

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Ipertensione e Rischio Cardiovascolare



**RUOLO DELLA VALUTAZIONE DELLA FUNZIONE
VENTRICOLARE SINISTRA MEDIANTE STRAIN
MIOCARDICO 2D IN PAZIENTI AFFETTI DA
INFARTO MIOCARDICO ACUTO ARRUOLATI
NELLO "STEM-AMI OUTCOME"**

RELATORE: PROF. GUIDO GRASSI
CORRELATORE: DOTT. FELICE ACHILLI

Dott.ssa Elisabetta SCANZIANI

Matricola: 042672

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	p. 4
1. L' INFARTO MIOCARDICO ACUTO (STEMI):	p. 4
Epidemiologia delle malattie cardiovascolari	p. 4
Eziopatogenesi dell'infarto miocardico acuto con ST sopraslivellato (STEMI):	p. 6
Diagnosi e stratificazione del rischio	p. 10
Rimodellamento ventricolare sinistro post-infartuale	p. 12
2. CELLULE STAMINALI E TERAPIA RIGENERATIVA:	p. 15
Cellule staminali e loro classificazione	p. 15
Proliferazione cellulare a livello del tessuto cardiaco	p. 22
Terapia rigenerativa miocardica	p. 27
Studio STEM-AMI Outcome: sinossi dello studio, emendamenti e stato attuale	p. 40
3. STRAIN MIOCARDICO:	p. 45
Meccanica miocardica	p. 45
Strain miocardico: definizione	p. 50
Metodi di misurazione dello strain miocardico	p. 53
Fattori modificanti e applicazioni cliniche dello strain miocardico (metodica speckle tracking)	p. 56
<u>SCOPO DELLO STUDIO</u>	p. 59
<u>MATERIALI E METODI</u>	p. 60
<u>RISULTATI</u>	p. 67
<u>DISCUSSIONE</u>	p. 72
<u>TABELLE E GRAFICI</u>	p. 76
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	p. 89

INTRODUZIONE

I. L'INFARTO MIOCARDICO ACUTO (STEMI):

EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Nonostante la mortalità cardiovascolare globale si sia ridotta durante le ultime quattro decadi, la cardiopatia ischemica (CAD) rimane responsabile di circa un terzo delle morti nella popolazione over 35 anni¹⁻²⁻³. È stato stimato che, negli Stati Uniti, quasi la metà della popolazione maschile sopra i 40 anni e un terzo della popolazione femminile sopra i 40 anni svilupperà una qualsiasi manifestazione di cardiopatia ischemica nel corso della vita⁴.

Inoltre, la riduzione della mortalità cardiovascolare mostra un'evidente distribuzione geografica ed economica⁵ e l'incidenza di CAD, con conseguente impatto sulla mortalità, risulta essere in significativo aumento nelle popolazioni dei paesi con economie in sviluppo⁶.

Globalmente nel 2012, circa 17.5 milioni di persone sono decedute per patologie cardiovascolari, rappresentando il 31% di tutte le morti mondiali.

Di queste, 7.4 milioni erano da riferirsi a CAD⁷.

L'infarto miocardico acuto può essere la prima manifestazione di CAD oppure può presentarsi, anche in maniera ripetitiva, in pazienti con cardiopatia ischemica ormai cronicizzata⁸.

Recenti dati epidemiologici mostrano, nelle ultime due decadi, una riduzione nell'incidenza di infarto acuto con sopraslivellamento ST (STEMI) a fronte di un incremento di incidenza di infarto senza sopraelevazione del tratto ST (NSTEMI): ciò potrebbe essere parzialmente spiegato da una più sensibile diagnosi del danno miocardico grazie all'introduzione di markers miocardici più affidabili (troponine ad alta sensibilità)⁹.

L'esatta incidenza di STEMI è di difficile stima e varia fra i diversi paesi. I registri nazionali e gli studi osservazionali sono forse più affidabili dei trial clinici perchè non sottoposti a bias di selezione: negli Stati Uniti, l'incidenza di STEMI, dai dati del National Registry of Myocardial Infarction viene stimata essere di circa 500,000 STEMI/anno; tra i registri europei, in quello svedese l'incidenza è di circa 66/100.000 abitanti all'anno e simili situazioni sono riportate anche in Repubblica Ceca e Belgio.

Nonostante quindi, la riduzione di incidenza, lo STEMI rimane un importante problema di salute pubblica mondiale in termini di morbilità e mortalità con importanti conseguenze anche sulla spesa sanitaria¹⁰.

Infatti, nonostante la mortalità a 30 giorni sia migliorata in maniera significativa, grazie alla

diffusione dell'angioplastica primaria, la sopravvivenza a lungo termine nella cardiopatia ischemica non ha subito modifiche rilevanti⁹⁻¹¹; dati europei confermano ciò e mostrano come la mortalità intraospedaliera nello STEMI varia tra il 6% e il 14%¹², confermano il trend in riduzione della mortalità dopo STEMI¹³ e come la mortalità a 6 mesi dall'evento rimanga del 12% ed ancora più alta nei pazienti ad alto rischio¹⁴⁻¹⁵.

La prevalenza dell' insufficienza cardiaca è di circa l'1-2% nella popolazione adulta dei paesi sviluppati ed aumenta sensibilmente fino al 10% nella popolazione sopra i 70 anni¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹.

Negli USA circa tre milioni di pazienti ed in Italia 700.000 sono affetti da scompenso cardiocircolatorio: rispettivamente circa 200.000 persone negli Stati Uniti e 40.000 in Italia muoiono ogni anno per tale condizione che rimane essere la principale causa di ospedalizzazione nella popolazione sopra i 65 anni²⁰⁻²¹

Le cause di insufficienza cardiaca possono essere molteplici e la cardiopatia ischemica rimane una delle principali; numerosi pazienti con storia di scompenso cardiaco concomitante a cardiopatia ischemica hanno in anamnesi un evento infartuale²².

L'insufficienza cardiaca secondaria a rimodellamento sfavorevole post-infartuale rimane quindi una delle principali cause di mortalità e morbilità a livello mondiale²³.

Come già sottolineato, la strategia riperfusiva precoce durante STEMI ha portato ad un significativo miglioramento della mortalità in acuto²⁴ senza che questa sia stata accompagnata da un miglioramento della funzione ventricolare sinistra a sei mesi nei pazienti riperfusi oltre la "golden hour"²⁵ con conseguente impatto sulla mortalità e morbilità a 12 mesi nei pazienti che sviluppano insufficienza cardiaca²⁶.

In considerazione delle limitate e impegnative opzioni terapeutiche a disposizione per la cura dello scompenso cardiaco secondario a rimodellamento negativo post-infartuale (trapianto cardiaco – assistenza ventricolare), la ricerca è in continua evoluzione verso la scoperta di nuove strategie di cura nei pazienti colpiti da STEMI.

EZIOPATOGENESI E DIAGNOSI DELL'INFARTO MIOCARDICO ACUTO CON ST- SOPRASLIVELLATO (STEMI)

L'infarto miocardico acuto rientra all'interno della famiglia delle sindromi coronariche acute; questi differenti entità cliniche sono tutte accumulate da instabilità coronarica e conseguente ischemia miocardica.

La sindrome coronariche acute comprendono:

- infarto miocardico acuto con ST-sopraslivellato (ST-elevated Myocardial Infarction, STEMI)
- infarto miocardico acuto senza ST-sopraslivellato (non ST-elevated Myocardial Infarction, NSTEMI)
- angina instabile

Dal punto di vista eziopatogenetico, la differenza tra le diverse sindromi è legata al grado e alla durata dell'ischemia.

La causa più frequente di sindrome coronarica acuta è l'instabilizzazione di una placca coronarica; nel caso dell'infarto miocardico acuto con ST-sopraslivellato (ST-elevated Myocardial Infarction, STEMI) è costituita da un processo trombotico occlusivo e persistente a livello di una arteria coronaria aterosclerotica in grado di portare alla morte delle cellule miocardiche tributarie a causa della prolungata ischemia.

In casi più rari le sindromi coronariche acute possono essere provocate da vasospasmo coronarico, fenomeni embolici, dissezioni coronariche spontanee e arteriti²⁷.

La trombosi coronarica è quindi solitamente il trigger scatenante l'ischemia miocardica acuta ed insorge su una placca aterosclerotica che ha un'improvvisa modifica di stato: da placca stabile ad instabile.

La placca aterosclerotica stabile e completamente formata, denominata dall'American Heart Association (AHA) di tipo IV o Va²⁸ è composta da un core lipidico circondato da una capsula di tessuto connettivale (FIG. I-intro).

Il core-lipidico è composto da colesterolo e da suoi esteri mentre nella capsula connettivale sono presenti grandi quantità di macrofagi che contengono un'abbondante quantità di colesterolo ("foam cells"). Questi macrofagi non sono inerti ma sono fortemente attivati e producono sostanze procoagulanti e proinfiammatorie quali tumor necrosis factor α (TNF α), interleuchina 6, PCR e metalloproteasi²⁹.

Il core lipidico e i macrofagi attivati sono entrambi circondati da una capsula di tessuto connettivo, prodotto da cellule muscolari lisce, che forma la capsula di separazione con il lume del vaso, ricoperta a sua volta dal tessuto endoteliale.

Gli stadi più precoci di formazione della placca (stadio AHA I e 2) non sono associati a danni strutturali del tessuto endoteliale al contrario di quanto avviene negli stadi più avanzati. La

progressione della placca fino allo stadio IV si accompagna nella maggior parte dei casi alla presenza di modifiche strutturali a livello dello strato endoteliale³⁰: l'endotelio attorno e al di sopra della placca mostra una aumentata replicazione cellulare rispetto alle normali arterie causando un'immaturità cellulare e un'alterazione della loro funzione. Questa disfunzione endoteliale è verosimilmente legata all'attivazione macrofagica in grado di provocare apoptosi delle cellule endoteliali. A livello della placca possono formarsi, quindi, focali aree di denudazione endoteliale che espongono la matrice connettivale portando alla formazione di un "monolayer" di piastrine (trombo ultramicroscopico) permettendo l'ulteriore evoluzione della placca verso l'instabilizzazione²⁷.

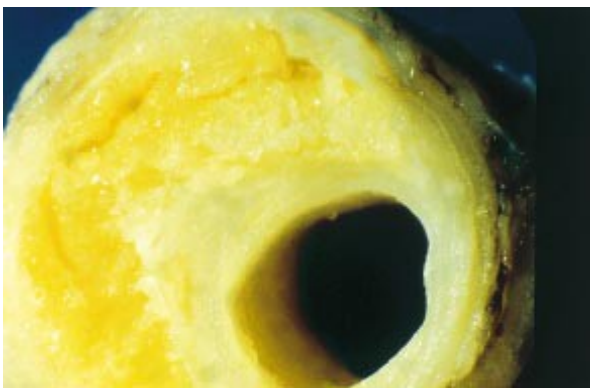


FIG 1-intro: Placca stabile.

Sezione di arteria coronarica umana con presenza di placca coronarica aterosclerotica fibrolipidica con core lipidico. Il core lipidico è separato dal lume del vaso tramite una capsula connettivale.

Il processo di trombosi della placca è conseguenza di uno di due possibili fenomeni distinti che riflettono

entrambi un aumento di attività infiammatoria a livello della placca³¹:

-erosione endoteliale (FIG. 2-intro): estensione del processo di denudazione endoteliale che porta all'esposizione di larghi tratti di matrice connettivale con conseguente formazione di trombo aderente alla superficie della placca. Questo fenomeno si osserva in circa il 50% delle trombosi coronariche nelle donne³².

-rottura della placca (FIG. 3-intro): fissurazione o rottura della capsula connettivale che permette l'esposizione del core-lipidico all'interno del lume del vaso. Il core lipidico è costituito da materiale altamente trombogenico che porta all'improvvisa formazione di trombo, dapprima intra-placca con conseguente distorsione della stessa e successivamente con trombosi endoluminale. La rottura di placca è la causa predominante (>85%) di trombosi nei maschi caucasici con elevata concentrazione plasmatica di LDL (low density lipoprotein) e bassi valori di HDL (high density lipoprotein)³³⁻³⁴

Tale distinzione non è di elevata importanza nella pratica clinica.

Il rischio di rottura della placca dipende dalla composizione, vulnerabilità e grado di stenosi della placca stessa³⁵.

C'è un'unanime consenso circa le caratteristiche della vulnerabilità delle placche, elencate qui di seguito³⁶:

- esteso core-lipidico (circa 50%) dell'intero volume della placca
- elevata densità di macrofagi
- bassa densità di cellule muscolari lisce nella capsula esterna
- elevata concentrazione di fattori tissutali
- sottile capsula esterna

Pertanto, quasi tre quarti dei trombi collegati ad infarto, sembrano evolvere su placche che causano una stenosi solo lieve o moderata.

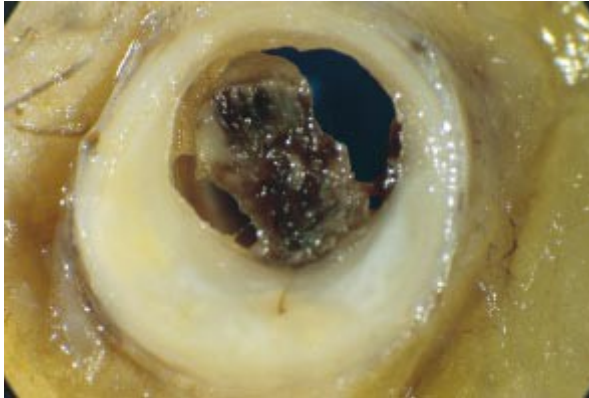


FIG 2-intro: Trombosi causata da erosione. Coronaria umana è in gran parte ostruita da una massa trombotica aderente alla superficie della placca. La placca è intatta.

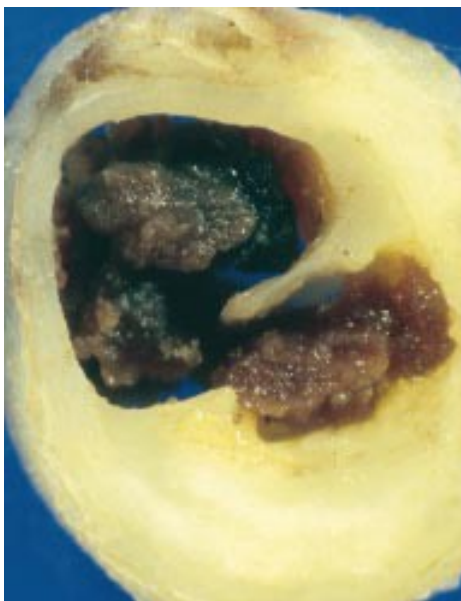


FIG. 3-intro: Trombosi causata da rottura di placca. La capsula della placca si è rotta e il core lipidico è stato proiettato verso il lume portando alla formazione del trombo endoluminale occludente il lume del vaso.

Sebbene porzioni dell'albero coronarico appaiano normali secondo criteri angiografici, spesso hanno un carico aterosclerotico importante. In particolare, placche con un sostanziale rimodellamento esterno, possono avere un cap fibroso sottile e un pool lipidico importante senza invasione del lume³⁷.

Inoltre, la risposta trombotica alla rottura di placca è dinamica: la trombosi e la lisi del coagulo, spesso associata a vasospasmo, si verificano contemporaneamente, e possono causare ostruzione del flusso e embolizzazione distale (FIG.4-intro).



FIG. 4-intro: Embolizzazione distale.

Ogni trombo (rosso) che protrude nel lume coronarico pur non occludente presenta sulla superficie delle piastrine attivate. Gruppi di piastrine possono essere trascinate nel letto vascolare miocardico

È frequente un ritardo (fino a due settimane) tra la rottura di placca e le sue conseguenze cliniche³⁸. La guarigione incompleta di una vecchia placca (ri-endotelizzazione incompleta) e la formazione di un trombo giocano un ruolo importante nell'improvvisa trombosi coronarica occlusiva.

La variazione circadiana dello STEMI con una più alta incidenza al mattino può essere spiegata dalla combinazione di stimolazione β -adrenergica, ipercoagulabilità del sangue e iper-reattività delle piastrine. Le attività associate con una aumentata stimolazione simpatica e vasocostrizione, come stress emotivi fisici o psichici, possono inoltre innescare la rottura di placca e la trombosi coronarica³⁹.

La necrosi miocardica causata dall'occlusione coronarica completa inizia circa dopo 15-30 minuti di ischemia severa e progredisce dal subendocardio al subepicardio in una maniera tempo-dipendente ('fenomeno wave-front').

La riperfusione può salvare il miocardio dal rischio di andare incontro a necrosi. Un flusso subcritico ma persistente può estendere la finestra temporale per salvare il miocardio.

La necrosi completa delle cellule miocardiche richiede almeno 2-4 ore per instaurarsi e inoltre questo processo dipende dalla presenza di circoli collaterali attorno alla zona ischemica, occlusione persistente o intermittente delle coronarie, la sensibilità dei cardiomiociti all'ischemia, predisposizione e rapporto tra domanda e offerta di ossigeno e nutrienti.

L'intero processo che porta alla guarigione richiede circa 5-6 settimane⁴⁰.

DIAGNOSI E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

Il termine infarto miocardico acuto (AMI) dovrebbe essere utilizzato in caso di evidenza di necrosi miocardica in corso di ischemia miocardica acuta.

I criteri per poter definire ciò sono l'associazione di salita o discesa in curva di marcatori biochimici di danno cardiaco associato ad una delle seguenti condizioni:

-sintomi di ischemia; prevalentemente il dolore/discomfort toracico della durata di almeno 10-20 minuti non responsivo (o parzialmente) alla somministrazione di nitroglicerina. Sono possibili altre localizzazioni del dolore (epigastrica/intrascapolare) e irradiazioni specifiche (collo, mandibola, braccio sinistro). Le caratteristiche e l'intensità del sintomo può essere atipica (in particolare in soggetti anziani o donne). Inoltre i pazienti spesso presentano segni e sintomi di accompagnamento per attivazione del sistema nervoso autonomo (pallore-sudorazione-ipotensione, ecc...).

-tipiche modificazioni ECG del tratto ST-T o nuova insorgenza di blocco branca sinistra (BBS). In particolare la diagnosi di STEMI è basata sul soprasslivellamento ST persistente in 2 derivazioni contigue o la presenza di BBS di nuova insorgenza.

-sviluppo di nuove onde Q patologiche

-perdita di miocardio vitale

-evidenza di trombo intracoronarico

Nel sospetto di infarto miocardico acuto, un elettrocardiogramma (ECG) dovrebbe essere eseguito non appena possibile. Anche in una fase iniziale, l'ECG è raramente normale.

In caso di STEMI o blocco di branca sinistra di nuova insorgenza, infatti, la terapia di riperfusione deve essere effettuata nel più breve tempo possibile.

Il prelievo di sangue per i marcatori sierici di necrosi è fatto di solito nella fase acuta, ma non si devono attendere i risultati per iniziare il trattamento di riperfusione. Solo talvolta l'individuazione di marcatori elevati di necrosi può essere utile per decidere se eseguire o no l'angiografia coronarica, ad esempio in pazienti con blocco di branca.

L'ecocardiografia bidimensionale è diventata una tecnica utile al letto dei pazienti con dolore toracico acuto. Anomalie regionali di cinesi di parete compaiono pochi secondi dopo occlusione coronarica, ben prima della necrosi miocitaria. Tuttavia, le anomalie della cinesi di parete non sono specifici per STEMI e possono essere causate anche da ischemia cronica o vecchio infarto. L'ecocardiografia bidimensionale ha un valore particolare quando la diagnosi di STEMI è incerta, e si sta facendo diagnosi differenziale con altre cause di dolore toracico acuto come la dissezione aortica, il versamento pericardico, o l'embolia polmonare. L'esecuzione di ecocardiografia non dovrebbe ritardare l'inizio del trattamento. L'assenza di anomalie di movimento della parete esclude ischemia miocardica maggiore.

Una rapida diagnosi e la precoce stratificazione del rischio dei pazienti che si presentano con dolore toracico acuto sono importanti per identificare coloro nei quali gli interventi precoci possono migliorare l'outcome ⁴¹

Età avanzata, elevata classe Killip, alta frequenza cardiaca, bassa pressione arteriosa sistolica e localizzazione anteriore dell'infarto sono stati identificati nei trials clinici⁴²⁻¹⁴ e nei registri⁴³ come i più importanti fattori predittivi indipendenti di mortalità precoce in caso di infarto miocardico acuto. Queste caratteristiche contengono la maggior parte delle informazioni prognostiche disponibili al momento del primo contatto medico. Altri predittori indipendenti sono precedente infarto, tempo di trattamento, diabete, peso / altezza e status di fumatore.

RIMODELLAMENTO VENTRICOLARE SINISTRO POST-INFARTUALE

Il rimodellamento ventricolare è un fenomeno complesso che inizia subito dopo l'evento infartuale, specie se transmurale.

Esso rispecchia per molti aspetti l'entità del danno miocardico e può essere visto come una risposta adattativa alla disfunzione.

È un processo progressivo che porta a gravi alterazioni della topografia ventricolare sia delle zone interessate della necrosi, sia in quelle remote e, in base all'entità e alla sequenza temporale con cui si manifesta, può avere ripercussioni sfavorevoli sia sulla morfologia del cuore che sulla prognosi⁴⁴.

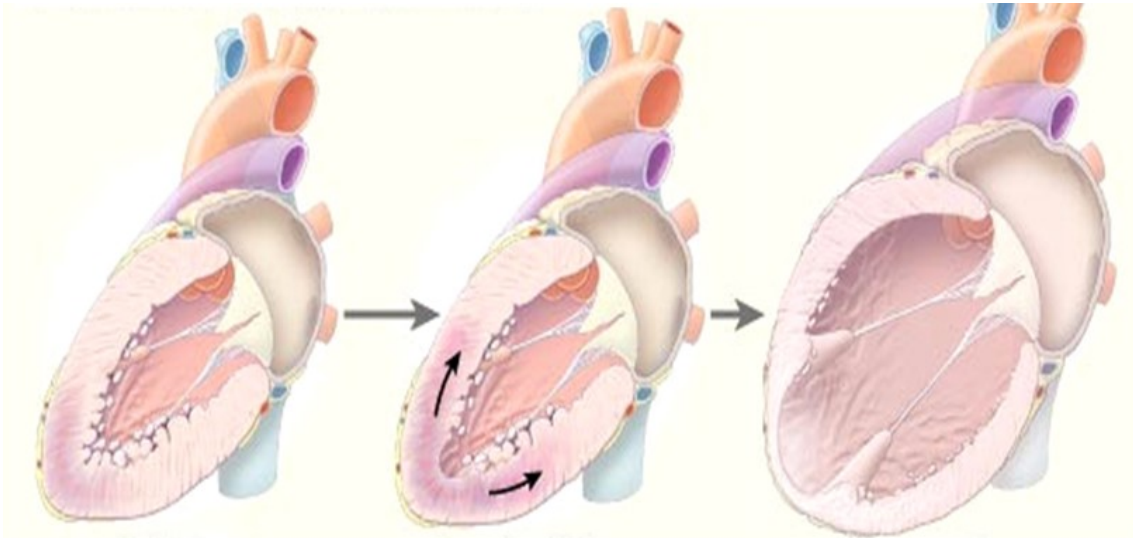
In letteratura, i sottoprogetti ecocardiografici di importanti trial farmacologici quali SAVE; GISSI-3. HEART e VALIANT, hanno dimostrato una diretta correlazione sfavorevole tra rimodellamento e prognosi in pazienti con IMA, anche dopo trattamento riperfusivo ottimale e terapia medica massimalizzata⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷⁻⁴⁸⁻⁴⁹.

Il processo di rimodellamento ventricolare è complesso e processo costituito dal susseguirsi di differenti meccanismi (FIG. 5-intro).

Innanzitutto interviene l'*espansione infartuale*: dilatazione e assottigliamento dell'area infartuata non spiegabile con ulteriore necrosi miocardica⁵⁰. Tale processo sembra essere dovuto a scivolamento tra i fasci muscolari riducendo così il numero di miociti a livello dell'area infartuata, rottura delle cellule miocardiche normali e perdita di tessuto nella zona necrotica. In secondo luogo subentra la *dilatazione della porzione vitale del ventricolo* che ha inizio nell'immediato post-

infarto e che prosegue nei mesi/anni successivi. Tale dilatazione può essere interpretata come un meccanismo compensatorio per far fronte alla nuova condizione emodinamica nel tentativo di mantenere una gittata sistolica adeguata. Oltre un certo grado, la dilatazione non è più compensatoria, genera a sua volta dilatazione (ipotesi fisiopatologica supportata da studi sulla funzione diastolica: ormai ampiamente accettato il ruolo prognostico del profilo diastolico transmitralico di tipo restrittivo⁵¹⁻⁵²) e può predisporre il paziente ad aritmie ventricolari potenzialmente letali⁵³

FIG. 5-intro: Remodelling post-infartuale:



A. Infarto miocardico B. Espansione dell'infarto(ore/giorni) C. Rimodellamento negativo(giorni/mesi)

È ormai noto da tempo che il processo di rimodellamento post-infartuale è influenzato da diversi fattori indipendenti⁵⁴:

- dimensioni dell'infarto e precocità di rivascolarizzazione: la riperfusione miocardica precoce si associa a riduzione dell'estensione dell'IMA con miglioramento della funzione regionale e talvolta, anche della performance globale del VS⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷

- transmuralità dell'IMA

- cicatizzazione infartuale

- stress di parete e profilo emodinamico

- pervietà del vaso responsabile della necrosi: effetto positivo indipendente dal salvataggio del miocardio ischemico attraverso un contenimento del volume sistolico ventricolare⁵⁸⁻⁵⁹

- ischemia miocardica residua

- interventi terapeutici successivi: es. ACE-inibitori⁶⁰⁻⁶¹⁻⁶² e beta-bloccanti⁶³

Come già sottolineato, la riperfusione precoce dell'arteria coronarica tributaria della zona infartuata rappresenta, oggi, uno dei mezzi più potenti a nostra disposizione in grado di salvaguardare il miocardio ischemico e limitare l'area infartuata nei soggetti con STEMI. Quando eseguita precocemente e da un'equipe di esperti, l'angioplastica coronarica con impianto di stent rappresenta il mezzo raccomandato per ristabilire il flusso coronarico⁶⁴. Sfortunatamente, la necrosi miocitaria inizia rapidamente dopo l'occlusione arteriosa, in genere prima che avvenga la riperfusione⁶⁵. Ciò spiegherebbe gli scarsi risultati delle tecniche riperfusorie nel migliorare la funzione ventricolare sinistra riportati in letteratura nei grandi trial.

Incoraggianti sembrerebbero i risultati di recenti ricerche che avrebbero dimostrato la capacità di replicazione di popolazioni di cardiomiociti all'interno del tessuto cardiaco⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸⁻⁶⁹⁻⁷⁰.

È in tale contesto che, negli ultimi anni, le comunità scientifiche si sono dedicate alla ricerca di nuove strategie per il management dell'infarto miocardico e il trattamento della disfunzione ventricolare sinistra. È proprio in questo ambito che sono andati sviluppandosi diversi studi finalizzati a valutare efficacia e sicurezza di un nuovo trattamento per la disfunzione ventricolare post-infartuale: la terapia cellulare.

2. CELLULE STAMINALI E TERAPIA RIGENERATIVA:

CELLULE STAMINALI E LORO CLASSIFICAZIONE

Le cellule staminali (Stem Cells, SC) sono cellule primitive, ossia non specializzate, dotate della capacità di trasformarsi nei circa 200 diversi tipi cellulari che formano l'organismo. Tale processo è possibile a partire dall'embrione e per tutta la durata della vita di ogni individuo; ciò è permesso da due fondamentali proprietà delle SC che le differenziano dagli altri tipi cellulari:

-capacità autorigenativa, per cui è sempre disponibile una riserva di SC. Tale capacità è definita *auto-rinnovamento*: ad ogni divisione cellulare, almeno una delle due cellule figlie mantiene la capacità di rinnovamento (ovvero rimane staminale).

-capacità di specializzazione in tutti i tipi cellulari di cui è costituito l'organismo; tale processo si chiama *differenziazione*: tramite vari stadi di maturazione, la cellula staminale diventa una cellula somatica, perdendo la capacità di differenziarsi (progenitori>precursori cellulari>cellula differenziata)⁷¹.

Pertanto, per le cellule staminali sono possibili due tipi di divisione cellulare: *divisione simmetrica* e *asimmetrica*. Nel primo caso, da una cellula staminale originano due cellule staminali; nel secondo caso, una delle due cellule resta staminale mentre l'altra inizia un processo di differenziazione, che attraverso diversi stadi di maturazione per cui si parla di progenitori e poi di precursori cellulari, diventa "adulta", ossia una cosiddetta cellula somatica (FIG. 6-intro)

Classificazione delle cellule staminali

La capacità di differenziarsi è quindi una caratteristica fondamentale delle SC che sono quindi in grado di diventare cellule di tessuti o di organi specifici con funzioni particolari. Tali cellule possono essere quindi classificate in base alla loro potenzialità di differenziazione, detta *potenza*, o alla loro origine.

La potenza delle SC può essere presente a diversi livelli classificandole in⁷²:

-cellule **TOTIPOTENTI**: livello massimo di potenza, per cui una singola SC può dare origine ad un intero organismo comprese le cellule trofoblastiche della placenta. Tale totipotenza è propria delle cellule embrionali nelle prime giornate dopo la fecondazione.

-cellule **PLURIPOTENTI**: cellule staminali della blastocisti, in grado di poter dare origine a tutti i tessuti dell'organismo, avendo però perso la capacità di dare origine a tessuti

extraembrionali (ovvero gli annessi embrionali)

-cellule **MULTIPOTENTI**: cellule in grado di differenziarsi in un range di linee cellulari tipiche del tessuto nel quale esse si trovano. Sono generalmente presenti nei tessuti adulti. Al contrario di quello che veniva tradizionalmente creduto, tali cellule però, benchè definibili cellule staminali "adulte", una volta rimosse dal tessuto originario posseggono la capacità di trasformarsi in cellule tipiche del nuovo ambiente tissutale nel quale vengono impiantate.

Questo fenomeno viene detto "plasticità cellulare", attraverso il quale, le SC possono differenziarsi in differenti tipi cellulari in risposta a segnali microambientali⁷³. Il cambiamento di differenziazione di una cellula staminale da una cellula di un certo tipo ad un altro è detto transdifferenziamento e la molteplicità dei possibili differenziamenti delle cellule staminali è nota come plasticità nello sviluppo.

-cellule **UNIPOTENTI**: livello minimo di potenza, per cui la cellula può trasformarsi in una sola specie cellulare tipica di un tessuto. Conservano però la capacità di autorinnovamento, possono quindi replicarsi all'infinito per rinnovare un tessuto.

Un'altra modalità di classificazione delle cellule staminali è in base alla loro origine:

-cellule staminali **EMBRIONALI**, se isolate dall'embrione. Hanno la proprietà (come già sottolineato) di poter generare tutte le cellule del corpo. Sono pluripotenti.

-cellule staminali **ADULTE**, cellule parzialmente specializzate. Posseggono ancora sia la capacità di autorinnovamento che di specializzazione con la possibilità di riparazione dei tessuti danneggiati. Sono in genere multipotenti o unipotenti.

Le cellule staminali adulte si trovano in molti tessuti e organi del nostro corpo: midollo osseo, cervello, intestino, ecc... e sono in sperimentazione per la cura di un gran numero di patologie e la ricerca a questo livello è in continua evoluzione.

-cellule staminali **FETALI**, cellule estratte dal feto durante il periodo dello sviluppo che va dalla decima settimana di gestazione fino alla nascita. Hanno le proprietà delle cellule staminali adulte ma con maggiori capacità di moltiplicarsi ed attecchire.

-cellule staminali del **CORDONE OMBELICALE**, sono cellule staminali del sangue. Posseggono caratteristiche simili alle cellule staminali del sangue del tessuto osseo dell'adulto con maggiori capacità di moltiplicarsi e attecchire.

-cellule staminali del **LIQUIDO AMNIOTICO**, posseggono caratteristiche miste tra quelle delle staminali embrionali e quelle delle staminali adulte.

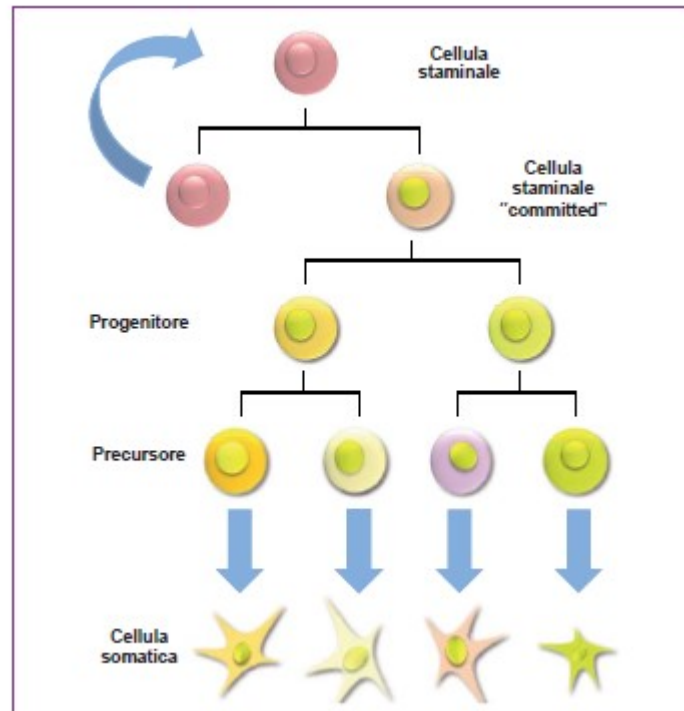


FIG. 6-intro: Divisione cellulare asimmetrica:

una delle due cellule che si originano in seguito alla divisione cellulare di una cellula staminale è "destinata" (in inglese "committed") a specializzarsi in uno dei possibili tipi di cellula somatica di cui è formato l'organismo.

Gli stadi attraverso cui passa prima di raggiungere la completa specializzazione sono quello di cellula progenitrice e di cellula precursore

Cellule staminali del midollo osseo

Il midollo osseo è un tessuto ricco di nutrienti e spugnoso localizzato soprattutto nella parte centrale delle ossa lunghe e piatte come lo sterno e le ossa delle anche.

La funzione primaria del midollo osseo è quella dell'emopoiesi, producendo tutte le cellule che troviamo nel sangue periferico.

L'attività del midollo dipende principalmente dalla presenza di due cellule staminali pluripotenti:

- cellule staminali EMATOPOIETICHE (Hematopoietic Stem Cells, HSC), responsabili dell'emopoiesi vera e propria

- cellule staminali MESENCHIMALI (Mesenchymal Stem Cells, MSC), capaci di differenziare in diverse linee cellulari⁷⁴⁻⁷⁵

In realtà, recentemente sono state individuate nel midollo osseo altre due popolazioni cellulari staminali: le cellule staminali multipotenti dell'adulto (Multipotent Adult Progenitor Cells, MAPC)⁷⁶ e le cellule progenitrici endoteliali (Endothelial Progenitor Cells, EPC)⁷⁷.

Le HSC sono in grado di differenziarsi nelle cellule della componente corpuscolata del sangue e sono in grado di ripopolare il midollo osseo in seguito a una deplezione causata da malattia o radiazioni. Tali processi sono regolate dalle caratteristiche del microambiente in cui si sviluppano le staminali ma subiscono anche l'influenza di organi lontani che producono molecole solubili, chiamate citochine, in risposta a differenti stimoli.

Questi fattori solubili sono in grado, legandosi a specifici recettori sulla membrana delle cellule, di spostare o accelerare la maturazione delle HSC verso un determinato tipo di cellula differenziata.

Infatti, le HSC possono essere prelevate direttamente dal midollo osseo, dal sangue proveniente dal cordone ombelicale e da quello circolante in soggetti che assumono citochine, come il fattore stimolante le colonie dei granulociti-macrofagi (GM-CSF), il quale mobilita la HSC.

La seconda osservazione fondamentale è che alcuni studi hanno dimostrato la possibilità che le HSC siano in grado di generare altri tipi cellulari differenti dalle cellule del sangue, come neuroni, epatociti ed altri tipi cellulari⁷⁸⁻⁷⁹.

Nella recente letteratura però, rimane fervida la discussione circa la plasticità delle HSC⁸⁰⁻⁸¹ ponendo dei dubbi circa questa capacità: in alcune situazioni, le HSC trapiantate si fondono con le cellule dell'ospite trasferendo il loro materiale genetico generando nuove cellule nell'ospite senza il fenomeno del transdifferenziamento⁸².

Inoltre, sebbene le HSC possano essere in grado di sostituire le cellule in tessuti danneggiati, sembra che non svolgano un ruolo nel mantenimento di questi tessuti in condizioni fisiologiche⁸⁰. Verosimilmente, la possibilità da parte delle HSC di generazione di cellule tissutali potrebbe avvenire soltanto a livello di territori lesionati, dove la risposta al danno recluterebbe cellule staminali dal midollo osseo per permettere la ripopolazione locale del tessuto. Inoltre, è verosimile che il principale contributo delle HSC nella riparazione dei tessuti non emopoietici non consista nella produzione di cellule per questi tessuti ma nella produzione di citochine e fattori di crescita che agiscono sulle cellule dei tessuti verso cui migrano, promuovendone la riparazione del danno e la replicazione cellulare.

Le *cellule staminali mesenchimali* (cellule staminali stromali del midollo osseo, MSC) sono cellule pluripotenti, di forma stellata, presenti in molti distretti del nostro organismo e che si differenziano dalle HSC per alcune importanti caratteristiche: reali capacità transdifferenziative, proprietà anti-infiammatorie/immunomodulanti e la funzione neuroprotettiva.

Sono proprio le MSC che gestiscono il microambiente della nicchia emopoietica favorendo da una parte la sopravvivenza delle HSC nel midollo ma al contempo mantenendole in uno

stato di quiescenza. Inoltre contribuiscono alla regolazione dei processi che governano il processo differenziativo delle HSC.

Le MSC, in relazione con l'ambiente tissutale, possono generare condrociti, osteoblasti, adipociti, mioblasti e precursori delle cellule endoteliali.

Le *cellule staminali multipotenti dell'adulto* (MAPC) sono una popolazione eterogenea di cellule staminali che sembrano avere una enorme capacità di sviluppo⁷⁶.

Oltre che a livello midollare, sono state isolate nel muscolo, nel cervello e nella cute e possono differenziarsi in differenti tipi cellulari come cellule endoteliali, neuroni, epatociti ed altri⁸³⁻⁸⁴. MAPC isolate in tessuti differenti, posseggono profili di espressione genica molto simili tra loro, suggerendo una possibile genesi comune.

Inoltre le MAPC potrebbero essere una popolazione di cellule staminali derivanti o strettamente correlate con le cellule staminali embrionali⁸³. Se questa ipotesi fosse corretta, la “plasticità” delle cellule staminali adulte potrebbe essere, in realtà, il processo di differenziamento in linee cellulari specifiche a opera di tali cellule multipotenti⁸⁵. Infatti le MAPC del midollo osseo di topo iniettate nelle blastocisti contribuiscono alla formazione di tutti i tipi di cellule somatiche a dimostrazione della loro pluripotenzialità⁷⁶.

Le *cellule progenitrici endoteliali* (EPC) sono cellule di derivazione midollare “migranti”, cioè dotate della capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature. Tali cellule esprimono marker endoteliali specifici simili a quelli delle cellule endoteliali e possono essere considerate progenitori delle cellule endoteliali mature⁸⁶. In particolare, le EPC identificate in modelli animali di ischemia tissutale sono considerate i veri elementi responsabili della vasculogenesi, considerata fino a poco tempo fa esclusiva della vita embrionale⁸⁷⁻⁸⁸⁻⁸⁹⁻⁹⁰.

I marcatori che caratterizzano queste cellule allo stadio più precoce di differenziamento siano comuni a quelli delle cellule staminali emopoietiche, il CD34+, il CD133+, ed il vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) o Flt-1⁸⁷.

A seguito dei lavori originari di Asahara et al, che per primi avevano isolato le EPC e dimostrato il loro contributo alla rivascolarizzazione post-natale, è stato confermato il ruolo cruciale delle EPC nel mantenimento della funzione endoteliale dei vasi sanguigni attraverso un continuo processo di re-endotelializzazione e neovascolarizzazione⁹¹.

Studi sperimentali condotti su differenti modelli di danno e riparazione cardiovascolare hanno sempre dimostrato come le EPC siano effettivamente responsabili della riparazione endoteliale e vascolare⁹².

A conferma di ciò, è stato dimostrato che, in seguito ad ischemia del tessuto scheletrico o

del miocardio, e/o a trattamenti con citochine quali il G-CSF (Granulocyte -Colony Stimulating Factor) e fattori angiogenici (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), le EPC sono mobilizzate dal midollo osseo nel circolo periferico (cellule progenitrici circolanti) e sono reclutate per formare nuovi vasi nei tessuti danneggiati⁹³⁻⁹⁴⁻⁷⁷.

Cellule staminali del midollo osseo

Oltre alle cellule del midollo osseo che possono migrare in un tessuto in seguito ad un trauma, esistono anche cellule staminali tissutali dell'adulto che si localizzano permanentemente a livello di molti organi. Tali cellule possono generare cellule mature degli organi nei quali risiedono.

A **livello epatico** è stato dimostrato che esistono cellule staminali nei canali di Hering, la giunzione tra le vie dei dotti biliari e gli epatociti del parenchima. Le cellule organizzate in queste nicchie possono dare origine a una popolazione di precursori cellulari noti come cellule ovali, progenitrici bipotenti in grado di differenziarsi in epatociti e cellule biliari⁹⁵. Contrariamente alle cellule staminali nei tessuti proliferanti, le cellule del fegato si attivano quando la proliferazione degli epatociti è bloccata. Nel caso di una parziale epatectomia o in seguito a lesioni necrotizzanti acute, gli epatociti stessi si replicano rapidamente e il compartimento delle staminali non viene attivato. Le staminali intervengono invece in seguito a danno epatico fulminante, cirrosi avanzata, epatite cronica ed epatocarcinoma, situazioni nelle quali la proliferazione degli epatociti è bloccata⁹⁶.

Cellule staminali neuronali sono state identificate in alcune aree del **cervello** di roditori adulti, il bulbo olfattivo e il giro dentato dell'ippocampo⁹⁷⁻⁹⁸⁻⁹⁹. La nestina, proteina dei filamenti intermedi, può essere usata come marcatore per istochimica al fine di identificare tali cellule¹⁰⁰. Ad oggi sembra che i neuroni generati ex novo nel cervello di mammiferi adulti si integrino funzionalmente nei circuiti nervosi¹⁰¹.

I **tessuti epiteliali** contengono cellule staminali, cellule in stadio intermedio altamente proliferanti che costituiscono il compartimento in espansione e cellule in diversi stadi di differenziamento. Le cellule completamente differenziate non si dividono e vengono continuamente perse dallo strato più superficiale dell'epitelio. In seguito al danno gli epiteli si ricostituiscono attraverso strategie non intercambiabili: con l'aumento di numero di cellule staminali in fase di divisione attiva, con l'aumento del numero di cellule che si replicano nel compartimento in espansione e con la diminuzione del tempo necessario per il ciclo cellulare.

Le cellule del **muscolo scheletrico**, al contrario degli epatociti, non si dividono in seguito a

lesioni. La crescita e rigenerazione dei muscoli scheletrici lesi avvengono attraverso la replicazione di cellule satelliti¹⁰². Queste cellule che si trovano al di sotto della lamina basale dei miociti, costituiscono un pool di riserva di cellule staminali che generano miociti differenziati in seguito ad un danno. Le cellule satelliti se disposte in altri tessuti possono essere osteogeniche o adipogeniche.

Recentemente qualche capacità replicativa è stata osservata nei **cardiomiociti**¹⁰³.

PROLIFERAZIONE CELLULARE A LIVELLO DEL TESSUTO CARDIACO

Il ciclo cellulare è costituito dalle fasi G_1 (presintetica), S (di sintesi del DNA), G_2 (premitotica) e M (mitotica). Le cellule quiescenti sono in uno stadio definito G_0 . I tessuti sono per lo più costituiti da cellule quiescenti in fase G_0 ; tuttavia molti tessuti maturi contengono una combinazione di cellule in continua divisione, cellule completamente differenziate, cellule staminali e cellule quiescenti che occasionalmente entrano nel ciclo cellulare.

Sulla base dell'attività proliferativa i tessuti possono essere suddivisi in tre gruppi¹⁰⁴.

Nei **tessuti in continua divisione (tessuti labili)** le cellule proliferano per tutta la vita, rimpiazzando quelle che vengono distrutte. Questi tessuti comprendono gli epitelii di rivestimento, come gli squamosi stratificati della cute, della cavità orale, della vagina e della cervice uterina; le mucose di tutti i dotti escretori delle ghiandole del corpo; l'epitelio del tratto colonnare del tratto gastrointestinale e dell'utero; l'epitelio di transizione del tratto urinario e le cellule del midollo osseo e dei tessuti ematopoietici. Nella maggior parte di questi tessuti le cellule mature derivano da cellule staminali che hanno capacità proliferativa illimitata e la cui progenie può andare incontro a percorsi differenziativi diversi.

I **tessuti quiescenti (o stabili)** normalmente hanno una bassa attività replicativa; tuttavia, le cellule di questi tessuti possono andare incontro a una rapida divisione in risposta ad una serie di stimoli. Sono quindi in grado di ricostituire il tessuto originario. Tali cellule si trovano nella fase G_0 del ciclo cellulare, ma possono essere stimolate a entrare in G_1 . In questa categoria rientrano le cellule parenchimali del fegato, dei reni, e del pancreas; le cellule mesenchimali, quali i fibroblasti e le cellule muscolari lisce; le cellule endoteliali, vascolari e i linfociti inattivi e altri leucociti. La proprietà rigenerativa delle cellule stabili è meglio esemplificata dalla capacità del fegato di rigenerarsi dopo una parziale epatectomia o dopo un danno chimico acuto. Fibroblasti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, condrociti e osteociti sono quiescenti nei mammiferi adulti, ma proliferano in risposta ad un danno.

I **tessuti non proliferanti (o perenni)** contengono cellule che hanno abbandonato il ciclo cellulare e che possono intraprendere divisioni mitotiche dopo lo sviluppo fetale. A questo gruppo appartengono, storicamente, i neuroni e le cellule della muscolatura scheletrica e cardiaca. Le cellule del muscolo cardiaco hanno una capacità rigenerativa limitata e una lesione grave al muscolo cardiaco, come può accadere nell'infarto del miocardio, è seguita dalla formazione di cicatrici.

In realtà ad oggi il modello del miocardio come tessuto non in grado di proliferare dopo la nascita è ormai superato. Ci sono infatti numerose evidenze che all'interno del miocardio esistono cellule che in seguito a danno entrano in fase attiva di proliferazione.

Anche il cuore non è un organo statico. Esistono numerose prove della dinamicità delle popolazioni cellulari cardiache¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

Come già accennato, in seguito ad un danno tissutale, nel cuore adulto avviene un processo di riparazione tissutale attraverso *due possibili forme distinte di rigenerazione*:

La *prima*, limitata alla parte intatta del miocardio, utilizza la riserva di crescita del tessuto vitale. Questo processo porta ad una ipertrofia dei miociti differenziati e coinvolge la replicazione dei miociti che hanno mantenuto la capacità di rientrare all'interno del ciclo cellulare e di dividersi¹⁰⁸.

La *seconda* interessa la riparazione della porzione necrotica del miocardio; può essere ottenuta grazie al recente sviluppo della terapia cellulare e si avvale di cellule esogene provenienti da varie fonti.

Abbiamo già sottolineato come l'affermazione secondo cui il cuore è un organo senza possibilità di replicazione cellulare ha perso consenso nella comunità scientifica¹⁰⁸⁻¹⁰⁵.

È stato dimostrato che la divisione mitotica è presente nei miociti¹⁰⁵ e questo implica che una popolazione di cellule parenchimali parzialmente differenziate si può dividere nell'organo adulto.

Sono disponibili sonde che permettono di ottenere una accurata valutazione dei miociti in ciclo. I regolatori chiave del ciclo cellulare dalla fase G₀ alla G₁ sono il gruppo delle *ciclina D*. In alcuni gruppi di miociti è stato identificato un aumento della *ciclina D2* e della chinasi associata alla ciclina D2, dimostrando che tali cellule hanno abbandonato la fase quiescente e sono entrate nel ciclo cellulare: l'aumentata espressione di ciclina D2 promuove la progressione dei miociti verso le fasi S e G₂-M prima della citocinesi¹⁰⁹.

Sono stati identificati anche altri marcatori capaci di riconoscere le varie fasi del ciclo cellulare: la sintesi del DNA può essere identificata per mezzo di nucleotidi modificati come la *bromodesossiridina (BrdU)*¹¹⁰ e l'immunofluorescenza permette poi di visualizzare l'incorporazione della BrdU nel DNA; anche l'*antigene nucleare di proliferazione cellulare PCNA*, la *proteina nucleare Ki67*, il *CDC6* e le *proteine del mantenimento dei microsomi MCM* sono stati impiegati come marcatori di proliferazione cellulare¹¹¹. Inoltre, le cellule in ciclo sono state identificate come miociti valutando la presenza di miofibrille e la co-marcatura con anticorpi diretti contro le proteine contrattili permette di riconoscere i miociti in divisione al microscopio confocale ad alta risoluzione.

In questo modo, sono stati identificati nei miociti tutti gli stadi della divisione cellulare e pertanto è stato possibile *dimostrare inequivocabilmente che i miociti cardiaci adulti possono andare incontro a proliferazione*.

L'indice mitotico dei miociti fornisce una importante misura della rapidità e dell'intensità della risposta della riserva di crescita a condizioni di stress. L'invecchiamento, il carico ventricolare, lo stress di parete, condizioni patologiche possono condizionare la proliferazione miocardica: in cuori infartuati, l'indice mitotico è 47 volte maggiore rispetto a ventricoli sinistri intatti. L'espressione di proteina Ki67 in cuori umani infartuati è 84 volte superiore a livello dell'area infartuata rispetto a cuori intatti e 28 volte superiore a livello delle aree distanti dall'infarto. Il numero dei miociti in ciclo è 3 volte superiore nell'area adiacente all'infarto rispetto ad aree lontane⁶⁹.

Al contrario, l'indice mitotico si riduce in cuori cronicamente scompensati di pazienti affetti da cardiopatia post-infartuale e cardiomiopatia dilatativa in fase avanzata¹¹², suggerendo che il carico eccessivo e la durata della patologia comportino un utilizzo progressivo della riserva proliferativa di cellule del miocardio, conducendo a scompenso terminale.

Meccanismi di rigenerazione del miocita

In letteratura sono stati descritti tre possibili meccanismi di rigenerazione del miocita¹¹³:

- a) All'interno del cuore adulto sembrano esserci *miociti parzialmente differenziati* in grado di andare incontro a un numero, seppur limitato, di duplicazioni prima di incorrere in un blocco mitotico.
- b) È stata evidenziata anche una popolazione di *cellule primitive residenti* che, in seguito ad attivazione, sono in grado di migrare nelle sedi di turnover cellulare, o di traslocare in aree adiacenti a quelle danneggiate, andando incontro a moltiplicazione e differenziazione. Tali cellule potrebbero essere in grado di generare miociti e vasi coronarici¹⁰⁸⁻¹¹⁴⁻¹¹⁵.
- c) Inoltre *cellule progenitrici circolanti* mobilizzate dal midollo osseo raggiungono il miocardio attraverso il circolo sistemico. Il microambiente locale sarebbe successivamente in grado di promuovere la differenziazione di tali cellule verso la linea delle cellule cardiache permettendo la sostituzione di miociti e le strutture vascolari

È ormai stato dimostrato come, dopo un evento ischemico cardiaco, esiste una mobilitazione spontanea di cellule staminali da midollo al sangue periferico⁹³⁻⁹⁴⁻⁷⁷⁻¹¹⁶.

Significativi sono, in particolare i dati di uno studio italiano che ha confrontato la mobilitazione spontanea di cellule staminali di derivazione midollare in pazienti con infarto miocardico acuto, angina cronica stabile e in un gruppo di controllo di pazienti sani¹¹⁷. Rispetto agli altri due gruppi, nel gruppo IMA venne dimostrato un incremento considerevole di cellule

CD34+ in prima, terza, quinta e settima giornata dall'evento acuto (FIG 7-intro).

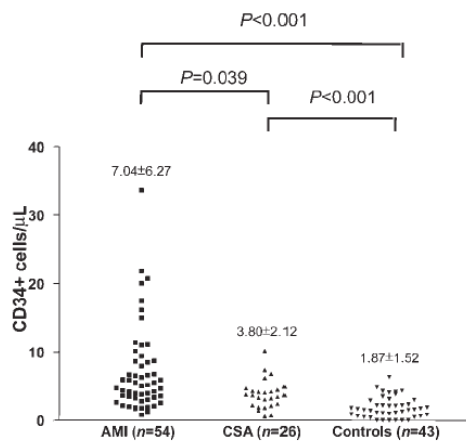


FIG. 7-intro. Numero di cell. CD34+ in paz. con IMA (infarto miocardico acuto), angina cronica stabile e gruppo di controllo

Il numero di cellule circolanti calcolato dalla prima alla settimana giornata, fu sostanzialmente simile (FIG. 8-intro), anche se la maggior parte dei soggetti mostrò una concentrazione di picco superiore in quinta giornata.

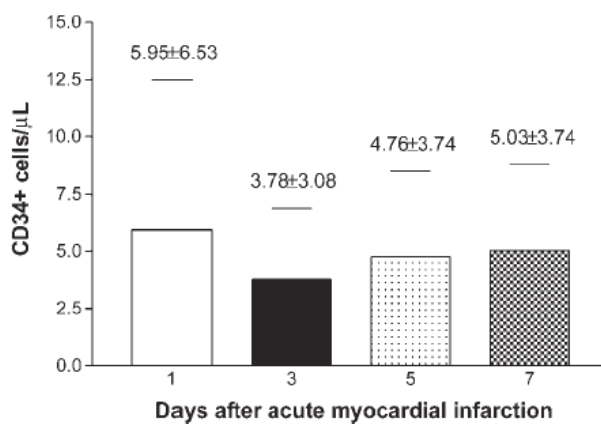


Figura. 8-intro. Numero di cell. CD34+, dopo IMA (infarto miocardico acuto)

La concentrazione di picco mostrò una importante variabilità tra i pazienti. Secondo l'analisi multivariata, i predittori indipendenti per il numero di cellule CD34+ circolanti erano rappresentati da IMA anteriore, esecuzione di angioplastica primaria e trattamento con statine già in corso, quest'ultimo in accordo con evidenze precedenti secondo cui l'attività pleiotropica delle statine si concretizzerebbe nell'espansione di cellule CD34+ e loro differenziazione in cellule endoteliali¹¹⁸.

Nessuna correlazione fu trovata tra il picco cellulare e la concentrazione dei marker di

miocitonecrosi e di infiammazione. Significativo è il fatto che, in fase acuta non si osservò relazione alcuna tra la funzione sistolica ventricolare sinistra e la concentrazione di cellule CD34+ circolanti. Tale concentrazione dimostrò, invece, essere predittore significativamente favorevole delle variazioni di funzione ventricolare al follow up (in termini di FEVsx, WMSI e volume telesistolico).

TERAPIA RIGENERATIVA MIOCARDICA

Queste evidenze hanno dimostrato l'enorme potenzialità delle cellule staminali come risposta ad un danno miocardico e come il cuore possieda un suo potenziale rigenerativo endogeno¹⁰⁵. La ricerca scientifica mirata alla rigenerazione miocardica, si è quindi sviluppata secondo due direzioni:

- somministrazione intracardiaca di “cellule staminali progenitrici”, già condizionate verso la riparazione di tessuto cardiaco
- reclutamento e mobilitazione di cellule staminali midollari verso il cuore, attraverso il potenziamento di fenomeni fisiopatologici

Non è ancora nota la più efficace modalità di somministrazione di cellule staminali nella fase post-infartuale. Le tecniche di somministrazione e trapianto cellulare, attualmente in fase di sperimentazione, sono le seguenti¹¹⁹:

- *iniezione intramiocardica diretta* attraverso l'*epicardio* (iniezione epicardica diretta). Tale modalità è stata utilizzata durante interventi di bypass aortocoronarico in molti studi clinici, quando il cuore è completamente esposto¹²⁰. Un importante vantaggio di questa tecnica è la diretta visualizzazione del miocardio e della cicatrice infartuale, permettendo l'iniezione di cellule staminali o di mioblasti scheletrici nella zona necrotica o nell'area circostante la necrosi. Tuttavia, l'applicazione di tale tecnica è limitata dall'approccio invasivo. Inoltre, in studi clinici in atto, l'efficacia del trapianto di cellule staminali risulta difficilmente valutabile, in quanto è stato eseguito contemporaneamente l'intervento di bypass aortocoronarico ed i reali benefici di tale tecnica sembrerebbero limitati dalla scarsa diffusione cellulare a livello dell'area infartuata¹²¹.
- *iniezione percutanea transendocardica*. Iniezione diretta di cellule nel miocardio attraverso cateteri dotati di un piccolo ago in punta: le cellule possono essere direttamente iniettate nell'endocardio della parete ventricolare. Tale metodica è stata associata all'esecuzione di tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo (SPECT) o al mappaggio elettromeccanico per individuare il miocardio vitale, ischemico e necrotico¹²²⁻¹²³. Tale procedura potrebbe essere molto utile nei pazienti con cardiopatia ischemica cronica, in cui l'occlusione dei rami coronarici e la scarsa quantità di segnali di “homing” cellulare, rilasciati dal tessuto cicatriziale, impediscono l'utilizzo di altre strategie di somministrazione (l'iniezione intracoronarica) o di reclutamento di cellule staminali (mobilizzazione dal midollo osseo mediante citochine)¹²⁴.
- *iniezione intramiocardica attraverso le vene coronariche*: procedura recente che rappresenta una nuova modalità di somministrazione permettendo l'iniezione di cellule staminali direttamente nel miocardio infartuato e nella zona perinfartuale¹²⁵. L'iniezione intramiocardica

di BMSC avviene le vene coronariche tramite un catetere dotato di guida ad ultrasuoni con un piccolo ago in punta: nel modello animale di cardiopatia ischemica, Thompson et al.¹²⁶ hanno effettuato iniezioni intramiocardiche nella parete anteriore, laterale, settale, apicale e inferiore del ventricolo sinistro, facendo avanzare il catetere nella vena coronarica interventricolare anteriore. Lo stesso approccio è stato utilizzato in un trial clinico pilota per iniettare i mioblasti scheletrici nel miocardio infartuato di pazienti affetti da cardiopatia ischemica cronica¹²⁷;

- *somministrazione intracoronarica*. È attualmente la modalità maggiormente utilizzata. La somministrazione di cellule staminali attraverso tale metodica permette il rilascio di un'elevata concentrazione di cellule nella zona ischemica utilizzando direttamente il vaso tributario del territorio ischemico. BMSC, EPC e MSC sono state iniettate attraverso iniezione intracoronarica in pazienti con IMA e cardiopatia ischemica cronica¹²⁸⁻¹²⁹⁻¹³⁰. La tecnica maggiormente utilizzata è denominata "stop-flow"¹³¹⁻¹³²⁻¹³³⁻¹³⁴⁻¹³⁵⁻¹³⁶⁻¹³⁷: è stato utilizzato un catetere con palloncino "over-the-wire", e, durante cicli di gonfiaggio/sgonfiaggio del palloncino, della durata di pochi secondi, le cellule sono state rilasciate nei vasi irroranti l'area circostante la necrosi. Tale metodica di iniezione aumenta il flusso di cellule staminali nella microcircolazione della zona perinfartuale rispetto all'iniezione delle cellule nel subendocardio o per via endovenosa¹³⁸, senza aumentare il rischio di ristenosi¹³⁹;

- *iniezione endovenosa sistemica*. È la tecnica meno invasive. Il razionale di tale metodica, risiede nella dimostrazione che il miocardio infartuato rilascia citochine e fattori di crescita in grado di richiamare nell'area ischemica cellule staminali circolanti nel sangue periferico e/o provenienti dal midollo osseo. È stato dimostrato come diverse popolazioni di cellule staminali (EPC, MSC e cellule staminali del miocardio positive per l'antigene Sca-1) sono in grado di raggiungere e colonizzare il tessuto miocardico ischemico¹⁴⁰⁻¹⁴¹. Tuttavia, dati recenti hanno dimostrato la possibilità che le cellule somministrate per via endovenosa, dopo IMA, rimangano intrappolate nei polmoni e in altri organi¹⁴².

- *trapianto intramiocardico di "bio-scaffolds"*: strutture bio-compatibili, in cui iniettare le cellule staminali¹⁴³. Tale tecnica è stata recentemente proposta da Feed et al¹⁴⁴.

Nonostante ci siano poche evidenze sperimentali a riguardo, particolare interesse è stato rivolto all'utilizzo di tale metodica. I "bio-scaffolds" garantiscono uno spazio tridimensionale, ricco di fattori di crescita e molecole di adesione, capace di stimolare la differenziazione e la maturazione cellulare¹⁴⁵. Se impiantati nel tessuto danneggiato, inoltre, forniscono un supporto meccanico in grado di promuovere la crescita cellulare e di rigenerare tessuti con appropriata struttura e funzione.

Applicazioni cliniche delle cellule staminali: focus sulla terapia cellulare nell'infarto miocardico acuto

Il primo studio clinico sull'utilizzo di cellule staminali per la promozione della rigenerazione cardiaca fu nel 2003 lo studio di Menasche¹²⁰. Tale studio dimostrò, rispetto ad un gruppo placebo-controllo, un incremento di funzione sistolica e contrattilità regionale del ventricolo sinistro in 10 pazienti sottoposti a by-pass aorto-coronarico nei quali furono iniettati mioblasti scheletrici durante l'intervento.

Da allora la ricerca scientifica ha proseguito gli studi in questo campo per valutare l'efficacia e la fattibilità della terapia con cellule staminali in pazienti affetti da IMA o scompenso cardiaco postinfartuale. Vista la complessità dell'argomento, la maggior parte sono studi di piccole dimensioni, non randomizzati e/o senza gruppi di controllo¹⁴⁶. Nonostante ciò, sebbene siano stati utilizzati differenti popolazioni di cellule staminali e diversi metodi di somministrazione, la terapia rigenerativa con cellule staminali sembra essere sicura, realizzabile¹¹⁹ e con risultati incoraggianti che dimostrano la verosimile efficacia di tali trattamenti.

Nel 2000, la National Library of Medicine ha istituito per conto dei National Institutes of Health un registro di tutti i trial clinici e l'International Committee of Medical Journal Editors richiede la registrazione del trial come prerequisito per la pubblicazione. Sono numerosi gli studi clinici sul ruolo della terapia cellulare nella cardiopatia ischemica ma la maggior parte dei trial riportati sono studi clinici di fase I. Pochi risultano i trial di fase II (studiati per fornire informazioni più dettagliate sulla sicurezza del trattamento e per valutarne l'efficacia), mentre non sono ancora stati raccolti dati su vasta scala e da un numero elevato di pazienti per confrontare la terapia cellulare con lo standard di cura in corso (studi clinici di fase III)¹¹⁹.

Come già accennato, la terapia cellulare per la rigenerazione miocardica nell'infarto acuto, si è sviluppata utilizzando differenti tipologie di cellule e di iniezioni:

-Terapia con *cellule mononucleate di midollo osseo – cellule staminali ematopoietiche (BMMNC)*: nei primi trial clinici fu utilizzata l'iniezione intracoronarica in pazienti postinfartuati basandosi sulle evidenze sperimentali sull'animale che avevano dimostrato che le BMSC erano in grado di raggiungere l'area ischemica e di differenziarsi in cardiomiociti e cellule endoteliali¹⁴⁷. Ad esempio, Strauer et al.¹⁴⁸, aspirarono BMMNC dal midollo osseo di 10 pazienti e lo reinfusero nel ramo coronarico responsabile dell'IMA, 7 giorni dopo l'evento acuto, dimostrando un significativo miglioramento della frazione di eiezione e della perfusione miocardica nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo.

Il trial Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)¹⁴⁹ randomizzò 59 pazienti, i quali ricevettero l'infusione intracoronarica di BMMNC (n = 29) o di cellule progenitrici derivate dal sangue

periferico (n = 30). L'iniezione fu intracoronarica ed in quarta giornata. I risultati dimostrarono, ad 1 anno, un aumento della frazione di eiezione e un incremento della motilità regionale nella zona infartuata. In particolare, significativo fu il dato di assenza di differenza statistica tra il gruppo trattato con BMMNC e quello trattato con cellule progenitrici derivate dal sangue periferico.

Anche nel Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration (BOOST)¹⁵⁰ trial è stata utilizzata iniezione intracoronarica di BMMNC nel post-angioplastica. I risultati dimostrarono, dopo 6 mesi, un miglioramento della frazione di eiezione nel gruppo trattato mentre dopo 18 mesi la differenza si appianava. Tali dati sembrano suggerire che la terapia con cellule staminali possa essere in grado di accelerare il miglioramento della funzione contrattile cardiaca postinfartuale che si ottiene con la terapia medica standard. Altri risultati favorevoli (sempre con somministrazione intracoronarica post-angioplastica) sono stati ottenuti nel trial Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI)¹⁵¹ con l'evidenza di miglioramento di funzione sistolica a 4 mesi.

Dati contrastanti sembrano essere stati ottenuti da Janssens et al.¹⁵² che non hanno dimostrato un miglioramento di frazione di eiezione in pazienti affetti da IMA sottoposti ad iniezione intracoronarica di BMMNC (studio, randomizzato, in doppio cieco con iniezione intracoronarica in prima giornata), sebbene ci fosse una riduzione significativa delle dimensioni della cicatrice infartuale e un incremento della funzione contrattile regionale del ventricolo sinistro. Anche il trial Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI)¹⁵³ non ha dimostrato nessun incremento, statisticamente significativo, della funzione contrattile globale del ventricolo sinistro nei pazienti trattati con BMMNC rispetto al gruppo di controllo.

In letteratura vi sono meno dati riguardo l'efficacia delle MSC (cellule staminali mesenchimali). In particolare, Chen et al.¹⁵⁴ dimostrarono un miglioramento della funzione contrattile regionale e globale e una significativa riduzione delle dimensioni del difetto di perfusione mediante infusione intracoronarica di MSC autologhe dopo IMA, suggerendo che le MSC siano in grado di rigenerare cardiomiociti funzionanti e vitali e ridurre il processo di rimodellamento postinfartuale.

Mobilizzazione di cellule staminali mediante G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor)

Oltre al tentativo di rigenerazione miocardica mediante utilizzo diretto di cellule staminali, è stata studiata anche la possibilità di somministrare citochine in grado di mobilizzare le

cellule midollari autologhe, potenziando risposte fisiologiche dell'organismo.

Una delle citochine maggiormente utilizzate è il C-GSF: citochina di derivazione emopoietica prodotta da monociti, fibroblasti e cellule endoteliali. Nell'organismo, in condizioni fisiologiche, la sua funzione è quella di regolare la produzione, il rilascio midollare e l'attivazione dei neutrofilo oltre alla proliferazione e differenziazione dei precursori dei neutrofilo¹⁵⁵.

Le forme sintetiche di G-CSF attualmente disponibili sul mercato sono tre:

- Filgastrim: forma non glicosilata
- Lenogastrim: forma glicosilata
- Pegfilgastrim: formulazione pegilata

Entrambi i farmaci sono stati sviluppati in ambito ematologico, dove sono state i primi trial clinici di fase I e le prime applicazioni cliniche. Alle dosi farmacologiche testate (da 1 fino a 70 mcg/kg/die) il G-CSF ha ricevuto l'approvazione dell'American Society for Clinical Oncology¹⁵⁶ per diversi ambiti di trattamento: neutropenia idiopatica cronica, trattamenti chemioterapici, recupero dall'aplasia midollare dopo trapianto autologo o allogenico di midollo¹⁵⁷.

A basso dosaggio (3.5-6 mcg/kg/die), il G-CSF è stato somministrato con successo, e con la minima tossicità, a soggetti normali sottoposti poi a leucoferesi per la raccolta di granulociti. Analogamente il G-CSF fu ben tollerato quando somministrato a soggetti sani per la mobilitazione e raccolta da sangue periferico di precursori cellulari¹⁵⁸⁻¹⁵⁹.

La somministrazione di G-CSF può essere sottocutanea o endovenosa. Solitamente è preferita la forma sottocute. La concentrazione plasmatica massima dopo somministrazione sottocutanea è tra le due e le otto ore; dosi di circa 3.5-11.5 mcg/kg determinano concentrazioni plasmatiche di circa 4 e 49 ng/ml rispettivamente. Tali concentrazioni non vengono quasi mai raggiunte dal G-CSF endogeno se non talvolta in caso di sepsi da germi gram negativi.

In letteratura non vi è stata segnalazione di alcuna interazione farmacologica rilevante¹⁶⁰ e non è richiesto aggiustamento posologico in caso di insufficienza epatica e/o renale e nella popolazione anziana.

L'attività del G-CSF è focalizzata alla stimolazione della proliferazione, differenziazione e funzione delle linee granulocitarie; in particolare gli effetti biologici del G-CSF sono:

- incremento della cinetica dei neutrofilo: aumentata produzione di polimorfonucleati, riduzione dose-dipendente del tempo di maturazione midollare, espansione del compartimento mieloide soprattutto a livello promielocitico e mielocitico
- attivazione di neutrofilo
- riduzione dell'attività infiammatoria tramite interazioni con citochine: incremento

dell'antagonista recettoriale dell'IL-1, aumentati livelli di recettori per il TNF, ridotto rilascio di TNF, aumento dell'IL-6, IL-8, IL-10

-incremento dei precursori cellulari circolanti: aumento plasmatico del numero di precursori periferici CD34⁺ di circa 15-35 volte i livelli basali, dopo somministrazione quotidiana per 5 giorni consecutivi¹⁶¹. Questo aumento sembra avere un incremento inversamente proporzionale rispetto all'età dei soggetti¹⁶².

-leucocitosi neutrofila dose-dipendente con picco a 12 ore dalla prima somministrazione persistente per circa 2-3 giorni (in media una somministrazione di 3-4 giorni genera un incremento di neutrofili e monociti di circa 8 volte, e un raddoppiamento dei linfociti); lieve calo dei livelli di emoglobina e della conta piastrinica; discusso e non chiaro effetto procoagulativo¹⁶³.

-parametri biochimici: incremento reversibile dei livelli plasmatici di fosfatasi alcalina, LDH, acido urico e colesterolo sierico; lieve riduzione della kaliemia e magnesemia

Nella tabella sottostante vengono elencati i principali effetti collaterali del G-CSF (FIG 9-intro).

Table 1. Summary of Clinical Toxicity of G-CSF in Normal Apheresis Donors

Reference	No. of Donors	G-CSF Dose and Schedule*	Bone Pain (%)	Headache (%)	Fatigue (%)	Miscellaneous (%)
Sato et al ^{46†}	15	2 µg/kg/d for 1-5 d	60 (low back pain)			Rash/fever (7)
Matsunaga et al ^{36†}	3	2.5 µg/kg for 6 d, then 5 µg/kg for 4 d	66	66		
Suzue et al ^{49†}	9	2-5 µg/kg/d for 5 d	100	100	100	Chest pain (80), vertigo and myalgia (40), anorexia (20) at the higher dose
Bensinger et al ⁷	8	3.5-6 µg/kg/d for 9-14 d	25			
Bishop et al ⁵⁵	25	5 µg/kg/d for 6 d	76	52		Fever (28), chills (20)
Russell et al ¹⁴	14	4.4-7.5 µg/kg/d for 2-4 d	100			Flu-like symptoms (43)
Stroncek et al ⁵⁶	62	2-10 µg/kg/d for 5 d	87; 90% taking analgesics at the higher dose level (n = 20)	35	18	Nausea (15), local reaction (10), night sweats (6), insomnia (6), dyspnea (3).
Grigg et al ⁴¹	28	3-10 µg/kg/d for up to 10 d	93; 86 at the higher dose level (n = 15)	33	63	Dizziness (20), flu-like symptoms (17), muscle pain (17), hyperventilation (3).
Dreger et al ⁴²	9	5-10 µg/kg/d for 5 d	100 at 10 µg/kg/d (n = 6)			
Schmitz et al ¹²	8	5-10 µg/kg/d for 5-6 d	66 at 10 µg/kg/d (n = 6)			
Azevedo et al ¹⁵	17	10 µg/kg/d for 5 d	100 (all donors taking minor analgesics)	100		
Lane et al ⁵⁷	8	10 µg/kg/d for 4 d			100	Myalgia (100)
Link et al ³⁹	10	5 µg/kg/d bid for 5 d	70	70		
Kadar et al ⁵⁴	29	5 µg/kg bid for 5-7 d	90	11	6	Sleep disturbances (3)
Körbling et al ²⁷	41	6 µg/kg bid for 4-6 d	63	76		Ankle swelling (13), fluid retention/weight gain (28)
Anderlini et al ⁵⁸	77	6 µg/kg bid for 4-6 d	82 (69% of donors taking minor analgesics)	69	35	Nausea (10)
Bensinger et al ¹³	8	16 µg/kg/d for 5 d	25			
Weaver et al ¹⁰	4	16 µg/kg/d for 5 d	100			
Weinthal et al ⁵⁹	19	16 µg/kg/d for 5 d	47 (ostealgia requiring narcotic analgesia or headache)			Nausea (10)

Abbreviation: bid, twice daily.

* Administered by subcutaneous injection.

† Glycosylated G-CSF (lenograstim).

Figura 9-intro. Effetti biologici e clinici del G-CSF in soggetti sani¹⁵⁵.

Gli eventi avversi principali consistono in dolori ossei, cefalea, astenia e nausea. Ansia, dolore toracico non cardiaco, mialgie, insonnia, sudorazione notturna, rush cutanei, anoressia, incremento ponderale, reazioni locali in sede di iniezione, vomito, sono stati occasionalmente riportati. I sintomi, in genere, scompaiono dopo pochi giorni dall'interruzione del trattamento e solo in un caso sono perdurati per circa una settimana¹⁵⁵.

Le basi teoriche per l'utilizzo terapeutico del G-CSF nell'infarto miocardico acuto sono l'evidenza che, durante infarto miocardico acuto, la somministrazione di questa citochina in aggiunta a quella fisiologicamente prodotta, stimola la mobilizzazione di cellule progenitrici endoteliali nel sangue periferico¹⁶⁴.

Il processo di mobilizzazione delle cellule progenitrici endoteliali sembra essere mediato dal legame del G-CSF con il diretto recettore presente sulla superficie di membrane; una via verosimilmente interessata potrebbe essere quella di SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) e del suo recettore CXCR-4, espresso sulla superficie delle cellule staminali ematopoietiche¹⁶⁵. È stato dimostrato che la concentrazione di SDF-1 nel midollo osseo decresce velocemente durante il trattamento con G-CSF¹⁶⁶. Tale riduzione è strettamente correlata all'aumento della mobilizzazione dei progenitori cellulari ematopoietici¹⁶⁷. L'inibizione del legame dell'SDF-1 con CXCR-4 conduce ad una rapida mobilizzazione di cellule ematopoietiche CD34+ dal midollo osseo al sangue periferico¹⁶⁸.

In letteratura vi sono ormai numerosi studi su animali che hanno dimostrato come la mobilizzazione di cellule staminali di derivazione midollare (BMSC) indotta da citochine dopo infarto miocardico acuto (IMA), è associata ad un più favorevole rimodellamento post-infartuale.

Il meccanismo di tale fenomeno rimane ancora non del tutto chiarito.

I principali studi hanno utilizzato G-CSF (da solo o in associazione con stem cell factor) in modelli di infarto miocardico acuto in differenti specie animali e tutti hanno dimostrato un miglioramento del rimodellamento ventricolare e della funzione sistolica:

-Minatoguchi¹⁶⁹; trial su conigli con dimostrazione che somministrazione di G-CSF dopo riperfusione in un modello di IMA porta ad un miglioramento della funzione ventricolare ed ad una riduzione del rimodellamento cardiaco.

-Harada¹⁷⁰ e Sugano¹⁷¹; somministrazione di G-CSF dopo l'evento ischemico infartuale in differenti modelli animali: miglioramento del rimodellamento ventricolare attraverso la sintesi del collagene ed aumento della sopravvivenza dei miociti cardiaci grazie all'inibizione dell'apoptosi.

-Ohtsuka¹⁷²; trial caso-controllo su ratti trattati con G-CSF da solo o in combinazione con

stem cell factor con dimostrazione di un miglioramento della funzione ventricolare e del grado di sopravvivenza dopo infarto

-Orlic¹⁷³; dimostrazione su ratti che la somministrazione di recombinant rat stem factor e recombinant human G-CSF dopo la legatura della coronaria discendente anteriore si associa ad un miglioramento della FEVsx oltre che alla formazione di nuovi miociti, arteriole e capillari.

-Iwanaga¹⁷⁴; studio su maiali che ha valutato la somministrazione di G-CSF dopo IMA con dimostrazione di miglioramento della funzione sistolica

Non vi è ancora completa conoscenza dei meccanismi attraverso i quali il G-CSF è in grado di portare ad un miglioramento della funzionalità cardiaca dopo infarto miocardico acuto. In particolare è ancora in discussione se gli effetti benefici della somministrazione di G-CSF dopo IMA siano da attribuire ad una azione diretta del G-CSF sui miociti o se siano dovuti a mobilitazione e differenziamento delle BMC.

Sembra che siano presenti entrambi questi effetti:

-effetti INDIRETTI: mediante l'azione delle BMC. Alcuni studi hanno mostrato che in topi trattati con G-CSF dopo infarto miocardico, si riscontra la presenza di miofibroblasti di origine ematopoietica a livello cardiaco. Pertanto, il G-CSF sarebbe in grado di mobilitare cellule staminali di origine ematopoietica dal midollo osseo e di indurre la differenziazione in miofibroblasti a livello del tessuto cardiaco¹⁷⁵.

-effetti DIRETTI: è stata dimostrata un'azione diretta del G-CSF a livello del tessuto cardiaco. Il recettore per il G-CSF è espresso sui cardiomiociti e l'apoptosi dei cardiomiociti indotta da idrogeno perossidasi dopo infarto miocardico si riduce se si somministra G-CSF¹⁷⁰. Questo indicherebbe che il G-CSF ha un effetto antiapoptotico diretto sui cardiomiociti indipendente dalle cellule staminali. Il meccanismo molecolare coinvolto in questo processo cardioprotettivo è mediato da Janus kinase /Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Jak2/STAT3) ed è attivato dal legame del G-CSF con il suo recettore¹⁷⁰.

Un'altra azione diretta potrebbe essere mediata dall'ossido nitrico: la somministrazione di G-CSF dopo IMA in ratti ha portato ad un aumento dell'ossido nitrico a livello cardiaco e ad una riduzione dell'area infartuata¹⁷⁶.

Infine, sembrerebbe che il G-CSF è in grado di ridurre l'infiammazione a livello del tessuto cardiaco dopo un evento infartuale, mediante l'inibizione mediatori infiammatori principali come l'interleuchina-1, il tumor necrosis factor- α e l'interferone- γ ¹⁷⁷⁻¹⁷⁸; tutto ciò contribuirebbe ad una attenuazione del rimodellamento ventricolare sinistro.

Nell'uomo, gli studi pubblicati riguardanti la mobilitazione di cellule staminali mediante la somministrazione di GCSF nei pazienti con IMA hanno dimostrato risultati contrastanti¹⁷⁹⁻¹⁸⁰.

181-182-183-184-185-186.

Uno dei primi trial di Valgimigli et al.¹⁸³ dimostrò una differenza significativa di FEVS e di VTDTVsx al follow-up su una larga scala di pazienti, sostenendone l'efficacia e la sicurezza sia a breve che a lungo termine.

Il trial FIRSTLINE-AMI¹⁸² ha evidenziato un significativo miglioramento della funzione ventricolare sinistra associato ad assenza di remodeling sfavorevole ad un follow-up di 1 anno. Tale studio aveva arruolato 30 pazienti consecutivi con STEMI candidati a PCI e randomizzati a terapia standard e terapia standard + G-CSF, 10 mcgr/Kg die s.c. per 6 giorni e aveva mostrato effettiva mobilitazione di cellule mononucleate CD34+, assenza di eventi avversi maggiori e gli effetti favorevoli sul rimodellamento già segnalati.

I successivi studi REVIVAL-2¹⁸⁴, STEMMI¹⁸⁵, G-CSF-STEMI¹⁸⁶ e Ellis e collaboratori¹⁸⁷ non hanno confermato l'efficacia di tale approccio: nessun miglioramento della funzione contrattile globale ed incremento del numero di restenosi nel follow-up. Tali studi, nonostante qualche differenza nel disegno del trial, hanno mostrato risultati simili tra loro.

Dati favorevoli sono stati invece pubblicati in studi più recenti: il RIGENERA STUDY¹¹⁷ e lo studio di Takano et al.¹⁸⁸. Entrambi gli studi sono stati effettuati su pazienti affetti da STEMI anteriore ed hanno mostrato effetti favorevoli della somministrazione di G-CSF in particolare sul miglioramento di FE.

Tabella I-intro Clinical trials sulla mobilizzazione con G-CSF nell'infarto miocardico acuto

Studio	Tipo	Numerosità del campione	Dose GCSF	Primary End-point
Valgimigli et al, 2005	RC	Control (n = 10) GCSF (n = 10)	5 µg/kg × 4 d	LVEF alla SPECT
Ince et al, FIRSTLINE-AMI 2005	RC	Control (n = 25) GCSF (n = 25)	10 µg/kg × 6 d	LVEF all'Echo
Zohnhofer et al, REVIVAL2 2006	RC	Control (n = 58) GCSF (n = 56)	10 µg/kg × 5 d	LVEF alla MRI e LVG
Ripa et al, STEMMI 2006	RC	Control (n = 39) GCSF (n = 39)	10 µg/kg × 6 d	LVEF all'Echo, e MRI
Engelmann et al, G-CSF-STEMI 2006	RC	Control (n = 21) GCSF (n = 23)	10 µg/kg × 5 d	LVEF alla MRI
Ellis et al, 2006	RC	Control (n = 6) LD GCSF (n = 6) HD GCSF(n = 6)	LD: 5 µg/kg × 5 d HD: 10 µg/kg × 5 d	LVEF all'Echo
Leone et al, RIGENERA STUDY, 2007	RC	Control (n = 27) GCSF (n = 14)	10 µg/kg × 5 d	LVEF all'Echo
Takano et al, 2007	RC	Control (n = 22) GCSF (n = 18)	2.5 µg/kg × 5 d	LVEF alla SPECT

Abbreviazioni: *bid*, due volte al giorno; *R*, randomized; *C*, controlled; *d*, days; *HD*, high dose; *Inc*, increase; *LD*, low dose; *LVG*, left ventriculography; *MRI*, magnetig risonance imaging; *Echo*, echocardiography; LVEF, left ventricle ejection fraction; *m*, mesi; *n*, numero.

Tabella 2-intro. Clinical trials sulla mobilizzazione con G-CSF nell'infarto miocardico acuto

Studio	Infarto anteriore	Timing	LVEF Baseline	Variazione statisticamente significativa di FE vs Controlli
Valgimigli et al, 2005	No	PCI < 12h post MI GCSF < 24h post PCI	G-CSF < 45% Control <45%	No variazioni nei valori assoluti Incremento nei valori %
Ince et al, FIRSTLINE-AMI 2005	No	PCI <5h post MI GCSF < 12h post PCI	G-CSF 48 ± 4 Control 47 ± 5	Incremento del 10%
Zohlhofer et al, REVIVAL-2 2006	No	PCI <12 h post MI GCSF 5d post PCI	G-CSF 51.3 Control 49.2	No variazioni
Ripa et al, STEMMI 2006	No	PCI < 12h post MI GCSF 28h post PCI	G-CSF 50 ± 10 Control 49 ± 10	No variazioni
Engelmann et al, G-CSF-STEMI 2006	No	6h>PCI<7d post MI GCSF 35 h post PCI	G-CSF 41 ± 12 Control 44 ± 9	No variazioni
Ellis et al, 2006	No	4h>PCI<12h post MI GCSF <30h post PCI	G-CSF < 40% Control <40%	No variazioni
Leone et al, RIGENERA STUDY 2007	Si	PCI <5d post MI GCSF 5d post PCI	G-CSF < 50% Control <50%	Incremento del 5%
Takano et al, 2007	Si	PCI <6h post MI GCSF <24h post PCI	G-CSF 47 ± 10 Control 46 ± 10	Incremento del 2%

Abbreviazioni: *d*, days; *n*, number; *h*, hours; *MI*, myocardial infarction; *PCI*, percutaneous coronary intervention

Dai dati finora riportati, la terapia con G-CSF, a partire dalle evidenze precliniche sui studi animali, sembra essere molto promettente.

Dati aggregati e meta-analisi¹⁸⁹⁻¹⁹⁰ hanno mostrato che il trattamento con G-CSF è sicuro in termini di restenosi dopo PCI o eventi avversi. Tuttavia tali meta-analisi hanno fallito nel dimostrare che la terapia con G-CSF ha portato ad un miglioramento della funzione e della struttura del Vsx in ogni tipi di IMA. Anche la capacità del G-CSF di promuovere la rigenerazione cardiaca dopo IMA rimane controversa.

La possibile spiegazione di tali risultati risiede verosimilmente nell'eterogeneità dei disegni degli studi, della dose di farmaco utilizzata, del campione analizzato e nella sua scarsa

numerosità (Tabella intro 1 e 2).

I fattori confondenti più significativi sarebbero infatti:

-la mancanza di un cut-off di funzione sistolica all'arruolamento nella maggior parte degli studi con arruolamento anche di pazienti con funzione sistolica conservata nei quali il beneficio della terapia con G-CSF è verosimilmente di scarsa importanza.

-assenza di uniformità per l'arruolamento, riguardo la definizione del criterio temporale dell'angioplastica primaria; la rivascolarizzazione precoce (entro la golden hour) sicuramente rende meno valutabile l'efficacia della somministrazione di C-GSF per la possibilità di minimizzare il danno cardiaco

-differenti dosaggi di G-CSF e differente tempistica di somministrazione. L'infusione di citochine precocemente rispetto all'evento infartuale, porta a raggiungere un picco di progenitori circolanti dopo 5-6 giorni dalla riperfusione¹⁶⁴, tempo in cui sembrano esserci condizioni più favorevoli per il reclutamento di cellule progenitrici a livello dell'area infartuata¹⁹¹

-eterogeneità nella modalità di valutazione dei risultati (RMN cuore, ecocardiografia, scintigrafia miocardica) e nella temporalità delle valutazioni.

-frequente esclusione di pazienti con caratteristiche prognostiche negative (es. Classe Killip 2 e shock cardiogeno, malattia coronarica multivasale). Proprio questa tipologia di pazienti potrebbe essere quella in grado di trarre maggiori benefici dalla terapia con G-CSF rispetto alla terapia convenzionale¹⁹².

Infatti, sottogruppi delle già citate meta-analisi di studi sulla somministrazione di G-CSF, hanno concluso che i pazienti con un'area infartuata di grandi dimensioni e con significativa disfunzione ventricolare, associate ad un inizio della terapia subito dopo la rivascolarizzazione sono quelli che possono trarre maggior beneficio dalla somministrazione di G-CSF¹⁹⁰.

In risposta a queste osservazioni è stato ipotizzato lo studio STEM-AMI trial (stem cells mobilization in acute myocardial infarction)¹⁹³: studio clinico di fase II, prospettico, randomizzato, singolo cieco, placebo controllo condotto per la valutazione della sicurezza e dell'efficacia della somministrazione precoce del G-CSF.

I criteri di arruolamento erano pazienti con infarto miocardico acuto ST sopraslivellato, sottoposti ad angioplastica primaria tra le 2 e 12 ore dopo l'insorgenza dei sintomi e con significativa disfunzione ventricolare dopo PCI (FEVS <45% entro 12 ore da rivascolarizzazione efficace: TIMI 2-3).

I pazienti totali arruolati sono stati 60, randomizzati a trattamento standard o trattamento standard + G-CSF; il dosaggio di G-CSF 5mcg/Kg bid/die per 5 giorni, entro 10 ore da rivascolarizzazione.

L'end point primario di questo studio è stato quello di un aumento del 5% della LVEF, misurata attraverso RM, a 5 giorni e a 6 mesi. L'end point secondario è stato quello di un miglioramento di ≥ 20 mL nella differenza tra i volumi telediastolici (LVEDV). La zona infartuata e la perfusione miocardica sono state valutate attraverso l'utilizzo di late gadolinium enhancement (LGE) e di gated ^{99m}Tc Sestamibi single-photon emission computed tomography (SPECT).

I risultati dello studio hanno mostrato come, a 6 mesi dall'evento acuto, non vi era differenza fra i due gruppi in termini di funzione sistolica; tuttavia, i pazienti trattati con G-CSF non mostravano aumento di volume telesistolico e telediastolico al contrario del gruppo placebo ed è stata dimostrata una significativa riduzione dell'area infartuata nel segmento transmurale LGE nel gruppo trattato. A tre anni di follow-up, l'effetto favorevole sul rimodellamento ventricolare sinistro nel gruppo trattamento è stato mantenuto e l'effetto del G-CSF sembrava essere amplificato in caso di maggior tempo trascorso fra sintomi e riapertura coronarica¹⁹⁴.

Sulla base di questo studio, per poter valutare se l'effetto favorevole sul rimodellamento ventricolare sinistro possa influenzare positivamente la prognosi a lungo termine e ridurre la mortalità e/o la morbilità cardiovascolare, è stato disegnato uno studio di fase III, denominato STEM-AMI Outcome.

STUDIO STEM-AMI OUTCOME (Stem Cells Mobilization In Acute Myocardial Infarction Outcome Trial): sinossi dello studio, emendamenti e stato attuale

Studio nazionale, multicentrico, randomizzato, aperto, di fase III, conforme alla Dichiarazione di Helsinki.

Popolazione e randomizzazione

Popolazione candidabile allo studio: pazienti con infarto miocardico anteriore acuto sottoposti a PCI primaria (symptoms-to-balloon in un tempo ≥ 2 ore e ≤ 12 ore o ≤ 24 ore se i sintomi persistono) o sottoposti a PCI-rescue con persistente occlusione del vaso responsabile, e con ripercussione efficace (TIMI flow ≥ 2). Prima della randomizzazione, ed entro 24 ore dalla PCI, deve essere fatto un esame ecocardiografico in 5 sezioni (asse parasternale lungo, corto, 4, 2 e 3 camere) al fine dell'arruolamento: la funzione sistolica biplana pre-arruolamento deve essere $\leq 45\%$.

Se sono rispettati anche gli altri criteri di inclusione ed esclusione e sottoscrive il consenso informato, è possibile l'arruolamento del paziente che viene randomizzato a terapia standard o terapia standard+C-GSF mediante un WEB-based system.

Il numero dei pazienti necessary da arruolare per potenza statistica è stato stimato in 1530 pazienti, randomizzati 1:1 (765 pazienti per ogni gruppo) in circa 50 centri in tutta Italia. La durata dello studio è stata calcolata su 3 anni.

Lo scopo dello studio è dimostrare una riduzione dell'incidenza di eventi nel gruppo trattamento. È stato stimato che l'incidenza di eventi a 2 anni, nel gruppo di controllo, sia circa il 15% e si considera rilevante una riduzione di eventi del 25% a 2 anni.

Questo corrisponde ad un event rate dell'11.25%. Il calcolo del sample size per l'analisi finale è quindi basata su un event rate del 15% per il gruppo controllo e del 11.25% per il gruppo trattamento.

Il calcolo del sample size è stato, quindi, effettuato sulla base dei seguenti punti: distribuzione esponenziale, potere 80%, α 0.05, test a due code, tempo di reclutamento 3 anni, follow up 2 anni.

Durante la pianificazione dello studio il numero di eventi necessari è stato stimato essere 188 per il gruppo controllo. Sono quindi necessari 765 pazienti per gruppo per raggiungere questo numero di eventi.

Criteri di inclusione:

1. Pazienti affetti da STEMI anteriore sottoposti a PCI primaria o PCI-rescue con TIMI flow ≤ 1 alla presentazione

2. Symptom-to-balloon time ≥ 3 ore e ≤ 12 ore (o ≤ 24 ore in caso di persistenza dei sintomi)
3. Evidenza di disfunzione Ventricolare sinistra (FE biplana $\leq 45\%$) misurata entro 24 ore dalla rivascolarizzazione
4. TIMI flow ≥ 2 post PCI
5. Uomini e donne di età ≥ 18 anni e ≤ 80 anni
6. Consenso informato firmato prima dell'arruolamento

Criteri di esclusione:

1. Pregresso infarto miocardico anteriore
2. Infarto miocardico recente (nel mese precedente)
3. Nota pregressa disfunzione ventricolare sinistra (FE $< 45\%$)
4. Pazienti con evidenza angiografica di stenosi coronariche non trattabili mediante PCI ma candidati a by-pass aorto-coronarico (CABG)
5. Evidenza di valvulopatia con indicazione chirurgica
6. Pregresso intervento cardiocirurgico o PCI sulla discendente anteriore nei 6 mesi precedenti
7. Pregressa (nei 5 anni precedenti) o attuale documentazione di leucemia, malattie mieloproliferative o disordini mielodisplastici
8. Pregressa (nei 5 anni precedenti) o attuale documentazione di malattie neoplastiche
9. Hb < 10 mg/dL
10. Conta dei globuli bianchi (WBC) $> 25.000/mm^3$
11. Conta piastrinica $< 50.000/mm^3$
12. Sepsi
13. Nota malattia da HIV
14. Pregressa o attuale documentazione di patologie autoimmuni
15. Interstiziopatia polmonare
16. Documentazione di concomitanti gravi patologie (non cardiache) non adeguatamente controllate
17. Gravidanza o allattamento
18. Documentato abuso di alcool e/o droghe
19. Scarsa compliance
20. Partecipazione a studi clinici con altri prodotti sperimentali
21. Altra terapia con cellule staminali

Trattamento

Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Filgrastim Zarzio-Sandoz) 5 mcg/kg b.i.d. per 6 giorni (dal giorno 0 al giorno 5), entro 24 ore dalla riapertura del vaso nei pazienti randomizzati a trattamento. La concentrazione di globuli bianchi è ottenuta prima di ogni somministrazione di G-CSF e successivamente fino alla dimissione ospedaliera; la somministrazione viene interrotta definitivamente se la concentrazione di globuli bianchi supera $50 \times 10^3/\text{mm}^3$. Tutti i pazienti ricevono gli standard terapeutici migliori in accordo con le linee guida correnti per il trattamento dello STEMI e dello scompenso cardiaco¹⁹⁵⁻¹⁹⁶, indipendentemente dal gruppo di randomizzazione.

Disegno dello studio

È uno studio Fase III, randomizzato, in aperto, multicentrico.

I pazienti sono randomizzati in modalità 1:1 a ricevere G-CSF in aggiunta al trattamento standard (gruppo trattamento) o il trattamento standard da solo (gruppo controllo). La randomizzazione è completata attraverso WEB-based system.

La scelta di un protocollo in aperto è stata dettata dalla volontà di riflettere le reali condizioni di cura del malato, in realtà ospedaliere differenti e per non interferire sulla velocità e la semplicità di conduzione dello studio stesso.

Il protocollo prevede 6 punti di valutazione del paziente durante il follow up come riportato di seguito:

Assessment I: screening e randomizzazione (giorno 0); raccolta del consenso informato e valutazione dei criteri di arruolamento.

Assessment II: fase intraospedaliera (giorni 0-7).

Assessment III: a 1 mese dalla dimissione (giorni 30 ± 1 settimane).

Assessment IV: a 6 mesi dalla dimissione (giorni 180 ± 2 settimane).

Assessment V: a 12 mesi dalla dimissione (giorni 365 ± 2 settimane).

Assessment VI: a 24 mesi dalla dimissione (giorni 730 ± 4 settimane).

Serious Adverse Events (SAEs) e Adverse Drug Reactions (ADRs) vengono raccolti continuativamente dal consenso informato sino alla fine dello studio.

A 1, 6, 24 mesi dopo STEMI i pazienti sono sottoposti ad una visita controllo ed ECG a 12 derivazioni. A 6 e 24 mesi viene eseguito ecocardio color doppler 2D per valutazione di frazione di eiezione ventricolare sinistra e volumi biplani. Ad ogni visita vengono raccolti gli eventi avversi cardiaci o cerebrovascolari maggiori, definiti come morte per ogni causa, re-infarto miocardico, ospedalizzazione dovuta a scompenso, necessità di by-pass aorto-coronarico (CABG), PCI, aritmie cardiache maggiori, scompenso cardiaco, angiografia coronarica e ictus, oltre a eventi legati alla sicurezza come sanguinamenti, neoplasie, Serious

Adverse Events (SAEs) e Adverse Drug Reactions (ADRs).

A 12 mesi dallo STEMI l'outcome clinico è valutato tramite una telefonata e l'eventuale raccolta della documentazione clinica degli eventi di efficacia e sicurezza.

Un sottostudio in cui il paziente sarà sottoposto a risonanza magnetica sarà fatto a 7 giorni e a 6 mesi dallo STEMI, per valutare i cambiamenti della frazione di eiezione e dei volumi ventricolari.

End points

End point primario di efficacia:

- mortalità totale o,
- recidiva di IMA o,
- ospedalizzazione per scompenso cardiaco.

End point secondario di efficacia:

- mortalità totale
- recidiva di IMA
- ospedalizzazione per scompenso cardiaco
- rivascolarizzazione coronarica
- morte cardiovascolare
- stroke fatale e non fatale
- ospedalizzazioni per tutte le cause
- ospedalizzazioni cardiovascolari
- rianimazione cardiopolmonare/intervento appropriato di AICD

End point di safety:

- incidenza e severità di complicanze emorragiche
- incidenza di neoplasie
- incidenza di reazioni avverse e eventi avversi seri

Analisi di laboratorio

Emocromo completo, picco di Creatin Kinasi MB e Troponina-T ultrasensibile, proteina C-reattiva (PCR), NT Pro-Brain Natriuretic Peptide (NT Pro-BNP) all'arruolamento. L'emocromo è valutato ogni giorno sino alla dimissione in entrambi i gruppi e prima di ogni somministrazione di G-CSF nel gruppo trattamento.

Emendamenti al protocollo

Durante il primo anno di arruolamento è stato riscontrato un rate di arruolamento inferiore

alle attese (atteso 0.8/paziente al mese per centro), pertanto è stato deciso di proporre emendamenti con lo scopo di aumentare la popolazione potenzialmente arruolabile.

Una spiegazione del basso rate di arruolamento può essere la modifica dell'epidemiologia dello STEMI negli ultimi anni oltre ad una modifica dell'epidemiologia stessa dello STEMI che ormai presenta come prevalenti gli STEMI non legati alla discendente anteriore⁹⁷.

Il primo emendamento è stato approvato a luglio 2014 con l'estensione:

- del "symptom to ballon time" da 2 ore fino a 12 ore o 24 ore se persistenza di sintomi
- dell'età dei pazienti arruolabili da 75 a 80 anni
- ai pazienti con TIMI Flow I alla presentazione
- ad anamnesi di neoplasia solida e/o ematologica pregressa ma con 5 anni di follow up negativo.

A Maggio 2015 è stato proposto e approvato un secondo emendamento che ha consentito di arruolare pazienti con STEMI in qualsiasi sede, indipendentemente dal symptom to ballon time purchè inferiore a 12 ore o 24 ore se presenza di sintomi.

Le modifiche apportate dagli emendamenti sono state acetate sulla base di precedenti e recenti evidenze che considerano come elemento fondamentale determinante la prognosi la persistenza di disfunzione ventricolare sinistra anche dopo rivascolarizzazione efficace, indipendentemente dalla sede dell'IMA¹⁹⁸⁻¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

Stato attuale dello studio

Inizio arruolamento nel novembre 2013 con sospensione nel febbraio 2016 (durata prevista era 3 anni e 2 anni per il follow-up).

Tale sospensione è avvenuta per le conseguenze non predicibili sui costi legate al basso numero di eventi complessivo osservato a 6 mesi di follow up e per un rate di arruolamento inferiore all'atteso (verosimili conseguenze del cambiamento dell'epidemiologia dello STEMI e del migliore livello terapeutico di questa patologia).

Lo studio ha concluso con 532 pazienti arruolati costituendo il trial numericamente più rilevante mai condotto in terapia rigenerativa.

Il follow up di tali pazienti è in corso.

3. STRAIN MIOCARDICO:

MECCANICA MIOCARDICA

Il primo studioso che dimostrò la natura muscolare del tessuto cardiaco fu Niccolò Stenone nel 1664, fornendo la prima illustrazione dell'organizzazione ventricolare miocardica.

Da allora fu un susseguirsi di scoperte che hanno portato alla comprensione delle caratteristiche anatomiche e meccaniche di questo organo¹⁹⁹ (FIG. 10-intro).

Figura 10-intro.

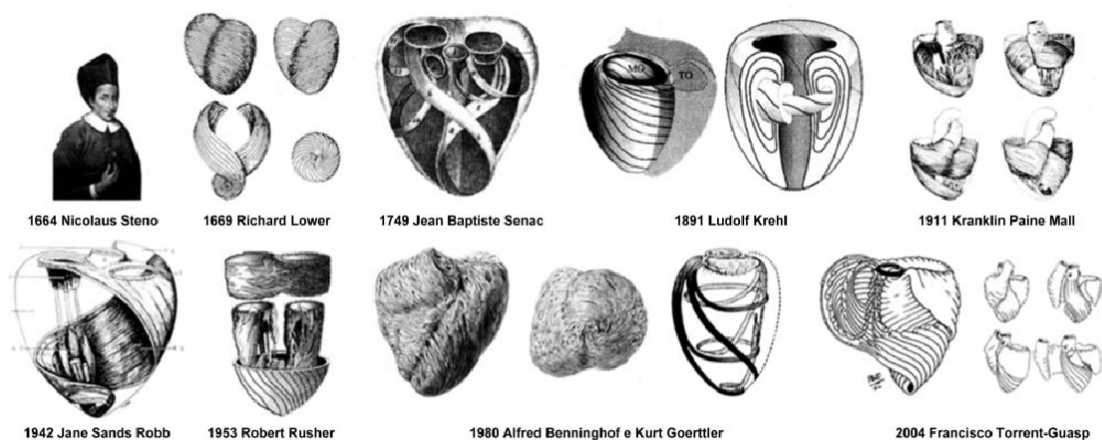


Fig. 1 - Iconografia degli studiosi che hanno contribuito alla comprensione dell'architettura ventricolare miocardica. Da M.J. Kocica et al. (11).

Il tessuto miocardico è costituito da cellule muscolari (i miociti) organizzati tra loro a formare un sincizio funzionale (le singole cellule mantengono una loro individualità ma presentano connessioni di tipo funzionale attraverso canali ionici).

I miociti sono inoltre organizzate in strutture costituite da 2 a 4 miociti denominate miofibrille che rappresentano l'unità strutturale del miocardio.

L'organizzazione spaziale delle miofibrille è fondamentale per la contrazione miocardica; la loro differente disposizione spaziale permette di riconoscere, a livello della parete miocardica, tre strati (subendocardio, strato intermedio e subepicardico).

Nello strato subendocardico le fibre sono orientate in senso longitudinale-obliquo dalla base verso l'apice, nello strato intermedio sono orientate in senso circolare, mentre lo strato subepicardico è formato dalle fibre dello strato subendocardico che riemergono in corrispondenza della punta e risalgono con andamento longitudinale-obliquo verso la base. Inoltre, le fibre miocardiche dello strato subendocardico sono disposte in modo tale da generare una variazione continua dell'angolo di orientamento rispetto alle fibre circolari dello

strato intermedio: in particolare, le fibre subepicardiche formano una spirale antioraria mentre quelle subendocardiche una spirale oraria. Si passa, cioè, da un'elica sinistrorsa nel subepicardio ad un'elica destrorsa nel subendocardio²⁰⁰⁻²⁰¹.

Entrambe le componenti hanno un ruolo fondamentale nella contrazione cardiaca; essa infatti non avviene in un'unica direzione ma dipende da un accorciamento longitudinale e circonferenziale, da un ispessimento radiale ed inoltre da una torsione delle fibre subepicardiche rispetto a quelle subendocardiche. La componente subendocardica ha un ruolo principale nell'accorciamento del ventricolo in senso longitudinale, mentre quella subepicardica interviene, assieme a quella mesoepicardica, maggiormente nel movimento in senso circonferenziale e alla rotazione ventricolare. All'ispessimento radiale contribuiscono invece entrambe²⁰²⁻²⁰³.

A causa della sua architettura tissutale, la contrazione sistolica del ventricolo sinistro non può essere riconducibile, come per il muscolo scheletrico che ha specifici capi tendinei di inserzione, ad un accorciamento secondo un'unica direzione. Il ventricolo sinistro, infatti, subisce in sistole differenti tipi di deformazione che interagiscono fra di loro in modo complesso²⁰⁴.

I principali tipi di deformazione miocardica che si generano in conseguenza dell'accorciamento delle fibre muscolari sono (FIG. 11-intro):

- l'accorciamento miocardico longitudinale
- l'accorciamento miocardico circonferenziale
- l'ispessimento di parete
- la torsione.

Il movimento miocardico durante la contrazione all'interno della gabbia toracica è quindi duplice: movimento di "spremitura" ("*wringing* o *squeezing motion*") legato alla disposizione a spirale dell'architettura miocardica e movimento di accorciamento longitudinale (abbassamento dell'anello mitralico), simile a quello di un pistone.

MECCANICA LONGITUDINALE E CIRCONFERENZIALE

La funzione longitudinale è l'accorciamento del diametro longitudinale del ventricolo sinistro. È un'importante determinante della gittata sistolica: durante la sistole l'apice è relativamente fisso mentre il piano dell'anello mitralico si abbassa verso la punta. Uno studio ha documentato con la RM che il 60% circa dello stroke volume viene generato dall'AVPD sia nei soggetti sani sia in pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa²⁰⁵.

In fase pre-eiettiva, gli strati subendocardici vengono attivati più precocemente e iniziano il loro accorciamento mentre alcuni strati subepicardici sono ancora in fase di allungamento. Durante l'eiezione tutti gli strati sono in accorciamento contemporaneo, benché si rilevi una maggior deformazione a livello degli strati subendocardici; tutto ciò comporta una

eterogeneità transmurale nell'accorciamento longitudinale, che si riflette in tutta la meccanica miocardica.

Anche l'accorciamento circonferenziale è di fondamentale importanza per una gittata efficace: diversi autori la considerano anche più rilevante dell'accorciamento longitudinale²⁰⁶.

La verità è verosimilmente quella descritta da Oki T e coll²⁰⁷ e di Ingles²⁰⁸ che sottolineano l'importanza dell'apporto combinato delle due componenti nelle differenti fasi del ciclo cardiaco: le fibre longitudinali realizzano la maggior parte della frazione di eiezione, cioè della riduzione del volume intracavitario del ventricolo sinistro; le fibre circonferenziali sono indispensabili per lo sviluppo della maggior parte della pressione intracavitaria del ventricolo sinistro, che contribuisce in modo determinante ad assicurare una normale gittata sistolica. In sistole l'accorciamento longitudinale si verifica prima dell'accorciamento circonferenziale cosicché le dimensioni del ventricolo sinistro lungo l'asse corto aumentano durante la contrazione isovolumetrica e la forma del ventricolo sinistro diventa più sferica.

MECCANICA ROTAZIONALE FISIOLÓGICA (TORSIONE)

Il meccanismo alla base della torsione è la particolare architettura delle fibre miocardiche con la disposizione a doppia spirale (ad elica) delle fibre longitudinali subendocardiche e subepicardiche.

La torsione rappresenta un meccanismo importante sia per la sistole eiettiva sia per il riempimento ventricolare:

-la torsione che si verifica durante la fase eiettiva è anti-oraria ("counter clockwise twisting"): si verifica nella direzione delle fibre subepicardiche, che hanno raggio maggiore rispetto a quelle subendocardiche e perpendicolare alle fibre dello strato subendocardico. La torsione dell'apice è maggiore della torsione dei segmenti medi mentre quella della base è minima dove avviene in senso orario (guardando il ventricolo dall'apice).

-Il riavvolgimento (untwisting) si verifica per la maggior parte durante la fase di rilasciamento isovolumetrico. In questa fase le fibre subepicardiche rilasciandosi si riavvolgono tornando nella loro posizione originaria; il riavvolgimento delle fibre subepicardiche fa sì che venga esercitata una forza di trazione sull'endocardio liberando l'energia potenziale immagazzinata durante la fase di twisting, contribuendo al riempimento ventricolare precoce.

MECCANICA FISIOLÓGICA RADIALE

Durante la fase sistolica si assiste all'ispessimento di parete che riveste un ruolo fondamentale nel sostenere la gittata sistolica. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare l'ispessimento miocardico. In particolare, il fenomeno dell'ispessimento miocardico sembra essere dovuto sia all'accorciamento in direzione longitudinale, sia a quello che è chiamato shear strain, ovvero la sovrapposizione per scivolamento degli strati di miociti fra loro. È stato evidenziato come la sovrapposizione sia maggiore negli strati subendocardici, che

saranno quindi quelli in cui si avrà un maggiore ispessimento. Ciò non è dovuto quindi ad una diversa contrattilità delle fibre subendocardiche rispetto alle subepicardiche, ma ad una differente architettura miocardica.

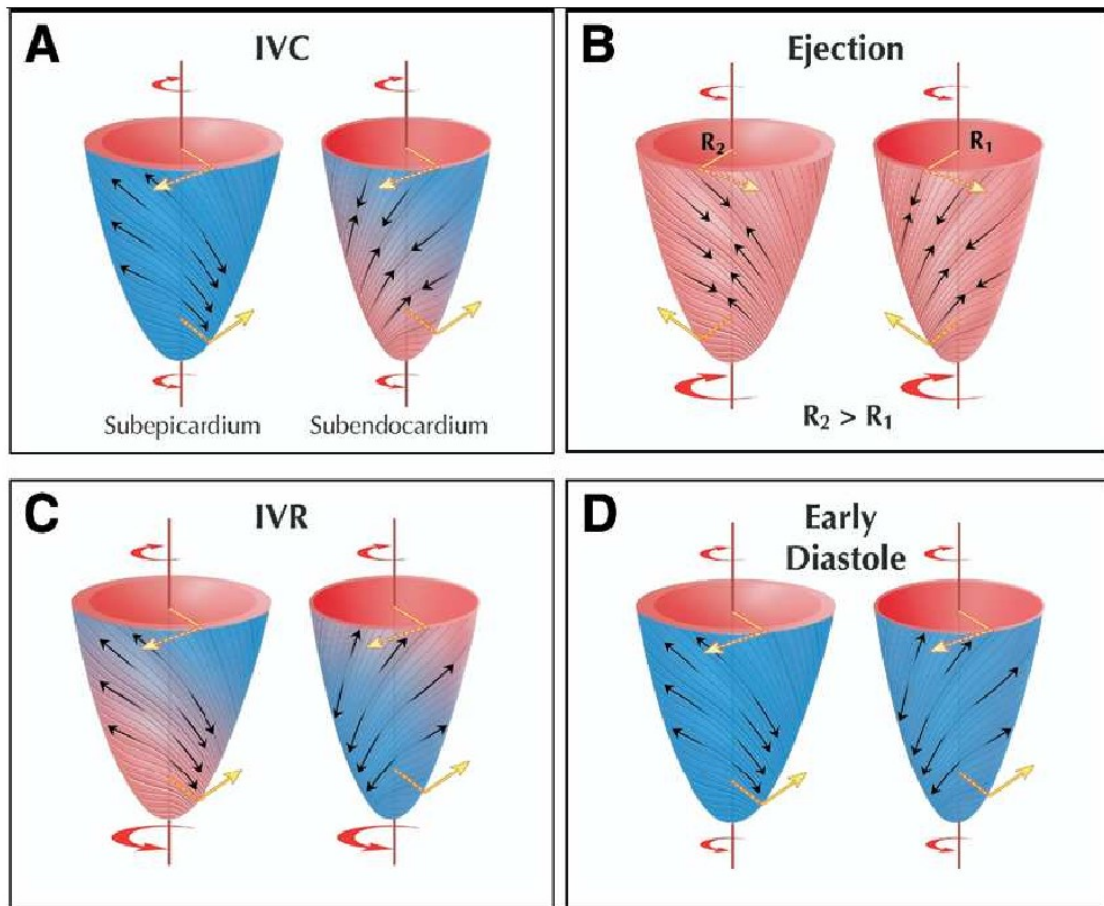


Figura 11-intro. Sequenza del meccanismo di twist spiegato in modelli animali. L'attivazione meccanica ed elettrica inizia nella regione subendocardica apicale. Durante la contrazione isovolumetrica (A) le fibre subendocardiche orientate ad elica destrorsa si accorciano con stretching delle fibre subepicardiche (orientate ad elica sinistrorsa), producendo una rotazione oraria dell'apice ed antioraria della base. Durante l'eiezione (B), gli strati subendocardico e subepicardico si accorciano simultaneamente, con un accorciamento maggiore a livello dell'apice rispetto alla base. Il braccio di leva più lungo a livello del subepicardio permette alle fibre di questo strato di dominare la direzione del twist, causando la rotazione dell'apice e della base in senso antiorario e antiorario rispettivamente. Durante il rilasciamento isovolumetrico (C) si osserva l'allungamento delle fibre subepicardiche dalla base verso l'apice e del subendocardio dall'apice verso la base. Il successivo periodo di diastole (D) è caratterizzato dal rilasciamento in entrambi gli strati²⁰⁹.

Meccanica di contrazione nel ventricolo patologico

Lo strato subendocardico è la porzione di miocardio più frequentemente interessata dai processi patologici, in particolare nell'ambito della cardiopatia ischemica, essendo più lontano dal flusso subepicardico. Inoltre esso è quello più esposto alle variazioni di pressione che si

verificano all'interno della cavità ventricolare ed è anche quello dove si sviluppa più facilmente la fibrosi.

È quindi evidente come la cardiopatia ischemica vada ad influire negativamente primariamente sulla deformazione longitudinale a cui contribuisce appunto maggiormente proprio tale strato. È stato dimostrato che lo strain longitudinale è significativamente ridotto nei pazienti con infarto miocardico acuto, proporzionalmente all'area infartuata e alla frazione di eiezione. La deformazione circonferenziale, rotazionale e radiale, invece, saranno interessate soltanto più tardivamente in quanto responsabili di esse sono prevalentemente gli strati medioparietale e subepicardico. Addirittura in alcuni casi si osserva un'esagerata compensazione di questi tipi di deformazione con una frazione di eiezione apparentemente conservata. Proprio per tale motivo, la frazione di eiezione è un parametro che non è sempre in grado di rilevare processi patologici miocardici in stadi molto precoci. È possibile quindi utilizzare il confronto tra i valori di strain circonferenziale, radiale e longitudinale per cercare di determinare l'estensione dell'area infartuata ottenendo una buona accuratezza diagnostica. Infine un danno miocardico transmurale, determinerà una modificazione sia della deformazione longitudinale, sia di quella radiale, circonferenziale e rotazionale, comportando una riduzione della funzione di pompa del cuore e andando quindi ad alterare in maniera significativa la frazione di eiezione.

STRAIN MIOCARDICO: DEFINIZIONE

Lo strain rappresenta una misura che valuta il grado di deformazione del segmento analizzato (deformazione miocardica locale durante la contrazione) in relazione alle sue dimensioni iniziali.

È un parametro adimensionale, espresso in percentuale e che esprime, convenzionalmente, la variazione di dimensione del materiale esaminato, in questo caso la fibra miocardica, in relazione alla dimensione al tempo 0 (FIG. 12-intro).

Per un oggetto monodimensionale è esprimibile come:

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0}$$

L_0 corrisponde alla lunghezza della fibra a stress 0

L corrisponde alla lunghezza della fibra dopo la deformazione²¹⁰

Per convenzione, l'equazione è posta in maniera tale che una deformazione in allungamento sia rappresentata da un valore di strain con segno positivo, mentre una deformazione in accorciamento sia rappresentata da un valore negativo. L_0 nel caso del miocardio, viene considerata la lunghezza del muscolo in telediastole. Dal momento che nel miocardio, ciò che è responsabile della deformazione è la contrattilità cardiaca, lo strain può essere considerato come un indice di funzione miocardica²⁰⁰.



$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Stipylon

Figura 12

Quando è nota la lunghezza al momento zero, successivamente alla deformazione e durante la deformazione, possiamo definire lo strain istantaneo:

$$\varepsilon(t) = (L(t) - L(t_0)) / L(t_0)$$

$L(t)$ è la lunghezza dell'oggetto all'istante di tempo t . In questo caso la deformazione istantanea è espressa in relazione alla lunghezza iniziale $L(t_0)$. Questo tipo di strain ε è detto lagrangian strain.

Tuttavia è possibile esprimere la deformazione miocardica anche in relazione alla lunghezza immediatamente precedente a quella dell'istante considerato:

$$d\varepsilon_N(t) = (L(t+dt) - L(t)) / L(t)$$

dove dt è un intervallo di tempo infinitamente piccolo;

$\varepsilon_N(t)$ è l'entità infinitesima di deformazione che avviene nell'intervallo di tempo considerato.

Lo strain ε totale, si ottiene sommando tutti gli ε infinitesimi

$$\varepsilon_N(t) = \int d\varepsilon_N(t)$$

$L(t)$ non è costante nel tempo ma cambia durante la deformazione stessa. Questo è definito strain naturale o ε_N .

A seconda del territorio analizzato possiamo definire lo strain come:

- strain principale, che esprime la deformazione di un singolo segmento;
- strain globale, media degli strain di tutti i 16 segmenti, che esprime la deformazione complessiva del ventricolo in quella direzione (longitudinale, radiale, circonferenziale);
- strain territoriale, che rappresenta la deformazione del territorio di irrorazione di ogni singola coronaria.

A seconda della direzione in cui analizziamo la deformazione lo strain può essere definito:

- strain longitudinale, ovvero deformazione lungo l'asse base-apice;
- strain radiale, ovvero deformazione verso il centro della cavità;
- strain circonferenziale, ovvero accorciamento delle fibre lungo la direzione del perimetro ventricolare.

In direzione longitudinale e circonferenziale avremo una deformazione sistolica in negativo, in quanto la deformazione in tali direzioni riflette l'accorciamento delle fibre cardiache durante la contrazione. In direzione radiale invece ci sarà un ispessimento in sistole perciò avremo una deformazione di segno positivo. Infatti se intendiamo come strain il movimento di 2 punti di miocardio vicini, essi si avvicineranno in direzione longitudinale e circonferenziale in sistole, poiché la fibra si accorcia; si allontaneranno invece in direzione radiale, quando la fibra si ispessisce, per poi avvicinarsi in diastole quando la fibra si assottiglia.

Parametri importanti da considerare quando valutiamo lo strain sono il picco di strain e il tempo di picco, ovvero il tempo in cui si raggiunge questo picco di deformazione. Entrambi

sono importanti per definire la funzione ventricolare sinistra in quanto la fisiologica efficace funzione ventricolare, dipende sia dal raggiungimento del picco di deformazione, sia dalla sincronia e quindi dal raggiungimento sincrono del picco da parte di tutti i segmenti.

Lo strain rate, ovvero la velocità di deformazione, è un altro parametro di valutazione della funzione miocardica. L'unità di misura con cui viene espresso è s^{-1} (o Hz). Come lo strain, sarà caratterizzata da segno negativo durante l'accorciamento delle fibre cardiache (contrazione) e da segno positivo durante l'allungamento (rilasciamento).

È bene sottolineare che quando parliamo di strain miocardico, facciamo riferimento ad un oggetto (il segmento miocardico) tridimensionale; un oggetto di questo tipo si deforma in maniera tridimensionale; ha quindi 9 componenti di strain che vanno considerate; ognuna di esse potrà avere diversi gradi di deformazione e diverse velocità di deformazione.

Lo strain viene valutato in tutto il ciclo cardiaco; la chiusura della valvola aortica è considerata come momento che divide la fase di telesistole dalla diastole. In particolare lo strain e lo strain rate sistolici, hanno caratteristiche peculiari nel miocardio ischemico. Non solo l'ischemia può tuttavia agire andando a modificare l'entità e l'andamento della deformazione.

METODI DI MISURAZIONE DELLO STRAIN MIOCARDICO

Attualmente sono disponibili due differenti metodi per calcolare la deformazione miocardica: lo strain derivato dal Tissue Doppler (Tissue Velocity Doppler Strain) e lo strain bidimensionale derivato dall'immagine ultrasonografica Bmode (Speckle Tracking Strain)²¹¹. Entrambe queste metodiche permettono l'analisi quantitativa della funzione miocardica e hanno mostrato la loro applicabilità in diversi scenari clinici.

Tissue velocity strain

Tecnica che consiste nella misurazione della velocità di spostamento delle fibre miocardiche parallelamente alla direzione degli ultrasuoni.

È una valutazione di tipo monodimensionale e permette il calcolo della deformazione lungo il fascio ultrasonoro attraverso la velocità (si fonda sulla determinazione dei gradienti di velocità regionali) e dunque solo lo strain e lo strain rate longitudinali nelle finestre apicali e lo strain e lo strain rate radiale dalla finestra parasternale. È una tecnica ben validata per il calcolo della deformazione miocardica²¹² e fattibile in ogni scenario clinico. I suoi limiti sono un'acquisizione non appropriata, l'angolo dipendenza e gli artefatti del post-processing.

Strain bidimensionale: speckle tracking strain

Il Two-dimensional Strain Imaging è una recente tecnica ultrasonografica che utilizza le immagini bidimensionali standard per l'analisi speckle tracking permettendo una valutazione obiettiva e quantitativa della funzione regionale e globale del miocardio.

Tale tecnica si basa sul fatto che le onde ultrasonore, interagendo con le fibre miocardiche, generano i cosiddetti speckles, ovvero markers acustici. Questi markers, assimilabili ai pixel in cui è scomposta l'immagine, vengono seguiti, attraverso specifici software, nel loro movimento durante tutto il ciclo cardiaco²¹³⁻²¹⁴.

Questa indipendentemente dall'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro e dai movimenti di traslazione cardiaca²¹⁰ apportando dei vantaggi rispetto alla tecnica TVI, non ultima una maggior rapidità e automaticità della metodica.

Inoltre esistono degli studi che confermano una superiorità di tale metodica nel differenziare i segmenti normali da quelli disfunzionanti²¹⁵⁻²¹⁶.

L'analisi speckle tracking avviene su una semplice immagine bidimensionale (in 2D) consentendo di seguire frame by frame gli spostamenti spaziali degli speckles (spots generati dall'interazione tra il fascio ultrasonoro riflesso e le fibre miocardiche). Questo pattern speckle è unico per ogni regione miocardica ed è relativamente stabile durante le fasi del ciclo cardiaco. Ciò consente di quantificare ogni tipo di deformazione della fibra cardiaca: sia longitudinale, sia radiale, sia circonferenziale, sia torsionale.

Viene registrata quindi un'immagine bidimensionale del ventricolo sinistro, effettuando tutte le varie sezioni apicali (4-2-3 camere) al fine di valutare tutte le pareti ventricolari. Per applicare la metodica è necessario utilizzare un frame rate di almeno 30Hz (il range ottimale è tra 50 e 80Hz). In seguito, una volta eseguito il tracking di una definita regione di speckle, lo spostamento di ogni speckle viene seguito durante il ciclo cardiaco, attraverso appositi software che, tramite un algoritmo ben definito, ne valuta il cambiamento fotogramma per fotogramma nella posizione geometrica e permette di calcolarne il displacement, la deformazione (strain) e la velocità con cui questa deformazione si verifica (strain-rate) in una definita regione miocardica.

Oltre ai parametri di deformazione circonferenziale permette di osservare se avviene la rotazione miocardica del ventricolo sinistro e la direzione e la velocità con cui questa si verifica.

Il tracking viene effettuato in questo modo: il contorno della camera cardiache (sulle varie sezioni acquisite) viene effettuato in maniera semi-automatica (vengono posizionati dall'operatore dei punti, almeno 3, e a partire da essi viene individuata automaticamente l'interfaccia tra cavità ed endocardio); successivamente viene individuata automaticamente la traccia epicardica e ogni parete viene divisa in 3 segmenti (basale, medio, apicale). Il software è in grado di riconoscere eventuali segmenti per i quali la tracciatura è considerata non corretta ma è compito dell'operatore la decisione finale sull'acquisizione, avendo anche facoltà di eliminare alcuni segmenti dall'analisi. Il processamento può essere ripetuto un numero infinito di volte. In seguito i vari segmenti vengono numerate e viene applicata una scala colorimetrica per facilitare visivamente la suddivisione in zone di contrattilità (rosso intenso è indice di una contrattilità normale, rosa pallido è indice di ridotta contrazione, azzurro è indice di una discinesia). Infine, rappresentazione grafica attraverso curve strain-tempo che evidenziano l'andamento temporale della deformazione dei singoli segmenti miocardici all'interno del ciclo cardiaco. Durante il processamento, viene chiesto all'operatore di individuare nel ciclo cardiaco, la chiusura della valvola aortica al fine di suddividere la sistole dal periodo postsistolico. Questa operazione viene fatta durante il processamento dell'immagine che descrive la sezione apicale 3 camere (APLAX), unica in cui è visualizzabile tale valvola. Da tutta questa operazione, vengono così estratti parametri importanti come lo strain di picco (ovvero il picco di strain che solitamente si trova in telesistole), lo strain postsistolico, e il post systolic index (parametro che esprime il rapporto tra lo strain postsistolico e telesistolico).

Anche lo studio dello strain mediante questa metodica ha tuttavia dei limiti. In particolare tra essi spiccano la dipendenza dalla qualità dell'immagine bidimensionale registrata necessitante

l'acquisizione con un frame rate adeguato. Inoltre vi sono diversi studi che sottolineano alcune difficoltà nella riproducibilità dello strain radiale, rispetto al longitudinale e al circonferenziale. Alcuni limiti potranno eventualmente essere superati dall'utilizzo più estensivo in future dell'ecocardiografia 3D che permette l'acquisizione di un volume e non di un singolo piano di scansione, permettendo di valutare meglio quelli che sono i reali movimenti delle fibre miocardiche, consentendo una maggiore precisione e attendibilità nella valutazione dello strain anche a livello apicale.

FATTORI MODIFICANTI E APPLICAZIONI CLINICHE DELLO STRAIN MIOCARDICO (metodica speckle tracking)

Lo strain miocardico calcolato mediante metodica speckle tracking, rispetto ai parametri ecocardiografici classici, è sicuramente una metodica più sensibile nella valutazione della funzione miocardica sisto-diastolica all'interno di un ampio range di condizioni fisiologiche e patologiche.

Infatti, è noto in letteratura come lo strain longitudinale sia direttamente correlato con la funzione sistolica del ventricolo sinistro (LVEF)²¹⁷⁻²¹⁸ ma anche che è in grado di riconoscere eventuali disfunzioni sistoliche precoci in pazienti con funzione sistolica conservata, attraverso l'analisi dei singoli segmenti²¹⁹

Ipertensione arteriosa

L'ipertensione arteriosa è un modello ideale per il monitoraggio dei vari gradi di modificazione della geometria miocardica fino allo sviluppo di ipertrofia concentrica.

L'ecocardiografia tradizionale è stata in grado di mostrare come un peggioramento della midwall fractional shortening precede la riduzione di funzione sistolica²²⁰.

La speckle-tracking echocardiography ci ha mostrato come l'interazione di queste progressive modificazioni sia più complessa. In particolare, ha dimostrato come lo strain longitudinale e radiale siano effettivamente ridotti mentre lo strain circumferenziale e la funzione di torsione del ventricolo sinistro rimangono nella norma ed anzi, quest'ultima, sembra fungere come meccanismo compensatorio per mantenere una normale funzione sistolica²²¹.

Questi risultati sono sostenuti da altri studi che dimostrano che in pazienti ipertesi, con funzione sistolica conservata, la riduzione di strain longitudinale e aumentata torsione ventricolare sono correlate ai livelli di metalloproteasi I, un marcatore di fibrosi miocardica e importante determinante di disfunzione diastolica²²².

Diabete Mellito

In pazienti diabetici asintomatici con funzione sistolica conservata è stato dimostrato come lo studio dello strain miocardico è in grado di evidenziare alterazioni subcliniche di contrattilità (in particolare come alterazione di strain longitudinale) prima che subentri una cardiopatia diabetica conclamata²²³⁻²²⁴⁻²²⁵.

Cardiopatia ischemica

In letteratura è stato dimostrato come un ridotto strain longitudinale possa essere, in pazienti asintomatici ed in assenza di dissinergie parietali regionali, un forte predittore di cardiopatia ischemica cronica²²⁶.

Studi in pazienti con infarto miocardico acuto hanno, inoltre, dimostrato come lo strain longitudinale sia correlato ai livelli di troponina T²²⁷ e con la dimensione dell'infarto²¹⁴. In più, quando misurato immediatamente dopo la riperfusione miocardica, lo strain longitudinale è

un forte predittore di rimodellamento ventricolare sinistro ed eventi avversi, come morte ed insufficienza ventricolare sinistra²²⁸.

La valutazione con la RMN cardiaca ha mostrato come lo strain longitudinale correla con l'estensione regionale e intramurale della cicatrice miocardica²²⁹⁻²³⁰.

Inoltre esistono dei valori di cut-off dello strain radiale (17.2%) in grado di predire il recupero miocardico funzionale dopo rivascolarizzazione con un grado di accuratezza simile alla predittività dell'iper-enhancement alla RMN²²². Per quanto riguarda lo strain longitudinale, il valore di -4.5% discrimina il miocardio vitale dalla cicatrice²³¹.

Recentemente, Voig e collaboratori hanno usato la metodica speckle tracking per validare l'analisi della motilità post-sistolica (parte di accorciamento che avviene dopo la chiusura della valvola aortica), identificando nell'indice post-sistolico (parametro che esprime il rapporto tra lo strain postsistolico e telesistolico) un importante marker quantitativo per l'analisi del miocardio ischemico²²⁴.

Cardiopatía valvolare

L'utilità dell'ecocardiografia con studio di strain e speckle-tracking echography è stata usata in maniera estesa nella valutazione della funzione sistolica mediante stress (esercizio fisico o farmacologico)²³².

Lancellotti et al²³³ hanno dimostrato che in pazienti asintomatici con rigurgito mitralico degenerativo, sottoposti a chirurgia valvolare, un ridotto strain longitudinale globale è predittore di una disfunzione ventricolare sinistra post-operatoria.

Inoltre, in pazienti con disfunzione valvolare aortica (stenosi o insufficienza) è stato dimostrato un aumento dello strain radiale e circonferenziale, confermando come questi parametri dipendano dalle condizioni di carico del ventricolo sinistro²³⁴.

Insufficienza cardiaca

È stato dimostrato come nello scompenso cardiaco a funzione sistolica conservata in pazienti ipertesi, lo strain ventricolare longitudinale ha un progressivo deterioramento dalla classe NYHA I alla 4; inoltre, anche lo strain radiale e circonferenziale hanno dimostrato una correlazione inversa con la classe funzionale²³⁵⁻²³⁶.

Per quanto riguarda la rotazione e la torsione ventricolare, è stato dimostrato come queste siano incrementate nella disfunzione diastolica iniziale mentre con la progressione della disfunzione e l'aumento delle pressioni di riempimento si ha una successiva normalizzazione ed infine una loro riduzione²³⁷⁻²³⁸.

Il primo studio longitudinale effettuato in pazienti con scompenso cardiaco a funzione sistolica ridotta ha dimostrato che lo strain circumferenziale globale è un importante predittore di eventi cardiovascolari²³⁹.

Un altro studio ha invece indicato come il global strain longitudinale sembra essere un

migliore predittore di outcome se confrontato con funzione sistolica e wall motion score index²⁴⁰.

Dissincronia miocardica

Il problema di trovare nuovi parametri in grado di discriminare pazienti responders o non responders alla terapia di resincronizzazione miocardica è di elevata attualità. In particolare sono stati valutati diversi parametri ecocardiografici potenzialmente utili²⁴¹ senza particolari evidenze di efficacia²⁴².

Recentemente però, uno studio ha mostrato come lo strain rate longitudinale può essere un parametro promettente per predire eventuali benefici della terapia di resincronizzazione in pazienti con scompenso cardiaco²⁴³.

Anche lo strain radiale è stato efficacemente utilizzato per predire la responsività in termini di FE alla resincronizzazione cardiaca²⁴⁴⁻²⁴⁵⁻²⁴⁶.

Cardiomiopatie

Un potenziale utilizzo dello studio dello strain longitudinale è la possibilità di discriminare la cardiomiopatia ipertrofica dall'ipertrofia ventricolare dell'atleta, basandosi sulla riduzione patologica dei valori di strain nella cardiomiopatia ipertrofica²⁴⁷⁻²⁴⁸⁻²⁴⁹⁻²⁵⁰.

Anche in altre tipologie di cardiopatie sono recentemente stati evidenziati possibili utilizzi di questa metodica²⁵¹.

Altri utilizzi

L'ecocardiografia con studio dello strain miocardico è stata recentemente introdotta anche in nuove aree di applicazioni. Promettente è il suo utilizzo nei cuori trapiantati²⁵², nello studio della funzione atriale²⁵³ e nell'identificazione precoce di disfunzioni ventricolari subcliniche durante chemioterapia²⁵⁴⁻²⁵⁵⁻²⁵⁶.

SCOPO DELLO STUDIO

La mobilitazione di cellule staminali da midollo a sangue periferico, mediante somministrazione precoce di G-CSF, potrebbe modificare il substrato biologico del miocardio infartuato con una riduzione dell'area di necrosi ed una conseguente attenuazione del rimodellamento inverso migliorando la prognosi del paziente.

La misurazione dello strain (mediante metodica 2D speckle tracking) potrebbe essere in grado di fornire informazioni aggiuntive precoci sulla possibilità di prevenire il rimodellamento inverso.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di riconfermare, in un gruppo di pazienti arruolati nello studio "STEM-AMI outcome" (ovvero colpiti da STEMI complicato con disfunzione ventricolare sinistra e sottoposti a PCI efficace), il possibile effetto favorevole della somministrazione precoce di C-GSF tramite studio RMN cuore in associazione alla valutazione della funzione ventricolare sinistra con strain miocardico 2D (metodica spekle tracking).

MATERIALI E METODI

Popolazione dello studio

Sono stati valutati 63 pazienti consecutivi giunti all'Ospedale San Gerardo di Monza (accesso in PS o con I18) per STEMI e funzione sistolica in acuto <45% entro 24 da PCI efficace e soddisfacenti i criteri di inclusione ed esclusione dello studio STEM-AMI Outcome.

Di questi, 5 pazienti sono risultati successivamente non conformi ai criteri di inclusione o con dati mal valutabili, e pertanto esclusi dall'analisi.

I criteri di inclusione ed esclusione sono descritti nella tabella 3 MM.

Tabella 3 MM. Criteri inclusione/esclusione STEMAMI OUTCOME prima dell'approvazione degli emendamenti 1 e 2

CRITERI DI INCLUSIONE	CRITERI DI ESCLUSIONE
Pazienti affetti da STEMI anteriore sottoposti a PCI primaria o PCI-rescue con TIMI flow ≤ 1 alla presentazione	Pregresso infarto miocardico anteriore
Symptom-to-balloon time ≥ 2 ore e ≤ 12 ore (o ≤ 24 ore in caso di persistenza dei sintomi)	Infarto miocardico recente (nel mese precedente)
Evidenza di disfunzione Ventricolare sinistra (FE biplana $\leq 45\%$) misurata entro 24 ore dalla rivascolarizzazione	Nota pregressa disfunzione ventricolare sinistra (FE < 45%)
TIMI flow ≥ 2 post PCI	Pazienti con evidenza angiografica di stenosi coronariche non trattabili mediante PCI ma candidati a by-pass aorto-coronarico (CABG)
Uomini e donne di età ≥ 18 anni e ≤ 80 anni	Evidenza di valvulopatia con indicazione chirurgica
Consenso informato firmato prima dell'arruolamento	Pregresso intervento cardiocirurgico o PCI sulla discendente anteriore nei 6 mesi precedenti
	Pregressa (nei 5 anni precedenti) o attuale documentazione di leucemia, malattie mieloproliferative o disordini mielodisplastici
	Pregressa (nei 5 anni precedenti) o attuale documentazione di malattie neoplastiche
	Hb < 10 mg/dL
	Conta dei globuli bianchi (WBC) > 25.000/mm ³
	Conta dei globuli bianchi (WBC) > 25.000/mm ³
	Conta piastrinica < 50.000/mm ³
	Sepsi
	Nota malattia da HIV
	Pregressa o attuale documentazione di patologie autoimmuni
	Interstiziopatia polmonare
	Documentazione di concomitanti gravi patologie

	(non cardiache) non adeguatamente controllate
	Gravidanza o allattamento
	Documentato abuso di alcool e/o droghe
	Scarsa compliance
	Partecipazione a studi clinici con altri prodotti sperimentali
	Altra terapia con cellule staminali

Trattamento

I pazienti arruolati nel nostro studio afferivano tutti allo STEM-AMI Outcome e pertanto sono stati randomizzati, mediante un sistema WEB based, a trattamento standard o trattamento standard + Granulocyte Colony Stimulating Factor (Filgrastim Zarzio-Sandoz).

Il Filgrastim è stato somministrato al dosaggio di 5 mcg/kg b.i.d. per 6 giorni (dal giorno 0 al giorno 5), entro 24 ore dalla riapertura del vaso. La concentrazione di globuli bianchi è stata ottenuta prima di ogni somministrazione di G-CSF e successivamente una volta al giorno fino alla dimissione ospedaliera. La somministrazione è stata interrotta definitivamente se la concentrazione di globuli bianchi superava i $50 \times 10^3/\text{mm}^3$. Tutti i pazienti hanno ricevuto gli standard terapeutici migliori in accordo con le linee guida correnti per il trattamento dello STEMI e dello scompenso cardiaco²⁵⁷⁻²⁵⁸.

Disegno dello studio

I pazienti arruolati nello STEM-AMI Outcome, e di conseguenza nel nostro studio, erano pazienti con STEMI con FEVS biplana all'arruolamento $\leq 45\%$ e candidati a PCI primaria o PCI rescue (trombolisi con TIMI flow 0 o 1) con successiva riperfusione efficace (TIMI >2).

L'ecocardiografia pre-arruolamento doveva essere eseguita entro 24 ore dalla PCI e possedere le 5 sezioni standard (sezioni parasternale asse lungo e corto, apicale 4-2-3 camere). Per la partecipazione allo studio era necessario il rispetto dei criteri di inclusione ed esclusione e la sottoscrizione del consenso informato.

In seguito i pazienti venivano randomizzati mediante un sistema computerizzato a trattamento standard o trattamento standard+G-CSF.

All'arruolamento il paziente è stato sottoposto ad un prelievo ematico venoso per la determinazione di emocromo completo, proteina C-reattiva (PCR), NT Pro-Brain Natriuretic Peptide (Nt pro-BNP). Sono stati effettuati dosaggi di Troponina (T-hs; ng/l) e Creatin Kinasi MB (CK MB; ng/ml) ad intervalli di 6 ore dopo accesso in ospedale sino al raggiungimento del picco di concentrazione ematica.

L'emocromo è stato valutato ogni giorno sino alla dimissione in entrambi i gruppi e prima di ogni somministrazione di G-CSF nel gruppo trattamento. Nei trattati, come già illustrato, se

la concentrazione ematica di leucociti prima di una somministrazione di G-CSF era superiore a $50 \times 10^3/\text{mm}^3$, il trattamento con farmaco sperimentale veniva sospeso definitivamente.

In fase pre-dimissione (7 giorni) e a 6 mesi dall'infarto, i pazienti venivano sottoposti a ecocardiografia 2D con studio strain mediante metodica speckle tracking e a RMN cardiaca. A 1 mese, veniva controllata la sola ecocardiografia 2D completa di studio dello strain.

Di ogni paziente sono quindi stati valutati:

- dati anagrafici
- fattori di rischio cardiovascolari:
 - familiarità per eventi cardiovascolari
 - ipertensione
 - diabete mellito
 - dislipidemia
 - arteriopatia periferica
 - anemia
 - ictus
 - fumo
 - insufficienza renale cronica
 - BPCO
- storia personale di angina, pregressi infarti, pregresse PCI, pregressi interventi cardiocirurgici.
- terapia in atto al momento della randomizzazione.
- presentazione clinica: peso, altezza, BMI ($\text{peso}/\text{altezza}^2$), pressione arteriosa sistolica e diastolica, classe Killip.
- caratteristiche elettrocardiografiche:
 - FC
 - ritmo di presentazione
 - presenza di sopraslivellamento del tratto ST e numero di derivazioni con ST sopraslivellato
 - nuova insorgenza di BBS
 - presenza di precedenti onde Q patologiche
- dati emodinamici:
 - ora di insorgenza dei sintomi
 - ora di riapertura del vaso

- symptom-to-balloon time
- tempo dalla PCI alla I somministrazione
- sede e numero delle lesioni coronariche sede di angioplastica e quindi responsabili dell'ischemia (culprit lesion)
- presenza di lesioni non culprit ed eventuale loro trattamento differito
- tipo di stent utilizzato: DES (drug eluting stent), BMS (bare metal stent), DES+diretto=stent medicato utilizzato senza predilatazione
- PCI rescue
- TIMI flow alla presentazione in sala di emodinamica e TIMI flow post procedura
- eventuale tromboaspirazione.
- trattamento antitrombotico eseguito in sala di emodinamica: ASA, clopidogrel, ticagrelor, prasugrel, biliverdina, inibitori IIb / IIIa, eparina sodica, EBPM.
- ecocardiogramma 2D:
 - pretrattamento
 - 7 giorni
 - 1 mese
 - 6 mesi
- esami ematochimici: GB ingresso e dimissione, hsTnT e CKMB ingresso e picco, proBNP ingresso e dimissione
- numero di somministrazioni di G-CSF e valore picco dei GB.
- procedure svolte durante la degenza: utilizzo di presidi (contropulsatore e CPAP)
- terapia alla dimissione.
- eventi avversi durante la degenza ed eventi avversi durante il follow up

Angiografia

Il laboratorio dell'Ospedale San Gerardo è fornito di fluoroscopio Philips Allura e sistemi Volcano per Intracoronary Vascular Ultrasound Imaging (IVUS) e Fractional Flow Reserve (FFR).

Prima della randomizzazione tutti i pazienti sono stati sottoposti a coronarografia e PCI primaria con stenting della lesione culprit da operatori esperti con materiali e tecniche in linea con le indicazioni della Società Italiana di Cardiologia Interventistica (GISE) e dell'European Association of Percutaneous Cardiovascular Intervention (EAPCI).

In caso di malattia multivasale al baseline e stabilità clinica dopo il trattamento della lesion target, il completamento della rivascularizzazione è stato effettuato durante la degenza in

ospedale con procedura differita.

Ecocardiografia

L'ecocardiografia pre-arruolamento per il calcolo della FEVS biplana è stata effettuata c/o l'UTIC HSG con ecografo Vivid E7 (GE) mediante sonda transtoracica M5S e refertato da medici inclusi nella lista ricercatori dello STEM AMI Outcome Trial.

Gli esami ecocardiografici durante il follow-up sono stati effettuati c/o il Servizio di diagnostica HSG con ecografo Vivid E9 (GE) mediante sonda transtoracica M5S.

Tale esame comprendeva:

- esame standard in 2D con acquisizione di tutte le immagini previste nell'apposito protocollo utilizzato nella Divisione di Diagnostica Cardiologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza;
- misurazione dello strain 2D longitudinale con tecnica speckle tracking effettuato a 7 giorni, 1 mese e 6 mesi. Per far ciò è stato necessario acquisire le sezioni 2-3-4 camere utilizzando un frame rate di almeno 50 fps. Per ogni sezione è stata effettuata un'acquisizione su un singolo ciclo cardiaco. Durante l'acquisizione di ogni sezione, al paziente è stato chiesto di mantenere lo stato di apnea al fine di ottenere una maggior precisione possibile nella valutazione dello strain evitando così i fisiologici movimenti del cuore durante le fasi del respiro.

Successivamente le immagini sono state sottoposte a post-processing utilizzando il software automatizzato EchoPAC PC (versione 110.1.2, GE Healthcare) da un operatore in cieco rispetto al trattamento. Sono stati ottenuti valori di strain globale longitudinale, di strain delle aree ischemiche e di strain delle aree non ischemiche.

Risonanza magnetica cardiaca

FEVsx, volume telediastolico e telesistolico ventricolare sinistro, indicizzati per BSA e non, sono stati valutati in ogni paziente a 7 giorni e a 6 mesi dall'IMA.

Tale esame è stato eseguito con le medesime modalità indicate nel sottostudio risonanza di STEM AMI Outcome Trial.

In dettaglio, le indagini sono state eseguite con bobina phased-array dedicata a 5 canali con apparecchiatura da 1,5 T (Achieva SE, Philips Medical Sistem, Best, Olanda). Il protocollo comprendeva sequenze per lo studio morfologico, sequenze Cine-RM, sequenze per lo studio della perfusione e del delayed enhancement. Per lo studio morfologico sono state utilizzate sequenze "black-blood" T2 STIR (studio dell'edema) e T2* (per ricerca infarcimento emorragico parietale miocardico- MH-myocardial hemorrhage) in asse corto. Lo studio Cine-RM è stato eseguito con sequenze dinamiche steady-state (BALANCED TFE, Philips Medical

Sistem) con i seguenti parametri: 30 frame/slice, FOV 33 cm circa, TR 3.6 ms, TE 1.4 ms, matrice di 176 x 169; per coprire l'intero ventricolo sinistro, sono state utilizzate da 9 a 12 acquisizioni di 8 mm nell'acquisizione in asse corto (gap di 0.8 mm), nonché acquisizioni cine in asse lungo (geometria 2 e 4 camere ed LVOT). Le sequenze di perfusione di primo passaggio sono state acquisite consecutivamente durante i 40-50 battiti immediatamente successivi all'iniezione di Gadobenato Dimeglumina (0.1 mmol/kg; Multihance, Bracco, Italia; iniezione su vena antecubitale con flusso di 2 ml/s, seguita da 20 ml di soluzione fisiologica con flusso di 2 ml/s) tramite iniettore automatico (Medrad, Warrendale, USA); sono state utilizzate sequenze TFE-EPI Single Shot con i seguenti parametri: FOV 27 cm circa, TR 9 ms, TE 3.1 ms, tempo di inversione variabile da 150 a 175 ms, impulso di saturazione 90°, flip angle 15°, matrice 96 x 98, spessore di 10 mm. Le sequenze di perfusione sono state posizionate per coprire le porzioni basali, medie ed apicali (3 slices) del ventricolo sinistro con orientamento in asse corto.

Dopo l'acquisizione delle immagini di perfusione, è stata somministrata una ulteriore dose di Gadobenato Dimeglumina (0.1 mmol/kg). Le immagini di delayed enhancement sono state acquisite a circa 10-20 minuti dopo le sequenze di perfusione, con sequenze 3D GE inversion-recovery T1 pesate con i seguenti parametri: FOV 32 cm, TR 4.9, TE 3.1, flip angle 15°, impulso di inversione di 180°, matrice di 184 x 151, l media di campionamento del segnale, tempo di inversione da 180 a 300 ms (il tempo di inversione è stato ottimizzato per annullare il segnale del miocardio remoto in ogni paziente). La geometria delle sequenze è stata copiata dalle acquisizioni cine (2/4 camere, asse corto ed LVOT).

Analisi statistica

I dati categorici sono stati rappresentati come numero assoluto o valori percentuali.

Le variabili continue sono state rappresentate come media \pm deviazione standard (SD).

La distribuzione normale è stata accertata tramite il test di Shapiro-Wilk.

Le variabili continue sono state confrontate fra gruppi utilizzando T-Test per dati non appaiati se la distribuzione era Normale e con il test di Wilcoxon-Mann-Whitney se la distribuzione della variabile in studio non era Normale. Per quanto riguarda le variabili discrete, le proporzioni osservate nei due gruppi sono state comparate con il test chi-quadrato e il test esatto di Fisher, se la numerosità del campione era ridotta.

I valori medi delle variabili continue sono stati confrontati all'interno dello stesso gruppo usando il test T di Student per dati appaiati se la distribuzione del delta era Normale e, in caso contrario, con il test dei ranghi con segno di Wilcoxon.

Il livello di significatività statistica è stato considerato per $p < 0.05$.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software IBM-SPSS Statistics version 17.0 (SPSS,

Chicago, IL, USA).

RISULTATI

I. Caratteristiche della popolazione e dati clinici

Il campione di popolazione da noi analizzato era composto da 28 pazienti nel gruppo trattamento e 30 pazienti nel gruppo controllo.

I due gruppi sono risultati omogenei in termini di età media, prevalenza di genere, fattori di rischio cardiovascolare.

Per quanto riguarda la storia ischemica pregressa, 5 pazienti del gruppo controllo (pari al 17%) avevano un'anamnesi di infarto miocardico acuto mentre solo 1 nel gruppo trattamento (Tabella 4R).

Le caratteristiche dell'evento infartuale sono risultate sovrapponibili in termini di classe Killip alla presentazione, numero di derivazioni sopraslivellate all'ECG, coronaria culprit dell'IMA, numero di vasi all'angiografia con stenosi > 50% e TIMI Flow pre e post PCI mentre si è osservata una significativa differenza dei livelli di dispersione degli enzimi di miocardioneccrosi (CKMB al picco): picco CK MB gruppo controllo 187.3 ± 127.4 ng/ml; gruppo trattamento 299.7 ± 198.0 ng/ml; P-value 0.037. Inoltre 13 pazienti del gruppo trattamento (46%) hanno avuto dispersione enzimatica maggiore di CKMB di 350ng/mL mentre una percentuale nettamente inferiore l'ha avuto nel gruppo controllo (solo 1 paziente).

I dati, pur senza raggiungimento della significatività statistica, mostrano anche come l'incidenza di elevato carico trombotico (valutato come necessità di tromboaspirazione e/o uso di inibitori della glicoproteina IIb-IIIa in bailout), sia circa il doppio nel gruppo trattamento.

Un dato importante per il nostro lavoro, è la mancanza di differenza significativa del time symptoms to balloon tra i due gruppi: in particolare $316,5 \pm 283.2$ minuti nel gruppo controllo e 297.4 ± 237.3 minuti nel gruppo trattamento (Tabella 5R e Tabella 6R).

La degenza intraospedaliera è stata più lunga nel gruppo trattamento (gruppo controllo 7.1 ± 2.1 giorni; gruppo trattamento 10.5 ± 4.7 giorni; P-value 0.001) e verosimilmente legata alla necessità di attendere la sospensione del trattamento ed il ripristino di valori di leucociti al di sotto dei 20×10^3 /ml.

La media del picco di GB nei trattati è stato 52.078×10^3 /ml.

In merito all'outcome intraospedaliero, 2 pazienti del gruppo controllo sono morti durante il ricovero ospedaliero per shock cardiogeno mentre nessun paziente è morto nel gruppo trattamento.

Non sono stati registrati reazioni avverse o eventi avversi a G-CSF durante la degenza.

I pazienti sono stati dimessi con il trattamento in uso nella corrente pratica clinica. La terapia diuretica era presente in circa il 50% dei casi (Tabella 7R).

Confrontando la popolazione dei trattati con i controlli, la differenza più rilevante appare pertanto la maggiore prevalenza di pazienti con dispersione di CK MB superiore a 350 ng/ml al picco nel gruppo trattamento (13 pz. vs 1pz. nel gruppo controllo) (FIG. 13R).

Tale differenza, causata dalla randomizzazione dei pazienti, potrebbe influire in maniera significativa sulle variazioni di volumi e funzione (FE e strain) ventricolare sinistra dopo eventi ischemici significativamente differenti.

Pertanto dopo la popolazione generale, abbiamo duplicato l'analisi in una popolazione di pazienti con dispersione enzimatica inferiore a 350 ng/ml di CK MB in entrambi i gruppi (17pz. trattati, 29pz. non trattati).

2. Rimodellamento ventricolare ed FE:

2.1. Popolazione generale:

Ecocardiogramma basale all'arruolamento:

All'arruolamento, i dati ecografici di funzione sistolica (FE biplana), volume diastolico e volume sistolico sono risultati sovrapponibili nei due gruppi (Tabella 8R; FIG 14R): FEVsx trattati $36.5\% \pm 7.3$, controlli $37.6\% \pm 7.6$, $p=0.4526$; Vol diastolico VS trattati $102.1\text{ml} \pm 32.5$, controlli $96.1\text{ml} \pm 23.9$, $p=0.6466$; Vol sistolico VS trattati $65.3\text{ml} \pm 25.6$, controlli $59.1\text{ml} \pm 16.6$, $p=0.6413$.

RMN cuore: FE e volumi intracavitari

In linea con l'ecocardiografia basale, anche per i dati di RMN cuore a 7 giorni dall'evento infartuale, osserviamo dei valori di rimodellamento ventricolare e funzione sistolica sovrapponibili in entrambi i gruppi (Tabella 9R).

Anche a 6 mesi, la RMN cuore conferma l'assenza di differenze significative in termini di funzione sistolica e volumi intracavitari nei due gruppi (Tabella 10R).

Ma è importante sottolineare che in entrambi i gruppi vi è un incremento di FEVsx: tale incremento è significativo nel gruppo trattamento (da 45.6 ± 9.5 a $49.8 \pm 7.$, P-value 0.029*) e non significativo nel gruppo controllo (da 49.2 ± 9.7 a 52.0 ± 11.1 , P-value 0.064). Nel gruppo controllo c'è una tendenza ad incremento del volume telediastolico a 6 mesi (VTDVsx/m² da $92.3 \pm 20.$ ml/m² a 95.6 ± 22.9 , P-value 0.340) mentre sostanzialmente non cambia il volume telesistolico (VTSVsx/m² da 48.3 ± 19.7 ml/m² a 47.9 ± 22.6 ml/m², P-value 0.9431).

Il trend nel gruppo trattamento è invece opposto, con sostanziale stabilità del volume telediastolico a 6 mesi e una riduzione del volume telesistolico (VTDVsx/m² da 94.5 ± 16.7

ml/m² a 95.0 ± 23.0 ml/m², P-value 0.8924; VTSVsx/m² da 52.2 ± 15.4 ml/m² a 48.9 ± 18.9 ml/m², P-value 0.1778) (Tabella 11R; FIG 15R).

2.2 Popolazione con CKMB <350ng/mL al picco:

Ecocardiogramma basale all'arruolamento:

All'arruolamento, anche nella sola popolazione selezionata, le medie di FEVsx e dei volumi all'ecocardio 2D non differivano all'arruolamento (FEVsx 38.5 ± 6.7 gruppo trattamento; 39.0 ± 4.7 gruppo controllo, P-value 0.991) (Tabella 12R).

RMN cuore: FE e volumi intracavitari

Anche in tale analisi a 7 giorni dallo STEMI i pazienti non differivano in termini di funzione sistolica e volumi fra trattati e controlli (FEVsx $47.0 \pm 9.7\%$ gruppo trattamento; $49.1 \pm 9.8\%$ nel gruppo controllo, P-value 0.519) (Tabella 13R) come per i valori a 6 mesi (Tabella 14R). A 6 mesi da IMA in entrambi i gruppi si nota un incremento della FEVsx, tuttavia ai limiti della significatività statistica solo nel gruppo trattamento (da $48.7 \pm 10.0\%$ a $54.2 \pm 4.8\%$, P-value 0.050* gruppo trattamento; da $49.2 \pm 9.7\%$ a $52.0 \pm 11.1\%$, P-value 0.064 gruppo controllo). Inoltre, è possibile notare nel gruppo trattamento una riduzione statisticamente significativa del volume telesistolico e telesistolico indicizzato (VTSVsx da 87.1 ± 31.5 ml a 73.1 ± 24.5 ml a 6 mesi, P-value 0.013; VTSVsx/m² da 48.3 ± 16.9 ml/m² a 40.2 ± 10.6 ml/m², P-value 0.033); in aggiunta si nota anche una tendenza alla riduzione del volume telediastolico e telediastolico indicizzato a 6 mesi (VTDVsx da 166.7 ± 41.5 ml a 157.5 ± 44.6 ml, P-value 0.114; VTDVsx/m² da 92.3 ± 16.9 ml/m² a 86.9 ± 17.2 ml/m², P-value 0.137). Nel gruppo controllo invece c'è una tendenza all'incremento dei volumi telediastolici e non variazioni dei volumi telesistolici (VTDVsx/m² da 92.3 ± 20.9 ml/m² a 95.6 ± 22.9 ml/m², P-value 0.340; VTSVsx/m² da 48.3 ± 19.7 ml/m² a 47.9 ± 22.6 ml/m², P-value 0.902) (Tabella 15R; FIG.16R).

3. Strain miocardico 2D: strain globale, strain aree ischemiche e aree non ischemiche

3.1 Popolazione generale:

Lo strain miocardico a 7 giorni, in linea coi dati di RMN cuore, non mostra differenze significative tra trattati e controlli, sia per lo strain globale che per lo strain nelle zone ischemiche e nel territorio non infartuale: strain globale trattati -10.84 ± 4.50 , strain globale controlli -12.37 ± 3.60 , p=0.17; strain aree ischemiche trattati -7.65 ± 5.33 , strain aree ischemiche controlli -9.92 ± 5.08 , p=0.13, strain aree non ischemiche trattati -12.89 ± 3.97 ,

strain aree non ischemiche controlli -14.22 ± 3.23 , $p=0.19$ (Tabella 16 R; FIG. 17 R).

Nel controllo a 1 mese, lo strain globale e lo strain delle aree ischemiche migliorano in entrambi i gruppi (Tabella 17R; Figura 18R).

Tale miglioramento è più evidente nei controlli che presentano uno strain significativamente superiore rispetto ai trattati (strain globale trattati -12.46 ± 4.81 , controlli -15.13 ± 5.18 , $p=0.05^*$; strain aree ischemiche trattati -10.01 ± 5.96 , controlli -13.42 ± 6.05 , $p=0.05^*$).

Al contrario non si riscontrano significative differenze dello strain nelle aree non ischemiche (Tabella 18R; FIG 19R).

A 6 mesi lo strain (globale, aree ischemiche e aree non ischemiche) è ulteriormente migliorato solo nei trattati così da annullare la differenza di strain tra trattati e controlli (strain globale: trattati 15.22 ± 5.02 , controlli 15.41 ± 4.68 , $p=0.89$; strain aree ischemiche: trattati -12.61 ± 5.71 , controlli -13.76 ± 5.90 , $p=0.49$; strain aree non ischemiche: trattati -17.04 ± 4.17 , controlli -16.05 ± 5.53 , $p=0.53$) (Tabella 19R-20R; Figura 19R-20R).

3.2 Popolazione con dispersione di CK MB < 350 ng/ml al picco

Lo stesso andamento si riscontra risulta accentuato nella popolazione resa omogenea per entità del danno miocardico.

In particolare:

-A 7 giorni lo strain globale, delle aree ischemiche e aree non ischemiche risulta sovrapponibile nei trattati e nei controlli: strain globale trattati -11.90 ± 5.27 , strain globale controlli -12.51 ± 3.61 , $p=0.40$; strain aree ischemiche trattati -8.56 ± 6.53 , strain aree ischemiche controlli -10.18 ± 5.03 , $p=0.66$, strain aree non ischemiche trattati -13.68 ± 4.35 , strain aree non ischemiche controlli -14.34 ± 3.23 , $p=0.58$ (Tabella 21R)

A 1 mese lo strain globale e lo strain delle aree non ischemiche migliora significativamente nei due gruppi mentre lo strain delle aree ischemiche è significativamente migliorato solo nel gruppo trattamento (Trattati: Strain Globale 7 giorni -11.90 ± 5.27 , 1 mese -12.94 ± 4.55 , $p=0.01^*$; Strain Aree ischemiche 7 giorni -8.56 ± 6.53 , 1 mese -12.32 ± 6.55 , $p=0.00^*$; Strain Aree non ischemiche 7 giorni -13.68 ± 4.35 , 1 mese -15.96 ± 3.90 , $p=0.03^*$. Controlli: Strain Globale 7 giorni -12.51 ± 3.61 , 1 mese -14.48 ± 4.87 , $p=0.00^*$, Strain Aree ischemiche 7 giorni -10.18 ± 5.03 , 1 mese -13.94 ± 5.46 , $p=0.08$, Strain Aree non ischemiche 7 giorni -14.34 ± 3.23 , 1 mese -16.31 ± 4.68 , $p=0.00^*$). (Tabella 22R-23R, FIG 21R).

-A 6 mesi, lo strain globale e nelle aree ischemiche dei trattati è significativamente migliorato rispetto al controllo a 1 mese (Trattati: Strain Globale 1 mese -12.94 ± 4.55 , 6 mesi -18.20 ± 4.10 , $p=0.03^*$; Strain Aree ischemiche 1 mese -12.32 ± 6.55 , 6 mesi -15.31 ± 5.15 , $p=0.05^*$).

Tale miglioramento nelle aree non ischemiche di trattati e nei controlli non raggiunge la

significatività (Trattati: Strain Aree non ischemiche I mese -13.68 ± 4.35 , 6 mesi -15.96 ± 3.90 , $p=0.08$ - Controlli: Strain Globale I mese -14.48 ± 4.87 , 6 mesi -15.65 ± 4.62 , $p=0.59$, Strain Aree ischemiche I mese -13.94 ± 5.46 , 6 mesi 14.18 ± 5.64 , $p=0.91$, Strain Aree non ischemiche I mese -16.31 ± 4.68 , 6 mesi -16.36 ± 4.12 , $p=0.46$) (Tabella 24R-25R, FIG 21R).

DISCUSSIONE

Il nostro studio si inserisce all'interno della ricerca sul ruolo della terapia rigenerativa nell'ambito della prevenzione del rimodellamento ventricolare sinistro post-infartuale.

Abbiamo considerato 63 pazienti arruolati nello studio STEM-AMI Outcome: pazienti affetti da STEMI con significativa disfunzione ventricolare sinistra in acuto, randomizzati a trattamento con G-CSF in acuto in associazione al trattamento standard o gruppo di controllo con sola terapia standard.

I nostri dati documentano un effetto positivo del G-CSF sui parametri di rimodellamento ventricolare sinistro (frazione d'eiezione e volumi endocavitari) tramite RMN cuore a 180 giorni.

Inoltre abbiamo studiato l'andamento dello strain miocardico, misurato con metodica speckle tracking, in tre intervalli temporali dall'evento acuto: 7 giorni, 1 mese, 6 mesi.

I nostri dati, per la prima volta, mostrano un miglioramento dello strain nel gruppo dei pazienti trattati con G-CSF che si protrae a lungo termine, verosimilmente aggiuntivo all'effetto positivo della rivascolarizzazione che si osserva, infatti, in entrambi i gruppi ad un mese.

La cardiopatia ischemica è a tutt'oggi una delle principali cause di morbilità e mortalità nel mondo¹⁻⁷. Nonostante l'angioplastica primaria abbia ridotto significativamente la mortalità per IMA a 30 giorni, la sopravvivenza a lungo termine nella cardiopatia ischemica non ha subito modifiche rilevanti⁹⁻¹¹. Importante, anche numericamente, è infatti l'incidenza di insufficienza cardiaca secondaria a rimodellamento ventricolare sfavorevole post- infartuale che rimane quindi una delle principali cause di mortalità e morbilità a livello mondiale²³.

Visto quindi l'importante impatto umano ed economico di questa condizione, la ricerca è in continua evoluzione verso la scoperta di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche capaci di contrastare efficacemente tale fenomeno.

Studi recenti hanno mostrato, in laboratorio e su animali, la possibilità della rigenerazione miocardica dopo danno infartuale da parte di cellule staminali endogene sia mediante mobilitazione citochinica che mediante infusione cellulare diretta (cellule staminali)^{105,119-145}.

Tra le citochine studiate la più promettente sembra essere il G-CSF, una citochina endogena in grado di stimolare la mobilitazione di cellule staminali midollari nel sangue periferico.

Numerosi studi clinici di piccole dimensioni hanno investigato la potenzialità del suo utilizzo nel periodo peri-infartuale allo scopo di favorire il recupero di funzione ventricolare sinistra tramite l'azione delle cellule staminali mobilitate e reclutate a livello miocardico.

I risultati a cui hanno condotto questi studi sono tuttavia discordanti e le meta-analisi hanno

posto qualche dubbio sugli effetti benefici della somministrazione di G-CSF.

Tali meta-analisi non mostrano sostanziale miglioramento della funzione cardiaca nei pazienti trattati dopo STEMI, ma allo stesso tempo evidenziano un possibile effetto positivo in sottogruppi di pazienti che ricevono la terapia precocemente dopo STEMI o che presentano depressione della funzione sistolica^{190,164}.

Le popolazioni incluse erano infatti eterogenee per grado di disfunzione ventricolare sinistra all'arruolamento, per tempistica di somministrazione o dosaggio del G-CSF e per symptoms to balloon time; inoltre dall'arruolamento erano stati esclusi pazienti con caratteristiche prognostiche negative (es. classe Killip 2, ...).

Lo studio STEM-AMI Trial¹⁹² è stato realizzato sulla base di queste osservazioni ed ha dimostrato che la somministrazione di terapia con G-CSF entro 24 da rivascolarizzazione efficace (dopo la terza ora) in pazienti affetti da STEMI anteriore e con funzione sistolica all'arruolamento ridotta (FE<45%) è in grado di attenuare il rimodellamento negativo del ventricolo sinistro a 6 mesi e fino a tre anni di follow-up¹⁹⁴.

Sulla base di questo studio, è nato lo STEM-AMI Outcome. Uno studio multicentrico, di fase III che si pone il fine di valutare se l'effetto favorevole già evidenziato in precedenza possa influenzare positivamente la prognosi a lungo termine e ridurre la mortalità/morbilità cardiovascolare.

La popolazione studiata in questa tesi è composta dai pazienti reclutati nello STEM-AMI Outcome che si presentavano con STEMI complicato da significativa disfunzione ventricolare sinistra (FE 45%) dopo rivascolarizzazione efficace.

Come è possibile per una popolazione di piccole dimensioni, nonostante la randomizzazione, nel gruppo trattamento sono stati reclutati pazienti "più gravi" ovvero con dispersione enzimatica di CKMB maggiore.

Nonostante tale distribuzione casuale, in linea con i dati della letteratura e con studi recenti effettuati nel nostro centro²⁵⁹, i pazienti trattati con G-CSF hanno mostrato un incremento significativo di funzione ventricolare sinistra a 6 mesi, documentato da RMN cuore, espressione della stabilità dei volumi diastolici e della riduzione dei volumi sistolici. Al contrario, nel gruppo controllo, non si è osservato un miglioramento significativo della frazione di eiezione né dei parametri di rimodellamento ventricolare. Vi è, anzi, seppur senza significatività statistica, una sfavorevole tendenza all'aumento del volume diastolico.

Tali risultati si mantengono anche dopo ripetizione dell'analisi selezionando la popolazione con omogenea dispersione di CKMB (< 350pg/mL), annullando il possibile fattore confondente secondario a questo bias di selezione.

Il gruppo trattamento mostra un significativo aumento della funzione sistolica accompagnato da una riduzione significativa del volume telesistolico oltre che ad un trend in miglioramento

nel volume diastolico. Nel gruppo controllo, il rimodellamento sfavorevole del volume diastolico diventa più evidente mostrando una differenza significativa di questo dato nei due gruppi. Tale tendenza all'espansione del volume diastolico, come già descritto in precedenza, è una delle prime fasi del rimodellamento ventricolare sfavorevole post-infartuale che mira al tentativo di recupero di gittata cardiaca adeguata dopo infarto miocardico⁴⁴.

In merito allo strain, abbiamo già sottolineato come il nostro sia uno dei primi studi effettuati su una popolazione di pazienti con infarto miocardico acuto trattati con un farmaco potenzialmente efficace sul rimodellamento.

La decisione di sottoporre i pazienti allo studio dello strain 2D (metodica speckle tracking) è legata alla possibilità di poter valutare l'effetto del farmaco con una tecnica relativamente recente e che offre vantaggi rispetto all'ecocardiografia tradizionale. In particolare, lo strain è in grado di fornire una valutazione obiettiva e quantitativa della funzione regionale e globale del miocardio, indipendentemente dall'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro e dai movimenti di traslazione cardiaca²¹⁰.

Inoltre è in grado di valutare precoci modificazioni nella contrazione miocardica, quando ancora non manifeste con alterazioni di contrattilità²⁶⁰⁻²⁶¹⁻²⁶²⁻²⁶³.

Lo strain è stato valutato in tre intervalli di tempo (7 giorni, 1 mese e 6 mesi) e sono stati ottenuti lo strain globale, lo strain delle aree ischemiche e lo strain delle aree non ischemiche. I risultati mostrano come i parametri di strain migliorino progressivamente in entrambi i gruppi ad un mese, ma come questo effetto favorevole prosegua in maniera significativa a 6 mesi solo nel gruppo trattamento.

Il miglioramento ad un mese evidenziabile in entrambi i gruppi è verosimilmente correlabile all'effetto positivo della rivascolarizzazione coronarica (necessariamente efficace per l'arruolamento allo studio) che tenderebbe a mascherare, in questa fase, l'effetto positivo della somministrazione di GCSF. Inoltre, la differenza tra i valori di strain a 1 mese che si osserva a favore del gruppo controllo potrebbe essere legata, come suggerito da alcuni studi in letteratura²⁶⁴, alla maggior dispersione enzimatica osservata nei pazienti del gruppo trattamento, segno di maggiore danno ischemico.

Il miglioramento a lungo termine invece, si evidenzia in maniera significativa solo nei trattati con una sostanziale stabilità dei valori di strain nel gruppo controllo.

Tale andamento potrebbe essere relato al possibile effetto favorevole del trattamento, in grado di ripristinare valori di strain sovrapponibili tra i due gruppi, pur in presenza di entità di danno miocardico differente.

Tale ipotesi sembrerebbe trovare conferma nell'analisi dei pazienti omogenei per entità di dispersione enzimatica, dove valori di strain migliori sono documentati nel gruppo trattamento anche a livello delle aree non ischemiche.

Ciò potrebbe essere attribuito agli effetti diretti sul miocardio da parte di G-CSF.

Infatti, il primo effetto di G-CSF è diretto sul miocardio ischemico attraverso differenti modalità: tramite l'esposizione di un recettore specifico sulle cellule con azione antiapoptotica, tramite un'azione mediata dall'ossido nitrico sull'endotelio e un'azione antinfiammatoria mediata dall'inibizione dei mediatori dell'infiammazione.

Il secondo effetto di questa citochina è mediato dalla mobilitazione nel circolo periferico di cellule staminali midollari. Tali cellule sono in grado di essere captate a livello della zona infartuale (processo fisiopatologico che viene massimizzato dalla somministrazione endogena di G-CSF) dove iniziano il processo di differenziazione¹⁷⁵.

Il miglioramento di strain delle aree non ischemiche nei soggetti trattati con G-CSF esprimerebbe perciò tale azione "paracrina" e che, tramite l'azione del recettore specifico presente sulla superficie delle cellule miocardiche, renderebbe ragione di un'azione anche nelle zone remote del muscolo.

Pertanto, i nostri dati di strain miocardico 2D riflettono l'azione positiva del G-CSF, nuovamente confermata mediante RMN cuore, nelle aree ischemiche e nello strain globale e sembrano evidenziare per la prima volta la possibilità che tali effetti siano estesi anche nelle zone non coinvolte nell'ischemia aprendo la possibilità a nuove implicazioni cliniche/terapeutiche della somministrazione di G-CSF.

I limiti del nostro studio sono principalmente legati alla numerosità campionaria per la valutazione ancora incompleta del follow-up e al casuale bias di selezione che ha portato ad una differenza significativa del gruppo trattati vs controlli in termine di dispersione di CKMB. È necessario il completamento del follow-up a due anni per la conferma dei dati del nostro studio.

TABELLE E GRAFICI

Tabella 4R: Fattori di Rischio e Anamnesi di Cardiopatia Ischemica.

	Controllo	Trattamento	P-value
Età, media (ds)	64.5 (11.3)	61.1 (11.8)	0.220
Maschi n (%)	22 (73.3)	25 (83.3)	0.347
Ipertensione Arteriosa, n (%)	12 (40.0)	11 (36.7)	0.791
Diabete Mellito, n (%)	8 (26.7)	6 (20.0)	0.542
Dislipidemia, n (%)	9 (30.0)	8 (27.6)	0.838
Fumo, n (%)	18 (60.0)	14 (46.7)	0.301
Obesità, n (%)	15 (50.0)	18 (60.0)	0.436
BSA, media (ds)	1.8 (0.2)	1.9 (0.2)	0.354
Infarto Progresso, n (%)	5 (16.7)	1 (3.3)	0.097
Angina Progressa, n (%)	1 (3.3)	0 (0.0)	0.500

BSA: Body Surface Area.

Tabella 5R: Caratteristiche dell'evento infartuale.

	Controllo	Trattamento	P-value
STB Time (min), media (ds)	316.5 (283.2)	297.4 (237.3)	0.802
CKMB picco, (ng/ml), media (ds)	187.3 (127.4)	299.7 (198.0)	0.037*
NTProBNP0, (pg/ml), media (ds)	2,151.7 (2,201.0)	1,705.8 (2,360.6)	0.307
Classe Killip, n (%)			
1	21 (70)	19 (63.3)	0.872
2	7 (23.3)	7 (23.3)	
3	1 (3.3)	3 (10.0)	
4	1 (3.3)	1 (3.3)	
Der. ECG con ST Sopra, n (%)			
≤3	7 (23.3)	4 (13.3)	0.702
4-5	12 (40)	13 (43.3)	
>5	11 (36.7)	13 (43.3)	

STB Time: tempo dai sintomi alla riapertura coronarica; NTProBNP0: NT-Pro BNP all'arruolamento; Der. ECG con ST Sopra: numero derivazioni ECG con ST sopralivellato all'osservazione.

Tabella 6R: Caratteristiche a Coronarografia e Angioplastica.

	Controllo	Trattamento	P-value
Coronaria Culprit, n (%)			
Destra	2 (6.7)	2 (6.7)	0.425
Circonflessa	4 (13.3)	1 (3.3)	
Interventricolare Anteriore	24 (80.0)	27 (90.0)	
Numero di Vasi malati, n (%)			
1	14 (46.7)	16 (53.3)	0.876
2	12 (40.0)	11 (36.7)	
3	4 (13.3)	3 (10.0)	
TIMI Flow pre, n (%)			
0	19 (63.3)	23 (76.7)	0.260
1	11 (36.7)	7 (23.3)	
TIMI Flow post, n (%)			
2	2 (6.7)	1 (3.3)	0.500
3	28 (93.3)	29 (96.7)	
Alto Carico Trombotico, n (%)	6 (20.7)	12 (40.0)	0.107
IABP, n (%)	4 (13.3)	5 (16.7)	0.500

Alto Carico Trombotico: pazienti sottoposti a tromboaspirazione e/o uso di farmaci inibitori della glicoproteina IIb/IIIa in bailout; IABP: contropulsatore aortico.

Tabella 7R: Caratteristiche di ricovero e Terapia alla dimissione.

	Controllo	Trattamento	P-value
Ricovero Ospedaliero			
Tempo di Degenza, giorni, media (ds)	7.1 (2.1)	10.5 (4.7)	0.001*
GB picco, 10 ³ /ml, media (ds)	-	52.078 (3.258)	-
Morti	2	0	-
RAS-EAS	0	0	
Terapia			
Diuretico, n (%)	13 (46.4)	16 (53.3)	0.599
B-Bloccante, n (%)	27 (96.4)	28 (93.3)	0.526
Acido Acetisalicilico, n (%)	30 (100)	30 (100)	
ACE-I o Sartano, n (%)	30 (100)	30 (100)	

RAS-EAS: Reazioni Avverse Serie – Eventi Avversi Seri.

Tabella 8R: Confronto dati Eco 2D tra pazienti trattati e non trattati all'arruolamento; 30 pz. trattati – 30 pz. non trattati.

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
ECO 2D			
FEV _{sx} %	36.5 (7.3)	37.6 (7.6)	0.4526
VTDV _{sx} (ml)	102.1 (32.5)	96.1 (23.9)	0.6466
VTSV _{sx} (ml)	65.3 (25.6)	59.1 (16.6)	0.6413

Tabella 9R: Confronto dati RMN tra pazienti trattati e non trattati a 7 giorni; 26 pz. trattati – 25pz. non trattati.

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
RMN			
FE %	43.0 (10.2)	48.2 (10.6)	0.0786
VTDV _{sx} (ml)	177.3 (46.1)	170.8 (39.5)	0.5943
VTDV _{sx} /m ² (ml/m ²)	94.6 (20.7)	92.0 (19.4)	0.6521
VTSV _{sx} (ml)	102.8 (36.8)	90.7 (36.8)	0.1468
VTSV _{sx} /m ² (ml/m ²)	54.9 (18.3)	48.7 (18.7)	0.1201

Tabella 10R: Confronto dati RMN tra pazienti trattati e non trattati a 6 mesi; 18 pz. trattati – 21pz. non trattati.

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
RMN			
FE %	49.8 (7.7)	52.0 (11.1)	0.41
VTDV _{sx} (ml)	178.8 (51.1)	179.5 (51.1)	0.72
VTDV _{sx} /m ² (ml/m ²)	95.0 (23.0)	95.6 (22.9)	0.84
VTSV _{sx} (ml)	92.4 (38.1)	90.8 (48.6)	0.46
VTSV _{sx} /m ² (ml/m ²)	48.9 (18.9)	47.9 (22.6)	0.53

Tabella I1R: Confronto per dati appaiati RMN cuore 7 giorni e 6 mesi nei pazienti trattati e non trattati; 18 pz. trattati - 21 pz. non trattati.

	7 Giorni media (ds)	6 Mesi media (ds)	P-value
Trattamento			
FEVsx %	45.6 (9.5)	49.8 (7.7)	0.0286
VTDVsx (ml)	177.1 (38.8)	178.8 (51.1)	0.7738
VTDVsx/m ² (ml/m ²)	94.5 (16.7)	95.0 (23.0)	0.8924
VTSVsx (ml)	97.8 (51.1)	92.4 (38.1)	0.3502
VTSVsx/m ² (ml/m ²)	52.2 (15.4)	48.9 (18.9)	0.1778
Controllo			
FEVsx %	49.2 (9.7)	52.0 (11.1)	0.0640
VTDVsx (ml)	171.9 (42.6)	179.5 (51.1)	0.2596
VTDVsx/m ² (ml/m ²)	92.3 (20.9)	95.6 (22.9)	0.3401
VTSVsx (ml)	90.3 (39.3)	90.8 (48.6)	0.9431
VTSVsx/m ² (ml/m ²)	48.3 (19.7)	47.9 (22.6)	0.9015

Tabella I2R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati Eco 2D tra pazienti trattati e non trattati all'arruolamento; 17 pz. trattati - 29 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
ECO 2D			
FEVsx %	38.5 (6.7)	39.0 (4.7)	0.991
VTDVsx (ml)	95.2 (35.6)	96.4 (24.2)	0.531
VTSVsx (ml)	59.2 (25.3)	59.1 (16.9)	0.432

Tabella I3R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati RMN tra pazienti trattati e non trattati a 7 giorni; 15 pz. trattati - 24 pz. non trattati.

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
RMN			
FEVsx %	47.0 (9.7)	49.1 (9.8)	0.519
VTDVsx (ml)	163.8 (49.3)	171.0 (40.4)	0.637
VTDVsx/m ² (ml/m ²)	91.2 (22.9)	92.1 (19.8)	0.899
VTSVsx (ml)	89.0 (38.5)	89.4 (37.0)	0.806
VTSVsx/m ² (ml/m ²)	49.8 (20.4)	48.0 (18.7)	0.795

Tabella I4R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati RMN tra pazienti trattati e non trattati a 6 mesi; 11 pz. trattati - 21 pz. non trattati.

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
RMN			
FEVsx %	49.84 (13.67)	53.29 (9.52)	0.23
VTDVsx (ml)	172.04 (39.74.3)	165.92 (51.1)	0.72
VTDVsx/m ² (ml/m ²)	91.18 (22.99)	89.46 (20.01)	0.84
VTSVsx (ml)	89.55 (38.11)	80.84 (34.72)	0.46
VTSVsx/m ² (ml/m ²)	47.35 (18.89)	43.52 (17.98)	0.53

Tabella 15R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto per dati appaiati RMN cuore 7 giorni e 6 mesi nei pazienti trattati e non trattati; 11 pz. trattati – 21 pz. non trattati.

	7 Giorni media (ds)	6 Mesi media (ds)	P-value
Trattamento			
FEV _{sx} %	48.7 (10.0)	54.2 (4.8)	0.050
VTDV _{sx} (ml)	166.7 (41.5)	157.5 (44.6)	0.114
VTDV _{sx} /m ² (ml/m ²)	92.3 (16.9)	86.9 (17.2)	0.137
VTSV _{sx} (ml)	87.1 (31.5)	73.1 (24.5)	0.013
VTSV _{sx} /m ² (ml/m ²)	48.3 (16.9)	40.2 (10.6)	0.033
Controllo			
FEV _{sx} %	49.2 (9.7)	52.0 (11.1)	0.064
VTDV _{sx} (ml)	171.9 (42.6)	179.5 (51.1)	0.260
VTDV _{sx} /m ² (ml/m ²)	92.3 (20.9)	95.6 (22.9)	0.340
VTSV _{sx} (ml)	90.3 (39.3)	90.8 (48.6)	0.943
VTSV _{sx} /m ² (ml/m ²)	48.3 (19.7)	47.9 (22.6)	0.902

Tabella 16R: Confronto dati Strain tra pazienti trattati e non trattati a 7 giorni; 26 pz. trattati – 28 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-10.84 (4.50)	-12.37 (3.60)	0.17
Aree ischemiche	-7.65 (5.33)	-9.92 (5.08)	0.13
Aree non ischemiche	-12.89 (3.97)	-14.22 (3.23)	0.19

Tabella 17R: Confronto per dati appaiati di strain miocardico nei due gruppi a 7 giorni e 1 mese; 30 pz. trattati – 28 pz. non trattati

	7 Giorni media (ds)	1 Mese media (ds)	P-value
Trattamento			
Strain Globale	-10.84 (4.50)	-12.46 (4.18)	0.02*
Strain Aree ischemiche	-7.65 (5.33)	-10.01 (5.96)	0.00*
Strain Aree non ischemiche	-12.89 (3.97)	-13.83 (5.0)	0.26
Controllo			
Strain Globale	-12.37 (3.60)	-15.13 (5.18)	0.00*
Strain Aree ischemiche	-9.92 (5.08)	-13.42 (6.05)	0.00*
Strain Aree non ischemiche	-14.22 (3.23)	-15.80 (4.76)	0.18

Tabella 18R: Confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 1 mese; 28 pz. trattati – 27 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-12.46 (4.81)	-15.13 (5.18)	0.05*
Aree ischemiche	-10.01 (5.96)	-13.42 (6.05)	0.05*
Aree non ischemiche	-13.83 (5.0)	-15.80 (4.76)	0.14

Tabella 19R: Confronto per dati appaiati di strain miocardico nei due gruppi a 1 mese e 6 mesi; 25 pz. trattati – 25 pz. non trattati

	1 Mese media (ds)	6 Mesi media (ds)	P-value
Trattamento			
Strain Globale	-12.46 (4.18)	-15.22 (5.02)	0.00*
Strain Aree ischemiche	-10.01(5.96)	-12.61(5.71)	0.01*
Strain Aree non ischemiche	-13.83 (5.0)	-17.04 (4.17)	0.01*
Controllo			
Strain Globale	-15.13 (5.18)	-15.41 (4.68)	0.40
Strain Aree ischemiche	-13.42 (6.05)	-13.76 (5.90)	0.91
Strain Aree non ischemiche	-15.80 (4.76)	-16.05 (5.53)	0.29

Tabella 20R: Confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 6 mesi; 24 pz. trattati – 25 pz. non trattati per i dati di strain

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-15.22 (5.02)	-15.41 (4.68)	0.89
Aree ischemiche	-12.61(5.71)	-13.76 (5.90)	0.49
Aree non ischemiche	-17.04 (4.17)	-16.05 (5.53)	0.53

Tabella 21R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 7 giorni; 17 pz. trattati – 27 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-11.90 (5.27)	-12.51 (3.61)	0.40
Aree ischemiche	-8.56(6.53)	-10.18 (5.03)	0.66
Aree non ischemiche	-13.68 (4.35)	-14.34 (3.23)	0.58

Tabella 22R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 1 mese; 17 pz. trattati – 27 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-12.94(4.55)	-14.48 (4.87)	0.35
Aree ischemiche	-12.32(6.55)	-13.94 (5.46)	0.41
Aree non ischemiche	-15.96(3.90)	-16.31(4.68)	0.32

Tabella 23R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto per dati appaiati di strain miocardico nei due gruppi a 7 giorni e 1 mese; 17 pz. trattati – 27 pz. non trattati

	7 Giorni media (ds)	1 Mese media (ds)	P-value
Trattamento			
Strain Globale	-11.90 (5.27)	-12.94(4.55)	0.01*
Strain Aree ischemiche	-8.56(6.53)	-12.32(6.55)	0.00*
Strain Aree non ischemiche	-13.68 (4.35)	-15.96(3.90)	0.03*
Controllo			
Strain Globale	-12.51 (3.61)	-14.48 (4.87)	0.00*
Strain Aree ischemiche	-10.18 (5.03)	-13.94 (5.46)	0.08
Strain Aree non ischemiche	-14.34 (3.23)	-16.31(4.68)	0.00*

Tabella 24R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 6 mese; 13 pz. trattati – 24 pz. non trattati

	Trattamento media (ds)	Controllo media (ds)	P-value
STRAIN			
Globale	-18.20 (4.10)	-15.65 (4.62)	0.11
Aree ischemiche	-15.31(5.15)	-14.18 (5.64)	0.55
Aree non ischemiche	-19.66(5.71)	-16.36 (4.12)	0.05

Tabella 25R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; confronto per dati appaiati di strain miocardico nei due gruppi a 1 mese e 6 mesi; 13 pz. trattati – 24 pz. non trattati

	1 Mese media (ds)	6 Mesi media (ds)	P-value
Trattamento			
Strain Globale	-12.94(4.55)	-18.20 (4.10)	0.03*
Strain Aree ischemiche	-12.32(6.55)	-15.31(5.15)	0.05*
Strain Aree non ischemiche	-15.96(3.90)	-19.66(5.71)	0.08
Controllo			
Strain Globale	-14.48 (4.87)	-15.65 (4.62)	0.59
Strain Aree ischemiche	-13.94 (5.46)	-14.18 (5.64)	0.91
Strain Aree non ischemiche	-16.31(4.68)	-16.36 (4.12)	0.46

Figura 13R. Distribuzione dei pz. trattati e dei pz. non trattati in base ai valori di CK MB.

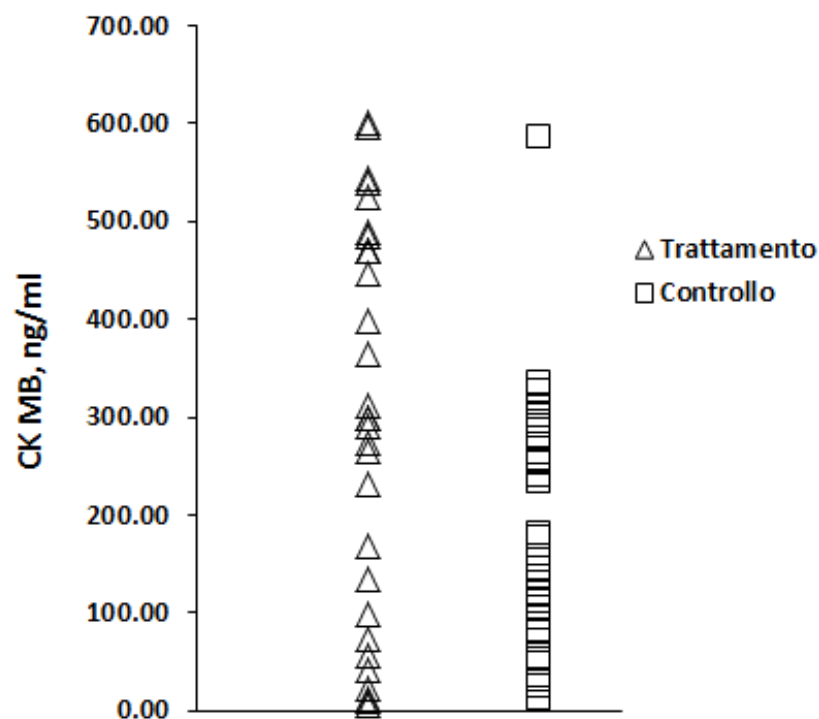


Figura I4R: Confronto dati Eco 2D tra pazienti trattati e non trattati all'arruolamento

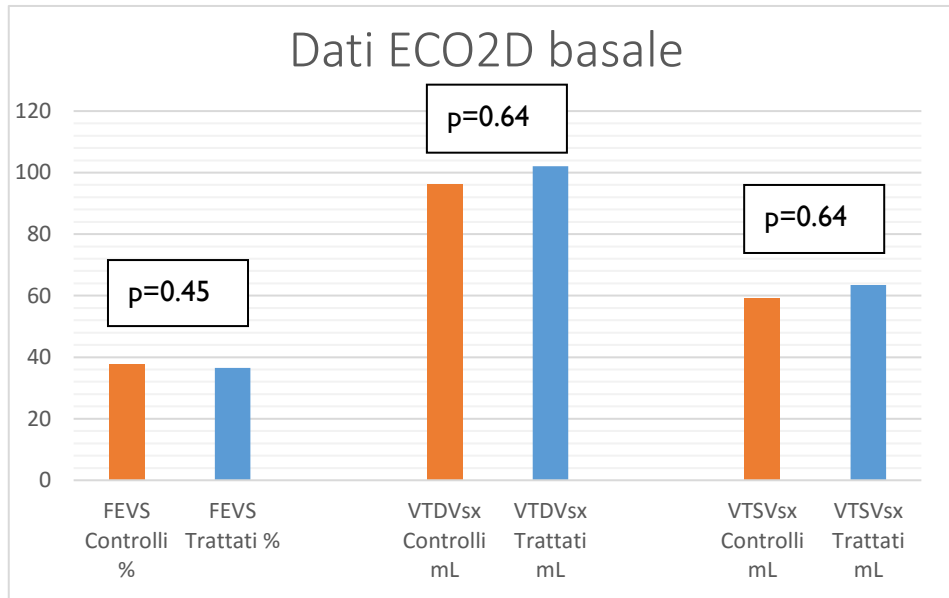
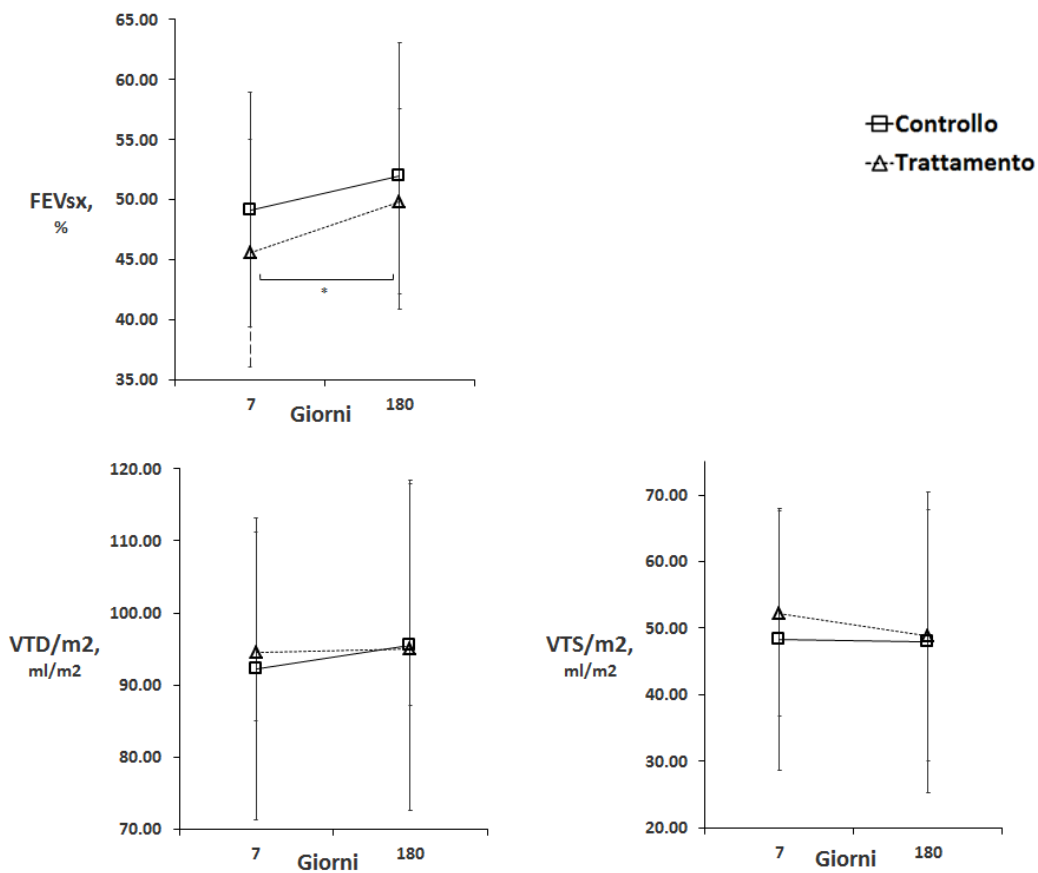
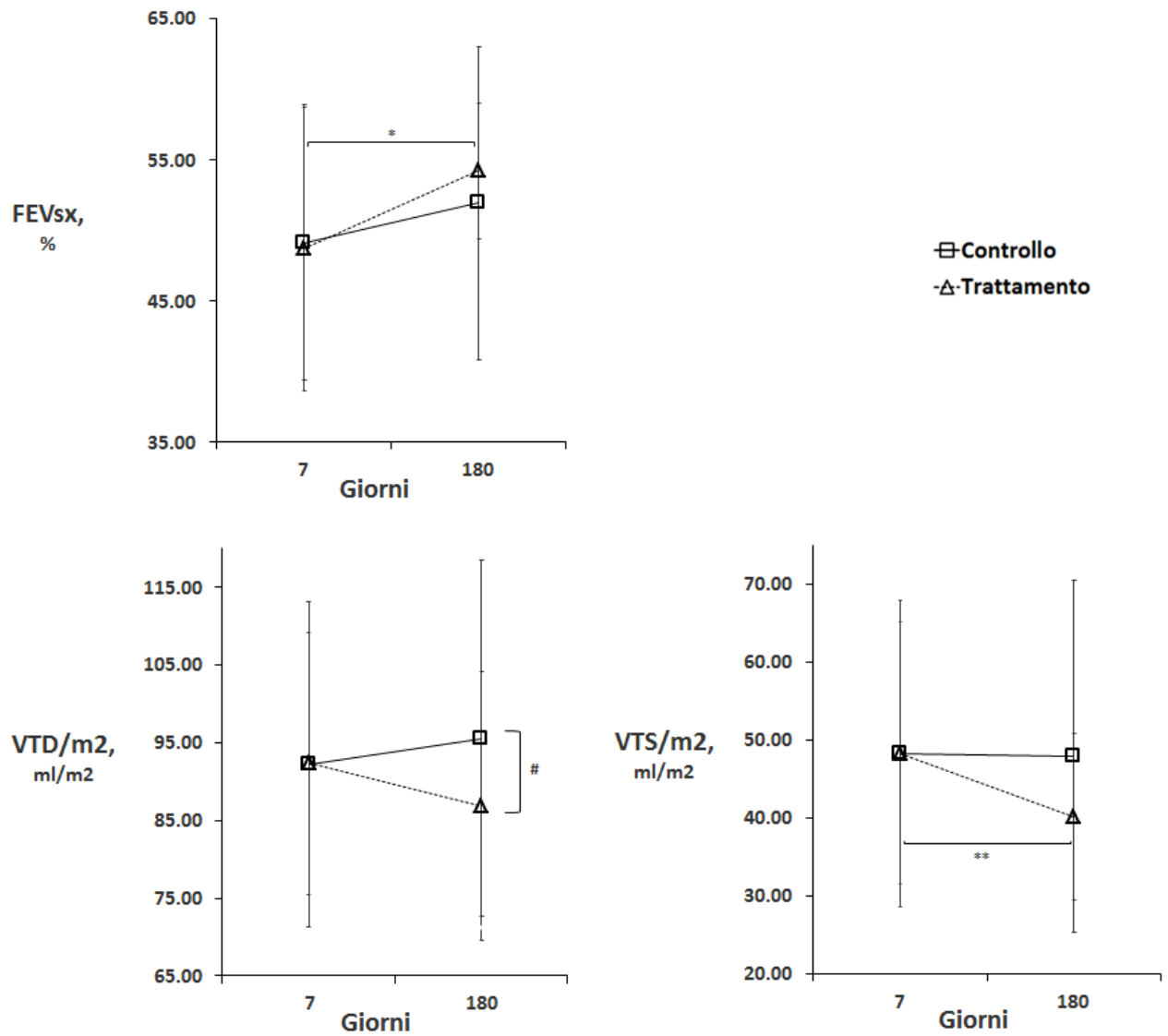


Figura I5R: Variazione delle medie dei dati RMN a 7 giorni 6 mesi gruppo controllo e gruppo trattamento.



FEVsx: frazione di eiezione del ventricolo sinistro; VTD/m2: volume telediastolico indicizzato del ventricolo sinistro; VTS/m2: volume telesistolico indicizzato del ventricolo sinistro; * P-value < a 0,05 per incremento di FEVsx nel gruppo trattamento.

Figura I6R: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; variazione delle medie dei dati RMN a 7 giorni e 6 mesi gruppo controllo e gruppo trattamento.



FEVsx: frazione di eiezione del ventricolo sinistro; VTD/m2: volume telediastolico indicizzato del ventricolo sinistro; VTS/m2: volume telesistolico indicizzato del ventricolo sinistro; * P-value < 0,05 per incremento di FEVsx nel gruppo trattamento; ** P-value < 0,05 per riduzione di VTS/m2 nel gruppo trattamento; # P-value < a 0,05 per confronto dei delta % di VTD/m2 fra 7 giorni e 6 mesi, gruppo trattamento e gruppo controllo.

Figura 17R: Confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 7 giorni

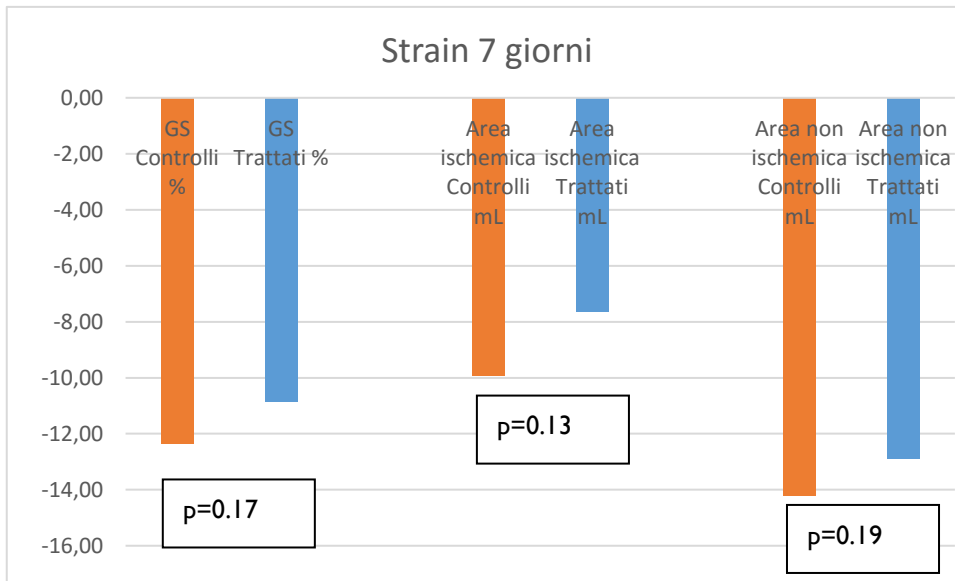


Figura 18R: Confronto dati strain tra pazienti trattati e non trattati a 1 mese

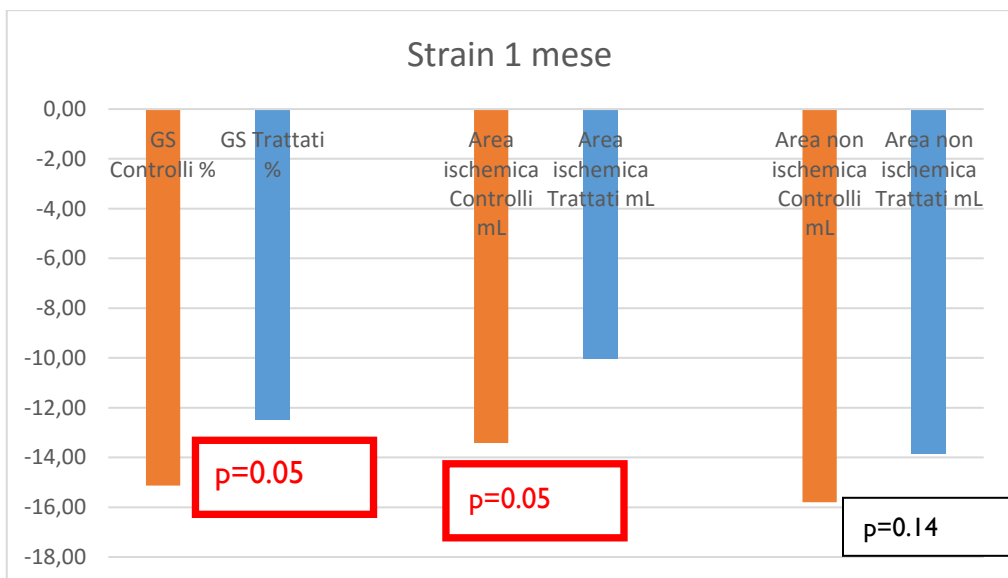
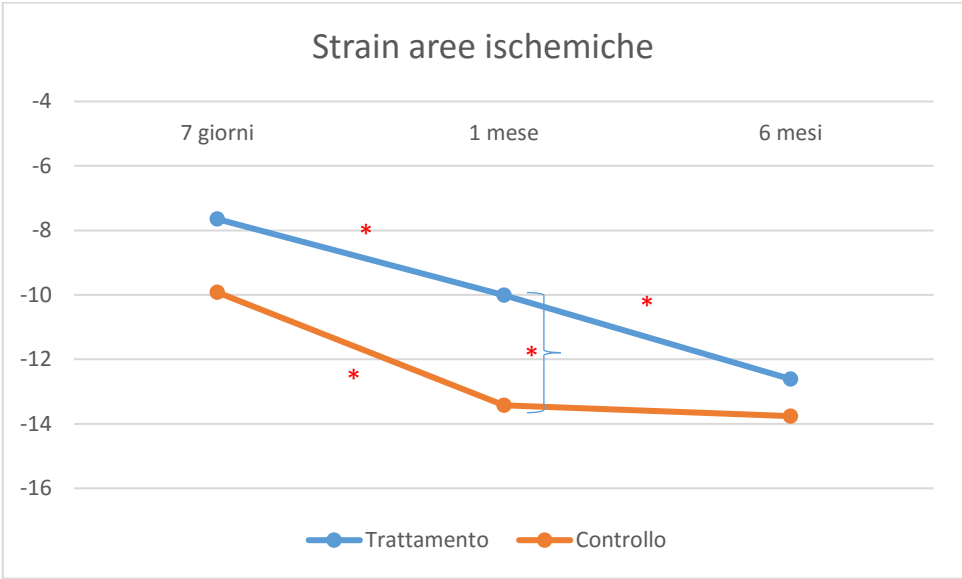
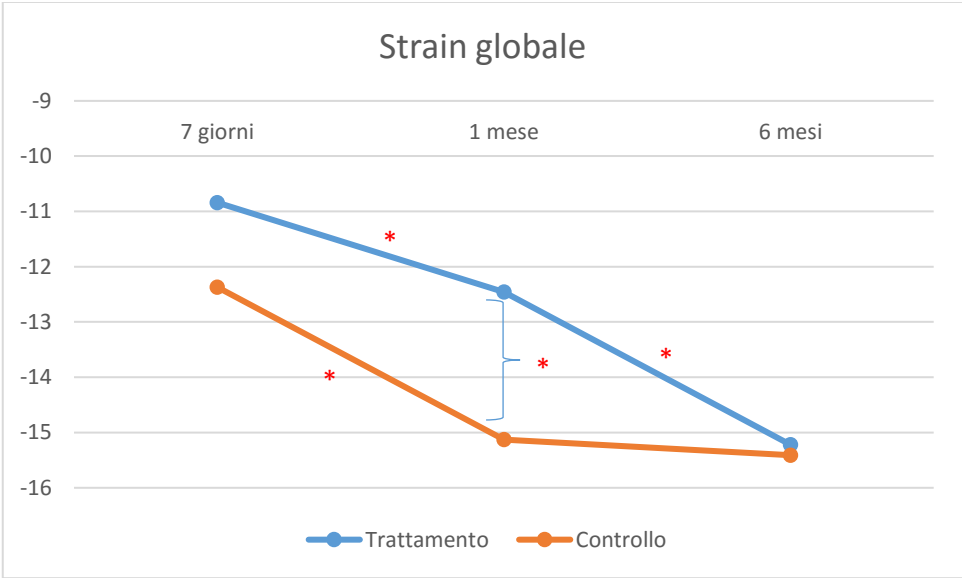


Figura I9R: grafico riassuntivo variazione delle medie dello strain a 7 giorni, 1 mese e 6 mesi - gruppo controllo e gruppo trattamento



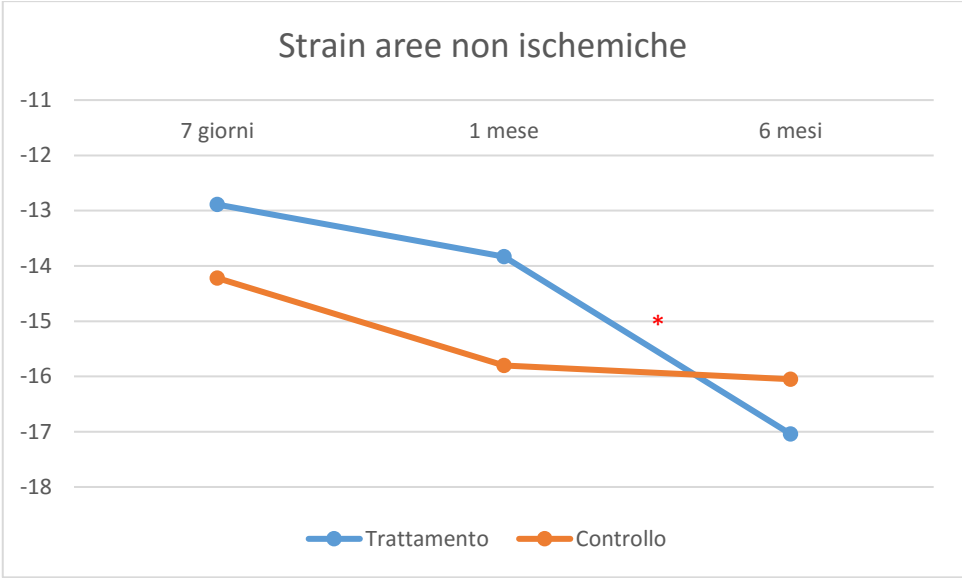


Figura 20R: Confronto dati Eco 2D tra pazienti trattati e non trattati a 6 mese

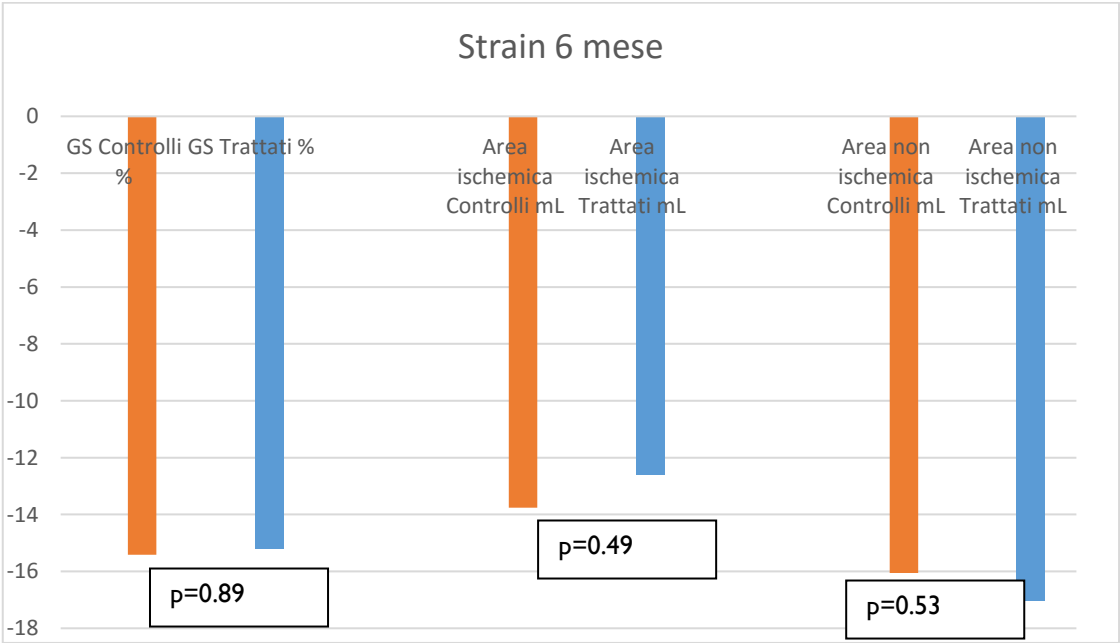
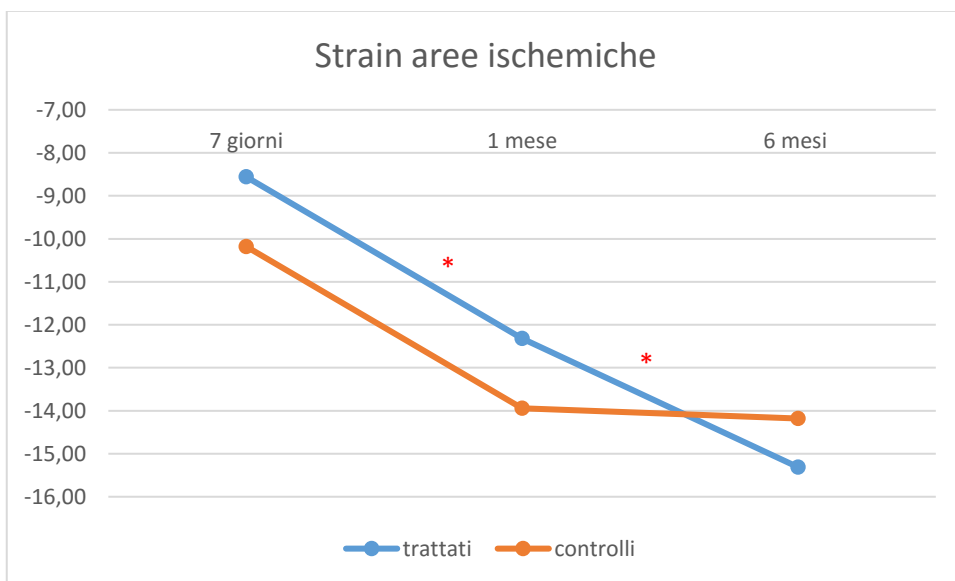
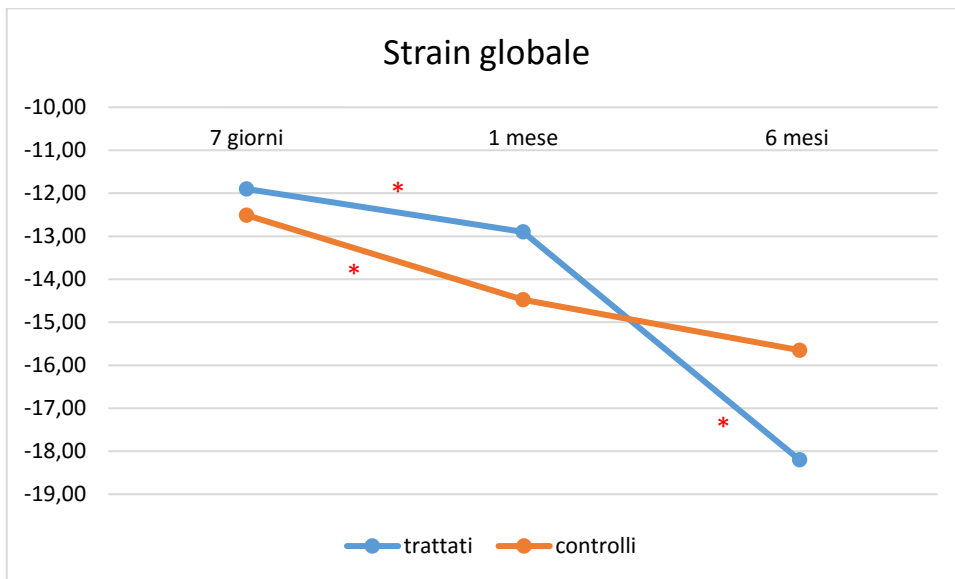
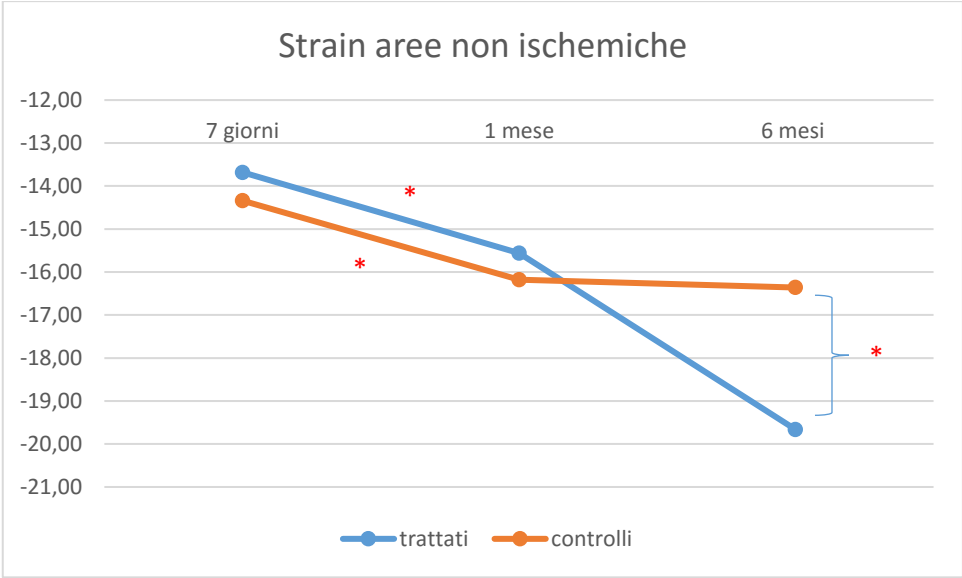


Figura 21: Popolazione CK MB picco <350 ng/ml; grafico riassuntivo variazione delle medie dei dati strain a 7 giorni, 1 mese e 6 mesi - gruppo controllo e gruppo trattamento





BIBLIOGRAFIA

- 1 Rosamond W, Flegal K., Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117:e25
- 2 Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American heart Association. *Circulation* 2010; 121: 948
- 3 Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 2014; 35: 2950
- 4 Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary artery disease. *Lancet* 1999; 353:89
- 5 Yusuf S, reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001; 104: 2855
- 6 Yusuf S, reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104: 2746
- 7 World Health Organization (WHO) Media Center, 2016
- 8 Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert, Allan S. Jaffe, Maarten L. Simoons, Bernard R. Chaitman and Harvey D. White: the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal* (2012); 33: 2551–2567
- 9 Véronique L. Roger, Susan A. Weston, Yariv Gerber, Jill M. Killian, Shannon M. Dunlay, Allan S. Jaffe, Malcolm R. Bell, Jan Kors, Barbara P. Yawn and Steven J. Jacobsen. Trends in Incidence, Severity, and Outcome of Hospitalized Myocardial Infarction. *Circulation* 2010; 121 (7): 863-869
- 10 O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD et al. 2013 ACCF/AHA Guidelines for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J AM Coll Cardiol* 2012
- 11 Lange RA, Hillis LD. Reperfusion therapy in acute myocardial infarction, *N Engl J Med* 2002; 346: 954-955
- 12 Mandelzweig L et al. The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004. *Eur Heart J* 2006;27:2285–2293
- 13 Widimsky P et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010;31:943–957
- 14 Fox KA et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *Br Med J* 2006;333:1091
- 15 Fox KA et al. Underestimated and under-recognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK– Belgian Study). *Eur Heart J* 2010;31:2755–2764
- 16 Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007.; 93: 1137-1146
- 17 Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003; 289: 194-202
- 18 Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JCM, Stricker BHC. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J England*; 2004;25:1614–1619
- 19 Ceia F, Fonseca C, Mota T, Morais H, Matias F, De Sousa A, Oliveira AG. Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur J Heart Fail* 2002;4:531–539
- 20 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of the European Society of Cardiology (ESC). 2012 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14:803–869.
- 21 Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. A report of the

- American College of cardiology foundation/American Heart association task force on practice guidelines developed in collaboration with the international society of heart and lung transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: e1-e90
- 22 The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* (2016) 37, 2129–2200
- 23 Krum H, Gilbert RE. Demographics and concomitant disorders in heart failure. *Lancet* 2003; 362: 147-158
- 24 Lange RA, Hillis LD. Reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 346: 954-955
- 25 Stone GW et al. Comparison of angioplasty with stenting, with or without abciximab, in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;346:957-66.
- 26 Dickstein K G et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 2008 Oct;10(10):933-89.
- 27 Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83:361-366
- 28 Sary H, Chandler A, Dinsmore R, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355–74
- 29 Herbert C. Sary, A. Bleakley Chandler, Robert E. Dinsmore, Valentin Fuster, Seymour Glagov, William Insull, Michael E. Rosenfeld, Colin J. Schwartz, William D. Wagner and Robert W. Wissler. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1995, Volume 92, Issue 5
- 30 Davies M, Woolf N, Rowles P, et al. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988;60:459–64
- 31 Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26
- 32 Arbustini E, Dal Bello P, Morbini P, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999;82:269–72
- 33 Burke A, Farb A, Malcom G, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276–82
- 34 Davies M. The composition of coronary artery plaques. *N Engl J Med* 1997;336:1312–13
- 35 Fuster V et al. Atherothrombosis and High-Risk Plaque. *J Am Coll Cardiol*, 2005; 46:937-954.
- 36 Davies M. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013–20.
- 37 Rodriguez-Granillo GA et al Global characterization of coronary plaque rupture phenotype using three-vessel intravascular ultrasound radiofrequency data analysis. *Eur Heart J* 2006;27:1921-1927.
- 38 Rittersma SZ et al. Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2005;111:1160-1165.
- 39 Stone PH Triggering myocardial infarction. *N Engl J Med* 2004;351:1716-1718.
- 40 Thygesen K, et al. Third definition of myocardial infarction. *JACC* 2012; Vol. 60
- 41 Van de Werf F et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2008 Dec;29(23):2909-45.
- 42 Lee KL et al. Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators. *Circulation* 1995;91:1659-1668
- 43 Morrow DA et al. TIMI risk score for ST-elevation myocardial infarction: a convenient, bedside, clinical score for risk assessment at presentation: an intravenous nPA for treatment of infarcting myocardium early II trial substudy. *Circulation.* 2000 Oct 24;102(17):2031-7.
- 44 Temporelli PL. Il rimodellamento ventricolare sinistro postinfartuale. *GIC* 2008; 9: 15S-19S

-
- 45 St John Sutton M, Pfeffer MA, Plappert T, et al. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction: the protective effects of captopril. *Circulation* 1994; 89: 68-75
- 46 Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, et al. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 2001; 141: 131-8
- 47 Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77
- 48 Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, et al. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and early afterload reducing therapy study. *Ann Intern Med* 2001; 134: 451-8
- 49 Solomon SD, Skali H, Anavekar NS, et al. Changes in ventricular size and function in patients treated with valsartan, captopril, or both after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 111: 3411-9.
- 50 Pfeffer JM et al. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991;260(5 Pt 2):H1406-14
- 51 Giannuzzi P, Imparato A, Temporelli PL, et al. Doppler-derived mitral deceleration time of early filling as a strong predictor of pulmonary capillary wedge pressure in postinfarction patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1630-7.
- 52 Moller JE, Sondergaard E, Poulsen SH, Egstrup K. Pseudonormal and restrictive filling patterns predict left ventricular dilation and cardiac death after a first myocardial infarction: a serial color M-mode Doppler echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1841-6.
- 53 Kim CB et al. Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis. *Circulation.* 1993;88(5 Pt 1):2426-36.
- 54 Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-72
- 55 Bates ER, Califf RM, Stack RS, et al. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI-1) trial: influence of infarct location on arterial patency, left ventricular function and mortality. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 12-18.
- 56 Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; 79: 441-4.
- 57 Serruys PW, Simoons ML, Suryapranata H, et al. Preservation of global and regional left ventricular function after early thrombolysis in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 729-42.
- 58 Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation* 1987; 75: 299-306.
- 59 Hale SL, Kloner RA. Left ventricular topographic alterations in the completely healed rat infarct caused by early and late coronary artery reperfusion. *Am Heart J* 1988; 116 (6 Pt 1): 1508-13
- 60 The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-35.
- 61 The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet* 1993; 342: 821-8
- 62 Yusuf S, Pepine CJ, Garces C, et al. Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet* 1992; 340: 1173-8.
- 63 Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, MacMahon S, Sharpe N. Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 1060-6
- 64 Keeley EG et al Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003; 361: 13-20
- 65 Giugliano RP et al. Selecting the best reperfusion strategy in ST-elevation myocardial infarction: it's all a matter of time. *Circulation* 2003; 108: 2828-30

-
- 66 Jackson KA et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107:1395- 402.
- 67 Quaini F et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002; 346: 5-15.
- 68 Soonpa MH et al. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998; 83:15-26.
- 69 Beltrami AP et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-57.
- 70 Mathur A et al. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364:183-92
- 71 Weissman IL Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68
- 72 Mathur A et al. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364:183-92
- 73 Orkin SH et al. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus development heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 3: 323-28
- 74 Verfaillie CM Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol*. 2002 Apr;3(4):314-7
- 75 Orkin SH et al. Stem-cell competition. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):25-7
- 76 Jiang Y et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893):41-9.
- 77 Hristov M et al. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:201-206
- 78 Lagasse E et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1229-34
- 79 LaBarge MA et al. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):589-601
- 80 Wagers AJ et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2256-9
- 81 Lemischka I A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):848-52
- 82 Wang X et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003 Apr 24;422(6934):897-901
- 83 Jiang Y et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):896-904.
- 84 Toma JG et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):778-84
- 85 Dorshkind K Stem cells and lineage plasticity: the challenge to existing paradigms. *Immunol Rev*. 2002 Sep;187:5-8
- 86 Bompais H. et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004, Apr 1; 103(7): 2577-84
- 87 Asahara T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7
- 88 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):952-8.
- 89 Luttun A1, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002 Feb;12(2):88-96.
- 90 Lin Y1, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(1):71-7
- 91 Heiss C, et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45 (9): 1441-1448
- 92 Kong D, Melo LG, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004; 110: 2039-2046
- 93 Shintani S et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2776-9.
- 94 Massa M et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199-206
- 95 Fausto N et al. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. 92

- Mech Dev. 2003 Jan;120(1):117-30.
- 96 Libbrecht L et al. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Dec;13(6):389-96.
- 97 Taupin P et al. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res.* 2002 Sep 15;69(6):745-9.
- 98 Belluzzi O et al. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 2003 Nov 12;23(32):10411-8.
- 99 Pagani FD et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Mar 5;41(5):879-88
- 100 Panchision DM et al. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Aug;12(4):478-87.
- 101 Van Praag H et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.
- 102 Zammit P et al. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation.* 2001 Oct;68(4-5):193-204.
- 103 Urbanek K et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2;100(18):10440-5.
- 104 Kumar V et al. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005
- 105 Anversa P et al. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998;83(1):1-14
- 106 Kajstura J et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8801-5
- 107 Nadal-Ginard B et al. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1457-9
- 108 Nadal-Ginard B et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003;92(2):139-50
- 109 Setoguchi M et al. Activation of cyclins and cyclin-dependent kinases, DNA synthesis, and myocyte mitotic division in pacing-induced heart failure in dogs. *Lab Invest.* 1999;79(12):1545-58.
- 110 Dolbeare F Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. *Histochem J.* 1996;28(8):531-75.
- 111 Larsen JK et al Detection of proliferating cell nuclear antigen. *Methods Cell Biol.* 2001;63:419-31.
- 112 Kajstura J et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8801-5.
- 113 Nadal-Ginard B et al. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1457-9.
- 114 Anversa P et al. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 2002;415(6868):240-3.
- 115 Anversa P et al. Primitive cells and tissue regeneration. *Circ Res.* 2003;92(6):579-82.
- 116 Kawamoto A et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):461-8.
- 117 Leone AM et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 2005; 26: 1196-1204
- 118 Vasa M et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-2890
- 119 Marco Centola, Karl H. Schuleri, Albert C. Lardo, Joshua M. Hare. La terapia con le cellule staminali per la rigenerazione del miocardio: meccanismi d'azione e attuali applicazioni cliniche. *G Ital Cardiol* 2008; 9 (4): 234-250
- 120 Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83
- 121 Melo LG et al. Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J* 2004;18: 648-663.
- 122 Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-30
- 123 Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial

- injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1721-4.
- 124 Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005; 96: 151-63.
- 125 Thompson CA, Reddy VK, Srinivasan A, et al. Left ventricular functional recovery with percutaneous, transvascular direct myocardial delivery of bone marrow-derived cells. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1385-92
- 126 Thompson CA, Nasser BA, Makower J, et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1964-71
- 127 Siminiak T, Fiszler D, Jerzykowska O, et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; 26: 1188-95
- 128 Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17
- 129 Chen SI, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 92-5
- 130 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
- 131 Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1222-32.
- 132 Schachinger V, Assmus B, Britten B, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one year results of TOPCAREAMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9.
- 133 Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742-8
- 134 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-8
- 135 Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-209.
- 136 Janssens S, Dubois C, Bogaert J, 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: 113-21.
- 137 Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; 27: 2775-83
- 138 T. Freyman et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction, *Eur Heart J* 27 (2006), pp. 1114–1122.
- 139 Assmus B, Walter DH, Lehmann R, et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 2989-95
- 140 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107: 1322-8.
- 141 Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004; 104: 3581-7
- 142 Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; 108: 863-8
- 143 Freed LE, Guilak F, Guo XE, et al. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng* 2006; 12: 3285-305
- 144 Freed L et al. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3285-305.
- 145 Sales VL, Engelmayr GC Jr, Mettler BA, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue

- engineering scaffolds. *Circulation* 2006; 114 (Suppl): I193-I199
- 146 Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM. Is stem cell therapy ready for patients? *Circulation* 2006; 114: 339-52.
- 147 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-6
- 148 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8
- 149 Schachinger V, Assmus B, Britten B, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one year results of TOPCAREAMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9
- 150 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-8
- 151 Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; 27: 2775-83
- 152 Janssens S, Dubois C, Bogaert J, 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: 113-2
- 153 Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-209
- 154 Chen SI, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 92-5
- 155 Anderlini P et al. Biologic and clinical effects of granulocyte colony stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996;88:2819-25.
- 156 The American Society of Clinical Oncology: American Society of Clinical Oncology recommendations for the use of hematopoietic colony stimulating factor: evidence based, clinical practice guidelines. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2471.
- 157 Cong YS et al. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 66(3):407-25.
- 158 Caspar CB et al. Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1993; 81: 2866.
- 159 Jendiroba DB et al. Evaluation and comparison of three mobilization methods for granulocyte collection. *Blood* 1995; 86: 609a.
- 160 De Haas M et al. Granulocyte colony stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effect on circulating neutrophils. *Blood* 1994; 84: 3885.
- 161 Tjnnfiord GE et al. Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1994; 84: 2795.
- 162 Chatta GS et al. Effects on in vivo recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor on the neutrophil response and peripheral blood colony forming cells in healthy young and elderly adult volunteers. *Blood* 1994; 84
- 163 Falanga A et al. Changes of hemostatic parameters in healthy donors administered G-CSF for peripheral blood progenitor cells collection. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: S72.
- 164 Zohnhöfer D et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(9):1003-10.
- 165 Deichmann M Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptor CXCR-4 and CKR-5 in CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1997;89:3522-3528.
- 166 Petit I et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3:687-694.
- 167 Semerad CL et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood.* 2005;106:3020-3027.
- 168 Flomenberg N et al. Role of CXCR4 chemokine receptor blockade using AMD3100 for mobilization of autologous hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol.* 2005;114:198-205.
- 169 Minatoguchi S et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction 95

- granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004
- 170 Harada M et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):305-11.
- 171 Sugano Y et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;65(2):446-56
- 172 Ohtsuka M et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J.* 2004;18(7):851-3.
- 173 Orlic D et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9
- 174 Iwanaga K et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(4):1353
- 175 Fujita J et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11)
- 176 Ueda K et al. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):e108-13.
- 177 Boneberg EM et al. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):270-6
- 178 Hartung T Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.* 1998 May;5(3):221-5
- 179 Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
- 180 Wang Y, Tagil K, Ripa RS, et al. Effect of mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease. *Int J Cardiol* 2005; 100: 477-83
- 181 Petzsch M, Ince H, Kleine HD, et al. No restenosis after G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor). (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 238
- 182 Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINEAMI) Trial. *Circulation* 2005; 112 (Suppl): I73-I80.
- 183 Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005; 26: 1838-45
- 184 Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-10.
- 185 Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2006; 113: 1983-92
- 186 Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1712-21
- 187 Ellis SG et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction : results of a pilot dose-escalation randomized trial. *Am Heart J* 2006 ;152(6) :1051.e09-.e15
- 188 Takano H et al. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in 96

- patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2007;122(1):41-7.
- 189 Ince H et al. Cardiovascular events and re-stenosis following administration of G-CSF in acute myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. *Heart* 2008; 94: 610-616.
- 190 Latif A et al. Granulocyte colony stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2008; 156:216-26.
- ¹⁹¹ Bartunek J et al. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3 Suppl 1:S52-6.
- 192 Piepoli MF et al. Secondary prevention through cardiac rehabilitation: from knowledge to implementation. A position paper from the Cardiac Rehabilitation Section of the European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010
- 193 Achilli F et al. G-CSF attenuates left ventricular remodelling after acute anterior STEMI: results of the single-blind, randomized, placebo-controlled multicentre STem cEll Mobilization in Acute Myocardial Infarction (STEM-AMI) Trial. *Eur J Heart Fail.* 2010
- ¹⁹⁴ Achilli F et al. G-CSF treatment for STEMI: final 3-year follow-up of the randomised placebo-controlled STEM-AMI trial. *Heart.* 2014 Apr;100(7):574-81.
- 195 Steg PG et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segmentelevation. *Eur Heart J.* 2012 Oct;33(20):2569-619.
- 196 McMurray JJ et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Eur Heart J* 2012;33:1787-847
- 197 Politi A et al. LombardIMA: a regional registry for coronary angioplasty in ST-elevation myocardial infarction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2011 Jan;12(1):43-50.
- 198 Mamas MA et al. Impact of left ventricular function in relation to procedural outcomes following percutaneous coronary intervention: insights from the British Cardiovascular Intervention Society. *Eur Heart J.* 2014 Nov 14;35(43):3004-12a
- 199 Zaffe D., Lodi R. Architettura e funzione del miocardio. Consensi, controversie e incognite. *Boll Soc Med Chir Modena* 2007; N4-6
- 200 Anderson RH, Ho SY, Redmann K, Sanchez-Quintana D, Lunkenheimer PP. The anatomical arrangement of the myocardial cells making up the ventricular mass. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 2005; 28: 517-25.
- 201 Greenbaum RA, Ho SY, Gibson DG, Becker AE, Anderson RH. Left ventricular fibre architecture in man. *Br Heart J.* 1981; 45: 248-263
- 202 Badano L, Galderisi M, Muraru D, Mondillo S. Speckle tracking echocardiography. *Malesci istituto farmacobiologico*
- 203 Tesi di laurea di Fontana A. Studio di variabilità dei parametri di velocità, strain and strain rate miocardici misurati mediante tecnica ecocardiografica speckle tracking. Relatore: Giannattasio C. Correlatore: Trocino G
- 204 Tesi di dottorato di ricerca in fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca. Applicazioni cliniche dello studio della deformazione miocardica mediante metodiche ultrasonore. Dottoranda Elisa Merli; Relatore Prof. Roberto Ferrari
- 205 Carlsson M, Ugander M, Mosen H, Buhre T, Arheden H. Atrioventricular plane displacement is the major contributor to left ventricular pumping in healthy adults, athletes, and patients with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1452-H1459
- 206 De Simone G, Ganau A, Roman MJ, Devereux RB. Relation of left ventricular longitudinal and circumferential shortening to ejection fraction in the presence or in the absence of mild hypertension. *J Hypertens* 1997; 15(9): 1011-1017
- 207 Oki T, Tabata T, Mishiro Y, Yamada H, Abe M, Onose Y, Watatsuki T, Iuchi A, Ito S. Pulsed tissue Doppler imaging of the left ventricular systolic and diastolic wall motion velocities to evaluate differences between long and short axes in healthy subjects. *J Am Soc Echocardiogr* 1999; 12(5): 308-313
- 208 Ingels NB. *Technology and health care* 1997; 45-52
- 209 Da Sengupta et al. Twist mechanics of the left ventricle: principles and application. *JACC Cardiovascular Imaging* 2008
- 210 Mondillo S, Galderisi M, Mele D, and the Echocardiography Study Group of the Italian Society of Cardiology. Speckle-Tracking Echocardiography. A New Technique for Assessing Myocardial

FunctionJ Ultrasound Med 2011; 30: 71-83

- 211 Tesi di laurea di Fontana A. Studio di variabilità dei parametri di velocità, strain and strain rate miocardici misurati mediante tecnica ecocardiografica speckle tracking. Relatore: Giannattasio C. Correlatore: Trocino G
- 212 Blessberger H, Binder T. Non-invasive imaging: two dimensional speckle tracking echocardiography –basic principles. *Heart* 2010; 96: 716-722
- 213 Leitman M, Lysansky P, Sidenko S, Shir V, Peleg E, Binenbaum M, Kaluski E, Krakover R, Vered Z. Two-dimensional strain-a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004 Oct;17(10):1021-9
- 214 Becker M, Bilke E, Kühl H, Kato M, Kramann R, Franke A, Bücken A, Hanrath P, Hoffmann R. Analysis of myocardial deformation based on pixel tracking in two dimensional echocardiographic images enables quantitative assessment of regional left ventricular function. *Heart*. 2006 Aug;92(8):1102-8. Epub 2005 Dec 30.
- 215 Cho GY, Chan J, Leano R, Strudwick M, Marwick TH. Comparison of twodimensional speckle and tissue velocity based strain and validation with harmonic phase magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol*. 2006; 97:1661–1666
- 216 Sjøli B, Ørn S, Grenne B, Ihlen H, Edvardsen T, Brunvand H. Diagnostic capability and reproducibility of strain by Doppler and by speckle tracking in patients with acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009 Jan;2(1):24-33
- 217 Brown J, Jenkins C, Marwick T. Use of myocardial strain to assess global left ventricular function: a comparison with cardiac magnetic resonance and 3-dimensional echocardiography. *Am Heart J* 2009; 157:102e1– 102e5
- 218 Choi JO, Shin DH, Cho SW, et al. Effect of preload on left ventricular longitudinal strain by 2D speckle tracking. *Echocardiography* 2008; 25:873– 879
- 219 Edvardsen T, Helle-Valle T, Smiseth OA. Systolic dysfunction in heart failure with normal ejection fraction: speckle-tracking echocardiography. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 49:207–21
- 220 De Simone G, Devereux RB, Roman MJ, et al. Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortening/end-systolic stress relation in human hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1444–1451
- 221 Wang J, Khoury DS, Yue Y, Torre-Amione G, Nagueh SF. Preserved left ventricular twist and circumferential deformation, but depressed longitudinal and radial deformation in patients with diastolic heart failure. *Eur Heart J* 2008; 29:1283–1289
- 222 Kang SJ, Lim HS, Choi BJ, et al. Longitudinal strain and torsion assessed by two-dimensional speckle tracking correlate with the serum level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, a marker of myocardial fibrosis, in patients with hypertension. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:907–911
- 223 Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM, Otsuji Y. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur J Echocardiogr* 2009; 10:926–932
- 224 Ng AC, Delgado V, Bertini M, et al. Findings from left ventricular strain and strain rate imaging in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2009; 104:1398–1401
- 225 Fang ZY, Yuda S, Anderson V, Short L, Case C, Marwick TH. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:611–617.
- 226 Choi JO, Cho SW, Song YB, et al. Longitudinal 2D strain at rest predicts the presence of left main and three vessel coronary artery disease in patients without regional wall motion abnormality. *Eur J Echocardiogr* 2009; 10:695–701
- 227 Bertini M, Mollema SA, Delgado V, et al. Impact of time to reperfusion after acute myocardial infarction on myocardial damage assessed by left ventricular longitudinal strain. *Am J Cardiol* 2009; 104:480–485
- 228 Park YH, Kang SJ, Song JK, et al. Prognostic value of longitudinal strain after primary reperfusion therapy in patients with anterior-wall acute myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:262–267
- 229 Becker M, Lenzen A, Ocklenburg C, et al. Myocardial deformation imaging based on ultrasonic pixel tracking to identify reversible myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1473–1481
- 230 Roes SD, Mollema SA, Lamb HJ, van der Wall EE, de Roos A, Bax JJ. Validation of echocardiographic two-dimensional speckle tracking longitudinal strain imaging for viability

- assessment in patients with chronic ischemic left ventricular dysfunction and comparison with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 2009; 104:312–317
- 231 Voigt JU, Nixdorff U, Bogdan R, et al. Comparison of deformation imaging and velocity imaging for detecting regional inducible ischaemia duringdobutamine stress echocardiography. *Eur Heart J* 2004; 25:1517–152
- 232 Moonen M, Lancellotti P, Zacharakis D, Pierard L. The value of 2D strain imaging during stress testing. *Echocardiography* 2009; 26:307–314
- 233 Lancellotti P, Cosyns B, Zacharakis D, et al. Importance of left ventricular longitudinal function and functional reserve in patients with degenerative mitral regurgitation: assessment by two-dimensional speckle tracking. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:1331–1336
- 234 Becker M, Kramann R, Dohmen G, et al. Impact of left ventricular loading conditions on myocardial deformation parameters: analysis of early and late changes of myocardial deformation parameters after aortic valve replacement. *J Am Soc Echocardiogr* 2007; 20:681–689
- 235 Kosmala W, Plaksej R, Strotmann JM, et al. Progression of left ventricular functional abnormalities in hypertensive patients with heart failure: an ultrasonic two-dimensional speckle tracking study. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:1309–1317
- 236 Liu YW, Tsai WC, Su CT, Lin CC, Chen JH. Evidence of left ventricular systolic dysfunction detected by automated function imaging in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction. *J Card Fail* 2009; 15:782–789
- 237 Park SJ, Miyazaki C, Bruce CJ, Ommen S, Miller FA, Oh JK. Left ventricular torsion by two-dimensional speckle tracking echocardiography in patients with diastolic dysfunction and normal ejection fraction. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 21:1129–1137
- 238 Wang J, Khoury DS, Yue Y, Torre-Amione G, Nagueh SF. Left ventricular untwisting rate by speckle tracking echocardiography. *Circulation* 2007; 116:2580–2586
- 239 Cho GY, Marwick TH, Kim HS, Kim MK, Hong KS, Oh DJ. Global 2-dimensional strain as a new prognosticator in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:618–624
- 240 Stanton T, Leano R, Marwick TH. Prediction of all-cause mortality from global longitudinal speckle strain: comparison with ejection fraction and wall motion scoring. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009; 2:356–36
- 241 Mele D, Toselli T, Dal Monte A, Guardigli G, Ceconi C, Ferrari R. Beyond dyssynchrony: what are the factors determining the response to cardiac resynchronization therapy [in Italian]? *G Ital Cardiol (Rome)* 2008;9:320–337
- 242 Chung ES, Leon AR, Tavazzi L, et al. Results of the Predictors of Response to CRT (PROSPECT) trial. *Circulation* 2008; 117:2608–26
- 243 Shi H, Shu X, Wang F, et al. Longitudinal two-dimensional strain rate imaging: a potential approach to predict the response to cardiac resynchronization therapy. *Int J Cardiovasc Imaging* 2009; 25:677–687
- 244 Tanaka H, Hara H, Saba S, Gorcsan J III. Prediction of response to cardiac resynchronization therapy by speckle tracking echocardiography using different software approaches. *J Am Soc Echocardiogr* 2009; 22:677–684
- 245 Tops LF, Delgado V, Bax JJ. The role of speckle tracking strain imaging in cardiac pacing. *Echocardiography* 2009; 26:315–323
- 246 Nesser HG, Winter S. Speckle tracking in the evaluation of left ventricular dyssynchrony. *Echocardiography* 2009; 24:324–336.
- 247 Stefani L, Pedrizzetti G, De Luca A, Mercuri R, Innocenti G, Galanti G. Real-time evaluation of longitudinal peak systolic strain (speckle tracking measurement) in left and right ventricles of athletes. *Cardiovasc Ultrasound* 2009; 7:17
- 248 Stefani L, De Luca A, Maffulli N et al. Speckle tracking for left ventricle performance in young athletes with bicuspid aortic valve and mild aortic regurgitation. *Eur J Echocardiogr* 2009; 10:527–531
- 249 Nottin S, Doucende G, Schuster I, Tanguy S, Dautat M, Obert P. Alteration in left ventricular strains and torsional mechanics after ultralong duration exercise in athletes. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009; 2:323–330
- 250 Richand V, Lafitte S, Reant P, et al. An ultrasound speckle tracking (twodimensional strain) analysis of myocardial deformation in professional soccer players compared with healthy subjects and hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2007; 100:128–132

-
- 251 Friedberg MK, Slorach C. Relation between left ventricular regional radial function and radial wall motion abnormalities using two-dimensional speckle tracking in children with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2008; 102:335–339
- 252 Cameli M, Lisi M, Palmerini E, et al. Left ventricular torsion dynamics by speckle tracking echocardiography after cardiac surgery or heart transplantation [abstract]. In: *Proceedings of the 2009 EUROECHO Congress*; Madrid, Spain. Sophia Antipolis, France: European Society of Cardiology; 2009:801
- 253 Saraiva RM, Demirkol S, Buakhamsri A, et al. Left atrial strain measured by two-dimensional speckle tracking represents a new tool to evaluate left atrial function. *J Am Soc Echocardiogr* 2010; 23:172–180
- 254 Jurcut R, Wildiers H, Ganame J, D’Hooge J, Paridaens R, Voigt JU. Detection and monitoring of cardiotoxicity: what does modern cardiology offer? *Support Care Cancer* 2008; 16:437–445
- 255 Roul G, Cohen C, Lieber A. Anthracycline-induced cardiomyopathy [in French]. *Presse Med* 2009; 38:987–994
- 256 Hare JL, Brown JK, Leano R, Jenkins C, Woodward N, Marwick TH. Use of myocardial deformation imaging to detect preclinical myocardial dysfunction before conventional measures in patients undergoing breast cancer treatment with trastuzumab. *Am Heart J* 2009; 158:294–301
- 257 Steg PG et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segmentelevation. *Eur Heart J*. 2012 Oct;33(20):2569-619.
- 258 McMurray JJ et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Eur Heart J* 2012;33:1787-847
- ²⁵⁹ Tesi di Specializzazione in Malattie dell’apparato cardiovascolare di Righetti Stefano. “Effetti del trattamento acuto con fattore di crescita su rimodellamento ventricolare sinistro in pazienti con infarto miocardico con st sopralivellato e disfunzione sistolica”. Relatore: Parati G. Correlatore: Achilli F. 2016
- ²⁶⁰ Antoni ML, Mollema SA, Delgado V, Atary JZ, Borleffs CJ, Boersma E, Holman ER, van der Wall EE, Schalij MJ, Bax JJ. Prognostic importance of strain and strain rate after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010;31:1640–1647
- ²⁶¹ Reisner SA, Lysyansky P, Agmon Y, Mutlak D, Lessick J, Friedman Z. Global longitudinal strain: A novel index of left ventricular systolic function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:630–633
- ²⁶² Tadic M, Cuspidi C, Majstorovic A, Pencic B, Backovic S, Ivanovic B, Scepanovic R, Martinov J, Kocijancic V, Celic V. Does the metabolic syndrome impact left-ventricular mechanics? A two-dimensional speckle tracking study. *J Hypertens* 2014;32:1870–1878
- ²⁶³ Van der Ende J, Vazquez Antona CA, Erdmenger Orellana J, Romero Cardenas A, Roldan FJ, Vargas Barron J. Ventricular deformation in children with congenital stenosis of the aorta or coarctation of the aorta. *Ultrasound Med Biol* 2013;39:1207–1214
- ²⁶⁴ Bertini M1, Mollema SA, Delgado V, Antoni ML, Ng AC, Holman ER, Boriani G, Schalij MJ, Bax JJ. Impact of time to reperfusion after acute myocardial infarction on myocardial damage assessed by left ventricular longitudinal strain. *Am J Cardiol*. 2009 Aug 15;104(4):480-5