

# Metode moderne de tratament în cardiopatia ischemică cronică post infarct miocardic. Terapia cu celule stem

Doctorand **Pop Ionel Ciprian**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ion Aurel Mironiuc**

## CUPRINS

### STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Studiul 1 – Inducerea infarctului miocardic cronic la animalul de laborator- model experimental
2. Studiul 2 – Recoltarea și Cultivarea celulelor stem mezenchimale (MSCs) de la iepuri
3. Studiul 3 – Modificări ecografice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale
4. Studiul 4 – Modificări histologice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale
5. Discuții generale
6. Concluzii finale

### Cuvinte Cheie:

infarct miocardic cronic, angiogeneza, celule stem, fracție de scurtare, histologie

### STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Boala cardiacă ischemică rămâne o problemă majoră de sănătate publică, în ciuda unei mai bune înțelegeri a fiziopatologiei acesteia și a unei îmbunătățiri continue a managementului terapeutic. Boala cardiovasculară este principala cauză de deces la nivel mondial.

Dacă, în cazul unui infarct miocardic acut, terapia medicamentoasă și revascularizarea miocardică (intervențională sau chirurgicală) sunt "standardul de aur", odată cu trecerea timpului, cronicizarea infarctului miocardic și, mai ales, odată cu apariția disfuncției ventriculare stângi, rolul terapiei medicamentoase este

limitat, adresându-se în special ameliorării simptomatologiei, progresia spre insuficiență cardiacă rămânând adeseori sigură.

Insuficiența cardiacă congestivă este stadiul terminal al multor patologii cardiace, boala ischemică cronică fiind una dintre cele mai frecvent întâlnite etiologii. Insuficiența cardiacă congestivă este de cinci ori mai frecventă în rândul celor care au suferit un infarct miocardic acut, comparativ cu cei care nu au suferit un infarct miocardic acut. De asemenea, prognosticul celor care au dezvoltat insuficiență cardiacă congestivă este, în general, nefavorabil, chiar mai grav decât în cazul celor care suferă de SIDA sau de cele mai multe afecțiuni neoplazice, cu o rată a mortalității anuale de până la 40 %, și o rată a mortalității la cinci ani cuprinsă între 26 și 75 %.

Revascularizația miocardică pare să aibă un rol în managementul pacientului cu infarct miocardic cronic și disfuncție ventriculară stângă (fracția de ejecție <35 %) doar dacă acesta prezintă angină pectorală instabilă restantă, sau stenoze coronariene semnificative.

Revascularizația miocardică la pacienți care prezintă insuficiență cardiacă congestivă și angină pectorală stabilă nu s-a dovedit să aducă vreun beneficiu în plus față de terapia medicamentoasă. Există totuși studii care ar justifica o revascularizație miocardică la acest grup de pacienți, dacă se poate dovedi existența de miocard viabil în zona de ischemie.

Revascularizația miocardică chirurgicală pare totuși să aducă un beneficiu pacienților cu infarct miocardic cronic, disfuncție ventriculară stângă, angină pectorală stabilă și cu dilatare de ventricul stâng, situație în care revascularizația miocardică chirurgicală este însoțită de o reconstrucție ventriculară și îndepărtarea țesutului cicatricial.

Totuși, marea parte a pacienților cu un infarct miocardic cronic și insuficiență cardiacă congestivă nu prezintă angină pectorală, sau prezintă angină pectorală stabilă și nu s-a putut dovedi existența de miocard viabil în zona de ischemie. Cei care nu prezintă dilatare de ventricul stâng nu sunt eligibili pentru revascularizație miocardică, singura alternativă terapeutică fiind cea medicamentoasă, cu un prognostic sumbru. Terapia celulară – celule stem mezenchimale – poate fi o abordare promițătoare, în special pentru acest grup de pacienți, pentru a îmbunătăți regenerarea miocardică în zona de infarct și revascularizația zonei ischemice prin neoangiogenează.

În literatura internațională de specialitate a fost documentat că transplantul de cardiomiocite fetale sau neonatale la șobolan cu infarct miocardic cronic poate crește grosimea peretelui infarctului și volumul ventriculului stâng, reduce volumul end-sistolic al ventriculului stâng, îmbunătățește fracția de ejecție a ventriculului stâng și induce neoangiogeneza.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În ultimii ani, dogma biologică a inimii ca organ "postmitotic" a fost contestată. În inima umană au fost demonstrate multiplicarea miocitelor și regenerarea miocardică după infarct miocardic și în insuficiența cardiacă cronică ischemică. În plus, studiile pe animale de laborator și studiile clinice sugerează că transferul de celule stem și de celule progenitoare în miocard are un impact favorabil asupra perfuziei țesuturilor și asupra performanței contractile. Au fost, de asemenea, descrise neovascularizație și formarea de noi miocite. Diferențierea celulelor stem administrate intralezional, fuziunea celulară, și eliberarea de semnale paracrine de către celulele stem injectate, sunt discutate în prezent precum și mecanismele care stau la baza lor

**Obiectivul principal** al prezentei teze a constat în stabilirea caracterului cauzal al legăturii dintre injectarea de celule stem intravenos și modificări ecocardiografice și histologice la modelele experimentale care prezintă disfuncție ventriculară ischemică cronică.

**Obiectivele secundare** au fost:

1. Realizarea unui model experimental animal de infarct miocardic cronic,
2. Recoltarea și cultivarea celulelor stem mezenchimale de la iepuri,
3. Evaluarea modificărilor ecocardiografice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale,

#### 4. Evaluarea modificărilor histologice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale.

Lucrarea de față a fost subîmpărțită în patru studii, primul studiu dorind să elaboreze un model experimental viabil care să prezinte un infarct miocardic de dimensiuni suficient de mari încât să determine o disfuncție de ventricul stâng, dar, în același timp, să fie și compatibil cu viața modelului experimental.

Al doilea studiu s-a axat pe recoltarea și creșterea celulelor stem mezenchimale iar studiile trei, respectiv patru au evaluat impactul asupra modelului experimental a administrării acestora pe cale intravenoasă periferică la 30 de zile după inducerea infarctului miocardic acut la modelul experimental.

### **1. Studiul 1 – Inducerea infarctului miocardic cronic la animalul de laborator-model experimental**

Realizarea unui model experimental animal cu infarct miocardic cronic reprezintă o primă etapă esențială în cercetarea cardiopatiei ischemice post infarct miocardic.

Metoda de realizarea a infarctului miocardic acut aleasă a fost ligatura directă a arterei coronare interventriculare anterioare, prin abord chirurgical transtoracic.

Ca metodă de anestezie, am ales să folosim o anestezie disociată, o combinație de Ketamină (15mg/kg) și Xilazină (5mg/kg), cu administrare intramusculară lentă.

După inducerea anesteziei, primul iepurele a fost intubat oro-traheal dar nu a necesitat suport ventilator, (restul iepurilor nu au avut nevoie de intubație oro-traheală), ulterior iepurii au fost poziționați în decubit dorsal, cu membrele anterioare în hiperextensie, a fost îndepărtată blana și tegumentul a fost aseptizat cu soluție de clorhexidină.

Incizia este realizată la nivel presternal, iar abordarea cordului s-a produs prin realizarea unui volet costal drept prin osteotomie la nivelul joncțiunii costo-sternale (coastele III, IV, și V), abordare care a menținut integritatea cutiei toracice, permițându-i să ia parte la mișcările respiratorii; urmat de pericardotomie.

După incizia pericardului, apexul a fost mobilizat anterior, și un tifon steril a fost plasat în spatele inimii pentru a realiza mobilizarea anterioară a acesteia.

În acest moment am realizat ligatura arterei interventriculare anterioare, cu Prolene 4.0, la distanțele diferite: pentru primul grup la 5mm distanță de apex, pentru al doilea grup la 10 mm distanță de apex, și pentru al treilea grup la 15 mm distanță de apex.

După un control rapid al hemostazei, am închis sternul cu fire separate neresorbabile lăsând pericardul deschis, urmat de o sutură cu fir continuu la nivelul țesutului subcutanat și a musculaturii parasternale, și sutură intradermică. Nu am lăsat nici un tub de dren la nici un nivel.

Iepurii supuși intervenției cu ligatura IVA la 15 mm distanță de apex au avut o rată de mortalitate de 100%, toți au dezvoltat un bloc atrioventricular de gradul III și bradicardie severă, cauza probabilă fiind proximitatea ligaturii IVA fiind anterioară emergenței ramurii septale care irigă fascicolul atrioventricular.

Dintre obiectivele studiului :

1. Am reușit să dezvoltăm un nou model experimental de infarct miocardic cronic la iepure, model care nu a necesitat intubare oro-traheală, și care poate fi baza viitoarelor studii clinice.
2. Ligaturarea arterei interventriculare anterioară la 10 mm distanță de apex cauzează infarctul miocardic transmural.

Ligaturarea arterei interventriculare anterioară la 15 mm distanță de apex nu este compatibilă cu viața animalului supus experimentului.

Ca model experimental pentru viitoarele studii, am ales modelul experimental la care ligatura a fost făcută la 10 mm distanță de apex din următoarele motive:

1. rata supraviețuirii imediat după operație, și la 30 de zile după operație este similară cu cea a grupului a cărui ligatura s-a făcut la 5 mm distanță de apex,
2. aria infarctului miocardic cronic este mai mare,
3. infarctul este transmural,
4. cinetica ventriculară stângă mult mai alterată comparativ cu lotul supus ligaturii IVA la 5 mm distanță de apex.

## **2. Studiul 2 – Recoltarea și Cultivarea celulelor stem mezenchimale (MSCs) de la iepuri**

Celulele stem mezenchimale au importante proprietăți de auto-regenerare și de plasticitate, acestea fiind candidatele ideale pentru regenerarea țesutului miocardic. Au fost utilizate cu succes în terapia cardiopatiei ischemice în numeroase studii internaționale. Sursa optimă a celulelor stem încă reprezintă o dezbateră de actualitate în literatura de specialitate.

Obținerea celulelor stem mezenchimale la animalul de laborator printr-o metodă simplă, accesibilă și viabilă este un alt pas esențial în studierea terapiei celulare în patologia cardiacă ischemică.

Cercetările s-au efectuat în perioada martie 2012 - decembrie 2013 în cadrul Biobazei UMF Cluj-Napoca în colaborare cu Facultatea de Medicină Veterinară-Disciplină de Reproducție, Obstetrică și Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

În scopul recoltării celulelor stem mezenchimale s-au utilizat iepuri Neozeelandez Alb (3-3.5 kg) cu vârsta de 1 an. Iepurii au provenit din Biobaza Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca.

Puncțiile medulare au fost realizate după efectuarea anesteziei generale și locale. Neuroleptanalgezia a fost realizată prin utilizarea acepromazinei și a ketaminei, iar anestezia locală s-a efectuat cu alfacaïnă și adrenalină în puncte separate. Anterior efectuării puncțiilor medulare s-a recurs la efectuarea asepsei și antisepsiei locale. Pentru efectuarea puncției osoase s-au utilizat ace de puncție cu stilette interioare necesare penetrării corticalei osoase și evitării obliterării lumenului acului.

Pentru intervenție animalele au fost conționate în decubit lateral, la nivelul paletelor iliace s-a efectuat incizia pielii urmat de pătrunderea acului steril la nivelul canalului medular la aproximativ 1 cm distanță de crestele iliace. Acul a fost direcționat paralel cu axul longitudinal al axului iliac în scopul păstrării traiectului în interiorul canalului medular. Aspiratul medular a fost prelevat în seringă sterilă prevăzută cu mediu de spălare preparată din DMEM-LG, 10%FCS, 1%NEA, penicilin G (Sigma)100 U/mL, streptomycin (Sigma) 100mg, 7.5UI/ml heparină.

După spălarea canalului medular suspensia celulară a fost diluată în proporție de 1:2 cu mediu de cultură nesuplimentat, urmat de centrifugare pe gradient de concentrație Histopaque 1077 (Sigma) 20 minute la 3000 rpm. După recoltarea inelului de celule nucleate resuspendarea celulelor s-a efectuat în mediul de cultură. Suspensia celulară a fost recentrifugată 10 minute la 1500rpm după care depozitul celular a fost resuspendat cu mediul DMEM/F12 (Gibco) suplimentat cu 10% FCS (Hyclone), 1% Antibiotic-Antimicotic (Gibco), 1% glutamine (Sigma), 1% NEA (Sigma), 5% ser de cal (horse serum, Sigma) și 1% MycoZap (Mycoplasma Elimination Reagent, Lonza) și 1 ng/mL factor de creștere fibroblastic (FGF-2) (Sigma).

Celulele au fost cultivate într-un microclimat favorabil dezvoltării și diviziunii celulare (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% umiditate).

Pentru îndepărtarea celulelor neaderente schimbarea mediului s-a efectuat după 72 h după care din 3 în 3 zile. Pentru obținerea subculturilor, celulele au fost tratate enzimatic cu 0.25% tripsin-EDTA, iar după centrifugare la 1200 rpm 5 minute celulele au fost pasate în proporție 1:3. Pasarea celulelor s-a efectuat la o confluență de 70- 80%. În vederea obținerii unei linii celulare stabile, s-au efectuat 4 pasaje successive.

În urma cercetărilor efectuate cu privire la izolarea și caracterizarea celulelor stem mezenchimale izolate prin aspirat de maduva osoasă putem să concluzionăm următoarele:

1. După 12 ore de cultivare doar un procent de celule de aproximativ 10% au fost aderente, forma acestora fiind rotundă;
2. După schimbarea mediului-la 72 de ore post recoltare- procentul de celule aderente a crescut la 50% . Cultura a prezentat o heterogenitate celulară, celulele neaderente au fost de diferite dimensiuni, iar cele aderente au fost cu morfologie rotundă, stelată și fusiformă.
3. În ziua 10 culturile au fost heterogene, conținând celule cu aspect fibroblastic cu bipolaritate accentuată în amestec cu celule stelate și rotunde.
4. La primul pasaj – ziua 12- confluența culturii a fost de 80%.
5. După 24 de ore de la primul pasaj, celulele au prezentat o morfologie fibroblastiformă cu bipolaritate accentuată printre acestea numărându-se și celule cu morfologie poligonală,
6. Culturile obținute după pasajul 3 au prezentat o scădere a numărului de celulele cu aspect poligonal, predominând celulele cu aspect fusiform cu bipolaritate accentuată
7. Procentul de creștere a fost de  $60.33 \pm 1.52$  colonii /100 cm<sup>2</sup>
8. Analiza imunofenotipică a celulelor stem derivate din maduva osoasă de iepure indică pozitivitate pentru markerii mezenchimali negativitate pentru markerii hematopoietici.

### **3. Studiul 3 – Modificări ecografice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale**

Cardiomioplastia celulară poate fi o abordare promițătoare pentru a îmbunătăți regenerarea cardiacă, sau vascularizarea după un infarct miocardic cronic.

În literatura de specialitate sunt citate studii care arată o îmbunătățire a funcției ventriculului stâng – a fracției de ejeție- după administrare intralezionară de celule stem, dar, în practică, administrarea locală de celule stem nu este întotdeauna posibilă, de aceea, studiul de față vrea să evalueze efectele administrării intravenoase de celule stem mezenchimale.

Cercetările s-au efectuat în perioada martie 2012 - decembrie 2013 în cadrul Biobazei UMF Cluj-Napoca în colaborare cu Facultatea de Medicină Veterinară Departamentul 3 paraclinic Disciplina de Anesteziologie și Propedeutică Chirurgicală; și Departamentul 4 clinic, Disciplina de Patologie și Clinică Medicală din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

Ca animale de laborator am folosit 40 de iepuri de rasa Neozelandez Alb (3-3.5 kg) cu vârsta de 1 an, cărora le-am indus un infarct miocardic acut prin ligatură directă a arterei coronare interventriculare anterioare la 10 mm distanță față de apex și am așteptat 30 de zile în condiții standard de temperatură, umiditate și alimentație , ca infarctul miocardic acut să se cronicizeze în conformitate cu protocoalele descrise în studiul 1.

La 30 de zile după inducerea IMA am împărțit lotul de iepuri în două subloturi, astfel :

- un lot de 30 de iepuri la care am injectat  $1 \times 10^6$  celule stem/animal prin vena auriculară sub ușoară sedare cu Ketamină (15mg/kg).

- un lot de 10 iepuri cu infarct miocardic cronic a fost păstrat ca martor.

După 30 de zile de la injectarea celulelor stem am studiat fracțiile de scurtare a ventriculului stâng ecocardiografic.

#### **Evaluarea ecocardiografică**

La 30 de zile după administrarea celulelor stem, ambele grupuri au fost supuse unei evaluări ecocardiografice ale ventriculului stâng, cu un interes special asupra fracțiilor de scurtare.

În literatura de specialitate, fracția de scurtare a ventriculului stâng este considerată: *normală* de la 25-40%; *puțin redusă* între 20-25%; *moderat redusă* între 15-20%; și *sever redusă* dacă valoarea ei este sub 15%.

În studiul nostru anterior- **studiul 1**- când am dezvoltat modelul experimental, valoarea normală a fracțiilor de scurtare a VS la iepure, a fost ușor superioară , respectiv de  $50 \pm 2\%$ , valori pe care le vom considera normale pentru acest studiu .

Ecografia a fost realizată printr-o fereastră subxifoidiană, cu iepurele ras, sedat cu Ketamină (15mg/kg), și în decubit dorsal. Am încercat să ne concentrăm pe ventriculul stâng, și mai ales pe fracțiile de scurtare (diametru diastolic- diametru sistolic/ diametru diastolic X100) în MMode.

La lotul de iepurii martor, ecocardiografia făcută la 60 de zile după inducerea infarctului miocardic acut (respectiv 30 de zile de la injectarea cu celule stem a lotului de studiu comparativ), a evidențiat o alterare marcată a funcției ventriculului stâng, media fracțiilor de scurtare fiind de aproximativ 6%, akinezie de ventricul stâng și akinezie/diminuare a cineticii septului interventricular, fiind, de asemenea, notată.

Doi dintre iepurii injectați au fost excluși din studiu deoarece fracția de scurtare a fost suspect de elevată (35%, respectiv 36%).

La 80% din iepurii injectați cu celule stem (24 de iepuri), fracția de scurtare a ventriculului stâng a fost semnificativ mai mare decât la iepurii-martor, aceasta variind între 24 % și 29 % media fiind de aproximativ 26 %.

#### **4. Studiul 4 – Modificări histologice post administrare intravenoasă de celule stem mezenchimale**

Studiul de față vine în completarea **Studiului 3**, și vrea să evalueze histopatologic efectele administrării intravenoase de celule stem mezenchimale asupra miocardului ischemiat cronic, și să evidențieze existența, sau nu, a unui substrat histologic al îmbunătățirii fracției de scurtare (FS) a ventriculului stâng (VS) la o parte din animalele de experiență la care s-au administrat celule stem.

Ca animale de laborator am folosit lotul de 40 de iepuri din rasa Neozelandez Alb (3-3.5 kg) cu vârsta de 1 an, folosit și în studiul 3, cărora li s-a indus un infarct miocardic acut prin ligatura directă a arterei IVA la 10 mm distanță față de apex și 30 de zile mai târziu, la 30 dintre aceștia, li s-au administrat intravenos celule stem mezenchimale.

După efectuarea studiului ecocardiografic, lotul de iepuri la care s-a injectat iv celule stem, a fost împărțit în 2 subloturi astfel, un lot de 24 de iepuri la care s-a observat o îmbunătățire a fracției de scurtare a ventriculului stâng, pe care îl vom denumi formal "responders", și un lot de 4 iepuri la care nu s-a observat nici o modificare a funcției ventriculului stâng comparativ cu lotul martor, pe care îl vom denumi formal "non-responders".

După efectuarea studiului ecocardiografic, s-a realizat eutanasierea iepurilor prin injectarea de supradoză de anesthetic (Ketamină și Xilazină), s-a recoltat cordul prin sternotomie mediană, s-a formolizat (formaldehidă 38%), și s-au realizat secțiuni longitudinale și transversale.

În urma studierii macroscopice comparative a secțiunilor transversale ale VS nu s-a putut decela o diferență clară, majoră, între grosimea miocardului VS la lotul martor vs lotul de iepurii la care s-au injectat celule stem iv.

De asemenea, macroscopic, nu se poate decela o reducere majoră a suprafeței de țesut cicatricial la lotul de iepuri injectați cu celule stem vs lotul martor.

Examinarea histologică în colorație hematoxilină eozină relevă prezența de benzi de țesut conjunctiv care disecă fibrele miocardice și fibroză subendocardică, atât la lotul martor cât și la lotul de iepuri injectați cu celule stem.

Examinarea histologică în Colorației Tricrom Masson a fost folosită în dorința de a evidenția mai bine caracteristicile fibrelor musculare striate. Aceasta a evidențiat prezența fibrozei epicardice, miocardice și sub endocardice atât la lotul de iepuri martor, cât și la lotul de iepuri injectați cu celule stem ("responders" sau "non-responders").

În scopul de a evita endotelium vascular, și, în consecință, evaluarea histologică a neoangiogenezei, probele aparținând loturilor studiate au fost supuse unui studiu imunohistochimic cu anticorpi CD31. Acesta a decelat prezența celulelor endoteliale (posibilă neoangiogeneză) atât la lotul martor cât și la lotul de iepuri injectați cu celule stem. Strict subiectiv, putem afirma că densitatea celulelor endoteliale a fost mai mare la lotul de iepuri injectați cu celule stem. Surprinzător, nu există o diferență evidentă între lotul de iepuri injectați "responders" vs "non-responders".

## 5. Discuții generale

Realizarea unui model experimental viabil este un prim pas esențial în cercetarea medicală. Prin abordul direct transtoracic, folosind o anestezie disociată, și ligatura arterei IVA la 10 mm distanță de apex, la iepurele de laborator, se poate obține un model experimental de infarct miocardic acut sau cronic viabil, simplu, fără a necesita aparatură sofisticată sau suport ventilator, cu o rată mică a mortalității și a complicațiilor perioperatorii. Merită de menționat faptul că ligatura IVA la 15 mm distanță de apex este incompatibilă cu viața animalului de laborator, iar principala cauză de mortalitate postoperatorie a fost expunerea repetată la anestezie a cordului ischemiat cronic.

Sursa celulelor stem a fost o altă temă abordată de cercetarea medicală contemporană, aspiratul de maduvă osoasă dovedindu-se a fi o sursă simplă și viabilă de celule stem.

Dacă administrarea directă, în zona de infarct miocardic, de celule stem îmbunătățește performanțele VS, injectarea de celule stem intravenos în același scop este o metodă terapeutică foarte tentantă tocmai prin simplitatea ei.

Studiul nostru a reușit să demonstreze o îmbunătățire a FS a VS la 30 de zile post administrarea iv de celule stem mezenchimale la 80 % dintre iepurii injectați, dar nu a reușit să demonstreze un substrat histologic al acestei îmbunătățiri. Examinarea histologică a miocardului VS la acești iepuri a decelat prezența infarctului miocardic transmural, și nu a reușit să evidențieze o creștere a masei contractile a VS.

Studiul imunohistochimic cu anticorpi CD 31 cu afinitate față de celulele endoteliale a demonstrat o densitate mai mare de celule endoteliale în zona cicatriceală a VS la lotul de iepuri la care s-a administrat iv celule stem – ceea ce ar putea reprezenta un proces de neoangiogeneză mai accentuat la acest lot comparativ cu lotul martor.

Ne atrage atenția faptul că această neoangiogeneză accentuată a fost evidențiată și la lotul de iepuri la care, deși li s-au administrat celule stem iv, nu au prezentat o îmbunătățire a fracției de scurtare a VS, ceea ce ne face să credem că neoangiogeneza nu este substratul îmbunătățirii performanțelor VS, cât, mai degrabă, o dovadă a efectului paracrin al celulelor stem injectate iv.

Wangde și colaboratorii, într-un experiment în care a injectat celule stem mezenchimale în cicatricea veche de o săptămână a unui infarct miocardic la șobolani Fischer, a obținut o îmbunătățire generală a funcțiilor ventriculului stâng 4 săptămâni mai târziu, îmbunătățire care s-a pierdut după 6 luni. Mai mult de atât, el de asemenea a notat că, din punct de vedere histopatologic, aceasta îmbunătățire a funcției ventriculului stâng a fost obținută fără o creștere a grosimii peretelui ventricular infarctat. Concluzia studiului a fost că îmbunătățirea performanțelor VS s-a datorat tocmai efectului paracrin al celulelor stem mezenchimale asupra celulelor musculare viabile restante.

Din motive obiective, studiul nu a urmărit evoluția FS a VS la 6 luni, dacă îmbunătățirile demonstrate ecografic la 30 de zile după injectarea celulelor stem se mențin și după 6 luni, dar, în lumina studiilor expuse anterior, este foarte probabil ca această îmbunătățire a cineticii VS să se piardă.

Nu am reușit să găsim o explicație pentru faptul că lotul de iepuri "non-responder" nu a prezentat o îmbunătățire a FS a VS, dar totuși a prezentat o activitate neoangiogenetică similară lotului "responder", putem doar să incriminăm factorii genetici și răspunsul individual specific la o terapie. Credem că administrarea intravenoasă de celule stem poate reprezenta doar o eventuală viitoare alternativă terapeutică temporară în cardiopatia ischemică cronică, asociată cu insuficiența ventriculară stângă, și toate eforturile trebuie depuse în vederea administrării locale, intralezionale, de celule stem dar, elaborarea unui

protocol terapeutic va necesita numeroase studii clinice pentru evaluarea și înțelegerea tuturor mecanismele implicate în modul de acțiune a acestor celule.

## 6. Concluzii finale

În baza rezultatelor obținute în cadrul acestor studii am putem să formulăm următoarele concluzii generale:

1. Prin abordul transtoracic descris în studiul 1, asociat cu anestezie disociată xilazină/ketamină se poate obține un model experimental de IMA în condiții minime de ambulator fără a necesita suport ventilator sau monitorizare avansată.
2. Prin ligatura directă a arterei interventriculare anterioare la 10 mm distanță de apex se obține un infarct miocardic acut transmural care interesează fața anterioară a ventriculului stang și septul interventricular, compatibil cu viața animalului experimental, cu rată de mortalitate perioperatorie mică.
3. Aspiratul de maduvă osoasă reprezintă o sursă viabilă și simplă de celule stem mezenchimale.
4. Administrarea de celule stem intravenos la 30 de zile după inducerea infarctului miocardic acut, determină o îmbunătățire moderată a fracției de scurtare a ventriculului stâng la 80 % dintre iepurii studiați și determină o neoangiogenază mai accentuată la 100 % din iepurii studiați comparativ cu lotul martor.
5. Examinarea macroscopică a secțiunilor de cord la 60 de zile după inducerea infarctului miocardic acut – respectiv la 30 de zile după administrarea de celule stem intravenos la lotul studiat- nu a determinat o diferență semnificativă între aria zonei de infarct și grosimea/aria miocardului VS între cele 2 loturi studiate.
6. Examinarea microscopică a secțiunilor de VS la 30 de zile după administrarea iv de celule stem a evidențiat prezența fibrozei epicardice, miocardice și sub endocardice atât la lotul de iepuri martor, cât și la lotul de iepuri injectati cu celule stem.
7. Nu s-au evidențiat zone de regenerare miocardică la lotul de iepurii la care s-au administrat celule stem.
8. Credem că îmbunătățirea FS a VS și neoangiogeneza mai accentuată la lotul de iepuri la care s-a administrat celule stem iv sunt rezultatul unui efect paracrin al celulelor stem injectate
9. Nu s-a evidențiat, micro sau macroscopic, prezența de formațiuni tumorale cardiace sau extracardiace.
10. Administrarea intravenoasă de celule stem poate reprezenta doar o eventuală viitoare alternativă terapeutică temporară în cardiopatia ischemica cronică asociată cu insuficiență ventriculară stângă.
11. Sunt necesare viitoare studii clinice atât în vederea elaborarii unui protocol terapeutic elocvent, cât și pentru evaluarea și înțelegerea tuturor mecanismele implicate în modul de acțiune al acestor celule în patologia cardiacă ischemică.



# Modern methods of treatment in chronic ischemic myocardial infarction. Stem cell therapy

## CONTENTS

### CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

### PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. Study 1 - Induction of chronic myocardial infarction in experimental animal model
2. Study 2 - Harvesting and cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs) from rabbits
3. Study 3 - Ultrasound changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells
4. Study 4 - Histological changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells
5. General Discussions
6. Conclusions

### Keywords:

Chronic myocardial infarction, angiogenesis, stem cells, shortening fraction, histology

### CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Ischemic heart disease remains a major public health problem, despite a better understanding of its pathophysiology and continuous improvement of its therapeutic management. Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide.

If, in the case of acute myocardial infarction, drug therapy and myocardial revascularization (interventional or surgical) are the "gold standard", but, if a chronic myocardial infarction develops and especially with left ventricular dysfunction, the role of drug therapy is limited, addressing in particular the improvement of symptoms, and the patient often progress to symptomatic congestive heart failure.

Congestive heart failure is the end stage of many cardiac pathologies, chronic ischemic disease is one of the most common etiologies. Congestive heart failure is five times more common among those who have suffered an acute myocardial infarction compared to those who haven't suffered one. In addition, the prognosis for those who have developed congestive heart failure is generally unfavorable even worse than those suffering from AIDS or most of the neoplastic disease, at a rate of annual mortality reaching up to 40%, and a five years mortality rate ranging from 26 to 75%.

Myocardial revascularization appears to have a role in the management of patients with chronic myocardial infarction and left ventricular dysfunction (ejection fraction <35%) only if unstable angina or significant coronary stenosis are presents.

Myocardial revascularization in patients who have congestive heart failure and stable angina has not

been proven to be of benefit in addition to drug therapy. There are still studies that would justify a myocardial revascularization in this group of patients, if they can prove the existence of viable myocardium in the ischemic area.

Surgical myocardial revascularization seems still be of benefit to patients with chronic myocardial infarction, left ventricular dysfunction, stable angina and left ventricular dilatation, situation in which the surgical myocardial revascularization is accompanied by a ventricular reconstruction and removal of scar tissue.

However, the majority of patients with chronic myocardial infarction and congestive heart failure, do not have an unstable angina pectoris, and have not been able to prove the presence of viable myocardium in the ischemic area. Those who do not show left ventricular dilatation are not eligible for myocardial revascularization, the only therapeutic alternative being drugs, with a dismal prognosis.

Cell therapy - mesenchimale- stem cells may be a promising approach, in particular for this group of patients, in order to improve the regeneration of myocardium in the scar area and revascularization of the ischemic area by neovascularization.

The international literature has documented that transplanting fetal cardiomyocytes to rats presenting chronic myocardial infarction can increase wall thickness of the left ventricle, reducing the left ventricular end-systolic volume, all this improves the left ventricle ejection fraction.

## **PERSONAL CONTRIBUTIONS**

In recent years, the biological dogma that the heart is a "postmitotic" organ was challenged. In the human heart it has been demonstrated muscle cells proliferation and myocardial regeneration after myocardial infarction. In addition, experimental animals studies and clinical trials suggest that the transfer of stem cells and progenitor cells in ischemic myocardium has a favorable impact on perfusion, and improves its performance and contractility. There have been also described neovascularization and formation of new myocytes.

Proliferation, intralesional cell fusion, and release of paracrine signals by injected stem cells are currently being discussed the mechanisms underlying this improvements.

The main objective of this thesis was to establish the causal nature of the link between injecting stem cells intravenously and echocardiographic and histological changes in experimental models showing chronic ischemic ventricular dysfunction.

Secondary objective were:

1. Conducting an animal model of chronic myocardial infarction,
2. The harvesting and cultivation of mesenchymal stem cells from rabbits,
3. Assessment of echocardiographic changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells
4. Evaluation of histological changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells.

This work was subdivided in four studies. The first study is aiming to develop an experimental viable model to present a myocardial infarction large enough to cause an impaired left ventricular function, but at the same time, also to be compatible with the life of the experimental model.

The second study focused on harvesting and growth of mesenchymal stem cells, and, studies three and four want to evaluate the impact on the experimental model of peripheral intravenous administration of MSCs 30 days after the induction of acute myocardial infarction.

## **1. Study 1 - Induction of chronic myocardial infarction in experimental animal model**

Developing a chronic myocardial infarction on animal model is an essential first step in researching heart disease after myocardial infarction.

The method chosen of achieving acute myocardial infarction was direct interventricular artery ligation by transthoracic surgical approach.

As anesthesia, we chose to use a dissociated anesthesia, a combination of Ketamine (15mg / kg) and Xylazine (5mg / kg), intramuscular slow.

After induction of anesthesia, the first rabbit was oro-tracheal intubated but did not require ventilatory support, (remaining rabbits did not require oro-tracheal intubation), then the rabbits were positioned supine with forelegs in hyperextension, the fur was removed and skin was sanitized with chlorhexidine solution.

The incision is carried at presternal are and the heart was exposed by osteotomy at the costo-sternal junction (ribs III, IV, and V), approach that maintained the chest wall integrity, allowing the chest to take part at respiratory movements; followed by pericardotomy.

After the incision of the pericardium was made, the apex was mobilized, and a sterile gauze was placed behind the heart to achieve its maximum anterior mobilization.

At this moment the interventricular artery (IVA) ligation was made with 4.0 Prolene at different distances: for the first group at 5mm away from the apex, to the second group at 10 mm away from the apex, and the third group 15 mm away from the apex.

After a rapid hemostasis control, chest was closed with separate absorbable suture, leaving open the pericardium, followed by a continuous subcutaneous suture and intradermal suturing. I have left no drainage tube at any level.

Rabbits undergoing surgery with IVA ligation 15 mm away from the apex had a mortality rate of 100%, all have developed a degree III atrioventricular block and severe bradycardia, likely caused beeing the proximity of IVA ligation as the septal branch that supply atrioventricular beam emergence distal to ligation point.

Among the objectives of the study:

1. We managed to develop a new experimental model of chronic myocardial infarction in the rabbit model without endotracheal intubation, and that can be the basis for future clinical trials.

2. interventricular artery ligation prior to 10 mm away from the apex causes transmural myocardial infarction.

Anterior interventricular artery ligation at 15 mm from the apex is not compatible with animal life in your experiment.

As a model for future experimental studies, we chose the experimental model that ligation was performed at 10 mm away from the apex of the following reasons:

1. The survival rate immediately and 30 days after the operation is similar to that of the group to which ligation was done at 5 mm from the apex,

2. Chronic myocardial infarction area is larger,

3. the infarction is transmural,

4. left ventricular kinetics is much altered compared to the group with IVA ligation at 5 mm away from the apex.

## **2. Study 2 - harvesting and cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs) from rabbits**

Mesenchymal stem cells have the important properties of self-regeneration and plasticity, they are ideal candidates for the regeneration of myocardial tissue. They have been used successfully in the treatment of ischemic heart disease in numerous international studies. Best source of stem cells is still a topical debate in the literature.

Obtaining mesenchymal stem cells in the laboratory animal through a simple, affordable and sustainable method is another important step in studying cell therapy in ischemic cardiac pathology.

The research was conducted during the period March 2012 - December 2013 Biobase the UMF Cluj-Napoca in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction, Obstetrics and Veterinary Medicine from the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.

For the purpose of harvesting mesenchymal stem cells we used New Zealand White rabbits (3-3.5 kg) the age of one year. Rabbits were from Biobase of University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca.

Medullary punctures were made after general anesthesia and local neuroleptanalgesia was carried out by use of acepromazine and ketamine, and local anesthesia was performed with separate points alfacaïnă and adrenaline. To perform the bone puncture needle was used to puncture had inner knives necessary to avoid penetration of cortical bone and obliteration of the lumen of the needle.

The experimental model was placed in a lateral decubitus position, the iliac blade skin incision was performed followed by the penetration of sterile needle in the medullary canal, about 1 cm from the iliac crests. The needle was directed parallel to the longitudinal axis of the iliac shaft in the purpose of keeping track inside the spinal canal. Bone marrow aspirate was collected into a sterile syringe provided with flushing medium prepared in DMEM-LG, 10% FCS, 1% NEA, penicillin G (Sigma), 100 U / mL, streptomycin (Sigma) 100 mg, 7.5UI / ml heparin.

After washing the medullary canal cell suspension was diluted in a ratio of 1: 2 with non-supplemented culture medium, followed by centrifugation on Histopaque 1077 gradient concentration (Sigma) for 20 minutes at 3000 rpm. After harvesting, the nucleated cells ring was resuspended in the culture medium. The cell suspension was recentrifuged for 10 minutes at 1500rpm and then the cell pellet was resuspended in DMEM / F12 (Gibco) supplemented with 10% FCS (Hyclone), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco), 1% glutamine (Sigma), 1 % NEA (Sigma), 5% horse serum (horse serum, Sigma) and 1% MycoZap (Mycoplasma Elimination Reagent, Lonza) and 1 ng / ml fibroblast growth factor (FGF-2) (Sigma).

The cells were cultured in a favorable microclimate for development and cell division (37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% humidity).

To remove non-adherent cells, changing the medium after 72 hours after from three to 3 days was performed. To obtain subcultures, the cells were enzymatically treated with 0.25% trypsin-EDTA and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes the cells were passed in ratio 1: 3. Bird cells was carried out at 70-80% confluency. In order to obtain a stable cell line, were carried out 4 successive passages.

Following the research on the mesenchymal stem cells isolated by bone marrow aspirates we can conclude the following:

1. After 12 hours of cultivation only a percentage of about 10% cells were adhered, their shape is round;
2. After the medium change at 72 hours after harvesting, percentage of adherent cells increased to 50%. Culture presented a cellular heterogeneity, non-adherent cells were of different sizes, while adhering were morphologically round, stellate and fusiform,
3. On day 10, heterogeneous cultures were containing fibroblast cells with bipolar mixed with stellate and round cells.
4. After the first passage - 12 day culture - confluence was 80%.
5. 24 hours after the first passage, cells exhibited a bipolar morphology with fibroblast sharp
6. cultures obtained after passage 3 showed, predominantly, fusiform cells with bipolar looking sharp and a decrease of polygonal cells
7. Aproximate growth was  $60.33 \pm 1.52$  of colonies / 100 cm<sup>2</sup>
8. Immunophenotyping analysis of stem cells derived from rabbit bone indicate positivity to mesenchymal markers and negativity for hematopoietic markers.

### **3. Study 3 - Ultrasound changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells**

Celular cardiomyoplasty pathways may be a promising approach to improve cardiac regeneration, vascularization after a chronic heart attack.

In the literature are cited studies showing an improvement in left ventricular after stem cells administration, but in practice, the local administration of stem cells is not always possible, therefore, the present study wants to evaluate the effects of intravenous administration of mesenchymal stem cells.

The research was conducted during March 2012 - December 2013 UMF Cluj-Napoca Biobase in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anesthesiology and Three Paraclinically Propedeutic Surgical Discipline; and Four Clinical Department, Department of Pathology and Internal Medicine at the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.

As animals we used 40 New Zealand White rabbits breed (3-3.5 kg) with 1 year of age, whom we induced myocardial infarction by direct IVA ligation 10 mm away from the apex and we waited 30 days under standard conditions of temperature, humidity and food as acute myocardial infarction to become chronic in accordance with the protocols described in study 1.

At 30 days after induction of AMI we have divided the batch of rabbits in two subgroups, as follows:

- A group of 30 rabbits we injected stem cells  $1 \times 10^6$  / animal in a ear vein under light sedation with ketamine (15mg / kg).

- A group of 10 rabbits with chronic myocardial infarction has been preserved as a witness.

30 days after, we studied of left ventricular shortening fractions, echocardiographically.

In literature, left ventricular shortening fraction is considered: normal 25-40%; slightly reduced between 20-25%; moderately reduced between 15-20%; and severely reduced if its value is less than 15%.

In our first study, when we developed the experimental model, normal value LV shortening fractions in rabbits it was slightly higher, 50 +/- 2% respectively, values which we consider normal for this study.

Echocardiography was performed through a subxiphoid window, with the rabbit shaved, sedated with ketamine (15mg / kg), and lying down. We tried to focus on the left ventricle, and especially on shortening fraction (systolic diameter - diastolic diameter / X100 diastolic diameter).

At the control rabbits, the echocardiogram performed 60 days after induction of acute myocardial infarction, revealed a marked deterioration of left ventricular function, media of fractions shortening being 6%, left ventricular akinesia and reduction of interventricular septum kinetics, was also noted.

Two of injected rabbits were excluded from the study because shortening fraction was suspiciously elevated (35% and 36% respectively).

At 80% of injected rabbits (24 rabbits), the left ventricular shortening fraction was significantly higher than control rabbits, varying between 24% and 29%, average being about 26%.

#### **4. Study 4 - histological changes after intravenous administration of mesenchymal stem cells**

This study wants to assess histopathological effects of intravenous administration of mesenchymal stem cells on chronic myocardial ischemia and studies the existence or not of a histological substrate of the improvement of left ventricular (LV) fraction shortening (FS).

As models we used a group of 40 New Zealand White rabbits (3-3.5 kg) age 1 year, also used in study 3, which had a myocardial infarction by direct IVA ligation at 10mm distance from the apex, followed by intravenously administration of mesenchymal stem cells 30 days later.

After the echocardiographical study, the injected group was divided into 2 subgroups: 24 rabbits which presented a significant improvement of LV FS, which we will formally call "Responders" and a group of 4 rabbits who have not developed any change in LV function compared with controls, which we will formally call "non-responders".

After the echocardiographical study was performed, the rabbits were euthanased by injection of an overdose of anesthetic (Ketamine and Xylazine), heart was harvested by median sternotomy and was formalinized (formaldehyde 38%) and longitudinal sections and cross sections were carried.

After a comparative study of LV macroscopic cross sections was performed, we could not detect a clear major difference between LV myocardium thickness of the control group vs the group of rabbits who received MSCs iv.

Also, macroscopic, we could not detect a major reduction of scar tissue surface at rabbits injected with stem cells vs the control group.

Hematoxylin eosin staining histological examination revealed the presence of connective tissue bands that dissect myocardial fibers and subendocardial fibrosis, at both control groups.

Histological examination in Masson Trichrome stains were used in a bid to highlight the features of striated muscle fibers. This showed the presence of epicardial, myocardial and endocardial fibrosis to both groups.

In order to show vascular endothelium, and consequently, the histological evaluation of neoangiogenesis, the samples belonging to the studied groups were subjected to an immunohistochemical study with CD31 antibodies. It detected the presence of endothelial cells (possible neovascularization) to

both the control group and the group of rabbits injected with stem cells. Strictly subjective, we can say that the endothelial cell density was higher in the group of rabbits injected with stem cells. Surprisingly, there is not an obvious difference between the group of rabbits injected "Responders" vs "non-responders".

## 5. General Discussions

Making a viable experimental model is an essential first step in medical research.

By directly, transthoracic, using a dissociated anesthesia, ligation of IVA 10 mm away from the apex, at laboratory rabbit we can obtain an viable experimental model of acute myocardial infarction, simple, without requiring sophisticated equipments or ventilatory support with a low rate of mortality and postoperative complications. It is worth mentioning that IVA ligation 15 mm away from the apex is incompatible with laboratory animal life, and the main cause of postoperative mortality was repeated exposure to anesthesia of the chronic ischemia heart.

Source of the stem cells was another topic of contemporary medical research, bone marrow aspirate proved to be a simple and viable source of stem cells.

If stem cells are administrated direct in the area of the scar, an improvement of the LV performance is noted but not always possible, and, intravenous injection of stem cells for the same purpose is a tempting therapeutic method by its simplicity.

Our study demonstrate an improvement in LV FS 30 days post IV administration of mesenchymal stem cells to 80% of the injected rabbits, but failed to demonstrate a histologic substrate of this improvement. Histological examination of LV myocardium to this rabbits detected the presence of transmural myocardial infarction, and failed to show a increase LV contractile mass.

CD 31 immunohistochemical antibody study with affinity for endothelial cells showed a higher density of endothelial cells in the LV scars at the rabbits who received iv MSCs what could mean a stronger process of neovascularization at this group compared with control group.

Draws our attention that this accentuated neovascularization was underlined in the group of rabbits that, although they were given iv MSCs did not show an improvement of LV SF, which makes us believe that neovascularization is not the substrate of LV improving performance as rather a evidence of paracrine effect of MSCs injected iv.

Wangde and collaborators in an experiment in which they injected MSCs into an one week old scar of a heart attack in Fischer rats, demonstrated a general improvement in left ventricular function four weeks later, improvement that was lost after 6 months . Moreover, he also noted that, in terms of histopathology, this improvement in LV function was achieved without an increase in ventricular myocardial wall thickness. The study concluded that LV improving performances was due to the paracrine effect of MSCs on restant viable muscle cells.

For objective reasons, this study did not follow the evolution LV FS 6 months later, so, question remains if the improvements demonstrated by ultrasound 30 days after the injection of MSCs persist after six months, but in the light of the studies above, it is likely that this improvement to be lost.

We failed to find an explanation for that "non-responder" group of rabbits who did not showed an improvement in the LV SF, but still showed similar angiogenesys activity "responder" group, we can only criminalize genetic factors and individual response specific to a therapy.

We believe that intravenous administration of stem cells can only represent a possible future temporary therapeutic alternative on chronic ischemic heart disease associated with left ventricular failure, and every effort should be made to local ,intralesional, administration of MSCs, but, developing a treatment protocol will require numerous clinical trials to understand all the mechanisms involved in the mechanism of action of these cells.

## 6. Final conclusions

Based on the results obtained in these studies we can make the following conclusions:

1. transthoracic approach described in study 1, associated with dissociated anesthesia Xylazine / ketamine can get an experimental model of AMI in ambulatory with standard conditions without requiring ventilator support and advanced monitoring.

2. The interventricular artery ligation 10 mm away from apex causes an acute transmural myocardial infarction who is affecting the LV anterior wall and interventricular septum, consistent with experimental animal life, with low perioperative mortality rate.

3. Bone marrow aspiration is a simple and viable source of mesenchymal stem cells.

4. intravenous administration of stem cells 30 days after induction of acute myocardial infarction causes a moderate improvement in left ventricular shortening fraction to 80% of studied rabbits and lead to a more pronounced neovascularization to 100% of rabbits studied compared with controls .

5. Macroscopic examination of heart sections at 60 days after the induction of acute myocardial infarction did not show a significant difference in infarct area and thickness / area of LV myocardium between the two studied groups

6. Microscopic examination of sections of LV 30 days after iv injection of MSCs revealed the presence of epicardial, myocardial and endocardial fibrosis both groups.

7. There was no evidence of myocardial regeneration zone at the group of rabbits that were administered iv MSCs.

8. We believe the improvement of LV SF and the accentuated neoangiogenesys at the group of rabbits that were administered iv MSCs are the result of a paracrine effect of this injected cells.

9. There are no micro and macroscopic evidence of any tumor formations.

10. Intravenous MSCs may represent only a possible temporary future therapeutic alternative on ischemic cardiomyopathy associated with chronic left ventricular failure.

11. Future clinical trials are needed in order to develop a treatment protocol, and assessing and understanding all the mechanisms involved in the mode of action of these cells in ischemic cardiac pathology.