

La terapia cellulare transcaterere dell'insufficienza cardiaca: stato dell'arte

Andrea D'Ambrosio, Germano Di Sciascio

Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Università Campus Bio-Medico, Roma

Key words:

Cell therapy;
Heart failure;
Interventional
procedures; Stem cells.

The progressive loss of cardiomyocytes by different injuries (first of all by ischemia), associated with an insufficient endogenous repair process, is one of the main factors of heart failure development, a real health problem in western countries.

In the last decade, cell transplantation in the heart of stem cells with myogenic and angiogenic potential, by intrinsic capability of cellular differentiation and paracrine favorable effects, represents a promising therapy for heart failure, producing a real myocardial regeneration. Early clinical results have been obtained from phase I studies with autologous adult stem cells such as skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells. The easy cellular availability, the lack of need for immunosuppression and the absent likelihood of tumor formation after cell transplantation are important advantages of these cells, which allow to overcome the apparent ethical dilemma associated with the use of fetal/embryonic cells.

Three percutaneous cell delivery methods have been added to the initial surgical transepical approach: transendocardial, intracoronary and coronary transvenous injection. The aim of this review was to describe advantages, limitations and techniques about each transcatheter delivery approach to cardiac tissue repair, in the light of current knowledge, investigating possible application fields in different left ventricular dysfunction settings.

(GIC - G Ital Cardiol 2006; 7 (1): 23-39)

© 2006 CEPI Srl

Ricevuto il 19 maggio 2005; nuova stesura il 2 novembre 2005; accettato il 3 novembre 2005.

Per la corrispondenza:

Prof. Germano Di Sciascio

Dipartimento di Scienze
Cardiovascolari
Università Campus
Bio-Medico
Via Emilio Longoni, 83
00155 Roma
E-mail: g.disciascio@
unicampus.it

Introduzione

Lo scompenso cardiaco congestizio da disfunzione ventricolare sinistra, prevalentemente ma non esclusivamente postischemica, è attualmente il principale problema di salute nel mondo occidentale: la sua incidenza è di circa 500 000 nuovi casi ogni anno, rappresenta la causa più frequente di morte in Europa ed è la singola causa più frequente di ricovero ospedaliero fra i pazienti di età > 65 anni negli Stati Uniti¹. Nonostante i sostanziali progressi raggiunti nella gestione clinica di questa sindrome, la sua prognosi rimane severa, con una mortalità che si aggira attorno al 50% a 5 anni dalla diagnosi.

La progressiva perdita di cardiomiociti, associata alla mancanza di un adeguato processo di riparazione endogeno, rappresenta uno dei principali fattori nell'evoluzione dell'insufficienza ventricolare sinistra verso gli stadi avanzati della malattia. Allo stesso tempo, il limite principale delle diverse strategie terapeutiche dello scompenso cardiaco attualmente disponibili – farmacoterapia, resincronizzazione elettrica, assistenza meccanica biventricolare,

cardiomioplastica dinamica, interventi cardiocirurgici di plastica ventricolare sinistra – è rappresentato proprio dalla loro incapacità di riparare o sostituire il miocardio danneggiato con tessuto vitale, normocontrattile. Si spiega in tal modo l'impatto a lungo termine non significativo di questi trattamenti sulla storia naturale della malattia. D'altro canto, la sostituzione dell'organo *in toto* (trapianto cardiaco ortotopico), nei quadri di scompenso cardiaco avanzato, è ostacolata dalla scarsa disponibilità di donatori e dalle problematiche connesse con l'immunosoppressione e la sopravvivenza a lungo termine del cuore trapiantato.

Le cellule staminali sono cellule non differenziate e pluripotenti in grado di moltiplicarsi, automantenersi e differenziarsi in linee cellulari diverse a seconda del microambiente biologico in cui vengono a trovarsi (secondo i principi della "topobiologia", descritta dal Premio Nobel Edelman)².

L'osservazione sperimentale che cellule staminali trapiantate nel cuore possono differenziarsi in tessuto miocardico funzionale ed in tessuto vascolare, ha provocato un grande interesse nella comunità scientifica e potrebbe rivoluzionare il trattamento del-

l'insufficienza cardiaca, se traducibile in realtà clinicamente applicabile³. Non si tratterebbe più di sostituire l'organo malato o di sostenerlo in modo meccanico/farmacologico, bensì di riparare/rigenerare il tessuto miocardico, con un autentico "ringiovanimento" del cuore. Parallelamente, sempre maggiori evidenze scientifiche supportano il rivoluzionario concetto che il cuore non è un organo postmitotico, bensì è di per sé capace di un tentativo di autorigenerazione dopo un danno, attraverso il reclutamento di cellule staminali presenti nel miocardio stesso, oppure provenienti dal midollo osseo o circolanti⁴.

Il termine "cardiomioplastica cellulare" (o ultimamente "cardiomiogenesi cellulare") è stato introdotto per la prima volta da Chiu et al.⁵ nel 1995 per descrivere il trapianto di cellule staminali in ambito cardiologico, riflettendo allo stesso tempo il fatto storico che l'idea originava dall'osservazione della riparazione ad opera dei mioblasti scheletrici dei lembi di muscolo scheletrico utilizzati per la cardiomioplastica dinamica, danneggiati nel tempo dall'eccessiva stimolazione sincronizzata.

Negli animali da esperimento – in fase preclinica – diversi tipi di cellule staminali, di origine embrionale, fetale oppure adulte, sono stati finora trapiantati in modelli di danno miocardico acuto o cronico (Tabella 1)⁶⁻¹⁶, con risultati talora contrastanti, mentre le iniziali esperienze nell'uomo si sono concentrate sull'utilizzo dei mioblasti scheletrici autologhi (ASM) e delle cellule staminali autologhe mononucleate di derivazione midollare (BMMC). Ampio rimane il dibattito sul tipo di cellula staminale da impiegare, essendo numerosi i fattori da considerare, di ordine etico, biologico e medico.

Per quanto attiene al razionale biologico nella scelta della cellula staminale da trapiantare, secondo un modello proposto da Taylor¹⁷, bisognerebbe innanzitutto considerare il tipo di danno miocardico da trattare: ibernazione miocardica da ischemia cronica vs disfunzione contrattile postinfartuale persistente dopo rivascolarizzazione di successo. Nel primo caso, infatti,

l'obiettivo sarà promuovere l'angiogenesi e pertanto dovrebbero essere utilizzate le cellule che sembrano possedere maggiori potenzialità in questa direzione: BMMC, cellule progenitrici endoteliali midollari o del sangue periferico, angioblasti, ecc. Nel secondo caso, in cui si cerca di ottenere un recupero cardiaco di tipo funzionale, contrattile, dovrebbero essere trapiantate cellule staminali con potenziale miogenico: ASM soprattutto, ma anche cellule staminali cardiache o altri progenitori mesenchimali. Lavori recenti, ad ogni modo, sottolineano che la formazione di nuovo tessuto muscolare e la neoangiogenesi per differenziazione delle cellule staminali trapiantate non sarebbero in grado di giustificare da sole gli effetti benefici osservati dopo terapia cellulare cardiaca^{18,19}, poiché sarebbero piuttosto prevalenti effetti di tipo paracrino da parte delle cellule staminali stesse, con rilascio nel miocardio ischemico di citochine (ad esempio interleuchina-1 e fattori di necrosi tumorale- α e β) e fattori di crescita angiogenici ed antiapoptotici (ad esempio fattore di crescita dei fibroblasti basico, fattore di crescita dell'endotelio vascolare, angiopoietina 1) in grado di promuovere fenomeni angiogenici locali²⁰⁻²².

Prerequisiti essenziali al fine del successo della procedura di cardiomioplastica cellulare sembrano essere non solo la scelta del tipo più appropriato di cellula staminale, ma anche l'utilizzo della modalità più efficace di trapianto cellulare. Obiettivi principali del trapianto cellulare sono, infatti, il raggiungimento di un'elevata concentrazione cellulare nella zona di tessuto di interesse e la prevenzione dell'impianto ("homing") delle cellule staminali in organi/tessuti diversi da quelli bersaglio. I primi studi nell'animale da esperimento e l'esperienza "first in man" di Menasche et al.²³ hanno utilizzato la modalità chirurgica di trapianto cellulare, con iniezione intramiocardica transepica in corso di toracotomia. Tale modalità affianca al vantaggio dell'iniezione guidata dalla visualizzazione diretta dell'area bersaglio di miocardio, i rischi propri di un intervento di cardiocirurgia (anestesia generale, toracotomia, circolazione extracorporea, ecc.) e limita l'applicazione del trapianto cellulare ai pazienti comunque candidati a rivascolarizzazione coronarica o impianto di sistemi di assistenza ventricolare meccanica²⁴.

In cardiologia, le tecniche diagnostiche e terapeutiche basate sull'uso di cateteri introdotti per via percutanea si sono notevolmente sviluppate negli ultimi decenni: basti considerare la rivascolarizzazione coronarica percutanea con catetere a palloncino, divenuta trattamento di scelta della malattia coronarica nella stragrande maggioranza dei casi²⁵. La contenuta invasività, l'elevato profilo di sicurezza anche in pazienti "complessi", la possibilità di ripetere la procedura nello stesso paziente in tempi diversi (e ravvicinati, se necessario) ed i costi contenuti per la spesa sanitaria (ad esempio ridotti tempi di ospedalizzazione e di convalescenza), sono i principali ed indubbi vantaggi delle tecniche percutanee.

Tabella 1. Cellule staminali utilizzate in studi sperimentali di cardiomioplastica cellulare: primi lavori pubblicati.

Autore	Tipo di cellula staminale
Koh et al. ⁶	Cardiomiociti fetali
Taylor et al. ⁷ , Kessler e Byrne ⁸	Mioblasti scheletrici autologhi
Li et al. ⁹	Cellule muscolari lisce
Murry et al. ¹⁰	Mioblasti scheletrici singenici
Hutcheson et al. ¹¹	Fibroblasti dermici
Li et al. ¹²	Cellule adulte di origine cardiaca
Klug et al. ¹³	Cellule staminali embrionali
Ferrari et al. ¹⁴ , Wang et al. ¹⁵	Cellule stromali di origine midollare
Orlic et al. ¹⁶	Cellule mononucleate di origine midollare

Non stupisce, pertanto, che la ricerca scientifica abbia valutato modalità percutanee di trapianto cellulare, alternative alla via chirurgica transepica, configurando un'autentica "terapia cellulare transcateretere"²⁶. Allo stato attuale esistono diversi studi nell'animale da esperimento ed alcuni studi iniziali nell'uomo (prevalentemente di fase I, di fattibilità/sicurezza, non randomizzati) che hanno valutato tre modalità di approccio percutaneo: transendocardico, intracoronarico e transvenoso coronarico.

Scopo della presente rassegna è stato analizzare, alla luce della letteratura attualmente disponibile, le tre modalità sopra elencate di terapia cellulare transcateretere dell'insufficienza cardiaca, descrivendo tecnica, vantaggi ed eventuali limiti delle singole metodiche.

Terapia cellulare cardiaca transendocardica

Vantaggi

Il trapianto di cellule staminali nel miocardio può essere effettuato per via transendocardica con un approccio percutaneo arterioso: la metodica prevede l'utilizzo di un catetere per iniezione introdotto nella cavità ventricolare sinistra che esegue iniezioni mirate della sospensione cellulare in regioni miocardiche ischemiche o sede di cicatrice infartuale, individuate con un mappaggio elettromeccanico della parete cardiaca.

Obiettivo dell'iniezione intramiocardica transendocardica è quello di ottenere un effetto comparabile a quello che si raggiunge con l'iniezione intramiocardica transepica dopo toracotomia. A fronte di un'efficacia potenzialmente paragonabile riguardo al trapianto di cellule intramiocardiche, si eviterebbe l'anestesia generale e la toracotomia, con i relativi rischi per il paziente. Inoltre, l'approccio percutaneo permette di raggiungere regioni miocardiche altrimenti inaccessibili all'approccio chirurgico, come il setto interventricolare e la parete posteriore del ventricolo sinistro. Ulteriore vantaggio dell'approccio transendocardico, condiviso da tutte le metodiche percutanee, a contenuta invasività, è la possibilità di ripetere più volte la procedura di trapianto cellulare nello stesso paziente, in tempi diversi.

Rispetto all'iniezione percutanea intracoronarica, quella transendocardica presenterebbe un vantaggio teorico: durante l'iniezione in coronaria, una quantità non prevedibile della sospensione cellulare potrebbe non essere trattenuta dal tessuto miocardico durante il primo passaggio e verrebbe pertanto a distribuirsi ad altri tessuti dell'organismo. L'iniezione diretta intramiocardica, invece, ridurrebbe in modo drastico la quantità di sospensione cellulare che verrebbe persa per via sistemica²⁰.

Studi preclinici e clinici

Studi preliminari condotti nel modello animale di ischemia miocardica cronica^{27,28} hanno dimostrato che l'iniezione intramiocardica per via transendocardica di

BMMC, sotto la guida di un mappaggio elettromeccanico del ventricolo sinistro, può determinare un miglioramento della perfusione tissutale e della contrattilità in modo sicuro e fattibile. In precedenza, la stessa metodica di iniezione intramiocardica era stata testata nel modello animale per la terapia genica²⁹.

Anche l'esperienza clinica con questa metodica transcateretere di iniezione intramiocardica è stata condotta inizialmente per la terapia genica, dimostrando un buon profilo di sicurezza^{30,31}.

Sicurezza e fattibilità del trapianto cellulare transcateretere per via transendocardica sono state valutate in alcuni studi pilota e di fase I, pubblicati prevalentemente nel corso del 2003 (Tabella 2)³²⁻³⁶.

I cateteri attualmente disponibili per questa metodica di cardiomioplastica cellulare sono: il catetere NOGA Myostar della Biosense Webster, Johnson & Johnson³²⁻³⁶ (Warren, NJ, USA), il Myocath Delivery System della Bioheart Inc.³⁷ (Sunrise, FL, USA), lo Stiletto della Boston Scientific³⁷ (Miami, FL, USA) ed il catetere elicoidale della Biocardia Inc.³⁸ (South San Francisco, CA, USA); sono in corso di sviluppo cateteri compatibili con la risonanza magnetica³⁸.

All'inizio del 2003 è stato pubblicato su *Lancet* il primo studio clinico di trapianto cellulare transendocardico nel modello della cardiopatia ischemica sintomatica non suscettibile di rivascolarizzazione³². Tse et al.³², dell'Università di Hong Kong, hanno trattato con questa metodica 8 pazienti affetti da angina cronica stabile refrattaria alla terapia medica antischemica massimale, trapiantando BMMC, al fine di indurre una neovascolarizzazione e migliorare la funzione cardiaca. I territori miocardici ischemici dei pazienti non potevano essere rivascolarizzati per via percutanea o chirurgica. Tutti i pazienti sono stati valutati in modo prospettico ed avevano una preservata frazione di eiezione del ventricolo sinistro all'arruolamento (frazione di eiezione media 58%). Al follow-up di 3 mesi, gli autori hanno osservato un miglioramento significativo dei sintomi (riduzione del numero di episodi anginosi alla settimana [$p < 0.0001$] e del consumo di compresse di nitroglicerina [$p = 0.0002$]) e degli indici di contrattilità parietale e di perfusione miocardica nei segmenti trattati, valutati con risonanza magnetica cardiaca (incremento del 35% dell'ispessimento parietale e del 28% della motilità parietale, riduzione del 44% del miocardio ipoperfuso).

Nessuno dei pazienti ha avuto complicanze legate alla procedura oppure esiti a breve termine, aritmie, danno miocardico o insorgenza di tumori intramiocardici.

Fuchs et al.³³, in un piccolo studio pilota condotto a Washington, hanno confermato in modo analogo fattibilità e sicurezza della procedura in 10 pazienti con cardiopatia ischemica cronica sintomatica, non suscettibile di rivascolarizzazione convenzionale. In questo caso è stato utilizzato midollo osseo autologo filtrato, ma non centrifugato: non è stata eseguita, cioè, una selezione del tipo di cellule midollari da trapiantare. L'a-

Tabella 2. Terapia cellulare cardiaca transcateretere per via transendocardica: studi clinici pubblicati.

Autore	N. pazienti	Tipo di cardiopatia	Cellule trapiantate	FE basale (%)	Follow-up (mesi)	Δ significativi strumentali pre/post-terapia cellulare	Complicanze
Tse et al. ³²	8	Angina stabile refrattaria alla terapia farmacologica antischemica	BMMC	58	3	RM contrattilità: ispessimento parietale 33.6/45.2% (+35%); motilità parietale 19.6/25.1% (+28%) RM perfusione: miocardio ipoperfuso 8.8/5.0% (-44%)	Nessuna
Fuchs et al. ³³	10	Severa ischemia miocardica cronica sintomatica	BMC	47 ± 10	3	SPECT perfusione: stress score 21 ± 0.8/1.6 ± 0.8 (-24%)	Nessuna
Perin et al. ^{34,35}	11 (9 controlli)	Severo scompenso cardiaco cronico postischemico	BMMC	30 ± 5.6	12	SPECT perfusione: difetto reversibile 14.8 ± 14.5/11.3 ± 12.8% (-24%)	Nessuna
Smits et al. ³⁶	5	Scompenso cardiaco postinfarto miocardico anteriore	ASM	18-43	6	Ventricolografia sinistra a 3 mesi: FE 36 ± 11/41 ± 9% (-14%) RM contrattilità (3 mesi): ispessimento parietale 0.9 ± 2.3/1.8 ± 2.4% (+100%)	1 paziente con TVNS (necessità di ICD)

ASM = mioblasti scheletrici autologhi; BMMC = cellule staminali autologhe mononucleate di derivazione midollare; ICD = defibrillatore impiantabile; FE = frazione di eiezione; RM = risonanza magnetica; SPECT = tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo; TVNS = tachicardia ventricolare non sostenuta.

spirato midollare è stato iniettato in regioni miocardiche ischemiche, non cicatriziali, precedentemente identificate con scintigrafia perfusionale (tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo [SPECT]). Non sono state osservate complicanze legate alla procedura (aritmie, infezioni/inflammazioni, formazione di cicatrice). A 3 mesi di follow-up, è stato registrato un miglioramento clinico significativo (riduzione del 35% del punteggio per l'angina della Canadian Cardiovascular Society) ed una riduzione significativa dell'ischemia inducibile nelle regioni trattate valutata con stress SPECT (-24%), mentre non sono stati registrati benefici dal punto di vista della contrattilità globale e segmentaria, valutata mediante ecocardiografia.

Due ulteriori studi clinici hanno valutato l'effetto del trapianto cellulare transendocardico nel modello della disfunzione ventricolare sinistra postischemica.

Un gruppo di ricercatori di Houston e Rio de Janeiro, guidati da Perin³⁴, ha pubblicato nel maggio del 2003 su *Circulation* i risultati di un'esperienza multicentrica a questo riguardo, con dati del follow-up fino a 12 mesi³⁵. BMMC sono state trapiantate per via transendocardica in zone di miocardio ibernato vitale in 14 pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico severo postischemico in stadio terminale ed in assenza di altre opzioni standard di rivascularizzazione. I pazienti sono stati seguiti in modo prospettico da un punto di vista clinico e strumentale non invasivo ad intervalli di 2, 6 e 12 mesi.

In questo piccolo studio prospettico, non randomizzato, aperto, i pazienti, che avevano una frazione di eiezione basale del ventricolo sinistro < 40%, sono andati incontro ad un miglioramento significativo e persistente (12 mesi di follow-up) della capacità funzionale (aumento del numero dei livelli di equivalenti metabolici alla prova da sforzo al treadmill [p = 0.02] vs gruppo di controllo) e della perfusione miocardica (riduzione della percentuale totale di difetto reversibile alla SPECT [p = 0.01] vs gruppo di controllo), senza alcun effetto collaterale correlato alla procedura. Non sono state registrate aritmie ventricolari maligne nel follow-up.

Nel secondo studio clinico condotto in pazienti con disfunzione contrattile postischemica, pubblicato alla fine del 2003 sul *Journal of the American College of Cardiology*, sono stati utilizzati ASM anziché BMMC³⁶. Un gruppo di ricercatori di Rotterdam, guidati da Smits³⁶, ha condotto uno studio pilota di fattibilità e sicurezza a breve termine (6 mesi) della terapia cellulare cardiaca con ASM, iniettati nella cicatrice infartuale per via transendocardica. Sono stati trattati 5 pazienti (range 2-11 anni) con precedente infarto miocardico acuto anteriore, scompenso cardiaco sintomatico nonostante terapia medica ottimale (classe funzionale NYHA ≥ II) ed importante disfunzione ventricolare sinistra (frazione di eiezione angiografica del ventricolo sinistro 18-43%). Obiettivo del trapianto cellulare è stata la cicatrice infartuale definita come regione di

a-discinesia priva di riserva contrattile all'eco-stress. Criterio di esclusione dalla procedura era la presenza di uno spessore parietale < 5 mm nella zona da trattare. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a follow-up clinico e strumentale ad 1, 3 e 6 mesi; i controlli strumentali prevedevano elettrocardiogramma secondo Holter, eco-stress, ventricolografia sinistra e SPECT (a 3 e 6 mesi) e risonanza magnetica cardiaca (solo a 3 mesi).

Non sono state osservate complicanze correlate alla procedura. A 6 settimane dal trapianto, un paziente è stato ricoverato per scompenso cardiaco ed evidenza Holter di run di tachicardia ventricolare non sostenuta: dopo miglioramento delle condizioni di compenso, data la persistenza del problema aritmico il paziente è stato sottoposto ad impianto profilattico di defibrillatore automatico.

Per quanto riguarda gli effetti della cardiomioplastica cellulare, si è osservato un miglioramento significativo della frazione di eiezione angiografica a 3 mesi rispetto ai valori basali ($p = 0.009$), incremento non confermato dai dati SPECT o risonanza magnetica. A 6 mesi, i dati angiografici e SPECT hanno evidenziato una tendenza all'incremento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro, senza raggiungere la significatività statistica. L'analisi della contrattilità segmentaria mediante risonanza magnetica eseguita a 3 mesi ha fornito dati coerenti con un processo di rimodellamento ventricolare sinistro più favorevole: aumento significativo della contrattilità parietale nelle regioni miocardiche trattate e riduzione dell'ipercontrattilità compensatoria nei segmenti distanti dall'area infartuale.

Durante l'edizione 2005 del Congresso dell'American College of Cardiology sono stati presentati da Serruys i risultati preliminari dello studio BioHEART, studio di fase I-II sull'utilizzo di ASM per via transendocardica in 15 pazienti con scompenso cardiaco cronico postinfartuale. L'evidenza di episodi di tachicardia ventricolare in 2 dei primi 6 pazienti trattati ha indotto i ricercatori ad impiantare un defibrillatore automatico in tutti i pazienti arruolati. Al termine del follow-up di 12 mesi, sono stati osservati due decessi (entrambi entro 2 settimane dal trapianto cellulare) e tre episodi aritmici ventricolari. Dal punto di vista dell'efficacia del trattamento, è stato segnalato un miglioramento ai limiti della significatività della contrattilità miocardica nei territori trattati.

Queste prime esperienze cliniche, condotte su un numero limitato di pazienti ed in modo non randomizzato, non permettono di formulare conclusioni definitive riguardo alla metodica transendocardica di trapianto cellulare. Al momento attuale è possibile affermare solamente la fattibilità della metodica e la sua sicurezza dal punto di vista procedurale. Dal punto di vista dell'efficacia, per quanto attiene all'uso di cellule staminali di origine midollare, è utile sottolineare che l'iniezione di midollo osseo autologo filtrato, ma non sottoposto a selezione cellulare (come descritto nel lavoro di Fuchs et al.³³), comporta l'utilizzo di una po-

polazione cellulare eterogenea, per la maggior parte costituita da cellule mature, già differenziate (in prevalenza linfociti e monociti), mentre la sottopolazione di cellule staminali (sia ematopoietiche che mesenchimali) costituisce una frazione decisamente più esigua. Ciò può giustificare, e in parte spiegare, la limitata efficacia del trattamento, in confronto con gli studi che hanno utilizzato BMMC selezionate a partire dal midollo osseo autologo aspirato.

Rimane aperta la problematica relativa alla potenziale aritmogenicità del trapianto cellulare con ASM. Smits segnala un totale di cinque eventi aritmici (due morti improvvise e tre tachicardie ventricolari) a 3 mesi di follow-up in 8 pazienti trattati con ASM per via transendocardica (dati non pubblicati, 2003). Questi dati si aggiungono a quelli riportati recentemente da Serruys ed ancor prima da Menasche et al.³⁹, riguardanti il trapianto transeplicardico di mioblasti scheletrici in corso di intervento di bypass aortocoronarico: quattro impianti di defibrillatore entro 1 mese dal trattamento su 10 pazienti arruolati. Ad ogni modo, i pazienti arruolati in questi studi sono di per sé ad alto rischio per aritmie maligne, in quanto portatori di disfunzione ventricolare sinistra postischemica di grado severo: può essere pertanto difficile distinguere tra eventi aritmici secondari al trapianto cellulare e quelli legati alla storia naturale della malattia.

Tecnica

Gli studi clinici finora pubblicati hanno utilizzato prevalentemente un singolo dispositivo di mappaggio ed iniezione, il sistema NOGA, che consta di un sistema di mappaggio elettromeccanico del ventricolo sinistro, che fornisce una ricostruzione tridimensionale della cavità ventricolare prima di eseguire l'iniezione di soluzione cellulare per mezzo di un catetere ad ago mobile (estensibile)⁴⁰.

Ciascun catetere per iniezione viene testato per la biocompatibilità cellulare affinché non si determini alcun danno cellulare meccanico o funzionale durante l'iniezione sotto pressione attraverso l'ago.

Nel caso del trapianto di cellule staminali di origine midollare, la prima fase della procedura prevedeva il prelievo di midollo osseo dal paziente. Nello studio di Tse et al.³², 40 ml di midollo osseo sono stati aspirati dalla cresta iliaca destra del paziente in anestesia locale e trasportati ad un laboratorio dedicato alla manipolazione cellulare in condizioni di asepsi per il trapianto di midollo. Qui le BMMC sono state isolate per mezzo di una centrifugazione secondo un gradiente di densità (Ficoll-Hypaque), lavaggio ripetuto, filtrazione e sospensione in plasma autologo. Successivamente, la soluzione cellulare è stata riportata direttamente nel Laboratorio di Emodinamica. L'intervallo medio di tempo tra prelievo del midollo osseo e l'iniezione delle BMMC isolate è stato di 140 min. La procedura di prelievo del midollo osseo ed isolamento delle cellule mononucleate è stata analoga negli altri studi^{34,35}, con l'ec-

cezione dello studio di Fuchs et al.³³ che ha fatto uso del midollo osseo autologo filtrato ma non sottoposto a selezione cellulare. L'intervallo di tempo trascorso tra prelievo ed iniezione transendocardica è stato più lungo nello studio di Perin et al.³⁴ (circa 240 min).

Nel caso del trapianto di ASM, il paziente deve essere sottoposto innanzitutto ad una biopsia muscolare. Nello studio di Smits et al.³⁶ la biopsia è stata eseguita a livello del quadricipite muscolare in anestesia locale. È da sottolineare che in ben 3 pazienti è stato necessario ripetere la biopsia dopo la conclusione del primo processo di coltura cellulare, per evidente insufficienza del materiale prelevato. Il trasporto del materiale biopico dalla sala operatoria al laboratorio di isolamento ed espansione cellulare ha richiesto una gestione attenta, in particolare della temperatura del contenitore utilizzato. Il periodo necessario per la coltura cellulare è stato in media di 17 giorni (range 14-19 giorni) ed ha condotto a 296 ± 199 milioni di ASM. La procedura di trapianto cellulare è stata condotta nel Laboratorio di Emodinamica dopo almeno 20 giorni dalla biopsia: come era prevedibile, l'intervallo di tempo tra prelievo cellulare e trapianto cellulare è estremamente più lungo nel caso dei ASM, rispetto alle BMMC.

La procedura di trapianto cellulare per via transendocardica è stata simile negli studi finora pubblicati. Dopo aver ottenuto l'accesso femorale, è stata somministrata eparina per via endovenosa nelle dosi anticoagulanti consuete (100 UI/kg) ed è stato eseguito cateterismo cardiaco sinistro con ventricolografia sinistra in due proiezioni ortogonali: in questo modo era possibile tracciare il profilo esterno del ventricolo sinistro.

Successivamente, veniva introdotto il catetere per il mappaggio elettromeccanico cardiaco: un catetere 7-8F NOGA-STAR con curva-F, collegato ad una consolle NOGA forniva una mappa NOGA elettromeccanica del ventricolo sinistro; parametri locali e globali che caratterizzano la funzione meccanica, dinamica ed elettrica del ventricolo sinistro venivano acquisiti, analizzati e mostrati sotto forma di mappe elettroanatomiche del cuore. L'analisi funzionale si basa sull'accorciamento locale come indice della funzione meccanica locale, mentre la registrazione degli elettrocardiogrammi intracardiaci locali fornisce dati sulla vitalità miocardica intesa come preservata funzione elettrica.

Le aree di miocardio con scarsa attività elettrica (bassi voltaggi unipolari < 4 mV) e scarso accorciamento lineare locale ($< 4\%$) sulla mappa NOGA erano considerate aree infartuali e rappresentavano le zone bersaglio del trapianto cellulare nello studio di Smits et al.³⁶, specialmente quando concordavano da un punto di vista topografico con le aree cicatriziali determinate dall'eco-stress, dalla risonanza magnetica e dalla ventricolografia sinistra.

Tse et al.³² e Perin et al.³⁴ hanno scelto le zone bersaglio del trattamento sovrapponendo le aree ischemiche precedentemente identificate con la SPECT con le zone di miocardio vitale evidenziate dalla mappa elet-

tromeccanica del ventricolo sinistro (voltaggio unipolare ≥ 6.9 mV). Venivano preferite le zone con miocardio ibernato, definito dalla presenza di ridotta attività meccanica (accorciamento lineare locale $< 12\%$).

Individuate le zone di miocardio bersaglio del trapianto cellulare, la procedura prevede la sostituzione del catetere di mappaggio con il catetere per iniezione 8F NOGA Myostar, provvisto all'estremità distale di un ago di 27G mobile (retraibile-estensibile). La lunghezza dell'ago può essere modificata manualmente sulla base dello spessore della parete ventricolare, precedentemente determinato con ecocardiogramma toracico o risonanza magnetica cardiaca. In genere, l'ago è stato avanzato nel miocardio per 4.5-6 mm e l'iniezione transendocardica è stata evitata nelle zone con spessore parietale < 5 mm.

Prima di avanzare l'ago nel miocardio ed eseguire l'iniezione della soluzione cellulare, è necessario valutare accuratamente il luogo dell'iniezione ed ottenere un contatto endomiocardico il più stabile possibile tra l'estremità distale del catetere iniettore e la parete ventricolare, sulla scorta della mappa NOGA e dell'immagine fluoroscopica. L'avanzamento dell'ago nel miocardio provoca, infatti, extrasistoli ventricolari che se da un lato confermano la penetrazione dell'ago nel tessuto miocardico, dall'altro possono inficiare la precisione della procedura stessa. Nello studio di Perin et al.³⁴ sono stati codificati alcuni criteri ottimali da raggiungere prima di eseguire l'iniezione della soluzione cellulare con il sistema iniettivo NOGA Myostar: posizione ortogonale del catetere rispetto alla parete ventricolare, eccellente stabilità del "loop" (< 4 mm), voltaggio della parete sottostante all'ago > 6.9 mV e presenza di un'extrasistole ventricolare al momento dell'estensione dell'ago nel miocardio. I punti di iniezione possono essere segnati sulla mappa NOGA per confronti successivi.

Ciascuna iniezione è stata in genere di 0.2-0.3 ml di soluzione cellulare (pari a circa 16.6 milioni di cellule nel caso della soluzione di ASM ed a 25.5 ± 6.3 milioni di cellule nel caso della soluzione di BMMC), ed il numero medio di iniezioni transendocardiche eseguite per paziente è stato sovrapponibile nei diversi studi (12^{33} , 15.9 ± 5.4^{32} , 16 ± 4^{36} , 15^{34}).

Limiti

Gli studi clinici finora pubblicati sono di fase I coinvolgono piccoli campioni di pazienti ed hanno un follow-up limitato nel tempo; valgono pertanto alcune considerazioni generali. Innanzitutto, i benefici osservati potrebbero non essere distinguibili da quelli dovuti ad effetto placebo e potrebbero, inoltre, essere attribuiti alla variabilità delle tecniche utilizzate per analizzare gli effetti della procedura (SPECT, risonanza magnetica, ecc.). Dati sulla sicurezza a lungo termine della metodica potranno venire da studi in doppio cieco, con gruppo di controllo, coorti di pazienti più vaste e follow-up prolungati.

Il trapianto cellulare per via transendocardica richiede una particolare esperienza del personale medico e tecnico sia nella fase di acquisizione delle immagini NOGA, sia al momento dell'iniezione intramiocardica. Gli autori sostengono che in genere è necessaria una curva di apprendimento prolungata per dominare la metodica.

Per quanto riguarda la possibilità di eseguire con questa metodica iniezioni in segmenti distinti della parete del ventricolo sinistro, va sottolineato che rimane limitato l'accesso all'area di miocardio posta subito al di sotto del piano valvolare mitralico, per l'ostacolo costituito dall'apparato sottovalvolare mitralico.

Come è già stato sottolineato, il contatto tra sistema iniettivo e parete ventricolare (mobile) può essere particolarmente instabile, anche per il fatto che il catetere endoventricolare non si muove in modo solidale con i movimenti cardiaci (che includono anche un momento rotatorio ad ogni sistole): tutto ciò può ridurre la precisione dell'iniezione.

Altro limite comune a tutti i sistemi di iniezione intramiocardica è rappresentato dal fatto che la stessa pressione di iniezione può destabilizzare il sistema iniettivo e provocare l'espulsione dell'ago dalla sede di puntura, con possibilità di perdita retrograda nella cavità ventricolare di una parte della sospensione cellulare dal breve canale intramiocardico precedentemente creato dall'ago. La presenza di sospensione cellulare nel ventricolo sinistro può a sua volta determinare fenomeni embolici sistemici e minor efficienza del trapianto cellulare. Al fine di migliorare la stabilità del sistema iniettivo transendocardico, sono in fase di sviluppo sperimentale degli elettrodo-cateteri a suzione che permettono l'adesione dell'estremità del catetere con l'endocardio ed allo stesso tempo l'identificazione dell'area infartuata per mezzo di parametri elettrofisiologici⁴¹.

Ad ogni modo, ogni tipo di manipolazione con catetere intraventricolare può danneggiare la parete miocardica, indurre extrasistoli ventricolari o run di tachicardia ventricolare; ciò può ostacolare, in alcuni casi, l'iniezione delle cellule staminali nelle zone più aritmogene, oltre a comportare un prolungamento della durata della procedura.

Infine, nei sistemi iniettivi endoventricolari l'ago è in genere orientato perpendicolarmente rispetto alla superficie endocardica e ciò controindica la puntura in segmenti di parete assottigliata (< 5 mm) per la presenza di cicatrice infartuale, essendo elevato il rischio di perforazione.

Lo sviluppo di tecniche non invasive di imaging (risonanza magnetica, ecocardiografia e tomografia computerizzata cardiaca) capaci di valutare in modo attendibile le concentrazioni di cellule staminali realmente trapiantate nel tessuto cardiaco, la loro vitalità ed il loro contributo alla funzione tessutale ed all'angiogenesi rappresenta un altro importante ambito di evoluzione della cardiomioplastica percutanea transendocardica.

Terapia cellulare cardiaca intracoronarica

Vantaggi

L'infusione di cellule nelle coronarie fornisce dei vantaggi teorici rispetto all'iniezione diretta nel miocardio: da un lato viene evitato ogni tipo di danno del tessuto miocardico secondario all'introduzione dell'ago (per via transepicaardica o transendocardica), dall'altro è possibile una disseminazione più estesa delle cellule staminali nel miocardio tributario della coronaria interessata dalla procedura di cardiomioplastica cellulare. Tutte le cellule attraversano al primo passaggio il tessuto miocardico irrorato dalla coronaria; di conseguenza, con questa via di somministrazione il tessuto miocardico può essere arricchito con la massima concentrazione di cellule in ogni momento.

Inoltre, l'applicazione di cellule staminali per via coronarica è sicuramente una metodica percutanea di esecuzione più semplice rispetto a quella transendocardica, considerato il notevole sviluppo e diffusione delle tecniche di incannulazione selettiva delle coronarie.

In generale, il trapianto intracoronarico di cellule staminali ha dimostrato di fornire potenziali benefici terapeutici nell'insufficienza cardiaca sia nel modello della miocardiopatia diffusa, che in quello postinfartuale. Nel primo caso, la somministrazione intracoronarica di cellule permette di raggiungere globalmente il miocardio coinvolto dalla patologia; nel secondo caso, la via intracoronarica consente l'infusione sede-specifica, attraverso il vaso responsabile dell'infarto, ad esempio di BMMC, in grado di colonizzare il muscolo necrotico e di differenziarsi secondo differenti linee cellulari, comprese quelle che conducono ai cardiomiociti, fibroblasti ed alle cellule endoteliali, che a loro volta partecipano al processo di rimodellamento postinfartuale attraverso la formazione di nuovo tessuto muscolare, fibroso reattiva e neoangiogenesi.

L'infusione coronarica di cellule staminali progenitrici di origine midollare o periferica sembrerebbe non associarsi al rischio di aritmie maligne, osservate nel caso dell'iniezione intramiocardica: studi sperimentali hanno dimostrato che queste cellule, infuse per via endovenosa, colonizzano in modo preferenziale il miocardio perinfartuale⁴². In modo analogo, studi clinici preliminari hanno evidenziato un miglioramento più evidente della contrattilità in sede perinfartuale dopo infusione coronarica⁴². Questa tecnica di trapianto, quindi, eviterebbe la formazione di aggregati di cellule vitali all'interno della cicatrice infartuale, che invece si otterrebbero con l'iniezione diretta e che potrebbero costituire un substrato di instabilità elettrica favorente le aritmie ventricolari maligne.

Studi preclinici

Robinson et al.⁴³, nel 1996, descrissero un metodo di somministrazione per via arteriosa di mioblasti scheletrici nell'animale da esperimento; esso consisteva nell'iniezione della soluzione cellulare nella cavità ventri-

colare sinistra del topo e permise di osservare un gran numero di mioblasti diffusamente presenti in sede intramiocardica.

La possibilità di infondere selettivamente in una coronaria le cellule staminali con un sistema a catetere è stata suggerita per la prima volta da Taylor et al.⁴⁴, che hanno utilizzato mioblasti scheletrici nel coniglio. L'efficienza del trapianto si rivelò, purtroppo, inadeguata; questo modello sperimentale servì a dimostrare che il maggiore fattore limitante la sopravvivenza delle cellule era rappresentato dalla migrazione verso l'interstizio miocardico delle cellule intrappolate nei capillari cardiaci.

Il gruppo di Willerson⁴⁵ ha descritto un sistema per l'infusione intracoronarica mediante catetere di cardiomiociti fetali nel cuore di cane, che prevede l'interruzione del flusso coronarico per 1-5 min dopo l'infusione di cellule, al fine di migliorare l'efficienza dell'impianto cellulare.

In un lavoro sperimentale di Wang et al.⁴⁶, condotto nel ratto, sono stati esplorati i meccanismi fisiopatologici dell'infusione coronarica di cellule staminali. Cellule stromali midollari infuse nell'aorta ascendente potevano essere individuate dopo breve tempo nei capillari coronarici e dopo 4 settimane nell'interstizio miocardico, singolarmente o in aggregati. Gli aggregati cellulari esprimevano un fenotipo di tipo fibroblastico quando erano localizzati nella cicatrice postinfartuale, mentre presentavano caratteristiche morfologiche dei normali cardiomiociti quando localizzate al di fuori dell'area infartuale; infine, alcune cellule stromali risultavano incorporate nell'endocardio e nell'endotelio capillare. Il meccanismo esatto della migrazione delle cellule stromali mononucleate di origine midollare dal lume vasale all'interstizio miocardico è tuttora sconosciuto; tali cellule hanno dimostrato capacità di migrazione nel modello sperimentale *in vivo*⁴⁷. Caratteristicamente, queste cellule possono differenziarsi in cardiomiociti, fibroblasti o cellule endoteliali a seconda del microambiente miocardico in cui vengono a trovarsi.

Studi clinici

L'infusione coronarica di cellule staminali per il trattamento dell'insufficienza cardiaca postinfartuale è stata già valutata in alcuni trial clinici, pubblicati a partire dal 2002 (Tabella 3)^{42,48-53}.

Due gruppi di ricerca tedeschi, quello dell'Università di Düsseldorf, guidato da Strauer, e quello dell'Università di Francoforte, diretto da Zeiher e Dimmeler, hanno pubblicato nel corso del 2002 i loro dati riguardo all'infusione per via coronarica di BMMC nei pazienti con infarto miocardico acuto ripperfuso per via percutanea⁴⁸.

Strauer et al.⁴⁸ sono stati i primi a valutare la sicurezza e la possibile efficacia del trapianto selettivo per via coronarica di BMMC in 10 pazienti con infarto miocardico acuto trattati con angioplastica coronarica ed impianto di stent 12 ± 10 h dopo l'esordio dei sinto-

mi. L'infusione cellulare è stata eseguita 5-9 giorni dopo la rivascolarizzazione percutanea nell'arteria responsabile dell'infarto secondo le modalità descritte nel paragrafo "Tecnica". Non sono state osservate complicanze di tipo ischemico e/o aritmico legate alla procedura. Il gruppo di controllo dello studio era costituito da un pari numero di pazienti con infarto miocardico acuto, trattati con terapia standard dopo la rivascolarizzazione percutanea. Al follow-up strumentale a 3 mesi, nel gruppo trattato con terapia cellulare si è osservata una riduzione significativa della regione infartuale valutata alla ventricolografia sinistra (da 30 ± 13 a 12 ± 7%, p = 0.005) e la significatività statistica persisteva anche nel confronto dell'estensione della regione infartuale con il gruppo di controllo (12 ± 7 vs 20 ± 11%, p = 0.04). Altri indici di funzione cardiaca hanno dimostrato un significativo miglioramento nel gruppo di pazienti trattati con terapia cellulare rispetto ai valori basali, eccetto la frazione di eiezione del ventricolo sinistro, che è migliorata in modo non significativo (Tabella 3).

Il TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction)⁴² è stato il primo trial randomizzato sulla terapia cellulare condotto nel modello del rimodellamento postinfartuale. Si tratta di un trial pilota che prevedeva l'arruolamento di almeno 20 pazienti per ogni braccio di trattamento ed una *interim* analisi dei dati con pubblicazione degli stessi al raggiungimento dei 4 mesi di follow-up dei primi 20 pazienti. La randomizzazione riguardava il tipo di cellula selettivamente infuso nell'arteria responsabile dell'infarto, ad un intervallo di 4.3 ± 1.5 giorni dall'angioplastica coronarica con stenting: BMMC (29 pazienti) oppure cellule progenitrici di derivazione periferica (CBPC) (30 pazienti)⁴⁹. Era previsto un gruppo di controllo, non randomizzato, costituito da 11 pazienti con caratteristiche analoghe e terapia postinfartuale standard. A 4 e 12 mesi è stato eseguito un follow-up clinico e strumentale completo, che prevedeva cateterismo cardiaco sinistro e coronarografia (con valutazione della riserva di flusso coronarico), SPECT e risonanza magnetica a 4 mesi e la sola risonanza magnetica a 12 mesi (disponibile in più del 60% dei pazienti arruolati). La pubblicazione dei dati a 12 mesi è dell'ottobre 2004⁴⁹.

Per quanto riguarda il profilo di sicurezza della metodica di trapianto cellulare, è stato segnalato un caso di embolizzazione coronarica in corso di procedura e 2 casi di recidiva infartuale nel decorso ospedaliero post-procedura, con decesso del paziente in un caso. È utile analizzare questi eventi avversi. L'episodio di embolizzazione coronarica distale ha avuto luogo prima dell'infusione di cellule ed è stato secondario alla mobilizzazione di un piccolo trombo residuo presente all'estremità prossimale dello stent impiantato in fase acuta; per tale motivo, l'evento è stato giudicato non correlato alla terapia cellulare di per sé, bensì correlato alla procedura interventistica necessaria per l'infusione di

Tabella 3. Terapia cellulare cardiaca transcateretere per via intracoronarica nel postinfarto: studi clinici pubblicati.

Autore	N. pazienti (cellule infuse)	Intervallo IMA-PCI	Intervallo IMA-terapia cellulare (giorni)	Follow-up (mesi)	Δ FE angiografica pre/post-terapia cellulare (%)	Δ significativi	Complicanze periprocedurali e nel follow-up
Strauer et al. ⁴⁸	10 (BMMC) 10 controlli	12 ± 10 h	5-9	3	57 ± 8/62 ± 10 p = NS	Ventricolografia sinistra ↑ indici di contrattilità	Nessuna
Assmus et al. ⁴² , Schachinger et al. ⁴⁹	29 (BMMC) 30 (CBPC) 11 controlli	13 ± 22 h 27 ± 40 h	4.3 ± 1.5	12	(4 mesi) 50 ± 10/58.3 ± 10 p < 0.001	Ventricolografia sinistra ed ecocardiografia a 4 mesi ↑ indici di contrattilità SPECT a 4 mesi ↑ vitalità miocardica RM a 12 mesi ↑ FE	Embolizzazione coronarica (n=1)
Wollert et al. ⁵⁰	30 (BMMC) 30 controlli	22 ± 2 h	5.7 ± 1.2	6	-	RM a 6 mesi ↑ FE	Nessuna
Chen et al. ⁵¹	34 (BMMSC) 35 controlli	8 ± 3.7 h	18.3 ± 0.4	6	49 ± 9/67 ± 3 p = 0.01 (p = 0.01 vs controlli)	Ventricolografia sinistra ↑ indici di contrattilità SPECT ↑ perfusione miocardica ↓ volumi del ventricolo sinistro	Nessuna
Kang et al. ⁵²	7 (PBSC) 3 (solo G-CSF) 1 controllo	3-270 giorni	3-270*	6	48.7 ± 8.3/55.1 ± 7.4 p = 0.005	↑ capacità funzionale SPECT ↑ perfusione miocardica	Restenosi a 6 mesi (60-70%)
Avilés et al. ⁵³	5 (BMMC)	< 24 h	5-20	6	-	Nessuno	Nessuna

BMMC = cellule staminali autologhe mononucleate di derivazione midollare; BMMSC = cellule staminali autologhe mesenchimali di derivazione midollare; CBPC = cellule progenitrici di derivazione periferica; FE = frazione di eiezione; G-CSF = fattore di stimolazione granulocitaria; IMA = infarto miocardico acuto; PBSC = cellule staminali isolate dal sangue periferico dopo mobilizzazione con fattori di stimolazione granulocitaria; PCI = rivascularizzazione percutanea con stenting; RM = risonanza magnetica; SPECT = tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo. * nello studio MAGIC di Kang et al.⁵² la terapia cellulare è stata somministrata nella stessa seduta della PCI.

cellule in coronaria. Ad eccezione di questo caso, l'infusione in coronaria di cellule staminali non ha determinato un aumento degli indici di infiammazione, né dei marker di miocardionecrosi nei pazienti trattati.

Nel decorso ospedaliero postprocedura, un paziente per ogni gruppo di terapia è andato incontro ad una recidiva infartuale in terza giornata. In entrambi i casi, nella seduta di terapia cellulare era stata eseguita un'ulteriore rivascolarizzazione percutanea con stenting di un vaso non responsabile dell'infarto. La recidiva infartuale in un caso è stata secondaria a trombosi dello stent nel vaso non interessato dalla terapia cellulare (risolto con nuova rivascolarizzazione percutanea dello stesso), mentre nel secondo caso la trombosi subacuta ha coinvolto proprio lo stent del vaso responsabile dell'infarto e sede della terapia cellulare. Nonostante la rivascolarizzazione percutanea di tale vaso, il paziente è deceduto in quinta giornata per shock cardiogeno secondario ad ulteriore trombosi subacuta intrastent, questa volta del vaso non interessato dalla terapia cellulare.

Durante il follow-up di 12 mesi, non sono stati osservati ulteriori decessi, né la comparsa di aritmie maligne. Gli autori descrivono una rivascolarizzazione del vaso responsabile dell'infarto complessiva del 21% (7 pazienti nel gruppo CBPC e 5 pazienti nel gruppo BMMC).

La terapia cellulare, indipendentemente dal tipo di cellula progenitrice utilizzato, ha determinato a 4 mesi un incremento significativo della frazione di eiezione angiografica del ventricolo sinistro rispetto ai valori basali (da 50 ± 10 a $58.3 \pm 10\%$, $p < 0.001$) ed una riduzione significativa dei volumi telesistolici (da 54 ± 19 a 44 ± 20 ml, $p < 0.001$); parallelamente si è osservato un incremento significativo di alcuni indici di contrattilità regionale in sede perinfartuale. Nell'analisi dei primi 20 pazienti a 4 mesi di follow-up, la vitalità miocardica nella zona infartuata (valutata con la SPECT, $p < 0.01$) e la riserva di flusso coronarico nell'arteria responsabile dell'infarto ($p < 0.001$) sono risultate significativamente migliorate nel gruppo trattato. Nel gruppo di controllo, gli indici di funzione ventricolare sinistra sono rimasti sostanzialmente invariati nello stesso periodo di tempo.

I dati della risonanza magnetica ad 1 anno in 37 dei pazienti trattati concludevano per un incremento significativo della frazione di eiezione (aumento finale della frazione di eiezione a 12 mesi: $9.3 \pm 8.0\%$, $p < 0.001$), con riduzione dell'area infartuale ($p < 0.001$) ed assenza di ipertrofia reattiva, ad indicare la possibile effettiva rigenerazione funzionale del ventricolo sinistro.

Nel complesso questi due studi preliminari^{42,48}, pur con i limiti dovuti all'esiguità del numero dei casi arruolati ed alla mancanza di un gruppo di controllo randomizzato, sembrano indicare che l'infusione selettiva di BMMC o CBPC nel vaso responsabile dell'infarto miocardico acuto, a breve distanza (pochi giorni) dalla rivascolarizzazione coronarica con stenting, è una pro-

cedura sostanzialmente sicura e fattibile. L'incidenza di complicanze ischemiche (morte e/o reinfarto) osservata nel TOPCARE-AMI⁴² (3.4%) è inferiore a quella di studi recenti sulla rivascolarizzazione percutanea nell'infarto miocardico acuto⁵⁴⁻⁵⁶. Non sono state osservate aritmie ventricolari maligne in acuto o durante il follow-up di 1 anno, a differenza di quanto accaduto nel caso dell'iniezione intramiocardica di mioblasti scheletrici³⁶. Inoltre, il significativo aumento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro associato alla significativa riduzione dei volumi telesistolici indicano che la terapia cellulare induce un processo di rimodellamento favorevole nel ventricolo postinfartuale.

Questi studi preliminari hanno fornito il razionale per la valutazione della tecnica transcoronarica di terapia cellulare in trial randomizzati e in doppio cieco su popolazioni di pazienti più ampie. È in corso lo studio multicentrico REPAIR-AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction), che cercherà di differenziare l'effetto positivo della terapia cellulare da quello dovuto al preconditionamento ischemico secondario alle ripetute occlusioni con palloncino dell'arteria responsabile dell'infarto, necessarie ai fini dell'infusione delle cellule progenitrici.

Il BOOST trial (Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration)⁵⁰, primo trial randomizzato e controllato sull'utilizzo delle cellule di derivazione midollare per via coronarica nei pazienti postinfarto miocardico acuto, è stato promosso da un gruppo di ricercatori tedeschi di Hannover guidati da Drexler. Sessanta pazienti con infarto miocardico acuto trattato con successo mediante angioplastica coronarica e stenting sono stati randomizzati a far parte del gruppo di controllo ($n = 30$; terapia medica ottimale standard postinfarto) oppure del gruppo trattato con BMMC oltre che con terapia medica ottimale ($n = 30$). L'infusione coronarica è stata eseguita 4.8 ± 1.3 giorni dopo l'angioplastica coronarica e l'endpoint primario era la variazione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro a 6 mesi di follow-up, valutata con risonanza magnetica cardiaca (ricordiamo che i valori di frazione di eiezione alla risonanza magnetica cardiaca nel soggetto adulto sano sono $67 \pm 5\%$)⁵⁷. Il protocollo di studio prevedeva anche l'esecuzione di un controllo coronarografico a 6 mesi (per valutare l'incidenza di restenosi intrastent) e l'esecuzione di uno studio elettrofisiologico con stimolazione ventricolare (al fine di evidenziare eventuali aritmie inducibili). Anche in questo studio i risultati sono stati favorevoli al gruppo trattato con terapia cellulare; si è osservato un incremento a 6 mesi della frazione di eiezione pari al 6.7% (da 50.0 ± 10 a $56.7 \pm 12.5\%$), mentre nel gruppo di controllo l'incremento è stato solo dello 0.7% (51.3 ± 9.3 a $52 \pm 12.4\%$), dato quest'ultimo piuttosto inusuale in pazienti con infarto miocardico acuto ripulso con successo. La differenza tra i due gruppi era statisticamente significativa ($p = 0.0026$). Era evidente un miglioramento

della contrattilità miocardica innanzitutto nei segmenti cardiaci perinfartuali.

Allo stesso tempo, si è confermato un eccellente profilo di sicurezza della procedura: assenza di eventi clinici avversi in acuto e nel follow-up (eccetto un caso di recidiva infartuale a 4 mesi dalla terapia cellulare, sostenuta da un vaso diverso da quello responsabile del primo infarto), incidenza del 23% di restenosi intrastent significativa a 6 mesi (sovrapponibile al 16% del gruppo di controllo) ed assenza di aritmie maligne spontanee o inducibili nel follow-up.

Gli stessi autori del BOOST trial hanno sottolineato la necessità di un follow-up più lungo al fine di valutare gli effetti della terapia cellulare sul rimodellamento ventricolare, così come l'importanza di trattare gruppi più ampi di pazienti per ottenere risultati in termini di endpoint clinici, come incidenza di scompenso cardiaco e sopravvivenza nel follow-up.

Nel luglio 2004 sono stati pubblicati i dati di un altro studio randomizzato e controllato che ha utilizzato cellule staminali autologhe mesenchimali di derivazione midollare infuse per via coronarica in pazienti con infarto miocardico acuto, ad un intervallo di tempo superiore agli studi precedenti (18 giorni)⁵¹. Lo studio è stato condotto da Chen et al.⁵¹ presso l'Università di Nanjing (Cina). Sessantanove pazienti con infarto miocardico acuto ripperfuso mediante angioplastica coronarica ed impianto di stent entro 12 h dall'insorgenza dei sintomi, sono stati randomizzati a ricevere cellule staminali autologhe mesenchimali di derivazione midollare per via coronarica (n = 34) oppure soluzione fisiologica (n = 35; gruppo di controllo) a distanza di 18 giorni dalla procedura di angioplastica coronarica, essendo necessari 10 giorni di coltura per espandere le cellule staminali autologhe mesenchimali di derivazione midollare inizialmente presenti nell'aspirato midollare. Va sottolineato che in questo studio i pazienti del gruppo di controllo sono stati ugualmente sottoposti all'intera procedura di trapianto cellulare, con l'eccezione dell'infusione di soluzione fisiologica invece di quella cellulare.

Il follow-up clinico e strumentale è stato complessivamente di 6 mesi ed ha previsto l'esecuzione di SPECT, cateterismo cardiaco sinistro ed ecocardiogramma ad intervalli di 3 mesi. Non è stato osservato alcun decesso nei due gruppi durante il follow-up (endpoint primario). Non vi sono state complicanze ischemiche e/o aritmiche in acuto, né nel follow-up. Per quanto riguarda i dati di funzionalità cardiaca, è stato osservato un miglioramento significativo degli indici di funzione ventricolare sinistra alla ventricolografia sinistra (frazione di eiezione, estensione dell'area infartuata, velocità del movimento parietale dell'area infartuata) nel gruppo trattato rispetto ai valori basali ed al gruppo di controllo. Anche l'estensione dell'area infartuale ed i volumi telediastolico e telesistolico valutati alla SPECT hanno dimostrato una significativa riduzione nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo.

L'uso dei fattori di stimolazione granulocitaria, al fine di mobilitare cellule staminali dal midollo osseo per poi raccogliere nel sangue periferico, costituisce un'attraente alternativa all'esecuzione di una procedura invasiva come l'aspirazione di midollo osseo dal paziente. La pubblicazione dello studio MAGIC⁵² nel marzo 2004 ha posto però l'accento sui potenziali effetti collaterali, in termini di aumentato rischio di restenosi coronarica, correlati all'uso del fattore di stimolazione granulocitaria prima della procedura di rivascolarizzazione coronarica. In questo studio randomizzato, controllato, di fase II, sono stati arruolati 27 pazienti con recente infarto miocardico acuto (> 48 h), divisi in tre braccia di trattamento: terapia sottocutanea con fattore di stimolazione granulocitaria per 4 giorni prima dell'angioplastica coronarica con stenting del vaso responsabile dell'infarto ed infusione al termine della procedura delle cellule staminali raccolte con aferesi dal sangue periferico (n = 10), terapia con fattore di stimolazione granulocitaria e successivo stenting coronarico, senza infusione di cellule (n = 10), e sola rivascolarizzazione percutanea (n = 7; gruppo di controllo). Undici pazienti avevano completato il follow-up clinico e strumentale di 6 mesi al momento della pubblicazione dei dati. L'arruolamento dei pazienti è stato sospeso a seguito dell'evidenza angiografica a 6 mesi di un'elevata percentuale di restenosi intrastent nei pazienti trattati con citochine (70% nel primo gruppo e 60% nel secondo gruppo), a fronte di un miglioramento significativo degli indici di funzione sistolica e della perfusione miocardica nel gruppo trattato con terapia cellulare (Tabella 3).

È possibile formulare alcune ipotesi per spiegare l'eccessiva restenosi intrastent osservata: è stato dimostrato, infatti, che le citochine promuovono la differenziazione delle cellule staminali mobilitate in cellule muscolari lisce nel segmento di arteria sottoposto a stenting⁵⁸ ed inducono all'interno della placca neoangiogenesi ed aggregazione di cellule infiammatorie mobilitate. Gli autori dello studio propongono l'uso degli stent medicati, a rilascio di farmaci antiproliferativi, al fine di antagonizzare gli effetti a livello coronarico della terapia con citochine, permettendo allo stesso tempo di mantenere gli effetti favorevoli delle cellule staminali infuse sulla funzione cardiaca e sul rimodellamento postinfartuale. In realtà, prima di proseguire con trial clinici in doppio cieco sull'uso della terapia con citochine per mobilitare cellule staminali in pazienti con lesioni aterosclerotiche coronariche, sarebbero necessari ancora ulteriori ampi studi preclinici incentrati sulla sicurezza di tale trattamento.

Tecnica

La tecnica di infusione coronarica di cellule staminali è stata descritta per la prima volta nel lavoro di Strauer et al.⁴⁸ ed è stata in seguito adottata anche da altri gruppi di ricerca, con piccole variazioni, essendosi dimostrata sufficientemente sicura e fattibile.

Tutti i pazienti trattati con terapia cellulare erano stati precedentemente sottoposti a rivascolarizzazione percutanea dell'arteria responsabile dell'infarto con impianto di stent. L'intervallo di tempo tra l'infarto miocardico acuto e la terapia cellulare è stato variabile nei diversi studi (Tabella 3), sebbene l'obiettivo fosse in genere quello di valutare gli effetti di un trattamento precoce (entro 20 giorni) con cellule staminali sul rimodellamento ventricolare postinfartuale. Solamente nello studio MAGIC⁵² sono stati considerati pazienti trattati con rivascolarizzazione percutanea anche a 9 mesi dall'infarto acuto e la terapia cellulare è stata somministrata al termine della seduta stessa di angioplastica coronarica.

L'aspirazione del midollo osseo dalla cresta iliaca (in anestesia locale o blanda anestesia generale) è stata eseguita in genere alcuni giorni dopo l'infarto e la procedura di rivascolarizzazione (in genere > 5 giorni); il protocollo di isolamento ed espansione delle cellule mononucleate è stato simile a quello già descritto in precedenza. Si poneva una particolare attenzione all'eparinizzazione e filtrazione della soluzione cellulare ottenuta, al fine di prevenire la formazione di aggregati cellulari con possibili rischi di microembolizzazioni durante l'infusione coronarica.

È da sottolineare che nel caso in cui si vogliono infondere le BMMC^{42,50} l'aspirato midollare può essere eseguito il mattino stesso del giorno previsto per la procedura di trapianto cellulare, mentre sono necessari almeno 3 giorni di coltura *ex vivo* del sangue venoso periferico nel caso di utilizzo delle CBPC⁴². Nello studio MAGIC⁵², le cellule staminali isolate dal sangue periferico dopo mobilitazione con fattori di stimolazione granulocitaria, ottenute con aferesi dal sangue venoso periferico dopo 4 giorni di terapia con citochine, venivano infuse entro 1 h dalla raccolta.

Dopo aver adeguatamente scoagulato il paziente (7500-10 000 UI di eparina in bolo endovenoso) ed aver ottenuto l'accesso arterioso periferico, l'arteria responsabile dell'infarto veniva incannulata selettivamente e la soluzione cellulare veniva introdotta direttamente nella zona infartuata utilizzando un palloncino "over-the-wire". Quest'ultimo veniva avanzato nella coronaria e posizionato esattamente in sede intrastent (ovvero a livello della precedente occlusione).

A questo punto la procedura prevedeva l'infusione ripetuta ad alta pressione di alcuni millilitri della sospensione cellulare (ogni millilitro di soluzione contiene alcuni milioni di cellule mononucleate) attraverso il lume centrale del catetere a palloncino ed il contemporaneo ripetuto gonfiaggio a bassa pressione del palloncino per pochi minuti (2-4, 3 e 2.5-4 min)⁴⁸⁻⁵⁰, al fine di interrompere transitoriamente il flusso anterogrado durante le infusioni. Il numero di gonfiaggi (e contemporanea infusione) è stato variabile nei diversi studi (6-7, 3 e 4-5)⁴⁸⁻⁵⁰; tra due gonfiaggi successivi veniva rispettato un breve periodo di almeno 3 min durante il quale veniva consentito un normale flusso anterogrado, al fi-

ne di minimizzare possibili danni ischemici al miocardio tributario. Chen et al.⁵¹ hanno eseguito un singolo gonfiaggio con occlusione della coronaria per un periodo ≥ 2 min ed infusione di 6 ml di sospensione cellulare (o soluzione fisiologica nei controlli).

Il gonfiaggio del palloncino da un lato impedisce il flusso retrogrado della sospensione cellulare nella coronaria, dall'altro determina un arresto transitorio del flusso sanguigno a valle, facilitando di conseguenza l'infusione ad alta pressione delle cellule nella regione infartuata ed un contatto prolungato tra la soluzione cellulare ed il microcircolo: viene in tal modo favorita la migrazione cellulare dal lume vascolare all'interstizio miocardico.

Svantaggi potenziali e questioni aperte

Le perplessità che possono sorgere riguardo all'applicazione di questa metodica di cardiomioplastica cellulare, di per sé semplice e facilmente ripetibile nello stesso paziente, sono relative al rischio di complicanze coronariche secondarie alla nuova procedura di rivascolarizzazione percutanea con palloncino all'interno di uno stent recentemente impiantato ed ancora non rivestito di endotelio. In particolare, il rinnovato barotrauma intrastent può favorire una maggiore restenosi e si può determinare dissezione parietale in segmenti non ricoperti dallo stent. Dai dati finora pubblicati, è possibile concludere in via preliminare che nonostante l'invasività a livello coronarico della tecnica, il tasso di rivascolarizzazione del vaso responsabile dell'infarto osservato nei trial clinici (21% nel TOPCARE-AMI⁴², 23% nel BOOST trial⁵⁰) è nel range atteso per uno stent non medicato impiantato in un infarto miocardico acuto⁵⁹.

L'embolia coronarica distale della sospensione cellulare, con conseguente infarto miocardico acuto più o meno esteso, può essere un'altra fonte di preoccupazione nel trapianto cellulare intracoronarico. In realtà, sono stati ormai individuati alcuni fattori potenzialmente responsabili di tale evento: dimensioni delle cellule staminali infuse, numero di cellule per millilitro di soluzione cellulare, durata dell'infusione coronarica e presenza di eventuali aggregati di cellule diverse (da rimuovere con appositi filtri prima dell'infusione). Riguardo al primo fattore, va ricordato che proprio per le loro dimensioni gli ASM non possono essere trapiantati per via intracoronarica; inoltre, dati sperimentali suggeriscono una particolare attenzione nell'uso delle cellule staminali autologhe mesenchimali di origine midollare⁶⁰.

Rimane ancora incerto l'intervallo di tempo ideale per il trapianto cellulare in pazienti con infarto miocardico acuto. Strauer et al.⁴⁸ hanno osservato che il momento migliore per la terapia cellulare si colloca tra 7 e 14 giorni dall'infarto miocardico acuto; nello studio di Chen et al.⁵¹, risultati positivi sono stati ottenuti anche quando il trapianto è stato eseguito in fase più tardiva (18 giorni).

Terapia cellulare cardiaca transvenosa coronarica

Vantaggi e studi preclinici

Recentemente è stata proposta una modalità diversa di cardiomioplastica cellulare percutanea che prevede l'introduzione di un ago per l'infusione delle cellule staminali direttamente nel miocardio attraverso il sistema venoso coronarico, sotto la guida della fluoroscopia e delle immagini acquisite con gli ultrasuoni intravascolari. In questo modo, vengono sfruttate le potenzialità dell'iniezione cellulare diretta intramiocardica, già dimostrate dall'approccio transeplicardico chirurgico e transendocardico percutaneo, cercando allo stesso tempo di superare i limiti di quelle metodiche, già descritti in precedenza.

Un gruppo di ricercatori di Harvard, del Massachusetts Institute of Technology di Cambridge (USA) e della TransVascular Inc. (Menlo Park, CA, USA), guidati da Thompson⁶¹, è stato il primo a studiare e sviluppare il trapianto cellulare per via transvenosa coronarica nell'animale da esperimento (cellule staminali midollari nel maiale), dimostrandone sicurezza e fattibilità. Brasselet et al.⁶² hanno dimostrato un analogo profilo di sicurezza e fattibilità della metodica utilizzando i mioblasti scheletrici come cellule donatrici.

Il seno coronarico e la vena cardiaca magna forniscono una via di accesso a bassa pressione alla parete inferiore ed anterolaterale del ventricolo sinistro.

Il posizionamento dell'ago per via transvenosa fornisce una piattaforma stabile per l'inserzione di un catetere da microinfusione in modo tangenziale nel miocardio, similmente alle iniezioni chirurgiche. La metodica ha dimostrato di essere altamente accurata nel trattare specifiche regioni miocardiche; l'ago ed il microcatetere per l'infusione sono localizzati in profondità all'interno del cuore e pertanto si muovono e ruotano in modo solidale con esso.

Altri vantaggi teorici della metodica sono la possibilità di eseguire iniezioni multiple in pochi secondi e la contenuta perdita di sospensione cellulare, in quanto viene evitato il fenomeno della perdita retrograda di sospensione cellulare dal canale creato dall'ago stesso. Allo stesso tempo, attraverso l'uso di mezzo di contrasto iniettato assieme alla soluzione cellulare che funge da tracciante, è possibile avere un controllo qualitativo immediato sull'effettiva ritenzione della soluzione iniettata nel miocardio.

È stata dimostrata la presenza di cellule trapiantate (adeguatamente marcate per il riconoscimento) in tutti gli animali trattati in un periodo che andava dalla fase acuta (dopo il sacrificio dell'animale) ad 1 mese dall'iniezione⁶¹.

Il tessuto miocardico cicatriziale postinfartuale, assottigliato, non ha offerto particolari difficoltà per questa metodica di trapianto cellulare, in quanto le iniezioni vengono eseguite secondo una direzione parallela (e non perpendicolare) alla parete ventricolare.

Tecnica

La tecnica prevede il posizionamento percutaneo in sede femorale di un introduttore arterioso 6F e di uno venoso 11F. Viene eseguita una coronarografia ponendo particolare attenzione alla fase di riempimento venoso al fine di verificare la pervietà del circolo venoso coronarico, la sede del seno coronarico e l'eventuale presenza di anomalie anatomiche (di decorso, origine, ecc.). Il seno coronarico viene incannulato selettivamente con un catetere SIM1 7F (Cook, Bloomington, IN, USA). Successivamente, una guida angolata a scambio idrofilica di 0.035" viene avanzata nel seno coronarico, nella vena cardiaca magna e nella vena interventricolare anteriore. Il catetere diagnostico viene scambiato con la consueta tecnica "over-the-wire" con un catetere guida 10F (Coronary Sinus, TransVascular Inc.). Successivamente, un catetere subselettivo viene avanzato all'interno del catetere precedente fino alla vena interventricolare anteriore. Il guidino idrofilico viene a questo punto sostituito con un guidino di 0.014".

Il catetere 6F TransAccess è un sistema a catetere composito, "monorail", che riunisce un dispositivo di ultrasuoni intravascolari (compatibile con i sistemi Volcano Therapeutics [Rancho Cordova, CA, USA] e JOMED Intravascular Ultrasound [Amsterdam, Netherlands]) ed un ago in nitinolo di 24G, pre-formato, estensibile. Il catetere TransAccess viene avanzato sul guidino di 0.014" e posizionato nella vena interventricolare anteriore in preparazione all'iniezione intramiocardica. Il posizionamento del catetere rispetto all'area infartuata si ottiene attraverso punti di repere angiografici (ventricolografia, reperi vascolari epicardici) e la fluoroscopia. Nelle immagini ad ultrasuoni intravascolari, l'orientamento intravascolare si raggiunge utilizzando l'arteria discendente anteriore, il pericardio e la cavità ventricolare sinistra: dopo aver confermato la posizione nella vena coronarica e rispetto alle strutture circostanti, l'ago in nitinolo viene avanzato nel miocardio per 5-7 mm di profondità al fine di raggiungere l'area infartuale e perinfartuale. A questo punto un catetere per microinfusione di 0.015" (Microlume, IntraLume TransVascular Inc.) viene avanzato attraverso l'ago ed in profondità nel tessuto miocardico. Considerato che il tessuto miocardico è uno spazio virtuale, tutta la forza esercitata al momento dell'iniezione all'interno del catetere, di tipo "floppy", si svilupperà in avanti lungo l'asse del catetere stesso; in pratica, l'estremità del catetere diviene una specie di trapano capace di creare un micro-tunnel di 40-50 mm ed oltre nel miocardio lungo lo stesso piano dell'ago. Le iniezioni possono essere eseguite in modo da sovrapporre ed incrociare questi micro-tunnel e creare un'autentica rete della sospensione cellulare nella regione infartuale e perinfartuale.

I cateteri TransAccess, attualmente disponibili, sono molto flessibili e possono incannulare selettivamente la vena cardiaca media e laterale, oltre che la vena interventricolare anteriore, sempre utilizzando un guidino coronarico di 0.014". Variazioni della lunghezza ed angolazione dell'ago in nitinolo consentono di accedere

re ai territori miocardici relativamente ampi a partire da una singola posizione, ovviando la necessità di riposizionare ogni volta il catetere.

Esperienze cliniche

I risultati del primo trial clinico di fase I sulla cardiomioplastica cellulare transvenosa coronarica con ASM nel trattamento dello scompenso cardiaco postinfartuale, sono stati presentati in anteprima da Siminiak et al.⁶³, ricercatori dell'Università di Poznan (Polonia), durante il Congresso dell'American College of Cardiology nel marzo 2004 e recentemente pubblicati. La metodica di trapianto è stata portata a termine con successo in 9 dei 10 pazienti arruolati: in un caso non è stato possibile avanzare il catetere oltre una valvola venosa presente alla biforcazione della vena cardiaca magna. Circa 10⁸ mioblasti sono stati veicolati dal sistema venoso coronarico nel miocardio attraverso 2-4 canalioli con profondità variabile da 1.5 a 4.5 cm.

Non sono state segnalate complicanze legate alla procedura; in particolare, in 9 pazienti in terapia con amiodarone non sono state osservate aritmie, mentre è stato osservato un episodio di tachicardia ventricolare nel singolo paziente che non assumeva terapia antiaritmica ed era portatore di defibrillatore impiantabile. In 4 dei 6 pazienti che hanno condotto il follow-up di 6 mesi, è stato osservato un incremento della frazione di eiezione del 3-8%, mentre un miglioramento della classe funzionale NYHA è stato registrato in tutti i pazienti.

Limiti e prospettive future

L'esperienza clinica è attualmente troppo limitata da consentire analisi approfondite della metodica. Per il momento possono essere segnalati alcuni aspetti strettamente tecnici. Innanzitutto, la cateterizzazione selettiva del seno coronarico richiede un'abilità manuale particolare anche nel caso di cardiologi interventisti esperti. È verosimile, inoltre, che l'uso di cateteri guida progressivamente più piccoli permetterà di superare le valvole venose coronariche, che sono state talora causa di insuccesso della procedura.

Sono in fase di valutazione i cateteri TransAccess di seconda generazione, più flessibili, che avanzano con facilità su un guidino di 0.014"; in tal modo potrà essere evitato l'uso del catetere subselettivo per la vena discendente anteriore e potrà essere incannulata selettivamente anche la vena cardiaca media, che decorre parallela all'arteria discendente posteriore, per migliorare l'approccio alla parete inferiore del ventricolo sinistro.

Conclusioni

I risultati incoraggianti che provengono dai primi studi di cardiomioplastica cellulare percutanea nell'uomo impongono la programmazione e lo svolgimento di ulteriori trial clinici di fase II e III, al fine di fornire risposte alle domande inerenti all'efficacia clinica e alla

sicurezza a lungo termine del trapianto cellulare. Rimangono ancora aperte, inoltre, questioni importanti come il tipo di cellula staminale adulta che deve essere impiegato (verosimilmente diverso a seconda della patologia cardiaca sottostante la disfunzione ventricolare), il numero di cellule da trapiantare, la necessità di ripetere più volte la procedura di trapianto, ecc.

Andrebbe, comunque, evitata in tale ambito qualunque applicazione affrettata nel trattamento dei pazienti delle osservazioni preliminari raccolte dai modelli sperimentali. Un articolo comparso sul *New York Times*⁶⁴ ha sottolineato il rischio di un conflitto tra i ricercatori di base, che richiedono ancora tempo per approfondire le conoscenze prima di applicarle in ambito umano, ed i clinici, che continuano ad arruolare pazienti con scompenso cardiaco avanzato in studi di cardiomioplastica cellulare, sollecitati dalla necessità di offrire loro un'estrema speranza terapeutica.

L'apparente dilemma nella scelta tra cellule staminali autologhe adulte e cellule di origine embrionale/fetale si risolve a favore delle prime sulla base delle evidenze scientifiche di facile disponibilità e reperibilità, assenza di necessità di immunosoppressione ed assente rischio di evoluzione teratogena.

Per quanto riguarda l'utilizzo di ASM, c'è un problema di sopravvivenza delle cellule trapiantate, probabilmente dovuto allo scarso apporto di ossigeno e nutrienti nella regione miocardica sede del trapianto. Possibili strategie potrebbero includere l'associazione di cardiomioplastica cellulare e di procedure che migliorano la perfusione nell'area infartuata (terapia angiogenica contemporanea, bypass aortocoronarico, ecc.). La biopsia muscolare eseguita nel paziente che beneficerà del trapianto cellulare e la successiva coltura cellulare sono procedure che richiedono tempo (2-4 settimane) e ripetuti controlli di vitalità cellulare e sterilità microbiologica.

Per quanto si evince dalla letteratura finora disponibile, le popolazioni di pazienti che possono beneficiare delle metodiche di terapia cellulare cardiaca transcateretere sono fondamentalmente due: i pazienti con infarto miocardico acuto recente (nei quali è imperativo contrastare il processo di rimodellamento ventricolare) ed i pazienti con scompenso cardiaco in fase avanzata e presenza di multiple aree di sostituzione fibrotica del miocardio alternate a miocardio ibernato.

La terapia cellulare per via intracoronarica è sicuramente la metodica più promettente nell'ambito della terapia del rimodellamento postinfartuale. Numerosi gli aspetti a suo favore: la rivascolarizzazione coronarica percutanea dell'arteria responsabile dell'infarto, in fase acuta oppure a breve distanza dall'episodio infartuale, verrebbe affiancata, nel decorso del medesimo ricovero del paziente (ricovero medio di un paziente con infarto miocardico acuto: 10 giorni), dalla procedura di infusione delle cellule staminali nella stessa coronaria precedentemente trattata. Terapia del "muscolo" che segue a breve distanza la terapia della "coronaria" e che si beneficia proprio del flusso coronarico ottimale ripristi-

nato. In questo contesto, sono da prediligere le BMMC o le CBPC: le prime possono essere prelevate addirittura la mattina stessa della procedura di trapianto cellulare, mentre le seconde richiedono alcuni giorni di coltura ed espansione *ex vivo* dopo il prelievo dal sangue periferico. L'uso dei fattori di stimolazione granulocitaria con successiva aferesi del sangue venoso periferico arricchito, permetterebbe di evitare al paziente l'invasività (seppure contenuta) del prelievo di midollo osseo, ma è gravata dall'elevato rischio di restenosi coronarica. Tale procedura di "arricchimento" del sangue periferico richiede ancora approfonditi studi sperimentali, prima di essere proposta in ambito clinico.

Le tecniche percutanee endoventricolare e transvenosa coronarica sono allo stato attuale di più difficile applicazione su larga scala in quanto richiedono cardiologi interventisti e personale tecnico particolarmente esperti. Considerata la possibilità di eseguire multiple iniezioni intramiocardiche in segmenti diversi della parete ventricolare durante la medesima seduta di trapianto, è verosimile che tali metodiche troveranno la loro migliore applicazione nei pazienti con disfunzione ventricolare sinistra severa sostenuta da estese, plurisegmentarie alterazioni della contrattilità parietale.

Riassunto

La progressiva perdita di cardiomiociti da cause diverse (innanzitutto ischemica), associata ad un processo endogeno di riparazione non adeguato, è uno dei principali fattori di evoluzione dell'insufficienza cardiaca, autentico problema di salute del mondo occidentale.

Nell'ultimo decennio, il trapianto nel cuore di cellule staminali con potenziale miogenico ed angiogenico, per intrinseca capacità di differenziazione cellulare e per effetti favorevoli paracrini, sta rappresentando una promettente modalità terapeutica dello scompenso, in quanto capace di determinare una reale rigenerazione del tessuto cardiaco. Risultati clinici preliminari sono derivati da studi di fase I che hanno utilizzato cellule staminali autologhe adulte: mioblasti scheletrici e cellule mononucleate di origine midollare. Facile reperibilità cellulare, assente necessità di immunosoppressione ed assente rischio di evoluzione teratogena costituiscono gli innegabili vantaggi di tali cellule e permettono di superare con evidenze scientifiche l'apparente dilemma etico riguardo alla necessità di utilizzare fonti embrionali/fetali di cellule donatrici.

Tre modalità di trapianto cellulare percutaneo hanno affiancato l'iniziale tecnica chirurgica transepica: transendocardica, intracoronarica e transvenosa coronarica. La presente rassegna descrive vantaggi, limiti e tecnica delle singole metodiche di terapia cellulare cardiaca transcateretere alla luce della letteratura disponibile, ipotizzando i possibili ambiti di applicazione nei diversi quadri di insufficienza ventricolare sinistra.

Parole chiave: Cellule staminali; Procedure interventistiche; Scompenso cardiaco; Terapia cellulare.

Bibliografia

1. American Heart Association. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, TX: American Heart Association, 2002.

2. Edelman GM. Topobiology, an introduction to molecular embryology. New York, NY: Basic Books, 1988: 17-21.
3. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
4. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
5. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 12-8.
6. Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Field LJ. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 1993; 264 (Pt 2): H1727-H1733.
7. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-33.
8. Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 219-42.
9. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 513-22.
10. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-23.
11. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000; 9: 359-68.
12. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999; 100 (Suppl): II63-II69.
13. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-24.
14. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-30.
15. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 999-1005.
16. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
17. Taylor DA. Cell-based myocardial repair: how should we proceed? *Int J Cardiol* 2004; 95 (Suppl 1): S8-S12.
18. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-8.
19. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668-73.
20. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-52.
21. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-85.
22. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004; 94: 573-4.

23. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
24. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52: 152-8.
25. Silber S, Albertsson P, Aviles FF, et al. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26: 804-47.
26. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 78-85.
27. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; 101: 454-8.
28. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1726-32.
29. Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T, Chen D, Milliken CE, Isner JM. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electromechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 246-54.
30. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 2138-43.
31. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al. Phase 1-2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105: 2012-8.
32. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
33. 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.
34. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
35. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110 (Suppl 1): II213-II218.
36. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure. Clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 2063-9.
37. Dick AJ, Guttman MA, Raman VK, et al. Magnetic resonance fluoroscopy allows targeted delivery of mesenchymal stem cells to infarct borders in swine. *Circulation* 2003; 108: 2899-904.
38. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003; 107: 2290-3.
39. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 45: 1078-83.
40. Perin EC, Silva GV, Sarmento-Leite R, et al. Assessing myocardial viability and infarct transmural extent with left ventricular electromechanical mapping in patients with stable coronary artery disease: validation by delayed-enhancement magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002; 106: 957-61.
41. Chachques JC, Herreros J, Lorusso R. New "Cell-Fix" catheter for infarct detection and cell delivery. (abstr) *Int J Cardiol* 2004; 95 (Suppl 1): S70.
42. 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.
43. Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI, et al. Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transplant* 1996; 5: 77-91.
44. Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, et al. Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 245-53.
45. Mar JH, McNatt JM, Wang Y, et al. Fetal canine cardiomyocytes to enhance adult canine myocardium cell numbers. (abstr) *Circulation* 1996; 94 (Suppl 1): I-171.
46. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 699-705.
47. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10711-6.
48. 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.
49. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9.
50. 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.
51. Chen SL, 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.
52. 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.
53. Avilés FF, San Roman JA, Garcia Frade J, et al. Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57: 201-8.
54. Stone GW, Grines CL, Cox DA, et al, for the Controlled Abciximab and Device Investigation of Lower Late Angioplasty Complications (CADILLAC) Investigators. Comparison of angioplasty with stenting, with or without abciximab, in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 346: 957-66.
55. Montalescot G, Barragan P, Wittenberg O, et al, for the ADMIRAL Investigators. Abciximab before Direct Angioplasty and Stenting in Myocardial Infarction Regarding Acute and Long-Term Follow-up. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with coronary stenting for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1895-903.

56. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, et al, for the DANAMI-2 Investigators. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 349: 733-42.
57. Lorenz CH, Walker ES, Morgan VL, Klein SS, Graham TP Jr. Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson* 1999; 1: 7-21.
58. Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403-9.
59. Neumann FJ, Kastrati A, Schmitt C, et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with abciximab on clinical and angiographic restenosis rate after the placement of coronary stents following acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 915-21.
60. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kitleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-4.
61. Thompson CA, Nasser BA, Makowe J, et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1964-71.
62. Brasselet C, Morichetti MC, Messas E, et al. Skeletal myoblast transplantation through a catheter-based coronary sinus approach: an effective means of improving function of infarcted myocardium. *Eur Heart J* 2005; 26: 1551-6.
63. Siminiak T, Fiszer 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.
64. Wade N. Tracking the uncertain science of growing heart cells. *New York Times*, March 14, 2005: 1.