



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

Ιατρική Σχολή

**«Η επίδραση του εκκρινώματος καρδιομυοβλαστών
μετά από μηχανική φόρτιση σε καρδιομυοβλάστες που
υπόκεινται σε υποξία/επανοξυγόνωση τραυματισμό»**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
«Μοριακή & Εφαρμοσμένη Φυσιολογία-
Κατεύθυνση Θεραπευτική Άσκηση»**

**Παπαδοπετράκη Αργυρώ
ΑΜ: 20160434**

Αθήνα, Οκτώβριος 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Φιλίππου Αναστάσιος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Επ. Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, ΕΚΠΑ

Κουτσιλιέρης Μιχαήλ,
Καθ. Φυσιολογίας, ΕΚΠΑ

Μαριδάκη Μαρία,
Αναπλ. Καθηγήτρια Εργοφυσιολογίας, ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μία υπέροχη διαδρομή φτάνει στο τέλος της και ανοίγει το δρόμο ώστε να ξεκινήσει μία νέα πορεία. Για μένα έχει τεράστια σημασία αυτή η προσπάθεια διότι πραγματοποιήθηκε με πολύ κόπο και μεράκι για την «έρευνα» και τον «άνθρωπο». Για την ολοκλήρωσή της είναι υπεύθυνοι πολλοί άνθρωποι οι οποίοι με βοήθησαν και συνετέλεσαν καταλυτικά σε αυτό το εγχείρημα και νιώθω την ανάγκη να τους ευχαριστήσω.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Μιχάλη Κουτσιλιέρη που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την παρούσα μελέτη στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών όπου διευθύνει.

Επίσης, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην καθηγήτρια και μέντορά μου Μαριδάκη Μαρία τόσο για την απεριόριστη στήριξή της όσο και για την αυστηρή κριτική της τα τελευταία 3 χρόνια. Οφείλω να ομολογήσω πως ένα μέρος αυτού που είμαι και έχω καταφέρει ως σήμερα το οφείλω σε εκείνη και δεν μπορώ παρά να την ευγνωμονώ για αυτό.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ ανήκει αδιαμφισβήτητα στον επιβλέποντα καθηγητή μου Αναστάσιο Φιλίππου, επίκουρο καθηγητή Πειραματικής Φυσιολογίας, για την αμέριστη βοήθειά και στήριξη του καθ' όλη την πορεία αυτής της μελέτης. Δεν μπορώ να μην αναφέρω πως ήταν παρόν οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκα την καθοδήγησή του και με όρεξη προβληματίστηκε μαζί μου σχετικά με τις ανησυχίες και αναποδιές της μελέτης. Γι' αυτούς τους λόγους και για εκείνους που θα έρθουν τα επόμενα χρόνια της συνεργασίας μας τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τους Διδακτορικούς φοιτητές και φίλους Αθανάσιο Μουστόγιαννη και Ευάγγελο Ζεβόλη που μοιράστηκαν με κέφι τις γνώσεις τους και με μύησαν στις τεχνικές του εργαστηρίου. Επίσης, τις κολλητές μου φίλες Γαλάτεια και Ιωάννα που με στηρίζουν καθώς για εκείνες είμαι η επιστήμονας της καρδιάς τους.

Τέλος, θέλω να αφιερώσω αυτή την εργασία στις δύο γυναίκες που με μεγάλωσαν και με αγαπούν όσο κανένας άλλος, την μαμά μου Στέλλα και την γιαγιά μου Ζίνα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Συντομογραφίες.....	6
Περίληψη	7
Abstract.....	9
1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Σημασία της έρευνας	11
1.2 Ορισμός και διατύπωση του προβλήματος.....	12
1.3 Μεταβλητές.....	12
1.4 Ερευνητικές υποθέσεις.....	12
1.5 Οριοθετήσεις και περιορισμοί.....	12
2. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.....	14
2.1 Καρδιομυοβλάστες και καρδιομυοκύτταρα.....	14
2.2 Υποξία.....	15
2.3 Ιστική βλάβη λόγω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης in vivo	16
2.4 Κυτταρική βλάβη λόγω υποξίας/επαναοξυγόνωσης in vitro.....	17
2.5 Κυτταρική Θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου	20
2.6 Εκκρίνωμα μυοβλαστών σκελετικού και καρδιακού μύος.....	22
3. Μεθοδολογία.....	24
3.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	24
3.2 Κυτταροκαλλιέργειες.....	24
3.3 Μηχανική φόρτιση.....	25
3.4 Συλλογή και φύλαξη υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας.....	26
3.5 Κυτταρική βλάβη λόγω υποξίας/επαναοξυγόνωσης in vitro	26
3.6 Ποσοτικές αναλύσεις αξιολόγησης της βιωσιμότητας των κυττάρων....	27
3.6.1 Κυτταρομετρία ροής (Annexin V/PI)	27
3.6.2 MTT assay.....	28
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	28

4. Αποτελέσματα.....	29
4.1 Πιστοποίηση κυτταρικής βλάβης λόγω υποξίας/επαναοξυγόνωσης	29
4.2 Βιωσιμότητα κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας (Πειραματική συνθήκη Α)	31
4.3 Βιωσιμότητα κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας (Πειραματική συνθήκη Β)	34
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	37
6. Βιβλιογραφία.....	40

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

EM: έμφραγμα του μυοκαρδίου

Υ/Ε: υποξία/επανοξυγόνωση

SM: εκκρίνωμα μετά από μηχανική φόρτιση (stretch media)

NSM: εκκρίνωμα χωρίς μηχανική φόρτιση (non stretch media)

PI: Ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide)

HIF-1: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 (hypoxia inducible factor-1)

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η επαναιμάτωση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (EM) μπορεί να επιδεινώσει τη βλάβη του καρδιακού ιστού και, έτσι, *in vitro* μοντέλα υποξίας/επανοξυγόνωσης (Y/E) έχουν αναπτυχθεί για την προσομοίωση της *in vivo* ιστικής βλάβης που προκαλείται από την ισχαιμία/επαναιμάτωση. Τα καρδιακά βλαστοκύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση του μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα, λόγω της πολυδυναμικότητάς και της παρακρινούς τους δράσης, ενώ είναι ενδιαφέρον ότι η μηχανική τους φόρτιση μπορεί να ρυθμίσει το εκκρίνωμά τους.

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξετάσει τις παρακρινείς δράσεις των καρδιομυοβλαστών σε βλάβη τους από Y/E, μέσω χορήγησης σε καρδιομυοβλάστες που έχουν υποστεί βλάβη, του μέσου καλλιέργειας (εκκρίνωματος) μηχανικά φορτισμένων ή μη φορτισμένων καρδιομυοβλαστών, *in vitro*.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιεργήθηκαν σε ελαστικές μεμβράνες και υποβλήθηκαν σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα μηχανικής φόρτισης, ενώ ακολούθως συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας (εκκρίνωμα) (stretch media-SM). Επίσης, συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας μη φορτισμένων καρδιομυοβλαστών (non-stretch media-NSM). Κατόπιν, καρδιομυοβλάστες υποβλήθηκαν σε βλάβη μέσω υποξίας/επανοξυγόνωσής τους και κατά τη διάρκεια της επανοξυγόνωσης τους χορηγήθηκε είτε SM είτε NSM. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης· στην πειραματική συνθήκη A οι καρδιομυοβλάστες υποβλήθηκαν σε 6 και 8 ώρες υποξίας και επανοξυγόνωσης, αντίστοιχα, ενώ στην πειραματική συνθήκη B υποβλήθηκαν σε 6 και 4 ώρες, αντίστοιχα. Αξιολογήθηκε η κυτταρική απόπτωση με κυτταρομετρία ροής (χρώση AnnexinV/PI) και με τη χημική διαδικασία ελέγχου της μεταβολικής κυτταρικής δραστηριότητας MTT. Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε μη παραμετρικό T-test και One-way ANOVA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Μετά την περίοδο υποξίας, το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν 98%, χωρίς να διαφέρει από την ομάδα ελέγχου-νορμοξίας ($p > 0.05$), ενώ μετά την επανοξυγόνωση (8h) το ποσοστό βιωσιμότητας μειώθηκε σημαντικά σε 50.6% ($p < 0.01$). Μετά την επίδραση με SM ή NSM, στην πειραματική συνθήκη A δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές ως προς την επιβίωση των καρδιομυοβλαστών. Αντίθετα, στη δεύτερη συνθήκη (B), το ποσοστό βιωσιμότητας

των κυττάρων αυξήθηκε, τόσο μετά την επίδραση με SM (92%) όσο και με NSM (80%), μη διαφέροντας σημαντικά από την ομάδα νορμοξίας ($p>0.05$). Επιπρόσθετα, στη συνθήκη Β, μόνο τα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με SM εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας ($p<0.05$) σε σχέση με τα κύτταρα της συνθήκης Υ/Ε που δεν έλαβαν καμία επίδραση και σημείωσαν ποσοστό βιωσιμότητας ίσο με 74%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι οι καρδιομυοβλάστες είναι ευαίσθητοι στη βλάβη από Υ/Ε εμφανίζοντας υψηλά ποσοστά απόπτωσης, ωστόσο το εκκρίνωμά τους δύναται να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η μηχανική φόρτιση των καρδιομυοβλαστών τροποποιεί το εκκρίνωμά τους, καθιστώντας το περισσότερο αποτελεσματικό ως προς την επιβίωση αυτών των κυττάρων.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Reperfusion after myocardial infarction (MI) can worsen cardiac tissue damage and in vitro models of hypoxia/reoxygenation (H/R) have been developed to simulate the in vivo tissue damage because of ischemia/reperfusion. Cardiac stem cells have been used for regeneration after MI due to their multipotency and paracrine actions in improving myocardial cell survival and function. Interestingly, mechanical loading of cardiomyoblasts may modulate their secretome.

PURPOSE: The aim of the study is to investigate the paracrine effects of cardiomyoblasts in H/R injury, by treating cardiomyoblasts that have been undergone H/R injury with the conditioned media (secretome) of mechanically loaded or unloaded cells, in vitro.

METHODS: H9C2 cardiomyoblasts were cultured on elastic membranes and underwent 2 different protocols of cyclic stretching and subsequently their conditioned media (secretome) was collected (stretch media, SM). Conditioned media of unstretched H9C2 was also collected (non-stretch media, NSM). H9C2 were subjected to hypoxia/reoxygenation injury while during reoxygenation, they were treated either with SM or NSM. Particularly, two conditions of hypoxia/reoxygenation were used: in the experimental condition A the cardiomyoblasts were subjected to 6 and 8 hours of hypoxia and reoxygenation respectively, while in the experimental condition B at 6 and 4 hours respectively. Cell apoptosis was assessed by flow cytometry (Annexin V/PI staining) and by the chemical process for monitoring cellular metabolic activity, MTT. Statistical analysis included non-parametric T-test and One-way ANOVA.

RESULTS: After the hypoxia period, the cell viability rate was 98%, without being significant different from the normoxia group ($p > 0.05$), while after reoxygenation (8h), the viability rate decreased significantly to 50.6% ($p < 0.01$). Following the treatment with the SM or the NSM, no statistical significant changes were observed in the experimental condition A. In contrast, in the second condition (B) the viability increased, both after the treatment with the SM (92%) and the NSM (80%), having no statistical significant differences from the normoxia group ($p > 0.05$). Additionally, in the condition B, only the cells which have been treated with the SM displayed a significantly higher viability ($p < 0.05$) compared with the cardiomyoblasts

that have undergone H/R injury without taking any treatment and had a 74% viability rate.

CONCLUSION: Our findings suggest that cardiomyocytes are susceptible to H/R injury, displaying high rates of cellular death while their secretome is able to inhibit their apoptosis. Moreover, the mechanical loading of cardiomyoblasts modifies their secretome by making it more effective for the survival of these cells.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν την πρώτη σε συχνότητα αιτία θανάτου παγκοσμίως ενώ το έμφραγμα του μυοκαρδίου (EM) είναι μία από τις πιο κοινές αιτίες που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια ή ακόμα και στο θάνατο (Nichols et al., 2014). Ως εκ τούτου, πλήθος ερευνητών μελετούν τις επιμέρους διαδικασίες του EM με σκοπό την ελαχιστοποίηση των δυσμενών εκβάσεων και την παροχή όσο το δυνατόν καλύτερης φροντίδας στους ασθενείς. Σε ένα εμφραγματικό ισχαιμικό επεισόδιο η αιματική ροή διακόπτεται και παράλληλα σταματά η παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών μέχρι την αποκατάστασή της. Βασισμένοι σε αυτή την απλή αρχή οι ερευνητές προσομοιάζουν την ιστική βλάβη του μυοκαρδίου *in vivo* με τη βλάβη που υπόκεινται τα κύτταρα σε πρωτόκολλα υποξίας/επανοξυγόνωσης (Y/E) *in vitro*.

Σε αυτό το πλαίσιο, εκτός από τις φαρμακευτικές παρεμβάσεις των ειδικών κατά τη φάση επανοξυγόνωσης, έχει ανοίξει την τελευταία δεκαετία ένα λαμπρό πεδίο έρευνας που ασχολείται με την αντιμετώπιση του EM, η κυτταρική θεραπεία. Διαφορετικά ήδη βλαστικών κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της επιβίωσης των καρδιομυοκυττάρων και διερευνούνται οι αποκρίσεις τους καθώς χωρίς μέχρι σήμερα δεν έχουμε σαφή και συνεπή αποτελέσματα.

1.1 Σημασία της έρευνας

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας θα επιχειρήσουν να περιγράψουν αφενός την ανοχή των καρδιοβλαστών στη βλάβη από Y/E και αφετέρου την αποκρισιμότητά τους στη χορήγηση κυτταρικού εκκρινώματος. Σκοπός της μελέτης είναι να εξετάσει τις παρακρινείς δράσεις των καρδιομυοβλαστών στη βλάβη λόγω Y/E, μέσω χορήγησης μέσω καλλιέργειας μηχανικά φορτισμένων ή μη φορτισμένων καρδιομυοβλαστών, *in vitro*.

1.2 Ορισμός του ερευνητικού προβλήματος

Στην μελέτη αυτή θα διερευνηθούν οι πιθανές επιδράσεις του εκκρινώματος των καρδιομυοβλαστών, με ή χωρίς μηχανική φόρτιση, σε αντίστοιχα κύτταρα που υπόκεινται σε βλάβη λόγω Y/E. Θα μελετηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων που θα υποστούν τη βλάβη, μετά την παρέμβαση-χορήγηση του εκκρινώματος κατά την επανοξυγόνωσή τους. Επίσης, θα διερευνηθούν πιθανές διαφορές στην απόκριση των καρδιομυοβλαστών που έλαβαν το εκκρίνωμα από φυσιολογικούς καρδιομυοβλάστες μετά από μηχανική τους φόρτιση ή χωρίς μηχανική φόρτιση.

1.3 Μεταβλητές

Ανεξάρτητη μεταβλητή: Η χορήγηση του εκκρινώματος των καρδιομυοβλαστών, με ή χωρίς μηχανική φόρτιση, κατά την επανοξυγόνωση των κυττάρων.

Εξαρτημένη μεταβλητή: Το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μετά τη βλάβη λόγω Y/E, όταν τους έχει χορηγηθεί υπερκείμενο μέσο καλλιέργειας.

1.4 Ερευνητικές υποθέσεις

1. Το μέγεθος της βλάβης θα είναι μικρότερο (μειωμένα ποσοστά απόπτωσης) μετά την επίδραση του εκκρινώματος κατά τη διάρκεια της φάσης επανοξυγόνωσης.
2. Η ομάδα που θα λάβει το υπερκείμενο μέσο από κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε μηχανική φόρτιση θα παρουσιάσει ακόμη μικρότερο βαθμό κυτταρικού θανάτου.

1.5 Οριοθετήσεις και περιορισμοί

Οριοθετήσεις-Περιορισμοί: Βασική οριοθέτηση αποτελεί η επιλογή της κυτταρικής σειράς καθώς τα αποτελέσματά μας αφορούν μόνο σε καρδιομυοβλάστες αρουραίου H9C2. Τα αποτελέσματα της μελέτης αφορούν σε αδιαφοροποίητα κύτταρα (μονοπύρηνους καρδιομυοβλάστες).. Επίσης, τα αποτελέσματά μας

αντανακλούν την επίδραση του συγκεκριμένου εκκρινώματος, στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο υποξίας / επανοξυγόνωσης (ειδικές πειραματικές συνθήκες της μελέτης). Περιορισμό αποτελεί η απουσία ελέγχου (επιβεβαίωσης) της συγκέντρωσης οξυγόνου (O₂) μέσα στον αεροστεγή θάλαμο καθ' όλη τη διάρκεια της χρήσης του.

2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Καρδιομυοβλάστες και καρδιομυοκύτταρα

Ο καρδιακός μυς αποτελεί έναν ιδιαίτερο τύπο μύος καθώς συνδυάζει χαρακτηριστικά τόσο των σκελετικών όσο και των λείων μυών. Το κύτταρο του καρδιακού μύος είναι οι μυϊκές ίνες κι επιτελούν το μηχανικό έργο της καρδιάς. Τα κυριότερα δομικά στοιχεία ενός μυοκαρδιακού κυττάρου είναι η κυτταρική μεμβράνη, το σαρκοπλασματικό δίκτυο και οι συσταλτές πρωτεΐνες, ενώ εμφανίζουν ένα ή δύο πυρήνες στο κέντρο τους. Επίσης, τα μυοκαρδιακά κύτταρα διαθέτουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, που καταλαμβάνουν περίπου το 35% του όγκου τους και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης η καρδιά αναπτύσσεται μέσω διαφοροποίησης πολυδύναμων προγονικών καρδιακών κυττάρων με υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα σε καρδιομυοκύτταρα και μέσω ελεγχόμενου τοπικού πολλαπλασιασμού των ήδη διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων. Αυτή είναι μία διαδικασία που απαιτεί τη στενή ρύθμιση εξωκυττάρων αυξητικών παραγόντων και την ενδοκυττάρια έκφραση μεταγραφικών παραγόντων (Kelly et al., 2014).

Για τη διερεύνηση των κυτταρικών και μοριακών απαντήσεων χρησιμοποιούνται ευρέως πρωτογενείς καλλιέργειες καρδιομυοκυττάρων, συνήθως από νεογνικές καρδιές αρουραίων, καθώς επίσης και εδραιωμένες κυτταρικές σειρές καρδιομυοκυττάρων. Οι πιο διαδεδομένες κυτταρικές σειρές είναι η HL-1 (Claycomb et al. 1998) που προέρχεται από κολπικούς όγκους ποντικού και η H9C2 (Kimes and Brandt 1976) που προέρχεται από τον κοιλιακό ιστό εμβρυϊκού αρουραίου (Watkins et al., 2011). Και οι δύο κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν πολλές από τις ιδιότητες του καρδιακού μύος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη διαφόρων παθολογιών του μυοκαρδίου. Όπως και οι σκελετικοί έτσι και οι καρδιακοί μυοβλάστες, ξεκινούν από μονοπύρηννα μυϊκά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται, καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας καλλιέργειας και με αλλαγή του θρεπτικού υλικού συγχωνεύονται και δημιουργούν πολυπύρηνους μυοσωληνίσκους (Zanou et al., 2013).

2.2 Υποξία

Ως υποξία ορίζεται ο περιορισμός ή η έλλειψη οξυγόνου στα όργανα, τους ιστούς ή τα κύτταρα. Η μείωση αυτή στην τάση του οξυγόνου μπορεί να οφείλεται αφενός σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και αφετέρου σε αυξημένη κατανάλωση σε σχέση με την παροχή. Τα προβλήματα αυτά στη συγκέντρωση οξυγόνου στους ιστούς και τα κύτταρα μπορεί να οφείλονται σε ποικίλους λόγους όπως η αναιμία, τα ανεπαρκή ή ελαττωματικά δίκτυα αιμοφόρων αγγείων και τα ξαφνικά υψηλά ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wu & Yotnda, 2011).

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων και κατ' επέκταση των ιστών και η επαρκής συγκέντρωση οξυγόνου στο εσωτερικό περιβάλλον διατηρείται με διάφορους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς (Wang et al, 2014). Η απόκριση των κυττάρων σε ανεπαρκή διαθεσιμότητα οξυγόνου έχει σημαντικό ιατρικό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να συμβεί φυσιολογικά σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα ή παθολογικά σε ισχαιμικούς τραυματισμούς και καρκινικούς όγκους (Gagner et al., 2018). Αν και κάθε κυτταρική ομάδα έχει διαφορετική ικανότητα προσαρμογής σε αυτή τη νέα κατάσταση, όλα τα κύτταρα μπορούν να ανιχνεύσουν την εξάντληση του οξυγόνου και να κινήσουν χαρακτηριστικές βιολογικές διεργασίες προκειμένου να προσαρμοστούν σε αυτό το νέο περιβάλλον (Wang et al, 2014, Wu & Yotnda, 2011).

Η ενεργοποίηση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα-1 (hypoxia inducible factor-1/ HIF-1) θεωρείται το πιο κρίσιμο γεγονός κατά την προσαρμογή στην υποξία καθώς αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ομοιόστασης κάτω από ένα υποξικό στρες. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης HIF είναι ένας ετεροδιμερής παράγοντας μεταγραφής που αποτελείται από μία ευαίσθητη στο οξυγόνο α -υπομονάδα και μία σταθερή απέναντι στο οξυγόνο β -υπομονάδα. Δηλαδή, ο HIF-1 α είναι ευαίσθητος στη συγκέντρωση οξυγόνου και κυριαρχεί στη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1, ενώ ο HIF-1 β εκφράζεται συνεχώς (Gladek et al, 2017).

Κατά τη νορμοξία, στα φυσιολογικά δηλαδή επίπεδα οξυγόνου, το οξυγόνο ελέγχει τον κύκλο εργασιών του HIF-1 α με μετα-μεταφραστικές διαδικασίες τροποποίησης που περιλαμβάνουν υδροξυλίωση, ουμπικουιλίνωση και πρωτεασωματική αποικοδόμηση. Αντίθετα, κατά την υποξία αναστέλλεται ο ρυθμός ανακύκλωσης του HIF-1 α , με αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό συσσώρευσης της

πρωτεΐνης, την μετατόπισή της στον πυρήνα και την αξιοσημείωτα ενισχυμένη μεταγραφική δραστηριότητα (Wang et al, 2014).

Στο επίπεδο των κυτταρικών καλλιέργειών *in vitro*, ως νορμοξία ορίζεται η καλλιέργεια των κυττάρων σε υγροποιημένα incubator με θερμοκρασία 37° C και συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) 5% v/v και οξυγόνου (O₂) 18,6% v/v. Το υπόλοιπο περίπου 76% του αέρα μέσα σε ένα incubator περιλαμβάνει κυρίως άζωτο (N₂). Για την επιβίωση των κυττάρων απαιτείται υγροποιημένο incubator κι όχι ξηρός αέρας καθώς διαφορετικά, το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων εξατμίζεται διακυβέοντας τις μεταβολικές τους διεργασίες λόγω μεταβολών στην οσμωτικότητα (Wenger et al., 2015).

2.3 Ιστική βλάβη λόγω ισχαιμίας/επαναιμάτωσης *in vivo*

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το καρδιαγγειακό σύστημα προμηθεύει τους ιστούς του σώματος με αίμα, το οποίο μεταφέρει οξυγόνο και ουσίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων. Ο περιορισμός της αιματικής κυκλοφορίας καταλήγει σε ισχαιμικό επεισόδιο το οποίο προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης οξυγόνου και αύξηση της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα.

Κατά τη διάρκεια ενός ισχαιμικού επεισοδίου ο καρδιακός ιστός υπόκειται σε βλάβη. Ένα σύνολο παραγόντων συνυπάρχουν και συντελούν στον θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων όπως η έλλειψη O₂, η οξέωση των ιστών, η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS), η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου, η εξάντληση του γλυκογόνου, οι μιτοχονδριακές βλάβες και οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Logue et al, 2005, Loor & Schumacker, 2008). Η χρονική διάρκεια της ισχαιμίας είναι ένας πολύ κρίσιμος παράγοντας που θα καθορίσει το μέγεθος της σχηματιζόμενης ιστικής βλάβης, καθώς μικρές περίοδοι ισχαιμίας είναι ανεκτές και δύναται να αντιμετωπισθούν με επιτυχία, ενώ μεγάλες περίοδοι χωρίς αιματική ροή και προμήθεια οξυγόνου καταλήγουν σε σημαντικό κυτταρικό θάνατο (Yellon & Hausenloy, 2007).

Στην κλινική πρακτική, η μοναδική θεραπεία απέναντι σε ένα ισχαιμικό επεισόδιο περιλαμβάνει την αποκατάσταση της αιματικής κυκλοφορίας. Παραδόξως, η επαναιμάτωση της ισχαιμικής περιοχής δυσχεραίνει ταυτόχρονα την ήδη υπάρχουσα ιστική βλάβη και πυροδοτεί την ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού

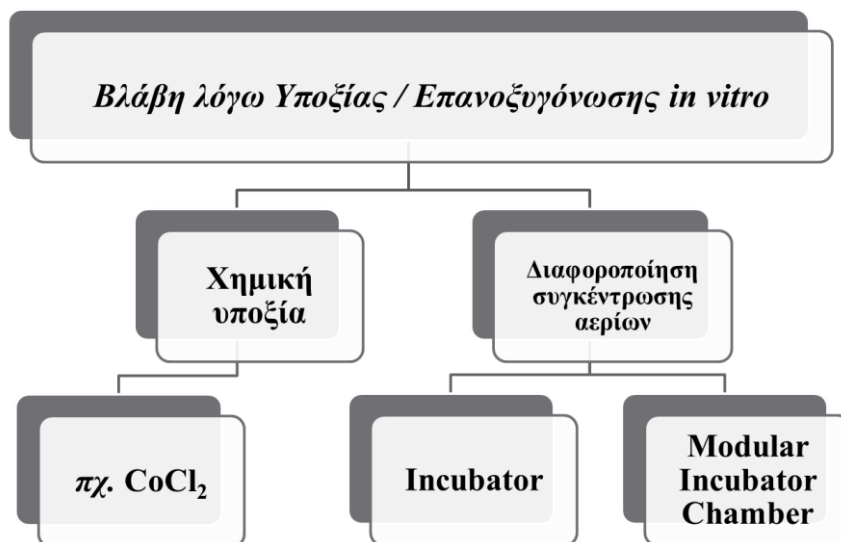
θανάτου (Loor & Schumacker, 2008). Το γεγονός αυτό οδήγησε στο σχηματισμό της έννοιας «βλάβη λόγω ισχαιμίας - επαναιμάτωσης» ως μία ακολουθία συμβάντων που συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο (Braunwald & Kloner, 1985). Η βλάβη του μυοκαρδίου λόγω ισχαιμίας - επαναιμάτωσης είναι μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε πολλά κλινικά σενάρια, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η καρδιακή ανακοπή, η διαδερμική επέμβαση στεφανιαίας αρτηρίας και η καρδιοχειρουργική επέμβαση. Το ενδιαφέρον τόσο των κλινικών ιατρών όσο και των ερευνητών που ασχολούνται με το μυοκάρδιο, παραμένει σταθερά στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη διακοπή της αιματικής ροής μέχρι την αποκατάστασή της στην ισχαιμική περιοχή. Είτε η κυκλοφορία αποκαθίσταται αυθόρμητα είτε ως αποτέλεσμα θεραπευτικών παρεμβάσεων, έχει αποδειχθεί ότι το διάστημα αυτό είναι κρίσιμο για τον περιορισμό του μεγέθους του εμφράγματος και τη διατήρηση της συστολικής λειτουργίας του μυοκαρδίου (He et al., 2017).

2.4 Κυτταρική βλάβη λόγω υποξίας/επανοξυγόνωσης in vitro

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν την 1η αιτία θανάτου όχι μόνο στην Ευρώπη αλλά και παγκοσμίως. Τα δεδομένα από την παγκόσμια μελέτη για την βαρύτητα των ασθενειών (Global Burden of Disease study – GBD) φανερώνουν πως το 29,6% όλων των θανάτων παγκοσμίως το 2010 (15.616,1 εκατομμύρια θάνατοι) οφείλονταν σε καρδιαγγειακά νοσήματα. Ο αριθμός αυτός είναι μεγαλύτερος από το σύνολο των θανάτων από μεταδοτικές, μητρικές, νεογνικές και διατροφικών διαταραχών ασθένειες και διπλάσιος από τον αριθμό των θανάτων που οφείλονταν στον καρκίνο (Nichols et al., 2014).

Όπως προαναφέρεται, η βλάβη λόγω ισχαιμίας – επαναιμάτωσης αποτελεί συστατικό στοιχείο πολλών κρίσιμων κλινικών σεναρίων που αφορούν στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Ως εκ τούτου, γεννήθηκε η ανάγκη για το σχεδιασμό ενός in vitro πρωτοκόλλου που να προσομοιάζει την in vivo βλάβη που υπόκειται ο καρδιακός μυς σε ένα ισχαιμικό επεισόδιο (ισχαιμία – επαναιμάτωση), προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα το φαινόμενο. Η in vitro αυτή προσομοίωση βασίζεται στη βλάβη που υπόκεινται τα μυοκαρδιακά κύτταρα λόγω υποξίας – επανοξυγόνωσης (Y/E), καθώς το οξυγόνο είναι το κύριο στοιχείο που στερούνται τα κύτταρα κατά τη διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας (Zhao et al., 2014, Borchì et al., 2009).

Για την επίτευξη της *in vitro* βλάβης λόγω υποξίας – επανοξυγόνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία 2 ομάδες πρωτοκόλλων: α) η πρώτη αφορά την επίτευξη της υποξίας με χημικό τρόπο και β) η δεύτερη βασίζεται στη διαφοροποίηση της συγκέντρωσης των αερίων (Σχήμα 1) (Wu & Yotnda, 2011).



Σχήμα 1: Μέθοδοι προσομοίωσης της βλάβης λόγω Υποξίας/Επανοξυγόνωσης *in vitro*

Για την επίτευξη της χημικής υποξίας αν κι έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες χημικές ουσίες η πιο διαδεδομένη είναι το διχλωριούχο κοβάλτιο (CoCl_2). Το διχλωριούχο κοβάλτιο είναι ένας χημικός επαγωγέας του υποξικού παράγοντα - 1, ο οποίος όταν προστίθεται στο θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων δημιουργεί ένα υποξικό περιβάλλον για αυτά. Στη συνέχεια, με την αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας τα κύτταρα μεταφέρονται ξανά σε νορμοξία προκαλώντας έτσι βλάβη λόγω υποξίας - επανοξυγόνωσης (Gagner et al., 2018).

Η διαφοροποίηση της συγκέντρωσης αερίων αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο πρόκλησης υποξίας. Όπως προαναφέρεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση O_2 στις κυτταρικές καλλιέργειες είναι περίπου 18,6% v/v. Ο περιορισμός της συγκέντρωσης του O_2 κάτω από 2% v/v, αποτελεί το κρίσιμο σημείο στο οποίο αρχίζει η υποξία. Έτσι λοιπόν, με την μεταφορά των ειδικών πιάτων καλλιέργειας είτε σε Υποξικό incubator είτε σε Modular incubator chamber μπορεί να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση O_2 (Σχήμα 1). Στη συνέχεια, η επαναφορά των πιάτων καλλιέργειας σε συνθήκες νορμοξίας οδηγεί στη βλάβη λόγω υποξίας –

επανοξυγόνωσης (Wenger et al., 2015, Wu & Yotnda, 2011). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται Υποξικό Incubator η ρύθμιση του O_2 από 0 έως 1% είναι αρκετή για τη δημιουργία υποξίας και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία (Wang et al., 2016, Du et al., 2015). Αντίστοιχα, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται Modular incubator chamber απαιτείται η πλήρωση του αεροστεγούς αυτού θαλάμου με κατάλληλο μείγμα αερίων ώστε να επιτευχθεί η υποξική συνθήκη (Zhao et al., 2014).

Ο χρόνος που τα κύτταρα θα παραμείνουν σε κάθε φάση (φάση υποξίας και φάση επανοξυγόνωσης) ποικίλει ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται καθώς επίσης και το βαθμό της βλάβης που θέλουμε να επιτύχουμε. Ορισμένα πρωτόκολλα που έχουν χρησιμοποιηθεί φαίνονται στον Πίνακα 1.

Ο χρόνος έκθεσης στην υποξία αρχίζει από τη στιγμή που θα κλείσει η πόρτα του incubator ή θα σφραγιστεί το modular incubator chamber. Ωστόσο, θα χρειαστούν αρκετά λεπτά έως αρκετές ώρες έως ότου η συγκέντρωση του O_2 στο θρεπτικό καλλιέργειας να προσεγγίσει την επιθυμητή τιμή, ακόμη και αν αλλάξει ακαριαία η σύνθεση του αέρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση του O_2 στην αέρια και την υγρή φάση δεν πρόκειται ποτέ να είναι η ίδια, ιδιαίτερα στην περίπτωση των κυττάρων που προσκολλούνται στα τρυβλία ή πιάτα καλλιέργειας. Αντίθετα, ακόμα κι ένα στιγμιαίο άνοιγμα της πόρτας ή μία πολύ μικρή διαρροή είναι ικανή να διαταράξει τις συγκεντρώσεις των αερίων και να καταστρέψει ένα υποξικό πείραμα (Wenger et al., 2015).

Paper	Cells	Method	Hypoxia (hrs)	Reoxygenation (hrs)	cell death (control)
Zhang et al. 2014	H9C2	Incubator	6h	8h	78% (b-galact)
Zhao et al. 2014	H9C2	Chamber	2h	2h	11% (PI)
Borchi et al. 2009	H9C2	Chamber	24h	1h	26% (trypan)
Chen et al. 2016	H9C2	Incubator	5h	4h	32% (PI)
Wang X et al. 2016	H9C2	Incubator	4h	24h	50% (MTT)
Wang X et al. 2014	H9C2	Incubator	2h	24h	50% (MTT)
Wang D et al. 2011	H9C2	Incubator	6h	8h	75% (b-galact)
Wang H et al. 2017	H9C2	Incubator	2h	1h	80% (active caspase 3-IF)
Paillard et al. 2013	H9C2	Incubator	3h	2h	50% (PI)
Paillard et al. 2013	Prim. Culture	Incubator	45min	2h	50% (PI)
Malliopoulou et al. 2006	H9C2	Incubator	8h	8h	38,16% (PI)
Rajendran et al. 2015	CDCs	Incubator	2h	6h	6% (Annexin V/PI)
Jiang et al. 2017	H9C2	Chamber	6h	12h	60% (CCK8 reagent)
Dong et al. 2016	H9C2	Chamber	3h	3h	55% (MTT)
Yu et al. 2016	Prim. Culture	Chamber	3h	3h	48% (Tunel)
He et al. 2018	H9C2	Incubator	8h	4h	62% (MTT)

Πίνακας 1: Πρωτόκολλα επίτευξης βλάβης λόγω Υποξίας/Επανοξυγόνωσης σε καρδιομυοβλάστες, *in vitro*

2.5 Κυτταρική Θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Σε ολόκληρο τον κόσμο, βασικοί και κλινικοί ερευνητές εργάζονται ώστε να είναι οι πρώτοι που θα εισάγουν νέες προσεγγίσεις για την αναγέννηση του καρδιακού ιστού και θα αποδείξουν τις επιδράσεις των κυτταρικών θεραπειών σε ασθενείς με καρδιακές παθήσεις (Garbern & Lee, 2013). Τα ώριμα καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από το μυοκάρδιο θηλαστικών θεωρούνται μετα-μιτωτικά, αυτό συνεπάγεται με το ότι δεν μπορούν να υποβληθούν σε μεταγεννητική κυτταρική διαίρεση. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία, μελέτες στον άνθρωπο αποκάλυψαν έναν περιορισμένο αλλά σημαντικό ρυθμό ετήσιας ανανέωσης των καρδιομυοκυττάρων (Bergmann et al., 2015). Παρόλ' αυτά, μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι αυτός ο ρυθμός ανανέωσης δεν θα είναι ποτέ ικανός να αντικαταστήσει τον μεγάλο αριθμό καρδιομυοκυττάρων που χάνονται μετά από καρδιακούς τραυματισμούς όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου (Gunthel et al., 2018).

Τα τελευταία 15 χρόνια η κυτταρική θεραπεία βρίσκεται στο προσκήνιο εισάγοντας την μεταμόσχευση κυττάρων, με σκοπό την αύξηση του αριθμού των

συσταλτών καρδιομυοκυττάρων και τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μετά από 2 γενιές κλινικών δοκιμών, τα αποτελέσματα είναι μεικτά εξαιτίας κυρίως την ετερογένειας των πρωτοκόλλων απομόνωσης, καλλιέργειας και χορήγησης των βλαστοκυττάρων. Συγκεντρωτικά, αντιμετωπίζουμε δύο βασικά θέματα: χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης των μεταμοσχευθέντων κυττάρων μετά από ενδοκοιλιακή παροχή και περιορισμένη επιβίωση κυττάρων μετά από ενδομυοκαρδιακή ένεση (Gunthel et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, ερευνητικά δεδομένα φανερώνουν ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα από μυελό των οστών μπορούν να παράγουν καρδιομυοκύτταρα σε μικρή συχνότητα αλλά μόνο μέσω κυτταρικής σύντηξης κι όχι μέσω διαφοροποίησης, μετά από μεταμόσχευση σε καρδιές ποντικών έπειτα από έμφραγμα (Nygren et al., 2004). Επιπλέον, τα θετικά οφέλη που παρατηρούνται ως προς την καρδιακή λειτουργία μετά τη μεταμόσχευση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε μοντέλα τρωκτικών φαίνεται να είναι ανεξάρτητα από την διαφοροποίησή τους σε καρδιομυοκύτταρα καθώς στρέφονται σύντομα προς τον κυτταρικό θάνατο (Martin et al., 2005). Τέλος, οι σκελετικοί μυοβλάστες φαίνεται ότι δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα ούτε αγγειακά κύτταρα (Menasché, 2008). Ως εκ τούτου συμπεραίνουμε πως καμία από τις τώρα πηγές ενήλικων βλαστοκυττάρων που έχουν διερευνηθεί δεν έχει αποδειχθεί ότι δύναται να επιβιώσουν μακροπρόθεσμα μετά τη μετεμφύτευση και να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά καρδιομυοκύτταρα (Gunthel et al., 2018, Perez-Izarbe et al., 2008).

Παράλληλα, ένα μεγάλο πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά τη μεταμόσχευση δεν οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των συσταλτών κυττάρων αλλά στην παρακρινή δράση εκείνων που έχουν μεταμοσχευθεί (Wollert & Dexler, 2010). Οι Zhang et al. σε έρευνά τους χρησιμοποίησαν το υπερκείμενο υγρό από την καλλιέργεια των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) κι ανέστειλαν τον κυτταρικό θάνατο των καρδιομυοβλαστών H9C2 που υπέστη βλάβη λόγω Y/E (Zhang et al., 2014). Η επιλογή της χορήγησης του εκκρινόμενου υπερκείμενου υγρού των κυττάρων στηρίχθηκε σε προηγούμενες μελέτες όπου η μετεμφύτευση αδιαφοροποίητων iPSCs σε μυοκάρδιο αρουραίων μετά από έμφραγμα είχε οδηγήσει στη δημιουργία όγκων (Ahmed et al., 2011, Zhang et al., 2011). Οι πιθανές δράσεις των εκκρινόμενων παραγόντων περιλαμβάνουν προστασία του μυοκαρδίου, νεοαγγείωση, διαμόρφωση φλεγμονωδών και ινωδογόνων διεργασιών, ενίσχυση καρδιακού μεταβολισμού και

συσταλτικότητα, αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρδιομυοκυττάρων και ενεργοποίηση των μόνιμων στελεχιαίων και προγονικών κυττάρων (Wollert & Dexler, 2010).

Οι τρέχουσες στρατηγικές θεραπείας για το έμφραγμα του μυοκαρδίου ανεξάρτητα από το είδος της θεραπείας της οποίας πραγματεύονται, επικεντρώνονται στην κατάλληλη χρονική παρέμβαση. Με την έλευση της επαναιμάτωσης, πυροδοτείται οξεία φλεγμονώδης απόκριση με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και την επιδιόρθωση της βλάβης. Πρόκειται όμως για έναν πολύπλοκο μηχανισμό καθώς ταυτόχρονα προκαλεί περαιτέρω τραυματισμό και επιδεινώνει την ήδη υπάρχουσα ιστική βλάβη. Κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης διαδραματίζει το φλεγμονόσωμα NLRP3, ένα μακρομοριακό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα αναπόσπαστο κομμάτι του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Μελετώντας τα αποτελέσματα των πρώτων κλινικών δοκιμών που αφορούν στους αναστολείς φλεγμονοσώματος παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση αναστολέα 60 λεπτά μετά την επαναιμάτωση είχε θετική έκβαση, ενώ η χορήγηση αναστολέα 3 ώρες μετά την επαναιμάτωση δεν επέφερε ευεργετικά αποτελέσματα. Ο χρόνος που προηγείται της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος αποτελεί θεραπευτικό «παράθυρο» για παρέμβαση με αναστολείς του NLRP3 ώστε να επιτύχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Οι ερευνητές καταλήγουν πως δεν πρέπει να μονοπωλεί το ερευνητικό μας ενδιαφέρον το είδος της θεραπείας για την αντιμετώπιση του εμφράγματος και πως απαιτείται να στρέψουμε την προσοχή μας και στην κατάλληλη χρονική στιγμή παρέμβασης (Toldo & Abbate, 2018).

2.6 Εκκρίνωμα μυοβλαστών σκελετικού και καρδιακού μυός

Γνωρίζουμε πως τόσο ο σκελετικός όσο και ο καρδιακός μυς αποτελεί ενδοκρινές όργανο κι αρκετές μυοκίνες ή καρδιοκίνες έχουν συνδεθεί με καρδιαγγειακές προστατευτικές δράσεις. Επιπρόσθετα, η μυϊκή συστολή αποτελεί εξαιρετικό ερέθισμα για την έκκριση αυτών των παραγόντων που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων κι οργάνων (Ouchi et al., 2016)

Όπως όλα τα βλαστικά κύτταρα έτσι και οι καρδιακοί και σκελετικοί μυοβλάστες εκκρίνουν ισχυρούς συνδυασμούς κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, ενζύμων, γενετικού υλικού, μικροκυστιδίων και εξωσωμάτων τα οποία

βοηθούν στην επιδιόρθωση και αναγέννηση του μυοκαρδίου (Ellison-Hughes & Madeddu, 2017). Η έκκριση των βιοδραστικών αυτών μεσολαβητών επηρεάζει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με το μικροπεριβάλλον ρυθμίζοντας την ομοιόσταση των ιστών και τις διαδικασίες επούλωσης (Li et al., 2014).

Πρωτεομική ανάλυση στο υπερκείμενο καλλιέργειας των μυοβλαστών C2C12 ανέδειξε ένα σύνολο 635 εκκρινόμενων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων 35 αυξητικών παραγόντων, 40 κυτταροκινών και 36 μεταλλοπεπτιδασών (Henningsen et al., 2010). Όμοια, πρωτεομική ανάλυση στο υπερκείμενο μέσο πρωτογενούς καλλιέργειας μυοβλαστών έπειτα από ένα πρωτόκολλο μιμητικής της άσκησης (EPS-24h) *in vitro* ανέδειξε 183 υποψήφιες μυοκίνες (Scheler et al., 2013).

Σε αντίθεση με τους σκελετικούς μυοβλάστες, το εκκρίνωμα των καρδιομυοβλαστών έχει διερευνηθεί σε πολύ μικρότερη έκταση. Πρωτεομική ανάλυση στο υπερκείμενο καλλιέργειας καρδιομυοβλαστών H9C2 ανέδειξε ένα σύνολο 2.000 πρωτεϊνών, από τις οποίες οι 860 είναι αναγνωρισμένες (Li et al., 2014). Οι ερευνητές διερεύνησαν το εκκρίνωμα των καρδιομυοβλαστών σε νορμοξία, υποξία και έπειτα από βλάβη λόγω υποξίας/επανοξυγόνωσης. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η εκκριτική απόκριση των καρδιομυοβλαστών στην υποξία σχετίζεται με την αγγειογένεση και τη φλεγμονή, ενώ αντιθέτως, η επακόλουθη επανοξυγόνωση συνδέεται με την καταστολή της φλεγμονής, την απόπτωση και την αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου υγρού (Li et al., 2014).

Τέλος, πρόσφατες μελέτες ασχολήθηκαν με τον πιθανό προστατευτικό ρόλο γνωστών μυοκινών και καρδιοκινών όπως η ιρισίνη, η φολλιστατίνη και η ιντερλευκίνη-6 απέναντι στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Τα αποτελέσματα των ερευνών φανερώνουν πως η φολλιστατίνη είναι ένας πιθανός μεσολαβητής της επαγόμενης από την άσκηση καρδιοπροστασίας σε αρουραίους μετά από OEM καθώς προάγει την αγγειογένεση και την γενικότερη λειτουργική ικανότητα (Xi et al., 2016). Επίσης, η χορήγηση ιρισίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* επέφερε προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στο OEM περιορίζοντας το ποσοστό κυτταρικής απόπτωσης και το μέγεθος της ιστικής βλάβης αντίστοιχα (Wang et al., 2017). Όμοια, η άσκηση αποτρέπει τις αρρυθμίες και περιορίζει τη νέκρωση του μυοκαρδίου μετά από OEM, μέσω της δράσης της ιντερλευκίνης-6 (McGinnis et al., 2015).

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιεργήθηκαν σε ελαστικές μεμβράνες και υποβλήθηκαν σε μηχανική φόρτιση ενώ ακολούθως συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας (εκκρίνωμα) των κυττάρων (stretch media-SM). Επίσης, συλλέχθηκε το μέσο καλλιέργειας και από μη φορτισμένους καρδιομυοβλάστες (non stretch media-NSM). Κατόπιν, τρεις ομάδες καρδιομυοβλαστών υποβλήθηκαν σε βλάβη μέσω υποξίας / επανοξυγόνωσης. Στην πειραματική συνθήκη A τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας που ακολουθήθηκαν από 8 ώρες επανοξυγόνωσης και στην πειραματική συνθήκη B σε 6 σε 6 ώρες υποξίας και 4 ώρες επανοξυγόνωσης. Η μία ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου ενώ στις υπόλοιπες δύο, κατά τη διάρκεια της επανοξυγόνωσης, τους χορηγήθηκε το SM και το NSM αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επανοξυγόνωσης, αξιολογήθηκε η κυτταρική απόπτωση με κυτταρομετρία ροής (χρώση Annexin V/PI) και με την τεχνική μεταβολικής κυτταρικής δραστηριότητας MTT.

3.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Για τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά καρδιομυοβλαστών H9C2 (passage 20-26) η οποία προμηθεύτηκε από την American Type Culture Collection (ATCC). Πρόκειται για έναν υποκλώνο της αρχικής κυτταρικής σειράς που προέρχεται από τον εμβρυϊκό καρδιακό ιστό αρουραίου BD1X από τους B. Kimes και B. Brandt και παρουσιάζει πολλές από τις ιδιότητες των σκελετικών μυών. Τα κύτταρα αυτά προσκολλούνται στα πιάτα καλλιέργειας κι έχουν τη δυνατότητα να συγχωνευτούν και να δημιουργήσουν πολυπύρηνους μυοσωληνίσκους με την αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας (Kimes & Brandt, 1976).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας 25 και 75 cm² σύμφωνα με τις συστάσεις της ATCC. Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό καλλιέργειας DMEM (high glucose) με επιπρόσθετο 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1%

αντιβιοτικό πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι το 70% confluency, παρέμειναν αδιαφοροποίητα και μετά διαιρούνταν με αναλογία 1:2.

3.3 Μηχανική φόρτιση

Για την πραγματοποίηση της μηχανικής φόρτισης οι καρδιομυοβλάστες καλλιεργήθηκαν μέχρι το 90% confluency σε ειδικά πιάτα καλλιέργειας (6-well plate) με επιφάνεια κολλαγόνου. Για τη μηχανική φόρτιση χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα FX-5000 - Flexcell International (Εικόνα 1) , το οποίο παρέχει δισδιάστατη ισοαξονική διάταση στην ελαστική μεμβράνη των πιάτων καλλιέργειας. Το σύστημα φέρει μηχανισμό βαλβίδας που αυτόματα ρυθμίζει και διατηρεί την πίεση, ώστε να παράσχει την προκαθορισμένη διάταση. Καθ' όλη τη διάρκεια της μηχανικής φόρτισης τα πιάτα καλλιέργειας βρίσκονταν σε υγροποιημένο συμβατικό incubator κάτω από συνθήκες νορμοξίας με θερμοκρασία 37°C. Τα πρωτόκολλα μηχανικής φόρτισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πειραματική συνθήκη A: επιμήκυνση 2,2 %, συχνότητα 0,25 Hz, διάρκεια 12 ώρες.

Πειραματική συνθήκη B: επιμήκυνση 12 %, συχνότητα 0,25 Hz, διάρκεια 12 ώρες.



Εικόνα 1: Flexcell® FX-5000™ Tension System. Βιοαντιδραστήρας που ρυθμίζεται από υπολογιστή και χρησιμοποιεί πίεση κενού για την εφαρμογή κυκλικής ή στατικής επιμήκυνσης σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε επιφάνειες καλλιέργειας με εύκαμπτο πυθμένα.

3.4 Συλλογή και φύλαξη υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας

Μετά το πέρας της μηχανικής φόρτισης τα κύτταρα παρέμειναν στα πιάτα καλλιέργειας για ακόμη 12 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας. Στη συνέχεια συλλέγονταν το μέσο καλλιέργειας σε αποστειρωμένες συνθήκες και αφού φιλτράρονταν με τη βοήθεια σύριγγας από φίλτρο (0.22- μm cellulose syringe filter) φυλάσσονταν κατευθείαν στους -80°C . Προκειμένου να γίνει η χορήγηση του μέσου καλλιέργειας εκείνο ξεπάγωνε σε υδατόλουτρο στους 37°C .

3.5 Κυτταρική βλάβη λόγω υποξίας/επαναοξυγόνωσης in vitro

Για την επίτευξη της βλάβης λόγω Y/E χρησιμοποιήθηκε ο αεροστεγής θάλαμος MIC-101, Modular Incubator Chamber από την Billups-Rothenberg Inc (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Modular Chamber Incubator (MIC-101), Billups-Rothenberg. Η αξιόπιστη αεροστεγή σφράγιση και οι γρήγορες ιδιότητες ανταλλαγής αερίων του θαλάμου, επιτρέπουν την ταχεία δημιουργία ενός μη-μεταβαλλόμενου υποξικού περιβάλλοντος.

Καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας (96well και 6well) μέχρι το 80% confluency και τοποθετήθηκαν μέσα στον αεροστεγή θάλαμο για 6 ώρες. Η πλήρωση του θαλάμου έγινε με μείγμα αερίων 95% N_2 και 5% CO_2 , με ταχύτητα ροής 20 λίτρα/λεπτό για 10 λεπτά, σύμφωνα με τις συστάσεις της εταιρείας για την επίτευξη υποξίας. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, η ταχύτητα ροής μειώθηκε στα 5 λίτρα/λεπτό και παρέμεινε σταθερή για 5 ώρες και 50 λεπτά. Για τη ρύθμιση

της ταχύτητας ροής του αέρα χρησιμοποιήθηκε αναλογικό ροόμετρο από την Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της υποξίας το θρεπτικό καλλιέργειας άλλαξε σε DMEM χωρίς ορό, γλυκόζη, γλουταμίνη και πυροσταφυλικό νάτριο, προκειμένου να γίνει προσομοίωση του εξωκυττάριου υγρού κατά την ισχαιμία – υποξία. Τέλος, μέσα στον αεροστεγή θάλαμο, κάτω από τον δίσκο, τοποθετήθηκε ένα τρυβλίο με 10ml απεσταγμένο νερό ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική εξάτμιση των καλλιεργειών και ο θάλαμος τοποθετήθηκε στους 37°C για 6 ώρες.

Μετά την επίδραση της υποξίας ξεκινά η δεύτερη φάση της βλάβης, η φάση της επανοξυγόνωσης. Σε αυτή τη φάση οι κυτταροκαλλιέργειες, έπειτα από αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας, επανατοποθετήθηκαν σε συμβατικό incubator νορμοξίας για 8 και 4 ώρες στα πειράματα A και B αντίστοιχα. Για την πειραματική συνθήκη A η ομάδα ελέγχου έλαβε πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας DMEM ενώ στις άλλες δύο ομάδες χορηγήθηκε SM και NSM αντίστοιχα. Για την πειραματική συνθήκη B η ομάδα ελέγχου έλαβε επίσης πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας DMEM ενώ στις άλλες δύο ομάδες χορηγήθηκε SM και NSM αντίστοιχα, σε αναλογία 1:1 με πλήρες DMEM.

3.6 Ποσοτικές αναλύσεις αξιολόγησης της βιωσιμότητας των κυττάρων

3.6.1 Κυτταρομετρία ροής (Annexin V/PI)

Καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας (6well) μέχρι το 90% confluency προκειμένου ν' αξιολογηθεί η απόπτωση μέσω κυτταρομετρίας ροής (kit Annexin V-FITC, Trevigen, Gaithersburg, MD). Οι διαταραχές στην κυτταρική μεμβράνη εμφανίζονται κατά τα αρχικά στάδια της απόπτωσης και οδηγούν σε ανακατανομή της φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα επισημάνθηκαν με την Αννεξίνη A5 ή διαφορετικά Annexin V, η οποία δεσμεύεται επιλεκτικά στη φωσφατιδυλσερίνη και ταυτοποιεί τα κύτταρα που στρέφονται σε απόπτωση. Τα κύτταρα επίσης επισημάνθηκαν με ιωδιούχο προπιδίο (Propidium Iodide – PI) προς διάκριση των κυττάρων πρόωμης απόπτωσης από τα νεκρωτικά ή τελικής απόπτωσης κύτταρα. Για κάθε δείγμα, συλλέχθηκαν δέκα χιλιάδες συμβάντα με το κυτταρόμετρο ροής Cyflow ML (Partec) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Flowmax software 2.56

(Partec) και κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 υπο-πληθυσμούς: ζωντανά κύτταρα (αρνητικά τόσο στην αννεξίνη όσο και στο ιωδιούχο προπίδιο), πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (θετικά στην αννεξίνη και αρνητικά στο ιωδιούχο προπίδιο) και νεκρωτικά κύτταρα (θετικά τόσο στην αννεξίνη όσο και στο ιωδιούχο προπίδιο).

3.6.2 MTT assay

Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας ή αλλιώς της τοξικότητας των κυττάρων διεξήχθη η χημική δοκιμασία MTT (3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο βρωμίδιο). Οι καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας (96well) μέχρι το 80% confluency και με πυκνότητα ≈ 75.000 κύτταρα/well ενώ παρέμειναν στην καλλιέργεια για 48 ώρες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου. Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου αφαιρείται το θρεπτικό καλλιέργειας και προστίθεται διάλυμα MTT σε τελική συγκέντρωση 5 mg/ml και αναλογία 1:10 με το νέο θρεπτικό καλλιέργειας. Τα κύτταρα επιάζονται για 4 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια αφαιρείται το MTT με το μέσο καλλιέργειας. Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται 200 μ L διαλύματος 4% HCl σε ισοπροπανόλη ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Η απορρόφηση διαβάστηκε χρησιμοποιώντας VersaMax microplate reader στα 570 nm

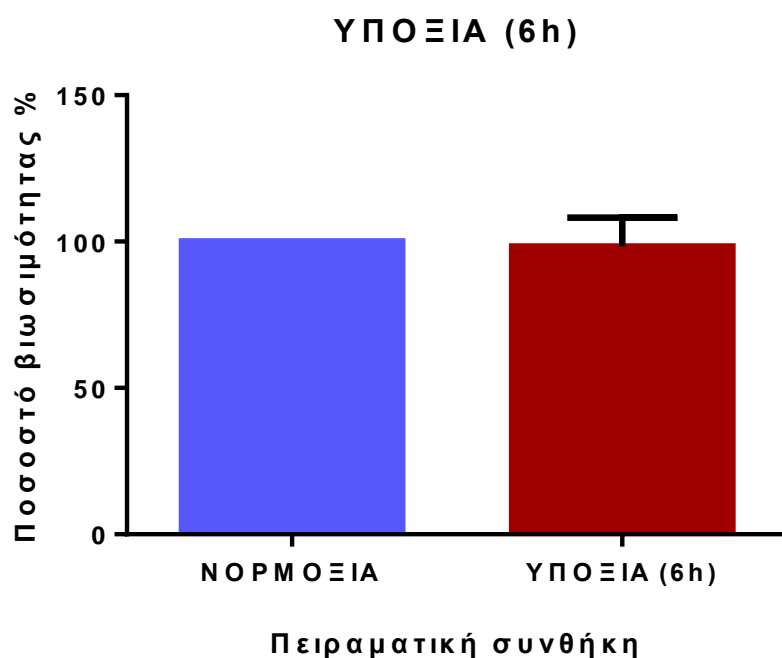
3.7 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση στις μετρούμενες παραμέτρους έγινε με μη παραμετρικό T-test και ανάλυση διασποράς μονής κατεύθυνσης ANOVA. Όπου βρέθηκαν αλληλεπιδράσεις τιμών στην ANOVA, εφαρμόστηκε Tukey post hoc test όπου συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως εξής: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το GraphPad Prism. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν για $n=3$ έως $n=6$ φορές. Οι τιμές παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπική απόκλιση.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

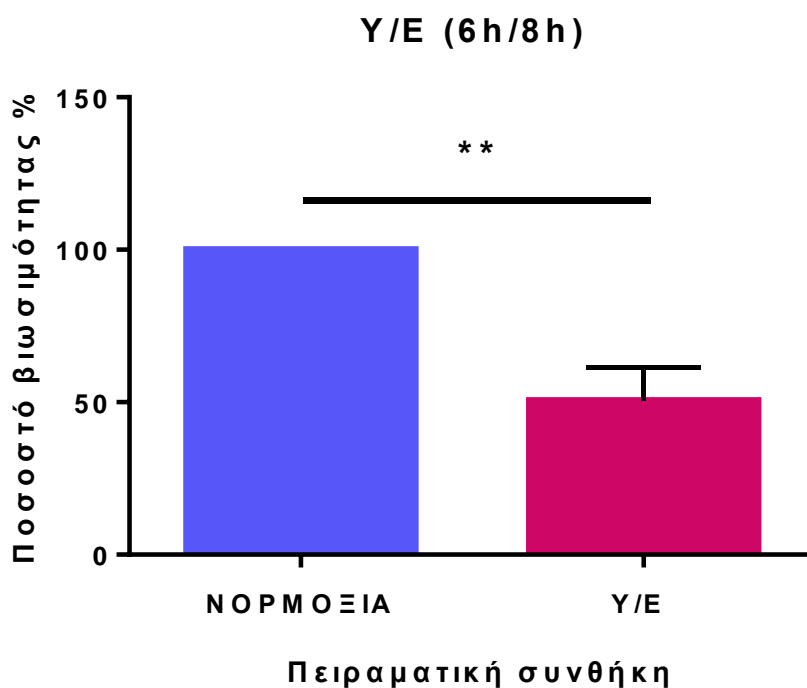
4.1 Πιστοποίηση βλάβης λόγω υποξίας/επανοξυγόνωσης

Καρδιομυοβλάστες H9C2 υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας κι αξιολογήθηκε η κυτταρική απόπτωση με τη χημική δοκιμασία MTT. Μετά το πέρας της υποξίας το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν $98\pm 9\%$, μη σημειώνοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου που δεν υπέστη καμία παρέμβαση και παρέμεινε σε νορμοξία ($p > 0.05$; Γράφημα 1Α).



Γράφημα 1Α: Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων μετά από 6 ώρες υποξίας (6h) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (νορμοξία), ($n=5$, $p > 0.05$)

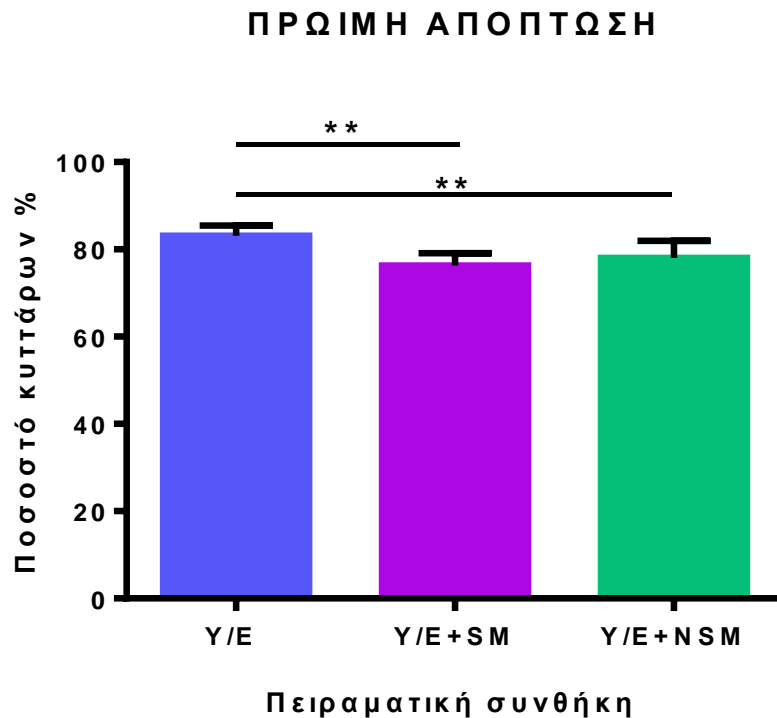
Επιπλέον, καρδιομυοβλάστες H9C2 υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας που ακολουθήθηκαν από 8 ώρες επανοξυγόνωσης. Κατόπιν, το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά σε $50.6 \pm 9.7\%$ όπως μετρήθηκε με τη χημική δοκιμασία MTT, συγκριτικά με την ομάδα νορμοξίας ($p < 0,01$; Γράφημα 1B)



*Γράφημα 1B: Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων μετά από βλάβη λόγω Υ/Ε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (νορμοξία), (n=5, Επίπεδο σημαντικότητας: ** $p < 0,01$)*

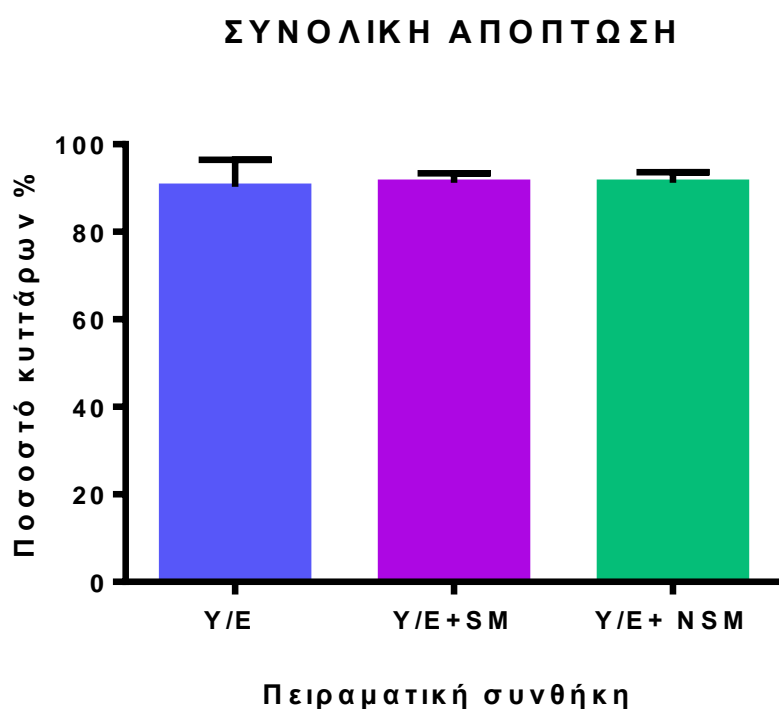
4.2 Βιωσιμότητα κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας (Πειραματική συνθήκη A)

Καρδιομυοβλάστες H9C2 καλλιεργήθηκαν σε 6well και υπέστη 6 ώρες υποξίας που ακολουθήθηκαν από 8 ώρες επανοξυγόνωσης. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 2A, το ποσοστό των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων στην ομάδα ελέγχου έφτασε το $83.14 \pm 2.09\%$, όπως διαπιστώθηκε με κυτταρομετρία ροής. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε σημαντικά στις ομάδες που έλαβαν το υπερκείμενο μέσο καλλιέργειας SM και NSM σε $77.07 \pm 2.59\%$ και $77.09 \pm 3.57\%$ αντίστοιχα ($p < 0.01$).



*Γράφημα 2A: Ποσοστό κυττάρων σε φάση πρώιμης απόπτωσης μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου φορτισθέντων μηχανικά (SM) ή μη φορτισθέντων (NSM) καρδιομυοβλαστών σε σύγκριση με τα μη υποβληθέντα σε επίδραση με υπερκείμενο μέσο κύτταρα (Y/E), μετά από βλάβη λόγω Y/E (n=6, Επίπεδο σημαντικότητας: ** $p < 0,01$)*

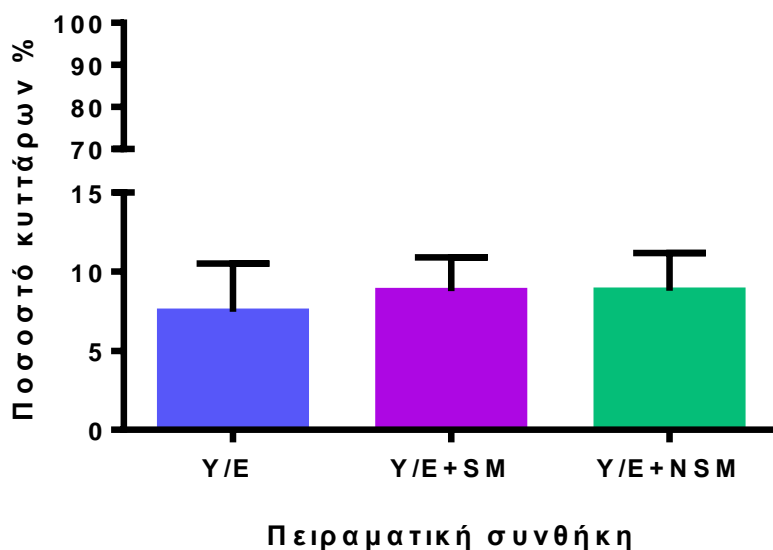
Το ποσοστό του συνολικού αριθμού αποπτωτικών κυττάρων, που περιλαμβάνει δηλαδή το άθροισμα των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πρώιμης και τελικής απόπτωσης, διαπιστώθηκε ως εξής: $93.08 \pm 5.64\%$ στην ομάδα ελέγχου, $92.03 \pm 1.95\%$ στην ομάδα που έλαβε το SM και $90.25 \pm 2.17\%$ στην ομάδα που έλαβε το NSM. Ωστόσο, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των τριών ομάδων όσο και μεταξύ των ομάδων που έλαβαν το υπερκείμενο μέσο SM και NSM ($p > 0.05$; Γράφημα 2B).



Γράφημα 2B: Ποσοστό κυττάρων σε φάση πρώιμης και τελικής απόπτωσης (συνολική απόπτωση) μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου φορτισθέντων μηχανικά (SM) ή μη φορτισθέντων (NSM) καρδιομυοβλαστών σε σύγκριση με τα μη υποβληθέντα σε επίδραση με υπερκείμενο μέσο κύτταρα (Y/E), μετά από βλάβη λόγω Y/E ($n=6$, $p > 0,05$)

Το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων παρουσίασε μια αυξητική τάση από $7.47 \pm 2,72\%$ στην ομάδα ελέγχου, σε $8.94 \pm 1,80\%$ και $9.24 \pm 2,11\%$ στις συνθήκες που έλαβαν το SM και το NSM αντίστοιχα. Εντούτοις, δεν διαπιστώθηκε στατιστική σημαντικότητα. ($p > 0.05$; Γράφημα 2Γ).

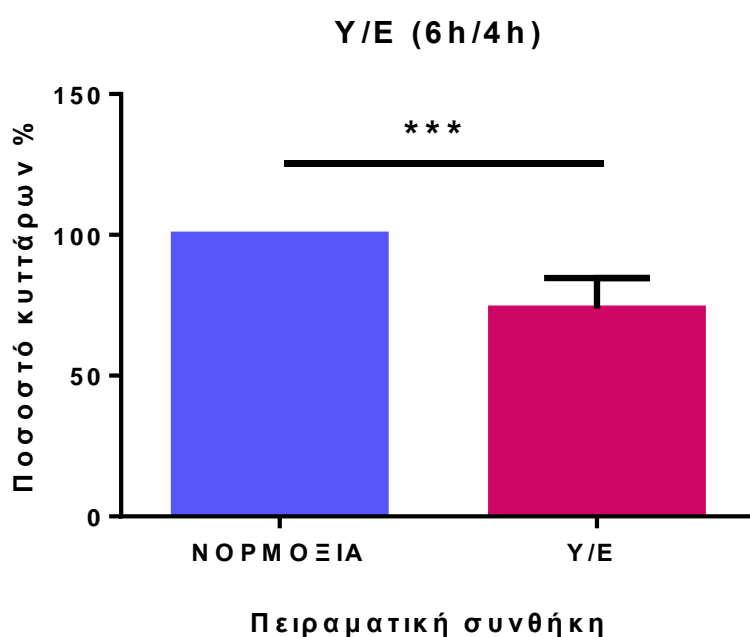
Ε Π Ι Β Ι Ω Σ Η



Γράφημα 2Γ: Ποσοστό ζωντανών κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου φορτισθέντων μηχανικά (SM) ή μη φορτισθέντων (NSM) καρδιομυοβλαστών σε σύγκριση με τα μη υποβληθέντα σε επίδραση με υπερκείμενο μέσο κύτταρα (Y/E), μετά από βλάβη λόγω Y/E (n=6, Επίπεδο σημαντικότητας: $p > 0,05$)

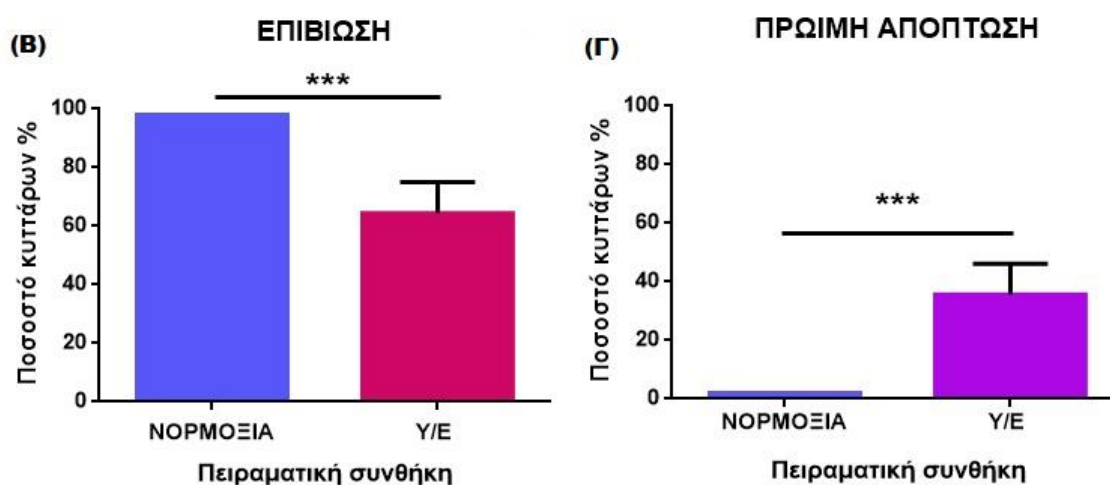
4.3 Βιωσιμότητα κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας (Πειραματική συνθήκη Β)

Καρδιομυοβλάστες H9C2 υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας που ακολουθήθηκαν από 4 ώρες επανοξυγόνωσης. Το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την Y/E ήταν $74 \pm 10\%$, όπως αξιολογήθηκε με τη χημική δοκιμασία MTT σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που δεν υπέστη καμία παρέμβαση ($p < 0.001$; Γράφημα 3Α).



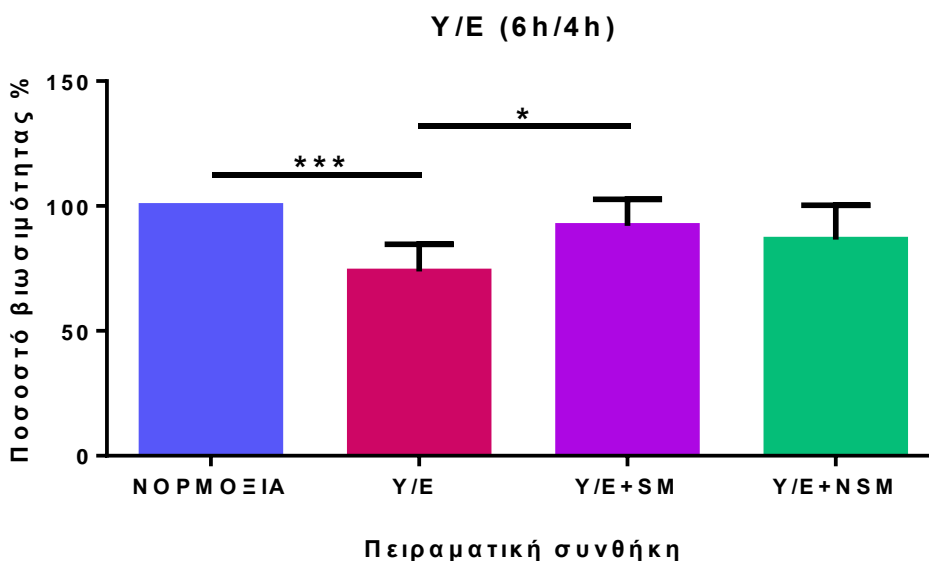
*Γράφημα 3Α: Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων μετά από βλάβη λόγω Y/E σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (νορμοξία) (n=6, Επίπεδο σημαντικότητας: *** $p < 0,001$)*

Επιπρόσθετα, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μετά την Υ/Ε ήταν $64\pm 9\%$, έναντι του 98% της ομάδας ελέγχου όπως μετρήθηκε με την κυτταρομετρία ροής ($p < 0,001$; Γράφημα 3B). Το υπόλοιπο $36\pm 9\%$ των καρδιομυοβλαστών μετά την Υ/Ε ανήκει στη φάση πρώιμης απόπτωσης, καθώς δεν εντοπίστηκαν νεκρωτικά κύτταρα σε κανέναν από τους δύο πληθυσμούς κυττάρων (Γράφημα 3Γ).



*Γραφήματα 3B,3Γ: Ποσοστό επιβίωσης (B) και πρώιμης απόπτωσης (Γ) κυττάρων μετά από βλάβη λόγω Υ/Ε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (νορμοξία) (n=3, Επίπεδο σημαντικότητας: *** $p < 0,001$)*

Στις ομάδες κυττάρων που πραγματοποιήθηκε επίδραση με SM και NSM, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας μετά την Y/E σε $92\pm 10\%$ και $80\pm 2\%$ αντίστοιχα, μη διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από την ομάδα νορμοξίας ($p > 0,05$; Γράφημα 3Δ). Επίσης, μόνο τα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το SM εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας σε σχέση με τα κύτταρα της συνθήκης Y/E που δεν έλαβαν καμία επίδραση ($p < 0,05$).



*Γράφημα 3Δ: Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου φορτισθέντων μηχανικά (SM) ή μη φορτισθέντων (NSM) καρδιομυοβλαστών μετά από βλάβη λόγω Y/E, σε σύγκριση με τα μη υποβληθέντα σε επίδραση με υπερκείμενο μέσο κύτταρα (Y/E) και την ομάδα ελέγχου (νορμοξία), (n=6, Επίπεδο σημαντικότητας: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)*

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι οι καρδιομυοβλάστες H9C2 είναι ευαίσθητοι στη βλάβη λόγω Y/E και μεταβολές στη διάρκεια επανοξυγόνωσης οδηγούν σε διαφορετικού μεγέθους βλάβες. Η τρέχουσα βιβλιογραφία αποτελείται από ποικίλης σοβαρότητας ιστικές βλάβες καθώς διαφορετικές ώρες υποξίας και επανοξυγόνωσης καταλήγουν σε διαφορετικού μεγέθους τραυματισμούς. Οι ερευνητές Zhang et al., 2014 σε έρευνα τους προκάλεσαν βλάβη ύψους 78% σε καρδιομυοβλάστες H9C2 που τους υπέβαλαν σε 6 ώρες υποξίας και 8 ώρες επανοξυγόνωσης, αξιολογημένη με χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Ωστόσο, τα ευρήματα της μελέτης μας υποδεικνύουν 93% βλάβη σε καρδιομυοβλάστες H9C2, με πανομοιότυπο πρωτόκολλο Y/E που αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Επιπλέον, οι He et al., 2018 διαπίστωσαν 62% βιωσιμότητα με τη χημική δοκιμασία MTT σε κύτταρα που υπέστη 8 ώρες υποξίας και 4 ώρες επανοξυγόνωσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα που υποδεικνύουν 74% βιωσιμότητα μετά από πρωτόκολλο Y/E διάρκειας 6 και 4 ώρες αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί μία ξεκάθαρη διαβάθμιση της βλάβης εξαιτίας τόσο της ποικιλίας που επικρατεί στα πρωτόκολλα βλάβης που έχουν χρησιμοποιηθεί όσο και της ετερογένειας στις μεθόδους αξιολόγησης.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι 6 ώρες υποξίας, χωρίς τη φάση της επανοξυγόνωσης δεν είναι ικανές να προκαλέσουν μετρήσιμη βλάβη στα κύτταρα. Αυτό επιβεβαιώνει τη θεωρία της βλάβης λόγω ισχαιμίας - επαναιμάτωσης ή κατ' επέκταση υποξίας – επανοξυγόνωσης, η οποία υποστηρίζει ότι η επαναιμάτωση της ισχαιμικής περιοχής δυσχεραίνει την ήδη υπάρχουσα ιστική βλάβη και πυροδοτεί την ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου (Loor & Schumacker, 2008).

Στην πειραματική συνθήκη A όπου τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας και 8 ώρες επανοξυγόνωσης τα ποσοστά κυτταρικού θανάτου όπως προαναφέρθηκε, ήταν πολύ υψηλά καθώς έφτασαν το 93% στην ομάδα που δεν έλαβε κάποιο υπερκείμενο. Το εύρημα αυτό δεν συμφωνεί απόλυτα με τη βιβλιογραφία διότι έχουν σημειωθεί μικρότερα επίπεδα απόπτωσης στο ίδιο πρωτόκολλο Y/E. Πιο συγκεκριμένα, στις μελέτες των Wang et al., 2011 και Zhang et al., 2014 το ποσοστό

κυτταρικού θανάτου ήταν 75% και 78% αντίστοιχα, όπως αξιολογήθηκε με χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι το passage στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, μαζί με τις μεθόδους καλλιέργειας και τις μεθόδους διαδοχικών διαιρέσεων επηρεάζει την αποκρισιμότητα των κυττάρων και δυσκολεύει την επίτευξη συναφή αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων (Gnecchi et al., 2008). Ενδέχεται, το υψηλό passage των κυττάρων να τα καθιστά πιο επιρρεπή στη βλάβη, λιγότερο ανεκτικά και να δικαιολογείται έτσι το υψηλότερο ποσοστό απόπτωσης.

Επιπλέον, τα κύτταρα στην αρχή της επανοξυγόνωσης έλαβαν το υπερκείμενο μέσο από καλλιέργεια καρδιομυοβλαστών που είχαν ή όχι υποστεί μηχανική φόρτιση. Και στις δύο περιπτώσεις φανερώθηκε ότι το υπερκείμενο μέσο μπόρεσε να καθυστερήσει μέχρι 6.05% αλλά όχι να αναστείλει τελείως τον κυτταρικό θάνατο. Ενδεχομένως, ο υψηλός βαθμός βλάβης κατέστησε μη αναστρέψιμη την πρόιμη απόπτωση των κυττάρων και δεν επέτρεψε να φανεί η επίδραση του μέσου καλλιέργειας στα «ισχαιμικά τραυματισμένα» κύτταρα. Κατ' επέκταση, δεν παρατηρήθηκε και καμία διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών, με ή χωρίς μηχανική φόρτιση.

Στην πειραματική συνθήκη Β όπου τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε 6 ώρες υποξίας και 4 ώρες επανοξυγόνωσης το ποσοστό κυτταρικού θανάτου υπολογίστηκε 26% σύμφωνα με τη χημική δοκιμασία MTT και 36% σύμφωνα με την κυτταρομετρία ροής. Αν και τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την 62% βιωσιμότητα που βρήκαν οι He et al., 2018, παράλληλα επαληθεύουν τον αρχικό ισχυρισμό ότι διαφορετικές μέθοδοι αξιολόγησης της βλάβης φέρουν διαφορετικά αποτελέσματα (Gnecchi et al., 2008). Μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου στην αρχή της επανοξυγόνωσης, το ποσοστό κυτταρικού θανάτου διαμορφώθηκε για την ομάδα που έλαβε το SM σε 8%, σημειώνοντας καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά με την ομάδα νορμοξίας. Γεγονός που υποδεικνύει ότι το εκκρίνωμα των καρδιοβλαστών που είχαν υποστεί μηχανική φόρτιση με επιμήκυνση 12 %, συχνότητα 0,25 Hz και διάρκεια 12 ώρες κατάφερε να αναστείλει την κυτταρική απόπτωση. Επιπρόσθετα, μετά τη χορήγηση του υπερκείμενου μέσου NSM, δηλαδή από καρδιομυοβλάστες που δεν έχουν υποστεί κάποια παρέμβαση, το ποσοστό κυτταρικού θανάτου μειώθηκε σε 20%, χωρίς να διαφέρει πλέον στατιστικώς σημαντικά από την ομάδα νορμοξίας.

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει ότι το εκκρίνωμα βλαστικών κυττάρων, όπως είναι και οι καρδιομυοβλάστες, προάγει την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων και περιορίζει τις αποπτωτικές, φλεγμονώδεις και προ-ινωτικές διεργασίες (Baraniak & McDevitt, 2010). Ωστόσο, φαίνεται πως η μηχανική φόρτιση των καρδιομυοβλαστών τροποποιεί το εκκρίνωμά τους καθιστώντας το περισσότερο αποτελεσματικό ως προς την επιβίωση αυτών των κυττάρων. Ενδεχομένως, η μηχανική φόρτιση επάγει την έκκριση κυτταροκινών και άλλων βιοδραστικών μορίων που ενισχύουν την επιβίωση των κυττάρων και ενορχηστρώνουν τις φλεγμονώδεις διαδικασίες, κατά παρόμοιο τρόπο που το κάνει η υποξία και η επανοξυγόνωση (Li et al., 2014).

Επιπρόσθετα, η καλλιέργεια των καρδιομυοβλαστών κατά την επανοξυγόνωση σε 100% υπερκείμενο μέσο καλλιέργειας δεν φαίνεται να ενισχύει την επιβίωσή τους πιθανόν γιατί έχει ήδη καταναλωθεί το μεγαλύτερο μέρος της διαθέσιμης γλυκόζης. Στη δεύτερη συνθήκη (B) που χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο μέσο σε αναλογία 1:1 με το νέο θρεπτικό καλλιέργειας, φανερώθηκαν τα ευνοϊκά αποτελέσματα του εκκρινώματος μειώνοντας σε εξαιρετικό βαθμό τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, δεν μπορούμε να αγνοήσουμε το γεγονός πως στην πρώτη συνθήκη (A) το εκκρίνωμα των καρδιομυοβλαστών προερχόταν από μηχανική φόρτιση επιμήκυνσης 2,2% ενώ στη δεύτερη συνθήκη (B) 12%. Πρωτόκολλα μηχανικής διάτασης διαφορετικής έντασης προκαλούν διαφορετικές αποκρίσεις στα κύτταρα επομένως και διαφορετική έκκριση παραγόντων (Rysa et al., 2018)

Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι λιγότερο επιβλαβή πρωτόκολλα Y/E είναι πιο κατάλληλα για να αποκαλύψουν τις ευμενείς επιδράσεις του εκκρινώματος των καρδιακών μυοβλαστών, με ή χωρίς μηχανική φόρτιση, στην επιβίωσή τους μετά την Y/E. Η μηχανική φόρτιση μεταβάλλει κατά τέτοιο τρόπο το εκκρίνωμα των κυττάρων που το καθιστά πιο ευεργετικό για τα κύτταρα. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση του εκκρινώματος των καρδιομυοβλαστών μετά τη μηχανική φόρτιση και τις αιτίες που η χορήγηση του μετατρέπει τα κύτταρα πιο ανεκτικά στη βλάβη λόγω Y/E.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed RP, Ashraf M, Buccini S, Shujia J, Haider H: Cardiac tumorigenic potential of induced pluripotent stem cells in an immunocompetent host with myocardial infarction. *Regen Med* 2011;6:171–178.
2. Baraniak, P. R., & McDevitt, T. C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*, 5(1), 121-143.
3. Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjostrom, S.L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., Dos Remedios, C., et al. (2015). Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 161, 1566–1575
4. Borch, E., Parri, M., Papucci, L., Becatti, M., Nassi, N., Nassi, P., & Nediani, C.(2009). Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(8b), 2724-2735.
5. Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword?. *The Journal of clinical investigation*, 76(5), 1713-1719.
6. Chen, L., Chen, M., Du, J., Wan, L., Zhang, L., & Gu, E. (2016). Hyperglycemia attenuates remifentanyl postconditioning-induced cardioprotection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyoblasts. *Journal of surgical research*, 203(2), 483-490.
7. Claycomb W. C.; Lanson Jr. N. A.; Stallworth B. S.; Egeland D. B.; Delcarpio J. B.; Bahinski A. et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2979–2984; 1998.
8. Dong, G., Chen, T., Ren, X., Zhang, Z., Huang, W., Liu, L., ... & Zhou, H. (2016). Rg1 prevents myocardial hypoxia/reoxygenation injury by regulating mitochondrial dynamics imbalance via modulation of glutamate dehydrogenase and mitofusin 2. *Mitochondrion*, 26, 7-18.
9. Du, J., Zhang, L., Zhuang, S., Qin, G. J., & Zhao, T. C. (2015). HDAC4 degradation mediates HDAC inhibition-induced protective effects against hypoxia/reoxygenation injury. *Journal of cellular physiology*, 230(6), 1321-1331.

10. Ellison-Hughes, G. M., & Madeddu, P. (2017). Exploring pericyte and cardiac stem cell secretome unveils new tactics for drug discovery. *Pharmacology & therapeutics*, *171*, 1-12.
11. Gagner, J. P., Lechpammer, M., & Zagzag, D. (2018). Induction and Assessment of Hypoxia in Glioblastoma Cells In Vitro. In *Glioblastoma* (pp. 111-123). Humana Press, New York, NY.
12. Garbern, J. C., & Lee, R. T. (2013). Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell stem cell*, *12*(6), 689-698.
13. Gladek, I., Ferdin, J., Horvat, S., Calin, G. A., & Kunej, T. (2017). HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *56*(6), 439-452.
14. Gnecci, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*, *103*(11), 1204-1219.
15. Günthel, M., Barnett, P., & Christoffels, V. M. (2018). Development, Proliferation, and Growth of the Mammalian Heart. *Molecular Therapy*.
16. He, X., Li, S., Fang, X., & Liao, Y. (2018). TDCPP protects cardiomyocytes from hypoxia-reoxygenation injury induced apoptosis through mitigating calcium overload and promotion GSK-3 β phosphorylation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *92*, 39-45.
17. He, X., Li, S., Liu, B., Susperreguy, S., Formoso, K., Yao, J., ... & Liao, Y. (2017). Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(23), E4582-E4591.
18. Henningsen, J., Rigbolt, K. T., Blagoev, B., Pedersen, B. K., & Kratchmarova, I. (2010). Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M110.
19. Jiang, W. B., Zhao, W., Chen, H., Wu, Y. Y., Wang, Y., Fu, G. S., & Yang, X. J. (2018). Baicalin protects H9c2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress through activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *45*(3), 303-311.
20. Kelly, R.G., Buckingham, M.E., and Moorman, A.F. (2014). Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *4*, 1–10

21. Kimes B. W.; Brandt B. L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98: 367–381; 1976.
22. Li, X., Ren, Y., Sorokin, V., Poh, K. K., Ho, H. H., Lee, C. N., ... & Sze, S. K. (2014). Quantitative profiling of the rat heart myoblast secretome reveals differential responses to hypoxia and re-oxygenation stress. *Journal of proteomics*, 98, 138-149.
23. Logue, S. E., Gustafsson, Å. B., Samali, A., & Gottlieb, R. A. (2005). Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 38(1), 21-33.
24. Loor, G., & Schumacker, P. T. (2008). Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia–reperfusion. *Cell death and differentiation*, 15(4), 686.
25. Malliopoulou, V., Xinaris, C., Mourouzis, I., Cokkinos, A. D., Katsilambros, N., Pantos, C., ... & Cokkinos, D. V. (2006). High glucose protects embryonic cardiac cells against simulated ischemia. *Molecular and cellular biochemistry*, 284(1-2), 87-93.
26. Martin, B. J., Kuang, J. Q., Dow, J. S., & Wold, L. E. (2005). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short and long-term effects. *Circulation*, 112(12), 214-223.
27. McGinnis, G. R., Ballmann, C., Peters, B., Nanayakkara, G., Roberts, M., Amin, R., & Quindry, J. C. (2015). Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 308(11), H1423-H1433.
28. Menasché, P. (2008). Skeletal myoblasts and cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45(4), 545-553.
29. Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., & Rayner, M. (2014). Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European heart journal*, 35(42), 2950-2959.
30. Nygren, J. M. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.* 10, 494–501 (2004)

31. Ouchi, N., Ohashi, K., Shibata, R., & Murohara, T. (2016). Protective roles of adipocytokines and myokines in cardiovascular disease. *Circulation Journal*, 80(10), 2073-2080.
32. Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P. A., Gomez, L., Fauconnier, J., Da Silva, C. C., ... & Abrial, M. (2013). Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes from Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury. *Circulation*, CIRCULATIONAHA-113.
33. Perez-Ilzarbe, M., Agbulut, O., Pelacho, B., Ciorba, C., Jose-Eneriz, E. S., Desnos, M., ... & Prósper, F. (2008). Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *European journal of heart failure*, 10(11), 1065-1072.
34. RajendranNair, D. S., Karunakaran, J., & Nair, R. R. (2017). Differential response of human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to hypoxia–reoxygenation injury. *Molecular and cellular biochemistry*, 425(1-2), 139-153.
35. Rysä, J., Tokola, H., & Ruskoaho, H. (2018). Mechanical stretch induced transcriptomic profiles in cardiac myocytes. *Scientific reports*, 8(1), 4733.
36. Scheler, M., Irmeler, M., Lehr, S., Hartwig, S., Staiger, H., Al-Hasani, H., ... & Weigert, C. (2013). Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(8), C877-C886.
37. Toldo, S., & Abbate, A. (2018). The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, 15(4), 203.
38. Wang, D., Zhang, Y. Z., Yang, B., Zhang, F. X., Cao, M. Y., Wang, C., & Chen, M. L. (2011). p21 WAF1 and hypoxia/reoxygenation-induced premature senescence of H9c2 cardiomyocytes. *Folia histochemica et cytobiologica*, 49(3), 445-451.
39. Wang, H., Zhao, Y. T., Zhang, S., Dubielecka, P. M., Du, J., Yano, N., ... & Zhao, T. C. (2017). Irisin plays a pivotal role to protect the heart against ischemia and reperfusion injury. *Journal of cellular physiology*, 232(12), 3775-3785.
40. Wang, X., Ha, T., Hu, Y., Lu, C., Liu, L., Zhang, X., ... & Li, C. (2016). MicroRNA-214 protects against hypoxia/reoxygenation induced cell damage

- and myocardial ischemia/reperfusion injury via suppression of PTEN and Bim1 expression. *Oncotarget*, 7(52), 86926.
41. Wang, X., Ha, T., Zou, J., Ren, D., Liu, L., Zhang, X., ... & Li, C. (2014). MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovascular research*, 102(3), 385-395.
 42. Watkins, S. J., Borthwick, G. M., & Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 47(2), 125-131.
 43. Wenger, R. H., Kurtcuoglu, V., Scholz, C. C., Marti, H. H., & Hoogewijs, D. (2015). Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia*, 3, 35.
 44. Wollert, K. C., & Drexler, H. (2010). Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nature Reviews Cardiology*, 7(4), 204.
 45. Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (54).
 46. Xi, Y., Gong, D. W., & Tian, Z. (2016). FSTL1 as a potential mediator of exercise-induced cardioprotection in post-myocardial infarction rats. *Scientific reports*, 6, 32424.
 47. Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121-1135.
 48. Yu, J., Wu, J., Xie, P., Maimaitili, Y., Wang, J., Xia, Z., ... & Zheng, H. (2016). Sevoflurane postconditioning attenuates cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury via restoring mitochondrial morphology. *PeerJ*, 4, e2659.
 49. Zanou, N., & Gailly, P. (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(21), 4117-4130.
 50. Zhang Y, Wang D, Chen M, Yang B, Zhang F, Cao K: Intramyocardial transplantation of undifferentiated rat induced pluripotent stem cells causes tumorigenesis in the heart. *PLoSOne* 2011;6:e19012
 51. Zhang, Y., Wang, D., Cao, K., Chen, M., Yang, X., & Tao, Y. (2014). Rat induced pluripotent stem cells protect H9C2 cells from cellular senescence via a paracrine mechanism. *Cardiology*, 128(1), 43-50.

52. Zhao, Y., Xu, Y., Zhang, J., & Ji, T. (2014). Cardioprotective effect of carvedilol: inhibition of apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the TLR4/NF- κ B pathway following ischemia/reperfusion injury. *Experimental and therapeutic medicine*, 8(4), 1092-1096.
53. Zhu, H. M., & Deng, L. (2012). Evaluation of cardiomyocyte hypoxia injury models for the pharmacological study in vitro. *Pharmaceutical biology*, 50(2), 167-174.