

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ



Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ

**«Μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ισχαιμικής και της μετισταμμικής
προστασίας σε όργανα στόχους μετά από υπερνεφρικό αποκλεισμό της
κοιλιακής αορτής σε αρουραίους»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΑΔΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-10-2014

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 26-11-2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ζωγράφος Γεώργιος, Καθηγητής Χειρουργικής
2. Σιγάλα Φραγκίσκα (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
3. Ανδρεάδου Ιωάννα. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} προόδου: 26-11-2015

Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} προόδου: 23-11-2016

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} προόδου: 16-03-2020

Ημερομηνία κατάθεσης Διατριβής : 13-03-2020

Ημερομηνία ορισμού 7μελούς εξεταστικής επιτροπής: 20-05-2020

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ








1. Ζωγράφος Γεώργιος, Καθηγητής Χειρουργικής
2. Σιγάλα Φραγκίσκα (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
3. Ανδρεάδου Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
4. Φίλης Κωνσταντίνος, Καθηγητής
5. Αλεξάκης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής

6. Πατέρας Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής
7. Παπαλάμπρος Αλέξανδρος – Λουκάς, Επίκουρος Καθηγητής

Ημερομηνία εξέτασης Διδακτορικής Διατριβής: 08-10-2020

Ὄρκος του Ιπποκράτη

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἩΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ἸΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ἸΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ἸΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ἩΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ἸΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ,
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ,  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ,  ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ,  ΟΥ ΤΕΜΕΝ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ,  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ,  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Ἡ ἸΔΩ, Ἡ ΔΚΟΥΣΩ, Ἡ ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ἩΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ἸΔΥΤΑ,  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛ
I. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	12
II. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
1. Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής	20
1α. Εισαγωγή	20
1β. Επιδημιολογία	21
1γ. Αντιμετώπιση	22
2. Ισχαιμία - Βλάβη επαναιμάτωσης	25
2α. Εισαγωγή	25
2β. Βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και μεσολαβητές	26
3. Ενδογενείς μηχανισμοί προστασίας	29
3α. Ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Preconditioning – IPre)	29
3α.ι. Δεύτερο παράθυρο προστασίας (Second window of protection - SWOP)	32
3β. Απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία (Remote Ischemic Conditioning - RIC)	32
3γ. Μετισχαική προστασία (Ischemic Postconditioning - IPost)	33
3δ. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος	36
3ε. Ενδογενείς ουσίες	36
4. Οξειδωτικό στρες	38
5. Μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA (DNA damage response, DDR)	39

5α. Εισαγωγή	39
5β. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης	42
5β.i. Μονοπάτι απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις	42
5γ. Απομακρυσμένη δράση επιδιόρθωσης βλάβης DNA (bystander effect)	44
6. Γήρανση	47
IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
1. Σκοπός της μελέτης	53
2. Μεθοδολογία	55
2α. Νομοθεσία και τόπος διεξαγωγής πειραμάτων	55
2β. Πειραματικό πρωτόκολλο	56
3. Βιοχημική ανάλυση	59
3α. Μέτρηση βιοχημικών δεικτών	59
4. Ιστοπαθολογική ανάλυση	59
4α. Εκτίμηση νεφρικού και καρδιακού ιστού	59
5. Ανάλυση πρωτεϊνών	60
5α. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από τους ιστούς	60
5β. Απομόνωση ιστονών	61
5γ. Ανοσοτύπωση (Western Blot)	61
6. Τεχνικές in situ	66
6α. Ανοσοϊστοχημεία	66
6β. Ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων – TUNEL	68

6γ. Elisa essay	69
6δ. Ιστοχημική χρώση με GL13 (Ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων)	70
7. Αντισώματα	71
7α. Αντισώματα για ανοσοτύπωση Western	71
7β. Αντισώματα για ανοσοϊστοχημεία	72
7γ. Αντισώματα για Elisa	72
8. Στατιστική ανάλυση	72
9. Αποτελέσματα	73
9α. Βελτιωμένο βιοχημικό προφίλ στις ομάδες χειρισμού	73
9β. Οι χειρισμοί μειώνουν τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο νεφρό και στην καρδιά	77
9γ. Οι χειρισμοί μειώνουν τη συσσώρευση βλάβης DNA σε νεφρό και καρδιά	77
9δ. Οι χειρισμοί μειώνουν τα επίπεδα TGFβ-1 στον ορό	82
9ε. Η θεραπεία με 5-HD και 8-SPT αναστέλλει την προστατευτική δράση των χειρισμών	84
10. Συζήτηση – Συμπεράσματα	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93
ABSTRACT	102

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	ΣΕΛ
ΙΙΙ. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εικόνα 1. Ανατομία ανευρύσματος κοιλιακής αορτής	20
Εικόνα 2. Αποκατάσταση κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος.	23
Εικόνα 3. Οι κύριοι συμμετέχοντες της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου: mPTP- μιτοχονδριακοί πόροι διαπερατότητας, SR - σαρκοπλασματικό δίκτυο, Cyt C- κυτόχρωμα C	27
Εικόνα 4. Ένα προτεινόμενο σχήμα με κάποια από τα σημαντικότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην ισχαιμική προετοιμασία και μετисχαιμική προστασία.	31
Εικόνα 5. Οξειδωτικό στρες υφίσταται όταν υπάρχουν παραπάνω ελεύθερες ρίζες από ότι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που τις εξουδετερώνουν.	38
Εικόνα 6. Απόκριση στη βλάβη DNA. Η βλάβη DNA προκαλείται από διάφορες πηγές. Η κυτταρική απόκριση στη βλάβη μπορεί να περιλαμβάνει ενεργοποίηση ενός σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, έναρξη μεταγραφικών προγραμμάτων, εκτέλεση επισκευής DNA ή έναρξη απόπτωσης όταν η βλάβη είναι εκτεταμένη	40
Εικόνα 7. Μια σχηματική παρουσίαση της απόκρισης στη βλάβη DNA και των μονοπατιών επιδιόρθωσης που ενεργοποιούνται από διάφορους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες	41
Εικόνα 8. Προτεινόμενο μοντέλο ενδο- και δια-κυτταρικής μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν το απομακρυσμένο αποτέλεσμα από ιονίζουσα ακτινοβολία.	45
Εικόνα 9. Βιολογικές συνέπειες κυτταρικής γήρανσης	49
Εικόνα 10. Κυτταρική γήρανση σε γηρασκόμο και ασθενή πλυθησμό: από μηχανισμούς έως τη θεραπεία	50
Εικόνα 11. Σχηματική παρουσίαση του πειραματικού πρωτοκόλλου και της κατανομής των ζώων σε διαφορετικές ομάδες.	57

Εικόνα 12. Φωτογραφίες κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειραματικού πρωτοκόλλου. Αποκάλυψη και παρασκευή υπερνεφρικής αορτής. Προετοιμασία για αποκλεισμό κα πρόκληση ισχαιμίας.	58
Εικόνα 13. Παρουσίαση κλασσικής Western Blot	64
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση Elisa	69
IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου και της κατανομής των πειραματοζώων σε διαφορετικές ομάδες. Group A (Ελέγχου): αποκλεισμός υπερνεφρικής αορτής για 30 min. Group B (IPost): 30 min. υπερνεφρικού αποκλεισμού πριν από 6 κύκλους of 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Group C (IPre): 6 κύκλοι of 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης πριν από τα 30 min. αποκλεισμού. Group D (IPre+IPost): 6 κύκλοι 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης πριν και άλλοι 6 κύκλοι 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μετά την παρατεταμένη ισχαιμία. Όλα τα ζώα θυσιάστηκαν σε όλες τις ομάδες στις 6, 24, 48 ώρες και 10 μέρες.	73
Σχήμα 2. Η προετοιμασία επιφέρει μια προστατευτική δράση στην ακεραιότητα του ιστού. A. Βελτιωμένο προφίλ σε σημαντικούς βιοχημικούς δείκτες στις ομάδες προετοιμασίας. i. Σημαντική μείωση στα επίπεδα CRP που υποδεικνύουν μειωμένη φλεγμονή. ii. Σημαντική μείωση στα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης που δείχνουν μια προστατευτική δράση στη νεφρική λειτουργία. iii. Σημαντική μείωση στα επίπεδα CPK, LDH, SGPT and K ⁺ που υποδεικνύουν μειωμένη βλάβη στους ιστούς. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως mean ± SEM (n=5) , *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, +p<0.05 C vs D. B. Αντιπροσωπευτικά δείγματα με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης αποκαλύπτουν μειωμένη βλάβη σε νεφρικούς και καρδιακούς ιστούς στις ομάδες προετοιμασίας. Και στις δυο περιπτώσεις το ολικό σκορ (που κυμαίνεται από 0-5) είναι βελτιωμένο στις ομάδες αυτές. Οι κεφαλές των βελών υποεικνύουν σωληνοειδείς ρωγμές και τα απλά βέλη αποκομμένα νεκρωτικά κύτταρα στο νεφρό (scale bar: 100μm). Βέλη μέσα στην απεικόνιση δείχνουν ζώνες συστολής στο μυοκάρδιο (scale bar: 100μm; scale bar within inset 20μm). Ποσοτικοποιημένα δεδομένα εκφράζονται ως mean ± SEM (n=3). For the kidney tissue, ****p< 0.0001 for 6h; +++++p< 0.0001 for 24h.	74
Σχήμα 3. A. Μειωμένη βλάβη DNA σε ομάδες χειρισμού. i. Μειωμένα επίπεδα ανοσοχρώσης 8-oxo-G και γH2AX σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ομάδων χειρισμού σε νεφρό και καρδιά. Οι κεφαλές βελών επιδεικνύουν θετική χρώση 8-oxo-G και γH2AX (κλίμακα: 100μm) ii. Τα αντιπροσωπευτικά γραφήματα παρουσιάζουν τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± SEM. iii. Η ανοσοτύπωση κατά Western σε αντιπροσωπευτικά δείγματα για τον εντοπισμό επιπέδων γH2AX έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού. H3 λειτούργησε ως πρότυπο φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση της Western Blot του γH2AX/H3 έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού ιδίως στην ομάδα C. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± SEM.	78
Σχήμα 4. A. Η ανοσοτύπωση Western Blot δείχνει μειωμένα επίπεδα NOX4 στο μυοκάρδιο σε ομάδες χειρισμού. Η β-ακτίνη λειτουργεί ως πρότυπο. Η ποσοτικοποίηση της ανάλυσης Western Blot της NOX4/b-actin έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού. B. Η ανοσοτύπωση Western Blot του δείκτη DDR, pATM σε αντιπροσωπευτικά δείγματα,	81

<p>παρουσίασε μειωμένα δείγματα στις ομάδες χειρισμού. Η β-ακτίνη λειτουργεί ως πρότυπο. Η ποσοτικοποίηση της ανάλυσης Western Blot της pATM/b-actin έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού, ιδίως στην ομάδα C. C. Αξιολόγηση της γήρανσης στο νεφρό με τη μέθοδο TUNEL, έδειξε μειωμένα επίπεδα αποπτωτικών κυττάρων στις ομάδες χειρισμού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος \pm SEM. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$. D. Αξιολόγηση της γήρανσης χρησιμοποιώντας την ουσία GL-13. Τα βέλη δείχνουν θετικά κύτταρα σε αντιπροσωπευτικά δείγματα από τις ομάδες A(i) και D(ii). Κλίμακα: 25μm.</p>	
<p>Σχήμα 5. A. Μειωμένα επίπεδα της TGFβ1 στον ορό των ομάδων με χειρισμό σε σχέση με τις ομάδες που δεν υπάστη χειρισμό, με πιο έντονη τη διαφορά στην υπο-ομάδα D ($p=0.031$). B. (i) Μειωμένη χρώση του πυρήνα για το p65 στο μυοκάρδιο των ομάδων με χειρισμό (scale bars: 100μm).</p>	83
<p>Σχήμα 6. Θεραπεία με 5-HD και 8-SPT εξαλείφουν τις προστατευτικές δράσεις των χειρισμών. A. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχήματος. 5-HD και 8-SPT χορηγήθηκαν πριν τον αποκλεισμό της υπερνεφρικής αορτής και των κύκλων ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. B. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα βιοχημικών δεικτών στις ομάδες μετά τη χορήγηση των ουσιών. C. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε αντιπροσωπευτικά δείγματα έδειξε στατιστικά σημαντική βλάβη ιστών στις ομάδες χειρισμού στις οποίες χορηγήθηκαν οι ουσίες. Σωληνοειδείς ρωγμές (κεφαλές βελών) μαζί με τα αποκομμένα νεκρωτικά κύτταρα (βέλη) και την ασβεστοποίηση (αστερίσκοι) στον πυρήνα των νεφρών από αντιπροσωπευτικά δείγματα post-conditioning (i, v), pre-conditioning (vi) και συνδυασμού pre- and post-conditioning (ii). Κλίμακα: 100μm. Η αιμορραγική μαζί με τη φλεγμονώδη διήθηση των κυττάρων (διπλές κεφαλές βελών) και οι ζώνες συστολής (βέλη) στο μυοκάρδιο από αντιπροσωπευτικά δείγματα post-conditioning (iii, vii), pre-conditioning (viii) and combined pre- and post-conditioning (iv). Κλίμακα: 100μm. Το ιστολογικό σκορ κυμαίνεται από 0 έως 5.</p>	87
<p>Σχήμα 7. Όχι στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα TGF-β1 στον ορό στις ομάδες χειρισμού σε σχέση με την ομάδα A έπειτα από τη χορήγηση των ουσιών 5-HD και 8-SPT.</p>	88

I. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Απασχόληση- Εργασιακή Εμπειρία

Ιανουάριος 2019 – Σήμερα: Market, Strategy and Planning Health Care and Pharma South East Europe

Φεβρουάριος 2017 – Δεκέμβριος 2018: Υπεύθυνη Φαρμακείων Πανελλαδικά, Procter & Gamble Hellas
- Global Pharmacy Solutions

Ιανουάριος 2013 – Ιανουάριος 2017: Υπεύθυνη Πελατών στο Κανάλι Φαρμακείων, Procter & Gamble
Hellas - Global Pharmacy Solutions

Οκτώβριος 2011 – Δεκέμβριος 2012: Υπεύθυνη Φαρμακοποιός σε Φαρμακείο (part time) [Φαρμακείο
Άννα Σκόπα, Γκύζη]

Απρίλιος - Μάϊος 2012: Οργάνωση και επιτήρηση εργαστηριακών ασκήσεων προπτυχιακών φοιτητών
στη Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών (ΕΚΠΑ)

2008 – 2009: Πρακτική Άσκηση ως Φαρμακοποιός, εννέα μήνες σε Φαρμακείο [Φαρμακείο Χριστίνα
Γαϊτάνη, Αγία Παρασκευή] και τρεις μήνες στο Φαρμακείο του νοσοκομείου Αθηνών «Γ.Γεννηματά»

2005 – 2011: Ιδιαίτερα Αγγλικής γλώσσας για προετοιμασία απόκτησης ξένου διπλώματος

Εκπαίδευση

Νοέμβριος 2014 – Μάρτιος 2020: Διδακτορική Διατριβή στην Ιατρική Σχολή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Οκτώβριος 2010 – Δεκέμβριος 2012: Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στην Κλινική Φαρμακευτική

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Βαθμός Πτυχίου «Άριστα»

Οκτώβριος 2011 – Φεβρουάριος 2012: Πρόγραμμα εκπαίδευσης σε νοσοκομεία Αθήνας (Ευαγγελισμός,
Κωνσταντοπούλειο Νοσοκομείο, Ιατρικό Κέντρο Αθηνών, Νοσοκομείο Νίκαιας, Νοσοκομείο Αγ.

Αναργύρων, Παίδων Αγ.Σοφία, Αττικό Νοσοκομείο) στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Κλινικής Φαρμακευτικής

2004 – 2010: Φαρμακευτική Σχολή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Βαθμός Πτυχίου «Λίαν Καλώς»

Σεπτέμβριος 2011: Απόκτηση Άδειας Άσκησης Επαγγέλματος Φαρμακοποιού, Υπουργείο Υγείας & Πρόνοιας

Ερευνητική δραστηριότητα

2014 – 2020: Ερευνητική μελέτη στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, που αφορά την: «Μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ισχαιμικής προστασίας σε όργανα στόχους μετά από υπερνεφρικό αποκλεισμό της κοιλιακής αορτής σε επίμυες»

2011 – 2012: Ερευνητική μελέτη στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος, που αφορά την: «Μελέτη του μηχανισμού δράσης στατινών στη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε ασθενείς μετά από καρωτιδική ενδαρτηρεκτομή»

2009 – 2010: Ερευνητική μελέτη, στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας: «Μελέτη της φαρμακολογικής αναστολής της PI3 κινάσης και των υποδοχέων της αδενοσίνης στις ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής σήματος κατά την απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία»

2009 – 2010: Βοηθός Αγγειοχειρουργού Dr.Φ.Σιγάλα στο χειρουργικό πειραματικό πρωτόκολλο: «Μελέτη της ευεργετικής δράσης και του μοριακού μηχανισμού της μετισχαιμικής προστασίας, στο ωτιαίο μυελό και στο νεφρικό ιστό μετά από υπερνεφρικό αποκλεισμό της κοιλιακής αορτής σε αρουραίους. Σύγκριση με την ισχαιμική προστασία»

Δημοσιεύσεις

Conditioning attenuates kidney and heart injury in rats following transient suprarenal occlusion of the abdominal aorta.

Dimitra M. Karageorgiadi#1,2, Diamantis I. Tsilimigras*#1,2,3, Platonas Selemenakis1,4,11, Vassiliki Vlachou1, Anne-Lise de Lastic5, Maria Rodi5, Danai Chatziathanasiou1, Kostas Savvatakis1,6, Nikos Antoniou1, Aikaterini C. Deli2, Alexandros Papalambros7, Konstantinos A. Filis2, Athanasia Mouzaki5, Anastasia Varvarigou8, George Zografos2, Vassilis G. Gorgoulis1,9,10, Ioannis S. Pateras1,11, Fragiska Sigala2,11

Sci Rep **10**, 5040 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61268-9>

Reciprocal regulation of eNOS, H₂S and CO-synthesizing enzymes in human atheroma: Correlation with plaque stability and effects of simvastatin.

Sigala F, Efentakis P, Karageorgiadi D, Filis K, Zampas P, Iliodromitis EK, Zografos G, Papapetropoulos A, Andreadou I

Redox Biol. 2017 Aug;12: 70-81. doi: 10.1016/j.redox.2017.02.006. Epub 2017 Feb 12

Βραβεία και συμμετοχές συνεδρίων

2020: 3 βραβεία κοινού για τα πιο αγαπημένα προϊόντα μέσα στο Ελληνικό Φαρμακείο στις κατηγορίες προϊόντων υγείας και δερματοκαλλυντικών

2019: Συμμετοχή και παρουσίαση εργασίας στο «45^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο»

2016: Βραβείο 1^{ης} καλύτερης ελεύθερης ανακοίνωσης «15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακή και Ενδαγγειακής Χειρουργικής – Αγγειολογίας»

2014: Συμμετοχή και παρουσίαση στο «14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακής και Ενδαγγειακής Χειρουργικής»

Δεξιότητες

Αγγλικά: Proficiency, ΚΠΓ C2

Γαλλικά: Delf 1,2

Υπολογιστές: MS Office, Graph Pad Prism, Image J, ECDL

Δραστηριότητες

Σήμερα: Μέλος Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

2011 – Σήμερα: Μέλος της Αμερικάνικης Ένωσης Φαρμακευτικών Επιστημών (με χορήγηση δωρεάν εγγραφής για ένα έτος λόγω υποτροφίας Catalent)

2004: «Global Youth Leadership Conference» (Νέα Υόρκη – Ουάσινγκτον, ΗΠΑ)

Σήμερα: Ιστιοπλοΐα στο Ναυτικό Αθλητικό Σύλλογο Πόρτο-Ράφτη (ΝΑΣΠΟΡ), Αθήνα

1990 – 2015 : Πολλαπλές σπουδές πάνω στο Χορό, συμμετοχές σε παραστάσεις και διαγωνισμούς

Συνέδρια/ Σεμινάρια

2020: 11^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή), Βραβεία κοινού σε 3 κατηγορίες

2019: 10^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

2018: 9^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

2017: 8^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

2017: Hellas Pharm, Φαρμακευτικό Συνέδριο, Μαρούσι (συμμετοχή)

2016: 7^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

2015: 6^η Διημερίδα και Έκθεση: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

2014: 5^η Διημερίδα Φαρμακοποιών: Επιχειρηματικότητα και Επικοινωνία Υγείας (συμμετοχή)

Απρίλιος 2012: 1^ο Συνέδριο Φαρμακευτικών Επιστημών: Από την έρευνα στην κοινωνία

2011: 1^η πανελλήνια συνάντηση μεταπτυχιακών φοιτητών στις φαρμακευτικές επιστήμες

2010: 7^ο μετεκπαιδευτικό σεμινάριο λοιμώξεων

2010 : Ημερίδα με θέμα εξατομικευμένη Φαρμακοθεραπεία (αρχές-εφαρμογές στην κλινική πράξη)

2010 :6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακολογίας, Κρήτη (Συμμετοχή πτυχιακής εργασίας)

2010 : 14^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας, Θεσσαλονίκη

2009 : Επιστημονική Ημερίδα με θέμα : «Από τη στεφανιαία νόσο στην καρδιακή ανεπάρκεια : Η εφαρμογή των Παθοφυσιολογικών Μηχανισμών στην Κλινική Πράξη»

2008 : 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Φαρμακευτικής

2008 : Συνέδριο και επίσκεψη στην Φαρμακευτική Εταιρεία Sandoz, στην Αυστρία

2008 : 13^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας

2008 : «Σεμινάρια Επαγγελματικής Κατάρτισης για τελειόφοιτους φοιτητές Φαρμακευτικής» που διοργανώθηκε από τον Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Φαρμακευτικής Σχολής και την Φαρμακαποθήκη ΠΡΟΦΑΡΜ Α.Ε.

2008 : 2^ο Διεθνές Φόρουμ Φοιτητών Ιατρικής, Νέων Ιατρών και Φαρμακοποιών

2007 : Σεμινάρια φαρμακολογίας στο Βερολίνο με εκπαιδευτική εκδρομή του Φαρμακευτικού Τμήματος Αθηνών

2005 : 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φοιτητών Φαρμακευτικής «Ο ρόλος του νέου Φαρμακοποιού στον 21^ο αιώνα»

II. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζωγράφο που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή στην 1^η Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτριά μου κ. Φραγκίσκα Σιγάλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Η πολύτιμη στήριξη και καθοδήγησή της στάθηκε καθοριστική στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Τέλος, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιωάννα Ανδρεάδου για τη συνολική καθοδήγηση της από τα φοιτητικά μου χρόνια και τη δυνατότητα που μου έδωσε να εισέλθω στο ερευνητικό προσκήνιο από πολύ νωρίς. Ευχαριστώ όλα τα μέλη της Συμβουλευτικής και Εξεταστικής επιτροπής.

Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Βασίλη Γοργούλη για την παραχώρηση του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και Μοριακής Καρκινογένεσης, όπου μπόρεσα να ολοκληρώσω το εργαστηριακό κομμάτι της διατριβής μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Πατέρα για την πολύτιμη συνεισφορά του καθώς και για και την πρακτική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Η συμμετοχή του ήταν κομβική και η καθοδήγησή του σημαντική σε όλα τα στάδια.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τον Πλάτωνα Σελεμεντάκη και Διαμαντή Τσιλιμίγκρα για την ενεργό συμμετοχή και πολύτιμη συνεργασία τους, ιδίως μέσα στο εργαστήριο. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους εργάστηκαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και σε όλα τα μέλη της ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά και το σύζυγο μου για την ηθική και ψυχολογική στήριξη και κατανόηση που μου παρείχαν όλα τα χρόνια εκπόνησης της εργασίας. Την Διδακτορική μου Διατριβή την αφιερώνω στο γιο μου Νικόλα, που ήταν η κινητήριος δύναμη για την επιτυχή ολοκλήρωση και σύγγραφή της.

III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

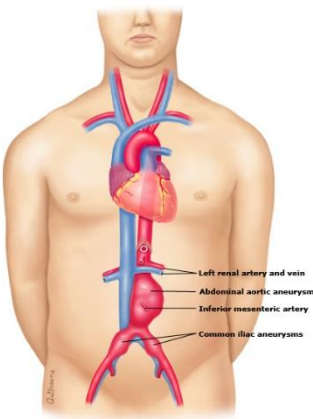
III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής

1α. Εισαγωγή

Το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (ΑΚΑ) είναι το πιο κοινό πραγματικό αρτηριακό ανεύρυσμα. Ως αληθές ανεύρυσμα ορίζεται μια τμηματική, ολικού πάχους διάταση ενός αιμοφόρου αγγείου που είναι 50% μεγαλύτερη από τη φυσιολογική διάμετρο της αορτής. Ψευδή ανευρύσματα της κοιλιακής αορτής μπορούν επίσης να εμφανιστούν αλλά είναι λιγότερο συχνά και συνήθως προκύπτουν από τραυματική ή μολυσματική αιτία.[2]



Εικόνα 12. Ανατομία ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (©2018, UpToDate, Inc. and/or its affiliates)

Η εξέλιξη του ΑΚΑ είναι προοδευτική και μεταβλητή. Εξαρτάται από τη διάμετρο του ανευρύσματος καθώς και από άλλους παράγοντες, ο σημαντικότερος εκ των οποίων είναι το κάπνισμα.[3] Τα ΑΚΑ χαρακτηρίζονται ανάλογα με τη συμμετοχή των νεφρικών και σπλαχνικών αγγείων και διακρίνονται στα εξής:

- Υπερνεφρικό ανεύρυσμα – Το ανεύρυσμα περιλαμβάνει την έκφυση μιας ή περισσοτέρων σπλαχνικών αρτηριών αλλά δεν εκτείνεται στο θώρακα.
- Παρανεφρικό ανεύρυσμα – Οι νεφρικές αρτηρίες εκφύονται από την ανευρυσματική αορτή, αλλά η αορτή στο επίπεδο της ανώτερης μεσεντερικής αορτής δεν είναι ανευρυσματική.

- Περινεφρικό ανεύρυσμα – Το ανεύρυσμα προέρχεται ακριβώς από την έκφυση των νεφρικών αρτηριών. Δεν υπάρχει τμήμα μη ανευρυσματικής αορτής περιφερικά των νεφρικών αρτηριών, αλλά η αορτή στο επίπεδο των νεφρικών αρτηριών δεν είναι ανευρυσματική.
- Υπονεφρικό ανεύρυσμα – Το ανεύρυσμα εκτείνεται κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες. Υπάρχει ένα τμήμα μη ανευρυσματικής αορτής που εκτείνεται σε απόσταση από την έκφυση των νεφρικών αρτηριών έως την έναρξη του ανευρύσματος.

Το ΑΚΑ επηρεάζει συχνότερα το τμήμα της αορτής μεταξύ των νεφρικών και κατώτερων μεσεντέριων αρτηριών. Περίπου το 5% αφορά τις νεφρικές και σπλαχνικές αρτηρίες. Έως 40% των ΑΚΑ σχετίζονται με το ανεύρυσμα της λαγόνιας αρτηρίας. [2, 4-6]

1β. Επιδημιολογία

Ο εκτιμώμενος επιπολασμός του ΑΚΑ στις ανεπτυγμένες χώρες είναι μεταξύ 2% και 8% και είναι υψηλότερος στους άνδρες (4-8% σε άτομα άνω των 50 ετών) σε σύγκριση με τις γυναίκες (1-1,3%). [7] Βάσει ελέγχου περίπου 1.000.000 άτομα έχουν ΑΚΑ στις Ηνωμένες Πολιτείες. [8] Ο επιπολασμός του ΑΚΑ αυξάνεται με την ηλικία σε άνδρες και γυναίκες, αν και η αύξηση που σχετίζεται με την ηλικία είναι πιο έντονη στους άνδρες. [9, 10] Υπερηχογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι 4-8% ηλικιωμένων ανδρών έχουν ένα ασυμπτωματικό ΑΚΑ. [11-13] Επειδή η επίπτωση του ΑΚΑ αυξάνεται κατακόρυφα σε άτομα άνω των 60 ετών, ο μελλοντικός επιπολασμός του ΑΚΑ θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά σε συνδυασμό με τη γήρανση του πληθυσμού. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μείωση του καπνίσματος μπορεί να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. [14, 15]

1γ. Αντιμετώπιση

Τα ΑΚΑ αντιμετωπίζονται σύμφωνα με τη διάμετρο και την παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε ασθενείς με συμπτώματα στους οποίους δεν μπορεί να αποδοθεί άλλη αιτιολογία θα πρέπει να εισαχθούν για περαιτέρω παρακολούθηση και αγγειακή αξιολόγηση.

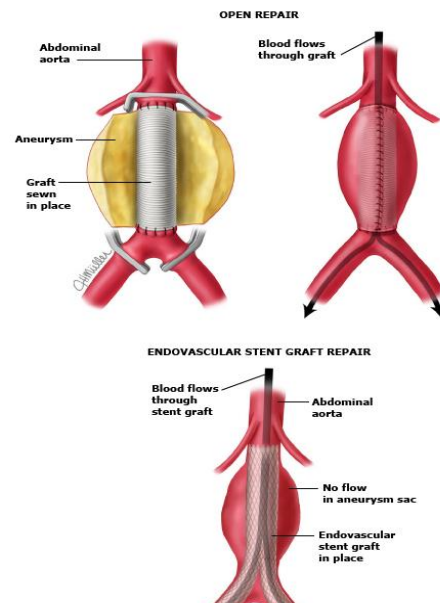
Ρήξη ανευρύσματος – Η ρήξη ανευρύσματος απαιτεί άμεση αντιμετώπιση με ανοικτή ή ενδαγγειακή χειρουργική. Η αρχική εκτίμηση και διαχείριση του ασθενούς καθοδηγείται από την αιμοδυναμική του σταθερότητα. Η αιμοδυναμική αστάθεια επιβάλλει αιμοδυναμική υποστήριξη και άμεση μεταφορά στο χειρουργείο.

Ανοικτή χειρουργική αποκατάσταση – Περιλαμβάνει την αντικατάσταση του ανευρυσματικού αορτικού τμήματος με ένα σωληνωτό ή διχαλωτό προσθετικό μόσχευμα μέσω μιας μέσης κοιλιακής ή οπισθοπεριτοναϊκής τομής.[16] Παρά τις βελτιωμένες τεχνικές, επιπλοκές όπως οξεία νεφρική ανεπάρκεια, περιφερική εμβολή, λοίμωξη τραύματος, ισχαιμία του παχέος εντέρου, σχηματισμός εσφαλμένου ανευρύσματος, αορτοεντερική επικοινωνία, λοίμωξη μοσχεύματος και περιεγχειρητική αιμορραγία εμφανίζονται λιγότερο συχνά αφού γίνεται επιλεκτική χειρουργική προσέγγιση. Παρ' ολ' αυτά παραμένουν σημαντικές επιπλοκές που ακολουθούν την επείγουσα ανοικτή χειρουργική αποκατάσταση του ΑΚΑ.

Ενδοαγγειακή αποκατάσταση – Η ενδοαγγειακή επιδιόρθωση του ΑΚΑ (endovascular aneurysm repair – EVAR) περιλαμβάνει την τοποθέτηση αρθρωτών επενδεδυμένων συνθετικών ενδομοσχευμάτων που εισέρχονται μέσω των λαγονίων ή μηριαίων αρτηριών και εκπτύσσονται εντός της κοιλιακής αορτής, αποκλείοντας τον ανευρυσματικό σάκο από την κυκλοφορία. Η EVAR προϋποθέτει την εκπλήρωση κάποιων συγκεκριμένων ανατομικών κριτηρίων.

Η αντιμετώπιση ενδοαγγειακής αποκατάστασης έναντι της ανοικτής χειρουργικής αντιμετώπισης σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο περιεγχειρητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας για ασυμπτωματικό, συμπτωματικό και ραγέν ΑΚΑ. Και οι δυο τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία. Μακροχρόνια όμως, το ποσοστό επανεπεμβάσεων και η θνητότητα που οφείλεται στο ίδιο το ανεύρυσμα φαίνεται ότι είναι υψηλότερα μετά από την ενδοαγγειακή αντιμετώπιση. Οι κατευθυντήριες οδηγίες συστήνουν την εξατομικευμένη

προσέγγιση κάθε περιστατικού όταν επιλέγεται μια από τις δυο τεχνικές, λαμβάνοντας υπόψιν την ηλικία του ασθενούς, παράγοντες κινδύνου περιεγχειρητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας, ανατομικούς παράγοντες και την εμπειρία του χειρουργού.[4] Λόγω της ανάγκης δια βίου παρακολούθησης μετά την ενδοαγγειακή αποκατάσταση, οι νεαροί ασθενείς με χαμηλότερο χειρουργικό κίνδυνο μπορεί να ωφεληθούν περισσότερο από την ανοικτή χειρουργική



Εικόνα 13. Αποκατάσταση κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος. Πάνω: Για αποκατάσταση ανοικτής χειρουργικής, η αορτή συσφίγγεται και ανοίγεται ο σάκος ανευρύσματος. Το μόσχευμα συρράπτεται στην αορτή εγγύτατα και απομακρυσμένα. Ένα σωληνοειδές μόσχευμα (εικονογραφημένο) ή ένα διχαλωτό μόσχευμα ανάλογα με την έκταση της νόσου της λαγόνιας αρτηρίας (ανεύρυσμα ή στένωση). Μόλις το μόσχευμα είναι στη θέση του ο σάκος τους ανευρύσματος και το οπίσθοπεριτόναιο κλείνουν γύρω από το μόσχευμα. Κάτω: Για την ενδοαγγειακή αποκατάσταση, το αναδιπλούμενο μόσχευμα εισάγεται μέσω της μηριαίας (ή λαγόνιας) αρτηρίας και μόλις τοποθετηθεί σωστά το αυτό-επεκτεινόμενο μόσχευμα αναπτύσσεται. Οι επεκτάσεις των ιλιακών αρτηριών τοποθετούνται και αναπτύσσονται για να ολοκληρωθεί η επισκευή. (©2018, UpToDate, Inc. and/or its affiliates)

αποκατάσταση σε σύγκριση με τους πιο ηλικιωμένους ασθενείς με υψηλό χειρουργικό κίνδυνο, οι οποίοι ωφελούνται από την ενδαγγειακή αποκατάσταση.

Συμπτωματικό (μη ραγέν) ανεύρυσμα – Η αποκατάσταση ανευρύσματος συνιστάται σε ασθενείς με συμπτώματα (άλγος στην κοιλιά/πλάτη/πλευρά, θρομβοεμβολή κτλ) που δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλη αιτιολογία ανεξαρτήτως της διαμέτρου του ανευρύσματος. Η πρώτη προτεραιότητα σε αυτούς τους ασθενείς είναι να εξεταστεί εάν το ανεύρυσμα έχει ραγίσει ή εάν είναι κοντά σε επικείμενη ρήξη, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί είτε από κλινικά συμπτώματα και σημεία, είτε από ορισμένα ακτινολογικά χαρακτηριστικά (πχ ασβεστοποίηση, ασυμμετρία που μπορεί να υποδηλώνουν αστάθεια του ανευρύσματος ή συγκεκριμένο αιμάτωμα). Ελλείψει εμφανούς ρήξης, οι ασθενείς με ΑΚΑ που θεωρούνται συμπτωματικοί ή έχουν πιθανά σημάδια επικείμενης ρήξης θα πρέπει να κάνουν εισαγωγή για περαιτέρω παρακολούθηση και εκτίμηση. Εάν θεωρηθεί απαραίτητο η αποκατάσταση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια της νοσηλείας.

Ασυμπτωματικό ανεύρυσμα – Η αντιμετώπιση του ασυμπτωματικού ΑΚΑ βασίζεται στην εκτίμηση του κινδύνου ρήξης του ανευρύσματος σε σύγκριση με τον αναμενόμενο κίνδυνο της περιεγχειρητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας που συνδέονται με την αποκατάσταση για τον συγκεκριμένο ασθενή.[17] Τα ασυμπτωματικά ανευρύσματα με πάνω από 3 εκατοστά διάμετρο παρακολουθούνται στενά με υπερηχογραφική εξέταση ανά τακτά χρονικά διαστήματα (1-2 έτη). Πάνω από τη διάμετρο των 4 εκατοστών, χρειάζεται και μία απεικόνιση με αξονική τομογραφία για πιο λεπτομερή εκτίμηση, ενώ η παρακολούθηση πρέπει να είναι πιο συχνή (3 έως 6 μήνες). Πάνω από τη διάμετρο των 5,5 εκατοστών, τα ασυμπτωματικά ΑΚΑ έχουν ένδειξη για αντιμετώπιση, είτε ανοικτή είτε ενδαγγειακή

Φαρμακευτική θεραπεία – Κατά την περίοδο παρακολούθησης οι φαρμακευτικές θεραπείες στοχεύουν στη μείωση του ρυθμού της αορτικής επέκτασης και της νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρδιαγγειακές παθήσεις. Ωστόσο καμία θεραπεία, εκτός από την παύση καπνίσματος, δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη μείωση του ρυθμού διεύρυνσης του ΑΚΑ και πιθανότατα στον κίνδυνο ρήξης αυτού.

2. Ισχαιμία – Βλάβη επαναιμάτωσης

2α. Εισαγωγή

Μια από τις μεγαλύτερες ανησυχίες της αγγειακής χειρουργικής τις τελευταίες δεκαετίες είναι η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης που προκαλείται από την απόφραξη της υπερνεφρικής αορτής – ένας απαραίτητος χειρισμός κατά την EVAR.[18] Παρά το γεγονός ότι η EVAR θεωρείται η αντιμετώπιση εκλογής για την πλειοψηφία των ενδονεφρικών ΑΚΑ, η ανοικτή αποκατάσταση με αορτική διασταύρωση πάνω από τις νεφρικές αρτηρίες είναι ακόμα το πρότυπο για αορτικά ανευρύσματα.[19] Η τελευταία διαδικασία περιλαμβάνει μια προσωρινή απόφραξη των νεφρικών αρτηριών με αποκλεισμό της παροχής του αίματος στους νεφρούς για περίπου 30-60 λεπτά κατά τη διάρκεια υπερνεφρικής αορτικής διασταύρωσης. Αυτό σαν αποτέλεσμα αυξάνει τον μετεγχειρητικό κίνδυνο νεφρικής δυσλειτουργίας.[19] Αν και οι άμεσοι στόχοι της βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση φαίνεται να είναι τα όργανα τα οποία αποκλείονται άμεσα από την παροχή αίματος, συγκεκριμένα οι νεφροί, η γαστρεντερική οδός και οι μύες των κατώτερων άκρων, υπάρχουν σημαντικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι προκαλείται βλάβη και σε απομακρυσμένα όργανα όπως το μυοκάρδιο.[20]

2β. Βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και μεσολαβητές

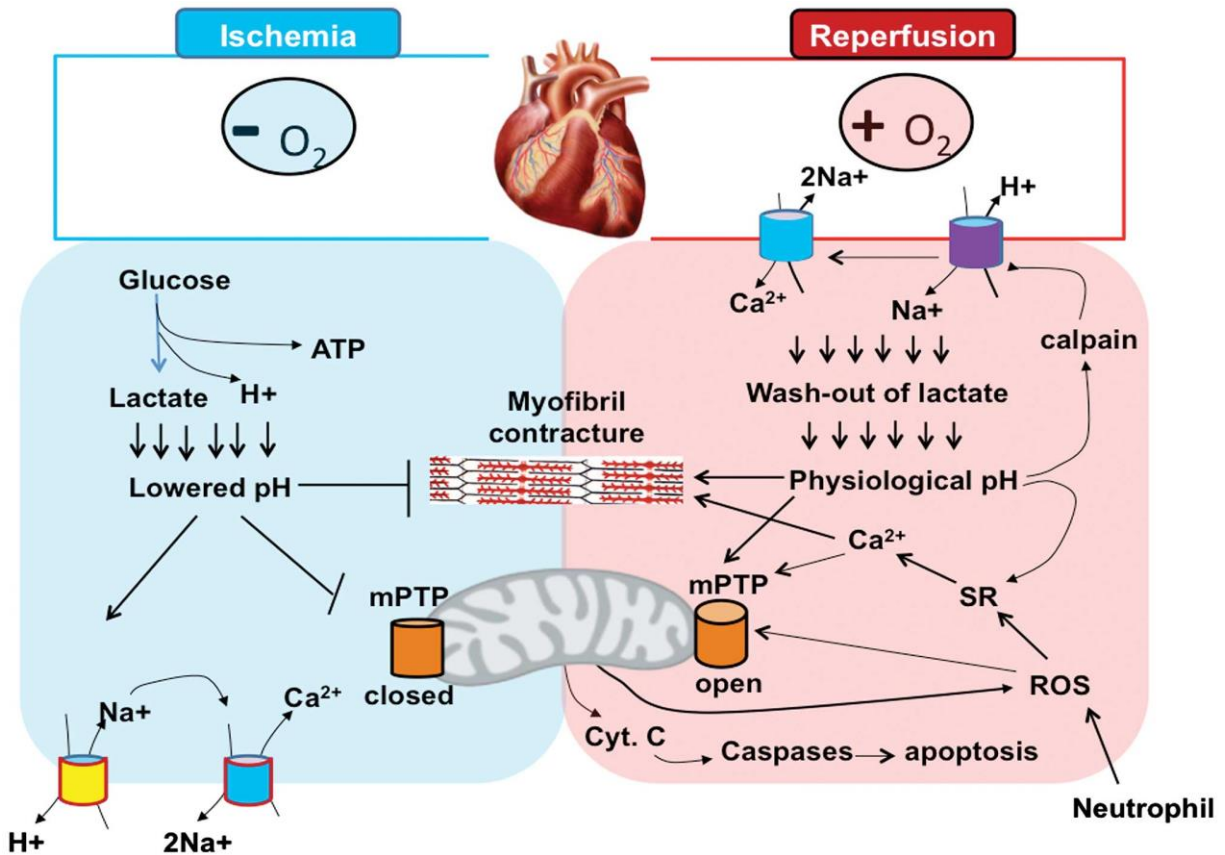
Το 1960 ο Jennings και οι συνεργάτες του αναφέρουν για πρώτη φορά το φαινόμενο της βλάβης της επαναιμάτωσης (reperfusion injury) και κάνουν λόγο για κυτταρική διόγκωση, σύσπαση των μυοϊνιδίων, αποδιοργάνωση του σαρκολλείματος κ.α.[21]

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου επάγει οξειδωτικό stress το οποίο από μόνο του μπορεί να επιφέρει μυοκαρδιακή βλάβη.[22] Η επανοξυγόνωση του μυοκαρδίου, δημιουργεί τέτοιο βαθμό βλάβης, ο οποίος υπερβαίνει κατά πολύ τη βλάβη που εισάγει από μόνη της η ισχαιμία.[23] Το οξειδωτικό stress κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης μειώνει επίσης τη διαθεσιμότητα του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μορίου του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και κατ'επέκταση και τις καρδιοπροστατευτικές του δράσεις.[24]

Τη στιγμή της επαναιμάτωσης συμβαίνει μια απότομη αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , η οποία με τη σειρά της προκαλεί βλάβη στη σαρκοπλασματική μεμβράνη και οξειδωτικό στρες. Αυτές οι δυο μορφές βλάβης «συντρίβουν» τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} στο μυοκαρδιακό κύτταρο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ενδοκυττάρια και μιτοχονδριακή υπερφόρτωση Ca^{2+} , η περίσσεια του οποίου εισάγει μυοκαρδιακό κυτταρικό θάνατο προκαλώντας υπερσυστολή των καρδιακών κυττάρων και άνοιγμα των μιτοχονδριακών διαύλων διαπερατότητας PTP.[25]

Η ταχεία αποκατάσταση του φυσιολογικού pH κατά την επαναιμάτωση, που ακολουθεί την εξάντληση του αποθέματος του γαλακτικού οξέος και την ενεργοποίηση της αντλίας ανταλλαγής Na^+/H^+ και την αντλία Na^+ /διτανθρακικών, συνεισφέρει στη θανατηφόρο βλάβη της επαναιμάτωσης. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως «το παράδοξο του pH».[26] Σε μυοκαρδιακά κύτταρα ποντικών, μελέτες έχουν δείξει ότι η επανοξυγόνωση με ρυθμιστικό διάλυμα (οξικού

οξέος/οξικού άλατος) είναι καρδιοπροστατευτική. Αυτή η δράση ίσως να προκαλείται από την αναστολή της διάνοιξης των mPTP διαύλων.[27, 28]



Εικόνα 14. Οι κύριοι συμμετέχοντες της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου: mPTP- μιτοχονδριακοί πόροι διαπερατότητας, SR - σαρκοπλασματικό δίκτυο, Cyt C- κυτόχρωμα C (Li et al, 2016)[29]

Μετά από ένα οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων παρασύρει τα ουδετερόφιλα στην περιοχή του εμφράγματος μέσα στις πρώτες 6 ώρες της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης και μέσα στις επόμενες 24 ώρες μεταναστεύουν μέσα στο μυοκάρδιο, αποφράσουν τις αρτηρίες και απελευθερώνουν ένζυμα και ελεύθερες ρίζες

οξυγόνου.[30] Έρευνες έχουν δείξει μείωση του μεγέθους των εμφραγμάτων κατά 50% με μερικές παρεμβάσεις, που στοχεύουν τα ουδετερόφιλα κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης.

Αρκετές εργαστηριακές και ορισμένες κλινικές μελέτες έχουν εξετάσει το ενδεχόμενο της καρδιοπροστασίας σε θεραπεία με γλυκόζη, ινσουλίνη και κάλιο χορηγούμενα σαν επιπρόσθετο στη μυοκάρδια επαναιμάτωση.[31, 32] Αυτές οι μελέτες οδήγησαν στο συλλογισμό ότι το ισχαιμικό μυοκάρδιο ωφελείται περισσότερο μεταβολίζοντας τη γλυκόζη σε σχέση με τα λιπαρά οξέα.[33] Όμως, μία μεγάλη και τυχαίοποιημένη έρευνα από διάφορα ερευνητικά κέντρα ανέφερε ότι η θεραπεία αυτή δεν παρέχει καρδιοπροστατευτικό όφελος σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου[34]. Η καθυστέρηση στην έναρξη της θεραπείας, η παράταση της περιόδου της ισχαιμίας και τα υψηλά και ενδεχομένως επιζήμια επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι οι λόγοι για τους οποίους δεν παρέχεται προστασία[32].

Οι μιτοχονδριακοί πόροι διαπερατότητας (mPTP) είναι μη εκλεκτικοί διάυλοι στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το άνοιγμα του διαύλου έχει σαν αποτέλεσμα την κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και οδηγεί σε εξάντληση του ATP και στον κυτταρικό θάνατο[35]. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας οι διάυλοι παραμένουν κλειστοί, ανοίγουν μόνο στα πρώτα λεπτά της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης ως απόκριση, στην υπερφόρτωση Ca^{2+} , στο οξειδωτικό στρες, στην αποκατάσταση του φυσιολογικού pH και στην εξάντληση του ATP[32, 36]. Συνεπώς οι mPTP διάυλοι είναι καθοριστικός παράγοντας στην βλάβη της επαναιμάτωσης και γι' αυτό το λόγο είναι και ένας σημαντικός στόχος για την επίτευξη καρδιοπροστασίας.

Συγκεντρωτικά λοιπόν, κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου συμβαίνουν αρκετές βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές που περιλαμβάνουν όλα τα παραπάνω, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ

τους και επάγουν τον μυοκαρδιακό θάνατο μέσω ανοίγματος των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (m PTP)[37].

3. Ενδογενείς μηχανισμοί προστασίας

Το μέγεθος του εμφράγματος μπορεί να περιοριστεί μέσω ενδογενών μηχανισμών καρδιοπροστασίας οι οποίοι χρονικά χωρίζονται σε κυρίως δυο κατηγορίες: α) Σε καρδιοπροστατευτική θεραπεία η οποία εφαρμόζεται πριν το επεισόδιο της παρατεταμένης ισχαιμίας (ischemic preconditioning) και β) Σε καρδιοπροστατευτική θεραπεία η οποία εφαρμόζεται μετά το τέλος της παρατεταμένης ισχαιμίας (ischemic postconditioning).[38]

3α. Ισχαιμική Προετοιμασία (Preconditioning, IPC)

Το 1986 ο Murry και οι συνεργάτες του περιγράφουν για πρώτη φορά το φαινόμενο της ισχαιμικής προετοιμασίας κατά το οποίο ένα ή περισσότερα επεισόδια βραχείας ισχαιμίας/επαναιμάτωσης εφαρμόζονται πριν από ένα επεισόδιο παρατεταμένης ισχαιμίας με εξαιρετικά σημαντικό καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα.[38] Από τότε και μετά έχουν γίνει πολυάριθμες πειραματικές μελέτες τόσο in vitro, όσο και in vivo σε μεγάλη ποικιλία πειραματοζώων για να προσδιοριστούν τα κυτταρικά και μοριακά σήματα καθώς και το μοριακό μονοπάτι που οδηγούν στη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος.

Μετά από ερευνητικές μελέτες φάνηκε ότι το preconditioning εισάγει τα καρδιοπροστατευτικά του οφέλη μέσω του μονοπατιού των RISK κινασών και ότι η φαρμακολογική αναστολή των κινασών αυτών κατά την επαναιμάτωση αναιρεί την καρδιοπροστασία.[39] Τα πιο σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και οι μεσολαβητές λοιπόν που εμπλέκονται στο preconditioning είναι : η φωσφατιδυλοϊνσιτολη-3-κινάση (PI₃K)-AKT, το μονοξείδιο του αζώτου NO-PKG, οι ATP

εξαρτώμενοι μιτοχονδριακοί δίαυλοι καλίου (mitoK_{ATP}), η αδενοσίνη, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι μιτοχονδριακοί δίαυλοι διαπερατότητας mPTP.[40] Σήμερα, το preconditioning είναι ξεκάθαρο ότι εισάγει καρδιοπροστασία σε όλα τα είδη ζώων που έχουν μελετηθεί και θεωρείται ως μια αποτελεσματική παρέμβαση εναντίον της βλάβης της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου.[40]

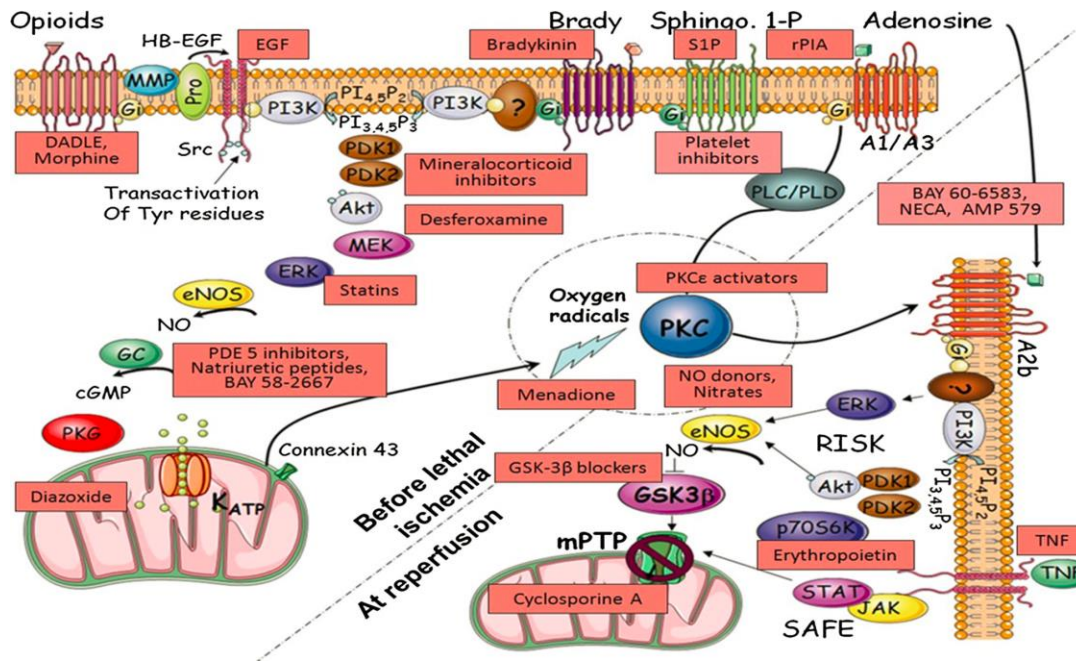
Επακόλουθο της σημαντικής αυτής ανακάλυψης ήταν η εύρεση φαρμακολογικών παραγόντων που να μιμούνται την καρδιοπροστατευτική δράση του IPC ή και να την επάγουν.[41] Παράγοντες όπως οι δότες μονοξειδίου του αζώτου, αναστολείς φωσφοδιεστεράσης, αγωνιστές των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων αδενοσίνης, η βραδυκινίνη, αγωνιστές οπιοειδών, η ενδοθηλίνη εισάγουν φαρμακολογικά το μυοκαρδιακό preconditioning ενεργοποιώντας τα κυτταροπροστατευτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος του μυοκαρδίου.

Η χρήση φαρμακολογικών παραγόντων που επάγουν ή μιμούνται την καρδιοπροστατευτική δράση του IPC έχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς η χορήγηση μιας μόνο δόσης ενός καλώς χαρακτηρισμένου και ασφαλούς φαρμακολογικού παράγοντα πριν από ένα ισχαιμικό επεισόδιο είναι πολλές φορές πιο εφικτή από την άμεση εφαρμογή του preconditioning.[40]

Το 1991 οι Liu et al. έδειξαν ότι η κατάσταση που προκύπτει από το IPC προέκυψε από ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος προστασίας.[42] Εγχύοντας αδενοσίνη ή ένα εκλεκτικό αγωνιστή αδενοσίνης A1 στις στεφανιαίες αρτηρίες για 5 λεπτά πριν από τον αποκλεισμό του στεφανιαίου τμήματος θέτει την καρδιά σε μια κατάσταση ίδια με αυτή του IPC. Αντίστροφα ένας ανταγωνιστής υποδοχέων αδενοσίνης (όπως η 8-SPT) μπλοκάρει τελείως την καρδιοπροστασία.

Ένας παροδικός στεφανιαίος αποκλεισμός έχει βρεθεί ότι απελευθερώνουν ουσίες για τους παρακάτω τέσσερις υποδοχείς: αδενοσίνη, βραδυκινίνη, οπιοειδή και σφιγγοσίνη. Αυτοί οι τέσσερις υποδοχείς δρουν με προσθετική δυναμική. Μπλοκάροντας έναν μόνο υπότυπο του υποδοχέα απλά

αυξάνει το ισχαιμικό κατώφλι προστασίας παρά να εξουδετερώνει την προστασία από IPC. Μεταγενέστερες μελέτες γρήγορα έδειξαν ότι η πρωτεϊνική κινάση C[43] και οι ευαίσθητοι διάλυοι ATP καλίου (KATP) οι οποίοι αποδείχθηκαν αργότερα ότι βρίσκονται στα μιτοχόνδρια[44] και μπορούν να διεγερθούν από το διαζωξείδιο, βρίσκονται επίσης στο μονοπάτι προστασίας IPC.



Εικόνα 15. Ένα προτεινόμενο σχήμα με κάποια από τα σημαντικότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην ισχαιμική προετοιμασία και μετischαιμική προστασία. Τα ροζ κουτιά υποδεικνύουν φαρμακευτικές παρεμβάσεις που έχουν αναφερθεί ότι μειώνουν το έμφραγμα του μυοκαρδίου όταν χορηγηθούν πριν την επανααιμάτωση. Έχουν τοποθετηθεί κοντά στην προτεινόμενη περιοχή δράσης τους. (Hausenloy et al., 2016)[45]

Το συνολικό μονοπάτι σηματοδότησης εξακολουθεί να μην είναι πλήρως κατανοητό αλλά έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα σε πολλά εργαστήρια και έχει αποκαλυφθεί μεγάλο μέρος αυτού όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.[46-49]

Το κλειδί για την κατανόηση του IPC είναι να κατανοηθεί η σημαντικότητα των παροδικών ισχαιμικών επεισοδίων πριν από την παρατεταμένη ισχαιμία. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων Gi

πρωτεϊνών οδηγεί στο άνοιγμα των μιτοχονδριακών KATP διαύλων κατά τη διάρκεια ισχαιμίας και την εισαγωγή καλίου μέσα στο μιτοχόνδριο. Όταν επανεισάγεται το οξυγόνο στη φάση επαναιμάτωσης, το αυξημένο μιτοχονδριακό κάλιο διεγείρει τα μιτοχόνδρια να παράξουν ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Αυτά τα μόρια προκαλούν redox signaling το οποίο τελικά οδηγεί στην ενεργοποίησης πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και ολοκλήρωση της διαδικασίας IPC.[50]

3α.ι. Δεύτερο παράθυρο προστασίας (Second window of protection, SWOP)

Το δεύτερο παράθυρο προστασίας περιγράφει την αυξημένη αντίσταση σε βλάβη του μυοκαρδίου που εμφανίζεται ξανά 12-24 ώρες μετά από τις παροδικές περιόδους ισχαιμίας-επαναιμάτωσης που διεγείρουν την κλασσική ή πρώιμη προετοιμασία. Το φαινόμενο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1993 από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες που έδρευαν στο Λονδίνο[51] και στην Οσάκα.[52]

Βάσει πολλών μελετών το SWOP είναι εμφανής κλινικά υπό συγκεκριμένες και ορισμένες συνθήκες αλλά είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με βεβαιότητα σε αναδρομικές μελέτες παρατήρησης που σχετίζονται με την καθημερινή κλινική πρακτική.

3β. Απόμακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία (Remote conditioning, RIPC)

Η απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία (RIPC) είναι ένα φαινόμενο που προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Przyklenk, Whittaker και συνεργάτες.[53, 54] Σημείωσαν ότι παροδικές περιόδους ισχαιμίας σε ένα απομακρυσμένο όργανο μπορεί να αποφέρει προστασία στην καρδιά και να μειώσει την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην RIPC είναι χωρίς αμφιβολία σύνθετοι και έχουν παραμείνει ατελείς.[48, 55-60] Εν συντομία, η τρέχουσα υπόθεσή είναι ότι το RIPC διεγείρει μια

νευροχυμική απόκριση, η οποία με τη σειρά της διεγείρει ένα καταρράκτη downstream αποτελεσμάτων. Υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία για νευρικά συστατικά του RIPC από τις πρώτες παρατηρήσεις ότι η χορήγηση εξαμεθώνιου – ενός ανταγωνιστή γαγγλίων- σε ζώα εξαλείφει την καρδιοπροστατευτική επίδραση της παροδικής μεσεντερικής ισχαιμίας[61] και μετέπειτα μελέτες δείχνουν ότι η τομή του ομόπλευρου μηριαίου νεύρου[62, 63] ή βαγοτομή διμερών αυχενικών[64] καταργεί την καρδιοπροστασία RIPC που προκαλείται από την ισχαιμία των άκρων. Αντιστρόφως, η άμεση διέγερση του μηριαίου νεύρου[65] ή των αισθητήριων νεύρων[66] μέσα στο άκρο έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν καρδιοπροστασία. Ωστόσο υπάρχουν επίσης αμφιλεγόμενα δεδομένα για τη συμμετοχή των νευρώνων στην RIPC καθώς το εξαμεθώνιο[67] ή νευρική διατομή[68] δεν κατήργησε την καρδιοπροστασία.

Σε αντίθεση με την ισχαιμική προετοιμασία και μετισχαιμική προστασία, η RIPC φαίνεται να έχει πλειοτροπικά αποτελέσματα που τροποποιούν τα μονοπάτια που εμπλέκονται στις οξείες και χρόνιες αποκρίσεις στη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και μπορεί να συμβάλει στα οφέλη της, συμπεριλαμβανομένης της βελτιωμένης ενδοθηλιακής λειτουργίας[69], μειωμένης συσσώρευσης αιμοπεταλίων[70, 71] και εκδηλώνεται μια σημαντική αντιφλεγμονώδης δράση νωρίς λόγω μείωσης της προσκόλλησης των ουδετερόφιλων[72] και αργότερα από μειωμένη φλεγμονή, κυτταρική διήθηση[55], μειωμένη τοπική φλεγμονή και μειωμένη αναδιαμόρφωση κατά τις εβδομάδες μετά το πειραματικό έμφραγμα του μυοκαρδίου[73].

3γ. Μετισχαιμική προστασία (Postconditioning, IPost)

Το 2003 ο Zhao και οι συνεργάτες του αναφέρουν για πρώτη φορά το φαινόμενο της μετισχαιμικής προστασίας (Postconditioning, IPost) κατά το οποίο διαδοχικοί κύκλοι βραχέων επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της στεφανιαίας αρτηρίας εφαρμοζόμενοι τα πρώτα λεπτά της

επαναιματώσεως αμέσως μετά το επεισόδιο της παρατεταμένης ισχαιμίας μειώνουν σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος. Ο Zhao και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν 3 κύκλους των 30 sec ισχαιμία/30 sec επαναιμάτωση σε αναισθητοποιημένους σκύλους μετά από 60 λεπτά ισχαιμίας και είχαν μείωση του εμφράγματος της τάξης του 44%, αποτέλεσμα συγκρίσιμο με αυτό του preconditioning.[74]

Στη πορεία ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες από πολλές ερευνητικές ομάδες με διαφορετικούς κύκλους επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης που εφαρμόστηκαν σε διάφορα είδη πειραματόζωων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες που έγιναν στον άνθρωπο όπου φάνηκε ότι το Postconditioning έχει παρόμοια ευεργετικά αποτελέσματα με αυτά που έδωσαν τα in vivo πειράματα.[75]

Η προστασία που προσδίδει η μετισχαιμική προστασία εξαρτάται από τον αριθμό των βραχέων επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ειδικά στα γουρούνια όπως φάνηκε από μελέτη του κ. Ηλιοδρομίτη και των συνεργατών του το 2006, αλλά η συνεχόμενη αύξηση των κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης δεν οδηγεί απαραίτητα σε ανάλογη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος όπως έδειξαν μελέτες του Kim και των συνεργατών του το 2004 σε κουνέλια και του Yang και της ομάδας του το 2004.[76-78]

Το Postconditioning έχει δείχθει ότι μειώνει την απόπτωση και επομένως και τη νέκρωση των κυττάρων που εισάγει η επαναιμάτωση μετά το ισχαιμικό επεισόδιο, επιπλέον μειώνει τις αρρυθμίες, τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων στην ισχαιμική περιοχή, το ενδοθηλιακό τραύμα και τη φλεγμονή.[40] Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η σημασία της μετισχαιμικής προστασίας είναι πολύ σημαντική αφού αφενός περιορίζει τη βλάβη που υφίσταται το ισχαιμικό μυοκάρδιο κατά

την επαναιμάτωση και αφετέρου είναι μια μέθοδος κλινικά εφαρμόσιμη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική.

Αυτό το γεγονός τη διαφοροποιεί σημαντικά από την μέθοδο της ισχαιμικής προετοιμασίας που η κλινική εφαρμογή της είναι αρκετά δύσκολη καθώς ο χρόνος της επερχόμενης παρατεταμένης ισχαιμίας είναι άγνωστος. Εκτός όμως των ασθενών που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική και μπορούν να ωφεληθούν από το IPost υπάρχουν και ασθενείς που η επαναιμάτωση γίνεται μέσω θρομβόλυσης όπου ο χρόνος διανοίξεως της αρτηρίας είναι άγνωστος και επομένως είναι προφανής η ανάγκη ανεύρεσης φαρμακολογικών παραγόντων που να μιμούνται την μετισχαιμική προστασία.[79]

Μελέτες ετών έχουν ταυτοποιήσει συγκεκριμένους παράγοντες οι οποίοι όταν χορηγηθούν κατά την επαναιμάτωση μειώνουν τη βλάβη της επαναιμάτωσης.[80] Τέτοιοι παράγοντες είναι η βραδυκίνη, η κυκλοσπορίνη Α, η ερυθροποιητίνη (EPO), το NO, η αδενοσίνη κ.α οι οποίοι παρουσιάζουν καρδιοπροστατευτική δράση, όταν χορηγούνται κατά την επαναιμάτωση σε πειραματικές μελέτες. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εισάγουν την καρδιοπροστασία είναι διάφοροι. Για παράδειγμα η αδενοσίνη μειώνει την αλληλεπίδραση ουδετερόφιλων- ενδοθηλίου, η ερυθροποιητίνη, η βραδυκίνη και πολλοί άλλοι παράγοντες ενεργοποιούν το μονοπάτι των κινασών διάσωσης που αναστέλλουν το άνοιγμα των mPTP διαύλων και με αυτό τον τρόπο εισάγουν καρδιοπροστασία.

Οι φαρμακολογικοί παράγοντες μπορούν όχι μόνο να μιμηθούν το IPost αλλά επίσης να ενισχύσουν τη δράση του, ενεργοποιώντας ένα διαφορετικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος ή να επιμηκύνουν τη δράση του πέρα από την αρχική φάση της επαναιμάτωσης. Η πιθανή ενίσχυση ή μίμηση του IPost με φαρμακολογικούς παράγοντες αποτελεί πάντως γόνιμο έδαφος για έρευνα.[40]

3δ. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Έπειτα από μελέτες τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στην ισχαιμική προετοιμασία και στην μετσχαιμική προστασία συγκλίνουν (Εικ.2). Η διαδικασία ξεκινά με ενδογενείς ουσίες όπως η αδενοσίνη, τα οπιοειδή και η βραδυκινίνη, οι οποίες συνδέονται με υποδοχείς της G πρωτεΐνης στην επιφάνεια του κυττάρου και κατόπιν ενεργοποιείται η διαδικασία PI₃-Akt.[81] Με την ενεργοποίηση της PI₃-Akt ακολουθούν η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου, η γουανυλική κυκλάση και η πρωτεϊνική κινάση G, η οποία οδηγεί στο άνοιγμα των mitoK_{ATP} διαύλων που με τη σειρά του ενεργοποιεί άλλες κινάσες διάσωσης μέσω αναγέννησης ενεργών μορφών οξυγόνου. Οι κινάσες της δεύτερης φάσης με μεσολαβητή και πάλι την PI₃-Akt οδηγούν στην αναστολή της GSK-3β κινάσης κλείνοντας έτσι τους mPTP πόρους και οδηγώντας σε καρδιοπροστασία.[82]

3ε. Ενδογενείς ουσίες

Αδενοσίνη: Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο φαρμακολογικός ανταγωνισμός των υποδοχέων της αδενοσίνης αναστέλλει την καρδιοπροστατευτική δράση του IPost.[83] Η παρατήρηση αυτή επιβεβαίωσε το ρόλο της ενδογενούς αδενοσίνης που σχηματίζεται κατά την ισχαιμία και της οποίας η απομάκρυνση καθυστερεί το IPost. Οι υποδοχείς της αδενοσίνης που παίζουν ρόλο στην καρδιοπροστασία είναι σύμφωνα με μελέτες οι A_{2A}, A_{2B}, A₃ υποδοχείς.[84, 85]

Οπιοειδή: Πεπτίδια των οπιοειδών και οι κυριότεροι υποδοχείς τους (μ, δ, κ) είναι παρόντες στο μυοκάρδιο. Το IPost διατηρεί τις συγκεντρώσεις των μυοκαρδιακών πεπτιδίων των οπιοειδών σταθερές κατά τα αρχικά στάδια της επαναιμάτωσης. Ο μη εκλεκτικός ανταγωνιστής των υποδοχέων των οπιοειδών, ναλοξόνη, ή οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των μ, δ και κ υποδοχέων όταν χορηγήθηκαν σε ποντίκια κατάργησαν την προστασία του IPost.[86, 87] Αντίθετα η χορήγηση

μορφίνης εισήγαγε φαρμακολογικό IPost και επόμενες μελέτες έδειξαν ότι αυτό είναι ανεξάρτητο της κατηγορίας του υποδοχέα που διεγείρεται.[88, 89]

Βραδυκίνη: Η βραδυκίνη είναι ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο το οποίο παράγεται στο καρδιαγγειακό ενδοθήλιο. Έχουν αναγνωριστεί δύο υποδοχείς της οι B₁ και B₂ από του οποίους ο B₂ εκφράζεται συνεχώς στον καρδιαγγειακό ιστό, ενώ ο B₁ σε υποξία και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις.[90] Ο μηχανισμός με τον οποίο η βραδυκίνη εισάγει τα προστατευτικά της αποτελέσματα στο IPost δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος αλλά έχει περιγραφεί ότι υπάρχει συμμετοχή του NO και της προσταγλανδίνης (PGI₂) που συντίθενται στο μυοκάρδιο.[91, 92] Η προστασία που εισάγει η ενδογενής αλλά και η εξωγενής βραδυκίνη στο IPost γίνεται μέσω ενεργοποίησης και των δυο υποδοχέων της.

Συμπερασματικά το postconditioning αυξάνει τη συγκέντρωση των ενδογενών αυτών μεταβιβαστών κατά τα πρώτα στάδια της επαναιμάτωσης. Η αύξηση αυτή μέσω ενεργοποίησης των ειδικών τους υποδοχέων, συνεισφέρει στη μείωση της θανατηφόρου βλάβης κατά την επαναιμάτωση, ενώ αν εμποδίσουμε τη δράση οποιουδήποτε από αυτούς του μεταβιβαστές τότε η προστασία που παρέχει το IPost καταργείται. Σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι η εξωγενής χορήγηση ενός τέτοιου μεταβιβαστή είναι ικανή να εισάγει προστασία παρόμοια με αυτή του postconditioning.[79]

4. Οξειδωτικό στρες

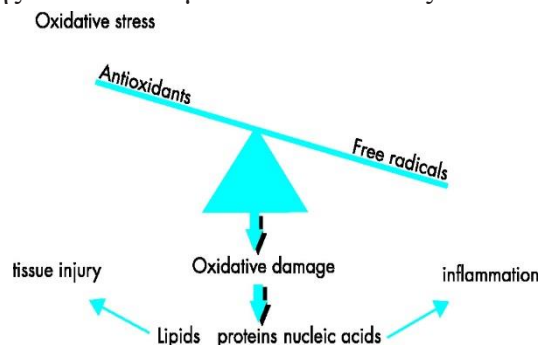
Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από την ανισορροπία μεταξύ της δημιουργίας δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και της απομάκρυνσης αυτών διαμέσου του αντιοξειδωτικού συστήματος.[93] Εκτός από λιπιδική υπεροξείδωση

και οξειδωτική βλάβη DNA παρεμβαίνει και τροποποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμιστικά συστήματα των κυττάρων. Τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου είναι γνωστά ως ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ουσίες οι οποίες έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους

στιβάδα.[94] Τα ηλεκτρόνια αυτά είναι πολύ ασταθή και αντιδρούν πολύ εύκολα με άλλα άτομα ή μόρια. Είναι πολύ επικίνδυνα για ουσίες του σώματος όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και το DNA.

Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς.[95] Υπάρχουν ωστόσο και μόρια οξυγόνου όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου και το μοριακό οξυγόνο οι οποίες αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, συμπεριφέρονται σαν αυτές. Οι πιο σημαντικές ρίζες οξυγόνου είναι το μοριακό οξυγόνο, το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα του υδροοξυλίου (OH) και η ρίζα υπεροξειδίου του υδρογόνου (ROO).

Η ρίζα μονοξειδίου του αζώτου είναι επίσης μια ελεύθερη δραστική ρίζα.[96] Το NO αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών, όπως η νευρομεταβίβαση, η ρύθμιση αρτηριακής πίεσης, η χάλαση λείων μυϊκών ινών και η ανοσία.[97]



Εικόνα 16. Οξειδωτικό στρες υφίσταται όταν υπάρχουν παραπάνω ελεύθερες ρίζες από ότι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που τις εξουδετερώνουν. (Kelly Frank, 2003)[1]

Μπορεί να μετατραπεί σε πολλές άλλες δραστικές ρίζες αζώτου όπως NO^+ και το υπεροξυνιτρόδες (ONOO^-).

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες έχει καταστεί πλέον αποδεκτός στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων όπως της αθηροσκλήρυνσης, της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη, του συνδρόμου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης κτλ. [98, 99] Επίσης η φλεγμονή,[100] ορισμένες μορφές καρκίνου[101] και η διεργασία της γήρανσης[102] έχουν αποδοθεί εν μέρει στη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

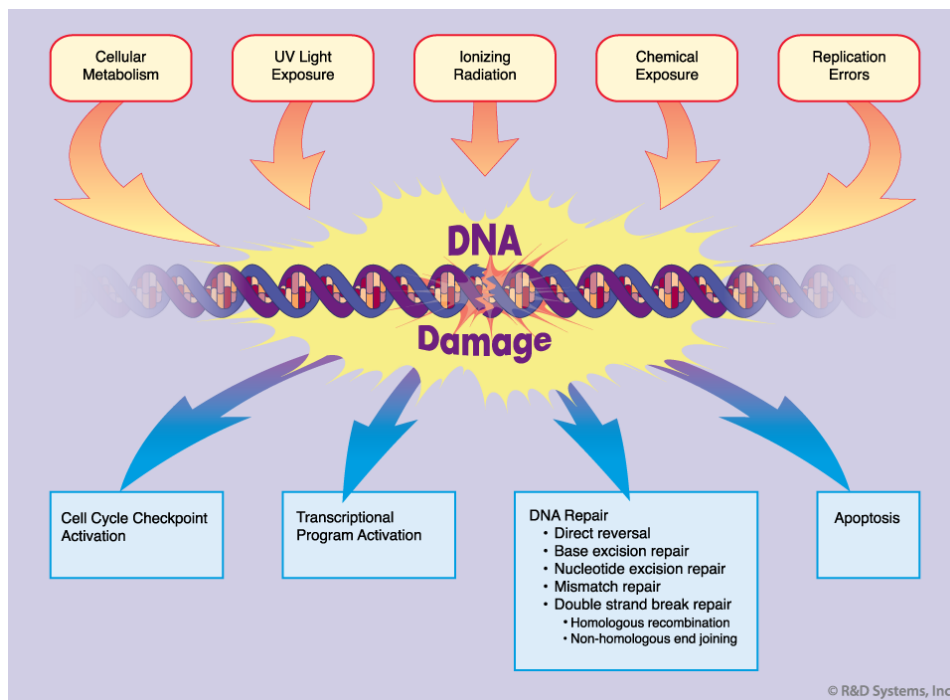
5. Μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες DNA (DNA damage response, DDR)

5α. Εισαγωγή

Όλα τα κύτταρα είτε είναι προκαρυωτικά είτε ευκαρυωτικά υπόκεινται σε συνεχής έκθεση σε εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες που βλάπτουν το DNA. Οι βλάβες αυτές μπορούν να μπλοκάρουν την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA και εάν δεν διορθωθούν ή εάν διορθωθούν με λανθασμένο τρόπο, μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να αποβούν μοιραίες για το κύτταρο ή και για ολόκληρο τον οργανισμό.[103, 104]

Πολλές από αυτές τις βλάβες μπορούν να προέλθουν από αναντιστοιχία βάσεων του DNA κατά τη διαδικασία αντιγραφής και μεταγραφής και από ενζυματικές αντιδράσεις -αλλοιώσεις βάσεων οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπουρινώσεις, απαμινώσεις-, θραύση της μιας αλυσίδας DNA (single-strand break SSB), διμερή πυριμιδινών, προσθήκη ογκωδών χημικών μορίων, θραύση και των δυο αλυσίδων DNA (double-strand break DSB). Ωστόσο η βλάβη του DNA μπορεί να προκύψει και από ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου τα οποία έχουν προέλθει από οξειδωτικές αντιδράσεις, φλεγμονή κτλ.[105, 106] Κάθε τύπος βλάβης ενεργοποιεί και τον αντίστοιχο μηχανισμό

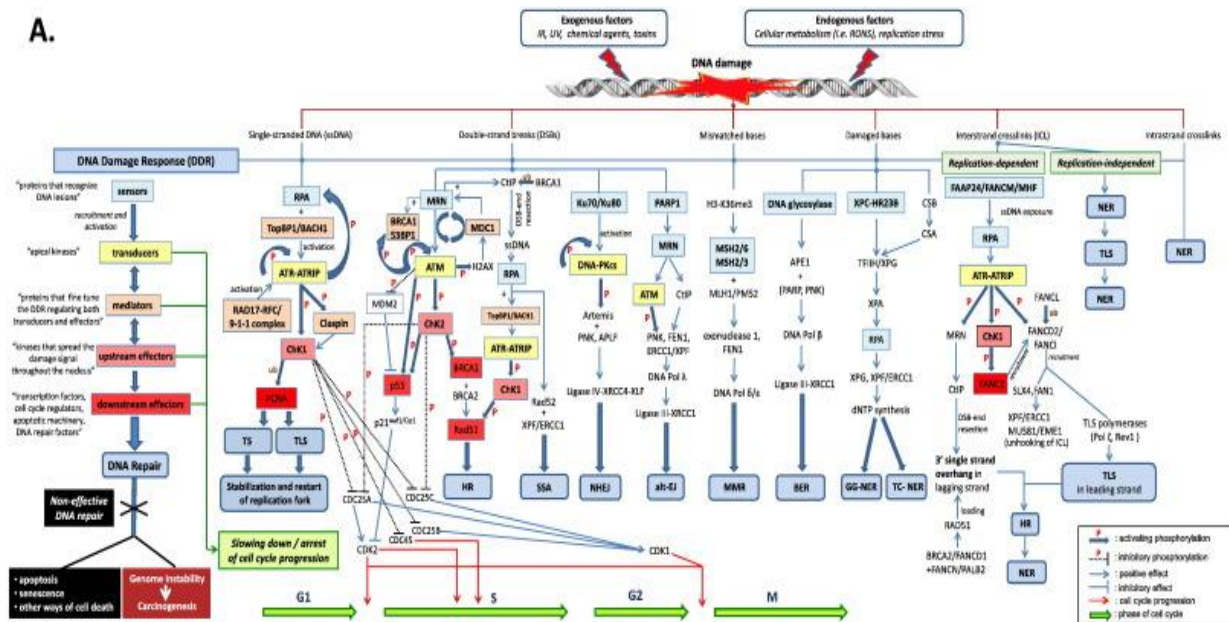
επιδιόρθωσης. Ο πιο σημαντικός και τοξικός όμως για το κύτταρο είναι οι δικλωνικές θραύσεις του DNA που προκαλούνται τόσο από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες X, γ-ακτινοβολία), γενετοξικοί χημικοί παράγοντες όπως ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όσο και από ενδογενείς παράγοντες όπως ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη μεταβολική διεργασία της αναπνοής, αντιγραφικό στρες, μείωση μήκους τελομερών. Επίσης φυσιολογικές δικλωνικές θραύσεις εμφανίζονται κατά τις διαδικασίες ανασυνδυασμού στο πλαίσιο της ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων και κατά τον μειωτικό ανασυνδυασμό.



Εικόνα 17. Απόκριση στη βλάβη DNA. Η βλάβη DNA προκαλείται από διάφορες πηγές. Η κυτταρική απόκριση στη βλάβη μπορεί να περιλαμβάνει ενεργοποίηση ενός σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, έναρξη μεταγραφικών προγραμμάτων, εκτέλεση επισκευής DNA ή έναρξη απόπτωσης όταν η βλάβη είναι εκτεταμένη. (©R&D Systems, 2003 Catalog)

Οι βλάβες που προκύπτουν εντοπίζονται ταχύτατα με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ένα εσωτερικό κύκλωμα μεταγωγής σήματος γνωστό και ως απόκριση βλάβης DNA ή DNA damage response (DDR).[103] Το DDR επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση, αφενός, μηχανισμών

επιδιόρθωσης του DNA και, αφετέρου, την ενεργοποίηση σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) που οδηγούν σε προσωρινή ή μόνιμη (γήρανση) αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) από σημεία άρσης του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints), τα κατάλληλα μονοπάτια διόρθωσης DNA είτε/ και εκκίνησης διαδικασιών απόπτωσης. Οι βλάβες εντοπίζονται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα που ανιχνεύουν τις θραύσεις (αισθητήρες, sensors) και προσδένονται στο DNA. Η ενεργοποίηση της αρχικής κινάσης σε κάθε μονοπάτι οδηγεί στη φωσφορυλίωση πλήθους υποστρωμάτων και την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών που βρίσκονται καθοδικά και που συνεχίζουν τη μετάδοση του σήματος (μεταγωγείς, transducers) μέχρι την τελική ενεργοποίηση των τελικών μορίων του μονοπατιού (τελεστές, effectors) που είναι υπεύθυνα για το τελικό αποτέλεσμα (επιδιόρθωση, αναστολή κυτταρικού κύκλου, γήρανση, απόπτωση). [103]



Εικόνα 18. Μια σχηματική παρουσίαση της απόκρισης στη βλάβη DNA και των μονοπατιών επιδιόρθωσης που ενεργοποιούνται από διάφορους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. (Pateras et al., 2015)[107]

5β. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών DNA όπως το mismatch repair (MMR) που διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισγωγή μιας ή λίγων (2-4) λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων, base excision repair (BER)[108] που διορθώνει αλλοιώσεις μιας μόνο βάσης νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) και θραύσης μίας αλυσίδας DNA, nucleotide excision repair (NER)[109] που διορθώνει αλλοιώσεις που εκτείνονται σε δυο ή περισσότερα νουκλεοτίδια (για παράδειγμα διμερή θυμίνης) και την προσθήκη ογκωδών μορίων.

5β. i. Μονοπάτι απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις

Οι δικλωνικές θραύσεις, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, τη διάρκεια και την έκταση της βλάβης, ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και προκαλούν διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Έτσι, για θραύσεις του DNA που συμβαίνουν στις φάσεις πριν την αντιγραφή του DNA, δηλαδή στις φάσεις G1 και G0, χρησιμοποιείται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης συνένωσης μη-ομόλογων άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ), ο οποίος ενεργοποιείται από την κινάση DNA-PK. Τα χαρακτηριστικά του μηχανισμού αυτού είναι η ταχύτητα, η απλότητα αλλά και η μεγαλύτερη πιθανότητα για λάθη. Επίσης, ο κύριος στόχος σε αυτήν την περίπτωση είναι η γρήγορη και άμεση επιδιόρθωση της βλάβης χωρίς δυνατότητα ενεργοποίησης σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Αντίθετα, όταν οι θραύσεις επιμένουν ή όταν συμβαίνουν κατά τις φάσεις S και G2, όπου το DNA του κυττάρου έχει αντιγραφεί, ενεργοποιείται ένας άλλος μηχανισμός επιδιόρθωσης, ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR) μέσω της κινάσης ATM.[110, 111]. Με τη

διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού η επιδιόρθωση της βλάβης γίνεται με τη χρήση της αδελφής χρωματίδας ως εκμαγείου, γι' αυτό και ο ομόλογος συνδυασμός είναι πιο αξιόπιστος, αλλά και πολύπλοκος.

Άλλο ένα χαρακτηριστικό σημείο των DSB είναι η μαζική φωσφορυλίωση της ιστόνης H2ax.[112] Εστίες φωσφορυλιωμένου H2ax δημιουργούνται ταχύτατα σε σημεία DSB και θεωρούνται απαραίτητα για την περαιτέρω ενεργοποίηση πρωτεϊνών του DDR. Συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί δυο διαφορετικές εστίες: μία μικρή, πρόιμη εστία που συνήθως παρατηρείται σε κύτταρα 10λεπτά έως και 8ώρες μετά από την έκθεση DNA στη βλάβη και μια μεγαλύτερη, καθυστερημένη εστία που αρχίζει να εμφανίζεται στις 4ώρες και επιμένει μέχρι και τουλάχιστον 24ώρες μετά από την επιδιόρθωση.[113] Στο παρόν δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος των διαφορετικών αυτών εστιών, ωστόσο η πληθώρα και πυκνότητα των πρωτεϊνών στις περιοχές DSB μπορεί να είναι σημαντικές για τη μεγέθυνση της μεταγωγής σήματος επιδιόρθωσης και για τη διευκόλυνση επιδιόρθωσης πιο μόνιμης βλάβης.[113]

Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 2×10^4 βλάβες DNA συμβαίνουν σε κάθε κύτταρο του ανθρώπινου σώματος κάθε μέρα.[114] Ένα σημαντικό ποσοστό από αυτές τις βλάβες προκαλείται από τα ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου (ROS). Τα ROS σε φυσιολογικά επίπεδα είναι σημαντικά για τη ρύθμιση μονοπατιών μεταγωγής σήματος και έκφρασης γονιδίων. Ωστόσο η ενδογενής ή εξωγενής παραγωγή τους σε υψηλά επίπεδα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA και να επιφέρουν πολλές βλάβες.[115]

Η 8-υδροξυδεοξυγουανোসίνη (8-oxo-G) η οποία είναι μια οξειδωμένη μορφή της γουανίνης, είναι ένα βασικό παράγωγο βλάβης DNA από οξειδωτικό στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις – A:T to C:C ή G:C to T:A.[116] Οι βλάβες όπως η 8-oxo-G θεωρούνται εδραιωμένοι βιοχημικοί δείκτες οξειδωτικού στρες.[117]

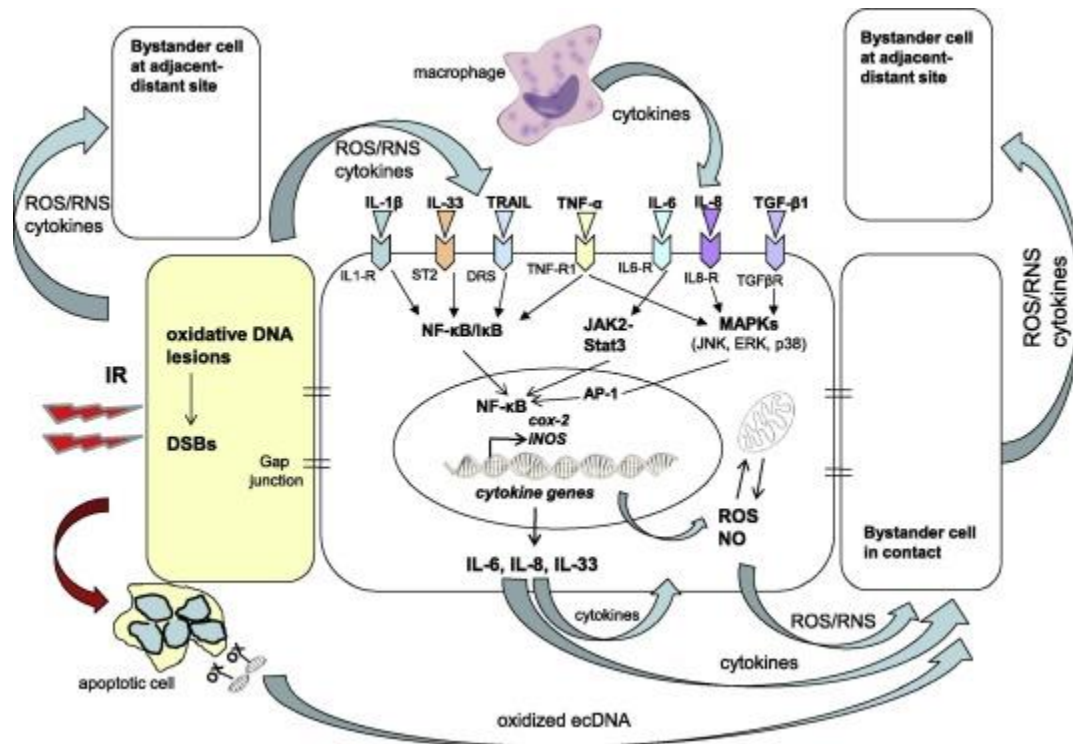
5γ. Απομακρυσμένη δράση επιδιόρθωσης βλάβης DNA (bystander effect)

Η ιονίζουσα ακτινοβολία (ionizing radiation, IR) χρησιμοποιείται τις τελευταίες δεκαετίες για θεραπευτικούς και διαγνωστικούς σκοπούς, ιδιαίτερα σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Ωστόσο η IR έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία λειτουργώντας ως καρκινογόνο ή/και μεταλλαξιογόνο, ακόμα και σε χαμηλές δόσεις. Παρόλο που θεωρείτο ότι οι επιπτώσεις αυτές περιορίζονταν μόνο στα κύτταρα της παθούσας περιοχής τα τελευταία χρόνια υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν κυτταρικές αλλοιώσεις σχετιζόμενες με την ακτινοβολία σε ιστούς και όργανα απομακρυσμένα από την πάσχουσα περιοχή.[118, 119] Αυτές οι απομακρυσμένες αλλοιώσεις προκαλούμενες από ακτινοβολία παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Mole το 1953 και είχε χαρακτηριστεί ως «δράση σε απόσταση από την ακτινοβοληθείσα περιοχή αλλά μέσα στο ίδιο όργανο.»[120, 121]

Οι Nagasawa και Little το 1992 ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν *in vitro*, τις προκαλούμενες από ακτινοβολία γονοτοξικές επιδράσεις σε μη ιονιζόμενα κύτταρα τα οποία ήταν σε γειτνίαση με τα απευθείας ιονιζόμενα κύτταρα.[122] Συγκεκριμένα έδειξαν ότι όταν εκτίθενται σε πολύ χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας α-σωματιδίων μονοστρωματικές καλλιέργειες από κύτταρα ωοθηκών κινέζικων hamster, όπου λιγότερο από 1% διέσχισαν τον πυρήνα, ένα ποσοστό μεγαλύτερο από 30% των κυττάρων έδειξε μεγάλη επίπτωση στην ανταλλαγή αδερφών χρωματίδων (sister chromatid exchange, SCE). Αυτή η επίδραση χαρακτηρίστηκε ως απομακρυσμένη επίδραση προκαλούμενη από ακτινοβολία. Πλέον ο χαρακτηρισμός αυτός αναφέρεται σε όλες τις βιολογικές επιδράσεις που εμφανίζονται σε μη ιονιζόμενα κύτταρα, ως αποτέλεσμα της απόκρισης τους στα σήματα που λαμβάνουν από τα απευθείας ιονιζόμενα κύτταρα.[121, 123, 124]

Οι απομακρυσμένες επιδράσεις περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών και βλαβών όπως η βλάβη DNA[125], κακοήθεις μεταλλάξεις[126], χρωμοσωμικές αλλοιώσεις[127], κυτταρικός θάνατος[128], απόπτωση[129] και ραδιενεργές αποκρίσεις[130].

Αν και δεν έχουν διευκρινιστεί οι ακριβείς μηχανισμοί των απομακρυσμένων επιδράσεων, είναι σίγουρο ότι εμπλέκονται πολλοί παράγοντες και σηματοδοτικά μόρια. Τα τελευταία μεταδίδονται κυρίως μέσω χασμάτων, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε φυσική επαφή, καθώς και μέσω διαλυτών μορίων που απελευθερώνονται στο μεσέγχυμα. Επιπλέον ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου ή/και αζώτου, καθώς και κυτοκίνες συμμετέχουν στον απομακρυσμένο μηχανισμό μέσω εκκριτικών παραγόντων.[124]



Εικόνα 19. Προτεινόμενο μοντέλο ενδο- και δια-κυτταρικής μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν το απομακρυσμένο αποτέλεσμα από ιονίζουσα ακτινοβολία. (Havaki et al.,2015)[121]

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), συμμετέχουν ενεργά σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική ανάπτυξη, η κυτταρική σηματοδότηση, η ανοσολογική απόκριση και η φλεγμονή. Προκειμένου να διατηρηθούν οι συγκεντρώσεις τους σε χαμηλά επίπεδα τα κύτταρα έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Για να αντιμετωπίσουν περαιτέρω τις καταστροφικές συνέπειες του οξειδωτικού στρες τα κύτταρα ενεργοποιούν και μονοπάτια επιδιόρθωσης DNA.[131]

Η χρόνια έκθεση σε οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αλλοιώσεις στο γονιδίωμα λόγω της συσσώρευσης οξειδωμένου DNA ενισχύοντας τη μεταλλαξογένεση και ανθρώπινη παθογένεση. Οι οξειδωτικές αλλοιώσεις του DNA είναι συνήθως απουρινικές / απυριμιδικές, μονοκλωνικές θραύσεις DNA, τροποποιήσεις εν μέρει σακχάρων, απαμίνωση και απώλεια βάσεων.[117, 132, 133] Η πιο συνήθης οξειδωτική αλλοίωση DNA είναι η 8-οξο-2-δεοξυγοανοσίνη (8-oxo-2-deoxyguanosine, 8-oxo-G) η οποία και χρησιμοποιείται ως αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε πολλά βιολογικά συστήματα.

Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία ότι τα ROS/ RNS συμβάλλουν στο απομακρυσμένο αποτέλεσμα εξοκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μέσω πολλών διαδοχικών γεγονότων.[124] Παράγονται απευθείας από τα άμεσα ιονιζόμενα κύτταρα (ή κύτταρα που εκτίθενται σε βλάβη, ισχαιμία κτλ.) ή έμμεσα μέσω φλεγμονωδών διαδικασιών και περνούν σε γειτονικά bystander κύτταρα, μέσω παθητικής διάχυσης, χάσματος ή ενεργούς μεταφοράς.[134] Αν και τα ROS έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και προκαλούν βλάβη τοπικά, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) έχει σχετικά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής.[135] Μπορεί επίσης να μεταναστεύσει ελεύθερα μέσω μεμβρανών και να ταξιδέψει μακρινές αποστάσεις προκαλώντας βλάβη DNA σε απομακρυσμένα σημεία. Η παρουσία δεσμευμένης με τη μεμβράνη πλάσματος οξειδάσης $NAD(P)H$ είναι

σημαντικός παράγοντας για την περίσσεια παραγωγή ενδοκυτταρικού ROS στα κύτταρα που έχουν υποστεί απαυθείας βλάβη, καθώς και για την έντονη παραγωγή τους σε bystander κύτταρα.[136, 137]

Η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στη βλάβη DNA σε απομακρυσμένα bystander κύτταρα ενισχύεται περαιτέρω από κυτοκίνες, καθώς υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά φλεγμονωδών διαδικασιών. Συγκεκριμένα κυτοκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και ιντερλευκίνη-33 (IL-33) απελευθερώνονται από ιονιζόμενα (τραυματισμένα) κύτταρα. Μετέπειτα δεσμεύονται σε υποδοχείς bystander κύτταρα και προκαλούν τοπική παραγωγή των ROS και NO ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κβ. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση του iNOS και COX-2 γονιδίων.[138-140]

Επίσης η κυτοκίνη μετασχηματισμένου παράγοντα ανάπτυξης (transforming growth factor-β1, TGF-β1) που απελευθερώνονται από ιονιζόμενα κύτταρα, συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση της NAD(P)H οξειδάσης οδηγώντας σε ενδοκυτταρική παραγωγή ROS. Η TGF-β1 μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει το TNF-α, το μονοπάτι MAPK (mitogen-activated protein kinase) οδηγώντας στη παραγωγή ελεύθερων ριζών στα bystander κύτταρα.[137, 138, 141]

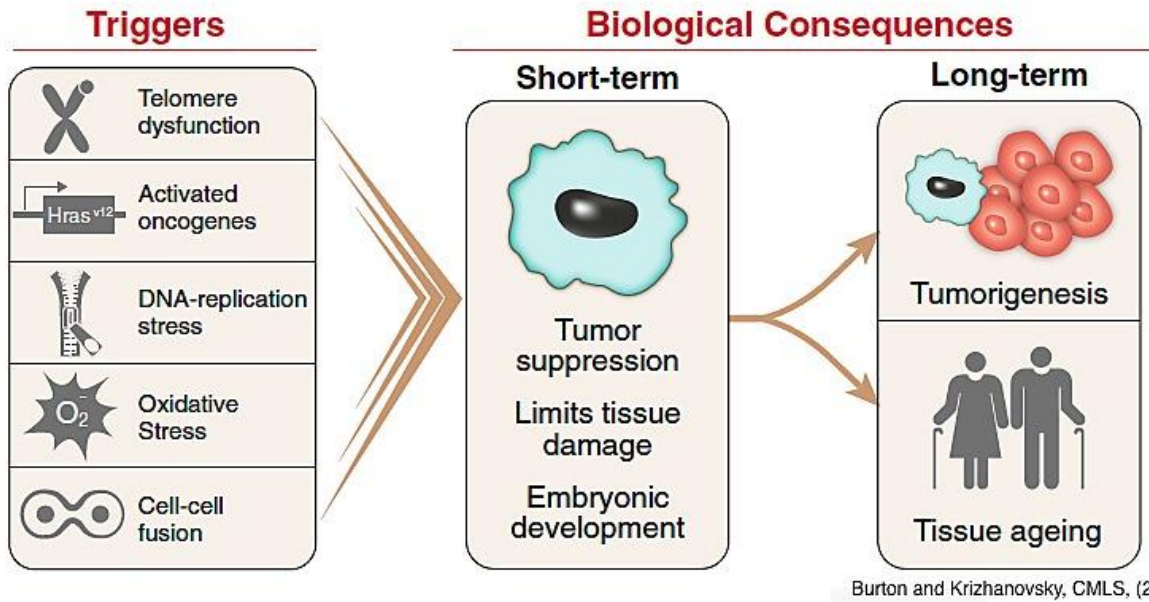
6. Γήρανση

Η ομοιότητα των οργανισμών εξασφαλίζεται από τη δράση κυτταρικών μηχανισμών έναντι ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων. Η γενικότερη πορεία του κυττάρου εξαρτάται από το είδος, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος, την φάση κατά την οποία βρίσκεται το κύτταρο και το ευρύτερο περιβάλλον. Κατά τη διάρκεια εξέλιξης των πολυκύτταρων οργανισμών αναπτύχθηκαν ποικίλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί με σκοπό τη ρύθμιση του αριθμού και του μεγέθους των κυττάρων, το συντονισμό δημιουργίας νέων κυττάρων, τη διαφορετικότητα ως προς

τη δομή και λειτουργία των κυττάρων και την εξάλειψη πλεονάζοντων ή προβληματικών κυττάρων.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι κυτταρικού θανάτου όπως η απόπτωση (τύπου 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου), η ανοίκιση (απόπτωση λόγω απώλειας της κυτταρικής πρόσφυσης), η αυτοφαγία (τα ίδια τα κύτταρα αιχμαλωτίζουν και ανακυκλώνουν στα λυσοσώματα ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και οργανίδια), η μιτωτική καταστροφή (σταματά η διαδικασία της μίτωσης), η παράπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που διαφέρει μορφολογικά από την απόπτωση), η κυτταρική γήρανση και η νέκρωση (τυχαία και χαστική κυτταρική καταστροφή).

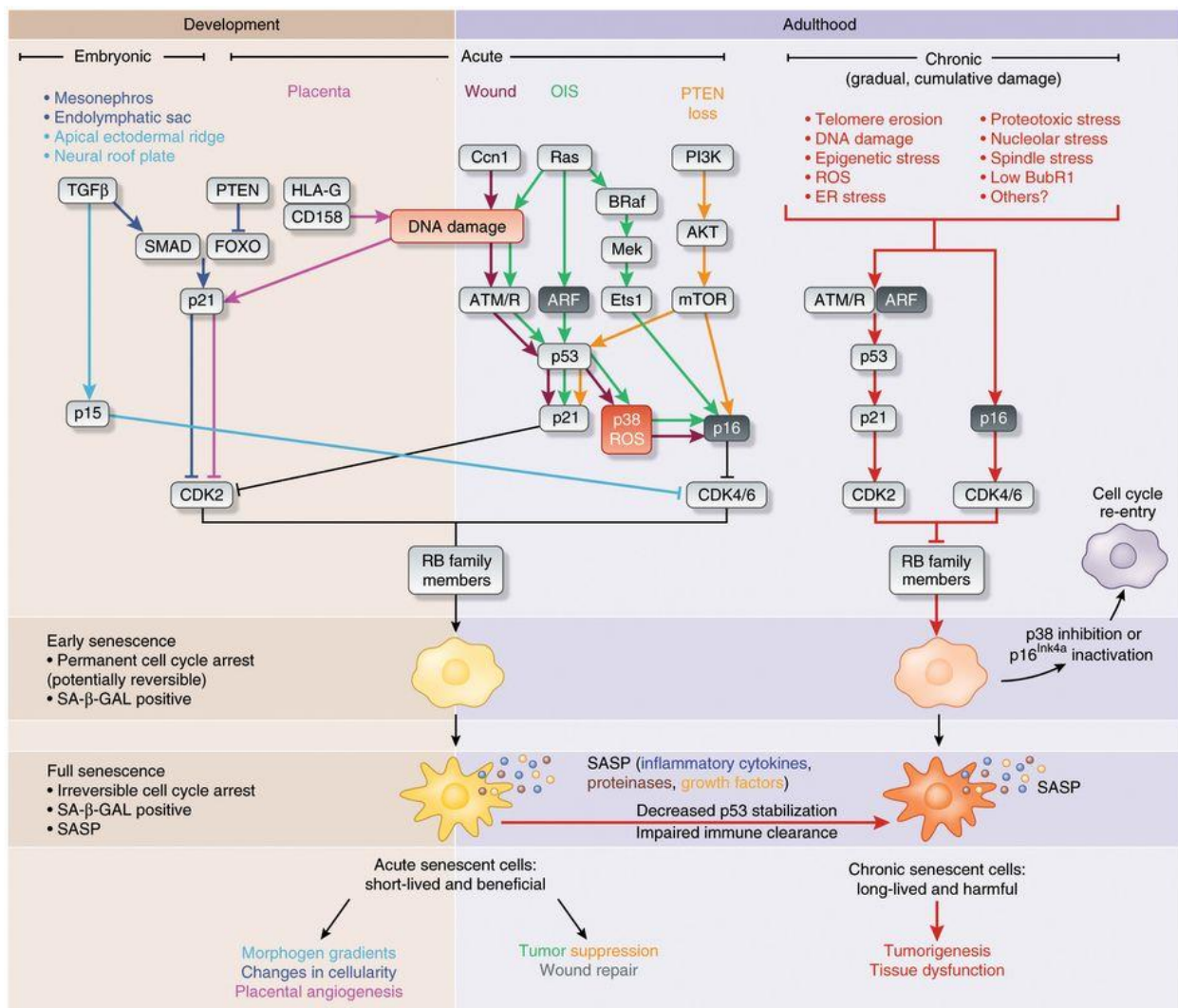
Η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) είναι η κατάσταση του κυττάρου που εξασφαλίζει την επιβίωσή του και χαρακτηρίζεται από προγραμματισμένη, παρατεταμένη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης, μεταβολική δραστηριότητα και τροποποιημένη λειτουργία [142].



Εικόνα 20. Βιολογικές συνέπειες κυτταρικής γήρανσης[142]

Ένας πληθυσμός κυττάρων όταν ολοκληρώσει ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων, εισέρχεται σε γήρανση. Κύρια μόρια διαμεσολαβητές της γήρανσης αποτελούν οι πρωτεΐνες p16INK4A, pRb και p53.

Η κυτταρική γήρανση διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, την αντιγραφική γήρανση και τη γήρανση επαγόμενη από στρες (Stress induced senescence). Η αντιγραφική γήρανση χαρακτηρίζεται από τη μείωση του μήκους των τελομερών σε τέτοιο βαθμό ώστε τα κύτταρα να μην μπορούν να εισέλθουν εκ νέου στο κυτταρικό κύκλο. Αυτού του είδους γήρανση στηρίζεται στη σταδιακή απώλεια ζευγών βάσεων (50-200) από τα τελομερή σε κάθε αντιγραφικό κύκλο. Η επαγόμενη από στρες κυτταρική γήρανση, αποτελεί μια πολύ σημαντική απόκριση του κυττάρου σε εξωγενή ή ενδογενή ερεθίσματα που ως στόχο έχουν τη διατάραξη της κυτταρικής ομοιόστασης [143-145].



Εικόνα 21. Κυτταρική γήρανση σε γηρασκόμενο και ασθενή πληθυσμό: από μηχανισμούς έως τη θεραπεία[146]

Αξιοσημείωτα στοιχεία που αποκτήθηκαν τα τελευταία χρόνια μέσω μελετών καταδεικνύουν ότι η βλάβη του DNA είναι ένας κοινός μεσολαβητής τόσο για την αναπαραγωγική γήρανση, η οποία προκαλείται από τη μείωση του τελομερούς όσο και την πρόωρη κυτταρική γήρανση που προκαλείται από διάφορους παράγοντες άγχους όπως ογκογόνο στρες και οξειδωτικό στρες. Εκτεταμένες παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η βλάβη του DNA συσσωρεύεται με την ηλικία και ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε αύξηση της παραγωγής ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου (ROS) και μείωση της ικανότητας επισκευής του DNA με την ηλικία. Η μετάλλαξη ή η διαταραγμένη

έκφραση γονιδίων που αυξάνουν τη βλάβη του DNA συχνά οδηγούν σε πρόωρη γήρανση. Αντίθετα, οι παρεμβάσεις που ενισχύουν την αντοχή στο οξειδωτικό στρες και την εξασθένιση της βλάβης του DNA συμβάλλουν στη μακροβιότητα. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η γονιδιωματική αστάθεια παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία γήρανσης. Εντούτοις, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η παραγωγή ROS και τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης των μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένου του DNA, δεν συσχετίζονται πάντοτε και απόλυτα με τη διάρκεια ζωής στα πειραματικά μοντέλα των ζώων. [147]

IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής είναι ένα πιθανόν θανατηφόρο συμβάν το οποίο παρουσιάζεται σχετικά συχνά στην κλινική άσκηση.[148] Παρά την χρήση ενδαγγειακής επιδιόρθωσης (EVAR) και τις σημαντικές βελτιώσεις στις χειρουργικές τεχνικές, στα μοσχεύματα και στην περιεγχειρητική φροντίδα τις τελευταίες δεκαετίες, η αποκατάσταση ΑΚΑ έχει ακόμα μεγάλο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας.[18] Μια από τις κυριότερες ανησυχίες της αγγειακής χειρουργικής τα τελευταία χρόνια είναι η βλάβη από ισχαιμία – επαναιμάτωση που προέρχεται από την απόφραξη της υπερνεφρικής αορτής κατά τη διαδικασία αποκατάστασης ΑΚΑ.[18] Παρά το γεγονός ότι η EVAR θεωρείται η μέθοδος εκλογής για τα περισσότερα ενδονεφρικά ανευρύσματα, η τεχνική ανοικτής χειρουργικής με cross-clamping πάνω από τις νεφρικές αρτηρίες είναι ακόμα η διαδικασία εκλογής για αορτικά ανευρύσματα.[19] Η τελευταία διαδικασία περιλαμβάνει μια παροδική απόφραξη των νεφρικών αρτηριών με αποκλεισμό της αιματικής ροής στα νεφρά για περίπου 30-60λεπτά κατά τη διάρκεια του υπερνεφρικού αποκλεισμού, το οποίο ως συνέπεια αυξάνει τον κίνδυνο μετεγχειρητικής νεφρικής δυσλειτουργίας.[19] Αν και οι βασικοί στόχοι της βλάβης ισχαιμίας – επαναιμάτωσης φαίνεται να είναι τα όργανα που επηρεάζονται άμεσα από τον αποκλεισμό της αιματικής ροής, δηλαδή οι νεφροί, η γαστρεντερική οδός και η μυϊκή μάζα των κάτω άκρων, έχουμε στοιχεία που υποδεικνύουν ότι προκαλείται βλάβη και σε απομακρυσμένα όργανα όπως το μυοκάρδιο.[20] Είναι πολύ ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η πιο συχνή αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με την επιδιόρθωση ΑΚΑ είναι η καρδιακή ανακοπή.[149] Μια ανισορροπία στην μεταβολική παροχή και απαίτηση κατά τη διάρκεια της απόφραξης της αρτηριακής παροχής αίματος που ακολουθείται από ξαφνική αποκατάσταση της παροχής οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών οδηγεί σε εκτεταμένη κυτταρική βλάβη. Υπάρχουν σημαντικά στοιχεία ότι τα ενδιάμεσα μόρια οξυγόνου

και αζώτου διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη βλάβη ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.[150] Η αποκατάσταση ροής αίματος στους ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη οδηγεί σε συσσώρευση ROS/RNS που βλάπτει κυτταρικά μακρομόρια όπως το DNA που οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη DNA.[151]

Περιεγχειρητικοί χειρισμοί, όπως η ισχαιμική προετοιμασία και μετischαιμική προστασία έχουν προταθεί σαν ένα τρόπο να μειωθεί η ισχαιμική προσβολή και κατά συνέπεια η κυτταρική βλάβη.[18] Παρόλο που οι κλασσικοί χειρισμοί ισχαιμικής προετοιμασίας απαιτούν απευθείας εφαρμογή στα αιμοφόρα αγγεία του όργανου στόχου, απομακρυσμένοι χειρισμοί -όπως η απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία και η απομακρυσμένη μετischαιμική προστασία- όπου η ισχαιμία σε αγγεία ενός οργάνου προστατεύει από την ισχαιμία σε απομακρυσμένο ιστό έχει θεωρηθεί ότι μειώνει την περιεγχειρητική ισχαιμική βλάβη.[152] Αν και κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία μειώνει δραστικά τον επιπολασμό της μετεγχειρητικής βλάβης/ εμφράγματος στο μυοκάρδιο και νεφρικής ανεπάρκειας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ανοικτή επιδιόρθωση ΑΚΑ, τα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία είναι αρκετά αντιφατικά. Μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση έδειξε ότι η ισχαιμική προετοιμασία δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε τελικά κλινικά σημεία[153] (θάνατος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, νεφρική ανεπάρκεια, εγκεφαλικό, ισχαιμία μεσεντερίου, χρόνος νοσηλείας ή εντατικής φροντίδας) αν και η σημαντική ανομοιογένεια στα κριτήρια ένταξης στη μελέτη περιορίζει τη δύναμη των συμπερασμάτων.[154]

Ο προσδιορισμός αποτελεσματικών στρατηγικών για τη μείωση της βλάβης ισχαιμίας – επαναιμάτωσης είναι επιτακτική. Σε αυτό το πλαίσιο, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε για πρώτη φορά στους νεφρούς που επηρεάζονται άμεσα από την απόφραξη της κοιλιακής αορτής και στην καρδιά, ένα απομακρυσμένο όργανο ζωτικής σημασίας τα εξής: α) ποια περιεγχειρητική διαδικασία (pre-,

post-, pre & post) παρέχει την μεγαλύτερη προστατευτική δράση αξιολογώντας βιοχημικές, μορφολογικές και κυτταρικές παραμέτρους β) δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν δυνητικά επιβλαβείς βλάβες στο DNA, ερευνήσαμε την επίδραση κάθε στρατηγικής ξεχωριστά στο σχηματισμό 8-οξο-γουανίνης, ενός δείκτη που αντικατοπτρίζει το οξειδωτικό στρες DNA και ερευνήσαμε περαιτέρω την παρουσία θραύσεων της διπλής έλικας DNA που μπορεί να είναι θανατηφόρο για το κύτταρο γ) ποια είναι η επίδραση της χορήγησης του μη εκλεκτικού υποδοχέα αδενosίνης (8-SPT) και του αναστολέα ATP ευαίσθητου διαύλου καλίου (5-HD) στην ακεραιότητα του ιστού.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2α. Νομοθεσία και τόπος διεξαγωγής πειραμάτων

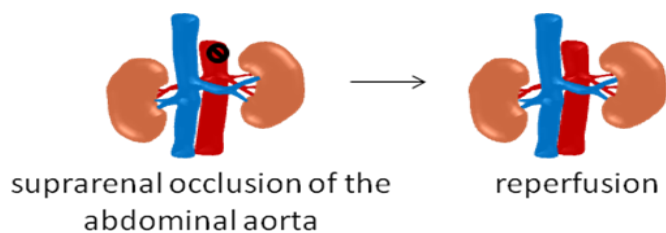
Τα πειραματόζωα προστατεύονται από το Προεδρικό Διάταγμα 160/1991 που εναρμονίζει την εθνική μας νομοθεσία με την κοινοτική οδηγία 1986/609 και το νόμο 2015/2001, ο οποίος ενσωματώνει στο εθνικό δίκαιο την Σύμβαση του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα σπονδυλωτά ζώα που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς.

Τα πειράματα της παρούσας διατριβής έλαβαν χώρα σε ειδικό χώρο του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χριστέας» της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Πρώτο Τμήμα Παθολογίας, ΕΚΠΑ. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και από την Κτηνιατρική Διεύθυνση Αθηνών σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/EU. Οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν ήταν σύμφωνοι με τις εγκεκριμένες κατευθυντήριες οδηγίες.

2β. Πειραματικό πρωτόκολλο

Στο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες αρσενικοί αρουραίοι τύπου Wistar (σωματικού βάρους 300-400gr) από το Ελληνικό Ινστιτούτο Ερευνών Pasteur. Τα πειραματόζωα βρίσκονταν σε ειδικούς θαλάμους με ελεγχόμενες καιρικές συνθήκες και συνεχή πρόσβαση σε φαγητό και νερό.

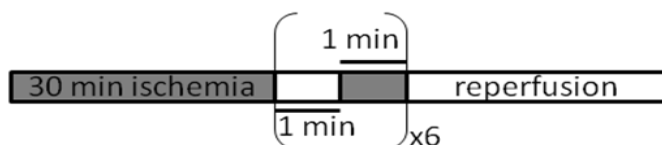
Όλα τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με περιτοναϊκή έκχυση κεταμίνης (50 mg/Kg) και μεσαλαζίνης (10mg/kg). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διασωλήνωση για μηχανική οξυγόνωση με ειδικό αναπνευστήρα για μικρά ζώα (MD Industries, Mobile, AL). Ο αναπνευστήρας ρυθμίστηκε ώστε να λειτουργεί με ρυθμό 35 αναπνοές/ λεπτό. Οι αρουραίοι υποβλήθηκαν σε λαπαροτομή. Το τμήμα της κοιλιακής αορτής άνωθεν των νεφρικών αρτηριών απομονώθηκε. Προσωρινή απολίνωση από μετάξι τοποθετήθηκε στο υπερνεφρικό τμήμα της αορτής. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 10x.



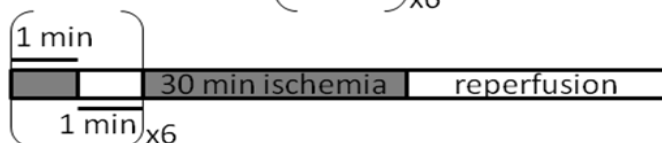
Group A
Control



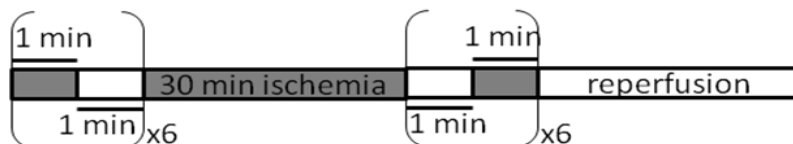
Group B
Ischemic
Postconditioning



Group C
Ischemic
Preconditioning



Group D
Ischemic
Preconditioning
and
postconditioning



Εικόνα 22. Σχηματική παρουσίαση του πειραματικού πρωτοκόλλου και της κατανομής των ζώων σε διαφορετικές ομάδες.

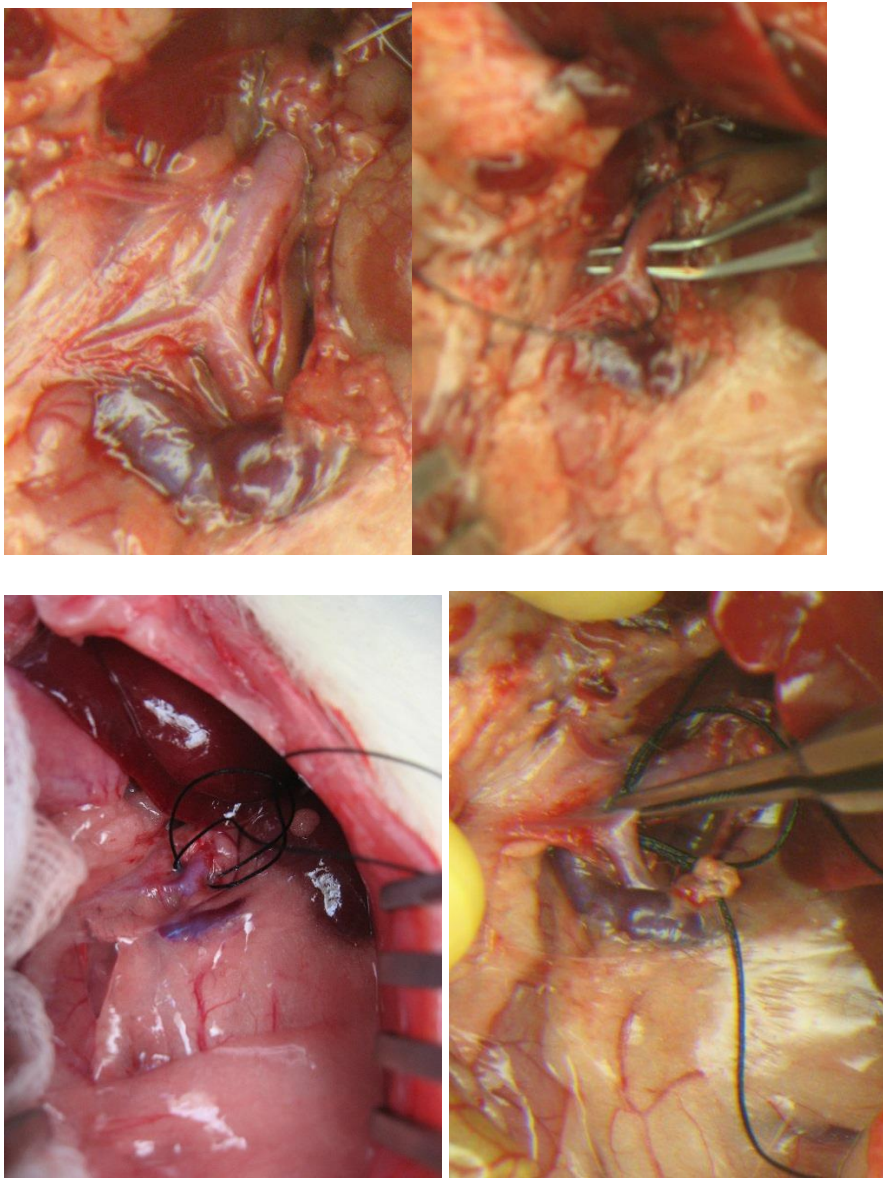
Το πειραματόζωο χωρίστηκε τυχαίοποιημένα στις παρακάτω ομάδες:

Ομάδα Α: Ομάδα ελέγχου (n=20). Η υπερνεφρική αορτή αποκλείστηκε για 30 min και θυσιάστηκαν στις 6, 24, 48 ώρες και 10 ημέρες.

Ομάδα Β: Ισχαιμικής προετοιμασίας, IPC (n=20) όπου προηγήθηκαν 6 κύκλοι 1 min ισχαιμίας–1 min επαναιμάτωσης και θυσιάστηκαν στις 6, 24, 48 ώρες και 10 ημέρες.

Ομάδα C: Μετισχαιμικής προστασίας, IPost (n=20), όπου των 30 min αποκλεισμού της υπερνεφρικής αορτής ακολούθησαν 6 κύκλοι 1 min ισχαιμίας–1 min επαναιμάτωσης και θυσιάστηκαν στις 6, 24, 48 ώρες και 10 ημέρες.

Ομάδα D: Συνδυασμός ισχαιμικής προετοιμασίας και μετσχαιμικής προστασίας IPC+IPost (n=20), όπου προηγήθηκαν 6 κύκλοι 1 min ισχαιμίας-1 min επαναιμάτωσης των 30 min αποκλεισμού της υπερνεφρικής αορτής και κατόπιν ακολούθησαν ακόμα 6 κύκλοι 1 min ισχαιμίας-1 min επαναιμάτωσης. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις 6, 24, 48 ώρες και 10 ημέρες.



Εικόνα 12. Φωτογραφίες κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειραματικού πρωτοκόλλου. Αποκάλυψη και παρασκευή υπερνεφρικής αορτής. Προετοιμασία για αποκλεισμό και πρόκληση ισχαιμίας.

3. Βιοχημική Ανάλυση

3α. Μέτρηση βιοχημικών δεικτών

Σε όλες τις περιπτώσεις συλλέχθηκε αίμα σε σωλήνες κενού μέσω καρδιακής παρακέντησης (Becton Dickinson Hellas, Αθήνα). Το αίμα φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15λεπτά στις 3000στροφές και ο ορός αποθηκεύτηκε σε κρυοσωλήνες στους -80°C .

Μετρήθηκαν βιοχημικοί δείκτες στον ορό των παραπάνω δειγμάτων από το μικροβιολογικό εργαστήριο με αυτόματο αναλυτή. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν: Na^+ , K^+ , ουρία, κρεατινίνη, CRP, CPK, CPK-MB, SGOT, SGPT, LDH, αμυλάση, Ca^{2+} .

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή (mean) \pm πρότυπο λάθος (standard error, SE). Οι συγκρίσεις μεταξύ των απόλυτων τιμών των μεταβλητών των εξεταζόμενων ομάδων πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση διασποράς (ANOVA) σε συνδυασμό με την ανάλυση Turkey (Turkey's multiple comparisons). Η υπολογιζόμενη *P* τιμή που ήταν μικρότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Graph Pad Prism.

4. Ιστοπαθολογική ανάλυση

4α. Εκτίμηση νεφρικού και καρδιακού ιστού

Κατά τον θυσιασμό απομονώθηκαν ικανά τμήματα ιστών από τους νεφρούς και την καρδιά για ιστολογική εξέταση. Αυτά τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο τμήματα. Το πρώτο παρασκευάστηκε αμέσως σε 10% ουδέτερα ρυθμισμένο διάλυμα με 4% φορμαλδεύδη για 24 ώρες πριν μονιμοποιηθεί σε παραφίνη. Το δεύτερο αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω επεξεργασία και μετρήσεις.

Τα ιστοτεμάχια που είχαν μονιμοποιηθεί σε παραφίνη αφού τεμαχίζονταν με λεπτές τομές, χρωματίζονταν με αιματοξυλίη και ηωσίνη. Η ιστολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από σου ανεξάρτητους παθολογοανατόμους στο Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, ΕΚΠΑ. Για την ποσοτικοποίηση της βλάβης των ιστών χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα βαθμολόγησης βασισμένο σε προηγούμενες μελέτες. Η συλλογική ιστολογική βαθμολόγηση ήταν από 0 (φυσιολογικός ιστός) έως και 5 (σοβαρή ιστική βλάβη).

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων scoring των ιστοτεμαχίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς με αναπαραγωγή (ANOVA- two factor with replication). Η υπολογιζόμενη *P* τιμή που ήταν μικρότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το Data Analysis του προγράμματος Microsoft Excel.

5. Ανάλυση πρωτεϊνών

5α. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από τους ιστούς

Λήφθηκε ποσότητα παγωμένου ιστού (νεφρών και καρδιάς), και ομογενοποιήθηκε σε υπότονο διάλυμα RIPA σε αναλογία 1:2,5 [0,05M Tris Base pH=8,0, 0,15M NaCl, 0,5% NaDOC (sodium deoxycholate), 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS] ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50-100 mg/ml, ενώ προστέθηκαν και αναστολείς πρωτεασών - φωσφατασών (1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin και 1 μg/ml pepstatin A). Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε ενώ το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C για να εκχυλιστούν οι ιστόνες από αυτό. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με φωτομέτρηση και πρότυπη καμπύλη Bradford. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C.

5β. Απόμονωση ιστονών

Τα ιζήματα από τις απομονώσεις πρωτεϊνών διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για ιστόνες (100μl Hepes 1M pH7,4, 30μl MgCl₂ 0,5M, 100μl KCl 1M και 250μl HCl 1N) με αναλογία όγκου 1:5. Σε αυτά προστέθηκαν αντιπρωτεασικοί και αντιφωσφατασικοί παράγοντες και στη συνέχεια επωάστηκαν για 1-2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 13500rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε ενώ το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C. Στα δείγματα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με φωτομέτρηση και πρότυπη καμπύλη Bradford. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C. Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων ιστονών ήταν απαραίτητη η εξουδετέρωση του όξινου χαρακτήρα με 1-5μl Tris-Cl pH9,5.

5γ. Ανοσοτύπωση (Western Blot)

Χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιήσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στα δείγματα ιστών από νεφρό και καρδιά. Για να διαχωρίσουμε τις φυσικές ή μεταυσιωμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή, με βάση το μήκος των πολυπεπτιδίων ή την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μετά μεταφέρονται σε μια ειδική μεμβράνη και επωάζονται με κατάλληλα αντισώματα ανάλογα με την πρωτεΐνη που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε. [155-157]

Η μέθοδος αυτή πρωτοεφαρμόστηκε στο εργαστήριο του George Stark στο Stanford. Το όνομα Western Blot δόθηκε στην τεχνική από τον W. Newl Burnette ως λογοπαίγνιο σχετικό με το southern blot, μια τεχνική αναγνώρισης DNA που είχε ανακαλυφθεί νωρίτερα από τον Edwin Southern. Η αναγνώριση του RNA ονομάζεται northern blotting και η αναγνώριση της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της πρωτεΐνης ονομάζεται eastern blotting.

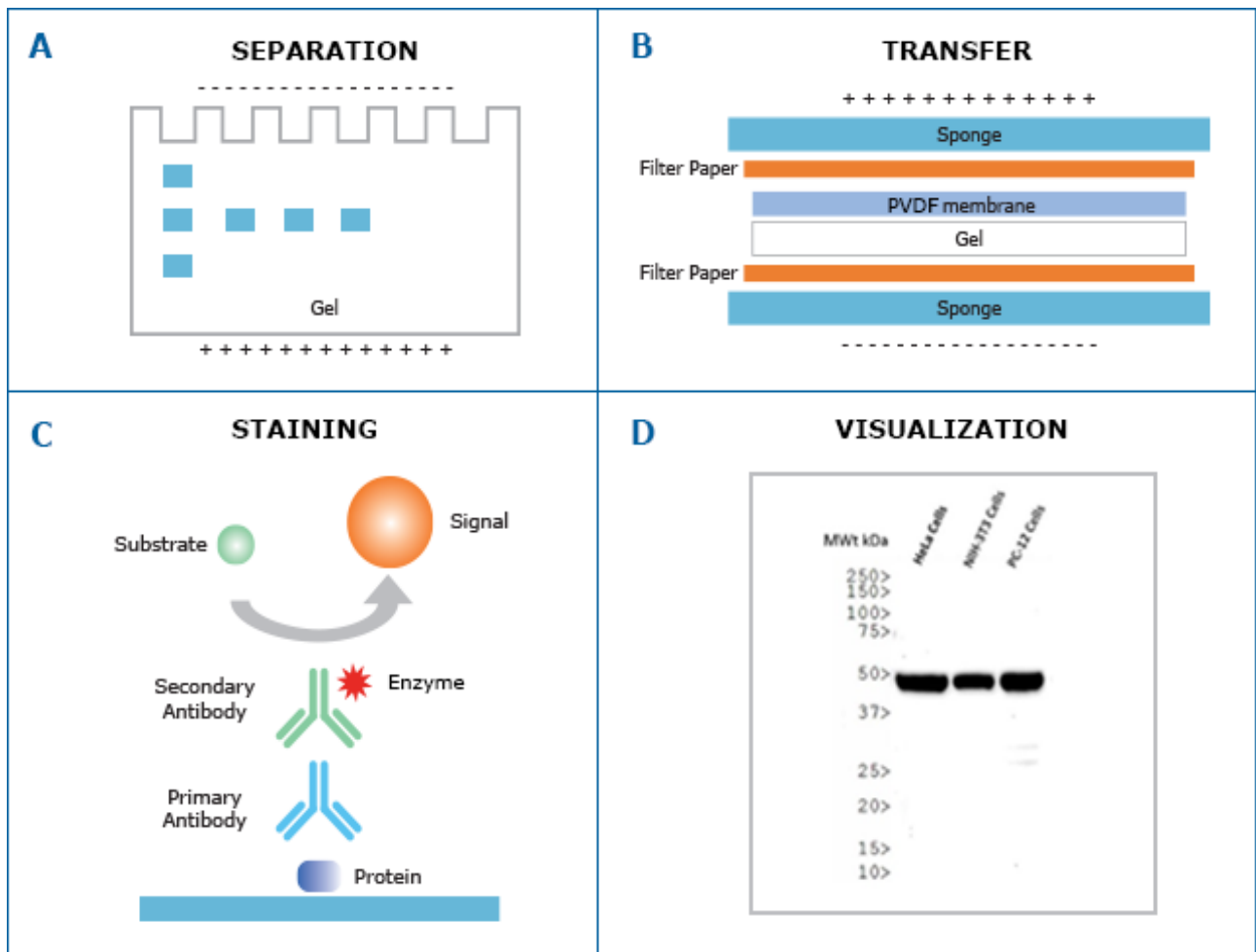
Ηλεκτροφόρηση

Αρχικά το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρασκευάστηκε με αρχική στρώση το πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel). Για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος πάνω από 40kD η συγκέντρωση του πηκτώματος διαχωρισμού είναι 10% (2,85ml dH₂O, 2,5ml 2,25M Tris-Cl, pH8,8, 4,5ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED), ενώ για πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους είναι 15% (0m53l dH₂O, 2,5ml 2,25M Tris-Cl, pH8,8, 6,76ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED). Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού προστέθηκε μικρότερη ποσότητα πηκτώματος φόρτωσης (Stacking gel) με συγκέντρωση 4% (5,6ml dH₂O, 1,25ml 0,5M Tris-Cl, pH6,8, 2ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED). Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running buffer 10x: 900ml dH₂O, 24gr Trizma Base, 115,2gr Glycine, 8gr SDS). Ταυτόχρονα τα δείγματα προετοιμάστηκαν. Σε 30μg πρωτεΐνης (μέγιστος όγκος 15μl) προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 1x (SDS protein oading buffer 2x: 20% Glycerol, 4% SDS, 120mM Tris-Cl pH6,8, 0,003% Bromophenol blue, 10% β-μερκαπτοαιθανόλης). Θερμάνθηκε το παραπάνω μίγμα επί 10 λεπτά στους 95°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια έγινε η φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 125V και 200mA για 3 ώρες περίπου. Μεταξύ των δειγμάτων ηλεκτροφορείται δείκτης (PageRuler Prestained Protein Ladder, SM0671) που περιέχει μίγμα πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος και αποτελεί σημείο αναφοράς για την εκτίμηση του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης που εξετάζουμε.

Στην πρώτη οπή εισάγουμε τον ιχνηθέτη (marker) που είναι μείγμα πρωτεϊνών με ορισμένα μοριακά βάρη. Ο ιχνηθέτης είναι έγχρωμος και διαμορφώνει ορατές μπάντες που μας βοηθούν να αναγνωρίσουμε τις πρωτεΐνες που αναπτύσσονται στα δείγματα μας.

Διαδικασία Μεταφοράς (TRANSPORTATION)

Προκειμένου να συνδεθούν οι πρωτεΐνες με τα αντισώματα, μεταφέρθηκαν από την πηκτή σε μια μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride). Το PVDF είναι αδρανές και χρησιμοποιείται στην τεχνική αυτή λόγω της μη εκλεκτικής συγγένειας που έχει με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η μέθοδος μεταφοράς αυτή ονομάζεται electro blotting και χρησιμοποιεί ηλεκτρικό ρεύμα για να τραβήξει τις πρωτεΐνες από την πηκτή στην μεμβράνη, διατηρώντας την οργάνωση που είχαν στην πηκτή. Η δέσμευση των πρωτεϊνών βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις καθώς και σε επιδράσεις φορτίων ανάμεσα στην μεμβράνη και τις πρωτεΐνες. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1x (Transfer Buffer 20x: 500ml dH₂O, 15,5gr Trizma Base, 72gr Glycine) και 20% μεθανόλης. Η μεταφορά έγινε στα 100V και 200mA επί 45 λεπτά για πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (έως 30 kD) έως 1,5 ώρες για πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (έως 70 kD). Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων 5% ημιαποβουτυρωμένο γάλα ή αλβουμίνη ορού μόσχου (Bovine Serum Albumine) σε περίπτωση χρήσης φωσφο-αντισωμάτων διαλυμένα σε TBS-T 0,1% (20mM TrisCl pH7.6, 0.135M NaCl, 0.1% Tween-20 0,1%) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 13. Παρουσίαση κλασικής Western Blot (A) Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε γέλη πολυακρυλαμιδίου με ηλεκτροφόρηση (B) Μεταφέρονται σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF) για ανίχνευση (C) Η μεμβράνη επωάζεται με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη ανίχνευσης και ακολουθείται από επώαση με δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζευγμένο με ένζυμο. Το ένζυμο δρα στο υπόστρωμα και εκπέμπεται φως (D) το παραγόμενο σήμα φωτός καταγράφεται από ένα σύστημα χημειοφωταύγειας (©Novus Biologicals, a bio techne brand)

Διαδικασία ΕΠΩΑΣΕΩΝ

Λόγω της ικανότητας της μεμβράνης να συνδέεται με πρωτεΐνες (τόσο με τις πρωτεΐνες στόχους όσο και με τα αντισώματα), είναι σημαντικό να λάβουμε μέτρα για να αποτρέψουμε την αλληλεπίδραση της μεμβράνης με τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών-στόχων. Η διαδικασία αυτή (παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης) ονομάζεται

blocking και πραγματοποιείται τοποθετώντας τη μεμβράνη σε αραιό διάλυμα NFDM(Non Fat Dry Milk) και TBS-Tween 2% που αποκαλούμε blocking buffer.

Η πρωτεΐνη του διαλύματος συνδέεται με τις περιοχές της μεμβράνης όπου οι πρωτεΐνες-στόχοι δεν έχουν συνδεθεί. Έτσι αποτρέπεται η σύνδεση του αντισώματος στην μεμβράνη του PVDF, γεγονός που θα δημιουργούσε πολλά προβλήματα στην συνέχεια, και το αντίσωμα επισυνάπτει μόνο τις πρωτεΐνες-στόχους. Μετά το τέλος του blocking πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με TBS-Tween 2%. Οι πλύσεις αυτές, που επαναλήφθηκαν και σε επόμενα στάδια είναι απαραίτητες για να απομακρύνουν αδέσμευτα αντιδραστήρια.

Αφού εκπλήθηκαν οι μεμβράνες για την απομάκρυνση του blocking buffer που δεν έχει συνδεθεί με το PVDF, η μεμβράνη εκτέθηκε στο πρωτογενές αντίσωμα (διαλυμένο σε 0,5% γάλα και TBS-T 0,1%) ολονύκτια στους 4°C. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις της μεμβράνης 5 λεπτών η κάθε μία σε διάλυμα TBS-T 0,1%. Στη συνέχεια έγινε η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα σε συγκεκριμένη αραιώση ανάλογα με το δευτερογενές και τη συγκέντρωσή του για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T 0,1%.

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι συνδεδεμένο με AP (AP conjugated). Η μεμβράνη επώαστηκε σε αραιώση 1/1000 για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη καλύφθηκε με 14ml διαλύματος εμφάνισης (14ml AP buffer, 200μl διάλυμα NBT, 100μl BCIP). Κατά την εμφάνιση της μεμβράνης δεν πρέπει να εκτίθεται σε δυνατό φως γιατί το ένζυμο απενεργοποιείται. Μόλις ολοκληρωθεί η εμφάνιση της πρωτεΐνης, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε νερό για να σταματήσει η αντίδραση.

Μέθοδος χημειοφωταύγειας (σκοτεινός θάλαμος) και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Μετά την επώαση της μεμβράνης με τα αντισώματα, ακολούθησε η επώαση της μεμβράνης με ειδικά διαλύματα ανίχνευσης, γνωστά ως ECL τα οποία επέτρεψαν την παρατήρηση των πρωτεϊνών σε φωτογραφικό φιλμ. Η εικόνα του φιλμ ακολούθως αναλύθηκε και αξιολογήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών οι οποίες ανιχνεύθηκαν.

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι συνδεδεμένο με HRP (HRP conjugated - Horse Radish Peroxidase). Η μεμβράνη επώαστηκε σε αραιώση 1/2500 για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα της χημειοφωταύγειας αναμίχθηκαν 5 λεπτά πριν την επώαση της μεμβράνης. Η μεμβράνη καλύφθηκε με το διάλυμα της χημειοφωταύγειας (chemiluminescent detection substrate της εταιρίας Pierce) και επώαστηκε για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Η μεμβράνη καλύφθηκε με σελοφάν και τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης. Στη συνέχεια σε σκοτεινό θάλαμο, πάνω στη μεμβράνη τοποθετήθηκε κομμάτι φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak X-omat). Ο χρόνος έκθεσης καθορίζεται εμπειρικά.

Τα φιλμ αναλύθηκαν σε σαρωτή και εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα Image-Pro, Έκδοση 3.0 των Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

6. Τεχνικές in situ

6α. Ανοσοϊστοχημεία

Οι τομές που βρίσκονταν σε παραφίνη σε αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν στους 60°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη, κατιούσα αλκοολών (100, 100, 96, 80, 70) και απεσταγμένο νερό. Έπειτα εμβαπτίστηκαν σε TBS (ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.6, 8,1gr NaCl

+ 1gr Trizma Base σε 1lt νερό) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των πλακιδίων για 15 λεπτά σε υπεροξείδιο του υδρογόνου 3%. Οι τομές ξεπλύθηκαν σε TBS για 5 λεπτά. Για να γίνει η επίδραση με το αντίσωμα θα πρέπει να αποκαλυφθούν οι αντιγονικές θέσεις. Οι τομές θερμάνθηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (2.1gr σε 1l dH₂O και ρύθμιση του pH6 με NaOH) ή EDTA (2.2 ml σε 1l dH₂O και ρύθμιση του pH8.0-8.5 με HCl) για 5 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων, η διαδικασία επαναλήφθηκε 5 φορές. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το αντίσωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Στην συνέχεια οι τομές παραμένειαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ξεπλύθηκαν σε TBS για 5 λεπτά.

Εν συνεχεία επώαστηκαν με το πρωτογενές αντισώμα. Ο ορός χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Η αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος ποικίλλει, ενώ η αραίωση του ορού είναι σταθερή, 1:20. Η επώαση γίνεται ολονύκτια στους 4°C. Με την ολοκλήρωση της επώασης οι τομές ξεπλένονται με TBS επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα ιχνηθετημένο με βιοτίνη διαλυμένο σε TBS, σε αραίωση 1:200. Το δευτερογενές αντίσωμα και ο ορός πρέπει να έχουν την ίδια προέλευση με τον ορό. Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά, στους 37°C. Οι τομές ξεπλένονται με TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται με το σύμπλοκο βιοτίνη-στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση (AB complex) για 20 λεπτά στους 37° C. Το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση (A) και η βιοτίνη (B) φυλάσσονται ξεχωριστά στους 4°C. Για τη δημιουργία του τελικού συμπλόκου AB complex τα συστατικά A και B αναμιγνύονται με αραίωση 1:100 σε TBS και φυλάσσονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το σύμπλοκο AB complex μέσω της στρεπταβιδίνης προσδένεται στο βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα. Ακολουθεί ξέπλυμα των τομών σε TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η εμφάνιση σε διάλυμα

διαμινοβενζιδίνης (DAB): 1 ml DAB + 16λ H₂O₂ (από το stock 30%) σε 50ml TBS. Ο χρόνος επώασης των τομών με το διάλυμα DAB ελέγχεται με παρατήρηση της χρώσης σε οπτικό μικροσκόπιο. Στην συνέχεια οι τομές ξεπλένονται με άφθονο νερό βρύσης και χρωματίζονται με αιματοξυλίνη. Η αιματοξυλίνη βάφει με κυανό χρώμα το DNA του πυρήνα και όσες δομές είναι όζινες, όπως το RNA στο κυτταρόπλασμα και ο υαλοειδής χόνδρος στη θεμέλια ουσία.

Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης και αφυδάτωση των τομών με εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης. Ολοκληρώνοντας, οι τομές καλύπτονται με ειδική ρητίνη (βάλσαμο του Καναδά ή DPX), καλυπτρίδα και παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο.

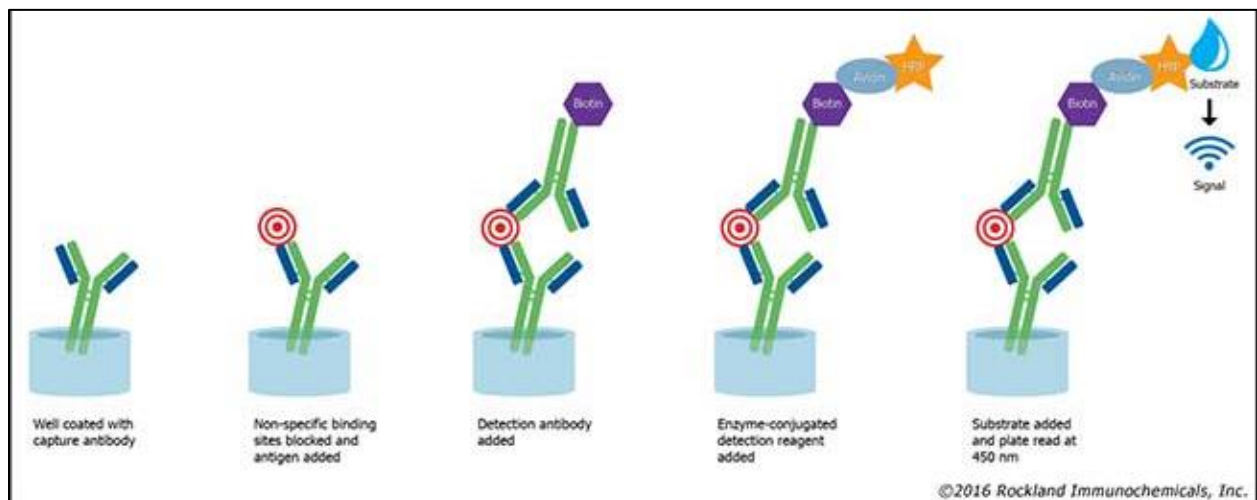
6β. Ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων - Tunel

Σε τομές παραφίνης εφαρμόστηκε πρότυπη μέθοδος με *in situ* τελική σήμανση με δεσοξυνουκλεοτιδυλτρανσφεράση (ΔNT) (μέθοδος TUNEL) για την ανίχνευση του κατακερματισμένου πυρηνικού DNA του σχετιζόμενου με την απόπτωση.

Τα τμήματα των νεφρικών και καρδιακών ιστών που παραλείφθηκαν μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% για 24 ώρες. Στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε τομές παραφίνης 4-μm. Μετά από πρότυπη αποπαραφινποίηση, υγροποίηση, επώαση με πρωτεΐνάση K και αναστολή της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης, ιστικές τομές επώαστηκαν: (α) με ΔNT και διγοξυγενίνη-dUTP (μείγμα αντίδρασης TUNEL) στους 37°C επί 60 λεπτά, και (β) με αντίσωμα κατά του μετατροπέα της υπεροξειδάσης στους 37°C επί 30 λεπτά. Ως χρωμογόνος ουσία χρησιμοποιήθηκε η διαμινοβενζιδίνη. Για τα θετικά δείγματα ελέγχου, τομές λεπτού εντέρου αρουραίου υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία. Για τα αρνητικά δείγματα ελέγχου, μερικά πλακίδια επώαστηκαν σε διάλυμα σήμανσης που δεν περιείχε τελική τρανσφεράση (ΔNT).

6γ. Elisa essay

Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιεί ποσοτική τεχνική ανοσοπροσδιορισμού ενζύμου (τεχνική sandwich). Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη ανίχνευσης εγγέεται στο πλακίδιο εργασίας. Τοποθετούνται τα τυφλά, πρότυπα και τα δείγματα στα κελιά και με αυτό τον τρόπο εάν υπάρχει πρωτεΐνη-αντογόνο προσδένεται στο αντίσωμα που είναι ήδη καθηλωμένο. Ξεπλένονται τυχόν ανεπιθύμητες ουσίες και προστίθεται ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο ειδικό έναντι στο αντιγόνο στα κελιά με σκοπό να συνδεθεί με το αντιγόνο με τη μέθοδο sandwich κατά την πρώτη επώαση. Ακολουθεί έκπλυση για να απομακρυνθούν ό,τι δεν δεσμεύτηκε και προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος. Ακολουθεί επώαση κατά την οποία εμφανίζεται χρώμα το οποίο σχετίζεται αναλογικά με την ποσότητα του αντιγόνου που έχει δεσμευτεί. Προστίθεται διάλυμα τερματισμού και μετράται η ένταση του χρώματος με ειδικό φασματοφωτόμετρο Elisa.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση Elisa (<https://immunologynotes.com/sandwich-elisa-steps-and-advantages>)

Στα πρώτα στάδια της μεθόδου, πριν τη προσθήκη του δείγματος, στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετείται διάλυμα BSA (λευκωματίνη ορού βόειας προέλευσης). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να μπλοκάρει τις μη ειδικές θέσεις προσρόφησης άλλων

πρωτεϊνών στην πλάκα μικροτιτλοδότησης, οι οποίες θα μπορούσαν να δώσουν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Το στάδιο αυτό λέγεται και στάδιο μπλοκαρίσματος (blocking step).

Η ποσοτική ανάλυση στηρίχθηκε στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μια πρότυπη καμπύλη, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντισώματος στο δείγμα.

6δ. Ιστοχημική χρώση με GL13 (Ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων)

Για την προετοιμασία του compound GL13,[158] χρησιμοποιείται 100% αιθανόλη για την αραιώση κάθε ένωσης και το διάλυμα επώαζεται σε υδατόλουτρο για περίπου 120 λεπτά στους 60°C, έως ότου διαλυθεί πλήρως. Τοποθετείται διπλό parafilm, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης. Έπειτα ακολουθεί αφυδάτωση των δειγμάτων σε 50% αιθανόλη για 5 λεπτά. Αφυδάτωση των δειγμάτων σε 70% αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετείται σταγόνα compound GL13 στην αντικειμενοφόρο πλάκα, με σύριγγα και φίλτρο διαμέτρου 0.22μm, και καλύπτεται το δείγμα με καλυπτρίδα. Ακολουθεί παρατήρηση της αντίδρασης στο μικροσκόπιο για 5-8 λεπτά. Γίνεται προσεκτική αφαίρεση της καλυπτρίδας. Εκπλένεται το δείγμα με 50% αιθανόλη και 2 ακόμα σε πιο καθαρή 50% αιθανόλη. Εκπλένεται το δείγμα με TBS και επώαζεται σε διάλυμα 0.3-0.5% Triton X/TBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 60 λεπτά στους 37°C με αντίσωμα έναντι της βιοτίνης αραιωμένο 1/300 σε TBS. Πλύση με TBS και επώαση με το Primary amplifier antibody του kit ανοσοϊστοχημείας για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πλύση με TBS. Επώαση του δείγματος με HRP Polymer του kit ανοσοϊστοχημείας για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πλύση με TBS. Εφαρμόζεται στο πλακάκι του DAB Chromogen αραιωμένο 1/200-1/300 για 30-50 δευτερόλεπτα. Εκπλένεται με νερό. Ακολουθεί χρώση με ¼ αραιωμένη αιματοξυλίνη. Πλύση

του δείγματος με νερό. Κάλυψη του δείγματος με διάλυμα 40% γλυκερόλης/PBS και καλυπτρίδα. Τέλος γίνεται η παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών. [158]

7. Αντισώματα

Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανά μέθοδο είναι οι εξής:

7.a. Αντισώματα για ανοσοτύπωση Western

Πρωτογενή αντισώματα (a) Ιστόνη H2Ax (JBW301; τάξεως: IgG1 mouse μονοκλωνικό; επίτοπος: πεπτίδιο που αντιστοιχεί σε αμινοξέα 134-142 της ανθρώπινης ιστόνης H2AX; αραιώση 1:1,000; Millipore). (b) Ιστόνη H3 (C-16; τάξεως: goat πολυκλωνικό IgG; επίτοπος: mapping at the C-terminus of Histone H3 of human origin; αραιώση 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). (c) NOX4 (τάξεως: IgG rabbit πολυκλωνικό; επίτοπος: συνθετικό πεπτίδιο σε σωτερική περιοχή της ανθρώπινης NOX πρωτεΐνης (ανάμεσα σε 100-200); αραιώση 1:500; Novus Biologicals). (d) Phospho-ATM (10H11.E12; τάξεως: IgG1 mouse μονοκλωνικό; επίτοπος: συνθετικό φωσφοπεπτίδιο κοντά στο Ser1981 της ανθρώπινης ATM; αραιώση 1:200-1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc.) (e) β-ακτίνη (τάξεως IgG rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο ανθρώπινης β-ακτίνης, αραιώση 1:1000 (Millipore, Lab Supplies, Αθήνα, Ελλάδα)[159]

Δευτερογενή αντισώματα: (a)goat anti-mouse IgG-HRP conjugated (#HAF007 R&D Systems, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), (b) goat anti-rabbit-HRP conjugated (# HAF008 R&D Systems, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), (c) goat anti-mouse IgG-AP conjugated (#G21060, Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), (d) goat anti-rabbit IgG-AP conjugated (#G21079 ,Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα).

7.β. Αντισώματα για ανοσοϊστοχημεία

(a) anti- γ H2AX (Ser139, 05-636, Millipore; αραίωση 1:1000), (b) Histone H3 (C-16, Santa Cruz Biotechnology Inc; αραίωση 1:1000), (c) anti-NOX4 (NB110-58851, Novus Biologicals, αραίωση 1:500), (d) Phospho-ATM (10H11.E12; Ser1981, Santa Cruz Biotechnology Inc; αραίωση 1:200-1:1000), (e) p53 (DO-7), τάξεως IgG2b, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο (aa 1-45) (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), αραίωση 1:100, (f) Ki67, τάξεως IgG1, mouse μονοκλωνικό, αραίωση 1:100 (DAKO). B-actin served as loading control.[159-163]

7.γ. Αντισώματα για Elisa

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της TGF- β 1 στον ορό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit Quantikine Elisa for mouse/rat/porcine/canine TGF- β 1 immunoessay. Catalog number MB100B, SMB100B, PMB100B, R&D Systems, Inc.[159]

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της MCP-1 στον ορό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit Quantikine Elisa for mouse/rat CCL2/JE/MCP-1 immunoessay. Catalog number MJE00, SMJE00, PMJE00, R&D Systems, Inc.[159]

8. Στατιστική ανάλυση

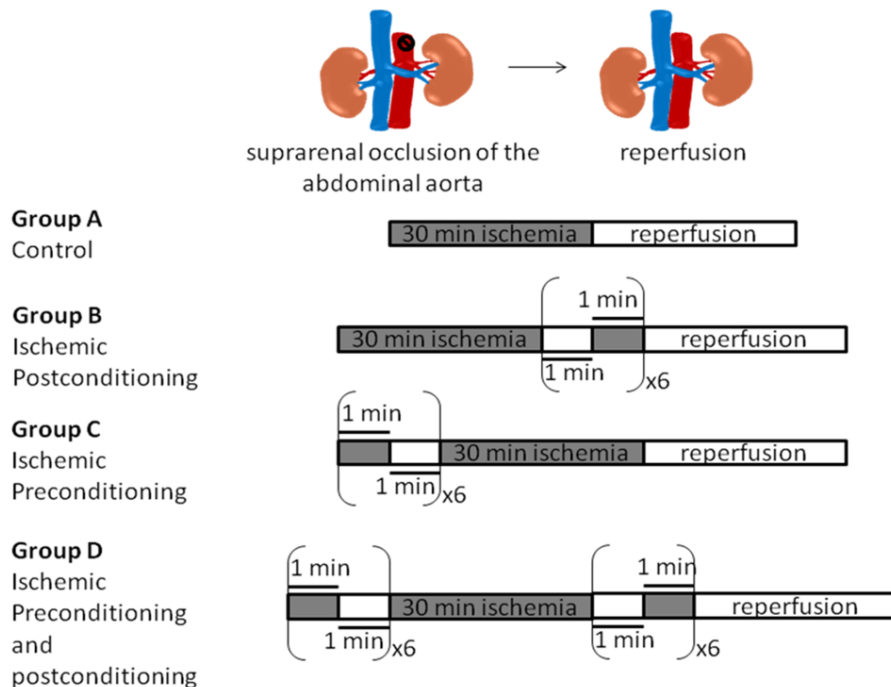
Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η μέση τιμή \pm πρότυπο σφάλμα (standard error of the mean, SEM). Η σύγκριση των απόλυτων τιμών των μεταβλητών των εξεταζόμενων ομάδων έγινε με ανάλυση διασποράς (ANOVA) σε συνδυασμό με τη διόρθωση Bonferroni και με Turkey post hoc ανάλυση. Η μετρημένη τιμή της μεταβλητής P που ήταν μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό Elisa επεξεργάστηκαν στατιστικά με ANOVA και έγινε regression analysis.

9. Αποτελέσματα

9α. Βελτιωμένο βιοχημικό προφίλ στις ομάδες χειρισμού

Για να εξετάσουμε την επίδραση των χειρισμών IPre, IPost και IPre+IPost, αρχικά αξιολογήσαμε τα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών. Η βιοχημική ανάλυση του ορού από όλες τις ομάδες που θυσιάστηκαν στις 24 και 48 ώρες, αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση στην C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C reactive protein, CRP) στις ομάδες B, C, D, που υποδεικνύει μειωμένη φλεγμονή. (Σχήμα 1; Σχήμα 2Αι).

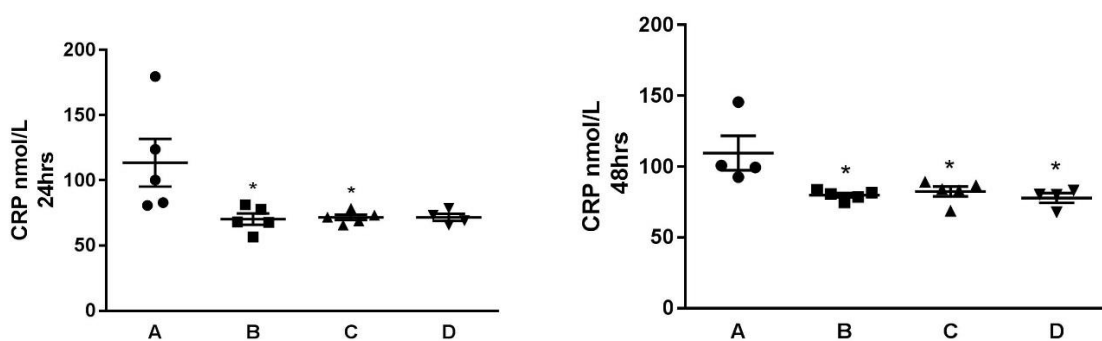


Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου και της κατανομής των πειραματοζώων σε διαφορετικές ομάδες. Group A (Ελέγχου): αποκλεισμός υπερνεφρικής αορτής για 30 min. Group B (IPost): 30 min. υπερνεφρικού

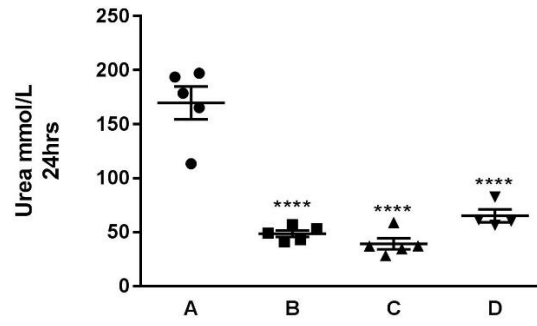
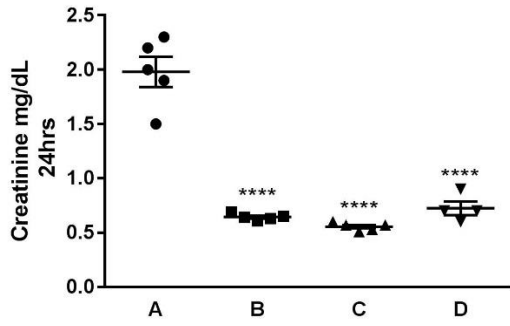
αποκλεισμού πριν από 6 κύκλους of 1 min. ισχαιμίας- επαναιμάτωσης. Group C (IPre): 6 κύκλοι of 1 min. ισχαιμίας- επαναιμάτωσης πριν από τα 30 min. αποκλεισμού. Group D (IPre+IPost): 6 κύκλοι 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης πριν και άλλοι 6 κύκλοι 1 min. ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μετά την παρατεταμένη ισχαιμία. Όλα τα ζώα θυσιάστηκαν σε όλες τις ομάδες στις 6, 24, 48 ώρες και 10 μέρες.

Μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση παρατηρήθηκε επίσης στους δείκτες ουρίας και κρεατινίνης στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε χειρισμούς υποδεικνύοντας ένα προστατευτικό μηχανισμό στην νεφρική λειτουργία. **(Σχήμα 2Aii)** Παρομοίως, συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου A, η κρεατινική κινάση ορού (creatinine phosphokinase, CPK), η γαλακτική αφυδρογονάση (lactate dehydrogenase, LDH) η πυροσταφυλική τρανσαμινάση (serum glutamic pyruvic transaminase, SGPT) και τα επίπεδα καλίου (K^+) ήταν μειωμένα στις ομάδες χειρισμού αποκαλύπτοντας μειωμένη βλάβη στους ιστούς. **(Σχήμα 2Aiii)** Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι όλα τα είδη χειρισμού IPre, IPost και IPre+IPost οδηγούν σε μειωμένη φλεγμονή και βλάβη ιστών.

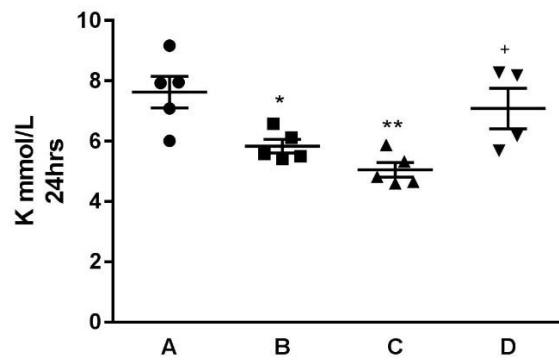
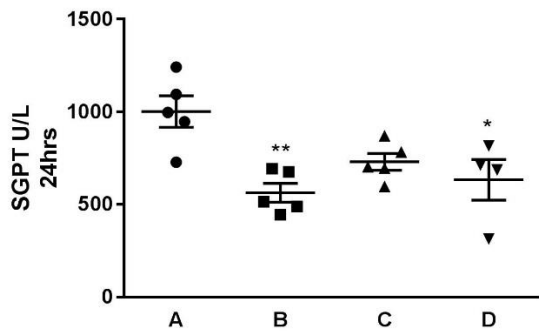
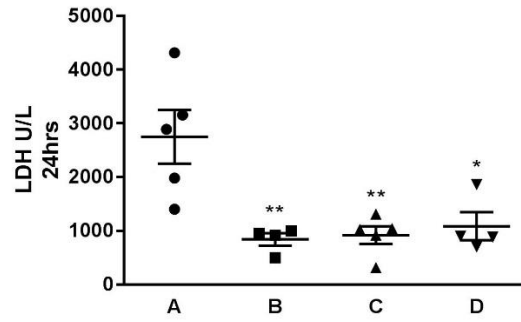
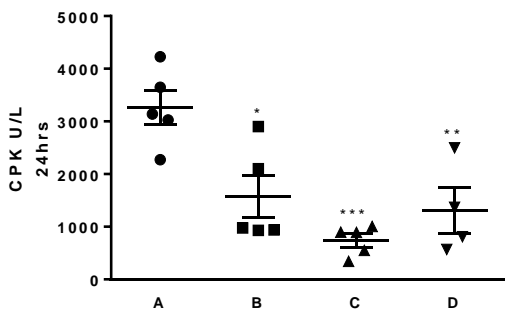
2. A i.

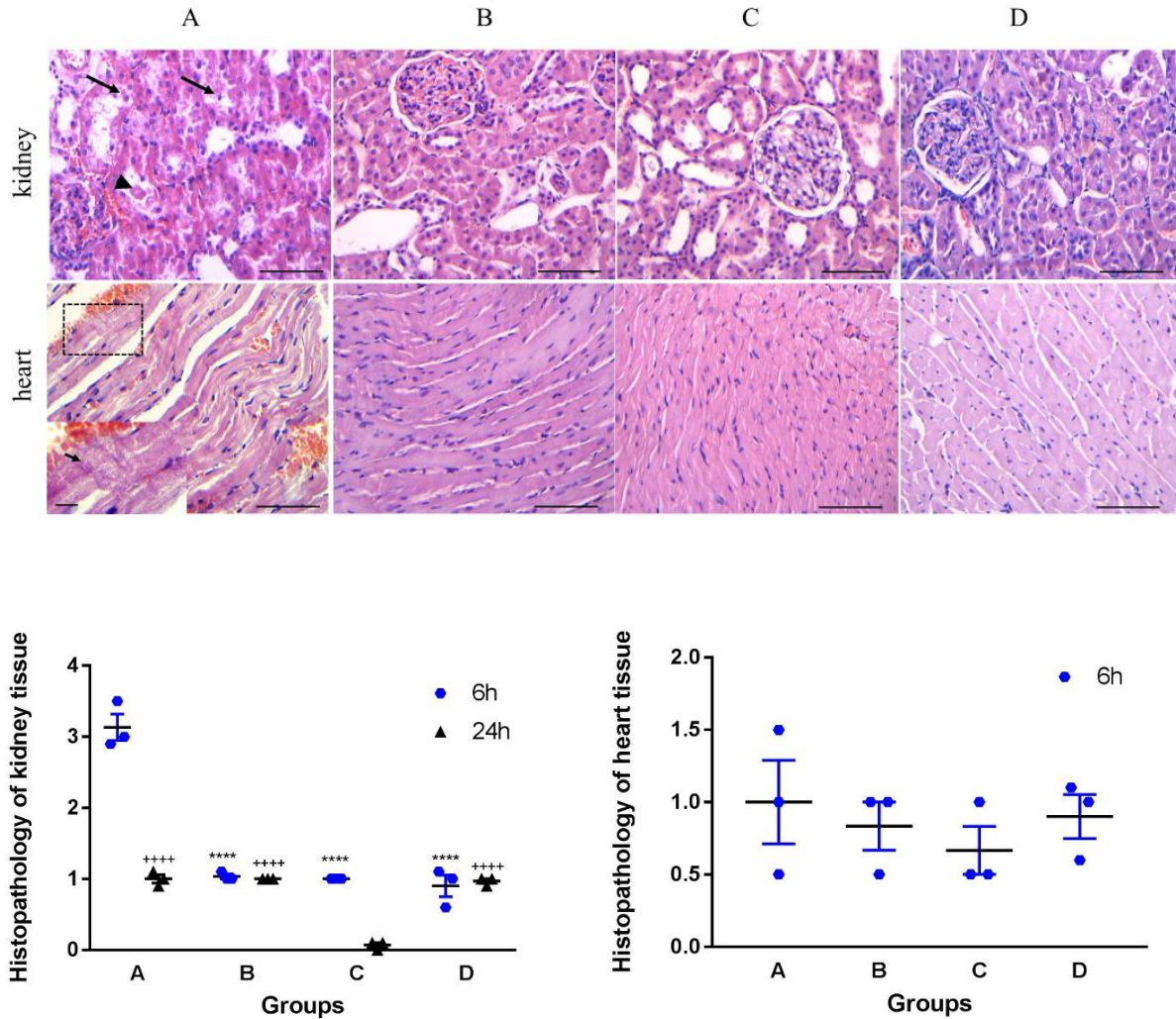


ii.



iii.



B i.

Σχήμα 2. Η προετοιμασία επιφέρει μια προστατευτική δράση στην ακεραιότητα του ιστού. Α. Βελτιωμένο προφίλ σε σημαντικούς βιοχημικούς δείκτες στις ομάδες προετοιμασίας. i. Σημαντική μείωση στα επίπεδα CRP που υποδεικνύουν μειωμένη φλεγμονή. ii. Σημαντική μείωση στα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης που δείχνουν μια προστατευτική δράση στη νεφρική λειτουργία. iii. Σημαντική μείωση στα επίπεδα CPK, LDH, SGPT and K⁺ που υποδεικνύουν μειωμένη βλάβη στους ιστούς. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως mean ± SEM (n=5), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, +p<0.05 C vs D. Β. Αντιπροσωπευτικά δείγματα με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης αποκαλύπτουν μειωμένη βλάβη σε νεφρικούς και καρδιακούς ιστούς στις ομάδες προετοιμασίας. Και στις δυο περιπτώσεις το ολικό σκορ (που κυμαίνεται από 0-5) είναι βελτιωμένο στις ομάδες αυτές. Οι κεφαλές των βελών υποεικνύουν σωληνοειδείς ρωγμές και τα απλά βέλη αποκομμένα

νεκρωτικά κύτταρα στο νεφρό (scale bar: 100 μ m). Βέλη μέσα στην απεικόνιση δείχνουν ζώνες συστολής στο μυοκάρδιο (scale bar: 100 μ m; scale bar within inset 20 μ m). Ποσοτικοποιημένα δεδομένα εκφράζονται ως mean \pm SEM (n=3). For the kidney tissue, ***p< 0.0001 for 6h; +++p< 0.0001 for 24h.

9β. Οι χειρισμοί μειώνουν τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο νεφρό και στην καρδιά

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω το αποτέλεσμα κάθε περιεγχειρητικής τεχνικής, κάναμε ιστοπαθολογική εκτίμηση των νεφρών και της καρδιάς. Στις περιπτώσεις των ιστών που δεν υπέστη χειρισμούς η νεφρική βλάβη ήταν εκτεταμένη από την πρώτη χρονική στιγμή, κατά την οξεία φάση (6h), με απώλεια των ορίων τριχοειδών, νεκρωτικών κυττάρων και αποκοπή αυτών μέσα στον αυλό των σωληναρίων, και σχηματισμό των πρωτεϊνικών θραύσεων αναμεμιγμένων με νεκρωτικά θραύσματα (**Σχήμα 2B**). Παρομοίως, στο μυοκαρδιακό ιστό που δεν υπέστη χειρισμούς, παρατηρήθηκαν μη αναστρέψιμες βλάβες από την οξεία φάση των 6 ωρών, τα οποία συνοδεύονταν από κυτταρικά κενोटόπια, εστιακό διάμεσο οίδημα και αιμοραγική διήθηση (**Σχήμα 2B**). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ισχαιμική προετοιμασία μειώνει στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν στους ιστούς χωρίς χειρισμούς και στα δυο όργανα, νεφρό και καρδιά, και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα από την βιοχημική ανάλυση.

9γ. Οι χειρισμοί μειώνουν τη συσσώρευση βλάβης DNA σε νεφρό και καρδιά

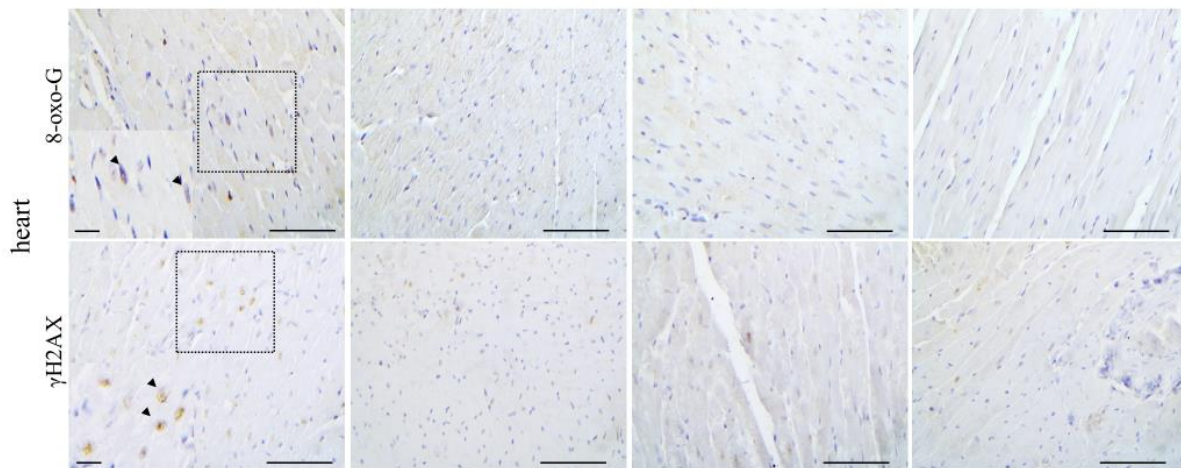
Ένας κρίσιμος παράγοντας στη βλάβη επαναιμάτωσης κατά την αποκατάσταση της αιματικής ροής είναι η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών [150]. Για να αξιολογηθεί η οξειδωτική βλάβη DNA εξετάσαμε τα επίπεδα της 8-οξο-γουανίνης (8-oxo-G), η οποία αποτελεί βασικό προϊόν της οξειδωτικής βλάβης που αντανακλά το κυτταρικό οξειδωτικό στρες [117]. Τα επίπεδα της 8-oxo-G μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε όλες τις ομάδες χειρισμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (**Σχημα 3Ai, ii**) Σε αυτό το πλαίσιο, η αξιολόγηση της οξειδάσης NADPH (NOX4), μιας

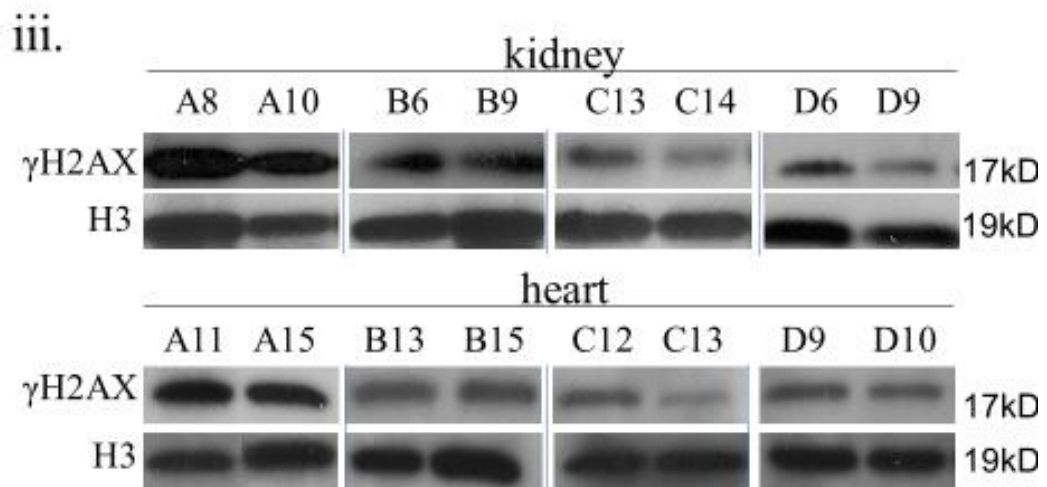
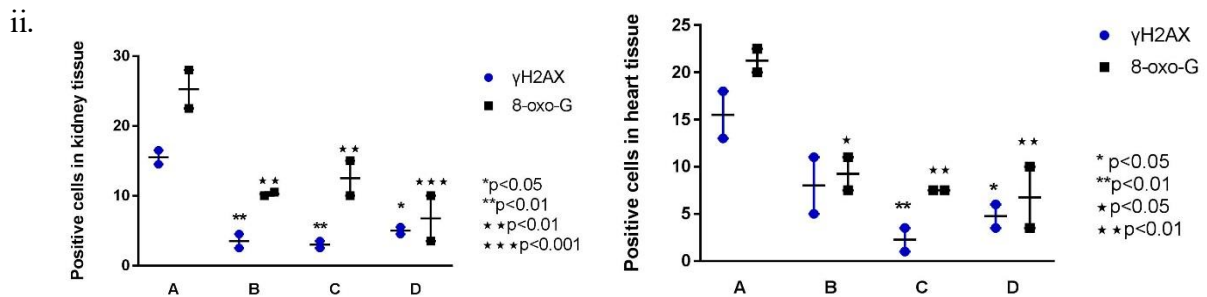
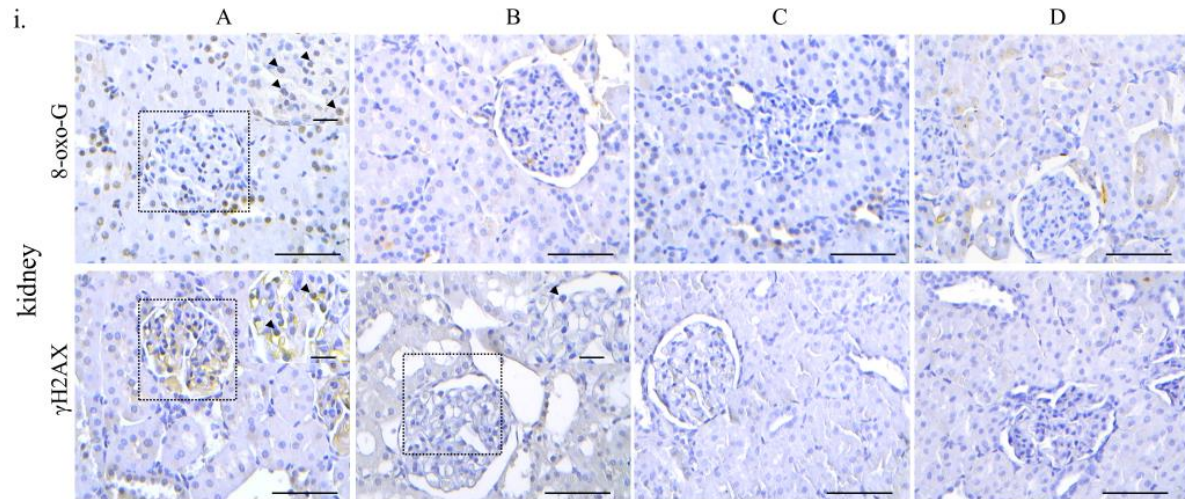
σημαντικής ενζυματικής παραγωγής ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα του μυοκαρδίου [164], παρουσίασε υψηλά επίπεδα NOX4 στην ομάδα A συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες, το οποίο συνάδει με τα προηγούμενα ευρήματα (Σχήμα 4A).

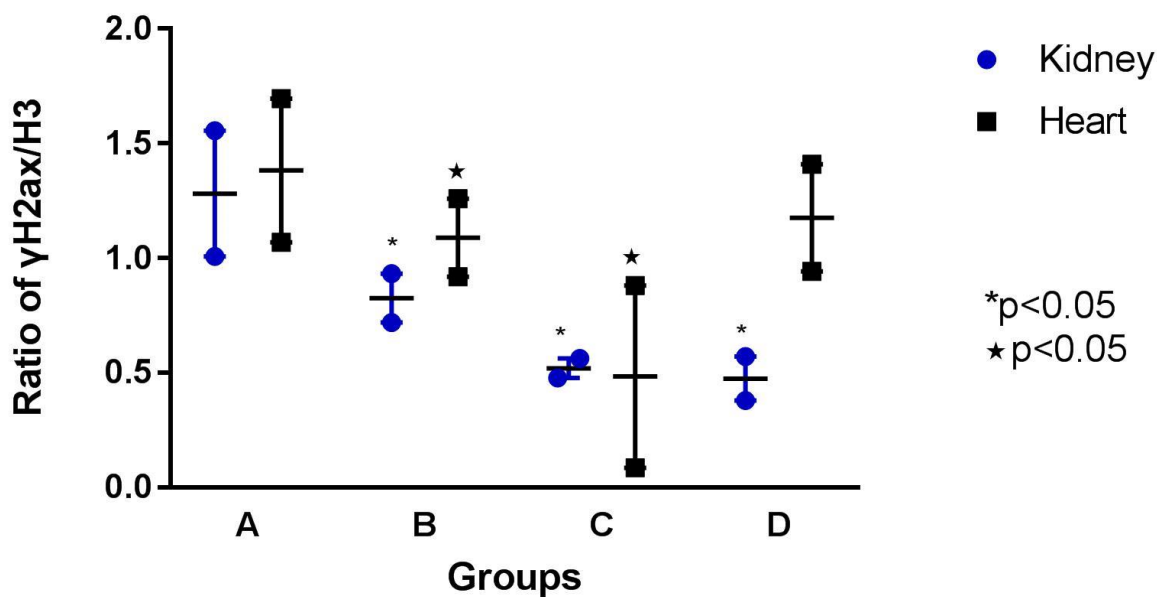
Δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν με τη σειρά τους να προκαλέσουν θραύσεις των αλυσίδων DNA, εξετάσαμε την παρουσία των δικλωνικών θραύσεων DNA (DSBs) [165]. Συγκεκριμένα αξιολογήσαμε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX στη Σερίνη 139 (ονομαζόμενη γ H2AX), ένα πρωτότυπο δείκτη που συσσωρεύεται στις περιοχές με DSBs καθώς και τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ATM κινάσης στη Σερίνη 1981 (επονομαζόμενη ως pATM) η οποία είναι μια πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται κατά τη δημιουργία DSBs [104]. (Σχήμα 3Ai,ii)

Σχήμα 3

A







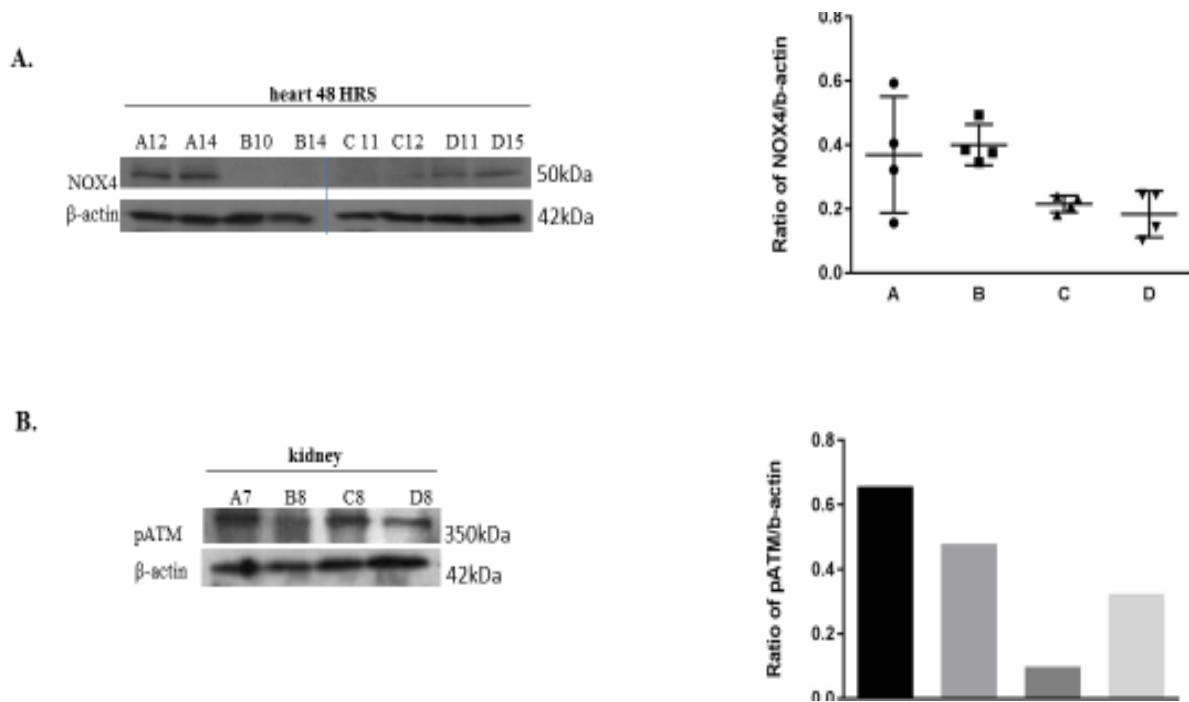
Σχήμα 3. A. Μειωμένη βλάβη DNA σε ομάδες χειρισμού. i. Μειωμένα επίπεδα ανοσοχρώσης 8-οξο-G και γH2AX σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ομάδων χειρισμού σε νεφρό και καρδιά. Οι κεφαλές βελών επιδεικνύουν θετική χρώση 8-οξο-G και γH2AX (κλίμακα: 100μm) ii. Τα αντιπροσωπευτικά γραφήματα παρουσιάζουν τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± SEM. iii. Η ανοσοτύπωση κατά Western σε αντιπροσωπευτικά δείγματα για τον εντοπισμό επιπέδων γH2AX έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού. H3 λειτούργησε ως πρότυπο φόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση της Western Blot του γH2AX/H3 έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού ιδίως στην ομάδα C. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± SEM.

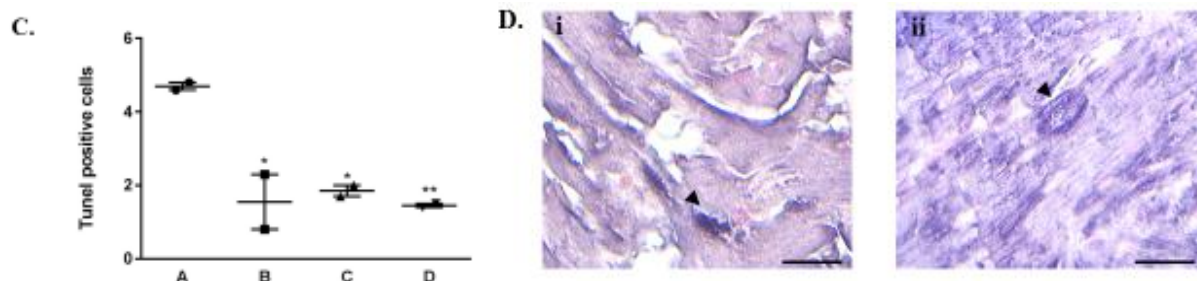
Αξίζει να σημειωθεί ότι οι χειρισμοί μείωσαν τα επίπεδα γH2AX στο νεφρό και στην καρδιά, υποστηρίζοντας περαιτέρω την προστατευτική δράση αυτής της στρατηγικής. Η ανάλυση στυλώματος κατά Western για την γH2AX και την φωσφορυλιωμένη pATM, επιβεβαίωσε τα ανοσοϊστοχημικά μας ευρήματα, επαληθεύοντας την προστατευτική δράση των περιεγχειρητικών χειρισμών στην ακεραιότητα του DNA. (Σχήμα 3Aiii και Σχήμα 4B) Επιπλέον παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα απόπτωσης περιπτώσεις χειρισμού το οποίο συμφωνεί με: α) τη μειωμένη ενεργοποίηση της απόκρισης στη βλάβη DNA (DDR/R) η οποία αντικατοπτρίζεται από τα επίπεδα της γH2AX και pATM, και β) με τις μειωμένες ιστοπαθολογικές αλωιώσεις στις περιοχές αυτές

(Σχήμα 4C). Επιπλέον, δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των μηχανισμών DDR/R μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τη γήρανση, την αξιολογήσαμε χρησιμοποιώντας μια καινοτόμο τεχνική ανοσοιστοχημικής ανάλυσης με την ουσία GL-13 [158]. Ωστόσο δεν βρήκαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Σχήμα 4D).

Συλλογικά τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν την επίδραση των χειρισμών στα θραύσματα των αλυσίδων DNA, αξιολογώντας τη συσσώρευση δυο ευαίσθητων δεικτών των δικλωνικών θραύσεων DNA (DSBs) και στα δυο όργανα, το νεφρό που είναι και το άμεσα επηρεαζόμενο όργανο και στην καρδιά που είναι το απομακρυσμένο όργανο.

Σχήμα 4





Σχήμα 4. Α. Η ανοσοτύπωση Western Blot δείχνει μειωμένα επίπεδα NOX4 στο μυοκάρδιο σε ομάδες χειρισμού. Η β-ακτίνη λειτουργεί ως πρότυπο. Η ποσοτικοποίηση της ανάλυσης Western Blot της NOX4/b-actin έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού. Β. Η ανοσοτύπωση Western Blot του δείκτη DDR, pATM σε αντιπροσωπευτικά δείγματα, παρουσίασε μειωμένα δείγματα στις ομάδες χειρισμού. Η β-ακτίνη λειτουργεί ως πρότυπο. Η ποσοτικοποίηση της ανάλυσης Western Blot της pATM/b-actin έδειξε μειωμένα επίπεδα στις ομάδες χειρισμού, ιδίως στην ομάδα C. C. Αξιολόγηση της γήρανσης στο νεφρό με τη μέθοδο TUNEL , έδειξε μειωμένα επίπεδα αποπτωτικών κυττάρων στις ομάδες χειρισμού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος ± SEM. *p<0.05, **p<0.01. D. Αξιολόγηση της γήρανσης χρησιμοποιώντας την ουσία GL-13. Τα βέλη δείχνουν θετικά κύτταρα σε αντιπροσωπευτικά δείγματα από τις ομάδες A(i) και D(ii). Κλίμακα: 25μm.

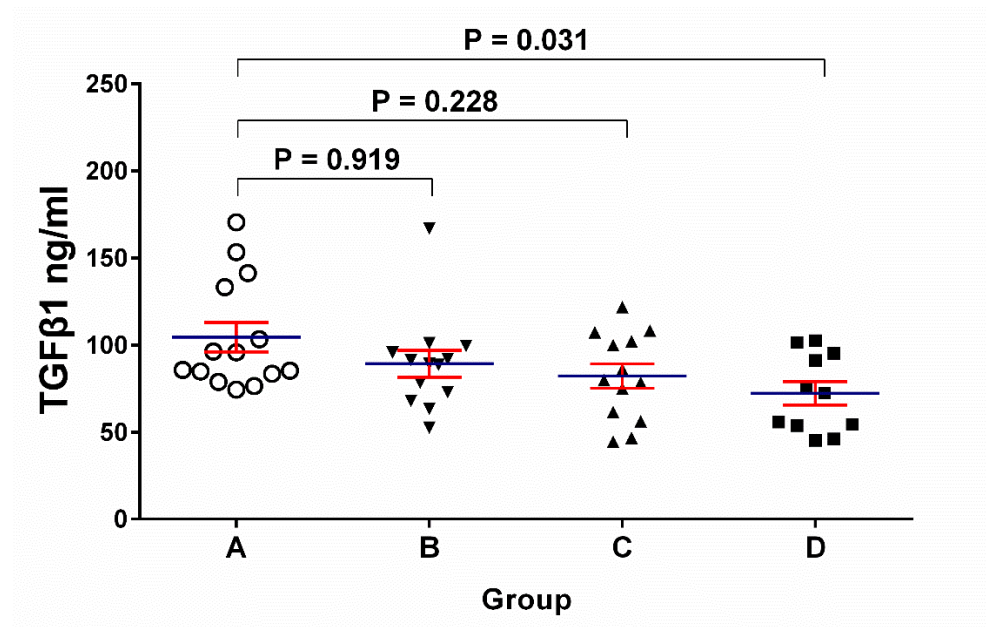
9δ. Οι χειρισμοί μειώνουν τα επίπεδα TGFβ-1 στον ορό

Το μη στοχοποιημένο αποτέλεσμα της ισχαιμίας επαναιμάτωσης στην καρδιά είναι ενδεικτικό της παρουσίας ενδιάμεσων μορίων που απελευθερώνονται από το άμεσο επηρεαζόμενο όργανο και προκαλούν DNA βλάβες σε απομακρυσμένες περιοχές. Επικεντρώσαμε την ανάλυσή μας στην επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα της TGFβ-1 στον ορό για τους παρακάτω εξής λόγους: (α) τα επίπεδα TGFβ-1 mRNA είναι υψηλά μετά από βλάβη ισχαιμίας σε νεφρό επίμυα [166], (β) TGFβ-1 παίζει κεντρικό ρόλο στην ομοίωση του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση [167], (γ) TGFβ-1 επάγει την παραγωγή ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου κυρίως μέσω της NOX4 και τα ROS με τη σειρά τους ενισχύουν τη δράση της TGFβ-1 δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο [168], (δ) TGFβ-1 μπορεί να επάγει τις δικλωνικές θραύσεις σε απομακρυσμένα κύτταρα με τη βοήθεια των ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου [169]. Όπως ήταν αναμενόμενο οι

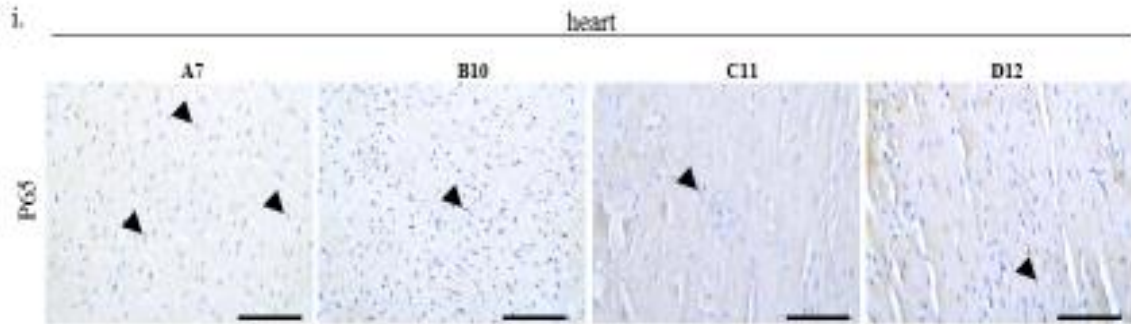
χειρισμοί μείωσαν τα επίπεδα της TGFβ-1, ιδίως στις ομάδες B,C και D (**Σχήμα 5A**), το οποίο συνάδει με τα μειωμένα επίπεδα των 8-οχο-G, γH2AX, pATM και NOX4 σε νεφρό και καρδιά στις ομάδες χειρισμού. Η μειωμένη πυρηνική ανοσοχρώση της p65, ένα downstream στόχο της TGFβ-1 στο μυοκάρδιο [167-169], επιβεβαιώνει επιπλέον τα ανωτέρω ευρήματα (**Σχήμα 5B**). Επιπλέον, υποκινούμενοι από προηγούμενα ευρήματα που συνδέουν την πρωτεΐνη MCP-1 (η οποία αποκαλείται επίσης και CCL2) με τη βλάβη DNA σε απομακρυσμένους ιστούς ακολουθούμενοι από ραδιενέργεια [170], εξετάσαμε τα επίπεδα της MCP-1 στο δικό μας πείραμα αλλά δεν βρήκαμε διαφορές ανάμεσα στις ομάδες χειρισμού και στην ομάδα ελέγχου. Συνολικά, τα ευρήματά μας υποστηρίουν ότι η TGF-β1 συμμετέχει στην βλάβη από ισχαιμία επαναιμάτωση στο μυοκάρδιο μετά από αποκλεισμό της κοιλιακής αορτής.

Σχήμα 5

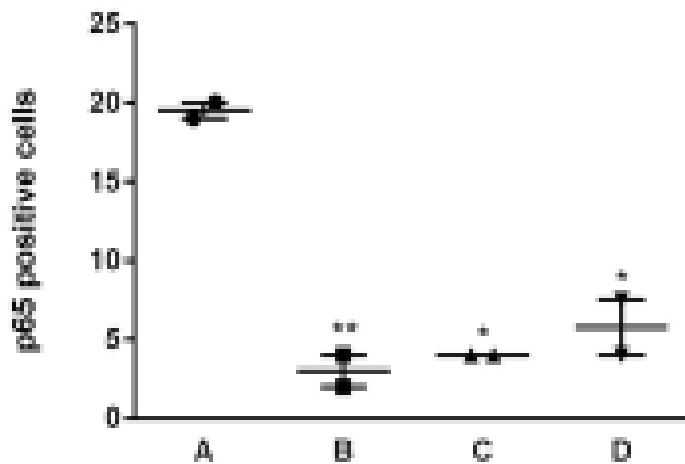
A.



B.



ii



Σχήμα 5. Α. Μειωμένα επίπεδα της TGFβ1 στον ορό των ομάδων με χειρισμό σε σχέση με τις ομάδες που δεν υπάστη χειρισμό, με πιο έντονη τη διαφορά στην υπο-ομάδα D ($p=0.031$). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος \pm SEM (one-way ANOVA with Turkey's post hoc test). Β. (i) Μειωμένη χρώση του πυρήνα για το p65 στο μυοκάρδιο των ομάδων με χειρισμό (scale bars: 100μm). Τα αντίστοιχα διαγράμματα διασποράς απεικονίζουν το μέσο των πυρηνικής ανοσόχρωσης του p65. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος \pm SEM ($n=2$) * $p<0.05$, ** $p<0.001$ A vs B, C, D for 24h (one-way ANOVA with Turkey's post hoc test). Β. (ii) Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των

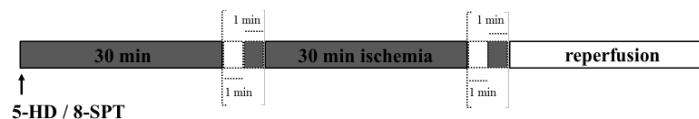
επιπέδω ορού CCL2/MCP-1 serum levels μεταξύ των ομάδων A, B, C, and D. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος \pm SEM (one-way ANOVA with Turkey's post hoc test).

9ε. Η θεραπεία με 5-HD και 8-SPT αναστέλλει την προστατευτική δράση των χειρισμών

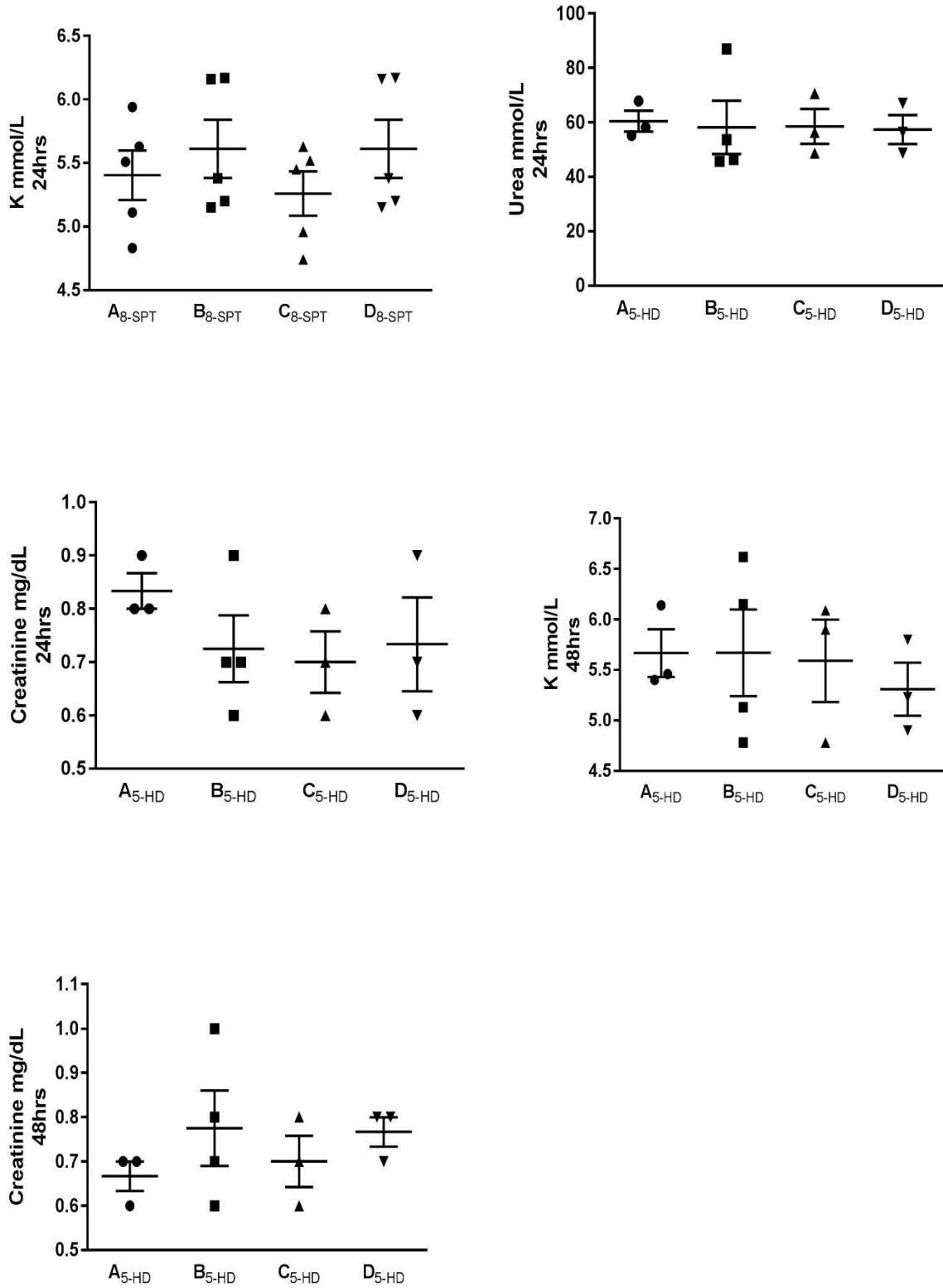
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση του αναστολέα των διαύλων KATP 5-HD ή του 8-SPT, ο οποίος αναστέλλει τους υποδοχείς αδενοσίνης, ακυρώνει τα προστατευτικά αποτελέσματα των χειρισμών IPC, IPost και IPC+Ipost [44, 171]. Η χορήγησή τους ξεχωριστά και ανεξάρτητα, πριν από την εφαρμογή της απόφραξης της υπερνεφρικής αορτής (**Σχήμα 6A**) οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα βιοχημικών δεικτών όπως ουρίας, κρεατινίνης, και καλίου σε ομάδες που υπέστη χειρισμούς (**Σχήμα 6B**). Σε αυτό το πλαίσιο, αξιολόγηση των ιστών αυτών των ομάδων, αποκάλυψε στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) βλάβη στους ιστούς νεφρών και καρδιάς (**Σχήμα 6C**). Ως εκ τούτου, η χορήγηση του 5-HD ή 8-SPT καταργεί το προστατευτικό αποτέλεσμα της προετοιμασίας τόσο στο νεφρό όσο και στην καρδιά. Η εξέταση των επιπέδων TGF β 1 στον ορό έδειξε παρόμοια επίπεδα σε διαφορετικά χρονικά σημεία, το οποίο υποστηρίζει επιπλέον το προτεινόμενο ρόλο της TGF- β 1 στη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (**Σχήμα 7**).

Σχήμα 6

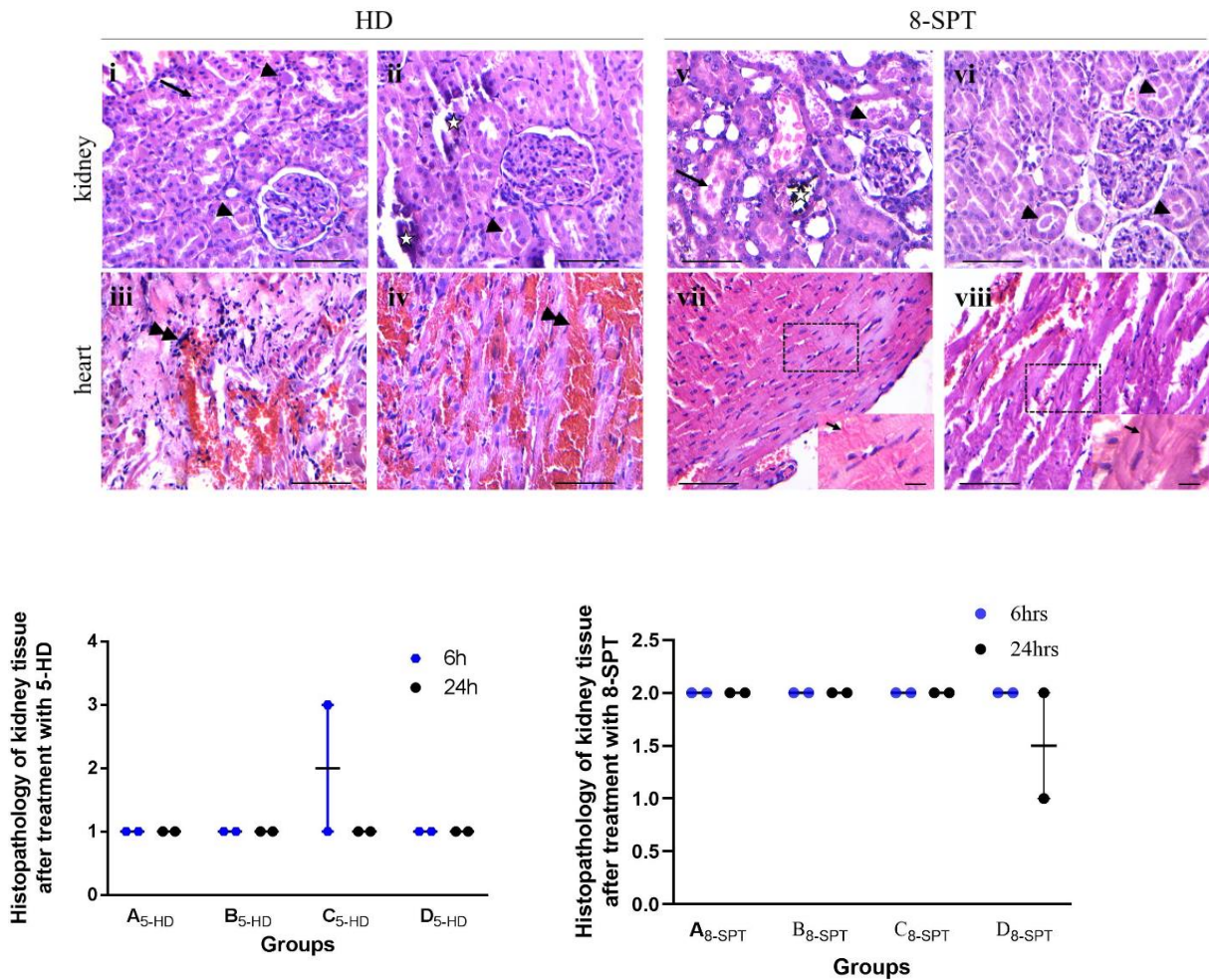
A.



B.

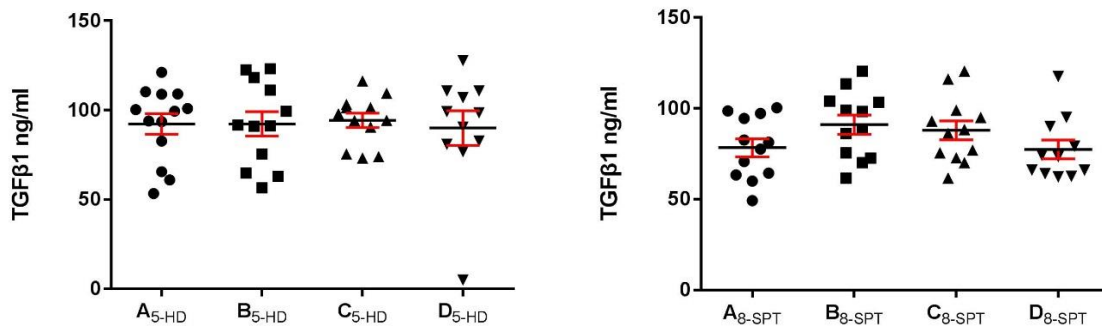


C.



Σχήμα 6. Θεραπεία με 5-HD και 8-SPT εξαλείφουν τις προστατευτικές δράσεις των χειρισμών. Α. Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχήματος. 5-HD και 8-SPT χορηγήθηκαν πριν τον αποκλεισμό της υπερνεφρικής αορτής και των κύκλων ισχαιμίας- επαναϊμάτωσης. Β. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα βιοχημικών δεικτών στις ομάδες μετά τη χορήγηση των ουσιών. C. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε αντιπροσωπευτικά δείγματα έδειξε στατιστικά σημαντική βλάβη ιστών στις ομάδες χειρισμού στις οποίες χορηγήθηκαν οι ουσίες. Σωληνοειδείς ρωγμές (κεφαλές βελών) μαζί με τα αποκομμένα νεκρωτικά κύτταρα (βέλη) και την ασβεστοποίηση (αστερίσκοι) στον πυρήνα των νεφρών από αντιπροσωπευτικά δείγματα post-conditioning (i, v), pre-conditioning (vi) και συνδυασμού pre- and post-conditioning (ii). Κλίμακα: 100μm. Η αιμορραγική μαζί με τη φλεγμονώδη διήθηση των κυττάρων (διπλές κεφαλές βελών) και οι ζώνες συστολής (βέλη) στο μυοκάρδιο από αντιπροσωπευτικά δείγματα post-conditioning (iii, vii), pre-conditioning (viii) and combined pre- and post-conditioning (iv). Κλίμακα: 100μm. Το ιστολογικό σκορ κυμαίνεται από 0 έως 5.

Σχήμα 7



Σχήμα 7. Όχι στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα TGF-β1 στον ορό στις ομάδες χειρισμού σε σχέση με την ομάδα A έπειτα από τη χορήγηση των ουσιών 5-HD και 8-SPT.

10. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα, επιπολασμό σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο και οξεία νεφρική βλάβη. [18] Αν και η νεφρική και καρδιακή βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση έχουν μελετηθεί διεξοδικά, οι μοριακοί μηχανισμοί που υποβόσκουν δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι. Η παρούσα εργασία συνεισφέρει στο να κατανοήσουμε την επίδραση διάφορων χειρισμών στο πλαίσιο του αποκλεισμού της κοιλιακής αορτής σε επίμυα στο νεφρό και στην καρδιά, ως άμεσο και απομακρυσμένο όργανο αντίστοιχα. Η ισχαιμική προετοιμασία (IPre)-Group C, η ισχαιμική προστασία (IPost)-Group B και ο συνδυασμός τους (IPre+IPost)-Group D οδήγησαν σε βελτιωμένο βιοχημικό προφίλ αντικατοπτρίζοντας: α) βελτιωμένη νεφρική λειτουργία και β) μειωμένη καταστροφή των ιστών σε σύγκριση με την ομάδα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Group A). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα CRP που έχουν συσχετισθεί με οξεία νεφρική βλάβη [172], τα επίπεδα της CRP σε όλες τις ομάδες χειρισμού ήταν μειωμένα συγκριτικά με την ομάδα A, το οποίο υποδεικνύει μια παρατεταμένη φλεγμονώδη απόκριση στην τελευταία. Η ιστολογική ανάλυση σε νεφρό και

καρδιά επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζοντας μια προστατευτική δράση σε όλες τις ομάδες χειρισμού. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με την ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των Wever et al το 2012 [173] που έγινε βάση 58 πειραματικών μελετών και η οποία έδειξε ότι η IPre μείωνε τα επίπεδα κρεατινίνης, ουρίας και την ιστολογική βλάβη συγκριτικά με ζώα που δεν είχαν υποστεί χειρισμό. Η μείωση αυτή ήταν πιο έντονη στο δεύτερο παράθυρο προστασίας (SWOP), η οποία εμφανίζεται 24 με 48 ώρες μετά την IPre. [174]

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συσσώρευση του βιολογικού δείκτη οξειδωτικής βλάβης DNA, 8-oxo-G, σε νεφρικό ιστό μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση. [175] Στη μελέτη αυτή δείξαμε για πρώτη φορά ότι οι διαφορετικοί χειρισμοί οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα 8-oxo-G τόσο σε νεφρό όσο και σε καρδιά. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, παρείχαμε επιπλέον αποδείξεις ότι η NOX4 ρυθμίζεται προς τα κάτω στο μυοκάρδιο στις ομάδες χειρισμού, το οποίο συνάδει με το ρόλο της NOX4 ως μια σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. [176]

Μέχρι στιγμής αποτυπώσαμε ότι οι χειρισμοί μειώνουν τις οξειδωτικές μετατροπές του DNA. Λαμβάνοντας υπόψιν μια παλαιότερη εργασία που παρουσίασε αυξημένα επίπεδα γH2AX και pATM σε νεφρικό ιστό κατά τη διάρκεια νεφρικής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [177], θα περιμένε κανείς ότι οι χειρισμοί επιβραδύνουν την ενεργοποίηση της απόκρισης για επιδιόρθωση DNA. Σε συμφωνία με την υπόθεσή μας, τα επίπεδα γH2AX και pATM ήταν μειωμένα σε όλες τις ομάδες χειρισμού σε σχέση με την ομάδα A, σε νεφρικό ιστό που ήταν το άμεσα επηρεαζόμενο όργανο αλλά και στο μυοκαρδιακό ιστό που ήταν το απομακρυσμένο όργανο. Οι γH2AX και pATM είναι ευαίσθητοι και σημαντικοί βιολογικοί δείκτες που συσσωρεύονται στα σημεία δικλωνικών θραύσεων. Με τον τρόπο αυτό αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι οι χειρισμοί έχουν μια άμεση προστατευτική δράση στο DNA. Με βάση προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η

αναστολή της πολυμεράσης PARP (Poly(ADP ribose)[104], ενός σημαντικού ενζύμου στο μονπάτι απόκριση DDR, που προστατεύει ενάντια στην βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου[178], τα δικά μας αποτελέσματα παρέχουν επιπλέον αποδείξεις για τη σημαντικότητα της απόκρισης DDR με την βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και τους χειρισμούς IPre και IPost. Παρομοίως, η απόπτωση ήταν μειωμένη στις ομάδες χειρισμού, το οποίο επιπλέον υποστηρίζει την προστατευτική δράση των IPre και IPost και επίσης έρχεται σε συμφωνία με ευρύματα προηγούμενων μελετών. [179]

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν ότι τα επίπεδα της TGF-β1 ήταν μειωμένα σε όλες τις ομάδες χειρισμού σε σύγκριση με την ομάδα A. Σημειωτέον η μείωση αυτή ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα D δηλαδή στον συνδυασμό των χειρισμών IPre και IPost. Η TGF-β1 είναι μια πλειοτρόπος κινάση η οποία συντίθεται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων και επηρεάζει διάφορες διεργασίες ανάλογα με τη φάση του κυττάρου. [180] Συσσωρευμένα στοιχεία αποδεικνύουν ότι η TGF-β1 ρυθμίζεται θετικά μετά από μια οξεία ισχαιμία παρέχοντας ευεργετική επίδραση στο νεφρό και στη καρδιά μετά από βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. [166, 167, 181-183] Αυτές οι παρατηρήσεις τονίζουν τον ευεργετικό ρόλο της TGF-β1, η οποία με την πρώτη ματιά φαίνεται αντίθετη με τα ευρήματά μας. Ωστόσο, από μια ευρύτερη ματιά, η θετική ρύθμιση της TGF-β1 μπορεί να έχει προστατευτική δράση μέχρι ένα όριο, ωστόσο πάνω από ορισμένα όρια μπορεί να επιφέρει ανεπιθύμητες δράσεις στην ομοιόσταση του κυττάρου επάγοντας οξειδοαναγωγική ανισορροπία. Το τελευταίο έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η TGF-β1 επάγει την παραγωγή ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου σε συγκεκριμένες καταστάσεις. [168] Ως εκ τούτου, τα παρατηρούμενα μειωμένα επίπεδα TGF-β1 μετά τον χειρισμό στο δικό μας πλαίσιο, μπορεί να ευνοεί την προστατευτική δράση της κυτοκίνης αυτής στην ακεραιότητα των ιστών. Με παρόμοιο τρόπο, οι ελεύθερες ρίζες έχουν διαφορούμενη φύση στη φυσιολογία των χειρισμών, όπου

αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν βλάβη των ιστών ενώ μικρές ποσότητες προστατεύουν κυτταρικές λειτουργίες. [184] Κατά αυτόν τον τρόπο η βιολογία ισχαιμίας-επαναιμάτωσης θυμίζει πολύ έντονα την πολυπλοκότητα της βιολογίας απομακρυσμένης δράσης από ραδιενέργεια. [170] Μέσα σε αυτό το πλαίσιο απεικονίστηκε συστηματική απόκριση σε ιστούς εκτός πεδίου κατά την ακτινοβολήση το οποίο επαληθεύεται από τις εστίες γH2AX που υποδηλώνουν βλάβη στο DNA. Ένα στοιχείο για τον υποκείμενο μηχανισμό προέρχεται από τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας ορισμένων κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της TGF-β1, που μπορεί να διαδραματίζουν ένα ρόλο ως μεσολαβητές μη στοχευμένων αποτελεσμάτων προκαλώντας οξειδωτικό στρες σε απομακρυσμένες θέσεις.[170]

Για να έχουμε καλύτερη επίγνωση, αποκλείσαμε ξεχωριστά και ανεξάρτητα δυο προστατευτικά μονοπάτια της IRI. [44, 45, 171, 185] Η χορήγηση του μη εκλεκτικού αναστολέα υποδοχέων της αδενοσίνης 8-SPT ή του αναστολέα μιτοχονδριακού ATP διαύλου 5-HD εξαφάνισαν την προστατευτική δράση των χειρισμών. Η καταστροφή της νεφρικής δομής ακολουθούμενη από ανεπάρκεια της νεφρικής λειτουργίας μαζί με μυοκαρδιακή βλάβη ήταν εμφανής σε όλες τις ομάδες, ανεξάρτητα από τους χειρισμούς. Ήταν πολύ ενδιαφέρον πως και τα επίπεδα της TGF-β1 ήταν παρόμοια σε όλες τις ομάδες χειρισμού και μη, το οποίο υποδεικνύει τη συμμετοχή της στη βιολογία της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

Συλλογικά, αυτά τα δεδομένα επιδεικνύουν σημαντική συστηματική επίδραση της απόφραξης της υπερνεφρικής κοιλιακής αορτής, επισημαίνοντας τον ευεργετικό ρόλο των διάφορων χειρισμών σε πολλαπλές κλίμακες καθώς και την προστατευτική δράση στο DNA. Επιπλέον, η δουλειά αυτή μπορεί να υποδεικνύει ότι η TGF-β1 μπορεί να είναι πιθανός μεσολαβητής στα απομακρυσμένα αποτελέσματα σε αυτό το πλαίσιο, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο συγκεκριμένος μηχανισμός. Η κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που εμπλέκονται στην

ισχαιμική προστασία είναι καθοριστική προκειμένου να υπερνικήσουμε τις τρέχουσες προκλήσεις στη μετάφραση των πειραματικών δεδομένων σε κλινικό περιβάλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kelly, F.J., *Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects*. *Occup Environ Med*, 2003. **60**(8): p. 612-6.
2. Johnston, K.W., et al., *Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery*. *J Vasc Surg*, 1991. **13**(3): p. 452-8.
3. Sweeting, M.J., et al., *Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms*. *Br J Surg*, 2012. **99**(5): p. 655-65.
4. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation*. *Circulation*, 2006. **113**(11): p. e463-654.
5. Chaikof, E.L., et al., *The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines*. *J Vasc Surg*, 2009. **50**(4 Suppl): p. S2-49.
6. Chaikof, E.L., et al., *SVS practice guidelines for the care of patients with an abdominal aortic aneurysm: executive summary*. *J Vasc Surg*, 2009. **50**(4): p. 880-96.
7. Kent, K.C., et al., *Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals*. *J Vasc Surg*, 2010. **52**(3): p. 539-48.
8. Mussa, F.F., *Screening for abdominal aortic aneurysm*. *J Vasc Surg*, 2015. **62**(3): p. 774-8.
9. Singh, K., et al., *Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromso Study*. *Am J Epidemiol*, 2001. **154**(3): p. 236-44.
10. Powell, J.T. and R.M. Greenhalgh, *Clinical practice. Small abdominal aortic aneurysms*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(19): p. 1895-901.
11. Scott, R.A., H.A. Ashton, and D.N. Kay, *Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years*. *Br J Surg*, 1991. **78**(9): p. 1122-5.
12. Lederle, F.A., et al., *Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group*. *Ann Intern Med*, 1997. **126**(6): p. 441-9.
13. Boll, A.P., et al., *High prevalence of abdominal aortic aneurysm in a primary care screening programme*. *Br J Surg*, 1998. **85**(8): p. 1090-4.
14. Lederle, F.A., *The rise and fall of abdominal aortic aneurysm*. *Circulation*, 2011. **124**(10): p. 1097-9.
15. Svensjo, S., et al., *Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease*. *Circulation*, 2011. **124**(10): p. 1118-23.
16. Sieunarine, K., M.M. Lawrence-Brown, and M.A. Goodman, *Comparison of transperitoneal and retroperitoneal approaches for infrarenal aortic surgery: early and late results*. *Cardiovasc Surg*, 1997. **5**(1): p. 71-6.
17. Welch, H.G., et al., *Estimating treatment benefits for the elderly: the effect of competing risks*. *Ann Intern Med*, 1996. **124**(6): p. 577-84.

18. Yeung, K.K., et al., *Organ protection during aortic cross-clamping*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2016. **30**(3): p. 305-15.
19. Grant, S.W., et al., *What are the risk factors for renal failure following open elective abdominal aortic aneurysm repair?* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2012. **43**(2): p. 182-7.
20. Norwood, M.G., M.J. Bown, and R.D. Sayers, *Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. **28**(3): p. 234-45.
21. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
22. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury*. J Biol Chem, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
23. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
24. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 181-90.
25. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
26. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes*. EXS, 1996. **76**: p. 99-114.
27. Bond, J.M., B. Herman, and J.J. Lemasters, *Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(2): p. 798-803.
28. Kim, J.S., Y. Jin, and J.J. Lemasters, *Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H2024-34.
29. Li, X., et al., *Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury*. Exp Ther Med, 2016. **12**(6): p. 3823-3829.
30. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
31. Jonassen, A.K., et al., *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1191-8.
32. Apstein, C.S. and L.H. Opie, *A challenge to the metabolic approach to myocardial ischaemia*. Eur Heart J, 2005. **26**(10): p. 956-9.
33. Opie, L.H., *Glucose and the metabolism of ischaemic myocardium*. Lancet, 1995. **345**(8964): p. 1520-1.
34. Mehta, S.R., et al., *Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial*. JAMA, 2005. **293**(4): p. 437-46.
35. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
36. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 1): p. 93-8.
37. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
38. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.

39. Hausenloy, D.J., et al., *Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(2): p. H971-6.
40. Granfeldt, A., D.J. Lefer, and J. Vinten-Johansen, *Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(2): p. 234-46.
41. Bolli, R., *Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(11): p. 1897-918.
42. Liu, G.S., et al., *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart*. *Circulation*, 1991. **84**(1): p. 350-6.
43. Liu, Y., K. Ytrehus, and J.M. Downey, *Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. **26**(5): p. 661-8.
44. Liu, Y., et al., *Synergistic modulation of ATP-sensitive K⁺ currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning*. *Circ Res*, 1996. **78**(3): p. 443-54.
45. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Ischaemic conditioning and reperfusion injury*. *Nat Rev Cardiol*, 2016. **13**(4): p. 193-209.
46. Cabrera-Fuentes, H.A., et al., *Meeting report from the 2nd International Symposium on New Frontiers in Cardiovascular Research. Protecting the cardiovascular system from ischemia: between bench and bedside*. *Basic Res Cardiol*, 2016. **111**(1): p. 7.
47. Hausenloy, D.J., *Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science)*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(25): p. 4544-63.
48. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. *Circ Res*, 2015. **116**(4): p. 674-99.
49. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
50. Dost, T., M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Redox signaling triggers protection during the reperfusion rather than the ischemic phase of preconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(4): p. 378-84.
51. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. *Circulation*, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
52. Kwan, J.C., et al., *Cardio-protective signalling by glyceryl trinitrate and cariporide in a model of donor heart preservation*. *Heart Lung Circ*, 2015. **24**(3): p. 306-18.
53. Whittaker, P. and K. Przyklenk, *Reduction of infarct size in vivo with ischemic preconditioning: mathematical evidence for protection via non-ischemic tissue*. *Basic Res Cardiol*, 1994. **89**(1): p. 6-15.
54. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. *Circulation*, 1993. **87**(3): p. 893-9.
55. Cabrera-Fuentes, H.A., et al., *RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2015. **48**(5): p. 732-7; discussion 737.
56. Cabrera-Fuentes, H.A., et al., *RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor-alpha in cardiac ischaemia/reperfusion injury*. *Thromb Haemost*, 2014. **112**(6): p. 1110-9.
57. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. *Cardiovasc Res*, 2008. **79**(3): p. 377-86.
58. Heusch, G., et al., *Remote ischemic conditioning*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **65**(2): p. 177-95.
59. Pickard, J.M., et al., *Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop*. *Basic Res Cardiol*, 2015. **110**(1): p. 453.
60. Sivaraman, V., J.M. Pickard, and D.J. Hausenloy, *Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar*. *Anaesthesia*, 2015. **70**(6): p. 732-48.

61. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. *Circulation*, 1996. **94**(9): p. 2193-200.
62. Lim, S.Y., D.M. Yellon, and D.J. Hausenloy, *The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2010. **105**(5): p. 651-5.
63. Steensrud, T., et al., *Pretreatment with the nitric oxide donor SNAP or nerve transection blocks humoral preconditioning by remote limb ischemia or intra-arterial adenosine*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(5): p. H1598-603.
64. Donato, M., et al., *Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning*. *Exp Physiol*, 2013. **98**(2): p. 425-34.
65. Redington, K.L., et al., *Remote cardioprotection by direct peripheral nerve stimulation and topical capsaicin is mediated by circulating humoral factors*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(2): p. 241.
66. Merlocco, A.C., et al., *Transcutaneous electrical nerve stimulation as a novel method of remote preconditioning: in vitro validation in an animal model and first human observations*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(3): p. 406.
67. Weinbrenner, C., et al., *Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(3): p. 590-601.
68. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. *Circ Res*, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
69. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(3): p. 450-6.
70. Pedersen, C.M., et al., *Remote ischemic preconditioning prevents systemic platelet activation associated with ischemia-reperfusion injury in humans*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(2): p. 404-7.
71. Battipaglia, I., et al., *Upper arm intermittent ischaemia reduces exercise-related increase of platelet reactivity in patients with obstructive coronary artery disease*. *Heart*, 2011. **97**(16): p. 1298-303.
72. Shimizu, M., et al., *Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils*. *J Surg Res*, 2010. **158**(1): p. 155-61.
73. Wei, M., et al., *Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction*. *Circ Res*, 2011. **108**(10): p. 1220-5.
74. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(2): p. H579-88.
75. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. *Circulation*, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
76. Iliodromitis, E.K., et al., *Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs*. *Basic Res Cardiol*, 2006. **101**(6): p. 502-7.
77. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 74-85.
78. Yang, X.M., et al., *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(5): p. 1103-10.
79. Ovize, M., et al., *Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology*. *Cardiovasc Res*, 2010. **87**(3): p. 406-23.
80. Gross, E.R. and G.J. Gross, *Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 212-21.

81. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion*. Pharmacol Ther, 2007. **116**(2): p. 173-91.
82. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
83. Yang, X.M., et al., *Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(1): p. 57-63.
84. Kin, H., et al., *Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 124-33.
85. Philipp, S., et al., *Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 308-14.
86. Zatta, A.J., et al., *Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1444-51.
87. Jang, Y., et al., *Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors*. Anesthesiology, 2008. **108**(2): p. 243-50.
88. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 960-6.
89. Chen, Z., T. Li, and B. Zhang, *Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts*. J Surg Res, 2008. **145**(2): p. 287-94.
90. Baxter, G.F. and Z. Ebrahim, *Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(4): p. 843-54.
91. Penna, C., et al., *Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(4): p. 368-77.
92. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(2): p. 185-93.
93. Sies, H. and E. Cadenas, *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **311**(1152): p. 617-31.
94. Halliwell, B., *Oxidants and human disease: some new concepts*. FASEB J, 1987. **1**(5): p. 358-64.
95. Miller, D.M., G.R. Buettner, and S.D. Aust, *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(1): p. 95-108.
96. Palmer, R.M., et al., *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 1251-6.
97. Ghafourifar, P. and E. Cadenas, *Mitochondrial nitric oxide synthase*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(4): p. 190-5.
98. Arrigo, A.P., *Gene expression and the thiol redox state*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 936-44.
99. Kojda, G. and D. Harrison, *Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 562-71.
100. Hecht, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(14): p. 1194-210.
101. Rosenfeld, M.E., *Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process*. Semin Reprod Endocrinol, 1998. **16**(4): p. 249-61.

102. Ashok, B.T. and R. Ali, *The aging paradox: free radical theory of aging*. Exp Gerontol, 1999. **34**(3): p. 293-303.
103. Barzilai, A. and K. Yamamoto, *DNA damage responses to oxidative stress*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1109-15.
104. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
105. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
106. Kawanishi, S., et al., *Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis*. Biol Chem, 2006. **387**(4): p. 365-72.
107. Pateras, I.S., et al., *The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where*. Pharmacol Ther, 2015. **154**: p. 36-56.
108. Almeida, K.H. and R.W. Sobol, *A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(6): p. 695-711.
109. Hoeijmakers, J.H., *Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals*. Trends Genet, 1993. **9**(6): p. 211-7.
110. Cimprich, K.A. and D. Cortez, *ATR: an essential regulator of genome integrity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 616-27.
111. Bartek, J. and J. Lukas, *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 238-45.
112. Redon, C., et al., *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 162-9.
113. Nelms, B.E., et al., *In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts*. Science, 1998. **280**(5363): p. 590-2.
114. Foray, N., et al., *A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2860-71.
115. Durocher, D. and S.P. Jackson, *DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 225-31.
116. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol Pathol, 2002. **30**(6): p. 620-50.
117. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
118. Gunz, F.W., *Bone marrow changes in patients with chronic leukemia treated by splenic X-irradiation; preliminary report*. Blood, 1953. **8**(8): p. 687-92.
119. Parsons, W.B., Jr., et al., *Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia*. Cancer, 1954. **7**(1): p. 179-89.
120. Mole, R.H., *Whole body irradiation; radiobiology or medicine?* Br J Radiol, 1953. **26**(305): p. 234-41.
121. Havaki, S., et al., *The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect*. Cancer Lett, 2015. **356**(1): p. 43-51.
122. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles*. Cancer Res, 1992. **52**(22): p. 6394-6.
123. Mothersill, C. and C. Seymour, *Radiation-induced bystander effects: past history and future directions*. Radiat Res, 2001. **155**(6): p. 759-67.
124. Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little, *Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells*. Curr Cancer Drug Targets, 2004. **4**(1): p. 53-64.

125. Yang, H., N. Asaad, and K.D. Held, *Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts*. *Oncogene*, 2005. **24**(12): p. 2096-103.
126. Sawant, S.G., et al., *The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells*. *Radiat Res*, 2001. **155**(3): p. 397-401.
127. Kadhim, M.A., et al., *Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 738-40.
128. Mothersill, C., C.B. Seymour, and M. Moriarty, *Lactate-mediated changes in growth morphology and transformation frequency of irradiated C3H 10T1/2 cells*. *Cell Biol Int Rep*, 1983. **7**(11): p. 971-80.
129. Lyng, F.M., C.B. Seymour, and C. Mothersill, *Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability?* *Radiat Res*, 2002. **157**(4): p. 365-70.
130. Iyer, R. and B.E. Lehnert, *Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells*. *Mutat Res*, 2002. **503**(1-2): p. 1-9.
131. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. *Mol Aspects Med*, 2011. **32**(4-6): p. 234-46.
132. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. *Mutat Res*, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
133. Sedelnikova, O.A., et al., *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. *Mutat Res*, 2010. **704**(1-3): p. 152-9.
134. Azzam, E.I., S.M. de Toledo, and J.B. Little, *Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect*. *Oncogene*, 2003. **22**(45): p. 7050-7.
135. Sokolov, M.V., et al., *gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(18): p. 2210-2.
136. Morel, F., J. Doussiere, and P.V. Vignais, *The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects*. *Eur J Biochem*, 1991. **201**(3): p. 523-46.
137. Narayanan, P.K., E.H. Goodwin, and B.E. Lehnert, *Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(18): p. 3963-71.
138. Hei, T.K., et al., *Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model*. *J Pharm Pharmacol*, 2008. **60**(8): p. 943-50.
139. Hei, T.K., et al., *Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications*. *Curr Mol Pharmacol*, 2011. **4**(2): p. 96-105.
140. Zhou, H., et al., *Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2233-40.
141. Andarawewa, K.L., et al., *New rationales for using TGFbeta inhibitors in radiotherapy*. *Int J Radiat Biol*, 2007. **83**(11-12): p. 803-11.
142. Burton, D.G. and V. Krizhanovsky, *Physiological and pathological consequences of cellular senescence*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(22): p. 4373-86.
143. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(3): p. 220-8.
144. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
145. Gorgoulis, V.G. and T.D. Halazonetis, *Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(6): p. 816-27.

146. Childs, B.G., et al., *Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy*. Nat Med, 2015. **21**(12): p. 1424-35.
147. Chen, J.H., C.N. Hales, and S.E. Ozanne, *DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7417-28.
148. Moll, F.L., et al., *Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2011. **41** Suppl 1: p. S1-S58.
149. Diehl, J.T., et al., *Complications of abdominal aortic reconstruction. An analysis of perioperative risk factors in 557 patients*. Ann Surg, 1983. **197**(1): p. 49-56.
150. Granger, D.N. and P.R. Kvietys, *Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 524-51.
151. Cordis, G.A., et al., *Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(10): p. 1939-44.
152. Przyklenk, K. and P. Whittaker, *Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 255-9.
153. Ali, Z.A., et al., *Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial*. Circulation, 2007. **116**(11 Suppl): p. I98-105.
154. Remote Preconditioning Trialists, G., et al., *Remote preconditioning and major clinical complications following adult cardiovascular surgery: systematic review and meta-analysis*. Int J Cardiol, 2014. **176**(1): p. 20-31.
155. Duhamel, T.A., et al., *Targeting platelets for prevention and treatment of cardiovascular disease*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(12): p. 1523-33.
156. Massy, Z.A., et al., *Increased plasma S-nitrosothiol levels in chronic haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(1): p. 153-7.
157. Ferdinandy, P., *Peroxynitrite: just an oxidative/nitrosative stressor or a physiological regulator as well?* Br J Pharmacol, 2006. **148**(1): p. 1-3.
158. Evangelou, K., et al., *Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens*. Aging Cell, 2017. **16**(1): p. 192-197.
159. Pateras, I.S., et al., *Downregulation of the KIP family members p27(KIP1) and p57(KIP2) by SKP2 and the role of methylation in p57(KIP2) inactivation in nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2546-56.
160. Evangelou, K., et al., *The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2013. **20**(11): p. 1485-97.
161. Evangelou, K., et al., *E2F-1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barrett oesophagus*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 601-5.
162. Ogrunc, M., et al., *Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation*. Cell Death Differ, 2014. **21**(6): p. 998-1012.
163. Tarcic, O., et al., *RNF20 Links Histone H2B Ubiquitylation with Inflammation and Inflammation-Associated Cancer*. Cell Rep, 2016. **14**(6): p. 1462-1476.
164. Cadenas, S., *ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection*. Free Radic Biol Med, 2018. **117**: p. 76-89.
165. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
166. Basile, D.P., et al., *Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury*. Am J Physiol, 1996. **270**(3 Pt 2): p. F500-9.
167. Hermonat, P.L., et al., *Mechanism of action and delivery possibilities for TGFbeta1 in the treatment of myocardial ischemia*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 235-43.

168. Liu, R.M. and L.P. Desai, *Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 565-77.
169. Hubackova, S., et al., *IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(12): p. 932-51.
170. Ventura, J., et al., *Localized Synchrotron Irradiation of Mouse Skin Induces Persistent Systemic Genotoxic and Immune Responses*. Cancer Res, 2017. **77**(22): p. 6389-6399.
171. Singh, L., et al., *Mechanisms involved in adenosine pharmacological preconditioning-induced cardioprotection*. Korean J Physiol Pharmacol, 2018. **22**(3): p. 225-234.
172. Pegues, M.A., et al., *C-reactive protein exacerbates renal ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(11): p. F1358-65.
173. Wever, K.E., et al., *Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32296.
174. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?* Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(3): p. 235-54.
175. Tsuruya, K., et al., *Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia-reperfusion injury in the rat kidney*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(2): p. 211-29.
176. Matsushima, S., H. Tsutsui, and J. Sadoshima, *Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(5): p. 202-5.
177. Ma, Z., et al., *DNA damage response in renal ischemia-reperfusion and ATP-depletion injury of renal tubular cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(7): p. 1088-96.
178. Thiemeermann, C., et al., *Inhibition of the activity of poly(ADP ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 679-83.
179. Wu, H.H., et al., *Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 19.
180. Massague, J., J. Heino, and M. Laiho, *Mechanisms in TGF-beta action*. Ciba Found Symp, 1991. **157**: p. 51-9; discussion 59-65.
181. Spurgeon, K.R., D.L. Donohoe, and D.P. Basile, *Transforming growth factor-beta in acute renal failure: receptor expression, effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(3): p. F568-77.
182. Guan, Q., C.Y. Nguan, and C. Du, *Expression of transforming growth factor-beta1 limits renal ischemia-reperfusion injury*. Transplantation, 2010. **89**(11): p. 1320-7.
183. Grunenfelder, J., et al., *Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts*. Circulation, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. I202-6.
184. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
185. Laubach, V.E., B.A. French, and M.D. Okusa, *Targeting of adenosine receptors in ischemia-reperfusion injury*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(1): p. 103-18.

ABSTRACT

Suprarenal aortic clamping during abdominal aortic aneurysm (AAA) repair results in ischemia-reperfusion injury (IRI) in local (i.e. kidney) and distant (i.e. heart) tissue. To investigate perioperative approaches that mitigate IRI-induced tissue damage, Wistar rats underwent suprarenal aortic clamping either alone or in combination with short cycles of ischemic conditioning before and/or after clamping. Serum analysis revealed significant reduction in key biochemical parameters reflecting decreased tissue damage at systemic level and improved renal function in conditioned groups compared to controls ($p < 0.05$), which was corroborated by histopathological evaluation. Importantly, the levels of DNA damage, as reflected by the biomarkers 8-oxo-G, γ H2AX and pATM were reduced in conditioned versus non-conditioned cases. In this setting, NADPH oxidase, a source of free radicals, decreased in the myocardium of conditioned cases. Of note, administration of 5-HD and 8-SPT blocked key protective signaling routes, abrogating the salutary effect of conditioning. To further understand the non-targeted effect of IRI on the heart, it was noted that serum TGF- β 1 levels decreased in conditioned groups, whereas this difference was eliminated after 5-HD and 8-SPT administration. Collectively, conditioning strategies reduced both renal and myocardial injury. Additionally, the present study highlights TGF- β 1 as an attractive target for manipulation in this context.