

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Mediche Specialistiche**

Progetto n.1

**“FISIOPATOLOGIA DELL’INSUFFICIENZA CARDIACA”**

Ciclo **XXV**

Settore Concorsuale di afferenza: **06/D1**

Settore Scientifico disciplinare: **MED/11**

**SISTEMI ENDORFINERGICI E MODULAZIONE DI  
SEGNALI MOLECOLARI E PROFILI TRASCRIZIONALI  
COINVOLTI IN PROCESSI DI PROTEZIONE E  
AUTORIPARAZIONE DEL MIOCARDIO  
DANNEGGIATO**

**Presentata da: Dott.ssa Irene Frascari**

**Coordinatore Dottorato:**

**Relatore:**

*Chiar.mo Prof. Angelo Branzi*

*Chiar.mo Prof. Carlo Ventura*

**Esame finale anno 2013**

---

# INDICE

	Pag.
<b>I – INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 – Cardiopatie ischemiche .....</b>	<b>1</b>
<i>I.1.1 – Scompenso cardiaco .....</i>	<i>1</i>
<i>I.1.2 – Malattie cardiovascolari .....</i>	<i>1</i>
<i>I.1.3 – Cardiopatie ischemiche .....</i>	<i>2</i>
I.1.3.1 – Infarto miocardico.....	3
I.1.3.2 – Misure terapeutiche di ripristino del flusso ematico.....	4
<b>I.2 – Il danno da ischemia/riperfusione.....</b>	<b>6</b>
<i>I.2.1 – Durante l'ischemia... ..</i>	<i>6</i>
I.2.1.1 – Blocco della produzione di ATP.....	6
I.2.1.2 – Calo del pH intracellulare .....	7
I.2.1.3 – Disequilibrio degli ioni intracellulari.....	7
<i>I.2.2 – Durante la riperfusione... ..</i>	<i>8</i>
I.2.2.1 – Ristabilizzazione del pH intracellulare a valori fisiologici.....	9
I.2.2.2 – Accumulo di Ca <sup>2+</sup> intracellulare .....	10
I.2.2.3 – Produzione di ROS.....	11
I.2.2.4 – Infiammazione e attivazione del sistema complemento .....	12
<i>I.2.3 – Meccanismi di morte cellulare nel danno da I/R .....</i>	<i>12</i>
<b>I.3 – Il Precondizionamento ischemico.....</b>	<b>14</b>
<i>I.3.1 – Caratteristiche dell'IPC .....</i>	<i>14</i>
<i>I.3.2 – Early IPC .....</i>	<i>16</i>
I.3.2.1 – La fase pre-ischemica.....	16
I.3.2.1.1 – Attivazione delle vie di segnale della cardioprotezione.....	16
I.3.2.1.2 – Coinvolgimento dei ROS.....	17
I.3.2.1.3 – Il ruolo della PKC.....	18
I.3.2.1.4 – Il ruolo della PKA.....	19
I.3.2.2 – La fase post-ischemica .....	19
<i>I.3.3 – Late IPC.....</i>	<i>20</i>
I.3.3.1 – Fattori di trascrizione attivati durante la <i>late</i> IPC .....	21
I.3.3.2 – Mediatori distali della <i>late</i> IPC .....	22
I.3.3.3 – Effettori finali della <i>late</i> IPC.....	24
<i>I.3.4 – Limitazioni dell'IPC .....</i>	<i>25</i>
<i>I.3.5 – Applicazioni cliniche dell'IPC.....</i>	<i>26</i>
<b>I.4 – Sistemi endorfinergici: peptidi e recettori oppioidi.....</b>	<b>27</b>
<i>I.4.1 – Peptidi oppioidi endogeni.....</i>	<i>27</i>
<i>I.4.2 – Recettori oppioidi .....</i>	<i>29</i>
<i>I.4.3 – Recettori oppioidi e cardioprotezione .....</i>	<i>32</i>
I.4.3.1 – Recettore $\delta$ e cardioprotezione.....	32
I.4.3.2 – Recettore $\kappa$ e cardioprotezione.....	34
I.4.3.3 – Recettore $\mu$ e cardioprotezione.....	35

---

---

I.4.4 – Coinvolgimento degli oppioidi nei meccanismi dell’IPC	35
I.4.4.1 – oppioidi e... <i>Early IPC</i>	35
I.4.4.2 – oppioidi e... <i>Late IPC</i>	37
I.4.5 – Limiti precondizionamento farmacologico con oppioidi	38
<b>I.5 – Cellule Staminali Mesenchimali umane</b>	<b>39</b>
I.5.1 – Caratterizzazione delle MSC	39
I.5.2 – Capacità differenziative delle MSC	40
I.5.3 – Proprietà immunomodulatorie delle MSC	41
I.5.4 – Fonti alternative al midollo osseo	41
I.5.5 – MSC e terapia cellulare	42
<b>I.6 – Terapia cellulare</b>	<b>44</b>
I.6.1 – Meccanismo d’azione delle MSC nella sede di danno ...	45
I.6.2 – Terapia cellulare: trial clinici sull’uomo	48
I.6.2.1 – Trial clinici con cellule staminali midollari non selezionate ...	48
I.6.2.2 – Trial clinici con cellule staminali mesenchimali	49
I.6.2.3 – I risultati dei trial clinici	50
I.6.2.3.1 – Efficacia dei trial clinici per la cardiopatia ischemica acuta	51
I.6.2.3.2 – Efficacia dei trial clinici per la cardiopatia ischemica cronica	52
I.6.3 – Limiti principali della terapia cellulare	53
I.6.3.1 – Scarsa disponibilità, <i>engraftment</i> e sopravvivenza delle cellule staminali	53
I.6.3.2 – Metodi di <i>delivery</i> delle cellule staminali	53
I.6.3.3 – <i>Homing</i> delle cellule staminali	55
<b>I.7 – Strategie combinate per potenziare la terapia cellulare</b>	<b>59</b>
<b>II – SCOPO DELLA TESI</b>	<b>62</b>
<b>III – MATERIALI E METODI</b>	<b>65</b>
<b>III.1 – Colture cellulari</b>	<b>65</b>
III.1.1 – <i>H9c2</i>	65
III.1.2 – Cellule staminali mesenchimali umane derivate da membrane fetali ( <i>FMhMSCs</i> )	65
<b>III.2 – Protocollo di induzione del danno</b>	<b>66</b>
<b>III.3 – Protocolli di condizionamento</b>	<b>66</b>
<b>III.4 – Protocollo creazione medium condizionati (MC)</b>	<b>67</b>
<b>III.5 – Immunofluorescenza su cellule adese a vetrino</b>	<b>68</b>
<b>III.6 – Saggio con Cristal violetto</b>	<b>69</b>
<b>III.7 – Saggio con MTT</b>	<b>69</b>
<b>III.8 – Saggio di Migrazione</b>	<b>70</b>
<b>III.9 – Saggio di attivazione dell’enzima caspasi 3</b>	<b>71</b>
<b>III.10 – Saggio di adesione</b>	<b>71</b>
<b>III.11 – Valutazione dell’espressione genica</b>	<b>72</b>
III.11.1 – Estrazione dell’RNA	73

---

---

III.11.2 – <i>Quantificazione dell’RNA</i> .....	73
III.11.3 – <i>Retrotrascrizione (RT) dell’RNA</i> .....	73
III.11.4 – <i>Real Time PCR</i> .....	74
III.11.4.1 – <i>Screening del profilo di espressione genica di citochine e chemochine</i> .....	74
III.11.4.2 – <i>Singoli saggi Real Time per la validazione dei geni di interesse</i> .....	75
<b>III.12 – Analisi statistica</b> .....	<b>77</b>
<b>IV – RISULTATI</b> .....	<b>78</b>
<b>IV.1 – Determinazione della presenza di recettori oppioidi</b> .....	<b>78</b>
<b>IV.2 – Messa a punto di un modello cellulare <i>in vitro</i> di microambiente cardiaco “ischemico”</b> .....	<b>79</b>
IV.2.1 – <i>Curva di crescita cellulare</i> .....	79
IV.2.2 – <i>Determinazione dell’attivazione dell’enzima caspasi 3</i>	80
<b>IV.3 – Valutazione tossicità oppioidi</b> .....	<b>81</b>
<b>IV.4 – Oppioidi e protezione diretta dall’apoptosi indotta dall’insulto “ischemico”</b> .....	<b>83</b>
IV.4.1 – <i>Validazione del modello di condizionamento 1: preconditionamento</i> .....	83
IV.4.2 – <i>Validazione del modello di condizionamento 2: percondizionamento</i> .....	84
IV.4.3 – <i>Validazione del modello di condizionamento 3: preconditionamento “continuativo”</i> .....	86
<b>IV.5 – Cellule staminali e “microambiente ischemico” trattato o meno con peptidi oppioidi: valutazione della migrazione di FM-hMSC</b> .....	<b>88</b>
<b>IV.6 – Determinazione delle possibili cause dell’aumento della migrazione</b> .....	<b>90</b>
IV.6.1 – <i>Modificazioni delle caratteristiche delle FMhMSC causate dall’interazione con il microambiente “ischemico”</i> .....	90
IV.6.1.1 – <i>Sopravvivenza FMhMSC</i> .....	91
IV.6.1.2 – <i>Valutazione delle capacità di adesione delle FMhMSC</i> .....	92
IV.6.2 – <i>Determinazione delle capacità attrattive delle H9c2 all’interno del microambiente ischemico: espressione genica</i> .....	94
<b>V – DISCUSSIONE</b> .....	<b>96</b>
<b>VI – BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>101</b>

---

# I – INTRODUZIONE

## I.1 – Cardiopatie ischemiche

### I.1.1 – Scompenso cardiaco

Il cuore è un organo che svolge una funzione essenziale: pompa in tutto il corpo il sangue e in questo modo assicura ad ogni distretto, tessuto, cellula dell'organismo il corretto apporto di ossigeno, sostanze nutritive e la rimozione dei metaboliti prodotti dalle reazioni cellulari. La disfunzione cardiaca ha gravissime ripercussioni fisiologiche: dalle condizioni più o meno invalidanti alla morte.

Lo scompenso cardiaco, o insufficienza cardiaca congestizia, è una condizione patologica che comporta una diminuzione della gittata cardiaca, ristagno nella circolazione venosa o entrambi. La maggior parte dei casi di scompenso cardiaco è conseguenza di un progressivo deterioramento della funzione contrattile miocardica (disfunzione sistolica), che si verifica spesso in seguito a sovraccarico di pressione o volume, cardiomiopatia dilatativa ma soprattutto danno ischemico. Il cuore deve compiere un lavoro al di là delle proprie capacità o fatica a riempire adeguatamente il ventricolo: in questo modo non riesce a pompare il giusto apporto di sangue ai tessuti in base alla loro richiesta metabolica, oppure sopperisce al fabbisogno ematico dell'organismo a prezzo di elevate pressioni di riempimento della camera ventricolare. [1a].

Lo scompenso cardiaco è comune e ricorrente ed ha spesso prognosi sfavorevole, è il punto di approdo di molti tipi di cardiopatia e di malattie cardiovascolari [1a].

### I.1.2 – Malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari (*cardiovascular diseases*, CVDs) sono la principale causa di morte e di disabilità a livello mondiale. Le CVDs rappresentano una vera emergenza, anche dal punto di vista della spesa sociale, sia nei paesi in via di sviluppo (più dell'80% di morti dovute a CVDs avvengono in paesi a basso e medio reddito), sia nei paesi industrializzati, in cui la buona qualità della vita ha determinato una

diminuzione di altre patologie - molte malattie infettive, ad esempio - e la prospettiva di vita media si è molto allungata. [1a, 2].

Con il termine “malattie cardiovascolari” si indica un gruppo di sindromi che colpiscono il cuore e i vasi sanguigni quali ictus, malattie della vascolatura periferica, cardiopatie e valvulopatie dovute a febbre reumatica, cardiopatie congenite, trombosi venosa profonda ed embolia polmonare ma, soprattutto, cardiopatie ischemiche [2].

Nel 2008 si è stimato che il 30% dei decessi a livello mondiale (17,3 milioni di persone), fosse imputabile a malattie cardiovascolari e che tra queste circa il 40% fosse dovuto a cardiopatie ischemiche.

Secondo le stime del WHO (*World Health Organization*, Organizzazione Mondiale della Sanità) entro il 2030 quasi 23,6 milioni di persone moriranno a causa di CVDs, in gran parte dovute a ictus e a cardiopatia coronarica. [2].

### **I.1.3 – Cardiopatie ischemiche**

Con il termine “cardiopatia ischemica” (*Ischemic Heart Disease*, IHD) si indica un gruppo di sindromi fisiopatologicamente collegate la cui origine comune è da attribuirsi all’ischemia miocardica, ovvero allo squilibrio tra l’apporto (perfusione) e la richiesta cardiaca di sangue ossigenato. Ciò comporta non solo un’insufficienza di ossigeno ma anche la riduzione della disponibilità di nutrienti e della rimozione dei metaboliti cellulari [1a].

L’IHD, sia per gli uomini che per le donne, rappresenta una delle prime cause di morte al mondo (7 milioni/anno) e, in base all’intensità e alla durata dell’evento ischemico, si manifesta clinicamente in varie forme: infarto miocardico (la forma più importante di IHD), angina pectoris, cardiomiopatia ischemica cronica con scompenso cardiaco e morte cardiaca improvvisa [1a].

In più del 90% dei casi l’ischemia miocardica alla base dell’IHD è imputabile ad una riduzione del flusso ematico coronarico dovuta a lesioni aterosclerotiche ostruttive presenti in una o più coronarie, per questo motivo l’IHD è chiamata anche coronaropatia (*coronary artery disease*, CAD) o cardiopatia coronarica (*coronary heart disease*, CHD) [1a].

Le lesioni aterosclerotiche, alla base delle IHD, nella maggior parte dei casi hanno una progressione lenta e silente, che può durare anche decenni, e spesso la loro origine può essere ricondotta all’infanzia o all’adolescenza.

Solitamente l'IHD si manifesta in forma acuta - con l'angina instabile, l'infarto miocardico e la morte cardiaca improvvisa - quando una placca ateromasica subisce un'imprevedibile e brusca trasformazione e, in seguito a erosione superficiale, ulcerazione, fissurazione, rottura, ecc., perde la sua stabilità diventando potenzialmente pericolosa per la vita del paziente. L'esposizione del contenuto della placca al sangue, infatti, determina una serie di reazioni che portano alla formazione di un trombo murale - che ostruisce, in modo più o meno marcato, la coronaria e che, all'occorrenza, si può staccare ed entrare in circolo in forma di embolo - oppure di un trombo occlusivo che blocca completamente il flusso attraverso l'arteria coronarica. [1a].

### **I.1.3.1 – Infarto miocardico**

La forma più importante di cardiopatia ischemica è l'infarto miocardico (*acute myocardial infarct*, AMI) comunemente chiamato "attacco cardiaco", che da solo è la principale causa di morte negli USA e nei paesi industrializzati.

Il rischio di sviluppare un attacco cardiaco cresce di pari passo con l'aumentare dell'età e in presenza di fattori predisponenti all'aterosclerosi. La mortalità globale nel primo anno dal manifestarsi dell'infarto è di circa il 30% (inclusi i pazienti che non riescono neanche a raggiungere l'ospedale), in seguito, tra i sopravvissuti, la mortalità è del 3-4% per anno [1a].

L'infarto miocardico è causato da un'occlusione coronarica che provoca una perdita di perfusione del miocardio con conseguenti alterazioni funzionali, biochimiche e morfologiche: si instaura un'ischemia che, in base alla sua entità e durata, può causare necrosi cellulare nella regione anatomica dell'arteria colpita, soprattutto a livello subendocardico [1a].

Il danno irreversibile, e quindi la necrosi cellulare, avviene solo in presenza di un'ischemia severa della durata di almeno 20-40 minuti o più e il classico infarto miocardico, con necrosi estesa e perdita permanente della funzionalità della regione colpita, si verifica quando la perfusione diminuisce sotto ai livelli minimi per un lungo intervallo di tempo (in genere da 2 a 4 ore) [1a].

Alla necrosi del tessuto muscolare si associa una reazione infiammatoria acuta; in seguito, la zona danneggiata viene sostituita da tessuto di granulazione intensamente vascolarizzato, infine si instaura un processo di fibrosi volto a promuovere la

formazione di una cicatrice (entro la fine della sesta settimana dall'infarto) che si consolida nel tempo in base alla gravità della lesione originaria [1a].

La maggior parte degli infarti miocardici sono transmurali: la necrosi interessa l'intero spessore o quasi della parete ventricolare; negli infarti subendocardici, invece, l'area di necrosi ischemica si limita al terzo interno o alla metà interna della parete ventricolare [1a].

In seguito a infarto, il cuore del paziente sopravvissuto deve comunque trovare il modo di fornire un ricircolo sanguigno all'organismo mantenendo un'adeguata gittata cardiaca; per fare ciò va incontro ad una serie di modificazioni strutturali dinamiche che vengono denominate col termine "rimodellamento ventricolare": sia la zona necrotica che il segmento di ventricolo non infartuato cambiano, in modo progressivo, dimensione, spessore e forma. In questo modo, si possono verificare assottigliamento precoce, cicatrizzazione e ipertrofia e dilatazione della parete, nonché la formazione tardiva di un aneurisma. In particolar modo, c'è il rischio, con il passare del tempo, di sviluppare uno scompenso cardiaco. [1a].

### **I.1.3.2 – Misure terapeutiche di ripristino del flusso ematico**

Nei pazienti colpiti da AMI, la dimensione dell'infarto è un fattore determinante della prognosi acuta e a lungo termine [3]; limitare la dimensione dell'infarto è, quindi, uno degli obiettivi principali delle terapie per il trattamento del danno ischemico.

L'approccio più efficace per limitare il danno miocardico e la dimensione dell'infarto è ristabilire tempestivamente il flusso ematico, un processo chiamato riperfusione [4].

La riperfusione si ottiene agendo a livello delle coronarie con trattamenti quali la terapia trombolitica, l'angioplastica coronarica (*percutaneous coronary intervention*, PCI), con o senza il posizionamento di *stent*, e la rivascularizzazione chirurgica tramite bypass aorto-coronarico (*coronary artery bypass graft*, CABG). Queste procedure permettono - dissolvendo, alterando meccanicamente o bypassando la lesione ostruttiva che causa l'infarto acuto - di ripristinare il flusso ematico nell'area a rischio di infarto al fine di salvare il più possibile il tessuto ischemico. Più tempestiva è la riperfusione maggiore è la possibilità di limitare la dimensione dell'infarto con miglioramento della funzionalità cardiaca a breve e lungo termine, poiché l'ischemia non causa una immediata morte cellulare. [1a]

Anche nel caso di pazienti soggetti ad ischemia subletale cronica, dove il miocardio colpito può anche entrare in uno stato di metabolismo e funzionalità ridotti chiamato “ibernazione”, la funzionalità del miocardio ibernato può essere ripristinata mediante rivascolarizzazione [1a].

La riperfusione, soprattutto se non praticata tempestivamente, può procurare complicanze quali aritmie, emorragie miocardiche con bande di contrazione, danno microvascolare, “stordimento” del miocardio (*myocardial stunning*) - uno stato di scompenso cardiaco reversibile attribuibile ad anomalie biochimiche che possono persistere nei miociti ischemici riperfusi per un periodo che varia da giorni a diverse settimane - e “danno da riperfusione”, un danno cellulare irreversibile che si sovrappone all’insulto ischemico originario [1a, 5]. Il danno miocardico causato dall’ischemia e quello imputabile alla riperfusione sono talmente interconnessi che spesso si parla in generale di danno da “ischemia/riperfusione”.

## I.2 – Il danno da ischemia/riperfusion

Il ripristino del flusso ematico in un tessuto ischemico può favorire il recupero delle cellule se il danno da queste subito è reversibile. Paradossalmente però la riperfusion può portare ad una esacerbazione del danno con conseguente perdita di un ulteriore numero di cellule oltre a quelle danneggiate irreversibilmente dall'ischemia. Per comprendere appieno il danno da ischemia/riperfusion (I/R) bisogna avere ben chiaro che cosa accade a livello metabolico all'interno del cardiomiocita nel contesto ischemico e nella fase riperfusiva (Fig.I.2.1).

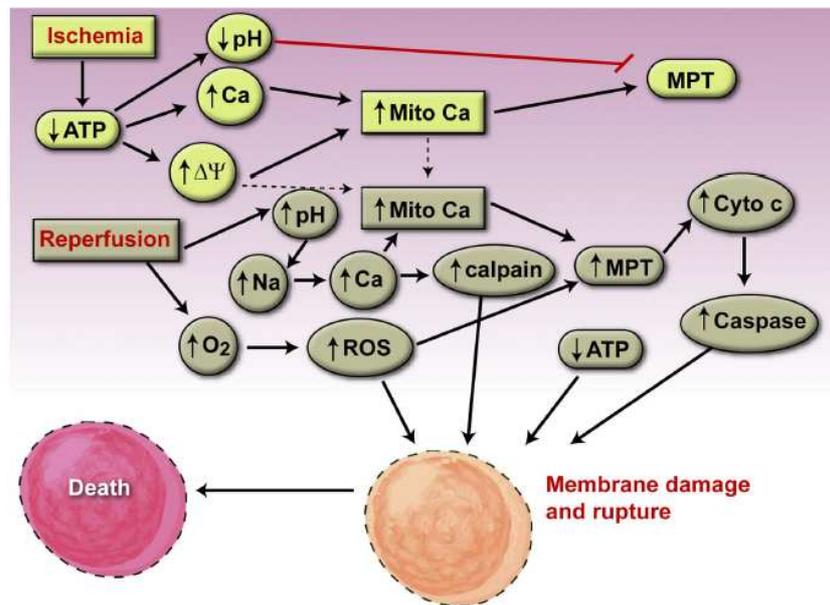


Fig.I.2.1: Vie metaboliche che portano alla morte cellulare nell'ischemia/riperfusion (I/R).  
(da [23])

### I.2.1 – Durante l'ischemia...

#### I.2.1.1 – Blocco della produzione di ATP

L'interruzione dell'apporto d'ossigeno al miocardio che avviene all'instaurarsi dell'ischemia determina il blocco della fosforilazione ossidativa mitocondriale. Malgrado nelle cellule colpite avvenga una transizione dalla respirazione aerobica a quella anaerobica si determina una drastica riduzione di produzione di ATP (adenosina trifosfato) e il veloce consumo dell'ATP intracellulare residuo: una delle conseguenze più immediate è il blocco della funzione contrattile miocardica che avviene già dopo pochi minuti dall'inizio dell'ischemia. Se l'insulto ischemico persiste la cellula va

incontro a modificazioni irreversibili che ne determinano la morte: in presenza di una riduzione del contenuto di ATP del 90% avvengono cambiamenti strutturali irreversibili nel miocardio [6]. Le tempistiche sono molto serrate: la riduzione di ATP diventa quasi completa (circa del 90-95%) dopo circa 40 - 60 minuti di ischemia [6, 7].

### **I.2.1.2 – Calo del pH intracellulare**

Nel miocardio ischemico la respirazione anaerobica ha vita breve: la beta ossidazione degli acidi grassi è bloccata velocemente, con conseguente rilascio di acidi grassi liberi che causa aritmia e inibisce i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali ( $mK_{ATP}$ ), che non riescono più a mantenere il potenziale di membrana mitocondriale, e la glicogenolisi è gradualmente rallentata ed inibita dall'aumento di NADH e  $FADH_2$  e dal calo di pH [8-10].

Le variazioni del pH intracellulare sono di primaria importanza durante l'ischemia e avvengono a pochi minuti dal suo inizio: P.B. Garlick e colleghi, lavorando *in vitro* su cuori di ratto perfusi, riportano che, in seguito ad ischemia globale, il pH intracellulare cala e raggiunge un valore di 6.2 dopo una decina di minuti [11].

Le cause di questo calo di pH non sono state chiarite del tutto, L.H. Opie suggerisce che l'accumulo di acido lattico e la produzione di  $CO_2$  da parte del ciclo di Krebs ne possano essere responsabili [8, 12].

### **I.2.1.3 – Disequilibrio degli ioni intracellulari**

Strettamente legato al calo dell'ATP e alla variazione del pH intracellulare è il bilanciamento degli ioni intracellulari, che da una condizione di omeostasi vengono a trovarsi in una situazione di disequilibrio (Fig.I.2.2):

- Accumulo dello ione  $Na^+$

Per contrastare il calo del pH, lo ione  $H^+$  in eccesso è escreto fuori dalla cellula dall'azione dello scambiatore  $Na^+/H^+$  con conseguente aumento dello ione  $Na^+$  intracellulare, come dimostrato anche da studi *in vivo* [13].

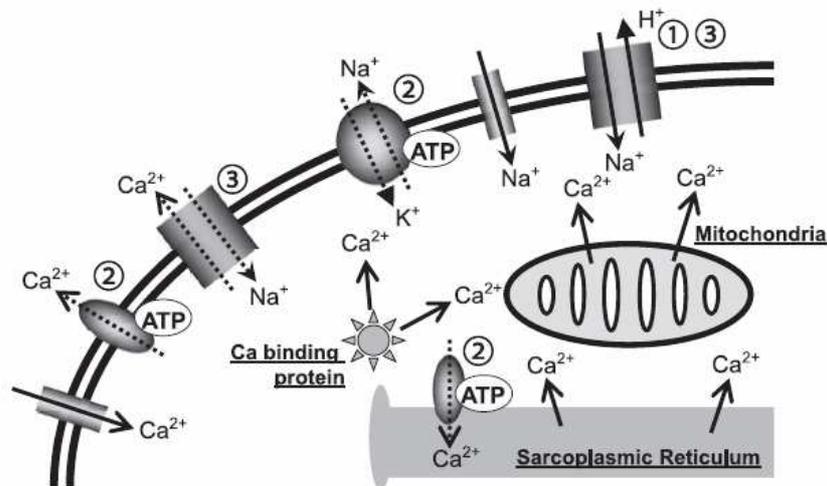
Anche l'esaurimento di ATP contribuisce all'accumulo di  $Na^+$  intracellulare, poiché blocca gradualmente l'azione di ATPasi tra cui la pompa  $Na^+/K^+$  [14]. L'accumulo di  $Na^+$  unito all'accumulo dei metaboliti della glicogenolisi (lattato e

protoni), dell'uso delle fosfocreatine (creatina e fosfato inorganico) e del catabolismo dei fosfati ad alta energia determina un gradiente osmotico che richiama acqua all'interno delle cellule causando rigonfiamento cellulare [8].

- Accumulo dello ione  $\text{Ca}^{2+}$

L'accumulo del  $\text{Na}^+$  e la mancanza di ATP causano un eccesso di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare tramite, rispettivamente, la riduzione dell'azione dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (*Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*, NCX), l'inattivazione del riassorbimento del  $\text{Ca}^{++}$  ATP-dipendente nel reticolo sarcoplasmatico e l'escrezione di  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dipendente operata dalla pompa  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasi [6]. Un meccanismo confermato anche *in vivo* [15].

L'accumulo di  $\text{Ca}^{2+}$  è accompagnato dalla traslocazione della calpaina, proteasi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente, presso la membrana plasmatica [16] dove, però, la sua azione è al momento rallentata o inibita dal calo del pH intracellulare [6, 17].



**Fig.I.2.2:** Variazione del bilanciamento degli ioni intracellulari durante l'ischemia.

1. escrezione di ioni  $\text{H}^+$  a causa del calo di pH intracellulare;
2. inattivazione a causa del calo di pH;
3. riduzione dello scambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a causa del calo di pH extracellulare e dell'accumulo intracellulare di ione  $\text{Na}^+$ .

(da [6])

## I.2.2 – Durante la riperfusione...

La riperfusione permette di reintegrare nell'area ischemica i substrati essenziali per la generazione di ATP (come glucosio o acidi grassi liberi), di aumentare l'ossigeno disponibile e di normalizzare il pH extracellulare; tutti fattori cruciali per la sopravvivenza del tessuto ma che possono anche contribuire a esacerbare il danno

nell'area. L'ischemia, infatti, indebolisce il miocardio, che peggiora durante la riperfusione a causa del ritorno a livelli fisiologici del pH intracellulare, dell'aumento della concentrazione di calcio citosolico, della produzione di radicali liberi e dell'instaurarsi di processi infiammatori nella sede di danno. [6].

### I.2.2.1 – Ristabilizzazione del pH intracellulare a valori fisiologici

Contestualmente al ripristino del flusso ematico, dovuto alla riperfusione, avviene una rapida normalizzazione del pH extracellulare che determina il formarsi di un forte gradiente  $H^+$  attraverso la membrana plasmatica. Il risultato principale è un ulteriore flusso massivo di  $Na^+$  all'interno della cellula per permettere l'espulsione degli ioni  $H^+$  in eccesso. L'aumento del  $Na^+$  intracellulare induce NCX ad agire in "reverse mode": secerne  $Na^+$  fuori dalla cellula per contrastarne l'accumulo ma così facendo permette l'accumulo intracellulare di  $Ca^{2+}$  [18] (Fig.I.2.3).

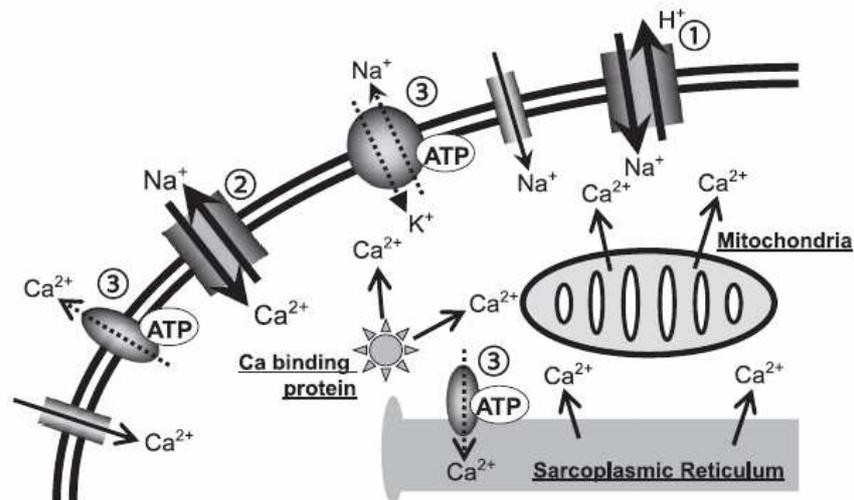


Fig.I.2.3: Variazione del bilanciamento degli ioni intracellulari durante l'ischemia.

1. escrezione ioni  $H^+$  a causa del ripristino del pH extracellulare
2. escrezione ioni  $Na^+$  accumulati per azione in "reverse mode" dell'NCX e conseguente accumulo di ioni  $Ca^{2+}$
3. escrezione di  $Ca^{2+}$  seguita dal ripristino della sintesi di ATP dopo 30-60 minuti di riperfusione

(da [6]).

### **I.2.2.2 – Accumulo di Ca<sup>2+</sup> intracellulare**

Durante la riperfusione il calcio entra nella cellula attraverso lo scambiatore Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> e i canali voltaggio dipendenti di tipo L [19]. Le cellule, però, provate da una lunga ischemia, non sono in grado di ristabilire repentinamente l'omeostasi del calcio intracellulare. Solo dopo 30-60 minuti di riperfusione avviene una graduale ripresa dell'escrezione di Ca<sup>2+</sup> e il ri-immagazzinamento ATP-dipendente di Ca<sup>2+</sup> nel reticolo sarcoplasmatico e la cellula ritorna ad una situazione di omeostasi [6].

Di conseguenza, nei primi stadi della riperfusione, si verifica un accumulo di calcio che è responsabile di una serie di fenomeni che accelerano immediatamente il danno miocardico [20]:

- 1) l'attivazione di lipasi, nucleasi e proteasi che minano la struttura cellulare (ad es. viene riattivata la calpaina, proteasi calcio dipendente la cui azione è inibita anche dal calo di pH);
- 2) l'ipercontrazione delle miofibrille dell'apparato contrattile (che porta a necrosi a bande);
- 3) l'apertura dei pori di transizione della permeabilità mitocondriale (*mitochondrial Permeability Transition Pore*, mPTP).

Gli mPTP sono pori formati da proteine della matrice, della membrana interna e della membrana esterna mitocondriale la cui composizione è però ancora controversa [21].

L'apertura degli mPTP rende la membrana interna mitocondriale permeabile a tutti i soluti fino a 1500 Da di grandezza e causa la rapida dispersione del potenziale di membrana,  $\Delta\psi$ , necessario per la produzione di ATP da parte degli enzimi della fosforilazione ossidativa mitocondriale [21]. L'ATP sintasi, per tentare di contrastare la perdita di  $\Delta\psi$ , comincia a idrolizzare piuttosto che a sintetizzare ATP, riducendone ulteriormente la quantità [22].

L'apertura degli mPTP causa, inoltre, il rigonfiamento dei mitocondri con conseguente rottura della membrana mitocondriale esterna, perdita di citocromo c e attivazione dell'apoptosi, sebbene con la completa apertura degli mPTP è probabile che la morte cellulare avvenga prima che il programma apoptotico venga completato [23].

Quindi, un'apertura prolungata dell'mPTP è incompatibile con la sopravvivenza della cellula a causa della perdita di funzione mitocondriale (con conseguente

perdita di ATP) e della perdita di omeostasi degli ioni intracellulari (con conseguente rigonfiamento cellulare, rottura della membrana plasmatica e morte cellulare) [23].

Gli mPTP sono sensibili a differenti stimoli: quando il pH intracellulare cala, durante l'ischemia, inibisce l'apertura dei pori (intorno al pH 6.0 avviene l'inibizione totale dell'apertura [24]) e il ripristino del pH a livelli fisiologici durante la riperfusione induce la morte cellulare stimolando l'apertura dell'mPTP. La formazione di mPTP è indotta anche dalla presenza di alte concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  nella matrice e dalla produzione di ROS – dovute alla reintroduzione di ossigeno durante la riperfusione – nonché da alte concentrazioni di NADH, dall'esaurimento di ATP e dalla perdita del potenziale transmembrana della matrice mitocondriale [23]; tutte condizioni presenti durante l'I/R [25]. Quindi le condizioni che si instaurano subito dopo l'inizio della riperfusione sono ideali per stimolare l'apertura degli mPTP.

### **I.2.2.3 – Produzione di ROS**

L'improvviso ripristino del metabolismo aerobico, fondamentale per la ripresa della produzione di ATP, ha come conseguenza un accumulo di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) e dell'azoto, in particolare di anione superossido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ). In condizioni fisiologiche il superossido viene convertito in perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dalla superossido dismutasi (SOD) ed è successivamente inattivato dalla catalasi in  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Una consistente produzione di ROS genera una quantità eccessiva di radicali ossidrili ( $\cdot\text{OH}$ ) che sono molto instabili; l'ischemia può aver compromesso i meccanismi antiossidanti della cellula e, se i mitocondri non sono in grado di eliminarli, i ROS possono danneggiare le strutture cellulari, gli enzimi o le proteine canale presenti sulla membrana cellulare [6]. Queste molecole possono essere prodotte anche da cellule parenchimali, endoteliali e leucociti dell'infiltrato infiammatorio [1b].

### **I.2.2.4 – Infiammazione e attivazione del sistema complemento**

Al danno ischemico si associa anche un danno infiammatorio causato da neutrofilii circolanti richiamati nella zona riperfusa da citochine e molecole adesive espresse da cellule parenchimali ed endoteliali ma, soprattutto, dal rilascio di componenti citosolici da parte delle cellule necrotiche [1b]. Questa infiammazione causa a sua volta un ulteriore danno tissutale.

Inoltre, durante la riperfusione, le frazioni del complemento si legano ad alcuni anticorpi IgM che si depositano nei tessuti ischemici e, attivandosi, inaspriscono il danno cellulare aumentando l'intensità della reazione infiammatoria [1b].

### **I.2.3 – Meccanismi di morte cellulare nel danno da I/R**

La morte cellulare causata dall'ischemia/riperfusion ha caratteristiche proprie dell'apoptosi, dell'autofagia e della necrosi [23].

Molti studi si sono concentrati sul definire quale forma di morte cellulare avvenga e con quale distribuzione nella zona danneggiata: alcune ricerche propongono che la morte necrotica prevalga quando i livelli di  $Ca^{2+}$  mitocondriali diventano estremamente bassi o si azzerano del tutto [6, 26]. Similmente, i livelli intracellulari di ATP potrebbero servire anche da *switch* molecolare: in presenza di alti livelli si avvierebbe l'apoptosi, a bassi livelli la necrosi [6, 27]. Altri ipotizzano che dopo l'ischemia/riperfusion il destino della cellula sia determinato dall'estensione dell'apertura degli mPTP nel mitocondrio: se minima la cellula è in grado di ristabilirsi, se moderata la cellula potrebbe innescare il meccanismo di morte programmata (l'apoptosi), se severa la cellula subirà necrosi a causa della inadeguata produzione di energia [22].

In tutti e tre i casi, comunque, i mitocondri risultano essere gli arbitri del destino cellulare in risposta allo stress.

Per quanto riguarda la distribuzione delle forme di morte cellulare innescate dall'I/R, nell'area del miocardio ischemico prevale la necrosi, mentre nelle cellule interstiziali che compongono il tessuto granulare avviene prevalentemente l'apoptosi [28].

E. Murphy e C. Steenbergen in una *review* del 2008 [23] esprimono l'interessante opinione che di fronte all'I/R può essere più utile ragionare sui meccanismi di morte cellulare senza cercare di definire esattamente quale tipo di morte cellulare avvenga,

perché spesso i meccanismi alla base delle diverse forme di morte cellulare sono interconnessi. Secondo gli autori il concetto importante è che la morte cellulare durante l'ischemia/riperfusion sembra essere un processo attivo che può essere inibito con interventi appropriati. In questo contesto i mitocondri stanno emergendo come importanti mediatori e regolatori di tutte le forme di morte cellulare nell'ischemia/riperfusion. In particolare, l'mPTP sembra essere uno dei regolatori principali sia della morte apoptotica che necrotica [29] e sembra avere un ruolo importante nel danno da I/R [22].

In conclusione, la riperfusion, se non è praticata tempestivamente, paradossalmente causa un ulteriore danno tissutale al miocardio già indebolito dall'ischemia, il cosiddetto “danno da riperfusion”. La perdita di massa contrattile che ne deriva determina un carico ulteriore di lavoro per il tessuto sopravvissuto con conseguente rischio di ipertrofia delle cellule rimanenti e di rimodellamento cardiaco del ventricolo che, in ultima analisi, possono portare a uno scompenso cardiaco.

Mettere a punto strategie che permettano alle cellule cardiache di contrastare il danno da ischemia/riperfusion migliorerebbe assai la prognosi di molti pazienti colpiti da infarto acuto del miocardio e da altre forme di cardiopatia ischemica.

## I.3 – Il Precondizionamento ischemico

Già negli anni '80 si è cominciato a ritenere che la risposta del miocardio all'I/R potesse essere manipolata per contrastare il danno ischemico.

Nel 1986, infatti, C.E. Murry e colleghi hanno mostrato, in un modello canino, che esponendo il cuore a quattro brevi cicli di ischemie subletali (cinque minuti di ischemia seguiti da cinque minuti di riperfusione ciascuno), prima di un danno ischemico prolungato, si conferiva una profonda resistenza all'infarto. L'esposizione a questo tipo di stress, infatti, poneva il cuore in uno stato di difesa che determinava la riduzione della dimensione dell'infarto (la dimensione dell'infarto nei soggetti preconditionati risultava essere un quarto rispetto a quella del gruppo di controllo) [30].

Questo fenomeno è stato chiamato preconditionamento ischemico (*ischemic preconditioning*, IPC) e da allora è stato dimostrato che è responsabile non solo della riduzione della dimensione dell'infarto, ma anche della minor produzione di lattato e della riduzione del consumo di ATP. Successivamente, studi portati avanti da altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'IPC è un meccanismo evolutivamente conservato comune a molti mammiferi, incluso l'uomo [6], ed è responsabile anche della diminuzione dell'incidenza di aritmie e del miglioramento della disfunzione contrattile [23].

Negli anni il concetto di cardioprotezione dovuta a preconditionamento ischemico si è ampliato fino ad includere non solo forme di danno acute e irreversibili quali la necrosi e l'apoptosi, ma anche disordini cronici quali l'ibernazione del miocardio o il rimodellamento cardiaco [6].

### I.3.1 – Caratteristiche dell'IPC

L'IPC è caratterizzato da due fasi in relazione a quando avviene il danno ischemico grave: una precoce (*early phase o classical phase*) e una tardiva (chiamata SWOP "*Second Window Of Preconditioning*", *late phase o delayed phase*), cronologicamente e fisiopatologicamente distinte.

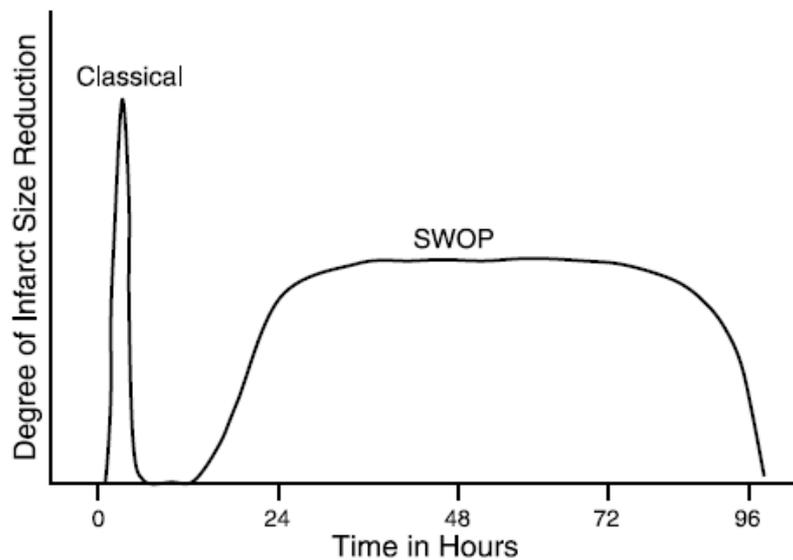
La fase precoce inizia immediatamente dopo lo stimolo ischemico preconditionante, finisce dopo 2-3 ore [31] ed è caratterizzata da modificazioni post-traduzionali di proteine preesistenti con conseguente attivazione di vie di segnalazione

cellulare che, da un lato, avviano meccanismi *pro-survival* e, dall'altro, inibiscono l'azione di segnali pro-morte cellulare [32].

L'effetto cardioprotettivo descritto dal gruppo di C.E. Murry [30] nel loro storico studio corrisponde ad un *early preconditioning*.

La fase tardiva, invece, comincia a 12-24 ore dallo stimolo iniziale [33, 34], continua fino a 2-3 giorni [35] ed è caratterizzata da una riprogrammazione genetica della cellula che attiva la trascrizione di geni stress-reattivi e dalla successiva sintesi di proteine che conferiscono un fenotipo cardioprotettivo [36].

La cardioprotezione conferita dalla fase tardiva è molto consistente ma, pur avendo una durata nel tempo maggiore, non è paragonabile a quella che si presenta durante la fase precoce [37] (Fig.I.3.1).



**Fig.I.3.1: Diagramma che descrive la natura temporale delle due finestre di preconditionamento.**  
(da [37])

Malgrado i molti studi effettuati sull'IPC, i meccanismi che portano come risultato finale alla protezione d'organo non sono stati ancora chiariti del tutto, in particolar modo per quel che concerne la fase tardiva.

Sia la fase precoce che la tardiva hanno molte caratteristiche comuni: in entrambe lo stimolo ischemico preconditionante provoca il rilascio di una serie di sostanze che, legandosi a recettori sulla superficie cellulare, innescano il meccanismo di protezione, iniziando una cascata di segnali intracellulari. Queste "sostanze-innesco" (*triggers*) sembrano essere le stesse in entrambe le forme di preconditionamento [32, 36, 37].

Le due fasi, però, sembrano coinvolgere due differenti tipi di reazione: la fase precoce comprende reazioni che possono essere completate in un breve periodo di tempo come l'attivazione di canali ionici, l'attivazione tramite fosforilazione di enzimi esistenti, il rapido ricambio o la traslocazione di sostanze [32].

La fase tardiva, invece, è caratterizzata da reazioni che chiedono un tempo maggiore come la modulazione genomica e la sintesi *de novo* di svariate proteine tra cui canali proteici, recettori, enzimi, *chaperones* molecolari, immunotrasmettitori ma anche modificazioni post-traduzionali e traslocazione di proteine [36].

## **I.3.2 – *Early* IPC**

Il preconditionamento ischemico si divide in due fasi [32]:

- la fase pre-ischemica in cui viene messo in moto il meccanismo cardioprotettivo;
- la fase post-ischemica (che inizia all'instaurarsi della riperfusione) in cui agiscono le molecole responsabili della cardioprotezione (chiamate mediatori).

### **I.3.2.1 – La fase pre-ischemica**

#### **I.3.2.1.1 – Attivazione delle vie di segnale della cardioprotezione**

In seguito allo stimolo preconditionante, sostanze quali l'adenosina [38], la bradichinina [39] e gli oppioidi [40] attivano i propri recettori sulla superficie cellulare, che agiscono in parallelo dando il via a una serie di complessi segnali intracellulari. È stato proposto che l'azione di questi recettori abbia effetti additivi [41].

Malgrado i tre tipi di recettori agiscano attraverso vie di segnali intracellulari diverse, si ritiene che abbiano un bersaglio comune: la proteina chinasi C (*protein kinase C*, PKC), una proteina chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente.

È stato suggerito, infatti, che l'adenosina attivi la PKC attraverso l'azione delle fosfolipasi C e D (PLC, PLD) che ricavano il secondo messaggero diacilglicerolo (*diacylglycerol*, DAG) dai fosfolipidi di membrana [32, 42].

Si ritiene, invece, che i recettori degli oppioidi dipendano per la loro azione dalla transattivazione mediata da metalloproteinasi del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). EGFR, un recettore tirosin chinasi, quando viene attivato dai

suoi ligandi dimerizza e autofosforila residui di tirosina nel suo dominio intracellulare, innescando così una rete di segnali che porta all'attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) [43]. Anche la bradichinina agisce attivando la PI3K ma, sembra, con un meccanismo indipendente dalla transattivazione dell'EGFR.

I passaggi a valle della PI3K sembrano simili sia per gli oppioidi che per la bradichinina: PI3K determina la fosforilazione di Akt attraverso chinasi fosfolipide-dipendenti. Successivamente, Akt fosforilato attiva l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS): l'ossido nitrico (NO) prodotto stimola a sua volta la guanilato ciclasi (GC) a produrre cGMP (Guanosin-monofosfato ciclico) che attiva la proteina chinasi G (PKG) [42-44]. Questa cascata di eventi porta all'attivazione della PKC.

### **I.3.2.1.2 – Coinvolgimento dei ROS**

Un altro stimolo coinvolto nel meccanismo protettivo del preconditionamento ischemico è dato dai ROS: tramite esposizione transitoria a radicali dell'ossigeno è stato possibile mimare gli effetti protettivi dell'IPC [45]; inoltre sostanze antiossidanti hanno mostrato di poter abolire la protezione indotta dal preconditionamento ischemico [46]. Studi in cui inibitori della PKC erano in grado di inibire la protezione conferita dai ROS [46] e studi in cui sostanze antiossidanti non erano in grado di abolire la protezione conferita da attivatori diretti della PKC [47] indicano che anche i ROS agiscono a monte della PKC.

Il mitocondrio sembra essere la sorgente primaria dei ROS: l'apertura dei canali  $mK_{ATP}$  presenti sulla membrana mitocondriale interna permette allo ione potassio ( $K^+$ ) di entrare nella matrice attraverso il suo gradiente elettrochimico [48].

L'ingresso dello ione  $K^+$  è bilanciato dall'efflusso di  $H^+$ ; la conseguente alcalinizzazione della matrice mitocondriale determina un aumento della produzione di anione superossido,  $H_2O_2$  e radicali ossidrilici da parte del complesso I e del III della catena respiratoria mitocondriale [49].

A.D. Costa e colleghi ipotizzano che la PKG promuova l'apertura dei  $mK_{ATP}$  attivando le PKC- $\epsilon$ 1, un gruppo di PKC- $\epsilon$  collocate presso il versante interno della membrana mitocondriale, con conseguente produzione di ROS. L'aumento di ROS da un lato attiva un altro gruppo di PKC- $\epsilon$ , le PKC- $\epsilon$ 2, che inibiscono l'apertura degli  $mPTP$  e proteggono il cuore, dall'altro continua ad attivare la PKC- $\epsilon$ 1 che mantiene aperto il canale  $mK_{ATP}$  [48, 49].

Nel cuore, oltre ai mitocondri, sono presenti altre fonti di ROS che possono essere coinvolte nell'IPC: ad esempio, la NADPH ossidasi [50].

### **I.3.2.1.3 – Il ruolo della PKC**

Il coinvolgimento della PKC nell'IPC è stato determinato grazie a esperimenti in cui utilizzando inibitori delle PKC si aboliva la protezione conferita dal preconditionamento ischemico [51].

Non è ancora stato chiarito del tutto però quale isoforma di PKC sia mediatrice degli effetti protettivi.

L'isoforma "ε" ha mostrato di essere necessaria e sufficiente a indurre la cardioprotezione: l'*over*-espressione cardiaco-specifica di PKC-ε conferisce protezione dal danno da ischemia/riperfusionazione [52]. Inoltre, attivatori selettivi e inibitori della PKC-ε hanno mostrato, rispettivamente, di proteggere il cuore e di abolire il preconditionamento ischemico o farmacologico in varie specie animali [53-54].

Invece, la funzione della PKC-δ è più controversa: ricerche condotte fin'ora hanno indicato che l'azione della PKC-δ durante la riperfusionazione inasprisce il danno [55], mentre l'attivazione dell'enzima durante il preconditionamento può indurre cardioprotezione [56].

Non è stato però ancora chiarito del tutto come la PKC eserciti la sua funzione protettiva. La PKC, infatti, può modulare, direttamente o indirettamente, componenti associate alle membrane mitocondriali quali mPTP, canali  $mK_{ATP}$ , BAX/BAD e Bcl-2 [48, 57, 58].

Il gruppo di J.M. Downey ha proposto un meccanismo d'azione per la PKC che coinvolge, a monte, l'azione dei recettori dell'adenosina: secondo questo modello la PKC aumenta la sensibilità dei recettori a bassa affinità dell'adenosina  $A_{2b}$  ( $A_{2b}AR$ ) in modo che possano essere attivati dall'adenosina endogena rilasciata dai cardiomiociti danneggiati e i recettori  $A_{2b}AR$  attivano, a loro volta, chinasi responsabili della sopravvivenza cellulare tra cui PI3K, Akt ed Erk [32].

#### **I.3.2.1.4 – Il ruolo della PKA**

È stato anche rilevato che alti livelli di cAMP (adenosina monofosfato ciclica) e, di conseguenza, l'attivazione della PKA (proteina chinasi A) sono coinvolti nella cardioprotezione indotta dal preconditionamento ischemico ma sono indipendenti dalla PKC [59, 60].

Inoltre, Sanada S. e colleghi hanno mostrato che il meccanismo cardioprotettivo della PKA prevede l'inibizione della chinasi Rho [59].

#### **I.3.1.2 – La fase post-ischemica**

Dati forniti da D.J. Hausenloy e colleghi indicano che l'IPC esercita la sua azione protettiva al momento della riperfusione attivando le vie di segnale della PI3K/Akt e delle tirosin chinasi MEK1/2 e Erk1/2. I ricercatori hanno chiamato PI3K, Akt e Erk “*reperfusion injury survival kinase*” (RISK) [61].

È stato inoltre dimostrato lo stretto legame tra l'azione di queste chinasi e la formazione di mPTP: si ritiene, infatti, che le RISK agiscano prevenendo la formazione di mPTP nel cuore ripperfuso, che è una causa determinante di morte cellulare [62]. Infatti, prevenire l'apertura degli mPTP – strategia che si ritiene alla base della cardioprotezione indotta dall'IPC – limita la dimensione dell'infarto miocardico del 40-50% [63].

Altri due enzimi collegati agli mPTP sono la PKC- $\epsilon$  e la GSK3 $\beta$  (*Glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ). La PKC- $\epsilon$ 2 ha mostrato di agire inibendo la formazione degli mPTP [49], mentre l'inattivazione della GSK3 $\beta$  può inibire fortemente la formazione degli mPTP nei miociti [64]. La GSK3 $\beta$  è, infatti, un mediatore importante del preconditionamento ischemico [65] e farmacologico indotto da oppioidi [66] o da attivatori dei canali mK<sub>ATP</sub> [49] ed è in grado di offrire una protezione immediata o tardiva. Inoltre agisce come effettore della cardioprotezione indotta dalla via di segnale Wnt/Frizzled [67].

### **I.3.3. – *Late* IPC**

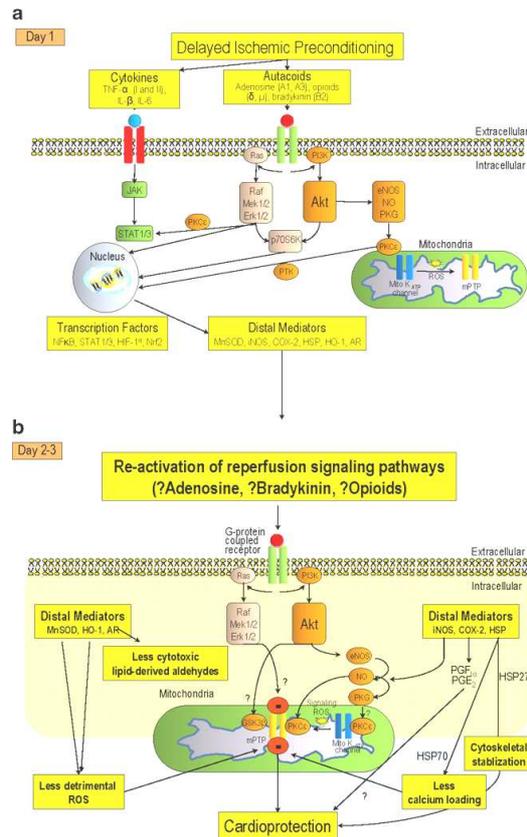
Nel 1993 è stato dimostrato per la prima volta in modelli animali che l'IPC era in grado di conferire cardioprotezione anche a 24 ore di distanza dallo stimolo preconditionante, che esisteva quindi una fase protettiva "ritardata" [33, 34].

L'IPC tardiva può proteggere il cuore dall'infarto miocardico ma anche dallo stordimento miocardico, dall'aritmia e dalle disfunzioni endoteliali [68].

La fase tardiva del preconditionamento ischemico può essere generata da [69]:

- stimoli fisiopatologici  
quali l'ischemia, lo stress cardiaco, l'esercizio fisico e l'ipossia;
- stimoli farmacologici costituiti da
  - molecole naturali potenzialmente nocive, quali l'endotossina, l'interleuchina-1, il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), il TNF- $\beta$ , il fattore inibente la leucemia (LIF), e i ROS;
  - farmaci applicabili clinicamente, quali gli agenti capaci di rilasciare NO, gli agonisti del recettore dell'adenosina, i derivati delle endotossine, gli stimolatori dei canali  $K_{ATP}$ , gli agonisti dei recettori adrenergici- $\alpha_1$  e gli agonisti dei recettori oppioidi.

Dalla sua prima descrizione, la fase tardiva dell'IPC è stata ampiamente studiata e sono state delineate le vie di segnale che la caratterizzano. La fase tardiva è iniziata da molecole generate durante lo stimolo preconditionante che mettono in moto i complessi meccanismi protettivi attivando i corrispondenti recettori sulla superficie cellulare. Le sostanze attivatrici reclutano dei mediatori precoci, che sono in genere protein chinasi, le quali, a loro volta, attivano fattori di trascrizione. A 12-24 ore dallo stimolo preconditionante, l'attivazione dei fattori di trascrizione ha come conseguenza la sintesi *de novo* di proteine, i mediatori distali, che proteggono il cuore nelle successive 24-72 ore, agendo su degli effettori finali che intervengono al momento dell'infarto (Fig.I.3.2). Alcuni fattori sono difficili da classificare perchè esprimono funzioni che si sovrappongono in una o più di queste categorie [36, 69].



**Fig.I.3.2: Schema riepilogativo della fase tardiva del preconditionamento ischemico. (a) attivazione delle vie di segnale cardioprotettive da parte dello stimolo preconditionante ischemico, (b) finestra protettiva. (da [36])**

Gli attivatori, i mediatori precoci (Tab.I.3.1) e alcuni effettori finali sono comuni sia nella fase tardiva che nella precoce del preconditionamento ischemico.

**Attivatori** adenosina, oppioidi, bradichinina, citochine proinfiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-6, ecc...), ROS, NO e eNOS, acido solfidrico (H $_2$ S).

**Mediatori precoci** PKC, tirosin chinasi, MAP chinasi (tra cui ERK1/2, p38 MAPK e JNK), via di segnale PI3K-Akt.

**Tab.I.3.1: Attivatori e mediatori precoci della fase tardiva del preconditionamento ischemico.**

### I.3.3.1 – Fattori di trascrizione attivati durante la *late* IPC

Tra i fattori di trascrizione attivati durante l'IPC tardiva troviamo:

- NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)  
Y.T. Xuan e colleghi hanno determinato che in seguito a IPC NF- $\kappa$ B viene attivato e si lega al DNA [70] e che l'azione di questo fattore di trascrizione

dipende dalla formazione di NO, ROS e dalla attivazione di vie di segnale PKC e tirosin chinasi dipendenti. Il ruolo dell'NF- $\kappa$ B è stato confermato, inoltre, da studi in cui il preconditionamento tardivo era indotto da stimolatori del canale  $K_{ATP}$  mitocondriale [71] o dall'attivazione dei recettori A3 dell'adenosina [72].

- *AP-1 (Activator protein-1)*

AP-1 è un eterodimero composto dai fattori di trascrizione c-Jun e c-Fos che sono stati associati al preconditionamento ischemico tardivo indotto da TNF- $\alpha$  [73].

È stato dimostrato, inoltre, che durante la fase tardiva dell'IPC, e spesso insieme all'NF- $\kappa$ B, aumenta l'attività di AP-1 e il suo legame al DNA attraverso l'azione di PKC- $\epsilon$ , Erk1/2 e JNK MAPK [74].

- *STAT 1/3 (Signal transducers and activators of transcription 1/3)*

STAT 1/3 possono essere attivati tramite la chinasi JAK1/2 attraverso fosforilazione di residui tirosinici oppure dalla cascata di segnali PKC- $\epsilon$ -Raf1-MEK1/2-Erk1/2, attraverso la fosforilazione di residui serinici, e sono implicati nella trascrizione e sintesi dei mediatori distali dell'IPC tardiva iNOS e COX-2 [75, 76].

- *HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )*

HIF-1 $\alpha$  è un fattore di trascrizione sensibile all'ossigeno: in condizioni di ipossia si accumula e trasloca nel nucleo dove dimerizza con HIF- $\beta$  e si lega a specifiche sequenze presenti nei promotori dei geni bersaglio. La stabilizzazione [77] o l'over-espressione di HIF-1 $\alpha$  [78] è cardioprotettiva e questo effetto è stato attribuito all'attivazione di una serie di fattori tra cui l'EPO (eritropoietina) [79], HO-1 (eme ossigenasi-1) [80] e iNOS (ossido nitrico sintasi inducibile) [77].

### **I.3.3.2 – Mediatori distali della *late* IPC**

I mediatori distali dell'IPC tardiva sono:

- *MnSOD (mitochondrial manganese superoxide dismutase)*

MnSOD è un enzima endogeno antiossidante che catalizza la dismutazione del radicale superossido in ossigeno e perossido di idrogeno. Grazie a studi in cui era inibita la trascrizione di MnSOD è stato possibile confermarne il coinvolgimento nella cardioprotezione tardiva dovuta a IPC [81], a shock termico [82] e all'attivazione del recettore A1 dell'adenosina [83].

- **HSPs (*Heat stress proteins*)**

Le HSPs sono state collegate per la prima volta alla cardioprotezione tardiva indotta da IPC dal gruppo di D.M. Yellon [33] che ha rilevato un aumento dell'HSP70 e dell'HSP60 a 24 ore dallo stimolo preconditionante.

La sovraregolazione di HSP70 ha dimostrato di mediare la cardioprotezione tardiva indotta da oppioidi nei cardiomiociti isolati sottoposti a ischemia/riperfusione [84]. Il ruolo di HSP70 come mediatore distale è però risultato controverso in modelli *in vivo* [85, 86].
- **iNOS (*inducibile Nitric Oxide Synthase*)**

È stato proposto che l'IPC induca una risposta bifasica in termini di attivazione delle NOS: eNOS sarebbe responsabile della produzione dell'ossido nitrico nella fase di avvio del preconditionamento [87], mentre iNOS è considerata un mediatore distale della fase tardiva dell'IPC [88].

Il meccanismo attraverso cui iNOS è trascritto è stato ampiamente studiato e include l'attivazione del recettore A1 dell'adenosina [89], ROS, NO [90], mediatori precoci quali la PKC [87] e potenziali effettori finali, tra cui gli mPTP [91]. iNOS interagisce anche con COX-2 [92].
- **COX-2 (*Cyclo-oxygenase 2*)**

COX-2, in condizioni di stress, genera prostaglandine catalizzando la conversione di acido arachidonico.

È stato dimostrato che nell'IPC tardiva COX-2 può associarsi ed essere modulata da iNOS [75, 92], ma il meccanismo che porta all'attivazione di COX-2 sembra differire da quello di iNOS in quanto include la via JAK1/2-STAT1/3 [75], la cascata di segnali PKC-ε-Raf1-MEK1/2-Erk1/2-STAT1/3 [76] e NF-κB. Inoltre non sembra coinvolgere NO o ROS [92].
- **AR (*Aldose reductase*)**

L'aldeide reductasi è un enzima che metabolizza le aldeidi citotossiche di derivazione lipidica che possono essere generate dallo stress ossidativo durante il danno da ischemia/riperfusione.

È stato dimostrato un aumento dell'attività dell'AR in corrispondenza dell'effetto protettivo determinato da preconditionamento ischemico e che l'inibizione farmacologica dell'AR abolisce la cardioprotezione [116].

- HO-1 (*Heme oxygenase-1*)  
L'eme ossigenasi-1 è una proteina antiossidante e antinfiammatoria stress inducibile. G. Jancso e colleghi, utilizzando cardiomiociti neonatali di ratto, hanno determinato che il precondizionamento ischemico o farmacologico tramite adenosina, epinefrina e oppioidi conferisce cardioprotezione, aumento dell'espressione di HO-1 e che questi effetti protettivi possono essere bloccati dal silenziamento dell'HO-1 [94].

### I.3.3.3 – Effettori finali della *late* IPC

Gli effettori finali che agiscono al momento dell'infarto sono:

- La via di segnale RISK (*reperfusion injury salvage kinase*)  
Le RISK sono un gruppo di chinasi, di cui fanno parte Akt e Erk1/2, che quando attivate all'inizio della riperfusione inducono una robusta cardioprotezione [61].
- I canali  $K_{ATP}$   
In ambito scientifico si è concordi nel ritenere i canali  $mK_{ATP}$  dei mediatori/effettori finali della cardioprotezione al momento dell'infarto. Infatti la gibenclamide (un inibitore del canale  $K_{ATP}$  non specifico) e il 5-idrossidecanoato (5-HD, un antagonista del canale  $mK_{ATP}$ ) hanno mostrato in svariati studi di inibire gli effetti protettivi della fase tardiva del precondizionamento ischemico e farmacologico indotto da diverse sostanze tra cui agonisti del recettore A1 dell'adenosina, agonisti dei recettori oppioidi, ecc. [36]. Inoltre l'apertura del canale  $K_{ATP}$  mediata da agenti farmacologici è in grado anche di prevenire il rimodellamento cardiaco dovuto a stimoli cronici non ischemici [95].  
I canali del  $K_{ATP}$  hanno mostrato però di comportarsi in un contesto di precondizionamento tardivo anche come attivatori dello stimolo protettivo. Infatti H.H. Patel e collaboratori hanno determinato che un inibitore dei canali sarcolemmici  $K_{ATP}$ , somministrato prima dello stimolo precondizionante era in grado di abolire gli effetti cardioprotettivi della fase tardiva del precondizionamento ischemico e farmacologico. Gli stessi ricercatori, utilizzando un inibitore specifico per i canali  $mK_{ATP}$ , hanno però escluso un ruolo da attivatore per questo tipo di canale [96].

Ulteriori studi, però, non sono riusciti ad escludere del tutto il coinvolgimento dei  $mK_{ATP}$  dal ruolo di attivatori dello stimolo protettivo [36].

- I canali  $K_{Ca^{2+}}$

Si ritiene che i canali del potassio  $Ca^{2+}$ -dipendenti possano mediare la cardioprotezione promuovendo l'aumento dell'influsso di potassio nel mitocondrio [97]. Nel topo è stato dimostrato che la somministrazione di uno specifico attivatore del canale  $K_{Ca^{2+}}$  era in grado di indurre effetti cardioprotettivi precoci e tardivi, con un meccanismo NOS-indipendente [98].

- mPTP

Alcuni studi hanno associato l'inibizione dell'apertura dei mPTP al momento della ri-perfusione con gli effetti cardioprotettivi della fase tardiva dell'IPC [99] e del preconditionamento indotto da CCPA, un agonista del recettore A1 dell'adenosina [100]. In un altro studio è stato dimostrato, in un modello murino, che l'over-espressione cardiaca specifica di iNOS determinava una diminuzione della dimensione dell'infarto, una minore produzione di ROS durante l'ischemia/ri-perfusione ma soprattutto l'inibizione dell'apertura degli mPTP nel cuore ri-perfuso [91].

### **I.3.4 – Limitazioni dell'IPC**

Il preconditionamento ischemico ha effetti cardioprotettivi molto importanti che però possono essere condizionati da molteplici fattori, tra cui il genere e l'età [36, 101]. In particolare, l'aumento d'età riduce gli effetti dell'IPC e del preconditionamento farmacologico con adenosine e oppioidi. Questo fatto è assai rilevante per quanto riguarda una futura applicazione clinica dell'IPC in quanto la maggioranza dei pazienti che necessitano di una terapia cardioprotettiva si colloca nella fascia d'età anziana [101].

Altri fattori che influenzano negativamente l'efficacia dell'IPC sono gli eventuali stati patologici preesistenti nel paziente, quali diabete, sindrome metabolica, aterosclerosi coronarica, dislipidemia, ipertensione, ipertrofia ventricolare sinistra, rimodellamento postinfartuale e ischemia miocardica cronica [36].

Un altro aspetto di cui tenere conto è che il preconditionamento ischemico è sensibile a prodotti farmaceutici comuni che possono interferire con le sue vie di

segnale. I farmaci che interferiscono con l'IPC includono, ad esempio, gli antinfiammatori non steroidei e le sulfaniluree ipoglicemizzanti [101].

### **I.3.5 – Applicazioni cliniche dell'IPC**

In seguito alla scoperta dell'IPC in ambito scientifico si sono moltiplicate le ricerche volte a elucidare i meccanismi alla base del preconditionamento ischemico e a trasferire questo tipo di trattamento nella pratica clinica a beneficio dei pazienti.

Malgrado i promettenti risultati in termini di cardioprotezione, il preconditionamento ischemico non è risultato facilmente applicabile in ambito clinico per due principali motivi: la tempistica e l'invasività della procedura.

La necessità di intervenire prima dell'insorgenza dell'insulto ischemico restringe la sua potenziale utilità clinica ad alcuni specifici scenari dove questo evento può essere chiaramente previsto: angioplastica coronarica e interventi chirurgici quali bypass aorto-coronarico e trapianto cardiaco.

Relativamente alla tempistica, una possibile alternativa all'IPC è fornita da tecniche che sono state proposte più recentemente: il per-condizionamento (*per-conditioning*) e il post-condizionamento (*post-conditioning*), in cui lo stimolo ischemico condizionante è somministrato, rispettivamente, in seguito all'instaurarsi dell'ischemia o nei primi minuti della riperfusione [102].

Per i pazienti che invece devono intraprendere procedure chirurgiche pianificando il momento del danno ischemico, e che possono quindi beneficiare dell'IPC, possibili alternative all'invasività della procedura classica sono fornite dal preconditionamento ischemico remoto - tecnica in cui lo stimolo preconditionante è applicato in zone al di fuori del distretto che verrà colpito dall'ischemia - e dalla terapia farmacologica.

Per quanto riguarda la terapia farmacologica, fin dalla scoperta dell'IPC si sono studiati molto i meccanismi che la caratterizzano per identificare sostanze che attivino le medesime (o equivalenti) vie di segnale. In questo contesto gli oppioidi e i loro recettori hanno mostrato di avere un ruolo cardioprotettivo importante e di essere coinvolti nel preconditionamento ischemico, pertanto possono essere considerati candidati ideali per lo sviluppo di una strategia terapeutica farmacologica alternativa all'IPC.

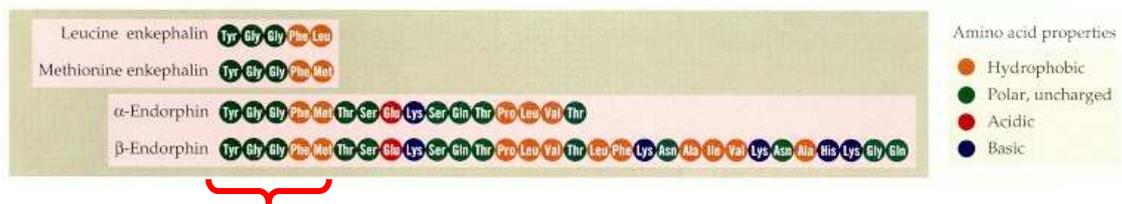
## I.4 – Sistemi endorfinergici: peptidi e recettori oppioidi endogeni

### I.4.1 – Peptidi oppioidi endogeni

Con il termine generico di “oppioidi” si indicano sostanze (naturali o sintetiche) che agiscono a livello dei recettori oppioidi e che producono alcuni degli effetti farmacologici (quali ad esempio gli effetti analgesici) presentati dall’oppio e dal suo costituente principale, la morfina.

I peptidi oppioidi endogeni sono stati scoperti negli anni ’70 durante le ricerche volte a individuare composti endogeni capaci di mimare gli effetti della morfina e sono una importante categoria di neurotrasmettitori.

La famiglia degli oppioidi endogeni conta più di 20 peptidi che spaziano dai cinque ai trentuno residui amminoacidici di lunghezza ed hanno in comune una sequenza ammino terminale composta dagli amminoacidi tirosina-glicina-glicina-fenilalanina-metionina/leucina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) che è chiamata “motivo oppioide” e che corrisponde all’esatta sequenza della Met-Enkefalina e della Leu-Enkefalina [103] (Fig.I.4.1).



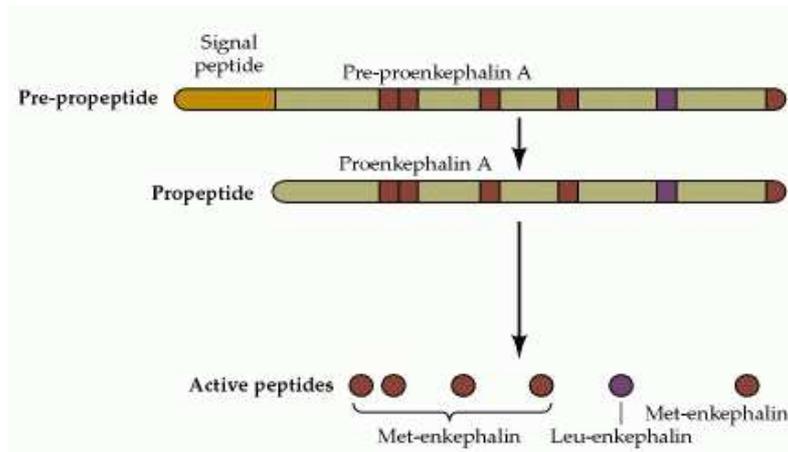
#### “MOTIVO OPIOIDE”

Fig.I.4.1: “Motivo oppioide” comune nei peptidi oppioidi endogeni.  
(da [104], modificata).

Tra le componenti principali della famiglia degli oppioidi endogeni troviamo le endorfine, le encefaline e le dinorfine .

Ognuna di queste tre classi deriva da un precursore specifico codificato da geni distinti. Il precursore è inattivo ed è sintetizzato in forma di pre-propeptide. La sequenza “pre” serve ad indirizzare il propeptide attraverso la membrana del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ed è clivata da enzimi specifici rilasciando così il propeptide nelle cisterne del RER. Il propeptide è traslocato quindi nell’apparato del Golgi dove è impacchettato in granuli secretori. I neuropeptidi attivi derivano da una ulteriore

proteolisi del propeptide e da eventuali modificazioni post-trasduzionali quali l'acetilazione (Fig.I.4.2).



**Fig.I.4.2: Rappresentazione schematica del processamento dei pre-propeptidi oppioidi. (da [104], modificata).**

I precursori specifici di queste tre classi sono:

- per le endorfine... la pro-opiomelanocortina (POMC) che contiene le sequenze
  - del peptide oppioide  $\beta$ -endorfina;
  - degli ormoni adrenocorticotropina (ACTH),  $\beta$ -lipotropina e gli ormoni stimolanti i melanociti  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

I derivati della POMC sono presenti nell'adenipofisi (cellule corticotrofe), nel lobo intermedio dell'ipofisi e in vari gruppi di neuroni centrali e periferici;

- per le encefaline... la proencefalina che contiene
  - copie multiple della Met-Encefalina, la cui sequenza amminoacidica è Tyr-Gly-Gly-Phe-Met;
  - due forme estese di Met-Encefalina: l'eptapeptide Met-Encefalina-Arg-Phe (MEAP) e l'octapeptide Met-Encefalina-Arg-Gly-Leu;
  - una singola copia di Leu-Encefalina, la cui sequenza amminoacidica è Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu.

I derivati della proencefalina sono presenti soprattutto nella midollare del surrene;

- per le dinorfine... la prodinorfina che codifica per
  - la Dinorfina A, la cui sequenza amminoacidica è Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln,
  - la Dinorfina B, la cui sequenza amminoacidica è Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr,
  - le  $\alpha$ -/ $\beta$ -neo-endorfina, le cui sequenze amminoacidiche sono Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro $\pm$ Lys.

I derivati della prodinorfina sono particolarmente abbondanti nel lobo ipofisario posteriore, ma presenti in vari nuclei cerebrali e in neuroni periferici.

I peptidi oppioidi, a livello del sistema nervoso centrale, hanno un'azione analgesica, deprimono il respiro, inducono catatonìa e stimolano la produzione di prolattina. A livello periferico, invece, causano la riduzione della secrezione gastrica acida e rallentano il processo digestivo allungando lo svuotamento gastrico e il transito intestinale. I  $\delta$  agonisti, oltre all'analgèsia spinale, hanno mostrato di poter causare una potente stimolazione dell'attività locomotoria, di svolgere un'azione antidepressiva e di avere possibili effetti immunomodulatori. I recettori  $\kappa$  vengono chiamati in causa anche nell'analgèsia e nella sedazione. [104-107].

Un'area che negli anni ha suscitato sempre maggiore interesse per la sua importanza clinica riguarda il ruolo degli oppioidi, sia dei composti endogeni che di sintesi, nel limitare la patogenesi del danno da ischemia/riperfusionè.

Le cellule miocardiche sono in grado di sintetizzare le tre principali classi di peptidi oppioidi endogeni [108-109], di immagazzinarli [110] e, soprattutto, di rilasciare peptidi oppioidi - incluse la Met-Encefalina e la Leu-Encefalina - sia durante l'ischemia del miocardio [111-113], sia durante il preconditionamento ischemico.

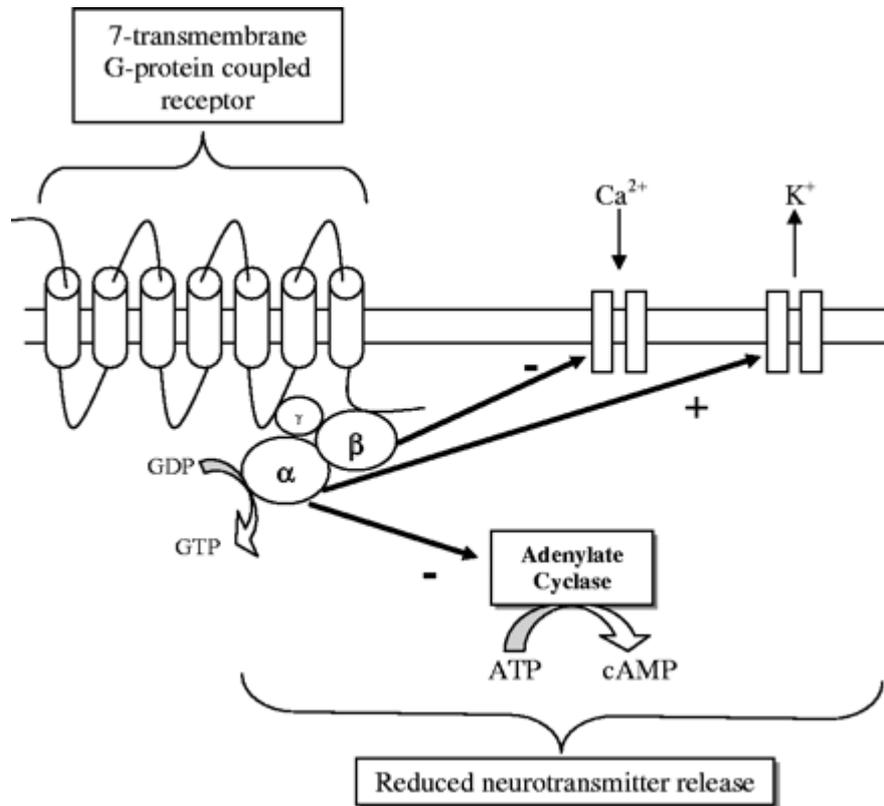
Infatti, K.E. Jackson e colleghi hanno dimostrato in un modello animale che, in seguito all'applicazione nel nodo seno-atriale di quattro cicli di dieci minuti di ischemia seguiti da dieci minuti di riperfusionè, si poteva rilevare un aumento del rilascio di MEAP durante la fase ischemica, con un ritorno ai livelli basali durante la riperfusionè [114].

## **I.4.2 – Recettori oppioidi**

Gli effetti degli oppioidi sono mediati attraverso l'attivazione di recettori oppioidi (*opioid receptors*, ORs), una famiglia costituita da recettori accoppiati a proteina G (*G protein coupled receptors*, GPCRs).

I GPCR sono presenti sulla membrana plasmatica, sono formati da un'unica catena composta da 7  $\alpha$ -elicè transmembrana, con un dominio extracellulare N-terminale di lunghezza variabile e un dominio intracellulare C-terminale e agiscono attivando la proteina G a loro accoppiata. In particolare i recettori oppioidi sono associati a una proteina di tipo inibitorio ( $G_{i/o}$ ), la quale blocca l'enzima adenilato ciclasi interrompendo così la produzione di cAMP e in misura minore attiva la via di segnale

della fosfolipasi C, e interagiscono con i canali cellulari aumentando la conduttanza al potassio e riducendo la conduttanza al calcio (Fig.I.4.3).



**Fig.I.4.3: Struttura dei recettori oppioidi e meccanismo d'azione accoppiato alla proteina G.**  
(da [115])

Nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico, sono stati identificati diversi sottotipi di recettori oppioidi, i tre principali sono:

- i recettori  $\delta$ , delta ( *$\delta$ -opioid receptor*, DOP), che si suddividono nei due sottotipi  $\delta_1$  e  $\delta_2$ . Oltre che nell'SNC si localizzano anche in tessuti periferici quali polmoni, ghiandole surrenaliche, stomaco, intestino, rene, milza, organi sessuali e cuore dove risultano più abbondanti rispetto a tutti gli altri organi [116, 117];
- i recettori  $\kappa$ , kappa ( *$\kappa$ -opioid receptor*, KOP) che si suddividono nei tre sottotipi  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  e  $\kappa_3$ . Studi di distribuzione del recettore effettuati in varie specie mostrano che KOP è espresso in grande quantità nel cervello e che può essere rilevato a livello cardiaco [118];
- i recettori  $\mu$ , mu ( *$\mu$ -opioid receptor*, MOP), così definiti perché capaci di legare selettivamente la morfina, che si suddividono nei tre sottotipi  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ , e  $\mu_3$ .

Si localizzano a livello del sistema nervoso centrale nei gangli basali e nel talamo, aree del cervello associate con le vie del dolore [119]. I MOP sono espressi ampiamente anche in tessuti periferici quali polmoni, intestino, ghiandole surrenaliche, rene e milza [116].

I peptidi oppioidi si legano ai recettori oppioidi con affinità diverse: i recettori delta hanno alta affinità di legame con le encefaline, il ligando primario dei kappa sono le dinorfine, i recettori mu invece hanno alta affinità, nell'ordine, per la  $\beta$ -endorfina, le encefaline e bassa affinità per le dinorfine. Oltre ai peptidi oppioidi endogeni i recettori oppioidi sono in grado di legare anche una vasta serie di agonisti e antagonisti naturali o sintetici (Tab.I.4.1).

	recettore
<b><u>Ligandi endogeni:</u></b>	
$\beta$ -endorfina	$\mu \approx \delta \gg \kappa$
Met-Encefalina	$\delta > \mu > \gg \kappa$
Leu-Encefalina	$\delta > \mu > \gg \kappa$
Dinorfina A/B	$\kappa > \gg \mu > \delta$
<b><u>Ligandi sintetici:</u></b>	
Agonisti	
Morfina	$\mu > \gg \delta \approx \kappa$
Antagonisti	
Naloxone	$\mu > \delta \approx \kappa$

**Tab.I.4.1: Affinità di oppioidi endogeni e sintetici verso i recettori oppioidi.**  
(da [115, 118])

I recettori oppioidi hanno mostrato di poter mediare e regolare le funzioni cardiovascolari sia in situazioni fisiologiche che patologiche [118, 120, 121] e sono stati localizzati nel sistema nervoso centrale e periferico presso le estremità presinaptiche dei nervi autonomi a contatto con i miociti cardiaci. Studi effettuati sui miociti cardiaci di ratto, inoltre, hanno indicato la presenza dei recettori  $\delta$  e  $\kappa$  nei cardiomiociti ventricolari [120]. In linea con questi dati C. Ventura e colleghi hanno dimostrato che i recettori  $\delta$  e  $\kappa$ , ma non i  $\mu$ , sono presenti sulle membrane sarcolemmali isolate da cuori di ratto [122].

In generale DOP è risultato essere il sottotipo di recettore prevalente individuato [116]. Studi di localizzazione del recettore  $\mu$  indicano che questo sottotipo non è espresso nel tessuto cardiaco [116]. Di conseguenza, si è indagato di meno il ruolo che MOP esercita nelle funzioni cardiache e cardiovascolari. M. K. Pugsley, in una esaustiva *review* del 2002, sostiene come forse siano necessarie ulteriori ricerche volte a determinare se il recettore  $\mu$  sia totalmente assente nel cuore. Infatti anche se non fosse possibile rilevarlo sulla superficie dei miociti atriali o ventricolari potrebbe essere presente nelle innervazioni cardiache o sulle cellule endoteliali della vascolatura cardiaca e l'eventuale individuazione di questi recettori sulla vascolatura coronarica potrebbe fornire informazioni di importanza terapeutica [118].

### **I.4.3 – Recettori oppioidi e cardioprotezione**

Alcuni studi hanno indicato che gli agonisti oppioidi, in particolare i  $\kappa$  agonisti, possono avere un effetto antiaritmogenico, agendo a livello dei canali cardiaci del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ . La modulazione di questi canali ionici avverrebbe sia con un meccanismo recettore indipendente sia attraverso l'azione dei recettori oppioidi, i quali regolerebbero direttamente i canali ionici attraverso l'interazione con le proteine G a cui sono accoppiati [121].

L'attivazione dei recettori oppioidi ha soprattutto dimostrato di poter preservare la cellula dal danno da ischemia/riperfusionazione in molti modelli sistemici tra cui l'intestino, il muscolo scheletrico, il sistema nervoso centrale e il miocardio [121].

Negli anni, infatti, un numero sempre maggiore di ricerche ha indicato che l'attivazione esogena dei recettori oppioidi è cardioprotettiva.

I recettori oppioidi hanno mostrato, in vari modelli animali, di essere molto importanti per la cardioprotezione indotta da preconditionamento farmacologico [123] e da IPC, sia nella fase precoce [40] che nella tardiva [124].

Svariati studi sperimentali hanno messo in luce il contributo che ciascun tipo di recettore oppioide ( $\kappa$ -  $\delta$ -  $\mu$ -) offre nel proteggere i miociti cardiaci in modo diretto [125], remoto [126] o secondario agendo sul sistema nervoso centrale [127].

Sono pochi i dubbi nella comunità scientifica riguardo all'efficacia dell'attivazione dei recettori oppioidi nel promuovere nella cellula uno stato tollerante all'ischemia, con l'attivazione sia del sottotipo  $\delta$  che  $\kappa$  considerata cardioprotettiva. Le indicazioni riguardo al tipo e al sottotipo di recettore primariamente responsabile degli effetti benefici degli oppioidi sul cuore, però, sono ancora discordanti.

#### **I.4.3.1 – Recettore $\delta$ e cardioprotezione**

Storicamente, dati ottenuti nella seconda metà degli anni '90 e all'inizio del 2000 su modelli animali [40, 128, 129] hanno indicato che gli oppioidi endogeni esercitano effetti protettivi nell'IPC attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi.

Nel 1997, infatti, J.J. Schultz e colleghi hanno dimostrato per la prima volta che un agonista esogeno degli oppioidi, la morfina, era in grado di mimare l'effetto cardioprotettivo del preconditionamento ischemico [130] agendo attraverso il recettore  $\delta$ .

Successivamente Takashi Y. e colleghi, utilizzando cardiomiociti adulti di coniglio, hanno cercato di determinare quale oppioide endogeno fosse responsabile per la protezione osservata durante e in seguito a IPC [131] e hanno indicato le encefaline come i più promettenti promotori ed effettori dell'IPC. Anche DADLE (*[D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-Enkephalin*), agonista generico del recettore  $\delta$ , ha mostrato di essere in grado di proteggere cuori isolati di ratto dall'ischemia/riperfusionazione, attraverso la stimolazione del recettore [132].

Non è stato ancora chiarito del tutto, però, quale sottotipo di recettore  $\delta$  oppioide sia il principale responsabile della risposta protettiva: alcuni studi effettuati su modelli di ratto e suino, utilizzando agonisti - quali DPDPE, (D-Pen<sup>2,5</sup>)-encefalina - o antagonisti selettivi dei recettori  $\delta$ , indicano questo sottotipo di recettore come cardioprotettivo [133-135]. Altri ricercatori, utilizzando agonisti esogeni selettivi quali la variante D della deltorfina, indicano anche il sottotipo  $\delta_2$  come cardioprotettivo [135]. Questo dato è stato confermato recentemente *in vitro* e *in vivo*: H. Shen e colleghi hanno mostrato in cardiomiociti neonatali di ratto l'effetto protettivo dell'agonista  $\delta_2$  deltorfina E, ma non quello del  $\delta_1$  selettivo DPDPE, nel contrastare il danno da I/R [136]. Similmente, il gruppo di S.A. Brown, utilizzando deltorfina II e DPDPE in un modello animale di infarto miocardico, ha indicato come mediatori chiave della cardioprotezione i recettori  $\delta_2$  periferici e non i  $\delta_1$  [137, 138].

Complessivamente, gli studi fino ad ora eseguiti indicano che la stimolazione del sottotipo  $\delta_1$  e/o  $\delta_2$  aumenta la tolleranza del miocardio al danno da ischemia/riperfusionazione: il meccanismo preciso e la localizzazione (centrale o periferica) di questi recettori però non sono ancora stati chiariti perfettamente e dovranno essere approfonditi in futuro.

Anche il modello animale utilizzato per determinare gli effetti dei recettori oppioidi può fornire indicazioni diverse riguardo a quale tipo di recettore conferisca cardioprotezione. Ad es. l'agonista del recettore  $\delta$  DADLE ha mostrato di essere in grado di proteggere cuori isolati di ratto dal danno da ischemia/riperfusionazione attraverso la stimolazione del recettore [132], ma in un altro studio effettuato sul maiale non ha mostrato un effetto cardioprotettivo [135].

### I.4.3.2 – Recettore $\kappa$ e cardioprotezione

Mentre nella letteratura scientifica sono presenti moltissimi studi che indicano il recettore  $\delta$  come il più importante per l'IPC, i dati sulla capacità del recettore  $\kappa$  di regolare la tolleranza cardiaca all'ischemia/riperfusione sono più discordanti. Originariamente J.E. Schultz e colleghi hanno dimostrato, utilizzando antagonisti selettivi, che i recettori  $\kappa$  e  $\mu$  non sono coinvolti nel preconditionamento ischemico [139]. Addirittura alcuni studi indicano che l'attivazione dei recettori  $\kappa$  oppioidi possa esacerbare il danno da ischemia/riperfusione nei cuori di ratto isolati e riperfusi [140]. Anche altri ricercatori hanno mostrato che l'attivazione del recettore  $\kappa$  durante il preconditionamento farmacologico accentua il danno da I/R *in vivo* promuovendo aritmie [141].

Questi dati negativi sono in contrasto con studi che hanno determinato che la stimolazione dei recettori  $\kappa$  possa aumentare la tolleranza delle cellule cardiache al danno da ischemia (anossia) e alla riperfusione (riossigenazione) sia in modelli *in vitro* [142-144] che *in vivo* [145, 146].

Per quanto riguarda il rapporto tra recettori  $\kappa$  oppioidi e aritmie, G.Y. Wang e colleghi nel 2001 hanno mostrato che questi recettori mediano l'effetto protettivo del preconditionamento ischemico non solo limitando la dimensione dell'infarto ma contrastando anche l'aritmia indotta dall'ischemia, mentre l'azione dei recettori  $\delta$  agisce soltanto a livello della dimensione dell'infarto [147]. Secondo questo [147] ed altri studi [148] sia la PKC che i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali mediano l'effetto cardioprotettivo dei recettori  $\kappa$  a livello dell'infarto. Questa tendenza è stata confermata anche da A. Valtachanova-Matchouganska e colleghi, i quali due anni più tardi riportano che sia i recettori  $\delta$  che  $\kappa$  sono coinvolti nell'IPC ma che esercitano al suo interno effetti diversi: l'azione di DADLE limita in modo consistente la dimensione dell'infarto senza però avere effetti significativi sulle aritmie. U-50488H, agonista del recettore  $\kappa$ , non solo riduce la dimensione dell'infarto ma ha soprattutto effetti antiaritmici [149]. L'azione cardioprotettiva e antiaritmica esercitata dai recettori  $\kappa$  è riportata anche dal L. Cheng e colleghi [146].

Alcuni studi hanno indicato inoltre che sia l'attivazione pre-ischemica sia l'attivazione al momento della riperfusione dei recettori  $\kappa$  è in grado di fornire cardioprotezione nel ratto e nel topo [145, 150, 151].

### **I.4.3.3 – Recettore $\mu$ e cardioprotezione**

Poiché i recettori  $\mu$  oppioidi sono considerati assenti nei miociti adulti, pochi studi hanno indagato un loro possibile ruolo nel conferire tolleranza all'ischemia. Nel 2004, però, Y. Zhang e colleghi hanno dimostrato che il remifentanil, un agonista del recettore  $\mu$ , era in grado di offrire una protezione simile all'IPC ed hanno ipotizzato che questo recettore agisca perifericamente e che la sua azione comprenda l'attenuazione della risposta infiammatoria, la quale è in grado di esacerbare il danno da ischemia/riperfusionazione [152].

## **I.4.4 – Coinvolgimento degli oppioidi nei meccanismi dell'IPC**

I risultati ottenuti da numerosi studi sperimentali indicano che l'attivazione dei recettori oppioidi è in grado di attenuare sia la disfunzione contrattile che lo sviluppo di infarto miocardico in seguito ad un danno da ischemia/riperfusionazione. Inoltre il recettore  $\delta$  e il recettore  $\kappa$  oppioide hanno mostrato di poter conferire una protezione sia in fase acuta che in una fase tardiva e che questo effetto è mediato attraverso vie di *signaling* simili a quelle ritenute responsabili della fase acuta e tardiva del preconditionamento ischemico [40, 120, 123, 124].

### **I.4.4.1 – oppioidi e... *early* IPC**

Per quanto riguarda il coinvolgimento degli oppioidi nella fase precoce dell'IPC, è un dato da anni riconosciuto che l'attivazione dei recettori degli oppioidi stimoli la via della PI3K [153, 154], via di segnale fondamentale per la cardioprotezione [66].

La cascata di segnali attivata dai recettori oppioidi ricalca quella dell'IPC.

Recentemente è stato proposto che i recettori  $\delta$  oppioidi promuovano la transattivazione del recettore EGFR tramite l'azione di una metalloproteinasi di membrana. EGFR, una volta attivato, dà il via ad una complessa rete di segnali intracellulari reclutando la tirosin chinasi intracellulare Src con successiva attivazione della PI3K e delle MAPK [43, 154]. Tra le MAPK coinvolte a valle del recettore delta oppioide troviamo p38 MAPK ed ERK1/2 (p44/42MAPK) [155], due chinasi che agiscono probabilmente in

parallelo. L'attivazione di PI3K porta all'attivazione di Akt attraverso chinasi fosfolipide-dipendenti. L'Akt fosforilata, successivamente, attiva eNOS per produrre ossido nitrico che a sua volta induce la produzione di cGMP da parte della guanilato ciclasi. In questo modo viene stimolata la PKG [42, 44] che agisce a livello dei canali mitocondriali  $K_{ATP}$  aprendoli, con conseguente rilascio di ROS [156].

I ROS, agiscono come secondi messaggeri e, a loro volta, promuovono l'attivazione di PKC.

Molti ricercatori hanno riportato che l'attivazione e la traslocazione della PKC ha un ruolo importante nel mediare il segnale del preconditionamento indotto da oppioidi. Alcuni studi infatti hanno mostrato che il blocco della PKC interrompe le vie di segnale stimulate dai recettori oppioidi e la protezione cellulare che ne deriva; questi primi studi non sono stati in grado però di individuare l'isoforma di PKC coinvolta in quanto impiegavano inibitori non selettivi [154, 157].

Già dalla fine degli anni '90 era stato dimostrato che nei cuori di ratto l'azione cardioprotettiva dei recettori oppioidi coinvolgeva l'attivazione dei canali del  $K_{ATP}$  [158].

In seguito è stato confermato in diverse specie che i canali mitocondriali del  $K_{ATP}$  hanno un ruolo essenziale nella cardioprotezione, sia in fase acuta che tardiva, esercitata dagli oppioidi [42, 157, 159, 160].

Dati recenti dimostrano che la protezione acuta mediata da recettori oppioidi durante la fase della riperfusione dipende dalla PI3K, da mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) [66] e dalla modulazione della GSK-3 $\beta$ , un mediatore della cardioprotezione indotta da preconditionamento ischemico [65] e farmacologico [49, 66].

I recettori  $\delta$  oppioidi hanno mostrato, infatti, di promuovere l'inibizione della GSK-3 $\beta$  attraverso fosforilazione da parte di PI3K [66].

Tramite l'inibizione della GSK-3 $\beta$  e la modulazione dei canali  $K_{ATP}$  mitocondriali questi recettori sono coinvolti, inoltre, con la cardioprotezione indotta dall'inibizione degli mPTP [49].

### I.4.4.2 –oppioidi e... *Late IPC*

Sono numerosissimi gli studi che collegano gli oppioidi alla fase tardiva del preconditionamento ischemico: R.M. Fryer e colleghi, utilizzando un modello *in vivo* di ratto, hanno riportato che l'agonista del recettore  $\delta_1$  TAN-67 è in grado di limitare la dimensione dell'infarto miocardico a distanza di 24 e 48 ore, ma non di 12 e 72 ore [161]. Studi successivi hanno dimostrato anche il coinvolgimento del recettore  $\kappa$  grazie all'utilizzo dell'agonista specifico U50488H [162, 163] e del remifentanil (un oppioide sintetico che agisce presso i tre tipi di recettori) [164].

Inoltre, usando un agonista che si lega irreversibilmente al recettore  $\delta_1$ , il fentanil isotiocianato, la finestra temporale della cardioprotezione tardiva è stata estesa a 96 ore [165].

La fase precoce e la tardiva del preconditionamento ischemico condividono componenti simili all'interno della cascata di segnali: la risposta in acuto è, però, di natura postraslazionale, mentre la fase tardiva è dovuta a responsi trascrizionali.

Anche le vie cardioprotettive di segnale attivate dai recettori oppioidi comprendono elementi comuni alle due fasi dell'IPC, quali:

- ROS

È ben documentato che il rilascio di ROS in seguito al trattamento con agonisti dei recettori oppioidi abbia un ruolo importante nel preconditionamento mediato da queste molecole [121]. Infatti, il trattamento con antiossidanti quali l'MPG abolisce la cardioprotezione indotta sia dall'attivazione del recettore  $\kappa$  [166] che del  $\delta$  [42, 160] mediatori precoci della cardioprotezione come PKC- $\epsilon$  [162, 167], le MAP chinasi p38 MAPK e ERK1/2 [155] e PI3K [165].

Similmente all'IPC, la protezione tardiva indotta dagli oppioidi coinvolge la regolazione dell'espressione di mediatori ed effettori distali della cardioprotezione, quali:

- HSP70

Studi *in vitro* su cardiomiociti di ratto hanno mostrato che l'azione degli oppioidi è mediata attraverso l'attivazione di HSP70 [84], che è in grado di ripristinare parzialmente l'omeostasi del calcio intracellulare alterata dall'insulto ischemico [168].

- iNOS [169, 170]

La fase tardiva della cardioprotezione conferita dagli oppioidi prevede iNOS come mediatore a monte di COX-2 [171, 172].

- HO-1

G. Jancso e collaboratori hanno mostrato, utilizzando cardiomiociti neonatali di ratto, che la cardioprotezione tardiva indotta da oppioidi era riconducibile ad un aumento della espressione di HO-1 e che l'effetto protettivo era abolito dall'inibizione di HO-1 tramite siRNA [94].

- COX-1 e COX-2 [171-173]

Anche i canali del  $K_{ATP}$  sono coinvolti nella cardioprotezione tardiva indotta da oppioidi sia attraverso il recettore  $\delta$  che  $\kappa$  [161, 163]. Inoltre, non solo il canale mitocondriale  $K_{ATP}$  [161] ma anche il canale sarcolemmale ha mostrato di agire nella fase tardiva del preconditionamento mediato da recettori oppioidi: in base ai loro dati Patel H.H. e colleghi hanno proposto che il canale  $K_{ATP}$  sarcolemmale agisca da stimolo immediato della cardioprotezione al momento dello stimolo preconditionante e che il canale  $K_{ATP}$  mitocondriale assuma il ruolo di mediatore distale della cardioprotezione al momento dell'infarto [36, 96].

## I.4.5 – Limiti preconditionamento farmacologico con oppioidi

L'azione cardioprotettiva esercitata dal preconditionamento ischemico, sia nella fase precoce che nella tardiva, è sensibile a fattori quali il genere, l'età, la compresenza di altri stati patologici (diabete, aterosclerosi, dislipidemia, ecc...) [101].

Per quanto concerne il preconditionamento farmacologico indotto da oppioidi valgono le stesse indicazioni; utilizzando un modello murino *in vitro*, J.N. Peart e colleghi suggeriscono che la perdita di cardioprotezione oppioide-mediata, rilevabile con l'aumentare dell'età, sia dovuta ad una diminuzione dell'attivazione di p38 MAPK e HSP27 [174], enzimi coinvolti nelle vie di segnale cardioprotettive.

Per quanto riguarda la compresenza con altri stati patologici, J.S. Qi e colleghi hanno mostrato, invece, che gli effetti cardioprotettivi causati da agonisti del recettore  $\kappa$  oppioide sono aboliti in ratti soggetti a diabete indotto con streptozotocina [175].

## I.5 – Cellule Staminali Mesenchimali umane

Le cellule staminali mesenchimali (*mesenchymal stem cells* o *mesenchymal stromal cells*, MSCs) sono cellule staminali adulte multipotenti che possono differenziare in tessuti di origine mesenchimale.

Le MSC sono state inizialmente isolate da aspirati di midollo osseo grazie alla loro abilità ad aderire alle piastre di coltura [176] e nel tempo sono state studiate da molti gruppi di ricerca [177, 178].

Le MSC derivate da midollo osseo (*bone marrow human mesenchymal stem cells*, BMhMSCs) hanno, *in vivo*, un ruolo nel supportare la crescita delle cellule staminali ematopoietiche (*hematopoietic stem cells*, HSCs) [179], mostrano di essere facilmente isolabili, non sono immortali, ma hanno un alto potenziale di espansione, stabilità genetica, capacità proliferativa e potenziale multilineare [178, 180].

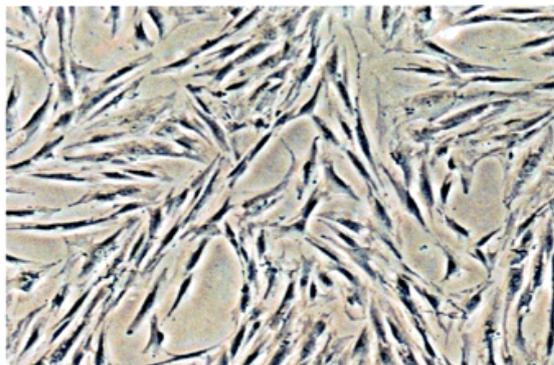
Inoltre, sono cellule che rilasciano citochine e fattori di crescita che stimolano meccanismi endogeni di riparo [181, 182].

### I.5.1 – Caratterizzazione delle MSC

Non esiste un'indicazione antigenica né un test universale - come la positività a CD34 e il saggio di ripopolazione per le HSC - per definire e classificare una cellula come staminale mesenchimale, quindi si studia la morfologia in coltura insieme ad un consistente set di proteine marker di superficie.

- **Morfologia in coltura**

Le MSC possiedono la capacità di aderire alla plastica e mostrano una caratteristica forma fibroblastoide ben stesa e fusiforme [183] (Fig.I.5.1).



**Fig.I.5.1: Cellule MSC in coltura (da [180]).**

- Marker fenotipici

Non esiste un singolo marker che definisca le MSC, le cellule devono esprimere una determinata serie di molecole: Pittenger e collaboratori [178], in un lavoro molto esaustivo ed ampiamente citato in letteratura, hanno caratterizzato le cellule e definito quali proteine di superficie debbano o non debbano essere espresse (Tab.I.5.1) per indicare una cellula come appartenente alle staminali mesenchimali.

**Tab.I.5.1: Marker di superficie delle MSC.**

Antigene	Descrizione	Positività/ negatività	
CD105	endoglina riconosciuta dall'anticorpo SH2	+	
CD73	ecto-5'-nucleotidasi riconosciuta dall'anticorpo SH3 e dall'SH4	+	
CD29	subunità $\beta 1$ dell'integrina	+	
CD44	recettore dello ialuronano	+	
CD71	recettore della transferrina	+	
CD90	Thy-1	+	
CD106	VCAM-1 ( <i>vascular cell-adhesion molecule-1</i> ), lega l'integrina VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ )	+	
CD120a	recettore TNF I	+	
CD124	recettore IL-4	+	
CD166	ALCAM ( <i>activated leukocyte cell-adhesion molecule</i> ), lega CD6	+	
CD14	recettore del lipopolisaccaride (espresso da monociti e macrofagi)	marker della linea ematopoietica	-
CD34	espresso da cellule progenitrici ematopoietiche		-
CD45	antigene comune leucocitario		-

## I.5.2 – Capacità differenziative delle MSC

Le MSC in condizioni controllate *in vitro* sono capaci di differenziare in molteplici *lineage* mesenchimali formando adipociti, osteoblasti e condrociti [178].

Queste cellule possono differenziare anche in tenociti, miotubi, stroma di supporto alle cellule ematopoietiche e cellule endoteliali e in cellule di origine non mesenchimale come astrociti, neuroni o epatociti [179, 184].

MSC derivate dal midollo osseo possono anche dare origine a cardiomiociti [185].

### **I.5.3 – Proprietà immunomodulatorie delle MSC**

Le MSC hanno capacità immunoregolatoria: sono in grado di sopprimere la risposta delle cellule T *in vitro* e in modelli animali *in vivo* [186, 187]. Le MSC, infatti, esprimono il complesso maggiore di istocompatibilità I (MHC I) e solo a bassi livelli la molecola di classe II, non esprimono, invece, le molecole costimolatorie B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) e CD40 che sono necessarie per innescare la proliferazione di cellule T [187, 188]. Le MSC possono anche agire direttamente sulle risposte infiammatorie [189] inibendo molte interazioni delle cellule T con altri stimoli [190]. Questa capacità immunomodulatoria rende le MSC ideali per l'utilizzo in terapie cellulari non solo autologhe ma anche allogeniche, con la possibilità di evitare rigetto.

### **I.5.4 – Fonti alternative al midollo osseo**

L'utilizzo di MSC provenienti da midollo osseo va incontro ad una serie di problemi in quanto:

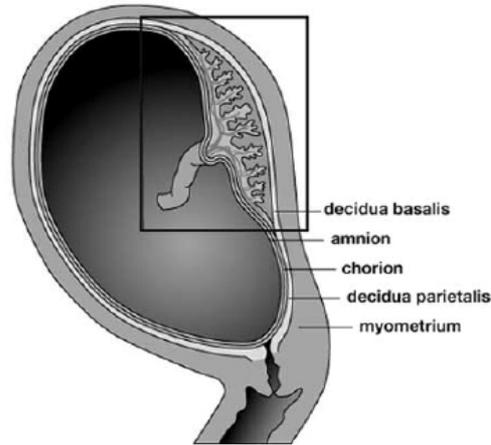
- la presenza di MSC nel midollo osseo nell'uomo adulto è relativamente bassa (0,001-0,01% delle cellule nucleate);
- il numero di cellule staminali e la capacità di differenziamento diminuiscono significativamente con l'età dell'individuo [191];
- la procedura che permette di prelevare le cellule è invasiva.

Si è resa dunque necessaria la ricerca di fonti alternative.

Le MSC, nell'uomo, sono state identificate anche nel sangue periferico [192], nel periostio, nel muscolo, nel tessuto adiposo [193], nel tessuto connettivo e nella polpa dentaria [194].

Nella presente tesi sono state utilizzate cellule provenienti da membrane fetali di placentate a termine.

La placenta umana è, infatti, una ricca fonte di cellule staminali mesenchimali; è un organo temporaneo espulso al termine della gravidanza ed è composto da tessuti materni (decidua parietale e basale) e fetali (corion ed amnios) (Fig.I.5.2).



**Fig.I.5.2:** Schema delle membrane che compongono la placenta (da [196]).

X. Zhang e collaboratori [195] descrivono la presenza di MSC nella placenta senza specificarne l'origine (fetale o materna); P.S. In 'tAnker e collaboratori [196] hanno mostrato che l'amnios è una fonte di MSC di origine fetale, mentre le decidue di MSC materne. Le cellule provenienti dall'amnios e dal corion (FMhMSC) mostrano un profilo fenotipico e di espressione genica paragonabile alle MSC e la positività a marker neuronali, polmonari, di adesione e della migrazione [197].

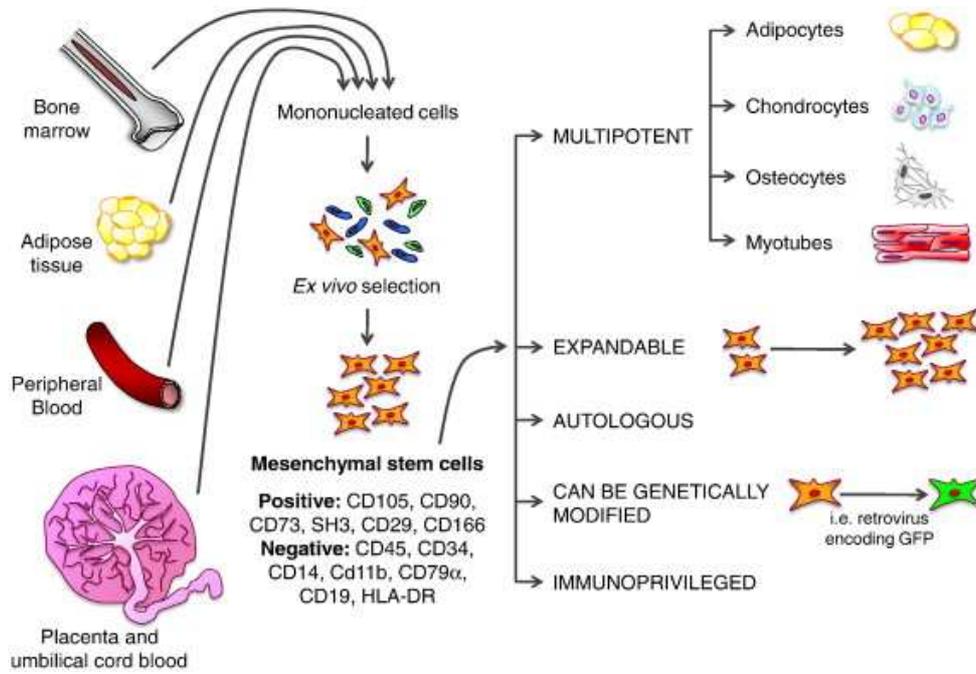
Le FM-hMSC non inducono proliferazione linfocitaria allogenica o xenogenica e sopprimono attivamente la risposta linfocitaria. Inoltre, il trapianto di FM-hMSC in suini e ratti neonati ha avuto come risultato un microchimerismo umano in vari organi e tessuti [197]. Le FMhMSC potrebbero, quindi, essere utilizzate per trapianti allogenici, senza bisogno di raccogliere midollo osseo dai pazienti riceventi, risolvendo in questo modo le problematiche legate alla resa di staminali e all'invasività del metodo di raccolta.

## **I.5.5 – MSC e terapia cellulare**

Grazie alla disponibilità di fonti da cui possono essere raccolte, alla facilità di selezione ed espansione e alle caratteristiche di multipotenzialità e immunomodulazione le MSC rappresentano un'importante prospettiva per la terapia cellulare autologa e allogenica di molte malattie (Fig.I.5.3), tra le quali anche le cardiopatie.

In particolare, potrebbe essere utile approfondire lo studio dell'utilizzo di FMhMSC in area cardiologica: queste cellule, infatti, opportunamente stimolate, hanno mostrato di

poter differenziare in elementi cardiovascolari in grado di migliorare la funzionalità ventricolare in ratti sottoposti ad infarto sperimentale [198].



**Fig.I.5.3: Caratteristiche delle MSC che le rendono candidate ideali per la terapia cellulare (da [199]).**

## I.6 – Terapia cellulare

Malgrado le attuali strategie terapeutiche mediche e chirurgiche abbiano aumentato con successo l'aspettativa di vita dei pazienti colpiti da eventi ischemici, quali l'infarto miocardico, si è ancora ben lontani dalla prevenzione del rimodellamento cardiaco e della conseguente insufficienza cardiaca congestizia [200].

Le terapie standard attualmente in uso per il trattamento dell'insufficienza cardiaca non sono in grado di impedire del tutto l'aggravarsi dello stato di salute di un cuore altamente danneggiato e sottoposto allo stress di sostenere il fabbisogno circolatorio di un intero organismo, riescono solo a ritardare la progressione della malattia [201].

Inoltre esiste un sostanziale numero di pazienti affetti da cardiopatia ischemica refrattari alle terapie attuali per i quali mancano altre opzioni terapeutiche (ad es. pazienti con angina pectoris e nessuna opzione di rivascolarizzazione tramite angioplastica coronarica o bypass aorto-coronarico).

L'unica terapia in grado di ristabilire completamente la funzionalità a lungo termine è il trapianto di cuore, ma non può essere preso in considerazione come terapia usuale visto l'esiguo numero di donatori, il rischio chirurgico e di complicanze legate alla possibilità di rigetto.

Si determina così una popolazione sempre più consistente di pazienti cronicamente malati e destinati a veder degenerare le proprie condizioni [202, 203] che graveranno con costi socio-economici sempre maggiori sui servizi sanitari già finanziariamente provati [204].

Secondo la medicina rigenerativa una possibile soluzione del problema potrebbe essere offerta da un approccio di terapia cellulare attuata mediante cellule staminali e/o progenitrici, che consiste nella somministrazione di cellule nell'area di miocardio danneggiato o perso al fine di rigenerare il tessuto miocardico e ristabilire la funzionalità cardiaca.

La terapia cellulare interviene laddove non può agire nessuna delle terapie abituali, contrastando la causa primaria del processo di rimodellamento cardiaco: la perdita di cardiomiociti e di cellule vascolari nella regione infartuata.

La terapia cellulare cardiaca ha fornito, fin dall'inizio, promettenti risultati a livello di studi preclinici *in vitro* e *in vivo* e oggi è un campo della ricerca di base e clinica in continua espansione [199].

In approcci sperimentali di trapianto cellulare sono stati utilizzati vari tipi di cellule, da quelle differenziate alle staminali [205-209].

Tra le cellule staminali, anche le MSC sono state ampiamente studiate in vari modelli animali di differenti specie: dai più usati topo [210] e ratto [211-213] a quelli di grossa taglia come il maiale [214-216].

Il trapianto, in seguito a infarto miocardico, di MSC espanse *ex-vivo* ha mostrato di poter ridurre la dimensione dell'area danneggiata e della cicatrice, di promuovere l'angiogenesi e di migliorare il recupero funzionale e strutturale del cuore infartuato [210-216].

### **I.6.1 – Meccanismo d'azione delle MSC nella sede di danno**

La rigenerazione miocardica e vascolare tramite transdifferenziamento delle MSC trapiantate in cardiomiociti e in cellule del *lineage* vascolare è il meccanismo d'azione principale originariamente proposto per spiegare l'azione terapeutica delle MSC in modelli di cardiopatia ischemica [180, 210-212, 214, 217].

Sebbene le MSC impiantate abbiano mostrato di esprimere marker di differenziamento cardiomiocitario ed endoteliale, c'è disaccordo nell'attribuire i processi riparativi cardiovascolari, osservati in seguito all'iniezione di staminali nei cuori infartuati, all'effetto del transdifferenziamento delle MSC impiantate [180, 218-221], soprattutto perchè a tutt'oggi non si è riusciti a determinare un attecchimento permanente delle MSC trapiantate nel miocardio ospite [222].

Un ampio numero di dati, invece, supporta l'ipotesi che meccanismi paracrini mediati da fattori prodotti e rilasciati dalle MSC siano responsabili dei processi riparativi osservati dopo il trapianto di staminali nei cuori infartuati [276, 277, 279-281, 267].

Prova dell'esistenza di un meccanismo paracrino alla base della cardioprotezione indotta dalle MSC è data da una serie di esperimenti che mostrano come i soli medium condizionati delle cellule staminali proteggano cellule cardiache dal danno da ischemia/riperfusion.

I medium condizionati delle cellule staminali hanno mostrato un effetto preconditionante pre-ischemico [226, 227] e di conferire protezione durante il danno da

---

ischemia/riperfusion sia al momento dell'ischemia [228], che della riperfusion [229, 230].

S.-C. Hung e colleghi hanno rilevato che medium condizionati di MSC umane possono proteggere cellule endoteliali umane dell'aorta da apoptosi indotta dall'ipossia e da morte cellulare e che la cardioprotezione è in parte collegata alla presenza di fattori anti-apoptotici e pro-angiogenici nei medium condizionati delle cellule staminali. Questi ricercatori suggeriscono anche che la protezione indotta dai medium condizionati sia il risultato dell'attivazione della via di segnale della PI3K [228].

Questi risultati sono in linea con quelli di L. Timmers e colleghi, che hanno mostrato la cardioprotezione indotta da medium condizionati in un modello suino di ischemia/riperfusion miocardica [229], e di D. Angoulvant e colleghi, i quali hanno dimostrato che sia le MSC sia i medium condizionati delle MSC da soli sono in grado di attenuare *in vitro* e *ex vivo* il danno da riperfusion miocardica. Anche in questo caso l'azione dei medium condizionati risultava collegata all'attivazione della PI3K [230].

I meccanismi che mediano gli effetti cardioprotettivi dei fattori paracrini agiscono su diversi livelli. Citochine, fattori di crescita e altre molecole secrete dalle MSC possono:

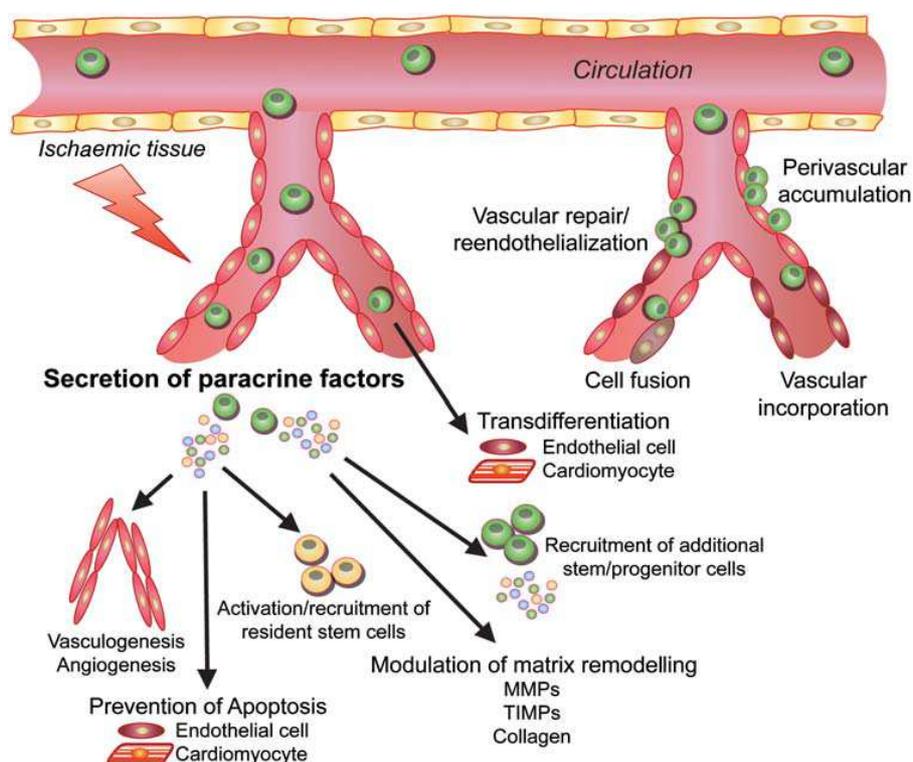
- favorire la neovascolarizzazione del miocardio ischemico [220, 221, 231];
- favorire la citoprotezione e la rigenerazione cardiaca endogena [219, 220, 229]:  
nel 2007 W. Dai e colleghi hanno mostrato che iniettando terreno contenente fattori cellulari secreti dalle MSC era possibile migliorare la rigenerazione miocardica post-infartuale nei ratti, sebbene l'effetto protettivo fosse più marcato con l'iniezione diretta delle cellule [232];
- intervenire nei processi infiammatori e fibrogenici post-infartuali:  
S. Ohnishi e colleghi hanno dimostrato gli effetti paracrini antifibrotici delle MSC attraverso la regolazione della sintesi di collagene e della proliferazione dei fibroblasti cardiaci [233];
- favorire la ripresa della contrattilità cardiaca e del metabolismo cardiaco.

Inoltre, anche alcuni degli effetti immunomodulatori delle MSC risultano dovuti a meccanismi paracrini [234].

Le MSC potrebbero, però, proteggere i cardiomiociti anche attraverso meccanismi diversi da quello paracrino - ad es. con il contatto cellula-cellula e/o con la secrezione di fattori di crescita solo in seguito a contatto diretto con le cellule danneggiate - come suggerito da D. Angoulvant [230] e A. Cselenyák e colleghi [235]. Ulteriori studi sono necessari per definire meglio questi meccanismi alternativi.

Ricerche precliniche hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali sono efficaci per la ripresa strutturale e funzionale del cuore infartuato promuovendo sia la riparazione del miocardio sia la rigenerazione vascolare, con aumento della densità capillare e miglioramento della riperfusione tissutale.

Il meccanismo proposto per illustrare l'azione cardioprotettiva della terapia cellulare è il seguente (Fig.I.6.1): in risposta a stimoli locali le cellule staminali sono richiamate nella sede di danno dove agiscono in parte differenziando in elementi cardiovascolari ma, soprattutto, secernendo fattori che alterano l'ambiente ischemico. Questi fattori esercitano un'azione paracrina su diversi tipi di cellule cardiache, promuovendo la protezione, la riparazione e la rigenerazione del tessuto. I fattori secreti agiscono anche in modalità autocrina regolando la capacità autoproliferativa e la capacità di espansione delle cellule staminali.



**Fig.I.6.1: Meccanismo proposto per illustrare l'azione della terapia cellulare (da [236]).**

Gli effetti benefici del trapianto cellulare sulle funzioni cardiache così dimostrati hanno portato all'attuazione di vari trial clinici sull'uomo.

## I.6.2 – Terapia cellulare: trial clinici sull'uomo

In una dettagliata *review* del 2011 J. Tongers e colleghi riepilogano le conoscenze acquisite grazie a trial clinici (in Fig.I.6.2 i più importanti) riguardanti il potenziale della terapia cellulare in medicina rigenerativa cardiovascolare [236].

	Bone marrow-derived cells			Circulating/mobilized stem/progenitor cells	Mesenchymal stem cells/adipose tissue-derived stem cells	Resident cardiac stem cells (cardiospheres)	Skeletal myoblasts
	Unselected	CD133+	CD34+				
<b>Completed trials</b>	ASTAMI Boost Cao <i>et al.</i> FINCELL HEBE Jannsen <i>et al.</i> MYSTAR Ramshorst <i>et al.</i> Repair-AMI	Bartunek <i>et al.</i>	Regent	ACT34-CMI TOPCARE-AMI TOPCARE-CHD	Hare <i>et al.</i>	n/a	MAGIC
<b>Ongoing trials</b>	Boost-2 SWISS-AMI TIME/Late TIME Cellwave REGENERATE-IHD FOCUS ... and others	SELECT-AMI Cardio-133		ENACT-AMI MAGIC Cell 5	PROMETHEUS C-Cure Prochymal® TAC-HFT Kastrup <i>et al.</i> APOLLO PRECISE ... and others	CADUCEUS SCIPIO	MARVEL

Fig.I.6.2: Elenco dei più importanti trial clinici di terapia cellulare effettuati fino al 2011 (da [236]).

### I.6.2.1 – Trial clinici con cellule staminali midollari non selezionate

Le cellule mononucleate del midollo osseo non selezionate (hBMC o *human bone marrow derived stem cell*, hBMSC), che contengono diverse popolazioni cellulari tra cui cellule ematopoietiche (HSC), cellule progenitrici endoteliali (EPC), cellule staminali mesenchimali (MSC), ecc. sono state sicuramente il tipo cellulare più esaminato negli studi clinici riguardanti la terapia cellulare cardiaca (Fig.I.6.2), con una esperienza di *follow-up* che arriva fino ai 5 anni per alcuni trial [236, 237].

Dopo che i primi studi clinici hanno determinato la sicurezza e la fattibilità dell'infusione di BMC in seguito a infarto acuto del miocardio [238-241] diversi studi di media grandezza randomizzati, alcuni con controllo placebo, hanno generato dei risultati misti.

A breve distanza - 4-6 mesi - dal trapianto cellulare i trial REPAIR-AMI (*Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction*) e BOOST (*BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration*) hanno mostrato un miglioramento nella funzionalità cardiaca [242, 243].

Inoltre, gli studi di Y. Tayyareci e colleghi hanno indicato un ruolo primario per l'angiogenesi e la neovascolarizzazione nella terapia cellulare [244]. Contrariamente a questi dati, altri due importanti trial non hanno riportato un miglioramento significativo nella funzionalità del ventricolo sinistro dopo 4-6 mesi di *follow-up* [245, 246], malgrado in uno degli studi si sia comunque osservata una riduzione nella dimensione dell'infarto 4 mesi dopo il trapianto intracoronarico delle cellule [245].

Per quanto riguarda la valutazione degli effetti della terapia a lungo termine, i dati sul *follow-up* del trial REPAIR-AMI hanno mostrato che a 12 mesi dal trapianto era presente una riduzione significativa degli eventi avversi cardiovascolari post-infartuali [247], una osservazione che è stata confermata fino ai 2 anni di *follow-up* [248].

Il trial BOOST, invece, mostrava che la differenza nella frazione di eiezione del ventricolo sinistro (*left ventricle-ejection fraction*, LV-EF) tra i gruppi non era più significativa dopo 18 mesi [249], malgrado uno studio ecocardiografico avesse rivelato un miglioramento persistente della funzione diastolica riconducibile alla somministrazione di BMC [250]. Similmente, dopo 5 anni non si rilevavano benefici sulla funzionalità sistolica e diastolica del ventricolo sinistro dopo una singola infusione di BMC [251]. Analisi dei sottogruppi hanno, però, rivelato che i pazienti con una funzionalità ventricolare maggiormente colpita possono avere benefici dal trattamento con BMC rispetto a pazienti in cui la funzionalità ventricolare post-infartuale era maggiormente preservata.

A differenza del trial BOOST, nello studio clinico controllato non randomizzato BALANCE, a 5 anni di *follow-up*, le misurazioni emodinamiche della funzionalità e della morfologia del ventricolo sinistro, della contrattilità, della dimensione dell'infarto, della capacità di compiere esercizi e la mortalità sono risultate migliori nei pazienti trattati con BMC rispetto al gruppo di controllo [252].

### **I.6.2.2 – Trial clinici con cellule staminali mesenchimali**

Studi specifici sull'utilizzo di MSC selezionate sono rimasti indietro rispetto a trial che hanno utilizzato cellule staminali midollari autologhe non frazionate (al cui interno, anche se in quantità minori, sono comunque presenti le MSC) e i dati clinici sono più scarsi [236].

Il trapianto di MSC autologhe o allogeniche è, al momento, in studio. In particolare, sono attualmente alle fasi conclusive i trial APOLLO e PRECISE: due trial clinici volti

---

a determinare la sicurezza, la fattibilità e l'efficacia della terapia con MSC, isolate sul momento da tessuto adiposo (ADSC), in pazienti con infarto miocardico o cardiopatia ischemica cronica [236].

Per quanto riguarda gli studi fino ad oggi eseguiti, in un trial controllato randomizzato di fase I in doppio cieco, la somministrazione sistemica intravenosa di MSC allogene in pazienti infartuati non ha presentato problemi di sicurezza e ha mostrato di poter essere efficace per un periodo di 6 mesi [253]. Questi dati positivi sono, però, da considerare con cautela perché il passaggio a livello polmonare – inevitabile con questa modalità di somministrazione – delle MSC e di altri sottotipi di staminali può essere problematico a causa delle dimensioni delle cellule [254].

S.L. Chen e collaboratori hanno valutato con uno studio non randomizzato l'applicazione intracoronarica di MSC autologhe su 69 pazienti colpiti da infarto miocardico acuto e sottoposti ad angioplastica primaria entro le 12 ore successive all'insorgenza della patologia [255, 256]. A 3 e 6 mesi, i pazienti nel gruppo dei trattati mostravano miglioramenti nella frazione di sangue eiettata e nella dimensione dell'infarto definita con la PET. Non erano presenti differenze per quanto riguardava aritmia o mortalità. In questo trial veniva utilizzata una quantità di MSC molto alta ( $6 \times 10^{10}$  cellule). In un altro studio effettuato su pazienti con cardiopatia ischemica cronica, dove veniva utilizzata una dose minore di MSC ( $5 \times 10^6$  cellule), non è stato dimostrato un miglioramento della funzionalità del ventricolo sinistro, ma il trattamento con MSC aveva come conseguenza il miglioramento della capacità di esercizio nei pazienti e della sintomatologia dell'insufficienza cardiaca dopo 3 mesi [257].

### **I.6.2.3 – I risultati dei trial clinici**

Malgrado la discrepanza di risultati e gli effetti terapeutici abbastanza modesti indicati nei primi trial, le indicazioni delle associazioni di professionisti del settore non hanno bocciato la prospettiva dello sviluppo di una terapia cellulare. Già nel 2006 la Società Europea di Cardiologia, riconoscendo la necessità sempre presente di migliorare i trattamenti disponibili per il paziente e sulla base dei dati positivi sulla sicurezza dell'uso delle BMC, aveva indicato la necessità di svolgere ulteriori trial clinici controllati randomizzati adeguatamente grandi e potenti [258].

I dati sulla sicurezza e la fattibilità fino a cinque anni di *follow-up* dal trapianto cellulare mostrano che non ci sono problemi riguardanti l'uso di BMC negli studi clinici.

Le ragioni della discordanza riguardo l'efficacia effettiva dei trial non sono chiare, ma possono, probabilmente, essere ricondotte a differenze nel protocollo e nel disegno degli studi, inclusi il tempo trascorso tra la riperfusione e l'iniezione di cellule, il tipo, il numero e le tecniche di isolamento delle cellule, o il disegno del *follow-up* [236].

Anche la scelta del metodo di acquisizione degli indicatori della funzionalità cardiaca può influire sui risultati. La misura della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LV-EF) è l'indicatore principale dell'esito della terapia. Bisogna però tenere conto che non tutte le tecniche utilizzate per misurare la LV-EF vi riescono con la medesima accuratezza e che non c'è uniformità tra i trial analizzati riguardo la tecnica impiegata.

Per determinare se le diverse tecniche influissero sul risultato degli studi, J.H. Traverse e colleghi, in una meta-analisi del 2011, hanno analizzato 10 trial clinici controllati randomizzati in cui venivano somministrate per via intracoronarica BMC o placebo dopo PCI in pazienti infartuati. Tutti i trial presi in considerazione utilizzavano la risonanza magnetica cardiaca (cMRI), che è la tecnica che fornisce la misura più accurata per la LV-EF, i volumi ventricolari e la dimensione dell'infarto.

I risultati indicavano che il beneficio della somministrazione di BMC sulla LV-EF, sul volume LV e sulla dimensione dell'infarto era limitato, quando determinato con la tecnica della risonanza magnetica cardiaca (cMRI) [259].

### **I.6.2.3.1 – Efficacia dei trial clinici per la cardiopatia ischemica acuta**

Nel 2012 la Cochrane Library ha pubblicato una *systematic review* in cui vengono valutati criticamente i dati forniti da 33 trial controllati randomizzati riguardo all'efficacia della terapia cellulare con cellule staminali midollari autologhe in pazienti con infarto miocardico acuto.

I risultati di questa meta-analisi indicano che la terapia cellulare proposta non era associata a variazioni statisticamente significative nell'incidenza di mortalità o di ricadute.

Malgrado l'alto grado di eterogeneità osservata, i risultati della meta-analisi hanno indicato un modesto miglioramento nella funzionalità cardiaca globale, significativo sia a breve che a lungo termine. Si può riscontrare una correlazione positiva sia tra la dose di cellule infuse e la LV-EF misurata tramite risonanza magnetica, sia tra il momento in

cui vengono somministrate le cellule e la LV-EF misurata tramite angiografia ventricolare.

Gli autori hanno concluso che comunque, poiché in generale il tasso di mortalità in seguito a una riuscita rivascolarizzazione è molto basso, è necessario che vengano effettuati ulteriori studi che coinvolgano un maggior numero di partecipanti per determinare del tutto gli effetti clinici del trattamento. Bisogna inoltre ridurre l'eterogeneità osservata tra gli studi clinici e per fare ciò bisogna standardizzare la metodologia utilizzata, la dose cellulare, la formulazione del prodotto cellulare, il momento del trapianto e i criteri di eleggibilità del paziente. [260, 261].

#### **I.6.2.3.2 – Efficacia dei trial clinici per la cardiopatia ischemica cronica**

Per quanto riguarda i trial concernenti le cardiopatie ischemiche croniche, i dati sono un po' più scarni rispetto al trattamento dell'AMI. In una recente meta-analisi sono stati analizzati i dati di 10 trial clinici controllati randomizzati che includevano 422 pazienti con cardiopatia ischemica cronica trattati con BMC. Gli autori hanno rilevato che nei trial, a 6 mesi di *follow-up*, il trapianto di BMC migliorava la frazione di eiezione e riduceva i volumi sistolici e diastolici del ventricolo sinistro. Concludevano, poi, sostenendo che malgrado il risultato positivo fosse necessario eseguire ulteriori studi clinici a lungo termine coinvolgendo un numero maggiore di pazienti [262].

I risultati e le indicazioni di questa meta-analisi sono in linea con le analisi sugli effetti benefici della terapia cellulare nell'infarto miocardico acuto precedentemente riportate [260, 261].

## **I.6.3 – Limiti principali della terapia cellulare**

Nei successivi paragrafi verranno approfondite alcune delle cause dei limiti della terapia cellulare che sono state portate alla luce dalla mole di studi preclinici e clinici effettuati fino ad oggi.

### **I.6.3.1 – Scarse disponibilità, *engraftment* e sopravvivenza delle cellule staminali**

Per quanto riguarda la modesta efficacia della terapia cellulare, le attuali strategie terapeutiche permettono l'arrivo di un esiguo numero di cellule e una scarsa ritenzione (*engraftment*) e sopravvivenza delle cellule staminali nella sede di danno, un ambiente ostile caratterizzato da ischemia, acidosi e infiammazione.

Una delle maggiori limitazioni della terapia cellulare con cellule staminali autologhe è la scarsa disponibilità di cellule. Sono necessarie dalle due alle tre settimane per espandere *ex vivo* un numero sufficiente di MSC e le staminali provenienti da pazienti anziani o pazienti con patologie cardiache severe spesso mostrano un indebolimento delle proprietà biologiche [263, 264].

L'uso di MSC allogene permette di aggirare il problema della scarsa disponibilità di cellule autologhe [265] e l'utilizzo di medium condizionati delle MSC fornirebbe a sua volta un'alternativa sia al trapianto con cellule autologhe che allogene [228-230].

### **I.6.3.2 – Metodi di *delivery* delle cellule staminali**

La terapia cellulare con cellule esogene ha il grosso problema della biodisponibilità cellulare nella sede di danno che è influenzata, in primo luogo, dalla modalità con cui vengono somministrate (metodi di *delivery*) le cellule.

Le staminali infatti possono essere somministrate in tre diversi modi:

- *in situ* con l'iniezione diretta nel miocardio infartuato o perinfartuale;
- localmente con l'infusione coronarica;
- sistemicamente con l'infusione per via intravenosa.

Tutti e tre gli approcci hanno delle potenzialità ma non sono scevri da difetti.

Con l'iniezione intramiocardica le cellule possono essere iniettate nel miocardio dal lato epicardico, in pazienti che si sottopongono a rivascolarizzazione chirurgica, o dal lato endomiocardico, tramite procedura catetere guidata. È un metodo sicuramente invasivo ma che permette di iniettare *in situ* e in modo preciso le cellule, evitando il rischio di ostruzione vascolare, di ristenosi e della formazione di ateromi. Inoltre, l'iniezione delle cellule nella zona perinfartuale può fornire un effetto terapeutico ottimale. È anche un approccio particolarmente desiderabile quando si utilizzano cellule di relativamente grandi dimensioni quali le MSC poiché permette loro di evitare gli ostacoli che si incontrano a livello del microcircolo polmonare durante il trasporto nel flusso sanguigno.

Lo svantaggio di questa via di rilascio è rappresentato dal fatto che l'iniezione diretta nel miocardio, vitale o necrotico, è una procedura tecnicamente impegnativa e comporta alcuni rischi, ad es. perforazione ventricolare e aritmie [266]. Inoltre, l'iniezione porta a una distribuzione non omogenea di gruppi di cellule nel tessuto malperfuso [236].

Negli studi clinici, l'infusione intracoronarica è la via di rilascio più comune [267] ed è effettuata attraverso un catetere a palloncino da angioplastica, nella arteria coronarica collegata alla zona infartuata [238].

Questo approccio permette di ridurre la perdita di cellule staminali e di ottimizzare il tempo di contatto tra le cellule e la parete del vaso coronarico.

È considerata una procedura sicura, ma è stato riportato che un aumento della presenza di BMSC nel flusso coronarico può indurre ristenosi dell'arteria coronarica o microinfarti. Malgrado permetta di distribuire omogeneamente le staminali nell'area di danno, molte cellule possono non riuscire a raggiungere la zona infartuata [236, 267] poiché l'efficienza della migrazione è condizionata da un complesso processo multistep di adesione al vaso e trasmigrazione per permettere alle cellule infuse di invadere il tessuto. Inoltre, il richiamo (*homing*) delle cellule somministrate nella sede di danno dipende anche dalla chemoattrazione indotta da fattori secreti dal tessuto ischemico [268]. Anche il tempo trascorso dall'insulto ischemico può influire sul richiamo delle cellule nella sede di danno: V. Schachinger e colleghi hanno mostrato che, in pazienti colpiti da infarto miocardico acuto e sottoposti a infusione intracoronarica di cellule progenitrici circolanti (CPCs) proangiogeniche, la quantità di progenitori che rimaneva *in loco* diminuiva progressivamente con l'aumentare del tempo trascorso dall'infarto [269].

Il rilascio sistemico per via intravenosa è una strategia semplice, sicura e non invasiva che permette somministrazioni ripetute di grandi quantità di cellule. Considerata fin dall'inizio una terapia fattibile [270], rispetto alle altre due tecniche ha mostrato una resa modesta [271, 272]. Infatti, il passaggio a livello polmonare delle MSC e di altri sottotipi di staminali può essere problematico [254] e le cellule sono richiamate in gran parte in organi al di fuori della zona cardiaca, soprattutto nel fegato e nella milza [271, 272]. Comunque, nel 2009 un trial che arruolava 53 pazienti post-infartuati ha indicato che la somministrazione intravenosa sistemica di MSC umane è sicura ed ha fornito anche dei dati provvisori positivi sull'efficacia della terapia [253].

Fondamentale per gli sviluppi futuri della terapia cellulare è l'identificazione della via di somministrazione meno invasiva possibile e con il minor numero di controindicazioni per la salute del paziente che permetta, però, l'arrivo e l'insediamento di un numero adeguato di cellule nella zona da trattare.

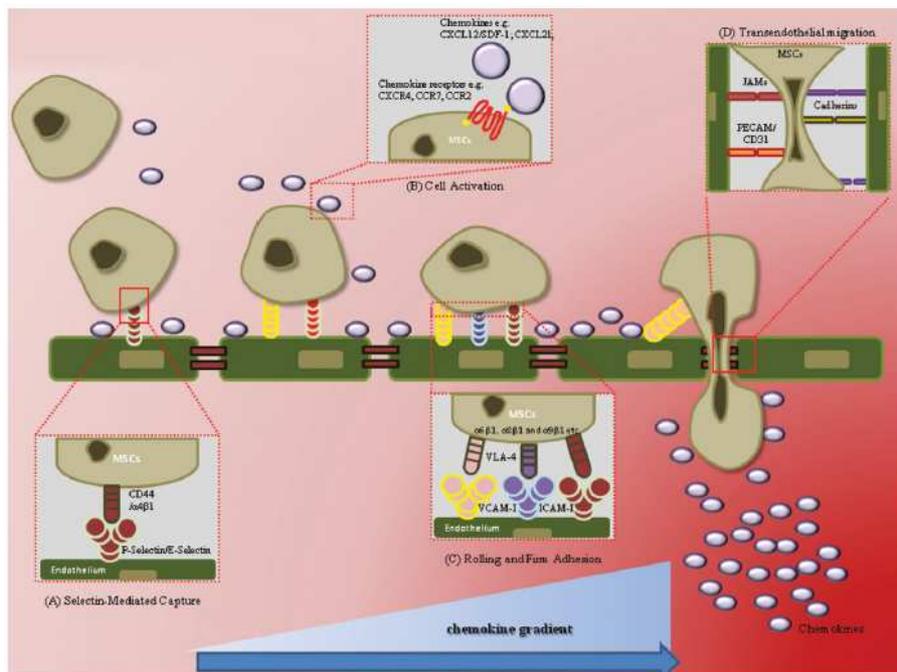
Al momento, nella comunità scientifica non vi è una netta presa di posizione a favore di una modalità rispetto alle altre, ma ora che i trial clinici stanno arrivando a periodi di *follow-up* consistenti si potranno eseguire molteplici analisi incrociate e determinare quale sia la tecnica più vantaggiosa. Ad esempio J. Brunskill e colleghi, nel 2009, hanno ricapitolato i dati di 21 trial clinici ed hanno concluso che la via di somministrazione utilizzata influenza l'effetto di MSC nel trattamento dell'infarto miocardico acuto e della cardiopatia ischemica cronica. Secondo la loro analisi la funzionalità cardiaca risulta significativamente migliore quando le cellule sono somministrate con l'iniezione intramiocardica rispetto all'infusione intracoronarica [273].

### **I.6.3.3 – *Homing* delle cellule staminali**

Un altro punto chiave della terapia cellulare con cellule staminali, sia endogene che esogene, è la mobilitazione/il richiamo verso la sede di danno, un fenomeno chiamato *homing*.

I meccanismi molecolari dell'*homing* delle MSC non sono stati chiariti completamente: si ritiene che le MSC, così come le HSC e i leucociti, abbiano la capacità di migrare attraverso il flusso sanguigno sotto la guida di stimoli chemoattrattivi e aderiscano e si infiltrino all'interno del tessuto con meccanismi simili a quelli dei leucociti nelle aree infiammatorie [274].

Le principali responsabili degli stimoli chemotattici a cui rispondono vari tipi cellulari tra cui leucociti, HSC, MSC ecc. sono le chemochine. Con il termine chemochine (*chemokines*) si indica una sottofamiglia delle citochine, composta da proteine a basso peso molecolare con una forte omologia di struttura, che agiscono attraverso specifici recettori accoppiati a proteina G. Il loro nome deriva dalla fusione dei due termini *chemotactic cytokines* e prende spunto dalla principale abilità che le contraddistingue: richiamare con uno stimolo chemotattico cellule responsive (cellule che esprimono sulla superficie cellulare i recettori delle chemochine) (Fig.I.6.3).



**Fig.I.6.3: Meccanismo proposto per l'homing delle MSC verso il sito di danno (da [275]).**

Attualmente sono state individuate più di cinquanta chemochine e venti recettori delle chemochine [276] (Tab.I.6.1).

Le chemochine vengono suddivise in quattro classi in base al numero e alla posizione dei residui di cisteina responsabili della formazione di ponti disolfuro che sono collocati nella regione NH<sub>2</sub>-terminale: la famiglia C in cui è presente un solo residuo di cisteina, la famiglia CC che ne possiede due adiacenti, la famiglia CXC dove i due residui di cisteina sono separati da un qualsiasi amminoacido e la famiglia CX<sub>3</sub>C dove i residui tra le cisteine sono tre (Fig.I.6.4) [277].

Tab.I.6.1: Chemochine e recettori delle chemochine.

Famiglia	Recettore	Chemochina ligando
<b>Chemochine C</b>	XCR1	XCL1, XCL2
<b>Chemochine CC</b>	CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/CCL10, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
	CCR2	CCL2, CCL7, CCL11, CCL12, CCL13, CCL16
	CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28
	CCR4	CCL17, CCL22
	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16
	CCR6	CCL20
	CCR7	CCL19, CCL21
	CCR8	CCL1, CCL16
	CCR9	CCL25
	CCR10	CCL27, CCL28
<b>Chemochine CXC</b>	CXCR1	CXCL6, CXCL8
	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
	CXCR3	CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11
	CXCR4	CXCL12
	CXCR5	CXCL13
	CXCR6	CXCL16
	CXCR7	CXCL11, CXCL12
<b>Chemochine CX<sub>3</sub>C</b>	CX <sub>3</sub> CR1	CX <sub>3</sub> CL1

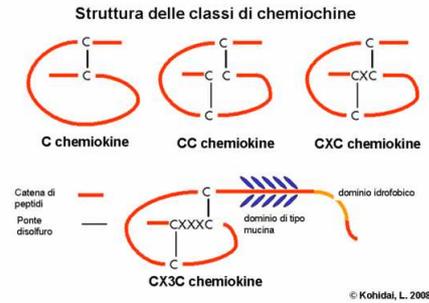


Fig.I.6.4: Struttura delle chemochine (©Kohidai, L. 2008).

Vari studi preclinici hanno mostrato che il miocardio ischemico è capace di attrarre le BM-MSC [278]. Infatti, l'induzione delle chemochine è una delle caratteristiche principali del miocardio post-infartuato [278-280].

La sovraregolazione di molte citochine è transiente e i livelli di solito calano entro 72 ore dall'infarto [278, 279]. Questo schema di espressione delle chemochine è coerente con i tempi dell'*homing* delle MSC, dal momento che si dirigono attivamente nel tessuto miocardico subito dopo l'evento ischemico [281].

Gli stimoli proinfiammatori, che sono parte integrante dell'ambiente ischemico, sono in grado di regolare l'espressione delle chemochine e dei loro recettori in vari tipi cellulari [282-284], tra cui le MSC umane [285].

Inoltre, citochine proinfiammatorie quali TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , sono in grado di potenziare *in vitro* l'azione di mobilitazione esercitata dalle chemochine sulle MSC [285, 286].

Sono sempre più numerose le ricerche che dimostrano la presenza di recettori delle chemochine sulla superficie cellulare delle MSC e che provano direttamente, con saggi *in vitro*, che numerose chemochine (tra cui, ad esempio, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, CX<sub>3</sub>CL1/Fractalchina ecc...) sono in grado di richiamare cellule staminali mesenchimali [285-291].

In una recente *review* Y. Wu e R.C.H. Zhao [292] analizzano il ruolo delle chemochine e dei loro recettori nell'*homing* delle cellule staminali mesenchimali verso

il miocardio danneggiato e pongono, in particolare, l'accento sull'importanza dell'azione dei recettori CCR1 e CCR2 per la mobilitazione e l'integrazione delle MSC nel tessuto ischemico miocardico.

I due ricercatori indicano, però, che anche altre chemochine che attivano recettori diversi da CCR1 e CCR2 – quali, ad esempio, CCL25/TECK [293] e CX<sub>3</sub>CL1/Fractalchina [289, 294] – sono molto probabilmente coinvolte nel reclutamento delle MSC nel miocardio ischemico [292].

Riuscire a potenziare anche i meccanismi di *homing* delle cellule staminali è quindi molto importante per aumentare l'efficacia della terapia cellulare.

## I.7 – Strategie combinate per potenziare la terapia cellulare

La terapia cellulare cardiaca potenzialmente può avere effetti benefici ma è importante approfondirne, con studi a lungo termine, la sicurezza e l'efficacia. In particolare, riguardo all'efficacia, bisogna individuarne le debolezze e cercare di implementarla.

Le conoscenze fino ad oggi acquisite suggeriscono che per superare le problematiche della terapia cellulare sia necessario un approccio più complesso, che ricalchi maggiormente meccanismi biologici innati e potenzi le strategie attuali.

Servono soprattutto approcci che associno l'utilizzo delle staminali a meccanismi che potenzino le capacità naturali dell'organismo di richiamare le cellule e di permetterne l'inserimento e la sopravvivenza nell'area di danno. Infatti, l'*homing* e l'*engraftment* sono fondamentali per permettere alle cellule staminali di svolgere la loro funzione nel tessuto danneggiato, in particolare quando vengono infuse sistemicamente.

Stimoli ipossici, che caratterizzano il preconditionamento ischemico, sono stati proposti quale strategia terapeutica per migliorare la sopravvivenza e l'attecchimento delle cellule staminali [295, 296].

S.M. Chacko e colleghi hanno rilevato che MSCs di ratto sottoposte a ipossia per 24 e 48 ore esprimevano in modo ottimale proteine fondamentali per potenziare la sopravvivenza e l'*engraftment* delle cellule nel cuore infartuato. Gli autori hanno concluso sostenendo che i risultati da loro ottenuti fornivano indicazioni su possibili modalità di preparazione delle MSC, capaci di potenziare l'efficacia della terapia cellulare *in vivo* [295].

In uno studio del 2005 su un modello murino *in vivo*, Y.L. Tang e colleghi hanno mostrato, inoltre, che MSCs ingegnerizzate per over-esprimere, in contesto ipossico, il gene dell'eme ossigenasi-1 - uno degli effettori attivati durante la fase tardiva del preconditionamento ischemico - mostravano una maggiore sopravvivenza e vitalità nel cuore ischemico [296].

Altri gruppi di ricerca [297, 298] hanno dimostrato che la cardioprotezione conferita dall'IPC è collegata anche alla mobilitazione di cellule staminali e alla produzione di citochine cardioprotettive che potenziano la ripresa in seguito a danno da ischemia/riperfusion e a ischemia cronica.

Sia durante la fase precoce che tardiva dell'IPC, cellule staminali sono state mobilitate dal midollo osseo verso il sito di danno, attraverso il flusso sanguigno, probabilmente attratte dalla secrezione di citochine ed altre sostanze chemoattrattive da parte dell'organo danneggiato.

Ii e colleghi, utilizzando un modello murino *in vivo*, hanno determinato che uno stimolo ischemico preconditionante classico poteva reclutare nel miocardio cellule progenitrici endoteliali (EPC) di derivazione midollare entro tre ore e che queste cellule "importavano" mediatori cardioprotettivi, quali iNOS ed eNOS, nell'area di danno [297].

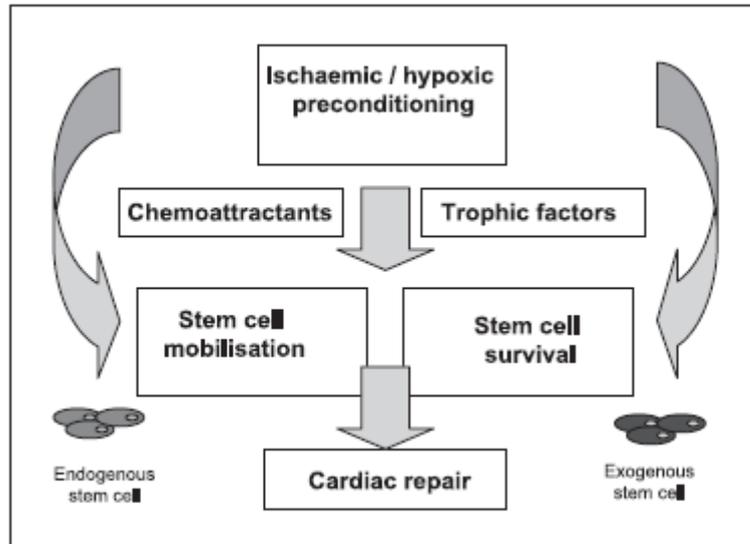
Nell'uomo, inoltre, è stato dimostrato, sottoponendo dei volontari per un mese a ripetuti cicli di ischemia riperfusione nel braccio (precondizionamento ischemico remoto), un aumento delle EPC circolanti e un miglioramento della funzione endoteliale [299], ma il contributo delle EPC al miglioramento della funzione endoteliale non è stato ancora chiarito del tutto.

In uno studio successivo, T. Kamota e collaboratori hanno dimostrato, tramite un modello murino *in vivo* di preconditionamento ischemico remoto, che l'IPC ha effetti benefici. I ricercatori hanno infatti rilevato la riduzione della dimensione dell'infarto e la preservazione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro. Durante la fase precoce aumentavano i livelli sierici di VEGF e di SDF-1 $\alpha$ , ma durante la fase tardiva si verificava un aumento dei livelli periferici di cellule staminali CD34+ e CD34+/flk-1+ e un accumulo di cellule staminali del midollo osseo nella zona a rischio ischemico [298]. Inoltre, l'utilizzo di anticorpi diretti contro le cellule staminali, aboliva anche gli effetti cardioprotettivi [298].

Gyöngyösi e colleghi [300] hanno mostrato, in un modello di infarto in un animale di grande taglia (il maiale), che l'IPC era in grado di promuovere la mobilitazione e il reclutamento di MSC e di HSC dal comparto circolante verso l'area infartuata e le zone di confine. Le MSC sembravano dirigersi più velocemente nelle zone danneggiate. Inoltre, durante la fase precoce dell'IPC hanno rilevato un aumento nei livelli di alcune citochine circolanti, tra cui VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

Questi studi forniscono potenziali implicazioni cliniche per la terapia cellulare cardiaca in quanto suggeriscono che il preconditionamento ischemico, al pari di strategie quali la somministrazione di citochine esogene [301], possa promuovere la mobilitazione e l'integrazione di cellule staminali in aree ischemiche.

Il trattamento con IPC, quindi, non solo è in grado di proteggere il miocardio dall'insulto ischemico, ma può fornire anche una nuova strategia per potenziare l'efficacia della terapia cellulare cardiaca, promuovendo la mobilitazione di cellule staminali endogene - che risultano diminuite e indebolite nei pazienti con malattie cardiovascolari [264] - e migliorando l'*engraftment* e la sopravvivenza di cellule staminali esogene trapiantate (Fig.I.7.1).



**Fig.I.7.1:** Schema riepilogativo dei potenziali effetti del condizionamento ischemico nel promuovere la terapia cellulare (da [302]).

## II – SCOPO DELLA TESI

Le cardiopatie a carattere ischemico rappresentano una delle principali cause di invalidità e mortalità a livello mondiale. Una delle forme più importanti di cardiopatia ischemica è l'infarto acuto del miocardio, il cui punto focale è rappresentato dal danno da ischemia/riperfusione (I/R). Durante l'ischemia, la mancanza di ossigeno e di nutrienti veicolati dal sangue causa perdita diretta di cardiomiociti e crea le premesse per cui al ristabilirsi della circolazione, durante la riperfusione dell'organo, insorgono infiammazione e stress ossidativi. In questo modo i cardiomiociti sopravvissuti subiscono un danno ulteriore e la situazione dell'area infartuata si aggrava.

La risposta del miocardio all'ischemia/riperfusione può essere manipolata per contrastare il danno ischemico. Esponendo il cuore a brevi cicli di ischemie subletali prima di un danno ischemico prolungato, è possibile conferire una profonda resistenza all'infarto, un fenomeno chiamato preconditionamento ischemico (IPC).

L'esposizione a questo tipo di stress, infatti, pone il cuore in uno stato di difesa che gli permette di contrastare l'evento ischemico.

Recentemente è stato dimostrato che l'azione del preconditionamento ischemico potrebbe coinvolgere anche cellule staminali: stimoli ipossici, che caratterizzano l'IPC, sono stati proposti quale strategia terapeutica per migliorare la sopravvivenza e l'attecchimento delle staminali [295, 296]. Inoltre è stato dimostrato che la cardioprotezione conferita dall'IPC è collegata anche alla mobilitazione di cellule staminali e alla produzione di citochine cardioprotettive che potenziano la ripresa in seguito al danno da ischemia/riperfusione e all'ischemia cronica [297, 298].

La terapia cellulare cardiaca mediante cellule staminali potenzialmente può avere effetti benefici ma è importante approfondirne, con studi a lungo termine, la sicurezza e l'efficacia.

Le conoscenze fin'ora acquisite suggeriscono che la cellula staminale da sola non sia sufficiente e che per superare le problematiche della terapia cellulare servano approcci che associno l'utilizzo delle staminali a meccanismi che potenzino le capacità naturali dell'organismo di richiamarle (*homing*) e di permetterne l'inserimento e la sopravvivenza nell'area di danno (*engraftment*).

Il trattamento con IPC, non solo è in grado di proteggere il miocardio dall'insulto ischemico, ma potrebbe fornire una nuova strategia per potenziare l'efficacia della

---

terapia cellulare cardiaca, promuovendo la mobilitazione e migliorando l'*engraftment* e la sopravvivenza di cellule staminali endogene ed esogene trapiantate.

Malgrado i promettenti risultati in termini di cardioprotezione il preconditionamento ischemico non è risultato facilmente trasferibile nella pratica clinica, per problemi legati alla tempistica e all'invasività della procedura. Per questo motivo, fin dalla scoperta dell'IPC, si sono studiati molto i meccanismi che la caratterizzano per identificare sostanze che attivino le medesime (o equivalenti) vie di segnale da utilizzare come terapia farmacologica.

È un fatto ampiamente associato che gli oppioidi e i corrispondenti recettori abbiano una robusta azione cardioprotettiva e siano coinvolti nel preconditionamento ischemico, pertanto possono essere considerati candidati ideali per lo sviluppo di una strategia terapeutica farmacologica alternativa all'IPC.

Lo scopo di questa tesi è di verificare se il condizionamento, in particolare il preconditionamento, di cardiomiociti con ligandi endogeni o agonisti sintetici dei recettori oppioidi:

- protegga le cellule dall'apoptosi causata da un ambiente ischemico ma
- possa anche indurre le cellule danneggiate a secernere fattori specifici per richiamare o modificare le caratteristiche di cellule staminali endogene e/o di altri elementi staminali esogeni che potrebbero essere trapiantati in sede di infarto.

Per testare questa ipotesi è necessario mettere a punto un modello cellulare di danno *in vitro* che ricrei il più fedelmente possibile il microambiente cardiaco "ischemico", su cui valutare se il trattamento con peptidi oppioidi conferisca alle cellule danneggiate protezione dall'apoptosi. In caso positivo si studierà l'interazione tra il modello di "microambiente ischemico", trattato o meno con gli oppioidi, e cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) che ne vengono a contatto. Si indagherà, in particolare, se gli oppioidi modificano la capacità delle cellule danneggiate di reclutare le hMSC e di influire sulla sopravvivenza o sulle caratteristiche cellulari di queste staminali.

Per ricreare il microambiente cardiaco "ischemico" si è deciso di lavorare con cardiomioblasti di ratto H9c2 e di danneggiarli con un approccio chimico, non potendo lavorare in assenza di ossigeno.

Gli oppioidi utilizzati sono i ligandi endogeni dei recettori  $\kappa$  e  $\delta$  oppioide (rispettivamente Dinorfina B e Met-Enkefalina) e DADLE, agonista sintetico del recettore  $\delta$  oppioide.

Dinorfina B è un peptide oppioide che ha mostrato d'essere coinvolto nell'organogenesi cardiaca attraverso una complessa serie di meccanismi intracrinici [109, 308]; Met-Enkefalina e DADLE sono due oppioidi la cui azione cardioprotettiva è ben consolidata [43, 131, 132, 149, 154].

Le cellule staminali impiegate sono le FMhMSC, cellule staminali mesenchimali umane provenienti da membrane fetali.

## III – MATERIALI E METODI

### III.1 – Colture cellulari

#### III.1.1 – H9c2

La linea cellulare H9c2 (2-1), composta da cellule embrionali di ratto di derivazione cardiaca (ampiamente utilizzate in simulazioni di danno ischemico *in vitro* [303-305]), è stata fornita dalla ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). In condizioni normali le H9c2 sono coltivate in terreno completo (“TC H9c2”) composto da DMEM *High Glucose* (DMEM Hg, *Dulbecco’s modified Eagle’s medium* con 4,5 g/L di glucosio, LONZA) al 10% di FBS (siero fetale bovino, *Euroclone*), glutammina 2mM (LONZA) e 1% di un mix di penicillina (10000 UI/mL)/streptomicina (10000 UI/mL) (LONZA).

Le cellule subconfluenti (70-80% confluenza) sono staccate enzimaticamente con Tripsina 0,05%-EDTA 0,02% (LONZA) e seminate nei supporti alla concentrazione richiesta dai vari saggi.

#### III.1.2 – Cellule staminali mesenchimali umane derivate da membrane fetali (FMhMSC)

Le FMhMSC sono state gentilmente fornite dalla banca delle Cellule Staminali presso il Laboratorio di Ematologia Sperimentale, Università di Bologna.

In condizioni normali le FMhMSC sono coltivate in terreno completo (“TC FM”) composto da DMEM *Low Glucose* (DMEM Lg, *Dulbecco’s modified Eagle’s medium* con 1,0 g/L di glucosio, LONZA) al 10% di FBS (siero fetale bovino, *Euroclone*), glutammina 2mM (LONZA) e 1% di un mix di penicillina (10000 UI/mL)/streptomicina (10000 UI/mL) (LONZA).

Le cellule subconfluenti (70-80% confluenza) sono staccate con Tripsina 0,05%-EDTA 0,02% (LONZA) e seminate nei supporti alla concentrazione richiesta dai vari saggi.

## III.2 – Protocollo di induzione del danno

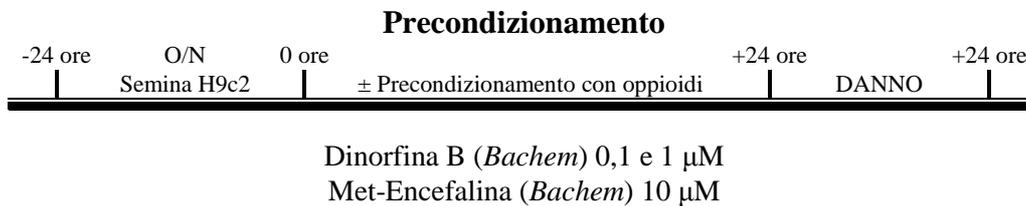
Per ricreare il più fedelmente possibile un microambiente cardiaco “ischemico” *in vitro*, non lavorando in ambiente privo di ossigeno, si è deciso di danneggiare chimicamente le H9c2 incubandole per 24 ore con un terreno di danno (indicato come “DANNO” negli esperimenti). Questo terreno è costituito da DMEM Hg senza due componenti fondamentali dei terreni di coltura, il siero e la glutammina, ma con l’aggiunta dell’inibitore del complesso I mitocondriale Rotenone (*Sigma-Aldrich*, alla concentrazione finale 0,5  $\mu\text{M}$ ), in modo da bloccare la catena respiratoria mitocondriale e impedirle di utilizzare ossigeno. Questa sostanza è stata già usata in passato in protocolli di simulazione di danno ipossico/ischemico [306, 307].

Il controllo positivo dell’apoptosi, negli esperimenti in cui è stata valutata l’entità del danno ottenuta con il modello *in vitro* ideato, è stato ottenuto trattando le H9c2 per 6 ore con Staurosporina (*Sigma-Aldrich*) 1  $\mu\text{M}$  in “TC H9c2”.

## III.3 – Protocolli di condizionamento

Per individuare il modello di condizionamento e, in secondo luogo, il peptide oppioide che conferisse la maggiore protezione alle cellule danneggiate sono stati testati tre diversi modelli di trattamento.

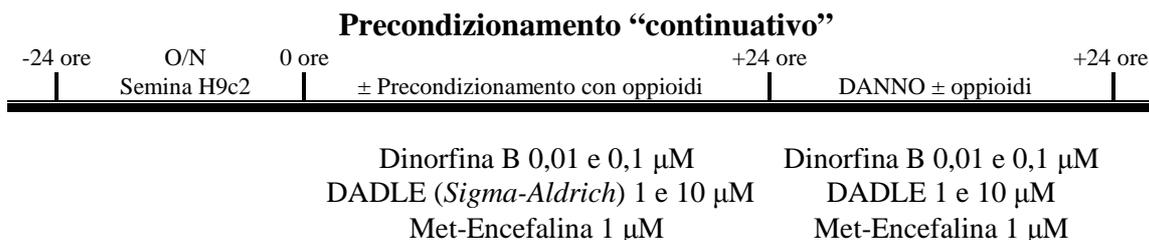
Le H9c2 sono state seminate e sono state lasciate aderire fino al giorno successivo (*overnight*, O/N). Sono quindi state trattate secondo lo schema temporale e con i peptidi oppioidi indicati nella figura III.1.A-C.



**Fig.III.1.A: Schema temporale precondizionamento e peptidi oppioidi testati.**



**Fig.III.1.B: Schema temporale percondizionamento e peptidi oppioidi testati.**



**Fig.III.1.C: Schema temporale precondizionamento “continuativo” e peptidi oppioidi testati.**

## III.4 – Protocollo creazione medium condizionati (MC)

Le H9c2 sono state seminate alla concentrazione di 7000/cm<sup>2</sup> in piastre petri da 6 cm di diametro (*BD Falcon*<sup>®</sup>) e sono state lasciate aderire O/N nei pozzetti. Le cellule sono state, poi, danneggiate e alcune sottoposte a protocollo di precondizionamento “continuativo” secondo lo schema temporale e con le sostanze indicate di seguito (Tab.III.1):

MC	DANNO	DADLE 1 µM	NLX 1µM/DADLE 1µM
<b><u>Impulso (1 ora):</u></b>			
Naloxone ( <i>Sigma-Aldrich</i> ) 1 µM			✓
↓			
<b><u>Precondizionamento (24 ore):</u></b>			
Naloxone 1 µM			✓
DADLE 1µM		✓	✓
↓			
<b><u>Impulso (1 ora):</u></b>			
Naloxone 1 µM			✓
↓			
<b><u>Trattamento (24 ore):</u></b>			
DANNO	✓	✓	✓
Naloxone 1 µM			✓
DADLE 1µM		✓	✓

**Tab.III.1: Schema trattamento per preparare i medium condizionati.**

---

Alla fine del trattamento, i surnatanti sono stati raccolti, filtrati utilizzando filtri da siringa con pori di 22  $\mu\text{m}$  di diametro (*Millipore*), aliquotati e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo.

## III.5 – Immunofluorescenza su cellule adese a vetrino

L'immunofluorescenza è una metodica che utilizza anticorpi per stabilire la presenza o meno di un antigene all'interno di un particolare compartimento cellulare o di un tessuto ed, eventualmente, la sua distribuzione anatomica.

Le H9c2 alla concentrazione di  $15000/\text{cm}^2$  sono state seminate su vetrini posti all'interno di piastre da 24 pozzetti (*Greiner bio-one CELLSTAR<sup>®</sup>*) e lasciate aderire O/N. Le cellule adese a vetrino sono state fissate con una soluzione di acetone-metanolo 1:1, permeabilizzate con sodio citrato 0,1% in tampone fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) e trattate con RNAsi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (*Sigma-Aldrich*) per evitare contaminazioni da RNA che potrebbero dare legami con il colorante nucleare DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, *Sigma-Aldrich*). In seguito le H9c2 sono state incubate con albumina di siero bovino 1% (BSA, *Sigma-Aldrich*) in PBS per saturare i legami aspecifici dell'anticorpo. Successivamente le cellule sono state marcate con un anticorpo primario non coniugato diretto contro l'antigene di interesse: sono stati utilizzati anticorpi policlonali primari di coniglio anti-recettore  $\delta$  oppioide (*Abcam*, diluito 1:1000), anti-recettore  $\kappa$  oppioide (*Novus Biologicals*, diluito 1:1000) e anti-recettore  $\mu$  oppioide (*Abcam*, diluito 1:1500).

Le cellule sono state, quindi, lavate con PBS e marcate con un anticorpo secondario di capra anti-anticorpo di coniglio (*Abcam*) coniugato con fluoresceina (FITC) e diluito 1:400. L'anticorpo secondario è stato lavato e i nuclei sono stati marcati con DAPI alla concentrazione di 0,05  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

Il vetrino con il campione così marcato è stato montato su un vetrino portaoggetto con il montante ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent (*Molecular Probes<sup>®</sup>*) e lasciato asciugare O/N. Il campione è stato osservato e fotografato al microscopio a fluorescenza (*Nikon*) o conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  al buio per successive analisi.

---

## III.6 – Saggio con Cristal violetto

La valutazione della crescita cellulare è stata effettuata mediante saggio con Cristal violetto, un colorante che si lega al DNA.

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 4000/cm<sup>2</sup> e lasciate aderire O/N. In seguito sono state trattate o meno secondo il protocollo di danno preso in esame per un lasso di tempo che va dalle 0 alle 48 ore. Alla scadenza del trattamento le cellule sono state fissate per 10 minuti con metanolo a freddo e poi colorate per un'ora a temperatura ambiente con Cristal violetto (*Sigma-Aldrich*) 0,1% sciolto in una soluzione acquosa al 25% di metanolo. In seguito, le cellule sono state lavate sotto acqua corrente per eliminare il colorante in eccesso e lasciate seccare. Una volta asciutte, sono state incubate O/N con una soluzione di Triton (*Sigma-Aldrich*) 0,2% in PBS per solubilizzare il cristal violetto. I valori di assorbanza (595nm) del colorante solubilizzato, direttamente proporzionali alla proliferazione, sono stati letti mediante spettrofotometro Opsys MR (*Dynex Technologies*).

I dati sono presentati come rapporto tra il valore medio di assorbanza di ogni campione rispetto al valore medio di assorbanza al tempo 0 ore.

## III.7 – Saggio con MTT

Il saggio MTT serve a determinare la proliferazione cellulare, la vitalità e la misurazione della citotossicità. Si basa sulla capacità delle cellule vitali di metabolizzare il sale di tetrazolio MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid*) - un sale di colore giallo - in cristalli di formazano, di colore viola. I sali di formazano, insolubili in soluzione acquosa, vengono sciolti con una soluzione apposita (10% SDS in HCl 0,01 M) e la soluzione colorata che ne risulta è quantificata usando uno spettrofotometro. L'assorbanza letta correla con il numero di cellule.

Le cellule, H9c2 o FMhMSC, sono state seminate in piastre da 48 pozzetti (*Thermo Scientific Nunc*) in 400 µL/pozzetto di volume finale, sono state lasciate aderire O/N e in seguito sono state trattate. Per i saggi di tossicità di 24 ore le cellule sono state seminate alla concentrazione di 7000/cm<sup>2</sup>, per le curve di crescita fino a 72 ore alla concentrazione di 4000/cm<sup>2</sup>. Alla scadenza del trattamento alle cellule sono stati aggiunti 40 µL/pozzetto di una soluzione di MTT 5 mg/mL in PBS e sono state lasciate

---

incubare a 37°C. Dopo 2.30 ore sono stati aggiunti 400 µL/pozzetto della soluzione di solubilizzazione. I campioni sono stati lasciati solubilizzare O/N a 37°C.

I valori di assorbanza del colorante solubilizzato, direttamente proporzionali alla proliferazione, sono stati letti mediante spettrofotometro Opsys MR (*Dynex Technologies*) a 595nm.

I dati sono presentati come rapporto tra il valore medio di assorbanza di ogni campione rispetto al valore medio di assorbanza di un campione di riferimento. Il campione di riferimento per i saggi di tossicità di 24 ore è il controllo (CTR), nelle curve di crescita il tempo 0 ore.

## III.8 – Saggio di Migrazione

Le capacità migratorie delle FM-hMSCs sono state testate mediante saggio di migrazione.

H9c2 sono state seminate alla concentrazione di 7000/cm<sup>2</sup> in piastre da 24 pozzetti compatibili con inserti per colture cellulari (*BD Falcon*) e sono state lasciate aderire O/N nei pozzetti. Le cellule sono state, poi, danneggiate e alcune sottoposte a protocollo di condizionamento “continuativo” con Dinorfina B 0,01 e 0,1 µM e DADLE 1 e 10 µM in un volume totale di 700 µL.

Alla fine delle 24 ore di danno, 25000 FMhMSC in 350 µL di DMEM Lg all’1% P/S sono state seminate nel lato interno di inserti per colture cellulari con membrana in PET con solco tracciato con pori da 8 µm (*BD Falcon*). Gli inserti sono stati inseriti nei pozzetti e le cellule sono state lasciate interagire con i diversi microambienti ischemici per 18 ore. Alla fine di questo periodo di migrazione le FMhMSC negli inserti sono state fissate con metanolo a freddo e, in seguito, colorate per 1 ora con Cristal violetto 0,1% sciolto in una soluzione acquosa al 25% di metanolo. Gli inserti sono stati quindi lavati e le cellule che non sono migrate e che si trovavano sul lato interno della membrana sono state rimosse con un cotton fioc. La membrana è stata completamente fotografata al microscopio invertito (Nikon eclipse TS100, *Nikon*) con ingrandimento 40x e sono state contate le staminali che attraverso i pori della membrana erano passate sul lato esterno che si affaccia verso le H9c2 danneggiate.

In ogni esperimento i dati sono presentati come rapporto tra il numero di cellule migrate in ogni microambiente rispetto ad un campione di riferimento, nel nostro caso il campione nel microambiente solamente danneggiato (DANNO).

---

## III.9 – Saggio di attivazione dell'enzima caspasi 3

La determinazione dell'apoptosi è stata effettuata tramite Saggio fluorimetrico di valutazione dell'attivazione dell'enzima caspasi 3 (*Sigma-Aldrich*).

Le caspasi sono una famiglia di proteasi coinvolte nei processi di morte cellulare, in particolar modo nell'apoptosi. La caspasi 3, una caspasi effettrice ed un enzima chiave della via apoptotica, è la caspasi più studiata nel mammifero e l'entità della sua attivazione è considerata indice dell'entità di apoptosi presente nel campione.

Per valutare l'attività dell'enzima si misura la quantità di peptide fluorescente (AMC) rilasciato in seguito all'idrolizzazione del substrato Ac-DEVD-AMC da parte della caspasi 3 attivata.

Le H9c2 alla concentrazione di 8000/cm<sup>2</sup> sono state seminate in fiasche per colture cellulari da 75 cm<sup>2</sup> (*SARSTEDT*) e lasciate aderire O/N. Poi sono state sottoposte ai diversi trattamenti. Alla scadenza di ogni trattamento le cellule sono state raccolte, lisate con il *lysis buffer* fornito dal kit e centrifugate a 14000 x g per 10–15 minuti a +4°C. I surnatanti sono stati raccolti e sono stati processati seguendo le indicazioni del protocollo del kit in micropiastre nere da 96 pozzetti con fondo trasparente (*BD Falcon*). La fluorescenza dei campioni (lunghezza d'onda di eccitazione 360 nm, di emissione 460 nm) è stata rilevata con un lettore di fluorescenza a piastre (*Wallac VICTOR2, Perkin Elmer*). La quantità di AMC rilasciata in ogni campione è stata determinata interpolando i valori di fluorescenza rilevati su una curva standard costituita da quantità definite di AMC ed è stata normalizzata in base alle proteine totali presenti nel lisato, quantificate con reagente di Bradford (*Sigma-Aldrich*).

I dati sono presentati come rapporto tra la media dei valori normalizzati di ogni campione rispetto alla media del valore normalizzato di un campione di riferimento, nel nostro caso il campione solamente danneggiato (DANNO).

## III.10 – Saggio di adesione

Le capacità adesive delle FM-hMSCs sono state testate mediante saggi di adesione.

FMhMSC sono state seminate alla concentrazione di 23000/cm<sup>2</sup> in piastre da 6 pozzetti (*Thermo Scientific Nunc*). Dopo 48 ore le cellule staminali sono state trattate con diversi

---

medium condizionati delle H9c2: MC DANNO, MC DADLE 1  $\mu\text{M}$  e MC NLX 1 $\mu\text{M}$ /DADLE 1 $\mu\text{M}$ . Per ricreare il più possibile le condizioni ambientali nei pozzetti della migrazione, i medium condizionati sono stati diluiti con DMEM Lg all'1% P/S in proporzione 2:1. Dopo 17 ore di trattamento le FMhMSC sono state staccate con una soluzione di EDTA 0,05% (*Sigma-Aldrich*) in PBS a 37° per 45 minuti e contate con camera di Burker. Le cellule sono state poi risospese nei MC, precedentemente utilizzati per l'incubazione e filtrati, in modo da ottenere una concentrazione finale di 20000 cellule/150  $\mu\text{L}$ .

Sono state poi seminate 20000 cellule/pozzetto in una micropiastra da 96 pozzetti (*Thermo Scientific Nunc*). I pozzetti erano stati precedentemente rivestiti O/N con 0,61  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  di fibronectina umana (*Sigma-Aldrich*) e lavati tre volte con PBS.

Per ogni trattamento la semina è stata in quadruplicato. Parallelamente a questi pozzetti del saggio (che chiameremo “pzt 1 ora”) sono stati seminati dei pozzetti di controllo per la quantificazione totale delle cellule seminate (“pzt 5.30 ore”), in triplicato.

Dopo un'ora di adesione i “pzt 1 ora”, sono stati lavati 2 volte con PBS per rimuovere le cellule non adese e sono stati incubati con 150  $\mu\text{L}$  di “TC FM” al 10% di soluzione MTT; dopo 3 ore di incubazione è stata aggiunta in volume uguale la soluzione di lisi dell'MTT.

Dopo 5.30 ore di adesione il terreno nei “pzt 5.30 ore” è stato sostituito (senza lavaggi con PBS) con 150  $\mu\text{L}$  di “TC FM” al 10% di soluzione MTT e si è proceduto come descritto precedentemente. I campioni sono rimasti O/N a 37°C e sono state lette le assorbanze allo spettrofotometro il giorno successivo.

Per ogni campione è stata calcolata la percentuale di cellule che hanno aderito in 1 ora rispetto alle totali seminate.

I dati sono presentati come rapporto tra la media della percentuale di adesione in ogni campione rispetto alla media della percentuale di adesione di un campione di riferimento, nel nostro caso il campione solamente danneggiato (DANNO).

### **III.11 – Valutazione dell'espressione genica**

Per studiare il profilo di espressione genica di una cellula sono necessarie metodiche di indagine molecolare che amplificano sequenze geniche di DNA. L'RNA non è utilizzabile in queste metodiche, per questo si effettua una retrotrascrizione,

ovvero la reazione che da uno stampo di RNA ottiene un filamento complementare di DNA (cDNA).

### **III.11.1 – Estrazione dell'RNA**

Le H9c2 sono state seminate alla concentrazione di 7000/cm<sup>2</sup> in petri da 6 cm di diametro (*BD Falcon*<sup>®</sup>) e sono state lasciate aderire O/N nei pozzetti. Le cellule sono state, poi, danneggiate e alcune sottoposte a protocollo di preconditionamento “continuativo” con DADLE 1 µM. Dopo 18 ore di danno le cellule sono state staccate con tripsina e i pellet cellulari sono stati processati per l'estrazione dell'RNA mediante RNeasy Micro Kit (*Qiagen*), seguendo le indicazioni del kit. I campioni sono stati lisati ed omogeneizzati, ai lisati è stato aggiunto etanolo e sono stati caricati nelle colonnine del kit dove l'RNA si lega alla membrana interna. Il campione è stato lavato in modo da eliminare i contaminanti e il DNA rimanente è stato rimosso con un trattamento con DNasi. Infine l'RNA purificato e concentrato è stato eluito in acqua RNasi-free.

### **III.11.2 – Quantificazione dell'RNA**

Un µl della soluzione di RNA estratto è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (*CELBIO*) che fornisce un valore di assorbanza proporzionale alla sua concentrazione.

### **III.11.3 – Retrotrascrizione (RT) dell'RNA**

L'RNA è stato retrotrascritto utilizzando l'”RT<sup>2</sup> First Strand Kit” (*Qiagen*), seguendo il protocollo del kit. I campioni sono stati incubati in un termociclatore (Mastercycler, *Eppendorf*) a 42°C per 5 minuti con un trattamento per eliminare i residui di DNA genomico. Dopo un minuto in ghiaccio, ai campioni è stata aggiunta la “Reverse-transcription mix” (che contiene i primer e l'enzima retrotrascrittasi). I campioni sono quindi stati incubati a 42°C per 15 minuti e, successivamente a 95°C per 5 minuti per stoppare la reazione.

Per l'analisi del PCR Array sono stati retrotrascritti 3 µg di RNA estratto per campione, per i singoli saggi di Real Time PCR 1 µg RNA estratto per campione.

### III.11.4 – Real Time PCR

La Real Time PCR è una tecnica che permette di quantificare l'espressione di mRNA retrotrascritto in cDNA in modo:

- assoluto, utilizzando una curva di calibrazione interna o esterna;
- relativo, rapportando i valori di un gene di interesse rilevabili in un campione rispetto ad quelli rilevabili in un altro campione di riferimento.

Nella Real time PCR l'amplificazione del DNA e la rivelazione della sua quantità avvengono nello stesso momento grazie all'utilizzo di una sonda fluorescente, nel nostro caso SYBR Green I, che si lega in modo specifico al DNA a doppio filamento.

#### III.11.4.1 – Screening del profilo di espressione genica di citochine e chemochine

Lo *screening* del profilo di espressione genica di citochine e chemochine è stato effettuato mediante il saggio su piastra da 96 pozzetti "RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array – Citochine e chemochine di ratto" (Qiagen), che permette di valutare 84 geni diversi. In tabella III.2.A e B sono indicati i geni presenti nella piastra e le categorie a cui appartengono.

ADIPOQ	BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	C5	CCL1	CCL11	CCL12	CCL17	CCL19	CCL2
CCL20	CCL21	CCL22	CCL24	CCL3	CCL4	CCL5	CCL7	CD40LG	CD70	CNTF	CSF1
CSF2	CSF3	CTF1	CX3CL1	CXCL1	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL13	CXCL16	CXCL3	CXCL9
FASLG	GDF15	GPI	IFNA2	IFNG	IL10	IL11	IL12A	IL12B	IL13	IL15	IL16
IL17A	IL17F	IL18	IL1A	IL1B	IL1RN	IL2	IL21	IL22	IL23A	IL24	IL27
IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL9	LIF	LTA	LTB	MIF	MSTN	NODAL
OSM	CXCL4	CXCL7	SPP1	TGFB2	THPO	TNF	TNFRSF11B	TNFSF10	TNFSF11	VEGFA	XCL1
ACTB	B2M	HPRT1	LDHA	RPLP1	RGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tab.III.2.A: Schema geni presenti nel PCR Array.

Chemochine	Interleuchine	Interferoni	Fattori di crescita
Superfamiglia del TNF	Altre citochine	Geni <i>housekeeping</i>	Controlli interni del saggio

Tab.III.2.B: Categoria di appartenenza dei geni analizzati.

Per eseguire il saggio sono state seguite le istruzioni del kit: il cDNA del campione è stato unito alla mix di reazione contenente SYBR Green (RT<sup>2</sup> SYBR® Green Fluor

---

qPCR Mastermix, *Qiagen*) e diluito con acqua RNasi-free. La miscela di reazione così ottenuta è stata aliquotata nei 96 pozzetti del saggio (ogni piastra un campione) ed è stata effettuata la corsa in un lettore per Real Time PCR a piastre (iCycler, *Biorad*), utilizzando il seguente protocollo per la corsa:

- fase iniziale a 95°C per 10 min per permettere alla polimerasi di attivarsi;
- 40 cicli:
  1. 95°C per 15 sec;
  2. 60°C per 1 min (la fluorescenza è stata misurata durante questa fase).

La specificità del prodotto è stata determinata con l'analisi della curva di melting, condotta con una scala di temperature che parte da 55°C e arriva a 95°C alla velocità di 2°C/min.

La quantificazione dell'espressione del gene di interesse è stata effettuata con il metodo di comparazione relativa dei cicli soglia " $\Delta\Delta C_t$ " [309], metodo che fornisce la quantità del gene di interesse in un campione, normalizzato con uno o più geni endogeni espressi stabilmente (*housekeeping*), come rapporto rispetto a un campione di riferimento, nel nostro caso il campione solamente danneggiato (DANNO).

### **III.11.4.2 – Singoli saggi Real Time per la validazione dei geni di interesse**

La Real time PCR è stata effettuata con un Lightcycler system (*Roche Diagnostics*) e per amplificare è stato usato il kit SYBR Green fastStart Kit (Lightcycler®FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I, *Roche*).

La miscela di reazione (Reaction Mix) è stata preparata unendo 14 µl di enzima (FastStart Taq DNA polymerase) a 128 µl di Master mix (reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I dye, dNTP mix).

Per ogni singolo campione sono stati preparati:

- 4,0 µL Reaction Mix
- 0,5 µL primer F (concentrazione finale 0,25 µM)
- 0,5 µL primer R (concentrazione finale 0,25 µM)
- 13 µL di H<sub>2</sub>O PCR GRADE
- 2 µL del cDNA retrotrascritto dal campione

---

I primer utilizzati dei geni delle chemochine (*Sigma-Aldrich*) sono:

- CCL3  
Primer senso (*forward*, F): 5'-GTCATTTTCCTGACCAAGAG-3'  
Primer antisenso (*reverse*, R): 5'-CCTCTAATCTCAGGCATTTAG-3'  
T annealing a 58°C
- CCL20  
Primer senso (F): 5'-AAAACGGATGCTTTTCTGG-3'  
Primer antisenso (R): 5'-CACAAATCAGGTCTGTGC-3'  
T annealing a 59°C
- CXCL3  
Primer senso (F): 5'-TTCCTAGCAGACCTTTCATAC-3'  
Primer antisenso (R): 5'-GCTTTTCAAACACTCAACACTG-3'  
T annealing a 57°C
- CX<sub>3</sub>CL1  
Primer senso (F): 5'-GACTCACTCCTTGATAGGTG-3'  
Primer antisenso (R): 5'-ACCGAAGAACCAGGATATAG-3'  
T annealing a 58°C

I primer utilizzati dei geni *housekeeping* sono:

- GAPDH  
Quantitect<sup>®</sup> Primer Assay Rn\_Gapd\_1\_SG (*Qiagen*).  
Mix di primer F e R (1 µL/campione).  
T annealing a 56°C
- ACTB  
Quantitect<sup>®</sup> Primer Assay Rn\_Actb\_1\_SG (*Qiagen*).  
Mix di primer F e R (1 µL/campione).  
T annealing a 56°C

I 20 µl della miscela di reazione sono stati processati secondo il seguente schema:

- fase iniziale di denaturazione: 95°C per 10 min;
- 45 cicli:
  1. Denaturazione: 95°C per 10 sec;
  2. Annealing: per 6-10 sec;
  3. Estensione: 72°C per 10 sec (nell'ultimo ciclo, step finale di 10 min a 72°C)con una velocità di variazione della temperatura di 20°C/sec.

La fluorescenza è stata misurata alla fine di ogni fase di estensione.

La specificità del prodotto è stata determinata con l'analisi della curva di melting, condotta con una scala di temperature che parte da 55°C e arriva a 95°C alla velocità di 0,1°C/sec.

Per ogni esperimento, la quantificazione dell'espressione del gene di interesse è stata effettuata con il metodo di comparazione relativa dei cicli soglia " $\Delta\Delta C_t$ " [309], metodo che fornisce la quantità del gene di interesse in un campione, normalizzato con uno o più geni endogeni espressi stabilmente (*housekeeping*), in relazione a un campione di riferimento, nel nostro caso il campione trattato con DADLE 1  $\mu$ M.

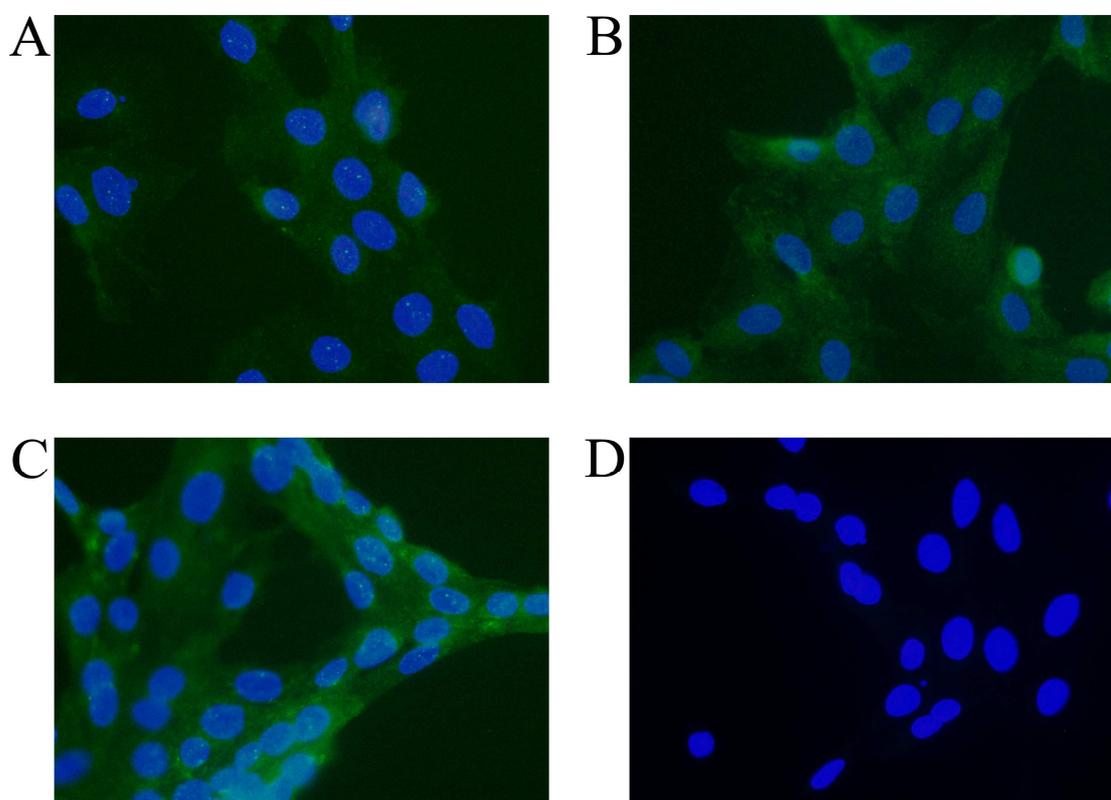
### **III.12 – Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad PRISM, versione 5. I risultati negli esperimenti sono calcolati come media $\pm$ deviazione standard (SD), con "n=" sono indicati i numeri di esperimenti condotti. In presenza di confronto di due gruppi è stato utilizzato il test "t di Student", per analisi concernenti più di due gruppi si è utilizzata l'ANOVA con Bonferroni post hoc test. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $P < 0,05$ .

## IV – RISULTATI

### IV.1 – Determinazione della presenza di recettori oppioidi

Per poter essere sicuri di lavorare con una linea cellulare responsiva alle sostanze preconditionanti scelte è stata valutata tramite immunofluorescenza (IF) la presenza dei recettori oppioidi sulla membrana delle cellule H9c2 (Fig.IV.1.A-D).



**Fig.IV.1.A-D**

**Immunofluorescenza su cellule H9c2 marcate con anticorpi anti-recettore oppioide. (A) recettore  $\delta$ . (B) recettore  $\kappa$ . (C) recettore  $\mu$ . (D) controllo negativo. Ingrandimento 400X.**

L'analisi ha mostrato che le cellule H9c2 esprimono i tre tipi di recettori oppioidi  $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\mu$ .

## IV.2 – Messa a punto di un modello cellulare in vitro di microambiente cardiaco “ischemico”

Per ricreare il più fedelmente possibile un microambiente cardiaco “ischemico” *in vitro*, non lavorando in ambiente privo di ossigeno, si è deciso di danneggiare chimicamente le H9c2. Il modello di danno scelto per gli esperimenti di questo progetto consiste nell’incubazione per 24 ore delle cellule H9c2 con un terreno di danno (indicato come “DANNO” nei successivi esperimenti). Questo terreno è costituito da DMEM senza siero e glutammina, ma con l’aggiunta dell’inibitore del complesso I mitocondriale Rotenone (alla concentrazione finale 0,5  $\mu\text{M}$ ), in modo da bloccare la catena respiratoria mitocondriale e impedirle di utilizzare ossigeno.

Per determinare se il protocollo scelto danneggiasse le cellule efficacemente è stata valutata la crescita cellulare e l’entità dell’insulto apoptotico nelle H9c2.

### IV.2.1 – Curva di crescita cellulare

La crescita cellulare delle H9c2 incubate con il terreno di danno fino a 48 ore è stata determinata tramite saggio con cristal violetto (Fig.IV.2 e Tab.IV.1).

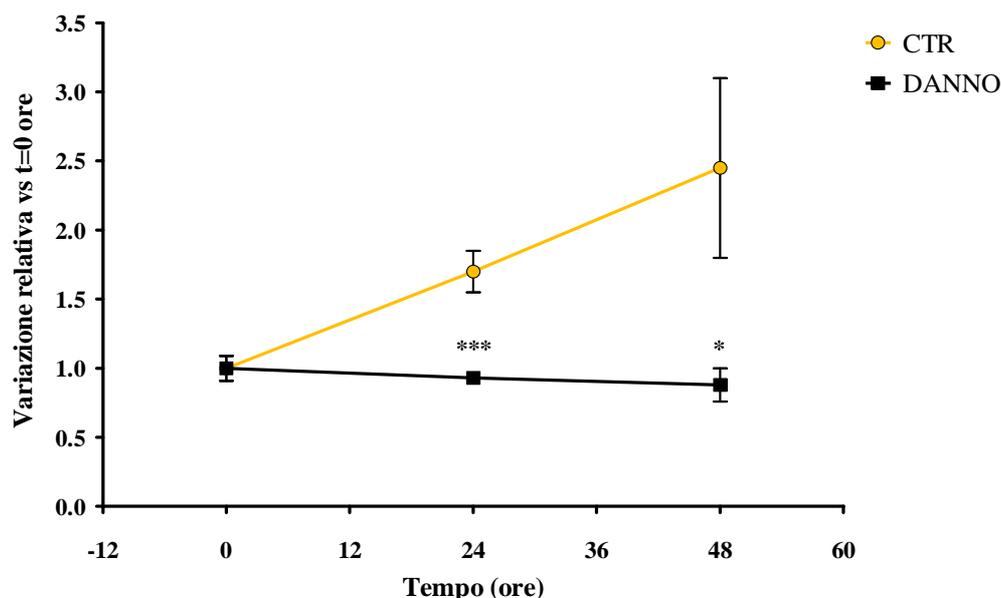


Fig.IV.2

Curva di crescita con cristal violetto fino a 48 ore di cellule di controllo o danneggiate (n=4).

\*\*\*P<0,001 significativamente diverso da CTR 24h. \*P<0,05 significativamente diverso da CTR 48h.

Tempo (ore)	CTR	DANNO
0	1,00±0,09	1,00±0,09
24	1,70±0,15	0,93±0,04
48	2,45±0,65	0,88±0,12

Tab.IV.1: Variazione relativa vs tempo=0 ore±SD.

I saggi effettuati indicano che, rispetto alle cellule di controllo (CTR), dopo 24 ore di danno cala il numero delle cellule sopravvissute e che le cellule danneggiate (DANNO) subiscono un netto blocco della crescita e rimangono stabili come numero fino alle 48 ore.

## IV.2.2 – Determinazione dell'attivazione dell'enzima caspasi 3

La determinazione dell'entità dell'insulto apoptotico provocato dal modello di danno è stata effettuata tramite saggio fluorimetrico di valutazione dell'attivazione dell'enzima caspasi 3. L'enzima attivato, infatti, è un marcatore di apoptosi.

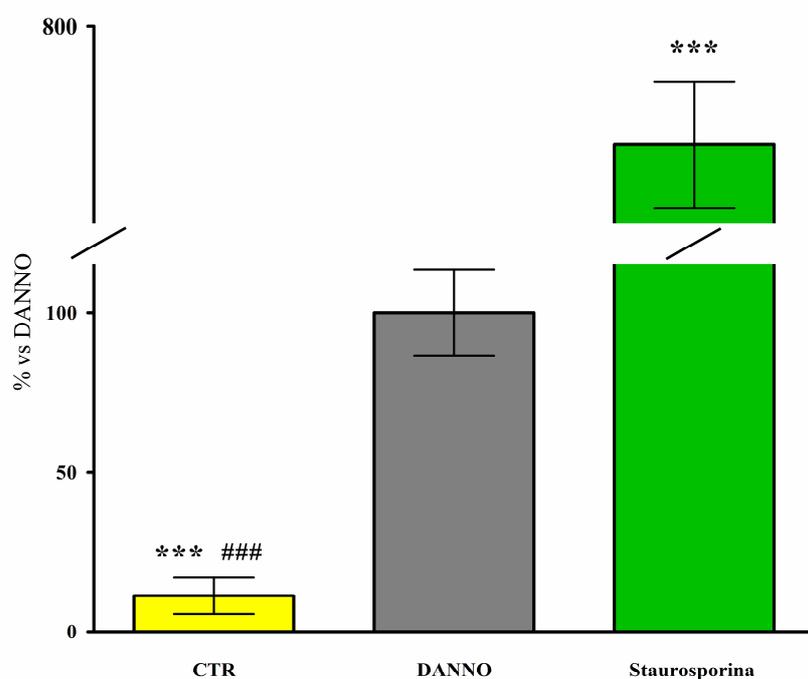


Fig.IV.3

Valutazione dell'induzione di apoptosi tramite saggio di attivazione della caspasi 3 in cellule di controllo o danneggiate (n=11).

\*\*\*P<0,001 significativamente diverso da DANNO. ###P<0,001 significativamente diverso da STAUROSPORINA.

CTR	DANNO	Staurosporina
11,20±5,68%	100,00±13,39%	639,24±85,40%

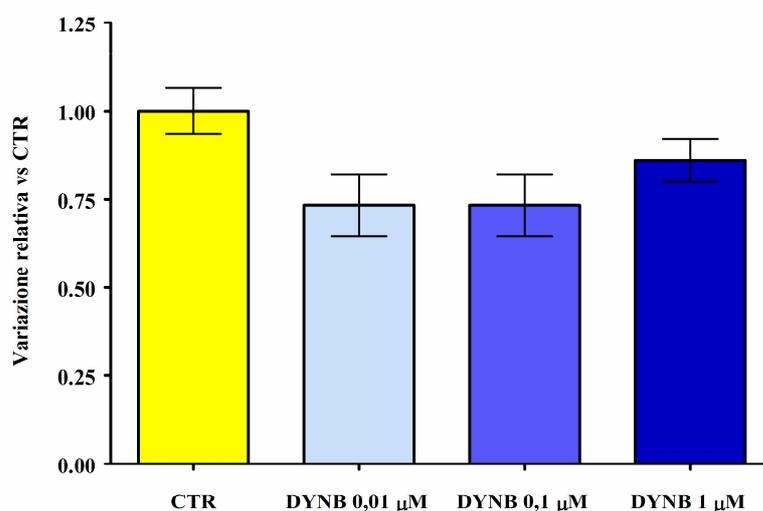
**Tab.IV.2: % attivazione dell'apoptosi vs DANNO±SD.**

I saggi effettuati hanno confermato la presenza di apoptosi nel modello di 24 ore di danno (DANNO). I campioni danneggiati (DANNO), così come i controlli positivi (cellule trattate con staurosporina 1  $\mu$ M, molecola che induce apoptosi, per 6 ore), presentano un aumento consistente e statisticamente significativo dell'attivazione dell'enzima rispetto al controllo (CTR).

### IV.3 – Valutazione tossicità oppioidi

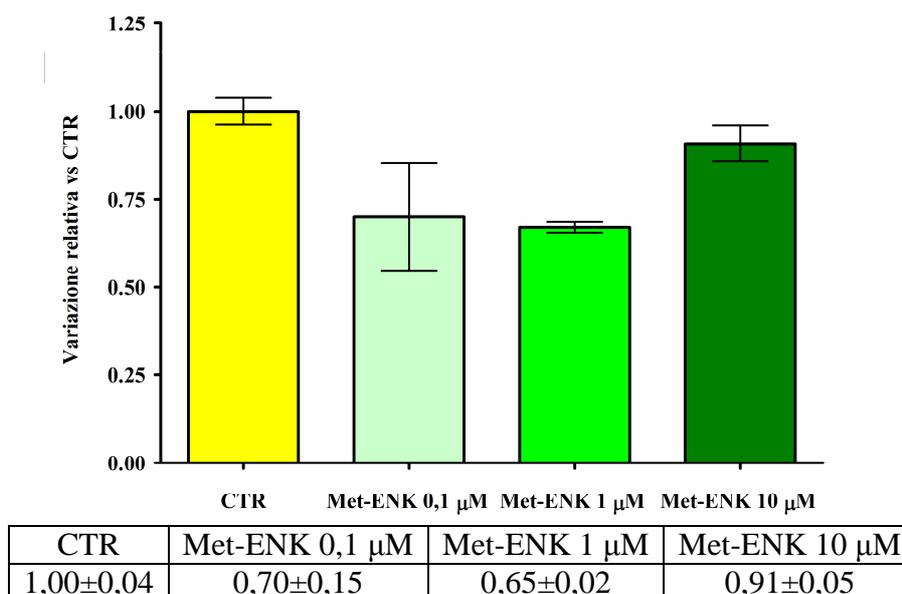
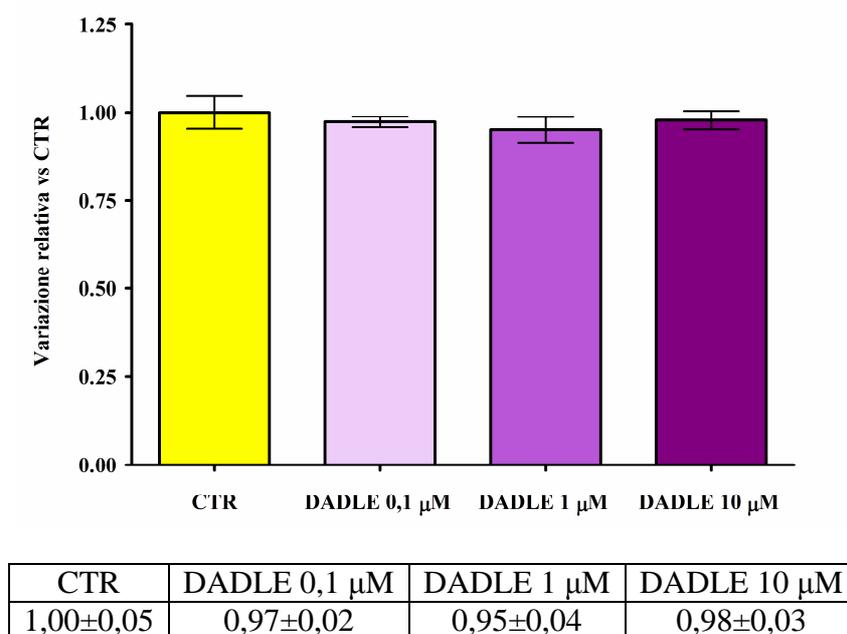
Per escludere che i peptidi oppioidi scelti per il progetto avessero effetti nocivi sulle cellule, è stata valutata tramite saggio con MTT la tossicità a 24 ore di trattamento di concentrazioni crescenti di Dinorfina B (DYNB), ligando naturale del recettore oppioide  $\kappa$ , Met-Enkefalina (Met-Enk), ligando naturale del recettore oppioide  $\delta$  e DADLE, agonista sintetico del recettore oppioide  $\delta$  (Fig.IV.4.A-C e Tab.IV.3A-C).

**Fig.IV.4.A Valutazione tossicità Dinorfina B mediante saggio con MTT (n=2).**



CTR	DYNB 0,01 $\mu$ M	DYNB 0,1 $\mu$ M	DYNB 1 $\mu$ M
1,00±0,06	0,73±0,09	0,80±0,07	0,86±0,06

**Tab.IV.3.A: Variazione relativa vs controllo (CTR)±SD.**

**Fig.IV.4.B Valutazione tossicità Met-enkefalina mediante saggio con MTT (n=2).****Tab.IV.3.B: Variazione relativa vs controllo (CTR)±SD.****Fig.IV.4.C Valutazione tossicità DADLE mediante saggio con MTT (n=3).****Tab.IV.3.C: Variazione relativa vs controllo (CTR)±SD.**

La Dinorfina B e la Met-Enkefalina nelle due concentrazioni più basse sembrano avere un leggero effetto inibente ma che non risulta statisticamente significativo. Nel complesso, però, i tre oppioidi non sembrano avere effetti tossici sulle H9c2 e per ognuna delle sostanze testate non sono riscontrabili differenze significative tra una concentrazione rispetto ad un'altra.

Si è deciso quindi di valutare le proprietà antiapoptotiche di ognuno dei tre peptidi.

## IV.4 – Oppioidi e protezione diretta dall’apoptosi indotta dall’insulto “ischemico”

Deprivando le H9c2 di siero e glutammina e trattandole con Rotenone 0,5  $\mu\text{M}$  per 24 ore è stato possibile ottenere un modello di danno consistente che causa apoptosi e blocco della crescita cellulare.

Una volta validato il protocollo di danno e una volta valutata la tossicità delle sostanze condizionanti si è proceduto ad individuare il modello di condizionamento e, in secondo luogo, il peptide che conferisse la maggiore protezione alle cellule danneggiate. Questa valutazione è stata effettuata mediante il saggio di attivazione della caspasi 3.

### IV.4.1 – Validazione del modello di condizionamento 1: preconditionamento

Il primo modello di condizionamento testato è stato il preconditionamento: ovvero la somministrazione dei peptidi per 24 ore prima di effettuare il danno. Sono state utilizzate Dinorfina B (DYNB) e Met-Enkefalina (Met-ENK) secondo lo schema indicato di seguito (Tab.IV.4.A).

	CTR	DANNO	DYNB 0,1 $\mu\text{M}$	DYNB 1 $\mu\text{M}$	Met-ENK 10 $\mu\text{M}$
<b><u>Precondizionamento (24 ore):</u></b>					
DYNB 0,1 $\mu\text{M}$	-	-	+	-	-
DYNB 1 $\mu\text{M}$	-	-	-	+	-
Met-ENK 10 $\mu\text{M}$	-	-	-	-	+
<b><u>Trattamento (24 ore):</u></b>					
DANNO	-	+	+	+	+

Tab.IV.4.A: Schema trattamento preconditionamento.

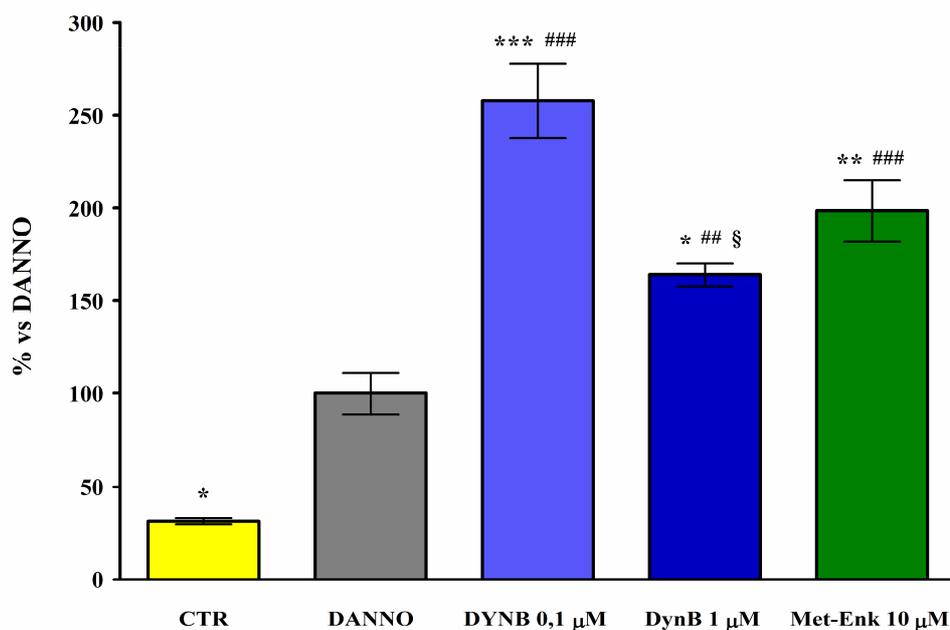


Fig.IV.5

Valutazione della protezione dall'apoptosi, nelle H9c2 danneggiate, tramite 24 ore di preconditionamento con Dinorfina B e Met-Encefalina (n=2).

\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 significativamente diverso da DANNO. ###P<0,01, ####P<0,001 significativamente diverso da CTR. §P<0,05 significativamente diverso da DYNB 0,1 µM.

CTR	DANNO	DYNB 0,1 µM	DYNB 1 µM	Met-ENK 10 µM
31,15±1,68	100,00±11,09	258,15±19,82	164,19±6,37	198,55±16,44

Tab.IV.4.B: % attivazione dell'apoptosi vs DANNO±SD.

Tutti i campioni hanno mostrato rispetto al puro danno (DANNO) un inasprimento nell'attivazione della caspasi 3 in maniera statisticamente significativa.

Quindi, nel nostro modello, l'utilizzo di una strategia che comprenda il solo preconditionamento non è in grado di proteggere le H9c2 dall'attivazione dell'apoptosi ma, anzi, aggrava il danno.

## IV.4.2 – Validazione del modello di condizionamento 2: percondizionamento

Si è quindi a proceduto a determinare se il trattamento delle H9c2 contestualmente al danno (PERcondizionamento) permettesse alle cellule di contrastare l'attivazione dell'apoptosi.

Per testare il percondizionamento sono state utilizzate Dinorfina B (DYNB) e Met-Encefalina (Met-ENK) secondo lo schema indicato di seguito (Tab.IV.5.A).

	CTR	DANNO	DYNB 0,01 $\mu$ M	DYNB 0,1 $\mu$ M	DYNB 1 $\mu$ M	Met-ENK 10 $\mu$ M
<b>Trattamento (24 ore):</b>						
DANNO	-	+	+	+	+	+
DYNB 0,01 $\mu$ M	-	-	+	-	-	-
DYNB 0,1 $\mu$ M	-	-	-	+	-	-
DYNB 1 $\mu$ M	-	-	-	-	+	-
Met-ENK 10 $\mu$ M	-	-	-	-	-	+

Tab.IV.5.A: Schema trattamento percondizionamento.

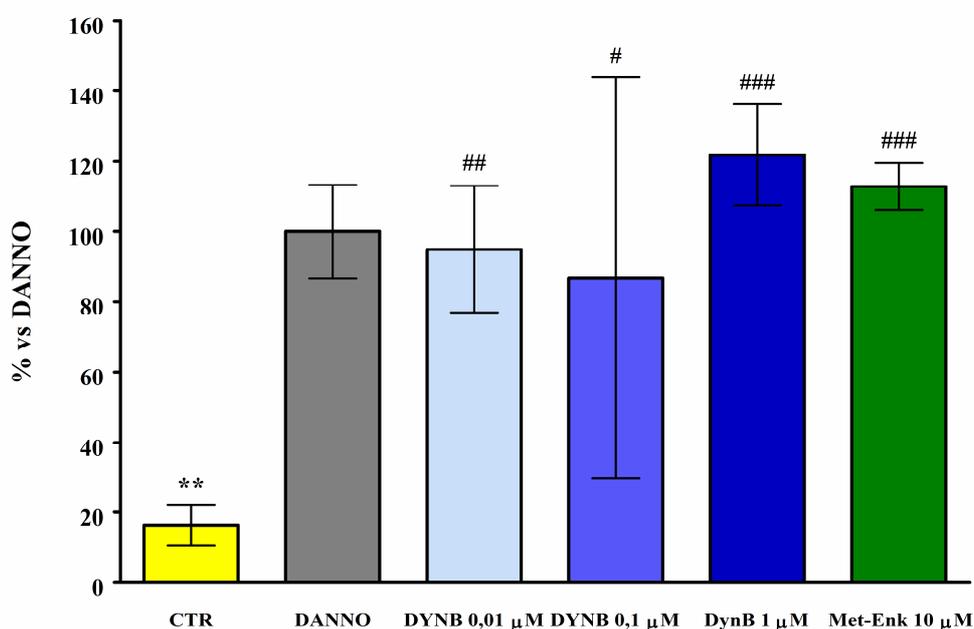


Fig.IV.6

Valutazione della protezione dall'apoptosi, nelle H9c2 danneggiate, tramite percondizionamento con Dinorfina B e Met-Enkefalina (n=4).

\*\*P<0,01 significativamente diverso da DANNO. #P<0,05 ##P<0,01 ###P<0,001 significativamente diverso da CTR.

CTR	DANNO	DYNB 0,01 $\mu$ M	DYNB 0,1 $\mu$ M	DYNB 1 $\mu$ M	Met-ENK 10 $\mu$ M
16,40 $\pm$ 5,79	100,00 $\pm$ 13,25	94,95 $\pm$ 18,09	86,82 $\pm$ 57,21	121,82 $\pm$ 14,42	112,81 $\pm$ 6,70

Tab.IV.5.B: % attivazione dell'apoptosi vs DANNO $\pm$ SD.

Anche con questo modello di condizionamento non è stato possibile inibire l'apoptosi nelle H9c2 danneggiate. I trattamenti non hanno mostrato di essere efficaci, infatti, sia le cellule solamente danneggiate (DANNO) sia le trattate hanno mostrato una maggiore attivazione della caspasi 3 rispetto al controllo non danneggiato (CTR), un risultato statisticamente significativo. Solo il trattamento con le concentrazioni più basse di dinorfina B (DYNB 0,01  $\mu$ M e DYNB 0,1  $\mu$ M) ha mostrato di indurre una lieve

diminuzione dell'attivazione dell'enzima rispetto al danno, ma in maniera non statisticamente significativa.

Non sembra però che i trattamenti aumentino l'attivazione delle caspasi 3: i punti DYNB 1  $\mu\text{M}$  e Met-ENK 10  $\mu\text{M}$  mostrano, sì, un lieve aumento dell'attivazione dell'enzima rispetto al danno, ma tale aumento non risulta essere statisticamente significativo.

### **IV.4.3 – Validazione del modello di condizionamento 3: preconditionamento “continuativo”**

L'ultima strategia di trattamento testata combina preconditionamento e percondizionamento: si preconditionano le H9c2 per 24 ore e si continua a trattarle con le sostanze condizionanti contestualmente alle 24 ore di danno, un preconditionamento “continuativo”.

Per testare il preconditionamento “continuativo” sono state utilizzate:

- Dinorfina B (DYNB) (Fig.IV.7 e Tab.IV.7);
- DADLE e Met-Encefalina (Met-ENK) (Fig.IV.8 e Tab.IV.8);

secondo lo schema indicato di seguito (Tab.IV.6).

	CTR	DANNO	Oppioide
<b><u>Precondizionamento (24 ore):</u></b>			
Oppioide	-	-	+
<b><u>Trattamento (24 ore):</u></b>			
DANNO	-	+	+
Oppioide	-	-	+

**Tab.IV.6: Schema trattamento preconditionamento “continuativo”.**

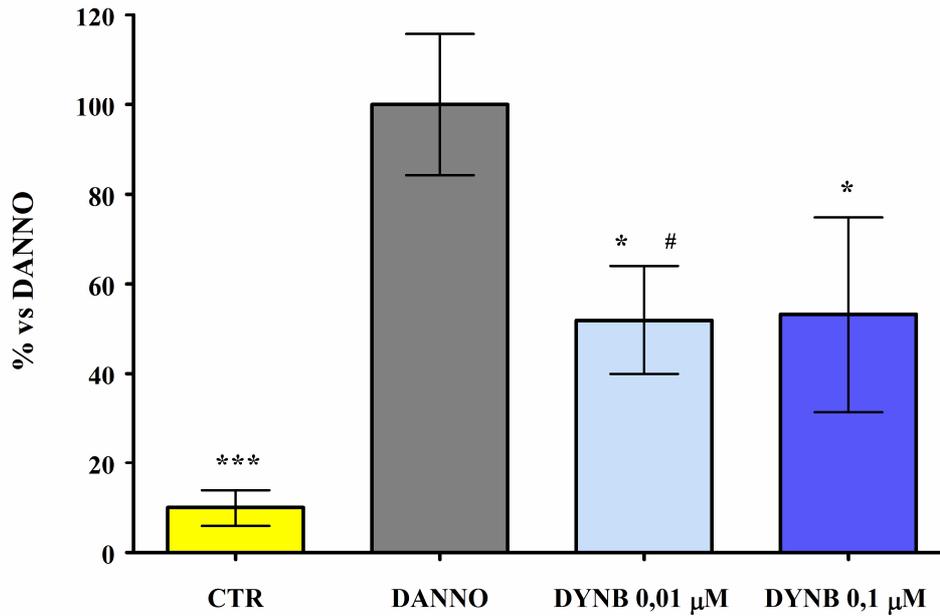


Fig.IV.7

Valutazione della protezione dall'apoptosi, nelle H9c2 danneggiate, tramite protocollo di preconditionamento "continuativo" con Dinorfina B (n=3).

\*P<0,05 \*\*\*P<0,001 significativamente diverso da DANNO. #P<0,05 significativamente diverso da CTR.

CTR	DANNO	DYNB 0,01 µM	DYNB 0,1 µM
9,99±3,94	100,00±15,69	51,91±11,96	53,22±21,78

Tab.IV.7: % attivazione dell'apoptosi vs DANNO±SD.

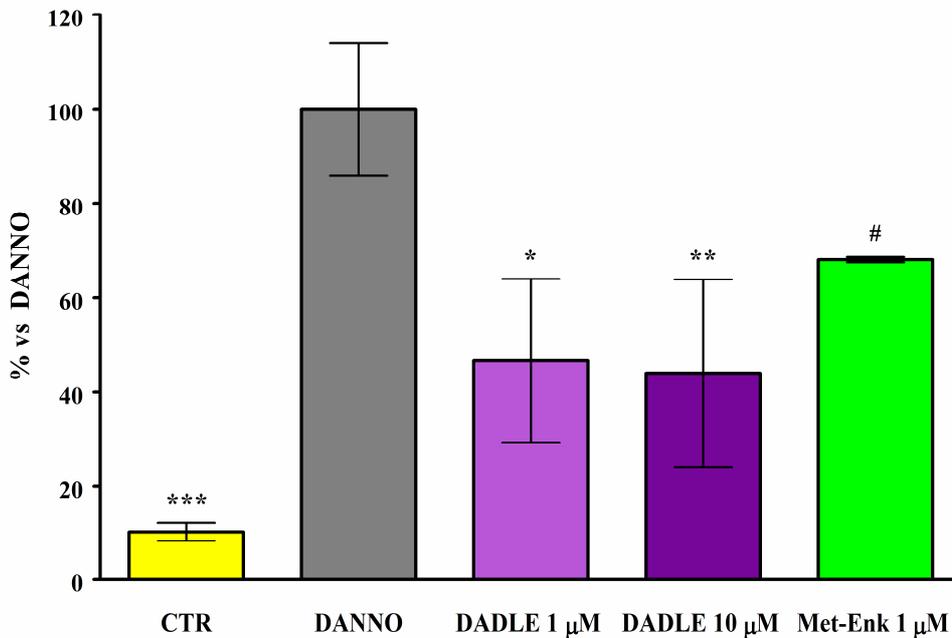


Fig.IV.8

Valutazione della protezione dall'apoptosi, nelle H9c2 danneggiate, tramite preconditionamento "continuativo" con DADLE e Met-Enkefalina (n=3).

\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 significativamente diverso da DANNO. #P<0,05 significativamente diverso da CTR.

CTR	DANNO	DADLE 1 $\mu$ M	DADLE 10 $\mu$ M	Met-ENK 1 $\mu$ M
10,22 $\pm$ 1,96	100,00 $\pm$ 14,05	46,67 $\pm$ 17,33	43,99 $\pm$ 19,86	68,06 $\pm$ 0,57

**Tab.IV.8: % attivazione dell'apoptosi vs DANNO $\pm$ SD.**

Le analisi indicano che con il preconditionamento “continuativo” è possibile contrastare l'attivazione dell'apoptosi nelle cellule danneggiate. Per quanto riguarda il determinare quale tipo di molecola sia protettiva, il saggio ha indicato che nelle H9c2 trattate con Dinorfina B 0,01 e 0,1  $\mu$ M e DADLE 1 e 10  $\mu$ M si riduce sensibilmente, e in maniera statisticamente significativa, l'apoptosi rispetto ai campioni non trattati che ricevono unicamente il danno (DANNO). Sia per la Dinorfina B che per il DADLE non risultano differenze significative nell'utilizzo di una concentrazione rispetto all'altra. DADLE, inoltre, sembra conferire una protezione lievemente maggiore rispetto alla Dinorfina B. Anche la Met-Enkefalina riduce l'attivazione dell'enzima rispetto al danno, ma non risulta essere statisticamente significativa.

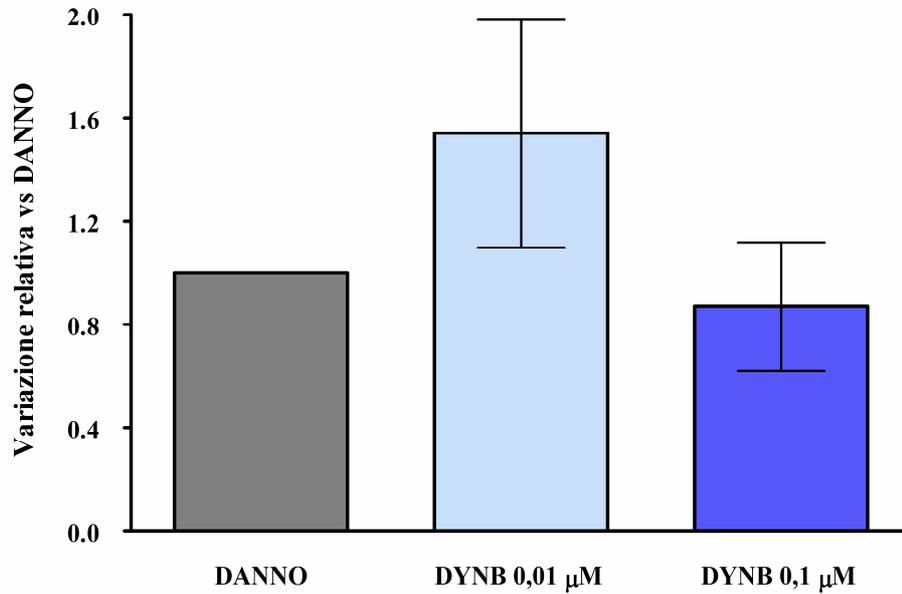
In seguito a questi risultati, si è deciso di utilizzare il protocollo di preconditionamento “continuativo” e solo Dinorfina B e DADLE nei successivi esperimenti.

## **IV.5 – Cellule staminali e “microambiente ischemico” trattato o meno con peptidi oppioidi: valutazione della migrazione di FMhMSC**

Il passo successivo è stato determinare se il preconditionamento con oppioidi modifichi la capacità di cellule H9c2 danneggiate di reclutare elementi staminali. Per questo motivo sono state testate, attraverso saggio di migrazione con inserti cellulari, le capacità migratorie di FMhMSC (cellule staminali mesenchimali umane derivate da membrane fetali). Le staminali sono state messe a contatto (per 18 ore) con i diversi “microambienti ischemici”, precedentemente messi a punto, trattati o meno con Dinorfina B (Fig.IV.9 e Tab.IV.9) e DADLE (Fig.IV.10 e Tab.IV.10).

Fig.IV.9

Saggi di migrazione delle FMhMSC poste nei microambienti ischemici delle H9c2 preconditionati “continuativamente” con Dinorfina B (n=3).



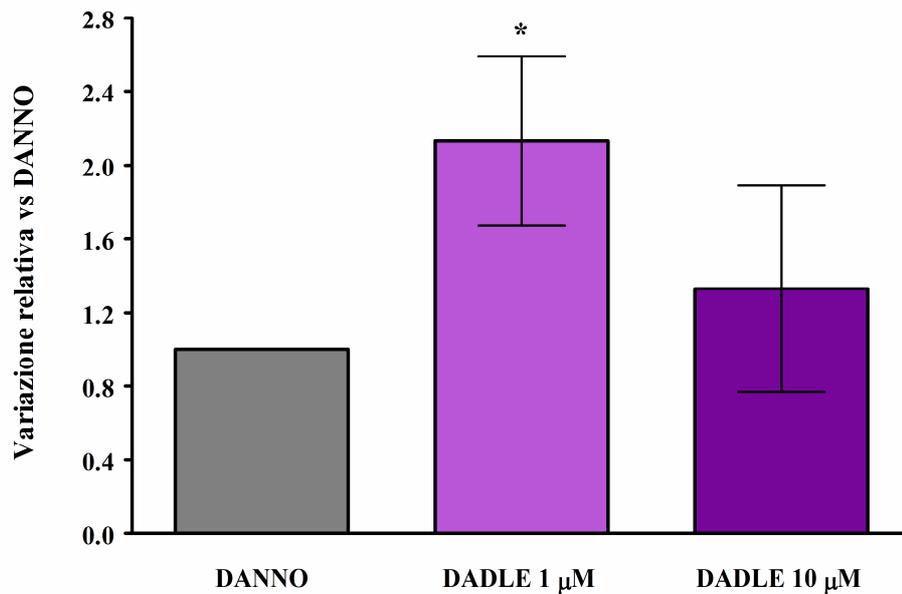
DANNO	DYNB 0,01 µM	DYNB 0,1 µM
1,00±0,00	1,54±0,44	0,87±0,25

Tab.IV.9: Variazione relativa vs DANNO±SD.

Fig.IV.10

Saggi di migrazione delle FMhMSC poste nei microambienti ischemici delle H9c2 preconditionati “continuativamente” con DADLE (n=3).

\*P<0,05 significativamente diverso da DANNO.



DANNO	DADLE 1 µM	DADLE 10 µM
1,00±0,00	2,13±0,46	1,33±0,56

Tab.IV.10: Variazione relativa vs DANNO±SD.

Gli esperimenti hanno evidenziato una aumentata migrazione di FMhMSC in risposta al trattamento con le concentrazioni più basse di DADLE e, in misura minore, di Dinorfina B. Solo in risposta al DADLE in maniera statisticamente significativa. Le concentrazioni più alte delle sostanze risultano inefficaci: campioni trattati con Dinorfina B 0,1  $\mu$ M mostrano una migrazione minore rispetto a quella dei campioni che ricevono unicamente il danno (DANNO) e i campioni trattati con DADLE 10  $\mu$ M mostrano un aumento della migrazione che però non risulta essere statisticamente significativo.

In seguito a questi risultati, si è deciso di utilizzare nei successivi esperimenti solo il DADLE, nella concentrazione più bassa.

## **IV.6 – Determinazione delle possibili cause dell'aumento della migrazione**

Alla luce dei risultati dei saggi di migrazione si è cercato di identificare le cause dell'aumentata migrazione delle cellule staminali, che sono state ricercate su due fronti. Da un lato si sono indagate possibili modificazioni delle caratteristiche delle FMhMSC promosse dall'interazione delle staminali con i diversi microambienti ischemici, dall'altro si è valutato se il trattamento con DADLE inducesse le H9c2 danneggiate ad esprimere elementi chemoattrattivi.

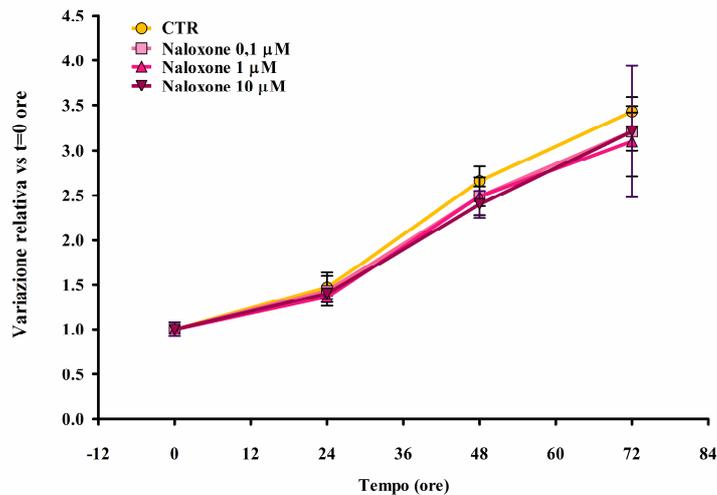
### **IV.6.1 – Modificazioni delle caratteristiche delle FMhMSC causate dall'interazione con il microambiente “ischemico”**

Nei successivi studi le cellule staminali sono state trattate con i surnatanti (medium condizionati, MC) di H9c2 che sono state danneggiate e hanno subito o meno il protocollo di preconditionamento “continuativo” con DADLE:

- “MC DANNO”  $\rightarrow$  MC delle cellule danneggiate;
- “MC DADLE 1  $\mu$ M”  $\rightarrow$  MC delle cellule danneggiate e trattate con DADLE 1  $\mu$ M.

Inoltre, per determinare se i risultati riscontrati nelle FMhMSC dipendessero dall'attivazione del recettore  $\delta$  oppioide nelle H9c2, sono stati preparati MC delle cellule danneggiate e preconditionate "continuativamente" con DADLE 1  $\mu$ M e Naloxone 1  $\mu$ M, un antagonista sintetico che blocca i tre recettori oppioidi  $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\mu$  ("MC NLX 1 $\mu$ M/DADLE 1 $\mu$ M").

Per escludere che questo antagonista avesse effetti nocivi sulle cellule, è stata valutata la tossicità tramite saggio MTT su H9c2 trattate fino a 72 ore con tre concentrazioni crescenti di Naloxone (Fig.IV.11, Tab.IV.11).



**Fig.IV.11**  
Valutazione tossicità Naloxone mediante saggio con MTT (n=2).

Tempo (ore)	CTR	Naloxone 0,1 $\mu$ M	Naloxone 1 $\mu$ M	Naloxone 10 $\mu$ M
0	1,00±0,08	1,00±0,08	1,00±0,08	1,00±0,08
24	1,47±0,17	1,43±0,17	1,36±0,01	1,40±0,06
48	2,66±0,16	2,49±0,11	2,49±0,21	2,40±0,15
72	3,43±0,16	3,21±0,21	3,10±0,39	3,21±0,73

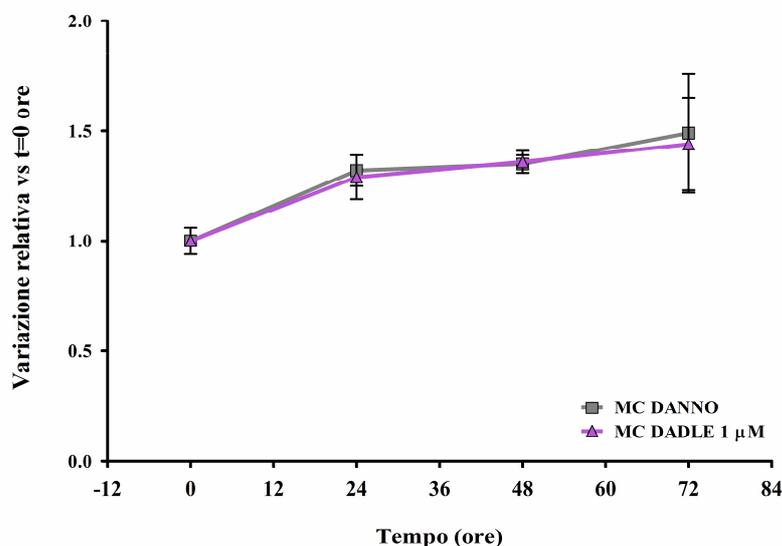
**Tab.IV.11: Variazione relativa vs tempo=0 ore±SD.**

Il saggio MTT eseguito fino alle 72 ore indica che il Naloxone in tutte e tre le concentrazioni testate non è tossico per le H9c2.

#### IV.6.1.1 – Sopravvivenza FMhMSC

L'aumento di migrazione rilevato potrebbe essere dovuto, in realtà, ad un aumento di sopravvivenza delle cellule staminali che aderiscono alla membrana e ne attraversano i pori. Per escludere questa ipotesi sono stati effettuati saggi di

sopravvivenza con MTT sulle FMhMSC trattate con i medium condizionati delle H9c2 (Fig.IV.12, Tab.IV.12).



**Fig.IV.12**

Curva di sopravvivenza delle FMhMSC trattate con i medium condizionati delle H9c2 (n=3).

Tempo (ore)	MC DANNO	MC DADLE 1 µM
0	1,00±0,06	1,00±0,06
24	1,32±0,07	1,29±0,10
48	1,35±0,04	1,36±0,05
72	1,49±0,27	1,44±0,21

**Tab.IV.12: Variazione relativa vs tempo=0 ore±SD.**

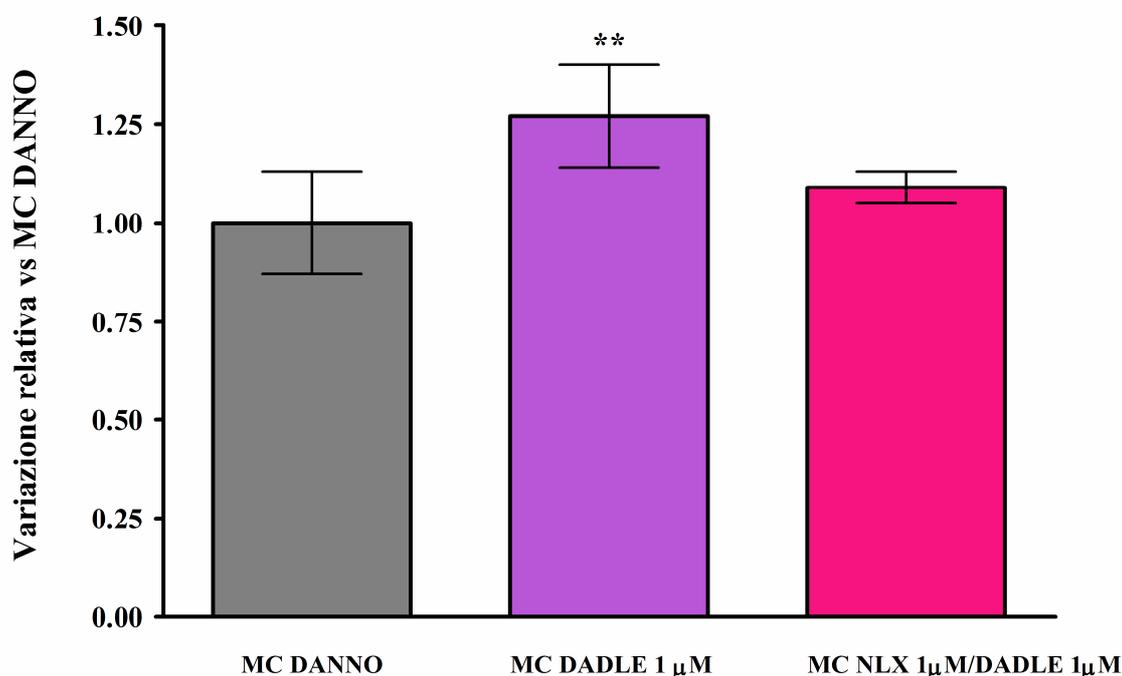
“MC DADLE 1 µM” non promuove la sopravvivenza delle FMhMSC rispetto ai medium condizionati delle H9c2 che ricevono unicamente il danno (“MC DANNO”). L’aumento di migrazione delle FMhMSC non è quindi imputabile ad un aumento della loro sopravvivenza.

#### **IV.6.1.2 – Valutazione delle capacità di adesione delle FMhMSC**

L’aumento di migrazione rilevato potrebbe essere imputabile anche ad un potenziamento delle capacità adesive delle FMhMSC a contatto col microambiente ischemico trattato o meno con DADLE.

Per testare questa ipotesi sono stati effettuati saggi di adesione. Sono stati utilizzati anche medium condizionati trattati con Naloxone, un antagonista dei recettori oppioidi,

per valutare se le proprietà dei medium condizionati dipendessero da un meccanismo mediato direttamente dai recettori oppioidi delle cellule H9c2.



**Fig.IV.13**

Saggio di adesione delle FMhMSCs trattate con i medium condizionati delle H9c2 (n=5).  
**\*\*P<0,01 significativamente diverso da MC DANNO.**

MC DANNO	MC DADLE 1 μM	MC NLX 1 μM/DADLE 1 μM
1,00±0,13	1,27±0,13	1,09±0,04

**Tab.IV.13: Variazione relativa vs MC DANNO±SD.**

I risultati indicano una aumentata capacità di adesione di FMhMSC poste a contatto con “MC DADLE 1 μM” rispetto ai medium condizionati di cellule ischemiche non trattate (“MC DANNO”). Il dato è statisticamente significativo. Cellule staminali a contatto con “MC NLX 1 μM/DADLE 1 μM” mostrano un lieve ma non statisticamente significativo aumento di adesione rispetto a “MC DANNO”. Quindi l’aumento di migrazione delle FMhMSC può essere in parte attribuibile ad un aumento della capacità delle cellule staminali di aderire alla membrana e attraversarne i pori. I dati dei medium condizionati con Naloxone sembrano indicare, inoltre, che le proprietà dei medium condizionati che promuovono l’aumento di adesione delle cellule staminali dipendono da un meccanismo mediato direttamente dal recettore δ oppioidi delle H9c2.

## IV.6.2 – Determinazione delle capacità attrattive delle H9c2 all'interno del microambiente ischemico: espressione genica

I saggi di migrazione indicano che il microambiente ischemico preconditionato “continuativamente” con DADLE 1  $\mu\text{M}$  è in grado di attirare le FMhMSC.

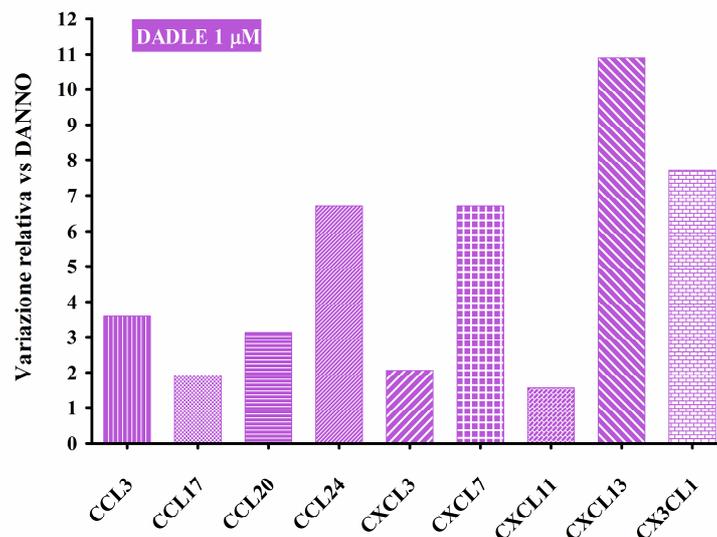
Per determinare se il trattamento con DADLE induca le H9c2 danneggiate ad esprimere elementi chemoattrattivi è stato effettuato uno *screening* in Real Time PCR del profilo di espressione genica di citochine e chemochine utilizzando il saggio su piastra “PCR ARRAY” (Fig.IV.14 e Tab.IV.15); successivamente, è stata effettuata con singoli saggi di Real Time PCR la validazione dell’espressione genica di molecole considerate promettenti (Fig.IV.15.A-D e Tab.IV.16).

Le H9c2 sono state trattate secondo il seguente schema (Tab.IV.14):

	DANNO	DADLE 1 $\mu\text{M}$
<b>Precondizionamento (24 ore):</b>		
DADLE 1 $\mu\text{M}$	-	+
<b>Trattamento (18 ore):</b>		
DANNO	+	+
DADLE 1 $\mu\text{M}$	-	+

Tab.IV.14: Schema trattamento.

Fig.IV.14  
Screening dell’espressione genica di citochine e chemochine: chemochine sovraesprese (n=1).



	CCL3	CCL17	CCL20	CCL24	CXCL3	CXCL7	CXCL11	CXCL13	CX <sub>3</sub> CL1
DANNO	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
DADLE 1 $\mu\text{M}$	3,59	1,92	3,13	6,70	2,06	6,70	1,56	10,88	7,70

Tab.IV.14: Variazione relativa vs DANNO.

Lo *screening* effettuato ha mostrato che, nelle H9c2 a cui è stato somministrato DADLE, avviene un aumento dell'espressione di nove chemochine. Si è deciso, per il momento, di validarne quattro - CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CXCL3/MIP-2 $\beta$  e CX<sub>3</sub>CL1/Fractalchina - considerate promettenti anche alla luce della letteratura scientifica corrente (Fig.IV.15.A-D).

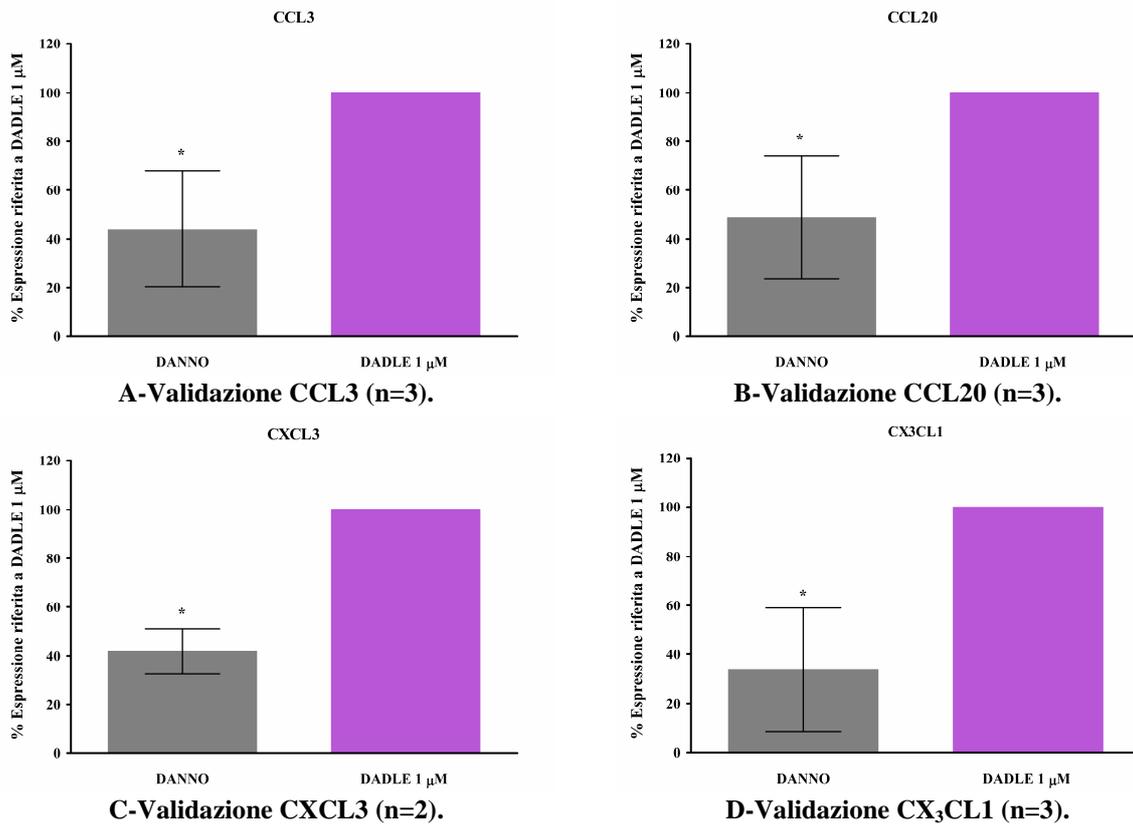


Fig.IV.15.A-D

Validazione dell'espressione genica di chemochine considerate promettenti.

\*P<0,05 significativamente diverso da DADLE 1  $\mu$ M.

	DANNO	DADLE 1 $\mu$ M
CCL3	44,17 $\pm$ 23,81	100,00 $\pm$ 0,00
CCL20	48,97 $\pm$ 25,02	100,00 $\pm$ 0,00
CXCL3	42,00 $\pm$ 9,19	100,00 $\pm$ 0,00
CX <sub>3</sub> CL1	33,85 $\pm$ 25,10	100,00 $\pm$ 0,00

Tab.IV.16: % Espressione riferita a DADLE 1  $\mu$ M $\pm$ SD.

L'analisi con i singoli saggi in Real Time PCR ha confermato che le cellule unicamente danneggiate (DANNO) esprimono queste citochine in maniera minore rispetto alle H9c2 trattate con l'oppioide. Il dato è statisticamente significativo.

---

## V – DISCUSSIONE

Con il termine IPC, preconditionamento ischemico, si indica un fenomeno evolutivamente conservato, comune all'uomo e a molti mammiferi, per il quale, esponendo il cuore a brevi cicli di ischemie subletali prima di un danno ischemico prolungato, si conferisce una profonda resistenza all'infarto. La possibilità fornita dall'IPC di manipolare la risposta del miocardio all'ischemia/riperfusione, contrastandone il danno, ha offerto nuove prospettive nello studio di strategie terapeutiche volte a limitare l'infarto acuto del miocardio ed altre forme di cardiopatia ischemica, che rappresentano una delle principali cause di invalidità e mortalità a livello mondiale.

Recentemente è stato dimostrato che l'azione del preconditionamento ischemico potrebbe coinvolgere anche cellule staminali: l'IPC è stata proposta quale strategia terapeutica per migliorare la sopravvivenza, la mobilitazione e l'integrazione di cellule staminali in aree ischemiche [295-298].

Complessivamente, i risultati forniti dagli studi preclinici *in vitro* e *in vivo* e dai trial clinici fino ad oggi eseguiti indicano che la terapia cellulare cardiaca potenzialmente possa avere effetti benefici ma che sia necessario approfondirne lo studio, nel lungo periodo, in termini di sicurezza ed efficacia.

Le conoscenze fino ad ora acquisite, infatti, suggeriscono che per superare le problematiche della terapia cellulare servono approcci che associno l'utilizzo delle cellule staminali a meccanismi che potenzino le capacità naturali dell'organismo di richiamare le cellule (*homing*) e di permetterne l'inserimento e la sopravvivenza nell'area di danno (*engraftment*).

Si ritiene che il trattamento con IPC, non solo sia in grado di proteggere il miocardio dall'insulto ischemico, ma possa fornire una nuova strategia per potenziare l'efficacia della terapia cellulare cardiaca, promuovendo la mobilitazione di cellule staminali endogene, che risultano diminuite e indebolite nei pazienti con malattie cardiovascolari [264], e migliorando l'*engraftment* e la sopravvivenza di cellule staminali esogene trapiantate.

L'IPC, purtroppo, non è risultata facilmente trasferibile nella pratica clinica, per problemi legati alla tempistica e all'invasività della procedura. Fin dalla sua scoperta si sono quindi studiati i meccanismi che la caratterizzano per identificare sostanze che

---

attivino le medesime (o equivalenti) vie di segnale, da utilizzare come terapia farmacologica.

Inoltre, è un fatto ormai appurato che gli oppioidi e i corrispettivi recettori hanno una robusta azione cardioprotettiva e sono coinvolti nel preconditionamento ischemico, pertanto possono essere considerati candidati ideali per lo sviluppo di una strategia terapeutica farmacologica alternativa all'IPC.

Alla luce di quanto appena esposto si è deciso di valutare se il condizionamento, in particolare il preconditionamento, di cardiomiociti con peptidi oppioidi protegga le cellule dall'apoptosi causata da un ambiente ischemico e possa indurle a secernere fattori – quali ad es. citochine o molecole chemoattrattive – specifici per richiamare o modificare le caratteristiche di cellule staminali endogene e/o altri elementi staminali esogeni da trapiantare in sede di infarto.

Al fine di testare questa ipotesi, per prima cosa è stato messo a punto un modello di danno *in vitro* che ricreasse il più fedelmente possibile il microambiente cardiaco "ischemico". È stata utilizzata la linea cellulare di cardiomioblasti di ratto H9c2, le cui cellule sono da anni impiegate in simulazioni *in vitro* di danno ischemico [303-305] e sono ritenute un modello cellulare idoneo per studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella sopravvivenza cardiomiocitaria.

Per mimare l'insulto ischemico ci si è focalizzati sulle componenti fondamentali che lo caratterizzano: un inadeguato apporto di ossigeno e di sostanze nutritive rispetto al fabbisogno metabolico del tessuto che viene colpito.

Per ricreare le condizioni di ipossia, non lavorando in ambiente privo di ossigeno, si è proceduto a somministrare alle cellule Rotenone – un inibitore del complesso I mitocondriale già impiegato in passato in protocolli di simulazione di danno ipossico/ischemico [306, 307] – in modo da bloccare la catena respiratoria mitocondriale e impedirle di utilizzare ossigeno.

Il protocollo scelto prevede, infatti che, per 24 ore, le H9c2 ricevano Rotenone e, contemporaneamente, siano deprivate di alcuni componenti fondamentali del terreno di coltura: siero (fonte di fattori fondamentali quali fattori di crescita, ormoni, fattori di adesione, trasportatori, elementi minerali in tracce, ...) e glutammina (fonte di energia e carbonio per la cellula).

La determinazione dell'entità del danno causato è stata effettuata mediante saggi di crescita cellulare e di valutazione dell'attivazione del marker apoptotico caspasi 3.

---

L'analisi ha mostrato che con il protocollo scelto è stato possibile ottenere un modello di danno consistente che causa apoptosi e blocco della crescita cellulare.

In seguito si è proceduto ad individuare il modello di condizionamento e il peptide che conferissero alle cellule danneggiate la maggiore protezione dall'apoptosi.

Gli oppioidi testati sono ligandi dei due recettori più coinvolti nei meccanismi di cardioprotezione mediata da IPC: i recettori  $\delta$  e  $\kappa$ . Si è scelto, infatti, di usare Met-Enkefalina e DADLE due agonisti (rispettivamente endogeno e sintetico) del recettore  $\delta$  la cui azione cardioprotettiva è ben consolidata [43, 131, 132, 149, 154]. Per quanto riguarda il recettore  $\kappa$ , è stato utilizzato il ligando endogeno Dinorfina B, un oppioide che ha mostrato d'essere coinvolto nell'organogenesi cardiaca attraverso una complessa serie di meccanismi intracrinici [109, 308].

Dinorfina B e DADLE, quest'ultimo in maniera lievemente maggiore, hanno mostrato di conferire una protezione diretta dall'apoptosi indotta dal modello di microambiente "ischemico" messo a punto. Anche la Met-Enkefalina riduce l'attivazione dell'enzima rispetto al danno, ma la sua azione non risulta statisticamente significativa.

L'azione protettiva delle sostanze testate si esercita solo mediante un protocollo di preconditionamento "continuativo": 24 ore di preconditionamento con oppioidi e successivamente 24 ore di induzione del danno, continuando però a somministrare i peptidi oppioidi.

Prove in cui il trattamento era somministrato solamente nelle 24 ore prima del danno (puro preconditionamento), oppure in contemporanea al danno (percondizionamento) hanno mostrato una protezione dall'insulto apoptotico inefficace e, in alcuni casi, un inasprimento dell'attivazione della caspasi 3.

Successivamente è stata studiata l'interazione tra il modello di "microambiente ischemico", trattato o meno con i peptidi oppioidi, e l'azione di cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) che ne vengono a contatto. In particolare, si è indagato se gli oppioidi modificano la capacità delle cellule H9c2 danneggiate di reclutare FMhMSC e di influire sulla sopravvivenza o sulle caratteristiche cellulari delle staminali.

I saggi di migrazione cellulare hanno mostrato come le FMhMSC, poste nel microambiente di cellule H9c2 danneggiate trattate con le concentrazioni più basse di DADLE e Dinorfina B, aumentino la migrazione verso la "sede" di danno; solo in risposta al DADLE in maniera statisticamente significativa.

---

Il passo successivo è stato cercare di identificare le possibili cause dell'aumentata migrazione delle staminali. Si è lavorato su due fronti: da un lato si sono indagate possibili modificazioni delle caratteristiche delle FMhMSC, promosse dall'interazione delle staminali con i diversi microambienti ischemici, dall'altro si è valutato se il trattamento con DADLE inducesse le H9c2 danneggiate ad esprimere elementi chemoattrattivi.

Per quanto riguarda il “versante hMSC”, grazie ai risultati dei saggi MTT delle FMhMSC a contatto con i medium condizionati, è stato possibile escludere che l'aumento di migrazione rilevato sia dovuto, in realtà, ad un aumento di sopravvivenza delle cellule staminali che aderiscono alla membrana e ne attraversano i pori.

Al contrario, i saggi di adesione indicano un aumento della capacità adesiva delle FMhMSC; quindi l'aumento di migrazione di queste staminali può essere in parte attribuibile ad un aumento della capacità delle FMhMSC di aderire alla membrana e attraversarne i pori.

Inoltre, i dati degli MC con Naloxone sembrano indicare che le proprietà dei medium condizionati che promuovono l'aumento di adesione dipendano da un meccanismo mediato direttamente dal recettore  $\delta$  oppioide delle H9c2.

Sul versante “H9c2”, per determinare se il trattamento con DADLE inducesse le cellule danneggiate ad esprimere elementi chemoattrattivi, è stato effettuato uno *screening* in Real Time PCR del profilo di espressione genica di citochine e chemochine dopo 18 ore di danno.

Le chemochine, una sottofamiglia di citochine in grado di richiamare con uno stimolo chemotattico cellule che esprimono sulla superficie cellulare i loro recettori, sono le principali responsabili della mobilitazione di vari tipi cellulari tra cui leucociti, HSC, MSC, ecc.

Il miocardio ischemico ha mostrato di poter attrarre le BM-MSK [278] ed una delle caratteristiche principali del miocardio post-infartuato [278-280] è l'induzione delle chemochine.

Gli stimoli pro-infiammatori, che sono parte integrante dell'ambiente ischemico, sono in grado di regolare l'espressione delle chemochine e dei loro recettori in vari tipi cellulari [282-284], tra cui le MSC umane [285]: citochine pro-infiammatorie quali TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , hanno infatti dimostrato di poter potenziare *in vitro* l'azione di mobilitazione esercitata dalle chemochine sulle MSC [285, 286].

---

Sono sempre più numerose le ricerche che dimostrano la presenza di recettori delle chemochine sulla superficie cellulare delle MSC e che provano direttamente, con saggi *in vitro*, che numerose chemochine (tra cui, ad esempio, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, CX<sub>3</sub>CL1/Fractalchina ecc...) sono in grado di richiamare cellule staminali mesenchimali [285-291].

Lo *screening* effettuato con il PCR Array ha mostrato che nelle H9c2 a cui è stato somministrato DADLE avviene un aumento dell'espressione di alcune chemochine. Tra le chemochine che sono risultate sovraesprese si è deciso di validare, con singoli saggi di Real Time PCR, CCL3 CCL20 CXCL3 e CX<sub>3</sub>CL1, considerate promettenti anche alla luce della letteratura scientifica corrente [285, 287-291].

L'analisi in Real Time PCR ha poi confermato che le cellule unicamente danneggiate esprimono le quattro citochine in maniera minore rispetto alle H9c2 trattate con DADLE e che il dato è statisticamente significativo.

Per concludere, i risultati ottenuti indicano che Dinorfina B e DADLE, utilizzati in un contesto di preconditionamento "continuativo", sono in grado di conferire una protezione diretta dall'apoptosi indotta nelle H9c2 dal modello di microambiente "ischemico" messo a punto per questo progetto.

DADLE, inoltre, agisce sulle cellule H9c2 "ischemiche" spronandole a creare un microambiente capace sia di attirare elementi staminali, sia di promuovere cambiamenti a livello delle FMhMSC (potenziamento delle capacità adesive). In quest'ultimo caso, le proprietà dei medium condizionati che promuovono l'aumento di adesione sono risultate dipendere da un meccanismo mediato direttamente dal recettore  $\delta$  oppioide delle H9c2.

In più, i dati fino ad ora raggiunti suggeriscono che la capacità del microambiente ischemico trattato con DADLE di attirare le cellule staminali possa essere imputabile ad una maggiore espressione di chemochine da parte delle H9c2. Per confermare definitivamente quest'ipotesi, però, sono necessari ulteriori studi: è fondamentale approfondire lo studio delle chemochine sovraesprese per identificare quale sia (o eventualmente quali siano) la chemochina primariamente responsabile dell'azione chemoattrattiva e come agisca all'interno del microambiente.

## VI – BIBLIOGRAFIA

- [1a] Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. “Le basi patologiche delle malattie - Vol. 1: Patologia generale” edizione italiana dell’8° ed. originale, 2010, *Elsevier Masson*, Milano, Cap.12, pag.519-549.
- [1b] Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. “Le basi patologiche delle malattie - Vol. 1: Patologia generale” edizione italiana dell’8° ed. originale, 2010, *Elsevier Masson*, Milano, Cap.1, pag.23-25.
- [2] “WHO - Cardiovascular diseases (CVDs)”, Fact sheet N°317, September 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- [3] Geltman EM. Infarct size as a determinant of acute and long-term prognosis. *Cardiol Clin* 1984; 2(1):95-103.
- [4] Maroko PR, Libby P, Ginks WR, et al. Coronary artery reperfusion. I: Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1972; 51(10):2710-6.
- [5] Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76(5):1713-9.
- [6] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(5):H1723-41.
- [7] Jones CE, Thomas JX, Parker JC, Parker RE. Acute changes in high energy phosphates, nucleotide derivatives, and contractile force in ischaemic and nonischaemic canine myocardium following coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1976; 10(3):275-82.
- [8] Bopassa JC. Protection of the ischemic myocardium during the reperfusion: between hope and reality. *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2(3):223-36.
- [9] Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Garlid KD. Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem* 1996; 271(50):32084-8.
- [10] Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3):H1295-303.
- [11] Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ. Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem J* 1979; 184(3): 547-54
- [12] Opie LH. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. *Circ Res* 1976; 38(5 Suppl 1):I52-74.
- [13] Pike MM, Luo CS, Clark MD, et al. NMR measurements of Na<sup>+</sup> and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol* 1993; 265(6 Pt 2):H2017-26.
- [14] Kupriyanov VV, Yang L, Deslauriers R. Cytoplasmic phosphates in Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> balance in KCN-poisoned rat heart: a <sup>87</sup>Rb<sup>-</sup>, <sup>23</sup>Na<sup>-</sup>, and <sup>31</sup>P-NMR study. *Am J Physiol* 1996; 270(4 Pt 2):H1303-11.
- [15] Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, et al. Intracellular free calcium concentration measured with <sup>19</sup>F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(16):6005-9.
- [16] Hernando V, Inserte J, Sartório CL, et al. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(2):271-9.
- [17] Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, et al. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(5):903-9.
- [18] Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, et al. Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51(2):241-50.
- [19] Smart SC, Sagar KB, Warltier DC. Differential roles of myocardial Ca<sup>2+</sup> channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in myocardial reperfusion injury in open chest dogs: relative roles during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997; 36(3):337-46.
- [20] Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, et al. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012; 94(2):168-80.
- [21] Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787(11):1395-401.
- [22] Honda HM, Ping P. Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20(6):425-32.

- 
- [23] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88(2):581-609.
- [24] Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 1991; 278 (Pt 3):715-9.
- [25] Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1993; 27(10):1790-4.
- [26] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434(7033):658-62.
- [27] Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185(8):1481-6.
- [28] Takemura G, Fujiwara H. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1):56-75.
- [29] Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(3):463-70.
- [30] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5):1124-36.
- [31] Burckhardt B, Yang XM, Tsuchida A, et al. Adenosine extends the window of protection afforded by ischaemic preconditioning in conscious rabbits. *Cardiovasc Res* 1995; 29(5):653-7.
- [32] Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24(3):225-34.
- [33] Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88(3):1264-72.
- [34] Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72(6):1293-9.
- [35] Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* 1997; 92(3):159-67.
- [36] Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24(3):235-54.
- [37] Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83(4):1113-51.
- [38] Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84(1):350-6.
- [39] Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270(2):681-9.
- [40] Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 2):H2157-61.
- [41] Goto M, Liu Y, Yang XM, et al. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77(3):611-21.
- [42] Cohen MV, Yang XM, Liu GS, et al. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001; 89(3):273-8.
- [43] Cohen MV, Philipp S, Krieg T, et al. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(4):842-51.
- [44] Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(1):H468-76.
- [45] Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997; 80:743-8.
- [46] Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:207-16.
- [47] Liu Y, Yang X-M, Iliodromitis EK, et al. Redox signaling at reperfusion is required for protection from ischemic preconditioning but not from a direct PKC activator. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:54-9.
- [48] Costa ADT, Garlid KD, West IC, et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 2005; 97:329-36.
- [49] Costa ADT, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC $\epsilon$ , ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H874-82.
-

- 
- [50] Bell RM, Cave AC, Johar S, et al. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J* 2005; 19:2037–9.
- [51] Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266:H1145–52.
- [52] Ping P, Song C, Zhang J, et al. Formation of protein kinase C $\epsilon$ -Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest* 2002; 109:499–507.
- [53] Liu GS, Cohen MV, Mochly-Rosen D, Downey JM. Protein kinase C- $\epsilon$  is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:1937–48.
- [54] Inagaki K, Begley R, Ikeno F, Mochly-Rosen D. Cardioprotection by  $\epsilon$ -protein kinase C activation from ischemia: continuous delivery and antiarrhythmic effect of an  $\epsilon$ -protein kinase C-activating peptide. *Circulation*. 2005; 111:44–50.
- [55] Inagaki K, Chen L, Ikeno F, et al. Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation* 2003; 108(19):2304-7.
- [56] Mayr M, Metzler B, Chung YL, et al. Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2):H946-56.
- [57] Costa ADT, Jakob R, Costa CL, et al. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2006; 281:20801–8.
- [58] Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res* 2004; 94:7–16.
- [59] Sanada S, Asanuma H, Tsukamoto O, et al. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation* 2004; 110: 51–57.
- [60] Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 2001; 104: 705–710.
- [61] Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007; 12:217–34.
- [62] Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:339–41.
- [63] Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55:534–43
- [64] Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004; 113:1535–49.
- [65] Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90:377–9.
- [66] Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94: 960–966.
- [67] Barandon L, Dufourcq P, Costet P, et al. Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning. *Circ Res* 2005; 96:1299–1306.
- [68] Laude K, Beauchamp P, Thuillez C, Richard V. Endothelial protective effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55:466–73.
- [69] Stein AB, Tang XL, Guo Y, et al. Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning. *Stroke* 2004; 35(11 Suppl 1):2676-9.
- [70] Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, et al. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 1999; 84:1095–10.
- [71] Wang Y, Kudo M, Xu M, et al. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:2037–46.
- [72] Zhao TC, Kukreja RC. Late preconditioning elicited by activation of adenosine A(3) receptor in heart: role of NF- kappa B, iNOS and mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:263–77.
- [73] Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, et al. Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:51–61.
- [74] Li RC, Ping P, Zhang J, et al. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H1679–89.
- [75] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:525–37.
-

- 
- [76] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Role of the protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation* 2005; 112(13):1971-8.
- [77] Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, et al. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res* 2006; 98:133-40.
- [78] Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C314-20.
- [79] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108:79-85.
- [80] Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H542-8.
- [81] Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, et al. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest* 1994; 94:2193-9.
- [82] Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, et al. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1805-13.
- [83] Dana A, Jonassen AK, Yamashita N, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase. *Circulation* 2000; 101:2841-8.
- [84] Zhou JJ, Pei JM, Wang GY, et al. Inducible HSP70 mediates delayed cardioprotection via U-50488H pretreatment in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H40-7.
- [85] Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, et al. Ischemic preconditioning elevates cardiac stress protein but does not limit infarct size 24 or 48 h later in rabbits. *Am J Physiol* 1994; 267:H1476-82.
- [86] Qian YZ, Bernardo NL, Nayeem MA, et al. Induction of 72-kDa heat shock protein does not produce second window of ischemic preconditioning in rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276:H224-34.
- [87] Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2360-71.
- [88] Kim SJ, Kim YK, Takagi G, et al. Enhanced iNOS function in myocytes one day after brief ischemic episode. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H423-8.
- [89] Zhao T, Xi L, Chelliah J, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation* 2000; 102:902-7.
- [90] Jones WK, Flaherty MP, Tang XL, et al. Ischemic preconditioning increases iNOS transcript levels in conscious rabbits via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:1469-81.
- [91] West MB, Rokosh G, Obal D, et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2008; 118:1970-8.
- [92] Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002; 90:602-8.
- [93] Shinmura K, Bolli R, Liu SQ, et al. Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002; 91:240-6.
- [94] Jancso G, Cserepes B, Gasz B, et al. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1095:251-61.
- [95] Sanada S, Node K, Asanuma H, et al. Opening of ATP-sensitive potassium channel attenuates cardiac remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:991-997.
- [96] Patel HH, Hsu AK, Peart JN, Gross GJ. Sarcolemmal K(ATP) channel triggers opioid-induced delayed cardioprotection in the rat. *Circ Res*. 2002; 91:186-8.
- [97] Xu W, Liu Y, Wang S, et al. Cytoprotective role of Ca2+-activated K+ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 2002; 298:1029-33.
- [98] Wang X, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Opening of Ca2+-activated K+ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H2070-7.
-

- 
- [99] Rajesh KG, Sasaguri S, Zhitian Z, et al. Second window of ischemic preconditioning regulates mitochondrial permeability transition pore by enhancing Bcl-2 expression. *Cardiovasc Res*. 2003; 59:297–307.
- [100] Hausenloy DJ, Yellon DM. Adenosine-induced second window of protection is mediated by inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening at the time of reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2004; 18:79–80.
- [101] Peart JN, Headrick JP. Sustained cardioprotection: Exploring unconventional modalities. *Vascular Pharmacology* 2008; 49:63–70.
- [102] Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8(11):619-29.
- [103] McNally GP, Aki H. "Opioid peptides and their receptors: overview and function in pain modulation", cap. 3 in: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. "Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress". American College of Neuropsychopharmacology, 2002.
- [104] Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. "Neuroscience" 2° ed., 2001, *Sinauer Associates*, Sunderland (MA), Cap.6 "Peptide Neurotransmitters". Disponibile presso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10873/>
- [105] Steward O. "Functional neuroscience" 1° ed., 2000, *Springer*, New York, Parte 2 Cap. 9.
- [106] Erspamer V. "Neurotrasmissione e neurotrasmettitori". Enciclopedia della Scienza e della Tecnica Treccani (2007) disponibile presso: [http://www.treccani.it/enciclopedia/neurotrasmissione-e-neurotrasmettitori\\_%28Enciclopedia della Scienza e della Tecnica%29/](http://www.treccani.it/enciclopedia/neurotrasmissione-e-neurotrasmettitori_%28Enciclopedia%20della%20Scienza%20e%20della%20Tecnica%29/)
- [107] "Peptidi oppioidi". Enciclopedia della Scienza e della Tecnica Treccani (2008) disponibile presso: [http://www.treccani.it/enciclopedia/peptidi-oppioidi\\_\(Enciclopedia della Scienza e della Tecnica\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/peptidi-oppioidi_(Enciclopedia_della_Scienza_e_della_Tecnica)/)
- [108] McLaughlin PJ, WuY. Opioid gene expression in the developing and adult rat heart. *Dev Dyn* 1998; 211:153–61.
- [109] Ventura C, Guarnieri C, Vaoma I, et al. Dynorphin gene expression and release in the myocardial cell. *J Biol Chem* 1994; 269:5384–6.
- [110] Barron BA, Gu H, Gaugl JF, Caffrey JL. Screening for opioid peptides in dog hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24:67–77.
- [111] Falcone C, Guasti L, Ochan M, et al. Beta-endorphins during coronary angioplasty in patients with silent or symptomatic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 1614–20.
- [112] Eliasson T, Mannheimer C, Waagstein F, et al. Myocardial turnover of endogenous opioids and calcitonin gene-related peptide in the human heart and the effects of spinal cord stimulation on pacing-induced angina pectoris. *Cardiology* 1988; 89:170–7.
- [113] Maslov LN, Lishmanov YB. Change in opioid peptide level in the heart and blood plasma during acute myocardial ischemia complicated by ventricular fibrillation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 812–6.
- [114] Jackson KE, Farias M, Stanfill AS, Caffrey JL. Transient arterial occlusion raises enkephalin in the canine sinoatrial node and improves vagal bradycardia. *Auton Neurosci Basic Clin* 2001; 256:84–92.
- [115] McDonald J, Lambert DG. Opioid receptors. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 2005; 5 (1): 22-25.
- [116] Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218:877–881.
- [117] Zhu Y, Hsu MS, Pintar JE. Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse. *J Neurosci* 1998; 18:2538–2549.
- [118] Pugsley MK. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2002; 93(1):51-75.
- [119] Wang JB, Imai Y, Eppler CM, et al. Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10230–10234.
- [120] Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(7):709-18.
- [121] Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: Recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol* 2005; 42(5-6):211-8.
- [122] Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, et al. Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim Biophys Acta* 1989; 987:69–74.
- [123] Schultz JE, Gross GJ. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther* 2001; 89:123–137.
- [124] Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87:972–983.
- [125] Liang BT, Gross GJ. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ Res* 1999; 84:1396–1400.
-

- 
- [126] Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:1317–1323.
- [127] Li R, Wong GT, Wong TM, et al. Intrathecal morphine preconditioning induces cardioprotection via activation of delta, kappa, and mu opioid receptors in rats. *Anesth Analg* 2009; 108: 23–29.
- [128] Chien GL, Van Winkle D.M. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1895–1900.
- [129] Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol* 2001; 280:H2175–H2181.
- [130] Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(8):2187–95.
- [131] Takashi Y, Wolff RA, Chien GL, Van Winkle DM. Met5-enkephalin protects isolated adult rat cardiomyocytes via  $\delta$ -opioid receptors. *Am J Physiol* 1999; 277:H2442–H2450.
- [132] Fryer RM, Wang Y, Hsu AK, Gross GJ. Essential activation of PKC-d in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H1346–53.
- [133] Schultz JE, Hsu AK, Nagase H, et al. TAN-67, a d1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels. *Am J Physiol* 1998; 274:H909–H914.
- [134] Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, et al. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via d1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res* 2004; 61:591–599.
- [135] Sigg DC, Coles JA, Oeltgen PR, et al. Role of d-opioid receptor agonists on infarct size reduction in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1953–H1960.
- [136] Shen H, Ben Q, Zhang Y, et al. Role of  $\delta 2$  opioid receptor in cardioprotection against hypoxia-reoxygenation injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 60(3):253–61.
- [137] Maslov LN, Lishmanov YB, Oeltgen PR, et al. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction. *Acad Emerg Med*. 2010; 17:1239–1246.
- [138] Maslov LN, Lishmanov YB, Oeltgen PR, et al. Activation of peripheral delta2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. *Life Sci* 2009; 84:657–663.
- [139] Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation* 1998; 97:1282–9.
- [140] Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, et al. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:1–10.
- [141] Coles JA, Sigg DC, Iaizzo PA. The role of j-opioid receptor activation in pharmacological preconditioning of swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:H2091–9.
- [142] Cao Z, Liu L, Van Winkle DM. Activation of d- and j-opioid receptors by opioid peptides protects cardiomyocytes via KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H1032–9.
- [143] Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of j-opioid receptor. *Circ Res* 1999; 84:1388–95.
- [144] Ho JC, Wu S, Kam KW, et al. Effects of pharmacological preconditioning with U50488H on calcium homeostasis in rat ventricular myocytes subjected to metabolic inhibition and anoxia. *Br J Pharmacol* 2002; 137:739–48.
- [145] Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Effect of exogenous kappa-opioid receptor activation in rat model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:410–5.
- [146] Cheng L, Ma S, Wei LX, et al. Cardioprotective and antiarrhythmic effect of U50,488H in ischemia/reperfusion rat heart. *Heart Vessels* 2007; 22:335–44.
- [147] Wang GY, Wu S, Pei JM, et al. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(1):H384–91.
- [148] Zhang Y, Irwin MG, Wong TM, et al. Remifentanyl preconditioning confers cardioprotection via cardiac kappa- and delta-opioid receptors. *Anesthesiology* 2005; 102(2):371–8.
- [149] Valtchanova-Matchouganska A, Ojewole JA. Mechanisms of opioid delta (delta) and kappa (kappa) receptors' cardioprotection in ischaemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction. *Cardiovasc J S Afr* 2003; 14(2):73–80.
- [150] Peart JN, Gross GJ. Exogenous activation of delta- and kappa-opioid receptors affords cardioprotection in isolated murine heart. *Basic Res Cardiol* 2004; 99:29–3.
- [151] Peart JN, Gross ER, Reichelt ME, et al. Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 2008; 103(5):454–63.
-

- 
- [152] Zhang Y, Irwin MG, Wong TM. Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology* 2004; 101: 918– 923.
- [153] Ai W, Gong J, Yu L. MAP kinase activation by mu opioid receptor involves phosphatidylinositol 3-kinase but not the cAMP/PKA pathway. *FEBS Lett* 1999; 456:196–200.
- [154] Cao Z, Liu L, Van Winkle DM. Met5-enkephalin-induced cardioprotection occurs via transactivation of EGFR and activation of PI3K. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(4):H1955-64.
- [155] Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:136–142.
- [156] Pain T, Yang X-M, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 87:460–466.
- [157] Seymour EM, Wu SY, Kovach M, et al. HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP) channel-dependent delta opioid preconditioning. *J Surg Res* 2003; 114:187–194.
- [158] Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism. *Circ Res* 1996; 78:1100–4.
- [159] Patel HH, Ludwig LM, Fryer RM, et al. Delta opioid agonists and volatile anesthetics facilitate cardioprotection via potentiation of K(ATP) channel opening. *FASEB J* 2002 ; 16:1468– 1470.
- [160] Peart, JN, Gross GJ. Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H81– H89.
- [161] Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, et al. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ Res* 1999; 84:846–51.
- [162] Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res* 1999; 84:1388–95.
- [163] Chen M, Zhou JJ, Kam KW, et al. Roles of KATP channels in delayed cardioprotection and intracellular Ca(2+) in the rat heart as revealed by kappa-opioid receptor stimulation with U50488H. *Br J Pharmacol* 2003; 140:750–8.
- [164] Yu CK, Li YH, Wong GT, et al. Remifentanyl preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat. *Br J Anaesth* 2007; 99:632–8.
- [165] Gross ER, Peart JN, Hsu AK, et al. Extending the cardioprotective window using a novel delta-opioid agonist fentanyl isothiocyanate via the PI3-kinase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H2744–9.
- [166] Cao CM, Xia Q, Tu J, et al. Cardioprotection of interleukin-2 is mediated via kappa-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309:560– 567.
- [167] Wang GY, Zhou JJ, Shan J, Wong TM. Protein kinase C-epsilon is a trigger of delayed cardioprotection against myocardial ischemia of kappa-opioid receptor stimulation in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:603–10.
- [168] Liu J, Kam KW, Borchert GH, et al. Further study on the role of HSP70 on Ca2+ homeostasis in rat ventricular myocytes subjected to simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C583–91.
- [169] Guo Y, Stein AB, Wu WJ, et al. Late preconditioning induced by NO donors, adenosine A1 receptor agonists, and delta1-opioid receptor agonists is mediated by iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H2251–7.
- [170] Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S. COX-2 mediates morphine-induced delayed cardioprotection via an iNOS-dependent mechanism. *Life Sci* 2006; 78:2543–9.
- [171] Kodani E, Xuan YT, Shinmura K, et al. Delta-opioid receptor-induced late preconditioning is mediated by cyclooxygenase-2 in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1943–H1957
- [172] Patel HH, Hsu AK, Gross GJ, COX-2 and iNOS in opioid induced delayed cardioprotection in the intact rat. *Life Sci.* 2004; 75:129–140.
- [173] Jiang X, Shi E, Nakajima Y, et al. Cyclooxygenase-1 mediates the final stage of morphine-induced delayed cardioprotection in concert with cyclooxygenase-2. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1707–15.
- [174] Peart JN, Gross ER, Headrick JP, Gross GJ. Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:972–980.
- [175] Qi JS, Kam KW, Chen M, et al. Failure to confer cardioprotection and to increase the expression of heat-shock protein 70 by preconditioning with a kappa-opioid receptor agonist during ischaemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 2004; 47:214–20.
- [176] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs *Exp Hematol* 1976; 4: 267–274.
- [177] Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5):641-50.
- [178] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
-

- 
- [179] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(1):32-45.
- [180] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95(1):9-20.
- [181] Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95(12):1191-9.
- [182] Kim DH, Yoo KH, Choi KS, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005; 31(2):119-26.
- [183] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309):71-4.
- [184] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41-9.
- [185] Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol* 2002; 325(10):1027-38.
- [186] Zhao RC, Liao L, Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *J Lab Clin Med* 2004; 143(5):284-91.
- [187] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30(1):42-8.
- [188] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75(3):389-97.
- [189] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10):3838-43.
- [190] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4):1815-22.
- [191] Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3):429-35.
- [192] Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2(6):477-88.
- [193] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279-95.
- [194] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13625-30.
- [195] Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, et al. Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiol Immunol* 2003; 47(1):109-16.
- [196] In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22(7):1338-45.
- [197] Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004; 78(10):1439-48.
- [198] Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem* 2007; 282(19):14243-52.
- [199] Gnecci M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascular Pharmacology* 2012; 57:48-55.
- [200] Fedak PW, Verma S, Weisel RD et al. Cardiac remodeling and failure: From molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol* 2005; 14:1-11.
- [201] Bramucci E, Repetto A, Ferrario M, et al. Effectiveness of adjunctive stent implantation following directional coronary atherectomy for treatment of left anterior descending ostial stenosis. *Am. J. Cardiol* 2002; 90:1074-1078.
- [202] Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118(20):2057-62.
- [203] Gheorghide M, Bonow RO. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97:282-289.
- [204] Fang J, Mensah GA, Croft JB, Keenan NL. Heart failure-related hospitalization in the U.S. 1979 to 2004. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:428-434.
- [205] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(3):513-22.
- [206] Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4(8):929-33.
- [207] Li RK, Weisel RD, Mickle DA, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119(1):62-8.
-

- 
- [208] Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122(4):699-705.
- [209] Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, et al. Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl):I96-104.
- [210] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1):93-8.
- [211] Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, et al. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl):I181-5.
- [212] Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(6):1168-73.
- [213] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9:1195-201.
- [214] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(6):1919-25.
- [215] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(32):11474-9.
- [216] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123:1132-40.
- [217] Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100:II247-II256.
- [218] Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, et al. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 2008; 26:2201-10.
- [219] Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease *Circ. Res* 2011; 109:923-940.
- [220] Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J et al. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50:280-289.
- [221] Gnecci M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy *Circ Res* 2008; 103:1204-1219.
- [222] Muller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:876-884.
- [223] Gnecci M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20:661-9.
- [224] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 2007; 21:3197-207.
- [225] Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol* 2005; 100:471-81.
- [226] Xu M, Uemura R, Dai Y, et al. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(2):441-8.
- [227] Dai Y, Xu M, Wang Y, et al. HIF-1 $\alpha$  induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:1036-44.
- [228] Hung S-C, Pochampally R, Chen S-C, et al. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25:2363-70.
- [229] Timmers L, Lim SK, Arslan F, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 2007; 1:129-37.
- [230] Angoulvant D, Ivanes F, Ferrera R, et al. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30(1):95-102.
- [231] Tse HF, Zhu SG, Zhang OY, et al. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow mononuclear cells to enhance neovascularisation in chronic ischemic myocardium. *Eur J Heart Fail* 2007; 9:747-753.
- [232] Dai W, Hale SL, Kloner RA. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regen Med* 2007; 2:63-8.
-

- 
- [233] Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, et al. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett* 2007; 581:3961-6.
- [234] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010; 19(6):667-79.
- [235] Cselenyák A, Pankotai E, Horvath EM, et al. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol* 2010; 11:29.
- [236] Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J* 2011; 32(10):1197-206.
- [237] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009; 30:2978–2984.
- [238] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106:1913–1918.
- [239] Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95:742–748.
- [240] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106:3009–3017.
- [241] Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1690–1699.
- [242] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355:1210–1221.
- [243] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141–148.
- [244] Tayyareci Y, Sezer M, Umman B, et al. Intracoronary autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation improves coronary collateral vessel formation and recruitment capacity in patients with ischemic cardiomyopathy: a combined hemodynamic and scintigraphic approach. *Angiology* 2008; 59(2):145-55.
- [245] Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367:113–121.
- [246] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355:1199–1209.
- [247] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; 27:2775–2783.
- [248] Assmus B, Rolf A, Erbs S, et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010; 3:89–96.
- [249] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113:1287–1294.
- [250] Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J* 2006; 27:929–935.
- [251] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009; 30:2978–2984.
- [252] Yousef M, Schannwell CM, Kosterling M, et al. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:2262–2269.
- [253] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:2277–2286.
- [254] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009; 18:683–692.
-

- 
- [255] Chen SL, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94(1):92-5.
- [256] Chen SL, Fang WW, Qian J, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117(10):1443-8.
- [257] Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan TW. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006; 18:552–556.
- [258] Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, et al. The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J* 2006; 27(11):1338-40.
- [259] Traverse JH, Henry TD, Moye' LA. Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging. *Am Heart J* 2011; 162(4):671-7.
- [260] Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Cochrane Coron Artery Dis* 2008; 19(5):327-35.
- [261] Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2:CD006536.
- [262] Zhao Q, Ye X. Additive value of adult bone-marrow-derived cell transplantation to conventional revascularization in chronic ischemic heart disease: a systemic review and meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(12):1569-79.
- [263] Xin Y, Wang YM, Zhang H, et al. Aging adversely impacts biological properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: implications for tissue engineering heart valve construction. *Artif Organs* 2010; 34:215-22.
- [264] Egan CG, Caporali F, Huqi AF, et al. Reduced levels of putative endothelial progenitor and CXCR4+ cells in coronary artery disease: kinetics following percutaneous coronary intervention and association with clinical characteristics. *Thromb Haemost* 2009; 101:1138–1146.
- [265] Hare JM. Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. *Tex Heart Inst J* 2009; 36:145-7.
- [266] LaPar DJ, Kron IL, Yang Z. Stem cell therapy for ischemic heart disease: Where are we?. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2009; 14:79–84.
- [267] Dai W, Kloner RA. Bone marrow-derived cell transplantation therapy for myocardial infarction: lessons learned and future questions. *Am J Transplant* 2011; 11(11):2297-301.
- [268] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53:31–47.
- [269] Schachinger V, Aicher A, Dobert N, et al. Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium. *Circulation* 2008; 118:1425–1432.
- [270] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; 108:863–868.
- [271] Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003; 107:2134–2139.
- [272] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111:2198–2202.
- [273] Brunskill SJ, Hyde CJ, Doree CJ, et al. Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bone-marrow derived cell therapy for ischaemic heart disease. *Eur J Heart Fail* 2009; 11:887–896.
- [274] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006; 108:3938–3944.
- [275] Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* 2010; 28:585–596.
- [276] Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 2008;9(9):970-80.
- [277] Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: New insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 2010; 16(3):133-44.
- [278] Ip JE, Wu Y, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell* 2007; 18(8):2873-82.
-

- 
- [279] Wu Y, Ip JE, Huang J, et al. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 2006; 99:315–322.
- [280] Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: From inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 2004; 53:585–595.
- [281] Schenk S, Mal N, Finan A, et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 2007; 25:245–251.
- [282] Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine* 2005; 32:270–279.
- [283] Kim MO, Suh HS, Brosnan CF, Lee SC. Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. *J Neurochem* 2004; 90:297–308.24.
- [284] Croitoru-Lamoury J, Guillemin GJ, Boussin FD, et al. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 2003; 41:354–370.
- [285] Croitoru-Lamoury J, Lamoury FM, Zaunders JJ, et al. Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27(1):53-64.
- [286] Ponte AL, Marais E, Galloway N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 2007; 25(7):1737-45.
- [287] Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106(2):419-27.
- [288] Ringe J, Strassburg S, Neumann K, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 2007; 101(1):135-46.
- [289] Hung S-C, Pochampally RR, Hsu S-C, et al. Short-Term Exposure of Multipotent Stromal Cells to Low Oxygen Increases Their Expression of CX3CR1 and CXCR4 and Their Engraftment In Vivo. *PLoS ONE* 2007; 2(5): e416.
- [290] Kroeze KL, Jurgens WJ, Doulabi BZ, et al. Chemokine-mediated migration of skin-derived stem cells: predominant role for CCL5/RANTES. *J Invest Dermatol* 2009; 129(6):1569-81.
- [291] Chamberlain G, Smith H, Rainger GE, Middleton J. Mesenchymal Stem Cells Exhibit Firm Adhesion, Crawling, Spreading and Transmigration across Aortic Endothelial Cells: Effects of Chemokines and Shear. *PLoS ONE* 2011; 6(9):e256-63.
- [292] Wu Y, Zhao RCH. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Myocardium *Stem Cell Rev and Rep* 2012; 8:243–250.
- [293] Binger T, Stich S, Andreas K, et al. Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25. *Exp Cell Res* 2009; 315(8):1468-79.
- [294] Zhu J, Zhou Z, Liu Y, Zheng J. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the migration of intravenously grafted human bone marrow stromal cells toward ischemic brain lesion in rats. *Brain Res* 2009; 1287:173-83.
- [295] Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, et al. Hypoxic preconditioning induces the expression of pro-survival and pro-angiogenic markers in mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(6):C1562-70.
- [296] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, et al. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1339-50.
- [297] Ii M, Nishimura H, Iwakura A, et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circulation* 2005; 111:1114–1120.
- [298] Kamota T, Li TS, Morikage N, et al. Ischemic preconditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1814–1822.
- [299] Kimura M, Ueda K, Goto C, et al. Repetition of ischemic preconditioning augments endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-derived nitric oxide and endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(6):1403-10.
- [300] Gyongyosi M, Posa A, Pavo N, et al. Differential effect of ischaemic preconditioning on mobilisation and recruitment of hematopoietic and mesenchymal stem cells in porcine myocardial ischaemic reperfusion. *Thromb Haemost* 2010; 103: 376-384.
- [301] Huang PP, Yang XF, Li SZ, et al. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1335–1342.
- [302] Lian Q, Tse HF. Ischaemic preconditioning and stem cell mobilisation. *Thromb Haemost* 2010; 104(2):194-5.
-

- 
- [303] Caretti A, Bianciardi P, Sala G, et al. Supplementation of creatine and ribose prevents apoptosis in ischemic cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2010; 26(6):831-8.
- [304] Urmaliya VB, Church JE, Coupar IM, et al. Cardioprotection induced by adenosine A1 receptor agonists in a cardiac cell ischemia model involves cooperative activation of adenosine A2A and A2B receptors by endogenous adenosine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53(5):424-33.
- [305] Alloatti G, Arnoletti E, Bassino E, et al. Obestatin affords cardioprotection to the ischemic-reperfused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(2):H470-81.
- [306] Hohl CM, Garleb AA, Altschuld RA. Effects of simulated ischemia and reperfusion on the sarcoplasmic reticulum of digitonin-lysed cardiomyocytes. *Circ Res* 1992; 70(4):716-23.
- [307] Benjamin IJ, Horie S, Greenberg ML, et al. Induction of stress proteins in cultured myogenic cells. Molecular signals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia. *J Clin Invest* 1992; 89(5):1685-9.
- [308] Re RN, Cook JL. Mechanisms of disease: Intracrine physiology in the cardiovascular system. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4(10):549-57.
- [309] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.