



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

——— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ———

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης:

«Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων»

Κατεύθυνση: Φαρμακολογία

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Θετικών Επιστημών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Διπλωματική εργασία με θέμα :

«Μελέτη της επαγόμενης καρδιοπροστασίας από τον αναστολέα
συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης 2 (SGLT-2), Εμπαγλιφλοζίνη, σε υγιείς
μύες»

Αμπού-Κούρα Φαϊρούζ

ΑΜ: 170122

Φαρμακοποιός

Ιούλιος 2019

Πρόλογος

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την αναπληρώτρια καθηγήτρια Φαρμακολογίας του ΕΚΠΑ κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα για την πολύτιμη ευκαιρία να συμμετάσχω στην επιστημονική της ομάδα καθώς και για την εμπιστοσύνη της στην ανάθεση του θέματος και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού σε επιστημονικό και συγγραφικό επίπεδο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής για τις επισημάνσεις και διορθώσεις της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ πολύ όλους τους συνεργάτες του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών ΙΙΒΕΑΑ για την ευγενική χορηγία των πειραματόζων, για τη φιλοξενία κατά τη διαχείρισή τους και ιδιαίτερα την τεχνικό εργαστηρίων Βαρελά Αιμιλία για την άμεση ανταπόκρισή της στη λήψη και αξιολόγηση των υπερήχων.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στα εκλεκτά μέλη του εργαστηρίου. Καταρχήν να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα Τσουμάνη Μαρία, την υποψήφια διδάκτορα Νικολάου Παναγιώτα Ευσταθία και τον παλαιό μεταπτυχιακό του εργαστηρίου Κρεμαστιώτη Γιώργο για την εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο, τη μετάδοση του ερευνητικού τρόπου σκέψης και την υπομονή και επιμονή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Γεωργίου για τη λήψη φασμάτων H-NMR που απαιτήθηκαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Χατζηστεφάνου Μιχαήλ, Ψαράκου Γαρυφαλλιά, Μπέση Λαζάρου Παύλο, και Τσακαλίδη Φωτεινή για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, για τη στήριξη και τη βοήθεια καθώς και για την επικοινωνιακή ανταλλαγή απόψεων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δόκτορα Sara Feminno από το εργαστήριο μελέτης της αθηροσκλήρωσης στο πανεπιστήμιο του Τορίνο Ιταλίας, για την εξαιρετική συνεργασία στην πραγματοποίηση των in vitro πειραμάτων που χρειάστηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στα πιο σημαντικά άτομα στη ζωή μου, την οικογένεια και τους φίλους μου. Ευχαριστώ λοιπόν τους γονείς μου για την αγάπη τους, την αμέριστη συμπαράστασή τους και την πολύτιμη συνεισφορά τους σε κάθε μου βήμα παρόλες τις δυσκολίες που μπορεί να αντιμετώπιζαν. Ευχαριστώ τα αδέρφια μου και τους φίλους μου που με στήριζουν και είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε στιγμή και με βοηθάνε με ένα χαμόγελο και μια αγκαλιά να ξεπερνάω τη κάθε δυσκολία.

Πίνακας περιεχομένων

Abstract	4
Περίληψη.....	6
1. Εισαγωγή	8
1.1 Ο ρόλος του νεφρού στον μεταβολισμό της γλυκόζης	8
1.2 Συμμεταφορείς Νατρίου-Γλυκόζης	9
1.3 Αναστολείς συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης 2 (SGLT2is), μηχανισμός δράσης και ιδιότητες μείωσης της γλυκόζης.....	10
1.4 Επιδράσεις των αναστολέων SGLT-2 πέραν του ελέγχου της γλυκόζης	14
1.5 Εμπαγλιφλοζίνη (Jardiance®).....	17
1.5.1 Ιδιότητες Εμπαγλιφλοζίνης	17
1.5.2 Μελέτη EMPA-REG	19
1.5.3 Προκλινικές μελέτες διερεύνησης της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης και άλλων αναστολέων SGLT2	21
1.6 Στεφανιαία νόσος.....	24
1.7 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (OEM)	25
1.7.1 Επιδημιολογία OEM.....	25
1.7.2 Διάγνωση OEM	26
1.7.3 Παθοφυσιολογία OEM.....	27
1.7.4 Μορφές κυτταρικού θανάτου και ο ρόλος τους κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση	28
1.8 Καρδιοπροστασία και καρδιοπροστατευτικές παρεμβάσεις	34
1.9 Μεταγωγή σήματος καρδιοπροστασίας	35
1.10 Ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές καρδιοπροστασίας.....	36
1.10.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι eNOS/PKG	36
1.10.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι RISK (Reperfusion injury salvage kinase)	36
1.10.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement)	37
1.10.4 Αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών RISK και SAFE	40
2. Στόχος Εργασίας.....	41
3. Πειραματικό Μέρος	42
3.1 Πειραματική Διαδικασία Απομόνωσης της Εμπαγλιφλοζίνης.....	42
3.2 Διαχείριση Πειραματοζώων.....	43
3.3 Πειραματικά Πρωτόκολλα	44
3.4 Μέτρηση Επιπέδων Γλυκόζης Νηστείας.....	48

3.5 Μέτρηση Αρτηριακής Πίεσης	48
3.6 Υπερηχογραφική αξιολόγηση	49
3.7 Χειρουργική Διαδικασία Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης σε μύες	49
3.8 Αναλυτικές Μέθοδοι	53
3.8.1 Western blot.....	53
3.8.2 Χρωματομετρική μέθοδος μέτρησης κυτταροτοξικότητας - MTT	69
3.9 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	69
4. Αποτελέσματα.....	70
4.1 Η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν μείωσε την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε υγιείς μύες	70
4.2 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε τα βάρη υγιών μυών	71
4.3 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης υγιών μυών .	72
4.4 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε την αρτηριακή πίεση των υγιών μυών.....	72
4.5 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε τη καρδιακή λειτουργία και τους δείκτες καρδιακής μορφολογίας των υγιών μυών	73
4.6 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης μείωσε σημαντικά την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου στους υγιείς μύες	76
4.7 Αποτελέσματα WB	78
4.8 Η Εμπαγλιφλοζίνη επανέφερε μερικώς τη κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων H9C2 και HUVEC ύστερα από τη βλάβη υποξίας/επανοξυγόνωσης παρουσία του STATTIC	81
5. Συζήτηση.....	83
6. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές.....	87
Βιβλιογραφία.....	88

Abstract

The sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inhibitors , are a novel class of agents indicated for the improvement of glycemic control in adults with type 2 diabetes mellitus (T2DM). By enhancing glucose excretion through the urinary tract and reducing plasma glucose levels through an insulin-independent mechanism, they face many of the restrictions of other available therapeutic agents for T2DM such as hypoglycemia and weight gain. SGLT2 inhibitors also exhibit other important non-glycemic effects such as blood pressure lowering, body weight reduction and favorably altering fat distribution.

Empagliflozin one of the newest members of this class, in the EMPA-REG clinical trial, has shown a significant reduction in cardiovascular mortality in T2DM patients with established cardiovascular disease. The positive results of this trial led our laboratory research team to investigate the effects of Empagliflozin on myocardial infarction following ischemia / reperfusion injury. Thus, after chronic administration to a diabetic mouse model that was subjected to ischemia / reperfusion surgical intervention, Empagliflozin showed significantly reduced infarct size compared to the control group, and further investigation showed that its cardioprotective effect is likely to be due to activation of the STAT-3 transcription factor independently of the RISK signaling pathway and AMPK kinase. Also, treatment with Empagliflozin, enhanced cell viability after hypoxia / reoxygenation injury (Andreadou et al., 2017).

In the present study, for further investigation of the cardioprotective effects of Empagliflozin, protocols of acute and chronic administration were designed and executed on a healthy experimental mouse model, as well as an in vitro protocol investigating the viability of HUVEC and H9C2 cells in the presence of Empagliflozin and the inhibitor of STAT-3 activation, STATIC. Macroscopic assessment of myocardial infarct size, western blot analysis of myocardial tissues, and cell viability assay using MTT technique were performed. Results showed that acute administration of Empagliflozin in the healthy experimental model had no effect on the extent of myocardial infarction. In contrast, chronic administration resulted in a statistically significant reduction in infarct size and increased activation of the STAT-3 transcription factor without any changes in the activation of ERK1 / 2, AMPK, and the anti-oxidant MnSOD2 compared to the control group. In addition, the results of the MTT analysis showed that Empagliflozin enhances cell viability while the STAT-3 activation inhibitor significantly reduces it. The co-treatment of STATIC and Empagliflozin

partly restores cell viability, indicating a potential involvement of STAT-3 in the Empagliflozin-induced protection mechanism.

Περίληψη

Οι αναστολείς των συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης 2 (SGLT-2), αποτελούν τη νεότερη ομάδα φαρμάκων που εγκρίθηκαν για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Ενισχύοντας την απέκκριση της γλυκόζης μέσω του ουροποιητικού συστήματος και μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου της ινσουλίνης, αντιμετωπίζουν πολλούς από τους περιορισμούς των διαθέσιμων θεραπειών για το ΣΔ2 όπως την υπογλυκαιμία και την αύξηση του βάρους. Οι αναστολείς SGLT2 παρουσιάζουν και άλλα σημαντικά μη γλυκαιμικά αποτελέσματα όπως την μείωση της πίεσης του αίματος και του σωματικού βάρους και την ευνοϊκή μεταβολή της κατανομής του λίπους.

Η Εμπαγλιφλοζίνη, ένα από τα νεότερα μέλη της ομάδας αυτής, στη κλινική μελέτη EMPA-REG, έδειξε σημαντική μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας σε ασθενείς με ΣΔ2 και εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο. Τα θετικά αυτά αποτελέσματα, οδήγησαν την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας στη διερεύνηση της δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης στο έμφραγμα του μυοκαρδίου ύστερα από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Έτσι, μετά τη χρόνια χορήγησή της σε διαβητικό μοντέλο μυών και την υποβολή τους σε χειρουργική παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, η Εμπαγλιφλοζίνη έδειξε να μειώνει σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ επιπλέον διερεύνηση έδειξε ότι ο η καρδιοπροστατευτική της δράση πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 και να είναι ανεξάρτητη της οδού σηματοδότησης RISK και της κίνησης AMPK. Επίσης, η παρουσία Εμπαγλιφλοζίνης, έδειξε να διατηρεί τη βιωσιμότητα κυττάρων που υποβλήθηκαν σε υποξία/επανοξυγόνωση (Andreadou et al., 2017).

Στη παρούσα εργασία, για την περαιτέρω διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν πρωτόκολλα οξείας και χρόνιας χορήγησής της σε υγιές πειραματικό μοντέλο μυών καθώς και ένα πρωτόκολλο διερεύνησης της βιωσιμότητας κυττάρων HUVEC και H9C2 παρουσία της Εμπαγλιφλοζίνης και του αναστολέα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3, STATIC. Πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική εκτίμηση του μεγέθους του εμφράγματος του μυοκαρδίου, αναλύσεις των μυοκαρδιακών ιστών με τεχνική Western Blot καθώς και εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση τεχνικής MTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης στο υγιές πειραματικό μοντέλο δεν έχει

επίδραση στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αντίθετα, η χρόνια χορήγηση οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους του εμφράγματος και αύξηση της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 χωρίς να παρατηρηθεί αλλαγή στην ενεργοποίηση των ERK1/2, AMPK, και του αντιοξειδωτικού παράγοντα MnSOD2 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον τα αποτελέσματα της ανάλυσης MTT έδειξαν ότι η εμπαγλιφλοζίνη αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενώ ο αναστολέας του STAT-3, STATIC, τη μειώνει σημαντικά. Η συγχορήγηση του STATIC και της Εμπαγλιφλοζίνης επαναφέρει τη βιωσιμότητα των κυττάρων μερικώς, υποδηλώνοντας έτσι την πιθανή εμπλοκή του STAT-3 στον επαγόμενο από την Εμπαγλιφλοζίνη μηχανισμό προστασίας.

1. Εισαγωγή

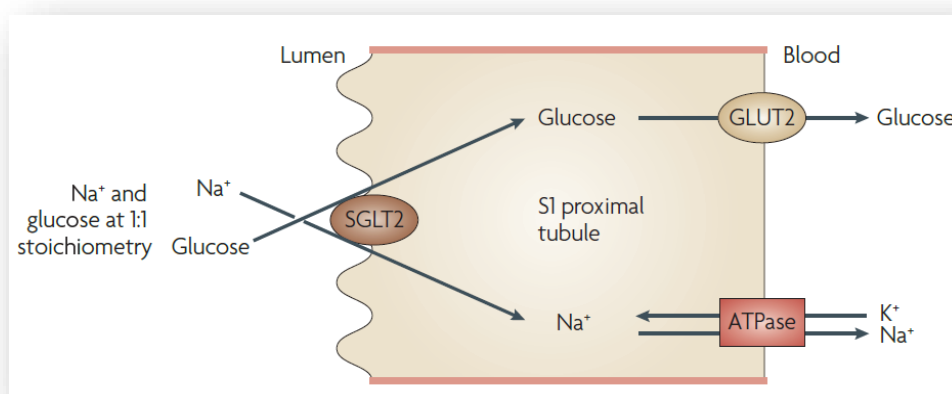
1.1 Ο ρόλος του νεφρού στον μεταβολισμό της γλυκόζης

Οι νεφροί κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης στον οργανισμό, μέσω της συμβολής τους στη γλυκονεογένεση και της ικανότητάς τους να απορροφούν γλυκόζη από τα ούρα (Gerich, 2010). Σε υγιή άτομα, διηθούνται από τους νεφρούς καθημερινά περίπου 160-180 g γλυκόζης (Marsenic, 2009). Υπό φυσιολογικές συνθήκες σχεδόν όλη η διηθημένη γλυκόζη επαναρροφάται συζευγμένη με νάτριο στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του νεφρώνα από τους δύο συμμεταφορείς νατρίου-γλυκόζης 1 (SGLT-1) και 2 (SGLT-2). Ο SGLT-2, συμμεταφορέας χαμηλής συγγένειας και υψηλής δυνατότητας για μεταφορά γλυκόζης (Rahmoune et al., 2005), βρίσκεται στο πρώτο μέρος του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και είναι υπεύθυνος για το 80-90% της συνολικής επαναρρόφησης της γλυκόζης στην κυκλοφορία. Ο SGLT-1, υψηλής συγγένειας αλλά χαμηλής δυνατότητας για μεταφορά γλυκόζης (Chao & Henry, 2010), βρίσκεται πιο απομακρυσμένος στο ευθύ τμήμα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και είναι υπεύθυνος μόνο για το υπόλοιπο 10-20% της επαναρρόφησης της γλυκόζης. Η επαναπορρόφηση γλυκόζης από τους συμμεταφορείς αυτούς είναι μια διαδικασία ανεξάρτητη της ινσουλίνης (Wright et al., 2011).

Οι πρωτεΐνες συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης είναι πρωτεΐνες υπεύθυνες για την ενεργή μεταφορά της γλυκόζης συζευγμένης με νάτριο έναντι βαθμίδωσης της συγκέντρωσής της στο κύτταρο. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της ενεργής μεταφοράς νατρίου εκτός του κυττάρου από την εξαρτώμενη από την τριφωσφορική αδενοσίνη αντλία νατρίου-καλίου (Saeed et al., 2014). Η ενδοκυτταρική γλυκόζη διαχέεται παθητικά από το κύτταρο, από τους μεταφορείς γλυκόζης τύπου 2 (GLUT2 επίσης γνωστός ως SLC2A2) και 1 (GLUT1 επίσης γνωστός ως SLC2A1) που εντοπίζονται στη πλευροβασική μεμβράνη του κυττάρου (Εικόνα 1). Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα υπερβεί το όριο απέκκρισης από τα νεφρικά σωληνάρια των 180 mg / dL, προκαλείται γλυκοζουρία (Chao et al., 2010).

Σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και χρόνια υπεργλυκαιμία, ο ουδός απέκκρισης αυξάνει παραδόξως στα 220 mg / dL λόγω αύξησης της μέγιστης ικανότητας νεφρικής επαναρρόφησης της γλυκόζης που προκαλείται από την «ρύθμιση προς τα πάνω» του SGLT-2 στο εγγύς σωληνάριο. Αυτός ο λανθασμένος προσαρμοστικός μηχανισμός φαίνεται να εξηγείται από την αυξημένη μεταγραφή και μετάφραση του SGLT-2 που οδηγεί στην αύξηση της έκφρασής του στο εγγύς σωληνάριο του νεφρώνα (Chao et al., 2010; Kamran et

al., 1997) και πιθανόν να κατέχει κάποιο ρόλο στη διατήρηση της υπεργλυκαιμίας σε αυτούς τους ασθενείς (Felicetta et al., 1988). Η ρύθμιση αυτή, φαίνεται να είναι αναστρέψιμη, καθώς εξομαλύνεται με αντιδιαβητική θεραπεία (Farber et al., 1951). Επιπλέον, η συμμεταφορά νατρίου έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απέκκριση νατρίου από τους νεφρούς και την αύξηση της συγκέντρωσής του στο σώμα, η οποία μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη και επιδείνωση της υπέρτασης στους ασθενείς με ΣΔ2 (Felicetta et al., 1988).



Εικόνα 1. Ενεργή μεταφορά γλυκόζης με σύζευξη Na^+ κατά μήκος της μεμβράνης του αυλού (Chao et al., 2010).

1.2 Συμμεταφορείς Νατρίου-Γλυκόζης

Ο SGLT-2 όπως είναι γνωστό, εκφράζεται αποκλειστικά στους νεφρούς, ενώ ο SGLT-1 εκφράζεται επίσης στο λεπτό έντερο, στη καρδιά και στο πνευμονικό ιστό (Wright et al., 2011). Πέρα από το ρόλο του στους νεφρούς, ο SGLT-1 είναι επίσης υπεύθυνος για το κύριο μέρος της απορρόφησης της γλυκόζης και της γαλακτόζης στο λεπτό έντερο (Bays, 2013). Ο ρόλος των υπόλοιπων μελών της οικογένειας συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης στο γλυκαιμικό έλεγχο είναι λιγότερο κατανοητός. Ο SGLT-3 εκφράζεται σε νευρώνες του λεπτού εντέρου και σε νευρομυϊκές ενώσεις του σκελετικού μυός και δεν είναι ικανός να μεταφέρει μονοσακχαρίτες, αλλά μεταφέρει το νάτριο ύστερα από τη πρόσδεσή του με ένα μόριο γλυκόζης. Τρεις επιπλέον συμμεταφορείς νατρίου-γλυκόζης, οι SGLT-4, 5 και 6, εκφράζονται στους νεφρούς και ενδεχομένως παίζουν ρόλο στη νεφρική απορρόφηση μονοσακχαριτών ή / και νατρίου. Έχει αποδειχθεί ότι ο SGLT-4, που επίσης εκφράζεται

έντονα στο λεπτό έντερο, μεταφέρει μαννόζη, 1,5-ανυδρο-D-γλυκικόλη και φρουκτόζη με εξαρτώμενο από το νάτριο τρόπο. Επιπλέον ο SGLT-5, όπως και ο SGLT-2, εντοπίζεται αποκλειστικά στον φλοιό των νεφρών, παρόλα αυτά ο ρόλος του στη μεταφορά μονοσακχαριτών δεν έχει τεκμηριωθεί. Τέλος ο SGLT-6 είναι ένας υψηλής συγγένειας μεταφορέας μυοϊνσιτόλης που εκφράζεται στον εγκέφαλο και στο έντερο (Grempler et al., 2012).

Πίνακας 1. Συμμεταφορείς Νατρίου-Γλυκόζης (Τροποποίηση από (Bays, 2013))

Μεταφορέας	Περιοχή δράσης	Λειτουργία
SGLT1 (SLC5A1)	Νεφρός, λ.έντερο (τραχεία, καρδιά, εγκέφαλος, όρχεις, προστάτης)	Μεταφέρει γλυκόζη στο νεφρό και γλυκόζη/γαλακτόζη στο λ. έντερο
SGLT2 (SLC5A2)	Νεφρός (εγκέφαλος, ήπαρ, θυρεοειδής, μύες, καρδιά)	Μεταφέρει γλυκόζη και νάτριο στο εγγύς σωληνάριο
SGLT3 (SLC5A4)	Λ. έντερο, μήτρα, πνεύμονες, θυρεοειδής και όρχεις	Μεταφέρει νάτριο (όχι γλυκόζη)
SGLT4 (SLC5A9)	Λ. έντερο, νεφροί, ήπαρ, στόμαχος και πνεύμονες	Μεταφέρει γλυκόζη και μαννόζη
SGLT5 (SLC5A10)	Νεφροί	Άγνωστη
SGLT6 (SLC5A11)	Εγκέφαλος, νεφροί και έντερο	Μυοϊνσιτόλη, γλυκόζη

1.3 Αναστολείς συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης 2 (SGLT2is), μηχανισμός δράσης και ιδιότητες μείωσης της γλυκόζης

Η αναστολή των SGLT-2 είναι γνωστή από τη γενετική διαταραχή ονομαζόμενη ως «οικογενής νεφρική γλυκοζουρία», η οποία χαρακτηρίζεται από μεταβαλλόμενους βαθμούς έκκρισης της γλυκόζης στα ούρα υπό φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ο SGLT-2 κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC5A2. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 44 διαφορετικές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητάς του οδηγούν σε αυτές τις σπάνιες περιπτώσεις οικογενούς νεφρικής γλυκοζουρίας. Οι περισσότεροι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή είναι ασυμπτωματικοί και πολύ σπάνια πάσχουν από υπογλυκαιμία, ή ουρογεννητικές λοιμώξεις (Santer et al., 2010).

Η περίσσεια γλυκόζης που δεν λαμβάνεται από τον SGLT-2 επαναρροφάται από τον SGLT-1, ο οποίος εντοπίζεται στο S3 τμήμα του εγγύς σωληναρίου. Όπως αναφέρθηκε

προηγουμένως, σε αντίθεση με τον SGLT-2, ο SGLT-1 εκφράζεται και στο έντερο, την καρδιά, το ήπαρ και τους πνεύμονες, με κύρια λειτουργία την απορρόφηση γλυκόζης και γαλακτόζης στο λεπτό έντερο. Ως εκ τούτου, η εκλεκτικότητα των αναστολέων SGLT για τον SGLT-2 έναντι του SGLT-1 είναι σημαντική, καθώς η αναστολή της απορρόφησης της γλυκόζης από το έντερο μπορεί να οδηγήσει σε «δυσαπορρόφηση γλυκόζης-γαλακτόζης», μια νόσο που χαρακτηρίζεται από σοβαρή αφυδάτωση και διάρροια και παρατηρείται σε άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο του SGLT-1 (Grempler et al., 2012).

Ο πρώτος αναστολέας SGLT2 που ανακαλύφθηκε ήταν η Φλοριζίνη, ένα φυσικής προέλευσης φλαβονοειδές που βρίσκεται κυρίως στο φλοιό της μηλιάς. Η Φλοριζίνη μελετήθηκε αρχικά ως πιθανός φαρμακευτικός παράγοντας, αλλά εγκαταλείφθηκε λόγω χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και μη-εκλεκτικής αναστολής των SGLT-1 και SGLT-2 (Ehrenkranz, Lewis, Kahn, & Roth, 2005). Υπάρχουν διάφοροι διαθέσιμοι εκλεκτικοί αναστολείς SGLT-2 παγκοσμίως (Πίνακας 2). Μέχρι στιγμής, έχουν εγκριθεί στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ, η Δαπαγλιφλοζίνη (Forxiga®), η Καναγλιφλοζίνη (Innovokana®), η Εμπαγλιφλοζίνη (Jardiance®), και η Ερτουγλιφλοζίνη (Steglatro®) (Ferrannini et al., 2015).



Εικόνα 2. Χημική δομή Φλοριζίνης (Bays, 2013)

Πίνακας 2. Αναστολείς Συμμεταφορέα Νατρίου-Γλυκόζης (Τροποποίηση από (Chao et al., 2010))

Χημική ουσία	Εμπορική ονομασία	Εταιρεία
Dapagliflozin	FORXIGA™	Bristol Myers-Squibb and Astra Zeneca
Canagliflozin	INVOKANA™	Johnson & Johnson and Mitsubishi Tanabe
Empagliflozin	JARDIANCE	Boehringer Ingelheim and Eli Lilly
Ipragliflozin	SUGLAT	Astellas and Kotobuki
Tofogliflozin		Roche and Chugai Pharmaceuticals
Luseogliflozin		Taisho Pharmaceuticals
Erugliflozin		Pfizer
Remogliflozin		Kissei and BHV
GW869682		GlaxoSmithKline
ISIS 388626		Isis
LX 4211		Lexicon Pharmaceuticals
EGT0001442		Theracos
SAR-7226, AVE-2268		Sanofi-Aventis

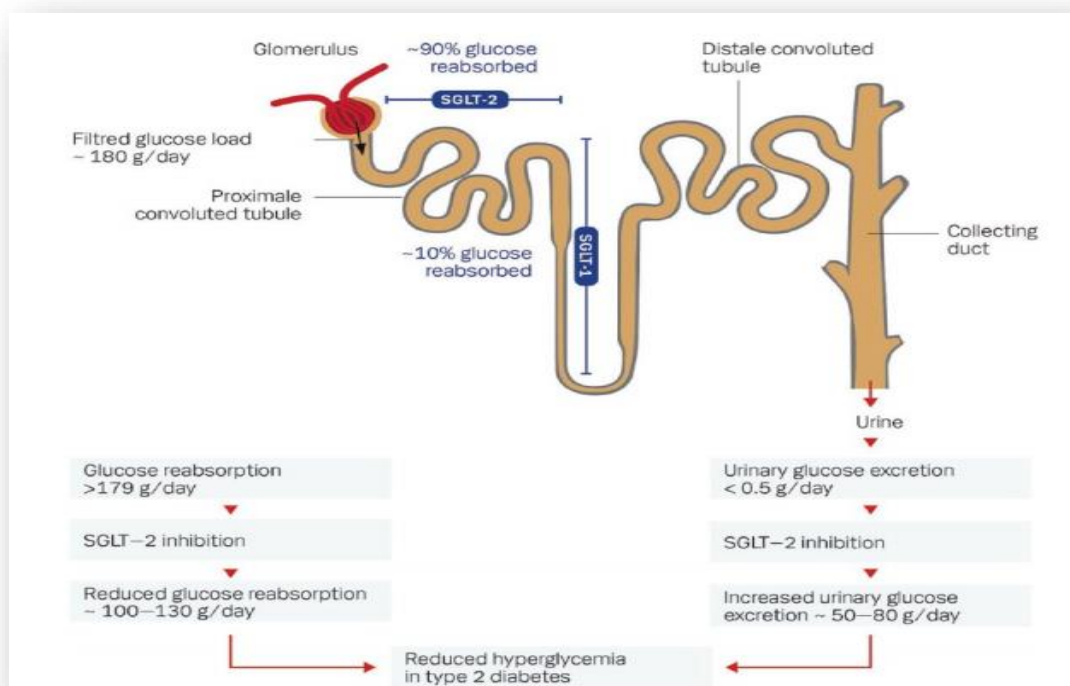
Οι αναστολείς SGLT-2 ανήκουν σε μια νεότερη ομάδα φαρμάκων που μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης δρώντας στους νεφρούς και αναστέλλοντας την εξαρτώμενη από τους SGLT-2 επαναπορρόφηση της γλυκόζης στο εγγύς σωληνάριο. Συνεπώς, προκαλούν αύξηση της έκκρισης της γλυκόζης στα ούρα και μείωση των επιπέδων της στο πλάσμα (Εικόνα 3) (Abdul-Ghani et al., 2011; Saeed et al., 2014).

Η στρατηγική της αναστολής των SGLT-2 διαφέρει από τις άλλες στρατηγικές μείωσης της γλυκόζης διότι η γλυκόζη απομακρύνεται από το «σύστημα», μειώνοντας έτσι την ολική σωματική και κυτταρική τοξικότητά της, με έναν μηχανισμό εντελώς ανεξάρτητο από αυτόν της ινσουλίνης. Συνολικά, η έκκριση γλυκόζης σε ούρα 24 ωρών σε ασθενείς που λαμβάνουν αναστολείς SGLT-2 βρίσκεται μεταξύ 60 και 100 g / ημέρα, που αντιστοιχεί σε απώλεια 240-400 kcal / ημέρα ύστερα από χρόνια χορήγηση (Nauck, 2014; Whalen et al., 2015).

Εκτός από τις γλυκοζουρικές επιδράσεις τους, οι αναστολείς των SGLT-2 οδηγούν σε αύξηση της έκκρισης νατρίου (DeFronzo et al., 2013) και μείωση του όγκου του πλάσματος λόγω των ωσμωτικών διουρητικών επιδράσεων της γλυκόζης και της νατριουρίας (Sha et al., 2014). Η γλυκοζουρία έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα και βελτιωμένο γλυκαιμικό έλεγχο σε ασθενείς με ΣΔ2 που υπολογίζεται από την HbA1c (Hummel et al., 2011). Το αποτέλεσμα αυτό εξαρτάται κυρίως από τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα, ανεξάρτητα από τη λειτουργία των β-κυττάρων και την ευαισθησία στην

ινσουλίνη. Συνεπώς, ο κίνδυνος για υπογλυκαιμία και μειωμένη δράση λόγω δευτερογενούς αποτυχίας της λειτουργίας των β-κυττάρων είναι περιορισμένος (Nauck, 2014). Επιπλέον, διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι αναστολείς των SGLT-2 βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη πιθανότατα μέσω της μεσολαβούμενης από αυτήν απόρριψης της γλυκόζης στους ιστούς, και χρονίως λόγω της θερμιδικής απώλειας και της αυξημένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη που προκαλείται από την απώλεια βάρους (Meronci et al., 2014). Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αναστολείς SGLT-2, αυξήθηκε η έκκριση γλυκογόνου από τα α-κύτταρα στις παγκρεατικές νησίδες (Bonner et al., 2015), μηχανισμός που πιθανόν να συμβάλει στην αυξημένη παραγωγή ενδογενούς γλυκόζης και συνεπώς να αποτρέπει την ανάπτυξη υπογλυκαιμίας στους ασθενείς αυτούς.

Η αποτελεσματικότητα της αναστολής των SGLT-2 εξαρτάται από το φυσιολογικό ή σχεδόν φυσιολογικό ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR). Έτσι, με μείωση του GFR, η δράση των αναστολέων SGLT-2 στον μεταβολισμό της γλυκόζης μειώνεται. Σε επίπεδα GFR κάτω από 30 ml / min η επίδραση στη γλυκοζουρία είναι μηδαμινή. Γενικότερα όμως, οι αναστολείς SGLT-2 δεν συνιστώνται σε επίπεδα GFR κάτω από 45 ml / min (Macha et al., 2014).



Εικόνα 3. Η νεφρική σωληναριακή επαναρρόφηση της γλυκόζης και η επίδραση της αναστολής του συµµεταφορέα νατρίου-γλυκόζης 2 (SGLT2). (Røder, 2018)

1.4 Επιδράσεις των αναστολέων SGLT-2 πέραν του ελέγχου της γλυκόζης

Οι αναστολείς των SGLT-2, μέσω διαφόρων μηχανισμών, έχουν δείξει αρκετές πλειοτροπικές επιδράσεις πέραν του ελέγχου της γλυκόζης .

- **Ανθρωπομετρικές Επιδράσεις**

Αρχικά η επαγόμενη από τους αναστολείς SGLT-2 γλυκοζουρία, προκαλώντας θερμιδική απώλεια, οδηγεί σε μια μείωση του βάρους της τάξης των 2-3kg, η οποία εμφανίζεται σταδιακά τους πρώτους μήνες της θεραπείας (Vasilakou et al., 2013). Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η απώλεια βάρους φαίνεται να φτάνει σε ένα βαθμό και στη συνέχεια μετά από 3-6 μήνες να σταθεροποιείται, πιθανότατα μέσω μιας αντισταθμιστικής αύξησης στην πρόσληψη ενέργειας (Ferrannini et al., 2015).

- **Επιδράσεις στην αρτηριακή πίεση**

Η μείωση της αρτηριακής πίεσης σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με αναστολείς SGLT-2 είναι μια επιπλέον επίδραση πέρα από τον έλεγχο της γλυκόζης που παρατηρείται σταθερά σε όλα τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς SGLT-2 οδηγούν σε μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης, της τάξης των 3-5 mmHg στη συστολική και 2-3 mmHg στη διαστολική αρτηριακή πίεση. Επιπλέον, οι αναστολείς SGLT-2 έδειξαν να μειώνουν την παλμική πίεση, τη μέση αρτηριακή πίεση και την αρτηριακή δυσκαμψία. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα αποτελέσματα που αφορούν τη πίεση του αίματος δεν ακολουθήθηκαν από αντιρροπιστική αύξηση του καρδιακού ρυθμού, υποδηλώνοντας έτσι την έλλειψη αντιρροπιστικής συμπαθητικής ενεργοποίησης (Chilton et al., 2015). Επιπλέον, μελέτες σε ασθενείς με ΣΔ1 έδειξαν ότι η Εμπαγλιφλοζίνη μειώνει την ταχύτητα σφυγμικού κύματος (Pulse wave velocity-PWV) μεταξύ καρωτίδας και μηριαίας αρτηρίας, και συνεπώς την αρτηριακή δυσκαμψία χωρίς επίσης να προκαλείται αντιρροπιστική ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος (Cherney et al., 2014).

- **Νεφρικές αιμοδυναμικές επιδράσεις**

Οι αναστολείς SGLT-2 έχουν επίσης αποδείξει ότι επηρεάζουν άμεσα τον μηχανισμό σωληναριοσπειραματικής ανατροφοδότησης. Η αυξημένη απελευθέρωση διαλυμένης ουσίας στην πυκνή ωχρά κηλίδα κατά την αναστολή των SGLT-2, πιθανόν να μειώνει την επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία σπειραματική υπερδιήθηση μέσω της σωληναριοσπειραματικής ανατροφοδότησης που επικαλείται εξαρτώμενες από την αδενosίνη οδούς, με άμεσες επιδράσεις στο προσαγωγό σπειραματικό αρτηριακό τόνο και συνεπώς να μειώνει την υπερδιήθηση οξέως και σταθερά κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Cherney et al., 2014).

- **Επιδράσεις σε μεσολαβητές και δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου**

Οι αναστολείς SGLT-2 αυξάνουν ελαφρά τόσο τη χαμηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνη-χοληστερόλη (LDL-C) όσο και την υψηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνη-χοληστερόλη (HDL-C) και οδηγούν σε ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων μέσω ενός μηχανισμού που βρίσκεται υπό διερεύνηση (Sinclair et al., 2014). Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανόν να οφείλονται σε άμεσες επιδράσεις στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων καθώς και στην αύξηση της συγκέντρωσης μεγάλων μορίων και άλλων στοιχείων στο αίμα, που προκύπτει από τις διουρητικές επιδράσεις της αναστολής των SGLT-2, με αποτέλεσμα να μην έχει άμεση επίδραση στον αριθμό λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων της κυκλοφορίας (Pancholia, 2018).

- **Καρδιακές επιδράσεις**

Πειραματικά δεδομένα σε παχύσαρκους και διαβητικούς μύες έδειξαν ότι ο αναστολέας SGLT2, Εμπαγλιφλοζίνη, μειώνει σημαντικά την καρδιακή ίνωση, την πάχυνση των στεφανιαίων αρτηριών και τη διήθηση μακροφάγων στον καρδιακό μυ, υποδεικνύοντας έτσι ένα άμεσο καρδιακό αποτέλεσμα καθώς και μείωση του οξειδωτικού στρες στο μυοκάρδιο (Lin et al., 2014).

Άλλες πιθανές άμεσες ή έμμεσες καρδιακές επιδράσεις πιθανόν να περιλαμβάνουν μεταβολές στην ενεργειακή λειτουργία του μυοκαρδίου και πιθανές αντιαρρυθμικές επιδράσεις. Στα καρδιομυοκύτταρα έχει βρεθεί να εκφράζεται ο SGLT-1 αλλά όχι ο SGLT-2 (Banerjee et al., 2009). Στους νεφρούς, η αναστολή των SGLT-2 έχει ως αποτέλεσμα την

αυξημένη επαναπορρόφηση της γλυκόζης μέσω του SGLT-1 (Rieg et al., 2014) έτσι η πιθανότητα για υπερέκφραση του καρδιακού SGLT-1 αυξάνεται. Αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει άμεσα τον μεταβολισμό του μυοκαρδιακού υποστρώματος και τις ενεργειακές ιδιότητες του μυοκαρδίου (Pancholia, 2018).

- **Επίδραση στα επίπεδα ουρικού οξέος**

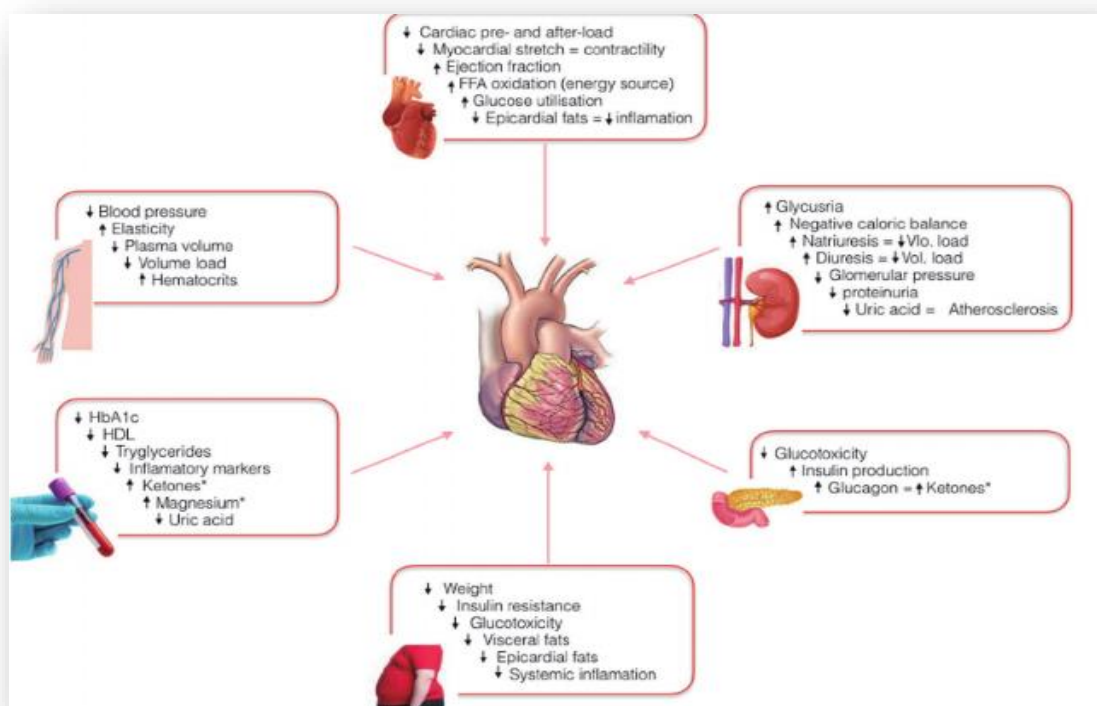
Τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθήσεις όπως η χρόνια νεφρική νόσος, οι καρδιαγγειακές επιπλοκές, και η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, παρόλο που δεν έχει ακόμη βρεθεί η σχέση αιτίας-αποτελέσματος μεταξύ του ουρικού οξέος και των καρδιαγγειακών εκβάσεων (Pancholia, 2018).

Η θεραπεία με αναστολείς SGLT-2, έχει συσχετιστεί με μείωση των επιπέδων του ουρικού οξέος στον ορό, που πιθανώς να οφείλεται στη δράση του μεταφορέα SLC2A9 (GLUT9), ο οποίος είναι γνωστό ότι ανταλλάσσει γλυκόζη με ουρικό οξύ στα νεφρικά σωληνάκια. Οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στα ούρα που οφείλονται στη θεραπεία με αναστολείς SGLT-2, πιθανόν να οδηγούν σε αυξημένη ανταλλαγή ουρικού οξέος στην εξωτερική μεμβράνη των σωληνοειδών κυττάρων. Κατά συνέπεια, αυτό να οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση ουρικού οξέος στα ούρα, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του στον ορό (Davies et al., 2015).

- **Επιδράσεις σε άλλους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου**

Σε πειραματικά μοντέλα, οι αναστολείς SGLT-2 έδειξαν να μειώνουν την επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία λευκοκυττάρωση (Nagareddy et al., 2013), τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (Tahara et al., 2013), διαδικασίες που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης (Panchapakesan et al., 2013; Osorio et al., 2012). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αναστολή των SGLT-2 οδηγεί σε γλυκοζουρία με ταυτόχρονη διούρηση και μείωση του σωματικού βάρους και της αρτηριακής πίεσης, επιδράσεις θεωρητικά ευεργετικές σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, έτσι η θεραπεία με τους αναστολείς SGLT-2 είναι δυνατό να βελτιώσει την κοιλιακή λειτουργία και αναδιαμόρφωση. Επιπλέον, αν και δεν υπάρχουν ακόμη κλινικά δεδομένα, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μοντέλο επίμυων με προοδευτική καρδιακή ανεπάρκεια, έδειξε ότι η αναστολή των SGLT-2 θα

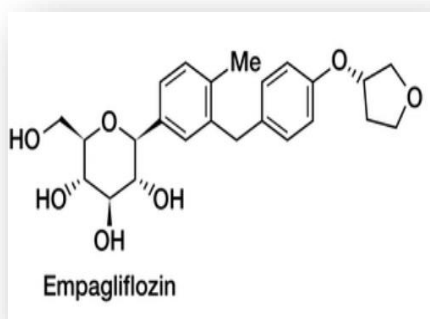
μπορούσε να αναστείλει την αύξηση της μάζας και της τελικής διαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας (Younis et al.,2014).



Εικόνα 4. Πλειοτροπικές επιδράσεις των αναστολέων SGLT-2 πέραν του γλυκαιμικού ελέγχου (Abdelgadir, F, Bashier, & Ali Rashid, 2018).

1.5 Εμπαγλιφοζίνη (Jardiance®)

1.5.1 Ιδιότητες Εμπαγλιφλοζίνης



Εικόνες 5, 6. Χημική δομή Εμπαγλιφλοζίνης (Bays, 2013), εμπορική συσκευασία Jardiance 10 και 25 mg.

Η Εμπαγλιφλοζίνη (Jardiance®, Boehringer Ingelheim), είναι ένας ισχυρός, εκλεκτικός αναστολέας των SGLT-2 και ανήκει στη νεώτερη κατηγορία από του στόματος χορηγούμενων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, στην οποία περιλαμβάνονται όπως προαναφέρθηκε, η Καναγλιφλοζίνη (Invokana®, Janssen), η Δαπαγλιφλοζίνη (Farxiga®, AstraZeneca / Bristol-Myers Squibb) και η Ερτουγλιφλοζίνη (Steglatro®, Merck).

Η Εμπαγλιφλοζίνη πήρε την έγκριση κυκλοφορίας από την αρμόδια αρχή ελέγχου φαρμάκων και τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) τον Αύγουστο του 2014. Έχει χαμηλό προφίλ παρενεργειών όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα, και μικρό κίνδυνο υπογλυκαιμίας καθώς ο μηχανισμός δράσης της είναι ανεξάρτητος της λειτουργίας των β-κυττάρων και της ινσουλίνης. Η Εμπαγλιφλοζίνη ενδείκνυται για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου σε συνδυασμό με δίαιτα και άσκηση σε ενήλικες με ΣΔ2 (Ndefo et al., 2015), και τη μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακού θανάτου σε ενήλικες ασθενείς με ΣΔ2 και εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο (Jardiance Indications & Usage).

Η χημική ονομασία της είναι η (1S)-1,5-άνυδρο-1-(4-χλώρο-3-{4-[(3S)- τετραυδροφουραν-3-υλόξυ]βενζυλ}φαινυλ)-D-γλυκικόλη, η χημική της δομή $C_{23}H_{27}ClO_7$, και το μοριακό της βάρος 450,91 g / mol (Ndefo et al., 2015).

Σε προκλινική μελέτη που διεξήχθη από τους Grempler et al., η Εμπαγλιφλοζίνη είχε την υψηλότερη εκλεκτικότητα για τον SGLT-2 έναντι του SGLT-1 (περισσότερο από 2.500 φορές), σε σύγκριση με τη Δαπαγλιφλοζίνη (περισσότερο από 1.200 φορές) και την Καναγλιφλοζίνη (περισσότερο από 250 φορές) (Grempler et al., 2012). Σε ασθενείς με ΣΔ2, η Εμπαγλιφλοζίνη μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και μεταγευματικής γλυκόζης μέσω της αύξησης της συνολικής απέκκρισης γλυκόζης, της βελτίωσης της λειτουργίας των β-κυττάρων και μεταβολής της χρήσης ενεργειακού υποστρώματος λιπιδίων έναντι γλυκόζης, παρά την αντισταθμιστική αύξηση της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξήσεις στην απέκκριση της γλυκόζης στα ούρα ύστερα από μία εφάπαξ δόση, με συνολική απέκκριση γλυκόζης αυξημένη κατά 11 φορές με τη δόση των 10 mg, 18 φορές με τη δόση των 25 mg και 14 φορές με τη δόση των 100 mg σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο. Η Εμπαγλιφλοζίνη προκάλεσε αναστολή της επαναρρόφησης της γλυκόζης κατά 36% έως 45% μετά από μία εφάπαξ δόση και διατήρησε την αναστολή της τάξης του 36% έως 48% μετά από 27 ημέρες ημερήσιας χορήγησης (Heise et al., 2013). Η Εμπαγλιφλοζίνη ανέστειλε την επαναρρόφηση της διηθημένης γλυκόζης κατά 40% σε απλές ημερήσιες δόσεις των 0,5-10 mg, ενώ σε υψηλότερες δόσεις κατά 40-60%, φθάνοντας σε πλατό περίπου στη δόση των 100 mg. Η χορήγησή της παρουσία

τροφής, δεν επηρέασε την απέκκριση της γλυκόζης στα ούρα, καθώς η μέση αθροιστική απέκκριση γλυκόζης στα ούρα στη δόση των 50 mg και σε διάστημα 24 ωρών μετά την από του στόματος χορήγηση, ήταν 71,7 g σε κατάσταση νηστείας ενώ σε κατάσταση τροφοδοσίας 75,9 g. Σε μελέτη μονής αυξανόμενης δόσης, όλες οι δόσεις της Εμπαγλιφλοζίνης εμφάνισαν υψηλότερες ποσότητες απέκκρισης γλυκόζης σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (Heise et al., 2013).

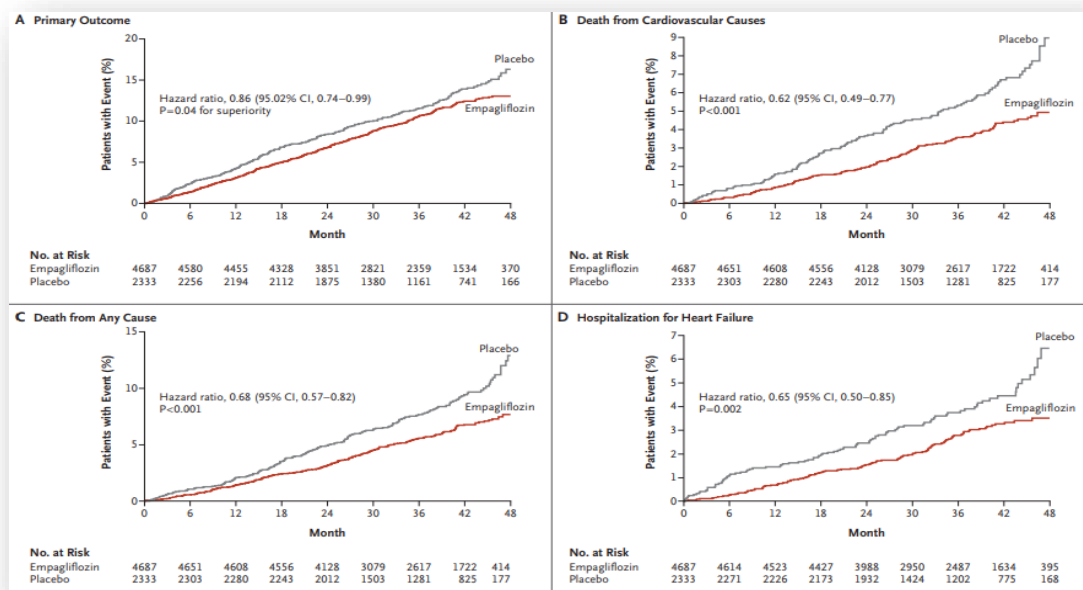
1.5.2 Μελέτη EMPA-REG

Στη κλινική μελέτη EMPA-REG, 7.020 ασθενείς με ΣΔ2 και εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες στις οποίες έλαβαν Εμπαγλιφλοζίνη 10 ή 25 mg άπαξ ημερησίως ή εικονικό φάρμακο. Μετά από διάρκεια παρακολούθησης 3,1 ετών, η επίπτωση του πρωτεύοντος τελικού σημείου (θάνατος από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο έμφραγμα μυοκαρδίου, μη θανατηφόρο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο) μειώθηκε κατά 14% στους ασθενείς που έλαβαν την Εμπαγλιφλοζίνη (10,5% και 12,1%, αντίστοιχα, $p=0,04$), χωρίς διαφορά μεταξύ των δύο δόσεων. Επίσης η χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης μείωσε τους θανάτους από καρδιαγγειακά αίτια κατά 38%, τους θανάτους από κάθε αιτία κατά 32% και τις νοσηλίες για καρδιακή ανεπάρκεια (ΚΑ) κατά 35%, χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου ή ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Επιπλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που έλαβαν Εμπαγλιφλοζίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο (5% έναντι 1,5% στους άνδρες και 10% έναντι 2,6% στις γυναίκες), χωρίς διαφορά μεταξύ των δύο δόσεων (Zinman et al., 2015).

Ο κίνδυνος εμφάνισης υπογλυκαιμίας, λοιμώξεων του ουροποιητικού, διαβητικής κετοξέωσης και καταγμάτων δεν διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. Επίσης, η διαφορά στο πρωτεύον τελικό σημείο προήλθε κυρίως από τη μείωση, κατά 38%, του σχετικού κινδύνου καρδιαγγειακού θανάτου. Η μείωση των καρδιαγγειακών θανάτων συνοδεύτηκε από 35% μείωση των νοσηλειών για ΚΑ, χωρίς ωστόσο να μειωθεί ο κίνδυνος του μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου ή του εγκεφαλικού επεισοδίου (Zinman et al., 2015). Επίσης, η διαφορά υπέρ της Εμπαγλιφλοζίνης όσον αφορά στην εμφάνιση του πρωτεύοντος τελικού σημείου εμφανίστηκε πολύ νωρίς στη μελέτη, ήδη από τους 3 πρώτους μήνες (Zinman et al., 2015; Henry, 2016).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το ευνοϊκό αποτέλεσμα της Εμπαγλιφλοζίνης δεν οφείλεται σε βελτίωση της αρτηριακής πίεσης, του αθηροσκληρωτικού φορτίου ή στην επίτευξη του γλυκαιμικού ελέγχου, αλλά ενδεχομένως να σχετίζεται με τις αιμοδυναμικές επιδράσεις του φαρμάκου, όπως είναι η αύξηση του αιματοκρίτη κατά 3% λόγω της ωσμωτικής γλυκοζουρίας και της νατριούρησης το οποίο σχετίζεται με μείωση κατά 7% περίπου του όγκου πλάσματος και αύξηση κατά 20% του οξυγόνου που μεταφέρεται στους ιστούς. Η αύξηση της οξυγόνωσης της καρδιάς, μαζί με τη μείωση του προφορτίου οδηγούν σε βελτίωση της λειτουργικότητας, αλλά και της αρρυθμιολογικής συμπεριφοράς της καρδιάς. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να κατέχουν τα κετονικά σώματα στο πλαίσιο της ήπιας κετοναϊμίας που προκαλείται με τη θεραπεία με αναστολείς SGLT-2 (Henry, 2016). Συγκεκριμένα, το β-υδροξυβουτυρικό οξύ, ως μεταβολικό προϊόν των κετονικών σωμάτων, είναι αποδεδειγμένα καλύτερο «καύσιμο» για την καρδιά και τους νεφρούς σε σχέση με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τη γλυκόζη καθώς για την παραγωγή του ενδοκυττάριου ATP απαιτείται μικρότερη κατανάλωση οξυγόνου με το β-υδροξυβουτυρικό οξύ. Αυτό μακροπρόθεσμα οδηγεί στη βελτίωση της λειτουργικότητας της καρδιάς και των νεφρών, γεγονός που αποτελεί πιθανή εξήγηση για τα εντυπωσιακά αποτελέσματα της μελέτης EMPA-REG (Verma et al., 2018).

Τα θετικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται να αφορούν και τα υπόλοιπα μέλη των αναστολέων των SGLT2, καθώς μελέτες καρδιαγγειακής ασφάλειας που έχουν διεξαχθεί με άλλους αναστολείς SGLT2, όπως η μελέτη DECLARE-TIMI 58 (Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events-Thrombolysis In Myocardial Infarction 58) που αφορά τη δράση της Δαπαγλιφλοζίνης και η μελέτη CANVAS (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study) για τη Καναγλιφλοζίνη, είχαν εξίσου εντυπωσιακά αποτελέσματα (Neal et al., 2017; Wiviott et al., 2019).



Εικόνα 7: Αποτελέσματα Μελέτης EMPA-REG (Zinman et al., 2015)

1.5.3 Προκλινικές μελέτες διερεύνησης της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης και άλλων αναστολέων SGLT2

Αρκετές προκλινικές μελέτες που αφορούν τη καρδιοπροστατευτική δράση της Εμπαγλιφλοζίνης και άλλων αναστολέων SGLT2 έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία χρόνια με αυξημένους ρυθμούς ειδικά μετά την αποκάλυψη των αποτελεσμάτων της μελέτης EMPA-REG. Τα θετικά αποτελέσματα αυτά οδήγησαν έναν μεγάλο αριθμό ερευνητικών ομάδων παγκοσμίως, στη διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής τους δράσης σε διάφορα πειραματικά μοντέλα με σκοπό τη μελέτη των αποτελεσμάτων αυτών σε μοριακό, κυτταρικό και ιστολογικό επίπεδο.

Μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2014 έδειξε ότι η διάμεση ίνωση, η πάχυνση και η αναδιαμόρφωση των στεφανιαίων αρτηριών, η αγγειακή δυσλειτουργία, η διήθηση μακροφάγων και τα επίπεδα υπεροξειδίου σε καρδιές μυών μειώθηκαν σημαντικά μετά από χρόνια θεραπεία με την Εμπαγλιφλοζίνη. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι η Εμπαγλιφλοζίνη βελτίωσε σημαντικά την ενδοθηλιακή λειτουργία (Lin et al., 2014). Σε μια άλλη μελέτη σε μοντέλο $\text{ApoE}^{-/-}$ μυών, η Εμπαγλιφλοζίνη μείωσε σημαντικά τις περιοχές αθηρωματικής πλάκας στην αορτική βαλβίδα σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου ή γλιμεπιρίδης, την αντίσταση στην ινσουλίνη και τις συγκεντρώσεις των TNP- α , IL-6, MCP-1, αμυλοειδούς Α στον ορό και μικροαλβουμίνης στο αίμα, γεγονός που συσχετίστηκε σημαντικά με το μέγεθος της πλάκας. Η θεραπεία με την Εμπαγλιφλοζίνη μείωσε το βάρος

και τη λιπώδη μάζα, το μέγεθος των λιπωδών κυττάρων, την έκφραση mRNA των TNF- α , IL6 και Msp-1 και την διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων στην πλάκα και τον λιπώδη ιστό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ή γλιμεπιρίδης, ενώ αύξησε σημαντικά και τα επίπεδα αδιπονεκτίνης (Han et al., 2017).

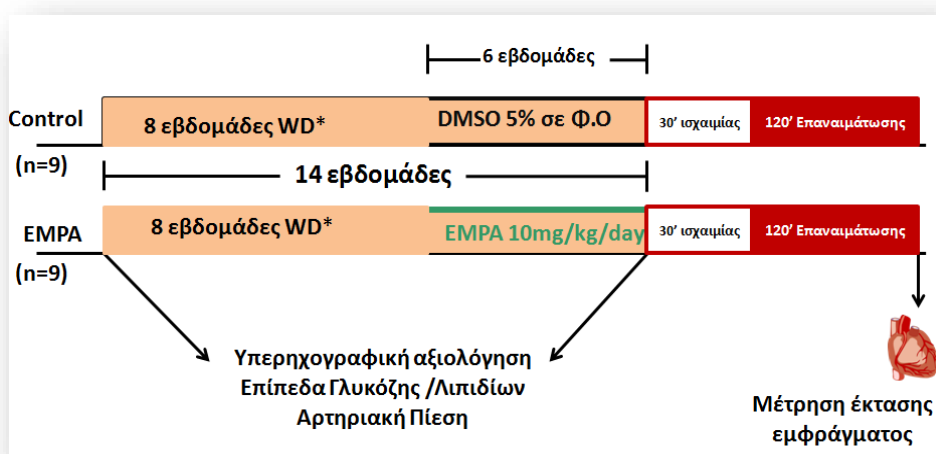
Σημαντικά αποτελέσματα είχαν οι έρευνες των Uthman et al, καθώς απέδειξαν ότι η δράση των Εμπαγλιφλοζίνη, Καναγλιφλοζίνη και Δαπαγλιφλοζίνη σε καρδιομυοκύτταρα μυών και απομονωμένες καρδιές μυών σε συσκευή Lagendorff, αναστέλλει άμεσα τη λειτουργία του καρδιακού ανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE) και μειώνει τη συγκέντρωση του κυτοσολικού Na^+ , πιθανώς μέσω της πρόσδεσής τους στη θέση πρόσδεσης του Na^+ στον ανταλλάκτη NHE-1. Επιπλέον, έδειξαν ότι η Εμπαγλιφλοζίνη και η Καναγλιφλοζίνη αλλά όχι η Δαπαγλιφλοζίνη, επηρεάζουν την υγιή καρδιά προκαλώντας αγγειοδιαστολή (Uthman et al., 2018). Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα καρδιομυοκύτταρα επίμυων και κονίκλων, οι Baartscheer et al., έδειξαν ότι ενώ η αύξηση των εξωκυτταρικών επιπέδων γλυκόζης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων κυτοσολικού Na^+ και Ca^{2+} , η αγωγή με Εμπαγλιφλοζίνη ανέστειλε απευθείας τη λειτουργία του NHE, προκάλεσε μείωση των επιπέδων κυτοσολικού Na^+ και Ca^{2+} και αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η Εμπαγλιφλοζίνη επηρέασε την κυτταρολυτική συγκέντρωση Na^+ και τη λειτουργία του NHE και απουσία εξωκυτταρικής γλυκόζης. Τέλος, διερευνήθηκε η δράση της ύστερα από την υποβολή των κυττάρων στον αναστολέα του NHE, Καριπορίδη, όπου τα αποτελέσματά της αυτά μειώθηκαν σημαντικά (Baartscheer et al., 2016).

Πρόσφατα οι Santos-Gallego et al., έδειξαν, σε ένα μη διαβητικό μοντέλο χοίρου, ότι η Εμπαγλιφλοζίνη βελτιώνει την ανεπιθύμητη καρδιακή αναδιαμόρφωση και καρδιακή ανεπάρκεια, καθώς και ότι αλλάζει τη χρήση «καυσίμου» στο μυοκαρδίου από γλυκόζη σε κετονικά σώματα, ελεύθερα λιπαρά οξέα, και διακλαδισμένα αμινοξέα βελτιώνοντας έτσι το μεταβολισμό του μυοκαρδίου, την δυσμενή αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και ενισχύοντας την συστολική λειτουργία της (Santos-Gallego et al., 2019). Σε μια επίσης πρόσφατη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε μύες *ob/ob*^{-/-}, η θεραπεία με Εμπαγλιφλοζίνη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της χοληστερόλης αίματος και της HbA1c, ενώ αύξησε την αναλογία γλυκαγόνης/ινσουλίνης και τα επίπεδα κετονών. Επιπλέον, αυξήθηκε και η αναλογία L-αργινίνης/ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης, ενός δείκτη ενδοθηλιακής λειτουργίας, και βελτίωσε τόσο την καρδιακή σύσπαση όσο και τη στεφανιαία μικροαγγειακή λειτουργία, όπως υποδεικνύεται από τη βελτίωση της

κλασματικής μεταβολής επιφανείας (FAC) και της εφεδρείας ταχύτητας στεφανιαίας ροής (CFVR), αντίστοιχα (Adinguru et al., 2019). Οι Yurista et al., σε μια μελέτη σε μη διαβητικό μοντέλο επίμυων με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία του μυοκαρδίου, έδειξαν ότι η Εμπαγλιφλοζίνη δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος, αλλά αύξησε σημαντικά το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF), εξασθένησε την υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων, και μείωσε τη διάμεση ίνωση και το οξειδωτικό στρες του μυοκαρδίου ύστερα από τη χορήγησή της για δύο εβδομάδες μετά το έμφραγμα. Η Εμπαγλιφλοζίνη, μείωσε τη καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA και διέγειρε τη μιτοχονδριακή βιογένεση, η οποία συσχετίστηκε με την ομαλοποίηση πρόσληψης και οξείδωσης της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων στο μυοκάρδιο. Επιπλέον, αύξησε τα επίπεδα κετονών στη κυκλοφορία καθώς και την έκφραση του μεταφορέα κετονικών σωμάτων και δύο κρίσιμων κετογόνων ενζύμων, υποδεικνύοντας ότι η μυοκαρδιακή χρήση κετονικών σωμάτων αυξήθηκε. Αυτές οι μεταβολικές μεταβολές συσχετίστηκαν με την αύξηση της παραγωγής ATP στο μυοκάρδιο (Yurista et al., 2019). Οι Lim et al., σε μελέτη διερεύνησης της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Καναγλιφλοζίνης σε απομονωμένες καρδιές υγιών και διαβητικών επίμυων που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία/επαναιμάτωση, έδειξαν ότι η χρόνια χορήγησή της οδήγησε σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος στο διαβητικό αλλά και στο υγιές μοντέλο. Αντίθετα, η οξεία χορήγηση της Καναγλιφλοζίνης σε καρδιές υγιών επίμυων δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος (Lim et al., 2019).

Η παρούσα εργασία βασίστηκε στη μελέτη της ερευνητικής ομάδας Andeadou et al., κατά την οποία σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν πειραματικά πρωτόκολλα με σκοπό τη διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης, ύστερα από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Έτσι ενήλικοι αρσενικοί μύες υποβλήθηκαν σε διατροφική παρέμβαση δυτικού τύπου που επάγει σύμφωνα με βιβλιογραφία ΣΔΤ2 (Surwit et al., 1988), τυχαιοποιήθηκαν σε 2 ομάδες, την ομάδα EMPA και την ομάδα ελέγχου και μετά το πέρας των 8 εβδομάδων που χρειάστηκαν για την επαγωγή του ΣΔΤ2 ακολούθησαν 6 εβδομάδες χορήγησης της Εμπαγλιφλοζίνης στη δόση των 10mg/kg/ημέρα. Στο τέλος του πρωτοκόλλου τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε χειρουργική παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης που διήρκεσε 30' και 120' αντίστοιχα και λήφθηκαν ιστοί για τον υπολογισμό της έκτασης του εμφράγματος (Εικόνα 8). Στα αποτελέσματα βρέθηκε ότι η Εμπαγλιφλοζίνη μείωσε το σωματικό βάρος και τα επίπεδα γλυκόζης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον η υπερηχογραφική αξιολόγηση έδειξε μείωση της συστολικής και διαστολικής διαμέτρου και βελτίωση της μυοκαρδιακής συσταλτικότητας στην ομάδα της Εμπαγλιφλοζίνης. Τέλος η χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης μείωσε σημαντικά την έκταση

του εμφράγματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ο βαθμός ισχαιμικής προσβολής ήταν ο ίδιος και στις 2 ομάδες. Ακολούθησε 2^η σειρά πειραμάτων στην οποία τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στις ίδιες ακριβώς παρεμβάσεις με την εξαίρεση ότι παραλήφθηκε μυοκαρδιακός ιστός από την ισχαιμική περιοχή στο 10^ο λεπτό της επαναιμάτωσης για τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού σηματοδότησης. Η καρδιοπροστατευτική δράση της Εμπαγλιφλοζίνης έδειξε να οφείλεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) και της κινάσης AMPK (AMP-activated protein kinase). Τέλος σε μια 3^η σειρά πειραμάτων η εμπαγλιφλοζίνη διατήρησε τη βιωσιμότητα ενδοθηλιακών κυττάρων και καρδιομυοκύτταρων H9C2 που υποβλήθηκαν σε συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης παρουσία και μη AGEs (Advanced glycation end products) για τη προσομοίωση του ΣΔ (Andreadou et al., 2017).



Εικόνα 8: Σχηματική Απεικόνιση Πειραματικού πρωτοκόλλου Andreadou et al., 2017.

1.6 Στεφανιαία νόσος

Σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα του 2017, η στεφανιαία νόσος (ΣΝ) αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως (Timmis et al., 2017), τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Περίπου πάνω από επτά εκατομμύρια

άνθρωποι ετησίως πεθαίνουν από ΣΝ, ποσοστό που αντιπροσωπεύει το 12,8% των συνολικών θανάτων παγκοσμίως (Steg et al., 2012).

Ως στεφανιαία νόσος (ΣΝ), χαρακτηρίζεται η προοδευτική στένωση των στεφανιαίων αρτηριών συνήθως ως αποτέλεσμα της αθηροσκλήρωσης (Timmis, 2015). Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα (ΟΣΣ) επέρχονται ύστερα από τη ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας στο στεφανιαίο αρτηριακό τοίχωμα. Αυτό διεγείρει μια θρομβωτική απόκριση προκαλώντας μεταβαλλόμενου βαθμού απόφραξη στον αυλό της στεφανιαίας αρτηρίας και μεταγενέστερη ισχαιμική βλάβη ή νέκρωση ενός τμήματος του μυοκαρδίου (Libby, 2013). Στα ΟΣΣ περιλαμβάνονται:

- Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανύψωση του ST (ST-elevation myocardial infarction, STEMI)
- Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανύψωση του ST (non ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI)
- Η ασταθής στηθάγχη
- Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος

Κατά την ασταθή στηθάγχη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανύψωση του ST, η απόφραξη της ροής είναι μερική, ενώ κατά το εμφράγματα του μυοκαρδίου με ανύψωση του ST, η απόφραξη είναι πλήρης (Libby, 2013).

1.7 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (ΟΕΜ)

Ο όρος έμφραγμα του μυοκαρδίου αντικατοπτρίζει τον κυτταρικό θάνατο των καρδιομυοκυττάρων που προκαλείται από ισχαιμία, ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ προσφοράς και ζήτησης οξυγόνου από και προς το μυοκάρδιο που προκαλείται από την απόφραξη μιας στεφανιαίας αρτηρίας (Thygesen et al., 2007).

1.7.1 Επιδημιολογία ΟΕΜ

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί τη σοβαρότερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου, και είναι υπεύθυνο για περισσότερο από 2,4 εκατομμύρια θανάτους στις ΗΠΑ, 4 εκατομμύρια θανάτους στην Ευρώπη και τη Βόρεια Ασία, (Nichols et al., 2014) και πάνω

από το ένα τρίτο των θανάτων σε ανεπτυγμένες χώρες ετησίως (Yeh et al., 2010). Η αυξημένη χρήση τεκμηριωμένων θεραπειών και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής έχουν οδηγήσει σε σημαντική μείωση της θνησιμότητας λόγω της στεφανιαίας νόσου τις τελευταίες δεκαετίες (Nichols et al., 2014). Ωστόσο, το έμφραγμα του μυοκαρδίου διατηρεί σημαντική επίδραση στην παγκόσμια υγεία, καθώς πλήττει κάθε χρόνο περισσότερα από 7 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Συνεπώς, ο οικονομικός αντίκτυπός του είναι τεράστιος, καθώς μόνο για το έτος 2010, καταγράφηκαν στις ΗΠΑ περισσότερες από 1,1 εκατομμύριο νοσηλείες λόγω εμφράγματος του μυοκαρδίου, με εκτιμώμενο κόστος της τάξης των 450 δισεκατομμυρίων δολαρίων τουλάχιστον (Weintraub et al., 2011).

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 παρατηρείται σταθερή μείωση του ποσοστού των ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανύψωση του ST (STEMI) και μικρότερη αύξηση του εμφράγματος του μυοκαρδίου χωρίς ανύψωση του ST (NSTEMI), με αποτέλεσμα τη συνολική μείωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Yeh et al., 2010). Το NSTEMI αποτελεί το 60-75% του συνολικού αριθμού εμφραγμάτων του μυοκαρδίου (Yeh et al., 2010; O’Gara et al., 2013). Επιπλέον, τόσο οι νοσοκομειακές όσο και οι μονοετείς θνησιμότητες από το STEMI έχουν μειωθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες κατά 5-6% και 7-18% αντίστοιχα, γεγονός που αποδεικνύει την πρόοδο των φαρμακολογικών και προληπτικών στρατηγικών και των στρατηγικών επαναιμάτωσης (O’Gara et al., 2013).

1.7.2 Διάγνωση OEM

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί επείγουσα ιατρική κατάσταση και η επιβίωση του ασθενούς συνδέεται στενά με την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία (Timmis, 2015).

Η ισχαιμία σε ένα κλινικό περιβάλλον συχνά εντοπίζεται από το ιστορικό του ασθενούς και από το ΗΚΓ. Στα πιθανά συμπτώματα ισχαιμίας περιλαμβάνονται η επιγαστρική δυσφορία, η δυσφορία στη περιοχή του θώρακος, του άνω άκρου, ή της γνάθου ύστερα από άσκηση ή εν ώρα ηρεμίας. Η δυσφορία που σχετίζεται με το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου διαρκεί τουλάχιστον 20 λεπτά και συχνά είναι διάχυτη, δεν εντοπίζεται σε συγκεκριμένη περιοχή, και δεν επηρεάζεται από την κίνηση της περιοχής αυτής, καθώς επίσης μπορεί να συνοδεύεται από δύσπνοια, εφίδρωση, ναυτία, ή συγκοπή. Τα συμπτώματα αυτά δεν αφορούν αποκλειστικά την ισχαιμία του μυοκαρδίου και συνεπώς μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση και να αποδοθούν σε γαστρεντερικές, νευρολογικές, πνευμονικές ή μυοσκελετικές διαταραχές. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να εμφανιστεί με την εκδήλωση άτυπων συμπτωμάτων ή και ακόμη χωρίς, ανιχνευόμενο μόνο

μέσω ΗΚΓ, αύξησης των βιοχημικών δεικτών ή καρδιακής απεικόνισης (Thygesen et al., 2007).

1.7.3 Παθοφυσιολογία ΟΕΜ

- **Παθοφυσιολογία της ισχαιμίας του μυοκαρδίου**

Η οξεία απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας σε έναν ασθενή με STEMI υποβάλλει το μυοκάρδιο που αιματώνεται από το εν λόγω αγγείο σε οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου, οριοθετώντας έτσι την περιοχή κινδύνου (Area at Risk/AAR) του πιθανού εμφράγματος του μυοκαρδίου, εάν διατηρηθεί ή μόνιμοποιηθεί η οξεία στεφανιαία απόφραξη. Εάν η περίοδος της οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου διαρκέσει περισσότερο από 20 λεπτά, ένα «κύμα» νέκρωσης των καρδιομυοκυττάρων ξεκινάει στο υπενδοκάρδιο και εκτείνεται σταδιακά προς το επικάρδιο (Reimer et al., 1977).

Η στέρηση του μυοκαρδίου από την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών οδηγεί σε μια σειρά από απότομες βιοχημικές και μεταβολικές διαταραχές. Η απουσία οξυγόνου αναστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οδηγώντας σε αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, εξάντληση των επιπέδων του ATP και αναστολή της συστολικής λειτουργίας του μυοκαρδίου. Η διαδικασία αυτή επιδεινώνεται από τη διάσπαση του διαθέσιμου ATP, καθώς η F1F0 ATP-άση με σκοπό να διατηρήσει το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων λειτουργεί αντίστροφα, με αποτέλεσμα την υδρόλυση του ATP και την αύξηση ανόργανου φωσφορικού άλατος στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η απουσία οξυγόνου, οδηγεί το κυτταρικό μεταβολισμό σε αναερόβια γλυκόλυση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση γαλακτικού οξέως, και συνεπώς τη μείωση του ενδοκυτταρικού PH σε $\text{PH} < 7,0$. Η ενδοκυττάρια συσσώρευση πρωτονίων ενεργοποιεί τον εναλλάκτη ιόντων Na^+/H^+ , ο οποίος αποβάλλει πρωτόνια από το κύτταρο με αντάλλαγμα την είσοδο Na^+ . Επιπλέον η έλλειψη ATP κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας αναστέλλει τη λειτουργία της Na^+/K^+ ATP-άσης, επιδεινώνοντας έτσι την ενδοκυττάρια υπερφόρτωση σε Na^+ . Ως απόκριση στην υπερφόρτωση αυτή, η αντίστροφη ενεργοποίηση του ανταλλάκτη ιόντων $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ οδηγεί σε υπερφόρτωση του ενδοκυτταρικού χώρου με ιόντα Ca^{2+} στην προσπάθεια του κυττάρου να αποβάλλει τα ιόντα Na^+ (Avkiran et al., 2002).

- **Παθοφυσιολογία της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου**

Η έγκαιρη επαναιμάτωση είναι ο μόνος τρόπος περιορισμού της μη αναστρέψιμης βλάβης κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Ωστόσο, η επαναιμάτωση μπορεί να οδηγήσει και σε σοβαρή και μη αναστρέψιμη βλάβη στο μυοκάρδιο, τη βλάβη της επαναιμάτωσης καθώς η άμεση και πλήρης αποκατάσταση της στεφανιαίας ροής αίματος έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση αρρυθμιών, συστολικής δυσλειτουργίας, μικροαγγειακής βλάβης και μη αναστρέψιμης βλάβης του μυοκαρδίου μέσω των μηχανισμών απόπτωσης και νέκρωσης (Skyschally et al., 2008).

Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης το μυοκάρδιο υποβάλλεται σε διάφορες απότομες βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές, που επιδεινώνουν τις μεταβολές που ξεκινούν κατά την ισχαιμία (Yellon et al., 2007). Κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης, επανενεργοποιείται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Επιπλέον, ROS παράγονται και μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης και της NADPH οξειδάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα ουδετερόφιλα αντίστοιχα. Τα αυξημένα επίπεδα ROS συμβάλλουν στη μυοκαρδιακή βλάβη της επαναιμάτωσης καθώς οδηγούν σε διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (MPTP), δρουν ως χημειοτακτικά των ουδετερόφιλων και μεσολαβούν στη δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου. Αυτές οι δράσεις έχουν ως αποτέλεσμα, την υπερφόρτωση του κυττάρου με ιόντα Ca^{2+} και την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσής, προκαλώντας ενζυμική αποδιάταξη και απευθείας οξειδωτική βλάβη στο DNA. Η επαναιμάτωση σε συνδυασμό με την επανενεργοποίηση του ανταλλάκτη ιόντων Na^+/H^+ οδηγούν σε έκπλυση του γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα την αποκατάσταση του φυσιολογικού pH. Η επαναφορά του pH αναιρεί την αναστολή της διάνοιξης του MPTP και της συσταλτικότητας των μυοκαρδιακών κυττάρων που οφείλεται στο όξινο περιβάλλον. Η αποκατάσταση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί ασβέστιο στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, το οποίο προκαλεί τη διάνοιξη του MPTP (Hausenloy et al., 2013) και συνεπώς την αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τη διόγκωση των μιτοχονδρίων και το θάνατο των καρδιομυοκυττάρων (Yellon et al., 2007).

1.7.4 Μορφές κυτταρικού θανάτου και ο ρόλος τους κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση

Η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία αποτελούν μορφές κυτταρικού θανάτου που εκδηλώνονται στα καρδιομυοκύτταρα ως χαρακτηριστικά της καρδιακής ανεπάρκειας, του

εμφράγματος του μυοκαρδίου και της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Και οι τρεις τύποι κυτταρικού θανάτου, έχουν παρατηρηθεί κατά την εξέλιξη της καρδιακής νόσου (Whelan et al., 2010).

- **Αυτοφαγία**

Ένα από τα βασικά κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην προσαρμογή ύστερα από stress και στον έλεγχο των βλαβών είναι η αυτοφαγία. Η αυτοφαγία είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη διαδικασία πρόσληψης ενδοκυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων και μακρομορίων, από τα λυσοσώματα για αποικοδόμηση μέσω ενός κυστιδίου απομόνωσης με διπλή μεμβράνη (αυτοφαγόσωμα) (Levine et al., 2008). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Levine et al., 2008) και στα καρδιομυοκύτταρα (Marambaio et al., 2010), οι συνθήκες στέρησης θρεπτικών ουσιών, η υποξία, οι ROS, τα οργανύλλια που έχουν υποστεί βλάβη και τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν αυτοφαγία εξαρτώμενη από τον στόχο ραπαμυκίνης θηλαστικών (mTOR). Παρομοίως, έχει αναφερθεί και αυτοφαγία ανεξάρτητη από τον mTOR, μέσω ενεργοποίησης της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI3K) τύπου III (Lipinski et al., 2010).

Πάνω από το 95% της ενέργειας που απαιτείται για τη λειτουργία των καρδιομυοκυττάρων προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η ισχαιμία του μυοκαρδίου διακόπτει την παροχή οξυγόνου, προκαλώντας ταχεία πτώση των επιπέδων ATP και συνεπώς αύξηση της αναλογίας AMP/ATP. Ως αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής, ενεργοποιείται η αυτοφαγία, ως μηχανισμός προ-επιβίωσης για την αναπλήρωση της ενέργειας κάτω από συνθήκες στρες. Η ισχαιμία/υποξία έδειξε να οδηγεί σε ενεργοποίηση της αυτοφαγίας σε αρκετές μελέτες in vivo και in vitro (Matsui et al., 2007; Yan et al., 2005).

Στις δύο οδούς που ευθύνονται για την αυτοφαγία που προκαλείται από την ισχαιμία/υποξία εμπλέκονται είτε η BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3) (A Hamacher-Brady et al., 2007) είτε η AMP-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) (Russell et al., 2004). Στα καρδιομυοκύτταρα πειραματικού μοντέλου μυός που εκφράζει επικρατούσα αρνητική δράση της AMPK, η αυτοφαγική απόκριση στην ισχαιμία μειώθηκε οδηγώντας σε πιο έντονη καρδιακή δυσλειτουργία και μεγαλύτερο έμφραγμα του μυοκαρδίου (Russell et al., 2004). Σε περίπτωση παρατεταμένης ισχαιμίας, η αυτοφαγική απόκριση καθίσταται δυσλειτουργική, όπως αποδεικνύεται από την ύπαρξη μη φυσιολογικών αυτολυσοσωμάτων. Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, προκαλείται περαιτέρω «προς

τα πάνω» ρύθμιση της αυτοφαγίας, ακόμη και μετά την αποκατάσταση των επιπέδων οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και η AMPK απενεργοποιείται (Hamacher et al., 2006; Matsui et al., 2007). Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης είναι διαφορετική από εκείνη της ισχαιμίας, ιδιαίτερα όσον αφορά τους μηχανισμούς που την επάγουν. Οι διεγέρτες, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η μιτοχονδριακή βλάβη (μέσω της BNIP3), το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η υπερφόρτωση ασβεστίου, πιθανότατα έχουν πιο σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αυτοφαγίας κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης (Gustafsson et al., 2009). Αν και τα διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η αυτοφαγία είναι προστατευτική υπό συνθήκες ήπιας έως μέτριας ισχαιμίας, το ίδιο δεν μπορεί να ειπωθεί για την αυτοφαγία που προκαλείται από την επαναιμάτωση. Συνεπώς, η έννοια της αυτοφαγίας στο πλαίσιο της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μπορεί να είναι είτε ωφέλιμη είτε επιζήμια για τον ιστό (Anne Hamacher-Brady et al., 2006; Matsui et al., 2007).

Πρόσφατα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η κάθαρση του αυτοφαγοσώματος μειώνεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης. Η ισχαιμία προκαλεί μείωση των επιπέδων της LAMP2 (Lysosome-associated membrane protein 2), μιας απαραίτητης πρωτεΐνης για τη σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων και των λυσοσωμάτων, μέσω της μεσολάβησης πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης που ενεργοποιούνται από τις ROS. Η επαναιμάτωση προκαλεί «προς τα πάνω» ρύθμιση της Beclin 1, η οποία προκαλεί περαιτέρω υποβάθμιση της λειτουργίας του αυτοφαγοσώματος, κορυφώνοντας την αυξημένη παραγωγή ROS, τη διαπερατότητα του μιτοχονδρίου και το θάνατο των καρδιομυοκυττάρων (Ma et al., 2012).

Όσον αφορά το ρόλο της αυτοφαγίας στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, η αυτοφαγία μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στο έμφραγμα. Επιπλέον, η αυτοφαγία πιθανόν να συμβάλλει στην διαδικασία αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου μετά το έμφραγμα. Μελέτη έδειξε ότι, η ενεργοποίηση της AMPK ύστερα από χορήγηση μετφορμίνης μείωσε την ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας που προκαλείται από το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η αναστολή του mTOR οδήγησε σε μειωμένη αναδιαμόρφωση και βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία (Buss et al., 2009). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη του μεταγραφικού παράγοντα STAT-1 είναι προστατευτική καθώς ενίσχυσε την αυτοφαγία σε ένα *ex vivo* μοντέλο ισχαιμίας του μυοκαρδίου (McCormick et al., 2012).

- **Απόπτωση**

Η απόπτωση προκαλείται από δύο οδούς, την εξωγενή και την ενδογενή οδό, οι οποίες έχουν περιγραφεί σε καρδιομυοκύτταρα. Η εξωγενής αποπτωτική οδός μπορεί να

ενεργοποιηθεί μέσω του προ-αποπτωτικού συνδέτη FAS, του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF-α ή του TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Τόσο ο FAS όσο και ο υποδοχέας I του TNF εκφράζονται στα καρδιομυοκύτταρα και εμπλέκονται στην καρδιαγγειακή παθολογία (Whelan et al., 2010). Ο TRAIL έχει επίσης αναφερθεί ότι απελευθερώνεται από τα καρδιομυοκύτταρα, (Liao et al., 2005) αλλά δεν υπάρχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο του στον καρδιακό ιστό. Σε καρδιομυοκύτταρα διαγονιδιακών μυών, η υπερέκφραση του TNF-α προκάλεσε διαστολική καρδιομυοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα θανάτου μέσω του TNF-α είναι επιβλαβής για την καρδιά (Kubota et al., 1997).

Το μιτοχόνδριο είναι το κύριο οργανίδιο που εμπλέκεται στη διαμεσολάβηση της ενδογενούς αποπτωτικής οδού. Στα καρδιομυοκύτταρα, τα μιτοχόνδρια βρίσκονται στο χώρο μεταξύ των μυοϊνδίων και κάτω από το σαρκείλλημα. Αυτός ο τρόπος κατανομής επιτρέπει στα μιτοχόνδρια την αποτελεσματική παροχή ATP, σε συνθήκες υψηλής ζήτησης σε ενέργεια, κατά τη συνεχή συστολή τους. Ωστόσο, επειδή τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν και στον κυτταρικό θάνατο σε απόκριση στο στρες, τα καρδιομυοκύτταρα έχουν αναπτύξει ειδικές στρατηγικές για την επίτευξη αυστηρού ελέγχου της ενδογενούς αποπτωτικής οδού (Lee et al., 2009; Whelan et al., 2010). Επιπλέον, στα καρδιομυοκύτταρα εκφράζονται διάφορα μέλη της οικογένειας BCL2, πολλά από τα οποία ρυθμίζονται κατά τη καρδιακή νόσο δια μέσου της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένων των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2 (Condorelli et al., 1999). Τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Araf1 (Apoptotic protease-activating factor-1) και ως συνέπεια ο αυστηρός έλεγχος της ενεργοποίησης των κασπασών γίνεται από την ενδογενή XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (Potts et al., 2005). Η «προς τα κάτω» ρύθμιση των XIAP και cIAP1/2 (Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2) στα καρδιομυοκύτταρα εντός του απόπληκτου μυοκαρδίου έχει προταθεί ότι συμβάλλει στην αυξημένη απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων (Scheubel et al., 2002). Σε διαγονιδιακό μοντέλο μυών που υπερεκφράζει τον cIAP2 το μέγεθος του εμφράγματος καθώς και τα TUNEL- θετικά κύτταρα (αποπτωτικά) μειώθηκαν σημαντικά μετά την υποβολή σε ισχαιμία/επαναιμάτωση (Chua et al., 2007). Η δράση των αναστολέων της απόπτωσης (IAPs) μπορεί επίσης να ανασταλεί μέσω της SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) / DIABLO (Direct IAP-Binding protein with Low PI) και της OMI / HTPA2 (μιτοχονδριακή πρωτεάση σερίνης) καθώς η αναστολή της πρωτεάσης αυτής σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία/επαναιμάτωση μείωσε την απόπτωση και το μέγεθος εμφράγματος (Bhuiyan et al., 2007).

Λόγω των χαμηλών επιπέδων Araf-1 και κασπασών στα καρδιομυοκύτταρα, τα μη μυϊκά κύτταρα της καρδιάς καθίστανται πιο επιρρεπή στην απόπτωση. Αυτό, με τη σειρά του, καθιστά περίπλοκη τη μελέτη της απόπτωσης των καρδιομυοκυττάρων σε ολόκληρη την καρδιά. Σε μελέτη που διεξήχθη σε πειραματικό μοντέλο επίμυων, η μέγιστη απόπτωση καρδιομυοκυττάρων παρατηρήθηκε στις 4.5 ώρες μετά τη μόνιμη απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας, ενώ η κορύφωση της νέκρωσης παρατηρήθηκε στις 24 ώρες (Kajstura et al., 1996) ενώ σε άλλη μελέτη η επαναιμάτωση έδειξε να επιταχύνει το χρόνο της απόπτωσης σε σύγκριση με την μόνιμη απόφραξη (Fliss et al., 1996).

Επιπρόσθετα, μύες που δεν εξέφραζαν τον FAS, με καρδιομυοπάθεια επαγόμενη από τη Δοξορουβικίνη παρουσίασαν μείωση της απόπτωσης των καρδιομυοκυττάρων (Nakamura et al., 2000), καθώς και σημαντική μείωση του μεγέθους του εμφράγματος μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση σε άλλη μελέτη που διεξήχθη σε παρόμοιο μοντέλο μυών (P. Lee et al., 2003). Ωστόσο, η έλλειψη των υποδοχέων ογκονεκρωτικού παράγοντα TNFR1 ή TNFR2 δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος, ενώ η έλλειψη και των δύο μαζί οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερα έμφρακτα μετά από μόνιμη απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας (Kurrelmeier et al., 2000). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο FAS και όχι ο TNFR είναι ο κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης της εξωγενούς αποπτωτικής οδού κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επιπλέον η υπερέκφραση της BCL2 στα καρδιομυοκύτταρα μειώνει σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος, την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και την καρδιακή δυσλειτουργία μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Chen et al., 2001). Σε πειραματικό μοντέλο μυών, η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAX μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος και την καρδιακή δυσλειτουργία μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Hochhauser et al., 2007). Επίσης, η έλλειψη της προ-αποπτωτικής PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) σε ένα ex vivo μοντέλο Langendorff που υποβλήθηκε σε ισχαιμία/επαναιμάτωση μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος περίπου κατά 50% (Toth et al., 2006) Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ενδογενής οδός της απόπτωσης έχει επίσης κεντρικό ρόλο στο έμφραγμα του μυοκαρδίου (Chiong et al., 2011).

- **Νέκρωση**

Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από ξεχωριστές μορφολογικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένων της διόγκωσης των κυττάρων, της καταστροφής της πλασματικής μεμβράνης, της απώλειας ATP και της διόγκωσης των οργάνων. Η διαταραχή της κυτταρικής ακεραιότητας και η απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων προκαλούν μια

δευτερογενή φλεγμονώδη αντίδραση, με πιθανές παθολογικές συνέπειες (Whelan et al., 2010). Η νέκρωση προκαλείται κυρίως από φυσική ή χημική βλάβη στο κύτταρο και είχε θεωρηθεί για πολύ καιρό ως ένα είδος παθητικού και τυχαίου κυτταρικού θανάτου (Vanlangenakker et al., 2008). Πρόσφατα όμως στοιχεία, υποδεικνύουν ότι ένα ποσοστό της νέκρωσης ρυθμίζεται από μια σειρά ελεγχόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών. Έχουν εισαχθεί αρκετοί όροι για την περιγραφή αυτής της μορφής νέκρωσης, όπως προγραμματισμένη νέκρωση, κυτταρικός θάνατος ανεξάρτητος από τις κασπάσες και νεκρόπτωση (Henriquez, Armisen, Stutzin, & Quest, 2008). Επίσης έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που περιγράφουν την έναρξη και τη λήξη της νέκρωσης, στους οποίους ανήκουν οι υποδοχείς θανάτου, οι ROS, το Ca^{2+} , και η διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (MPTP) (Kroemer et al., 2007; Vanlangenakker et al., 2008).

Κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η ενεργοποίηση της αναερόβιας γλυκόλυσης για την παροχή ATP οδηγεί στη συσσώρευση ιόντων H^+ και στην οξέωση. Οι αντλίες ιόντων στη πλασματική μεμβράνη ανταποκρίνονται με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας ιόντων H^+ σε αντάλλαγμα με ιόντα Na^+ . Σε ανταπόκριση στα αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού Na^+ , ο ανταλλάκτης $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ που λειτουργεί αντίστροφα είναι λιγότερο ικανός να απομακρύνει το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια ο μιτοχονδριακός μονομεταφορέας Ca^{2+} μεταφέρει το Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια. Η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} μέσα σε αυτό το οργανίδιο προκαλεί την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από Ca^{2+} αφυδρογονάσης, μείωση της ροής NADH και ηλεκτρονίων μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αυξημένα επίπεδα ROS και μείωση των επιπέδων ATP. Καθώς η πρόσληψη Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια διαταράσσει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τελικά η αύξηση Ca^{2+} στη μήτρα φτάνει σε πλατό κάτω από υποξικές συνθήκες λόγω μείωσης των πρωτονίων. Κατά την επαναιμάτωση, ωστόσο, η αποκατάσταση των δυνατοτήτων παραγωγής οξυγόνου και ATP αποκαθιστά γρήγορα τα επίπεδα ATP και το δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε αυξημένη είσοδο Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια, η οποία προκαλεί παρατεταμένη διάνοιξη του MPTP που ρυθμίζεται από την κυκλοφιλίνη D, και διόγκωση των μιτοχονδρίων η οποία τελικά οδηγεί στην κυτταρική νέκρωση (Whelan et al., 2010). Αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι η διάνοιξη του MPTP αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ της νέκρωσης των καρδιομυοκυττάρων και της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Η συμμετοχή του MPTP στις καρδιακές επιδράσεις της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μελετήθηκε από τις ερευνητικές ομάδες Molkenstein και Tsujimoto, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η έλλειψη κυκλοφιλίνης D προστατεύει τα *in vitro* καρδιομυοκύτταρα από το κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από

την υπερφόρτωση Ca^{2+} . Το μέγεθος του εμφράγματος και η απελευθέρωση γαλακτικού οξέως από την καρδιά μειώθηκαν σημαντικά σε γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα ύστερα από παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η επαγόμενη από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες απελευθέρωση κυτοχρώματος C δεν διέφερε μεταξύ των knock-out και wild type πειραματόζων, υποδηλώνοντας ότι η κυκλοφιλίνη D δεν διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην απόπτωση (Chiong et al., 2011).

1.8 Καρδιοπροστασία και καρδιοπροστατευτικές παρεμβάσεις

Ο όρος καρδιοπροστασία αναφέρεται σε όλες τις στρατηγικές που έχουν στόχο την μείωση των αποτελεσμάτων της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Για να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητη η συμμετοχή ενδογενών μηχανισμών που ενεργοποιούνται ύστερα από φυσικές παρεμβάσεις ή χημικές ουσίες. Η εφαρμογή της καρδιοπροστασίας μειώνει τις βλαβερές συνέπειες της μυοκαρδιακής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με τη παρέμβαση που εφαρμόζεται (Heusch, 2013). Εκτός από τη μείωση του εμφράγματος, οι στρατηγικές καρδιοπροστασίας μειώνουν τις αρρυθμίες, διατηρούν την κοιλιακή λειτουργία και προλαμβάνουν την ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας βελτιώνοντας την κλινική έκβαση (Kleinbongard et al., 2015).

Το φαινόμενο της ισχαιμικής προστασίας (Ischaemic conditioning) περιγράφει μία ομάδα σχετιζόμενων μεταξύ τους ενδογενών καρδιοπροστατευτικών στρατηγικών που βασίζονται στο να καταστήσουν την καρδιά ανθεκτική στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Περιγράφηκε αρχικά από τους Murry et al., οι οποίοι ανέφεραν ότι σύντομοι κύκλοι ισχαιμίας/επαναιμάτωσης προστατεύουν το μυοκάρδιο από το OEM και τη μακροχρόνια βλάβη της επαναιμάτωσης.

Έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία διάφορες καρδιοπροστατευτικές παρεμβάσεις με εντυπωσιακά αποτελέσματα στη προστασία του μυοκαρδίου από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, οι κυριότερες εκ των οποίων συνοψίζονται παρακάτω :

- **Ισχαιμική προετοιμασία (Pre Conditioning –IPC):** Η διαδικασία κατά την οποία εφαρμόζονται ολιγόλεπτοι κύκλοι ισχαιμίας ακολουθούμενοι από επαναιμάτωση ακριβώς πριν την παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας και μπορεί να περιοριώσει το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Murry, Jennings, & Reimer, 1986).

- **Μετισχαιμική προστασία (Post Conditioning –POC):** Η εφαρμογή conditioning κατά την επαναιμάτωση που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2003 κατά την οποία σύντομες, επαναλαμβανόμενες περίοδοι ισχαιμίας, με εναλλαγή με σύντομες περιόδους επαναιμάτωσης επιτυγχάνουν να μειώσουν το μέγεθος του εμφράγματος (Zhao et al., 2003).
- **Απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία (Remote Conditioning –RIPC):** Η εφαρμογή σύντομων κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε ιστούς και όργανα απομακρυσμένα από την καρδιά, όπου αποδείχθηκε από αρκετές μελέτες ότι μπορεί να περιορίσει το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Heusch et al., 2015).
- **Φαρμακολογική προστασία (Pharmacological Conditioning):** Η χορήγηση ενός φαρμάκου κατά την επαναιμάτωση ή πριν την ισχαιμία, που ενεργοποιεί ένα πιθανό σηματοδοτικό μονοπάτι καρδιοπροστασίας και μπορεί να προστατεύσει την καρδιά εγκαίρως από τη βλάβη της επαναιμάτωσης (Hausenloy et al., 2016).
- **Διατροφική προετοιμασία (Nutritional Preconditioning) :** Μορφή φαρμακολογικής προετοιμασίας μεσολαβούμενη από διατροφική παρέμβαση που επάγει την προετοιμασία του μυοκαρδίου, περιορίζει την καρδιακή βλάβη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, οδηγώντας σε καρδιοπροστασία (Efentakis et al., 2017).

1.9 Μεταγωγή σήματος καρδιοπροστασίας

Η μεταγωγή σήματος κατά την καρδιοπροστασία διακρίνεται σε τρία στάδια:

1. Σε πρώτο στάδιο, ένας **διεγέρτης (trigger)** απελευθερώνεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους (καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, κλπ) κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, πριν (IPC) ή μετά (POC) από παρατεταμένη μυοκαρδιακή ισχαιμία, και δρά ως ερέθισμα για την καρδιοπροστασία (Heusch, 2015).

2. Σε δεύτερο στάδιο, ενεργοποιείται από το διεγέρτη ένας εξαρτώμενος ή ανεξάρτητος από υποδοχέα **μεσολαβητής (Mediator)** και μεταδίδει το καρδιοπροστατευτικό σήμα κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Heusch, 2015).

3. Τέλος, ο **τελεστής (Effector)** ως στόχος της καρδιοπροστατευτικής σηματοδότησης, ενεργοποιείται κατά την παρατεταμένη ισχαιμία ή κατά την πρώιμη επαναιμάτωση και μειώνει τη μυοκαρδιακή βλάβη (Heusch, 2015).

1.10 Ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές καρδιοπροστασίας

1.10.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι eNOS/PKG

Η ενδοθηλιακή συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) ενεργοποιείται από την πρωτεϊνική κινάση B (Akt), η οποία ενεργοποιείται μετά από ενεργοποίηση υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνη και στη συνέχεια ενεργοποίηση της κινάσης της διφωσφορικής φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης (PI3K). Το παραγόμενο μονοξείδιο του αζώτου (NO) ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση (cGC) να σχηματίζει κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G (PKG). Έχει αποδειχτεί ότι η PKG είναι υπεύθυνη για την καρδιοπροστασία τόσο της IPC όσο και της POC. Στόχος της PKG είναι ο εξαρτώμενος από το ATP μιτοχονδριακός δίαυλος καλίου και η παραγωγή ROS. Κατά τη διάρκεια της POC, ο ανταλλάκτης ιόντων Na^+/H^+ αποτελεί έναν ακόμη στόχο της PKG, ενώ η ενεργοποίηση της PKG επιβραδύνει την κανονικοποίηση του pH. Επίσης, το NO επάγει καρδιοπροστασία όχι μόνο μέσω της PKG, αλλά και μέσω της νιτροζυλίωσης. Αυτή η ανεξάρτητη από την PKG δράση του λαμβάνει χώρα κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου (Heusch, 2015).

1.10.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι RISK (Reperfusion injury salvage kinase)

Το μονοπάτι RISK αναφέρεται στις κινάσες διάσωσης του μυοκαρδίου από τη βλάβη της επαναιμάτωσης, Akt και τις ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases), η ενεργοποίηση των οποίων κατά την επαναιμάτωση μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος. Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι έγινε γνωστό από τις μελέτες της ερευνητικής ομάδας των Hausenloy, Yellon οι οποίοι εκτός από την επινόηση του ονόματος, απέδειξαν την ενεργοποίηση των PI3K, Akt και ERK πρωτεϊνών κατά τη πρώιμη επαναιμάτωση ως απάντηση σε εξωγενείς καρδιοπροστατευτικούς παράγοντες (Hausenloy et al., 2016).

Το μονοπάτι RISK διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρδιοπροστασία της IPC καθώς συμβάλλει στην ενεργοποίηση της PI3K και των κατώτερων μοριακών στόχων της, Akt και κινάση 3β συνθάσης γλυκογόνου (GSK-3β). Παράλληλα, η ενεργοποίηση των ERK από την αδενοσίνη και η επακόλουθη trans -ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) μετά από σύντομους κύκλους ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αποτελούν σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια καρδιοπροστασίας κατά την IPC. Η GSK-3β, ως κατώτερος στόχος και σημείο σύγκλισης των κινάσων RISK, όταν φωσφορυλιωθεί και κατά συνέπεια ανασταλεί, δρα αναστέλλοντας τη διάνοιξη του MPTP (Heusch, 2015; Juhaszova et al., 2009). Η αναστολή διάνοιξης των MPTP από τις RISK μπορεί να επιτευχθεί και μέσω φωσφορυλίωσης και αναστολής των προ-αποπτωτικών παραγόντων BAD (Bcl-2-associated death promoter) και Bax (BCL2-associated X protein), φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της eNOS ή φωσφορυλίωσης και μετατόπισης της πρωτεϊνικής κινάσης Cε (PKCε) στα μιτοχόνδρια (Hausenloy et al., 2005). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποδεικνύεται η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ των κινάσων του RISK μονοπατιού, Akt και ERK 1/2, καθώς η φαρμακολογική αναστολή μιας κινάσης ενεργοποιεί την άλλη με στόχο να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή προστασία έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Hausenloy et al., 2016).

1.10.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement)

Ο TNFα παραδόξως ξεκινά την ενεργοποίηση ενός νέου μονοπατιού έναντι της βλάβης επαναιμάτωσης, το οποίο ονομάστηκε SAFE και έχει την ικανότητα να μειώνει τον θάνατο των καρδιομυοκυττάρων κατά την επαναιμάτωση, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των RISK. Οι παρεμβάσεις IPC και POC αυξάνουν τα επίπεδα του TNFα, ο οποίος προσδένεται στον υποδοχέα του στη κυτταρική επιφάνεια και ενεργοποιεί την κινάση Janus Kinase (JAK). Όταν η JAK ενεργοποιείται, ενεργοποιεί, με τη σειρά της, τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) από το κυτταρόπλασμα και τον φωσφορυλιώνει σε ένα υπόλοιπο τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση αυτή επιτρέπει στον STAT-3 να σχηματίσει ομοδιμερή και να μετατοπιστεί στον πυρήνα, και να ρυθμίσει προς τα πάνω τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Η αλληλεπίδρασή του με το DNA βελτιώνεται την επιπλέον φωσφορυλίωσή του σε ένα υπόλοιπο σερίνης (Lecour, 2009). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του STAT-3 δε συμμετέχει μόνο στη προς τα πάνω ρύθμιση των καρδιοπροστατευτικών πρωτεϊνών (Bcl, MnSOD, VEGF κλπ). Λόγω της θέσης του στα μιτοχόνδρια, βελτιώνει τη λειτουργία τους καθώς διατηρεί τη λειτουργικότητα του συμπλέγματος I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Boengler et al., 2010), ενώ

συμμετέχει και στην καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση αναστέλλοντας τη διάνοιξη του MPTP (Boengler et al., 2010).

- **Μεταγραφικός Παράγοντας STAT-3**

Ο STAT-3 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται σε αρκετές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες στο μυοκάρδιο. Εντοπίζεται στη μήτρα των υποσαρκολεϊμιατικών μιτοχονδρίων και των μιτοχονδρίων που βρίσκονται ανάμεσα στα μυοϊνίδια και η λειτουργία του οδηγεί στην αύξηση της αναπνοής μέσω του συμπλέγματος I και την αναστολή σχηματισμού ROS. Αποτελεί βασικό συντελεστή του σηματοδοτικού μονοπατιού SAFE και συμβάλλει καθοριστικά στην καρδιοπροστασία κυρίως μέσω αναστολής της διάνοιξης του MPTP (Boengler et al., 2010; Heusch, 2015; Lecour, 2009).

Δομή STAT-3

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο θηλαστικού STAT-3 περιέχει έξι λειτουργικές περιοχές: το αμινο-τελικό άκρο, τη περιελισσόμενη σπείρα, το τμήμα πρόσδεσης του DNA, τον συνδέτη, και τις SH2 (phosphotyrosine/src homology 2) και καρβοξυ-τελικές περιοχές trans-ενεργοποίησης. Υπάρχουν δύο θέσεις φωσφορυλίωσης που οδηγούν στην ενεργοποίηση του STAT-3 : ένα υπόλοιπο τυροσίνης στην περιοχή SH2 (Tyr705) και ένα υπόλοιπο σερίνης στην περιοχή trans-ενεργοποίησης (Ser727). Ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος υπάρχουν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης : η STAT-3α (770 αμινοξέα) που βρίσκεται σε αφθονία και σε μικρότερο βαθμό η STAT-3β (722 αμινοξέα) που στερείται τη καρβοξυ-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης και τη θέση φωσφορυλίωσης στη Ser727 (Bharadwaj et al., 2014).

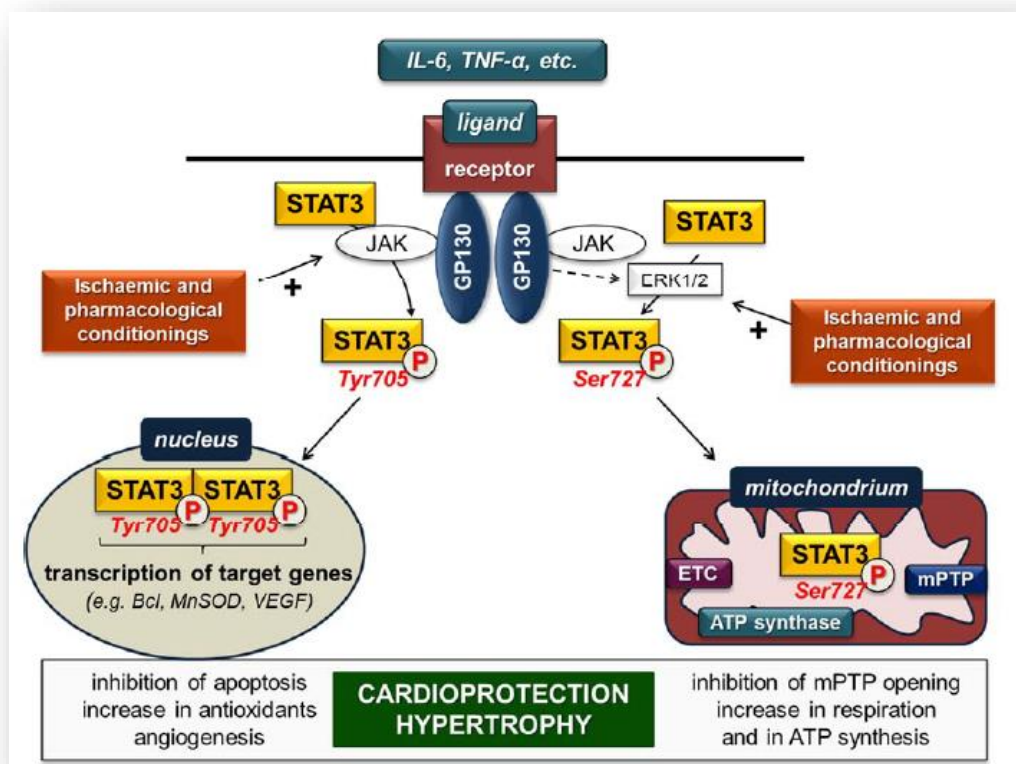
Σηματοδότηση του STAT-3

Μια ποικιλία εξωκυτταρικών πολυπεπτιδικών προσδεμάτων όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας, η ογκοστατίνη M, ο ακτινωτός νευροτροφικός παράγοντας και η καρδιοτροφίνη δρουν στους υποδοχείς της πλάσματικής μεμβράνης και ενεργοποιούν τον STAT-3, κυρίως μέσω του άξονα της κινάσης γλυκοπρωτεΐνης-130-Janus (gp-130-JAK). Η πρόσδεση του συνδέτη στο σύμπλοκο του υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση των JAK που σχετίζονται με τον

υποδοχέα αυτό, ενεργοποιώντας έτσι τον STAT-3 άμεσα ή/και έμμεσα μέσω της σηματοδοτικής οδού ERK1/2 (Εικόνα 9) (Fischer et al., 2008).

Η άμεση ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα μόλις ο gr-130 φωσφορυλιωθεί από τη JAK και παρέχει θέσεις πρόσδεσης για την περιοχή SH2 του STAT-3. Μετά την πρόσδεση ο STAT-3, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από τις JAKs στη Tyr705. Στη συνέχεια, διαχωρίζεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα, σχηματίζει ομο-ή ετεροδιμερή με άλλες πρωτεΐνες STAT και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται με αλληλουχίες DNA και τελικά οδηγεί στην έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Ο STAT-3 ενισχύει την έκφραση αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν αντι-αποπτωτικές (Bcl-x1, MCL-1), αντιοξειδωτικές (MnSOD, μεταλλοθειονεΐνη) και προ-αγγειογόνες πρωτεΐνες (VEGF) (Fischer et al., 2008).

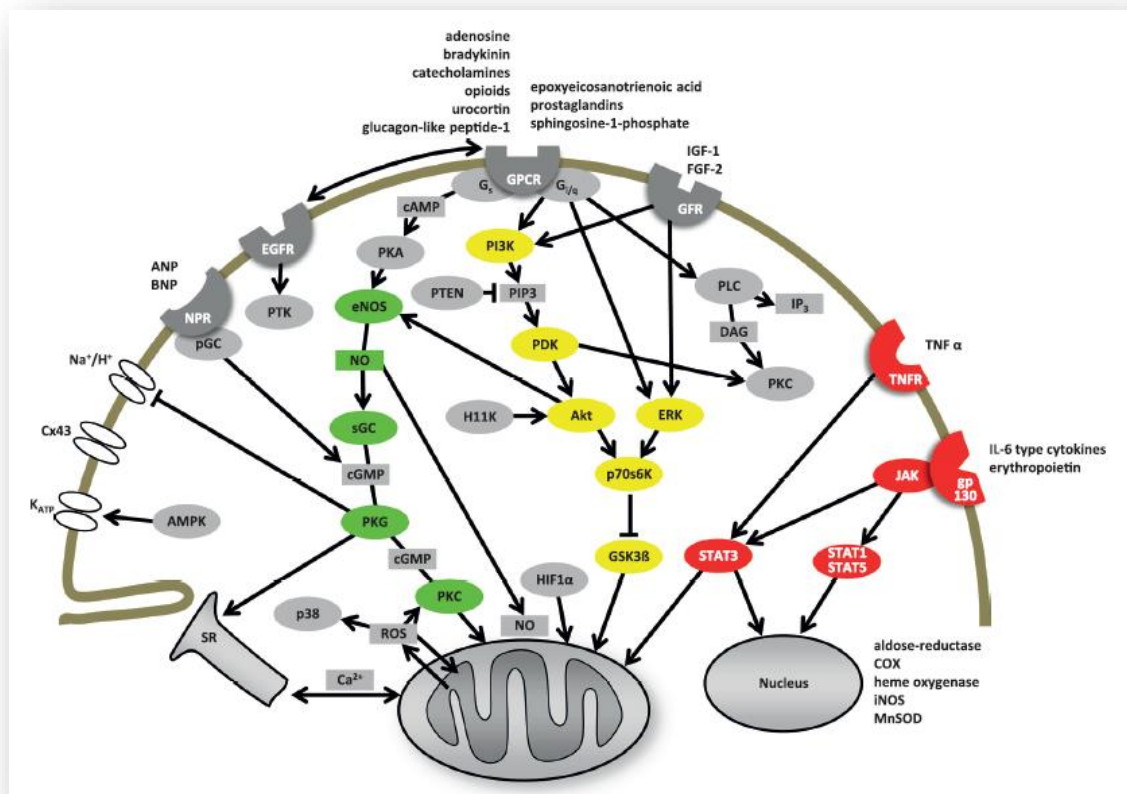
Ο άξονας gr-130-JAK ενεργοποιεί συγχρόνως την ERK1/2, που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τα μονομερή STAT-3 στη Ser727 ή/και τα φωσφορυλιωμένα στη Tyr705 διμερή του STAT-3. Η φωσφορυλίωση των μονομερών STAT-3 στη Ser727 οδηγεί στη μετατόπισή τους στα μιτοχόνδρια χωρίς το διμερισμό τους. Στα μιτοχόνδρια, ο STAT-3 (ser727) αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τον μεσολαβητή του MPTP κυκλοφιλίνη D, το μιτοχονδριακό DNA και πιθανόν να επηρεάζει και τα σύμπλοκα II και V. Επομένως, ο μιτοχονδριακός STAT-3 επηρεάζει την σύνθεση ATP, τη διάνοιξη του mPTP, την παραγωγή ROS και τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Εκτός από τους κλασικούς συνδέτες, η σηματοδότηση του STAT-3 ενεργοποιείται ή ρυθμίζεται και από άλλα ενδογενή ή εξωγενή πεπτίδια, όπως η ινσουλίνη, η λεπτίνη, η αγγειοτενσίνη II, η ερυθροποιητίνη, κλπ (Garama et al., 2016; R. Yang et al., 2016)



Εικόνα 9. Η σηματοδότηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 στα καρδιομυοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Piricz et al., 2018).

1.10.4 Αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών RISK και SAFE

Η πρόκληση ενός OEM, ενεργοποιεί το μονοπάτι SAFE μόνο του ή ταυτόχρονα με το μονοπάτι RISK κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της επαναιμάτωσης. Αν και τα δύο αυτά μονοπάτια προστατεύουν το μυοκάρδιο ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, η διασταύρωσή τους ενδεχομένως απαντάται στην IPC (Lecour, 2009). Εξάλλου, και τα δύο καταλήγουν στα μιτοχόνδρια όπου φαίνεται να οδηγούν στις καρδιοπροστατευτικές δράσεις της IPC μέσω αναστολής της διάνοιξης των MPTP (Boengler et al., 2010; J Hausenloy et al., 2005).



Εικόνα 10. Σηματοδοτικά μονοπάτια καρδιοπροστασίας (Μονοπάτια **eNOS/PKG** , **RISK** και **SAFE**) (Heusch, 2015)

2. Στόχος Εργασίας

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν η διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης ύστερα από την οξεία χορήγησή της σε ένα υγιές πειραματικό μοντέλο ενήλικων C57BL/6 μυών, δηλαδή απουσία ΣΔ2, μέσω της υποβολής τους σε βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και η διερεύνηση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επόμενος στόχος, ήταν η περαιτέρω μελέτη της καρδιοπροστατευτικής δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης ύστερα από χρόνια χορήγηση σε ένα επίσης υγιές μοντέλο μυών μέσω της διερεύνησης της έκτασης του εμφράγματος και του εμπλεκόμενου μοριακού μηχανισμού ύστερα από χειρουργική παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Τέλος για την περαιτέρω μελέτη της εμπλοκής του STAT-3 στον μηχανισμό καρδιοπροστασίας της Εμπαγλιφλοζίνης, διερευνήθηκε η βιωσιμότητα ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC και καρδιομυοκυττάρων H9C2 παρουσία Εμπαγλιφλοζίνης, αλλά και ενός αναστολέα της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 (STATTIC).

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Πειραματική Διαδικασία Απομόνωσης της Εμπαγλιφλοζίνης

Υλικά

- Δισκία Jardiance των 25mg
- Γουδί μικρού μεγέθους
- Διηθητικό χαρτί
- Γυάλινο χωνί διήθησης
- Εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη
- Falcon των 25 ml
- Eppendorf

Διαλύματα

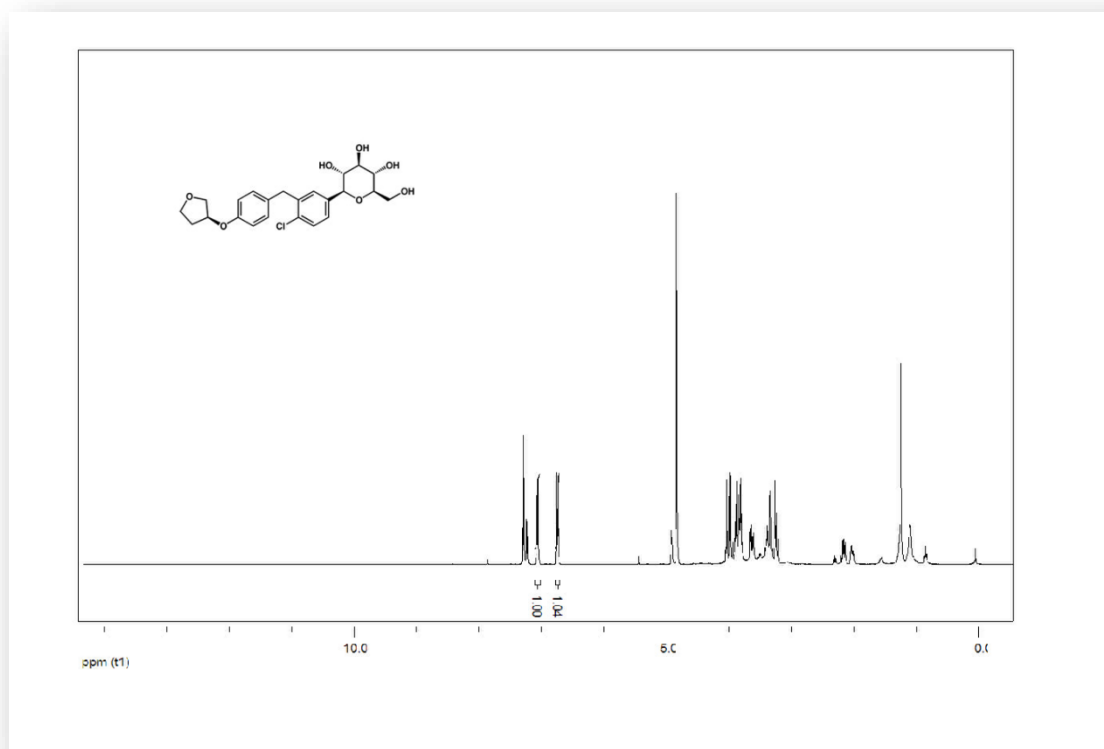
- Απόλυτη αιθανόλη
- Διαιθυλαιθέρας

Η διαδικασία απομόνωσης της δραστικής από τα δισκία γίνεται ως εξής :

Δισκία Jardiance των 25 mg κονιοποιούνται σε γουδί και διαλυτοποιούνται σε παγωμένη απόλυτη αιθανόλη. Για κάθε δύο δισκία χρειάζονται περίπου 20-40ml. Το διάλυμα διηθείται με τη χρήση πτυχωτού ηθμού σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη χωρίς τις αδιάλυτες στην αιθανόλη ουσίες δηλαδή τα τμήματα της επικάλυψης και τα εκδόχα των δισκίων.

Το τελικό διήθημα, μεταφέρεται ποσοτικά σε falcon των 25 ml προς φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 2250g για 10-15 λεπτά. Στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο σε νέο falcon και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση ώστε να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών των δισκίων. Το νέο υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη για την απομάκρυνση του διαλύτη (απόλυτη αιθανόλη) σε κενό με τη χρήση συσκευής Rotavapor. Η σφαιρική με την υπολοιπούμενη, σε στέρεη μορφή πλέον, δραστική ουσία ζυγίζεται και υπολογίζεται με το απόβαρο της σφαιρικής η ποσότητα της ουσίας που έχει απομονωθεί. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα διαιθυλαιθέρα και γίνεται απόξεση του στερεού από τα τοιχώματα και αυτό μεταφέρεται σε eppendorf το οποίο ζυγίζεται εκ νέου για να επιβεβαιωθεί η προηγούμενη μέτρηση.

Τέλος επιβεβαιώνεται η ποιότητα της δραστικής ουσίας που απομονώθηκε με τη χρήση τεχνικής NMR σε μηχάνημα 600 Hz.



Εικόνα 11. Ανάλυση NMR Εμπαγλιφλοζίνης.

3.2 Διαχείριση Πειραματοζώων

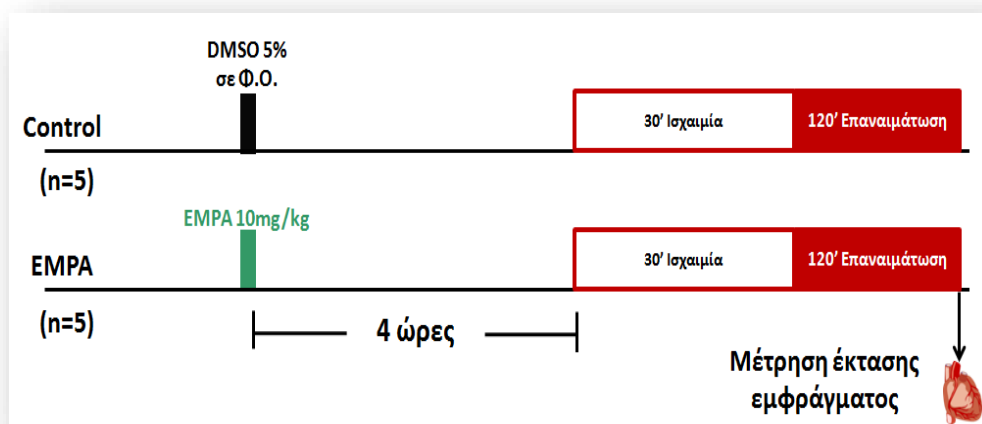
Στα πειραματικά πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι υγιείς μύες C57BL/6, ηλικίας 8 εβδομάδων και βάρους μεταξύ 25 και 30gr. Έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία η οποία εναρμονίστηκε με την Οδηγία 86/609, του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης με το Προεδρικό Διάταγμα (ΠΔ) 160 περί της προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Οι μύες τρέφονταν με τη συνήθη εργαστηριακή διατροφή κατά βούληση και στεγάζονταν σε μια εγκατάσταση χωρίς ειδικά παθογόνα στους 20 - 25°C. Όλοι οι χειρισμοί των ζώων ήταν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για τη χρήση πειραματόζωων και υλοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ. Αριθμός Πρωτοκόλλου: 2746/05-06-2018

3.3 Πειραματικά Πρωτόκολλα

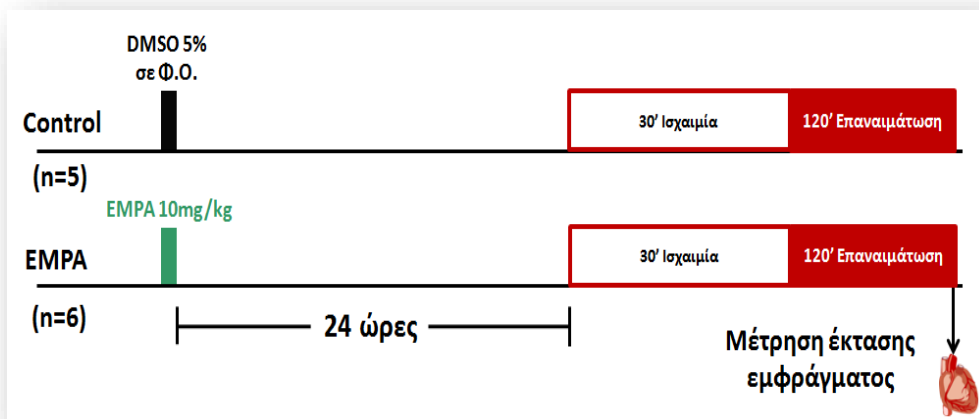
Για τους στόχους της παρούσας μελέτης σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν τα παρακάτω in vivo και in vitro πειραματικά πρωτόκολλα.

3.3.1 Πρωτόκολλο 1 (*In vivo*): Διερεύνηση της δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου ύστερα από οξεία χορήγηση σε υγιείς μύες

Το 1^ο πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε για το σκοπό της διερεύνησης της δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου ύστερα από οξεία χορήγηση σε υγιές πειραματικό μοντέλο. 21 υγιείς μύες C57BL/6 τυχαιοποιήθηκαν σε 4 ομάδες, δύο ομάδες ελέγχου και δύο ομάδες EMPA, στις οποίες χορηγήθηκαν ο διαλύτης της Εμπαγλιφλοζίνης (DMSO 5% σε φυσιολογικό ορό) και η Εμπαγλιφλοζίνη διαλυμένη σε 5% DMSO και φυσιολογικό ορό αντίστοιχα στην ίδια δόση με τη προηγούμενη μελέτη (Andreadou et al., 2017). Οι χορηγήσεις έγιναν από του στόματος με τη χρήση συσκευής gavage, 24 ή 4 ώρες πριν την υποβολή των πειραματόζων σε χειρουργική παρέμβαση 30 λεπτών ισχαιμίας και 120 λεπτών επαναιμάτωσης και παραλήφθηκαν ιστοί για το προσδιορισμό της έκτασης του εμφράγματος.



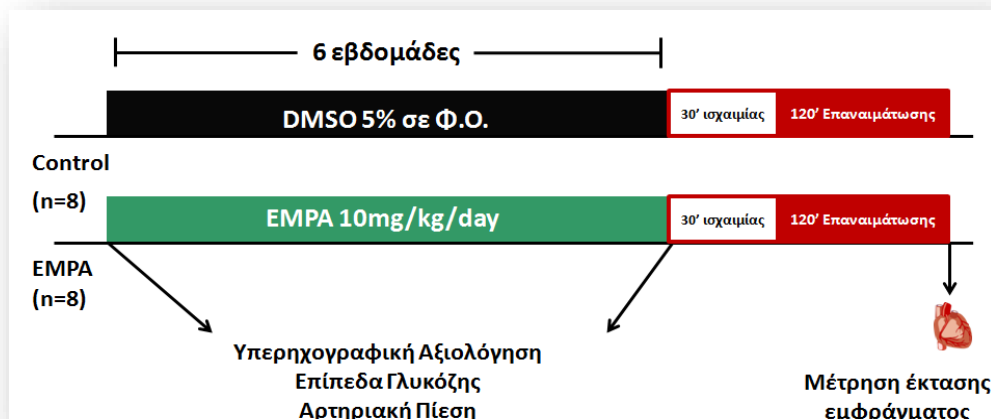
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση 1^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου (4 ώρες).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση 1^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου (24 ώρες).

3.3.2 Πρωτόκολλο 2 (*In Vivo*): Διερεύνηση της δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου ύστερα από χρόνια χορήγηση σε υγιείς μύες

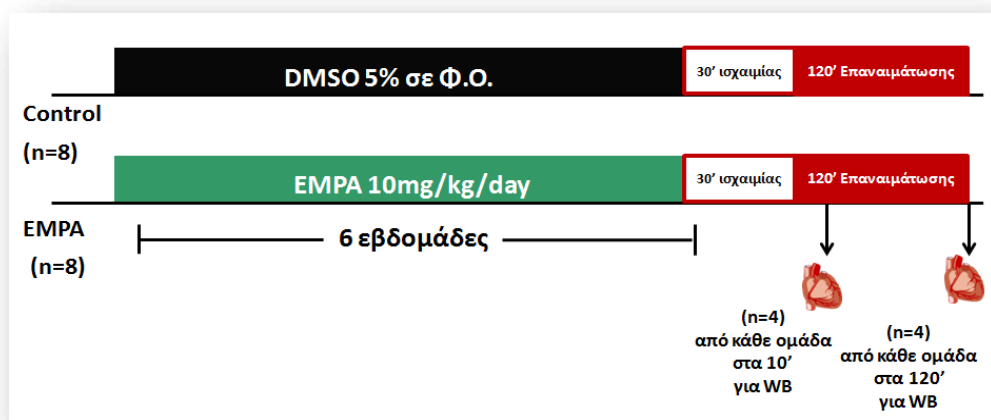
Με σκοπό τη διερεύνηση της δράσης της Εμπαγλιφλοζίνης στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου ύστερα από χρόνια χορήγηση σε υγιές πειραματικό μοντέλο, σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε το 2^ο πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας. 16 υγιείς μύες C57BL/6 τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα EMPA και την ομάδα ελέγχου, στις οποίες χορηγήθηκαν από του στόματος, με τη χρήση συσκευής gavage, η Εμπαγλιφλοζίνη και ο διαλύτης της αντίστοιχα, στην ίδια δόση με το προηγούμενο πρωτόκολλο για έξι εβδομάδες. Στο τέλος του πρωτοκόλλου οι μύες υποβλήθηκαν σε χειρουργική παρέμβαση 30 λεπτών ισχαιμίας και 120 λεπτών επαναιμάτωσης και παραλήφθηκαν ιστοί για το προσδιορισμό της έκτασης του εμφράγματος.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση 2^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου διερεύνησης της έκτασης του εμφράγματος.

3.3.3 Πρωτόκολλο 3 (*In Vivo*): Διερεύνηση του εμπλεκόμενου μηχανισμού καρδιοπροστασίας της Εμπαγλιφλοζίνης ύστερα από χρόνια χορήγηση σε υγιείς μύες

Ακολούθως, σε 2^η σειρά πειραμάτων, 16 υγιείς μύες C57BL/6 υποβλήθηκαν στις ίδιες ακριβώς παρεμβάσεις με το 2^ο πρωτόκολλο με την εξαίρεση ότι παραλήφθηκε μυοκαρδιακός ιστός από την ισχαιμική περιοχή στα 10 (n=4) ή στα 120 (n=4) λεπτά της επαναιμάτωσης για τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού σηματοδότησης με τη χρήση της αναλυτικής μεθόδου Western Blot.



Εικόνα 15: Σχηματική Απεικόνιση 3^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου διερεύνησης του εμπλεκόμενου μοριακού μηχανισμού σηματοδότησης.

3.3.4 Πρωτόκολλο 4 (*In Vitro*): Διερεύνηση του καρδιοπροστατευτικού ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3

Με σκοπό τη περαιτέρω διερεύνηση του καρδιοπροστατευτικού ρόλου της Εμπαγλιφλοζίνης μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3, σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε ένα επιπλέον πειραματικό πρωτόκολλο σε κυτταρικές σειρές ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC και καρδιομυοβλαστών H9C2. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες υποξίας / επανοξυγόνωσης παρουσία της Εμπαγλιφλοζίνης (500nm) ή/και του αναστολέα του STAT-3, STATTIC (500nm).

- **Καλλιέργεια καρδιομυοβλαστών H9C2**

Εμπορικά διαθέσιμα κύτταρα H9c2 προμηθεύτηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC · Manassas, VA). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM), 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% (v / v) στρεπτομυκίνη / πενικιλίνη στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε 80% συρροή, αφαιρέθηκαν από τη φιάλη, μετρήθηκαν σε θάλαμο Burker και τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 φρεατίων για την αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

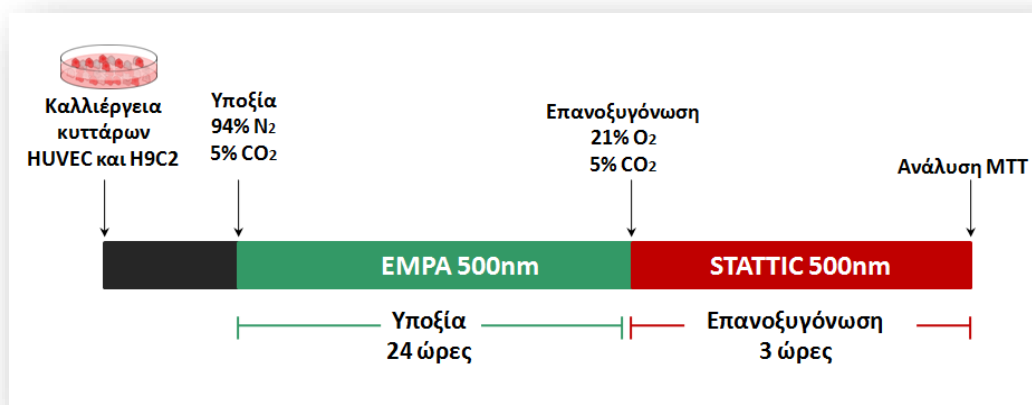
- **Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC**

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC απομονώθηκαν εντός 4 ωρών από την απελευθέρωσή τους με κατεργασία με Θρυψίνη (0,1%) και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο M199 παρουσία 10% FBS και 10 ng / ml βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF). Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε 80% συρροή, αφαιρέθηκαν από τη φιάλη, μετρήθηκαν σε θάλαμο Burker και τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 φρεατίων για την αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

- **Πρωτόκολλο υποξίας / επανοξυγόνωσης (H/R)**

Για να μελετηθεί η απόκριση στο *in vitro* πρωτόκολλο υποξίας / επανοξυγόνωσης (H / R), τόσο τα κύτταρα H9c2 όσο και τα κύτταρα HUVEC υποβλήθηκαν σε 24 ώρες υποξίας (5%

CO₂ και 94% N₂) και ακολούθως σε 3 ώρες επανοξυγόνωσης (21% O₂ και 5% CO₂) . Κατά τη διάρκεια της υποξίας τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με Εμπαγλιφλοζίνη (EMPA · 500 nM) και στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της επανοξυγόνωσης υποβλήθηκαν στον αναστολέα ενεργοποίησης του STAT-3, Stattic (500 nM).



Εικόνα 16: Σχηματική Απεικόνιση 4^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου (in vitro)

3.4 Μέτρηση Επιπέδων Γλυκόζης Νηστείας

Τα επίπεδα γλυκόζης αίματος του 2^{ου} πρωτοκόλλου, μετρήθηκαν πριν την έναρξη της θεραπείας, στις 21 μέρες και τη τελευταία μέρα των χορηγήσεων, με τη χρήση ενός φορητού μετρητή σακχάρου (Onetouch Verio IQ Lifescan, Johnson & Johnson Company) και με τη λήψη μιας σταγόνας αίματος από την ουρά του μυός, τεντώνοντάς την και τρυπώντας την κάθετα με μια βελόνα μεσαίου μεγέθους. Οι μύες παρέμεναν νηστικοί για τουλάχιστον 8 ώρες πριν από κάθε μέτρηση γλυκόζης.

3.5 Μέτρηση Αρτηριακής Πίεσης

Κατά την έναρξη και στο τέλος του 2^{ου} πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκε μη επεμβατική μέτρηση της αρτηριακής πίεσης των μυών με τη χρήση συστήματος CODA Monitor tail-cuff (Kent Scientific Co., Torrington, CT USA). Οι μύες ακινητοποιούνται και τοποθετούνται σε ένα συγκρατητήρα πάνω από ένα θερμαινόμενο μαξιλάρι. Ύστερα από μια περίοδο

εγκλιματισμού περίπου 5 λεπτών, τοποθετείται στην ουρά ένα ειδικό cuff και πραγματοποιούνται τουλάχιστον 10 διαδοχικοί κύκλοι προσδιορισμού ΑΠ. Όλες οι μετρήσεις καταγράφονται στο λογισμικό CODA . Σε περίπτωση εμφάνισης ενδείξεων δυσφορίας, το πειραματόζωο επιστρέφεται στο κλωβό και επανεξετάζεται 1 ώρα αργότερα.

3.6 Υπερηχογραφική αξιολόγηση

Η λήψη υπερήχων του 2^{ου} πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη των χορηγήσεων και κατά τη λήξη των 6 εβδομάδων πριν την υποβολή των μυών στη χειρουργική παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Οι μύες υποβλήθηκαν σε αναισθησία με ισοφλουράνιο και πραγματοποιήθηκε υπερηχογραφική αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπερήχων (Vevo 2100, FUJIFILM VisualSonics, USA) με γραμμικό μετατροπέα 13-MHz. Υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι: καρδιακός ρυθμός (heart rate, HR), τελοδιαστολική και τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας (left ventricular end-diastole and end-systole diameter, LVEDD, LVESD), πάχος οπίσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας στη διαστολή και συστολή (left ventricular posterior wall thickness at diastole and systole, LVPWd, LVPWs), επί τοις εκατό κλάσμα συστολικής βράχυνσης (fractional shortening, FS % = (LVEDD - LVESD) / LVEDD * 100%) και ο λόγος της ακτίνας της αριστερής κοιλίας προς το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος (left ventricular radius to posterior wall thickness ratio, r/h).

3.7 Χειρουργική Διαδικασία Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης σε μύες

Υλικά

- 2 Falcon (15 ml, 50 ml)
- Σύριγγες (1 ml, 5 ml)
- Θερμαινόμενο Υπόστρωμα
- Λευκοπλάστ
- Απολίνωση
- Γάζες μικρού μεγέθους
- Μπατονέτες
- Μικρό πλαστικό σωληνάκι
- Μπλέ φλεβοκαθετήρας (χωρίς βελόνα)

- Καρδιογράφος
- Αναπνευστήρας μικρών ζώων MiniVent (Harvard Apparatus)
- Χειρουργικά Εργαλεία (Λαβίδες, Αιμοστατική, Mosquito, Ψαλίδι)
- 6-0 μεταξωτό ράμμα
- Ψηφιακή κάμερα Canon Powershot A620 (Canon, Tokyo, Japan)
- Μικροσκόπιο Zeiss 459300 (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany)

Διαλύματα

- Κεταμίνη
- Ξυλαζίνη
- Ατροπίνη
- Φυσιολογικός Ορός
- Αιθανόλη 70%
- Χρωστική Evans Blue
- TTC 1%
- NSBF 10%

Πειραματική Διαδικασία

Προετοιμασία Αναισθησίας : Σε ένα falcon, προστίθενται 1 ml κεταμίνης, 0,5 ml ξυλαζίνης και 0,25 ml ατροπίνης και αραιώνονται μέχρι τα 10 ml σε φυσιολογικό ορό.

Ακίνητοποίηση και αναισθητοποίηση μυός : Ακίνητοποιείται το πειραματόζωο και με μια σύριγγα, του 1 ml, την οποία έχουμε φορτώσει με το διάλυμα αναισθησίας που προετοιμάσαμε προηγουμένως, το αναισθητοποιούμε χορηγώντας την αναισθησία που αντιστοιχεί στο βάρος του (100μL/10gr ζώου). Η χορήγηση γίνεται ενδοπεριτονεακά στο κάτω δεξί τεταρτημόριο ανάμεσα στο πόδι του ζώου και τη μέση γραμμή. Για τη πλήρη αναισθητοποίηση του πειραματοζώου απαιτούνται περίπου 15 λεπτά και επιβεβαιώνεται πριν την έναρξη της χειρουργικής διαδικασίας ελέγχοντας τα αντανακλαστικά του αφού ασκηθεί πίεση με μια λαβίδα στα άκρα του.

Προετοιμασία μυός για έναρξη χειρουργικής διαδικασίας : Το πειραματόζωο τοποθετείται σε θερμαινόμενο υπόστρωμα σε ύπτια θέση, στερεώνεται από τα χέρια και την ουρά του με λευκοπλάστ, και με μια απολίνωση στα άνω δόντια για να είναι σε πλήρη ορατότητα ο λαιμός του. Στη συνέχεια εγκαθίσταται καρδιογράφος τοποθετώντας τα τρία ηλεκτρόδια στο πειραματόζωο τοποθετώντας το μαύρο ηλεκτρόδιο στο πόδι του και τα άλλα δύο

(πράσινο-κόκκινο) στα άνω άκρα παράλληλα με το υπόστρωμα. Η καταγραφή του καρδιογραφήματος γίνεται με τη χρήση του λογισμικού LabChart ρυθμίζοντάς το στην επιλογή για μύες.

Υποβολή μύος σε μηχανική υποστήριξη αναπνοής : Ψεκάζουμε με αιθανόλη το σημείο του λαιμού που θα διανοιχθεί. Με χειρουργική λαβίδα ανασηκώνεται το δέρμα και με ένα ψαλίδι κρατώντας το παράλληλα, κόβεται το δέρμα. Απομακρύνεται ο επιθηλιακός ιστός που εμφανίζεται και με τη χρήση δύο λαβιδών διαχωρίζονται οι αδένες και αποκαλύπτεται η τραχεία, η οποία έχει λευκό χρώμα και φέρει δακτύλιους. Με τη βοήθεια λαβίδας περνιέται μια απολίνωση από κάτω και έπειτα με ένα ψαλίδι διανοίγεται μια μικρή οπή και συνδέεται προσεκτικά ο αναπνευστήρας. Ο αναπνευστήρας MiniVent ρυθμίζεται για 200 strokes/min και 250 stroke volume. Με απλό κόμπο, σφίγγεται η απολίνωση γύρω από τη τραχεία για να σταθεροποιηθεί ο αναπνευστήρας.

Υποβολή μύος σε Ισχαιμία/Επαναιμάτωση : Γυρίζεται το πειραματόζωο στο πλάι με την αριστερή πλευρά προς τα επάνω και ψεκάζεται με αιθανόλη το σημείο κάτω από το αριστερό χέρι και προς τα κάτω, δηλαδή το σημείο που θα διανοιχθεί για να γίνει η αποκάλυψη της καρδιάς. Το δέρμα ανασηκώνεται και με ένα ψαλίδι κόβεται παράλληλα στο ζώο. Ανοίγονται προσεκτικά οι στοιβάδες ιστού προσπαθώντας να αποφευχθεί τυχόν αιμορραγία μέχρι να εμφανιστούν τα πλευρά. Σε περίπτωση αιμορραγίας, εντοπίζεται το σημείο που αιμορραγεί και τοποθετείται αιμοστατική λαβίδα ή μπατονέτα ανάλογα με το μέγεθος της αιμορραγίας. Πριν τη διάνοιξη των πλευρών χορηγείται στο ζώο λίγη ακόμα αναισθησία και στη συνέχεια κρατώντας ένα ψαλίδι κάθετα στο ζώο κάνοντας μια οπή μέσα στο θωρακικό μυ και ανάμεσα στο δεύτερο και τρίτο πλευρό, πιάνεται με τη βοήθεια λαβίδας το ένα πλευρό και αφαιρείται κόβοντάς το προς τα επάνω (προς το πνεύμονα) και έπειτα το δεύτερο πλευρό για καλύτερη πρόσβαση στη καρδιά. Αφού αποκαλυφθεί η καρδιά, αφαιρείται προσεκτικά το περικάρδιο με τη χρήση δύο λαβιδών ώστε να διευκολυνθεί η πρόκληση της ισχαιμίας. Έπειτα γίνεται προσπάθεια εντοπισμού του πρόσθιου κατιόντα στη καρδιά για να περαστεί το ράμμα περίπου 3-4 mm κάτω από τη βάση της αρτηρίας και επιφανειακά. Τοποθετείται ένα πλαστικό σωληνάκι και δένεται το ράμμα σφιχτά με ένα κόμπο γύρω από αυτό για να επιτευχθεί η διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος στο πρόσθιο κατιόντα και να προκληθεί ισχαιμία. Η διάρκεια της ισχαιμίας είναι 30'.

Με το πέρας της ισχαιμίας, αφαιρείται το πλαστικό σωληνάκι και λύνεται ο κόμπος ώστε να ξεκινήσει η επαναιμάτωση η διάρκεια της οποίας, για τη συγκεκριμένη εργασία ήταν 120 ή

10 λεπτά. Τέλος καλύπτεται με μια γάζα εμποτισμένη με ορό η ανοιχτή περιοχή για να διατηρείται ενυδατωμένη μέχρι τη λήξη της επαναιμάτωσης.

Προετοιμασία Χρώσης Καρδιάς : Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης προετοιμάζεται το διάλυμα χρώσης Evans Blue 2.5 ή 5 % αραιωμένο με φυσιολογικό ορό. Προτιμάται το διάλυμα 2.5% ώστε η χρώση να είναι πιο αραιή και να μη βάφει έντονα.

Με το πέρας της επαναιμάτωσης, αφαιρείται η καρδιά πιάνοντας τη με μια λαβίδα πάνω από τη βάση και κόβοντάς τη με ένα ψαλίδι και τοποθετείται πάνω σε μια γάζα εμποτισμένη με ορό. Αμέσως το πειραματόζωο ευθανατώνεται με εξάρθρωση τραχήλου. Στη συνέχεια, με τη χρήση μιας σύριγγας φορτωμένης με 5ml ορό και ενός καθετήρα ο οποίος πρέπει να περαστεί μέσα από την αορτή, ξεπλένεται η καρδιά πριν τη χρώση. Με μια απολίνωση δένεται η καρδιά πάνω στο καθετήρα με διπλό κόμπο και το λυμένο ράμμα δένεται εκ νέου για τη σωστή χρώση της καρδιάς. Αφαιρείται ο καθετήρας με τη καρδιά από τη σύριγγα με τον ορό και το τοποθετείται πάνω σε μια σύριγγα με Evans Blue. Το βάψιμο της καρδιάς γίνεται αργά και προσεκτικά με περίπου 1ml χρώσης και αφήνοντας τη κορυφή της καρδιάς άβαφη. Η διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από τρεχούμενο νερό για να ξεπλένεται ταυτόχρονα η περίσσεια χρώσης. Τέλος η βαμμένη πλέον καρδιά, τοποθετείται σε ένα erpendorf και φυλλάσσεται στους -20°C για 1-2 μέρες.

Μέτρηση έκτασης εμφράγματος : Για τη μέτρηση της έκτασης του εμφράγματος απαιτούνται διάλυμα TTC 1% και διάλυμα φορμόλης (10% NSBF) των οποίων οι συστάσεις αναγράφονται στους πίνακες παρακάτω.

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος TTC 1%.

TTC 1%	
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)	0.1 g
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	10 ml

Πίνακας 4 : Σύσταση διαλύματος NSBF 10%.

10% NSBF	
Formalin	100 ml
NaH₂PO₄	4 g/lit
Na₂HPO₄	6.5 g/lit
dd H₂O	900 mL

Πάνω σε παγωμένη επιφάνεια και αφού έχει αφαιρεθεί η καρδιά από το erpendorf, κόβεται σε λεπτές τομές 1-2 mm από τη κορυφή της μέχρι το ράμμα (2-3 τομές). Οι τομές αποθηκεύονται σε ένα erpendorf και φυλάσσονται στο πάγο. Στη συνέχεια αφού κοπούν όλες οι καρδιές, προστίθενται 800μL διαλύματος TTC σε κάθε erpendorf με σκοπό να καλύπτονται οι ιστοί. Σε περίπτωση που ξεβάφει η χρώση αφαιρείται το υπάρχων διάλυμα και προστίθεται ίδια ποσότητα εκ νέου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2-3 φορές μέχρι να ξεπλυθεί η περίσσεια χρώσης. Στη συνέχεια επωάζονται οι καρδιές στο υδατόλουτρο στους 37°C για 20 λεπτά και στο τέλος της επώασης αφαιρείται το διάλυμα TTC και προστίθενται 60μL διαλύματος φορμόλης. Οι ιστοί επωάζονται στη φορμόλη για 48 ώρες πριν τη φωτογράφησή τους. Τέλος, φωτογραφίζονται οι τομές με τη βοήθεια μικροσκοπίου Zeiss 459300 (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany) και ψηφιακής κάμερας Canon Powershot A620 (Canon, Tokyo, Japan). Το συνολικό μέγεθος της κάθε φέτας (All / A), η περιοχή κινδύνου (R) και η περιοχή εμφράγματος (I) προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας λογισμικό ImageJ (μέτρηση εμβαδού) και υπολογίζονται τα ποσοστά των λόγων των εμβαδών R / A% και I / R (Andreadou et al., 2017).

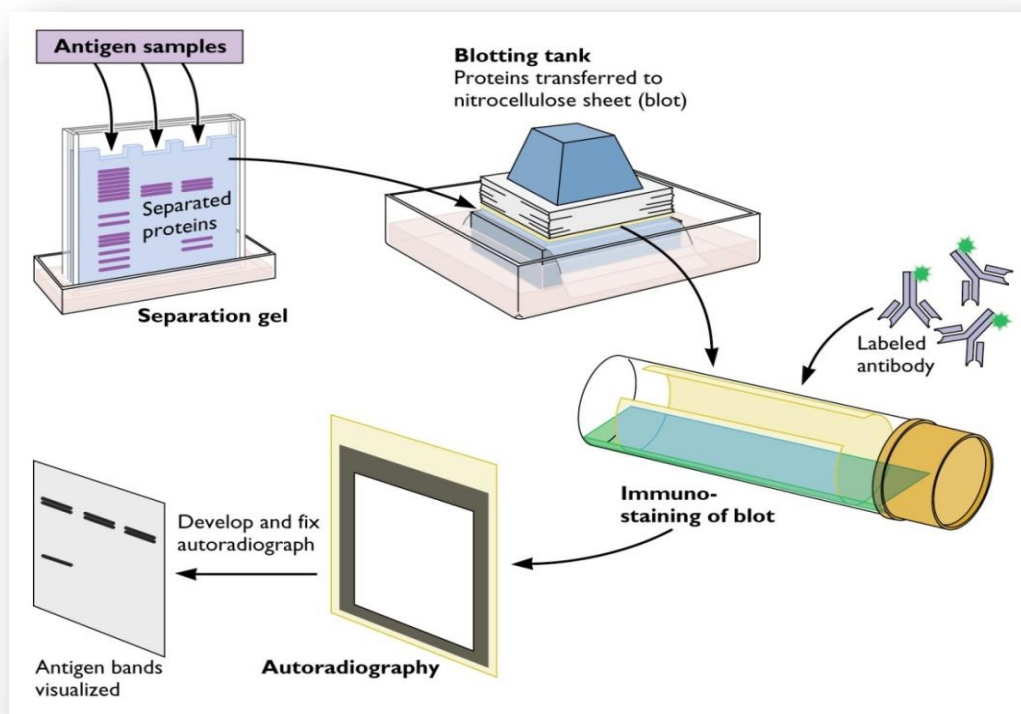
3.8 Αναλυτικές Μέθοδοι

3.8.1 Western blot

Αρχή μεθόδου

Η τεχνική Western blot είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα εκχύλισμα ή δείγμα ομογενοποιημένου ιστού. Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με τρισδιάστατη δομή ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών από πολυπεπτίδια χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση πηκτής. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή πολυ-βίνυλοπυρρολιδόνης

PVDF), πάνω στην οποία συνδέονται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια ανιχνεύονται πάνω σε ειδικό φωτογραφικό φίλμ σε μορφή μπαντών που καθιστούν εύκολη τη ποσοτικοποίησή τους (P.-C. Yang & Mahmood, 2012).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας Western Blot

(<https://www.mybiosource.com/learn/westernblotting>)

Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση Western Blot

Ο μυοκαρδιακός ιστός βαπτίζεται σε υγρό άζωτο για την αποφυγή της καταστροφής μέρους των πρωτεϊνών από τις φωσφατάσες και τις πρωτεάσες του ιστού. Τμήμα του μυοκαρδίου μεταφέρεται σε ιγδίο πορσελάνης ενώ ταυτόχρονα διαβρέχεται με υγρό άζωτο και με τη χρήση υπέρου μετατρέπεται σε κόνι. Στη συνέχεια η κόνις διαβρέχεται με lysis buffer (σε κάθε 50 mg ιστού καρδιάς αντιστοιχούν 500 μ L Lysis buffer).

Η σύσταση του Lysis buffer είναι η εξής:

- 1% v/v Triton X : Μη ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας που καταστρέφει τις λιπιδικές με μεμβράνες και απελευθερώνει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες
- 20 mM TRIS HCl : Ρυθμιστικό διάλυμα με εύρος pH 7 έως 9,

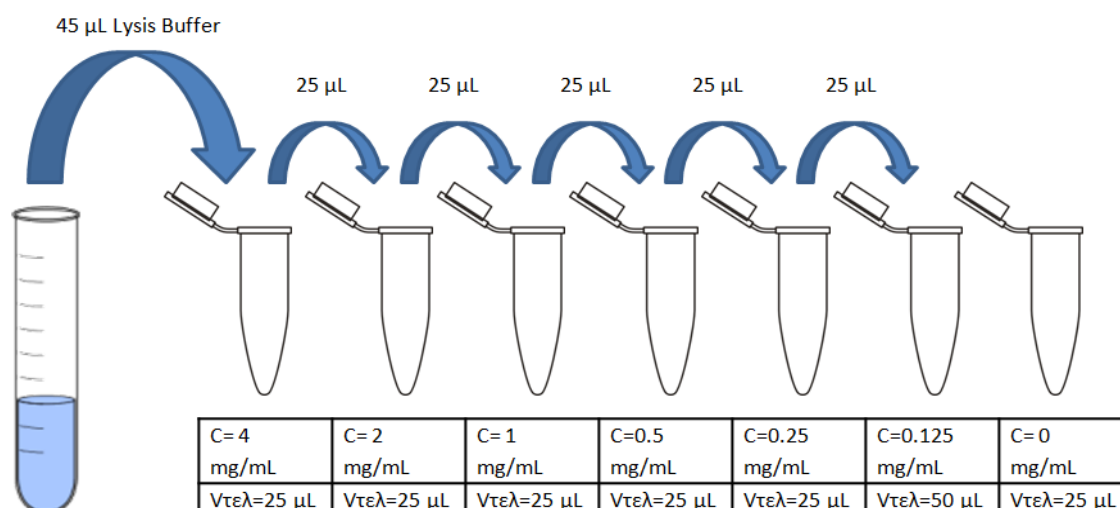
- 150 mM NaCl : Καθορίζει και σταθεροποιεί την ιονική ισχύ του διαλύματος καθώς επίσης ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του διαλύματος.
- 50 mM NaF : Ανταγωνιστής της φωσφατάσης Σερίνης-Θρεονίνης ώστε να μην καταστραφεί το δείγμα.
- 1 mM EDTA : Συμπλοκοποιητικός παράγοντας των ιόντων Mg^{2+} και Mn^{2+} που δρα ως ανταγωνιστής των μεταλλοπρωτεασών που απαιτούν την ύπαρξή τους για να δράσουν.
- 1mM EGTA: Συμπλοκοποιητικός παράγοντας των ιόντων Ca^{2+} που δρα ως ανταγωνιστής των μεταλλοπρωτεασών που απαιτούν την ύπαρξή τους για να δράσουν.
- 1% w/v SDS : Ιονικό επιφανειοδραστικό που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες από τις μεμβράνες (το υδρόφοβο τμήμα «περικυκλώνει» τις βιολογικές μεμβράνες και έτσι απομονώνονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες από τη μεμβράνη). Επίσης μετουσιώνει τις πρωτεΐνες καταστρέφοντας την τριτοταγή τους δομή , ευθυγραμμίζοντάς τις έτσι ώστε να μπορούν να πακεταριστούν στο στάδιο της φόρτωσης στα gel.
- 0.5% w/v Sodium Deoxycholate: Ιονικό επιφανειοδραστικό που «λύνει» τα κύτταρα και διαλυτοποιεί κυτταρικά και μεμβρανικά συστατικά καθώς επίσης μειώνει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.
- 10 μ L PMSF : Ανταγωνιστής των πρωτεασών σερίνης-κυστεΐνης
- NaDPH : Αναγωγικό. Οξειδώνεται και μειώνει την οξείδωση των πρωτεϊνών.
- Αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών.

Ακολουθεί η ομογενοποίηση σε ειδική συσκευή μέσα σε πάγο για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 11000 στροφές (rpm) στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο κατακρημνίζονται τα αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά και λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα δηλαδή το πυκνό διάλυμα ιστού που ονομάζεται lysate. Τα δείγματα τοποθετούνται και αποθηκεύονται στον υπερκαταψύκτη στους -80°C.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, τα δείγματα βγαίνουν από τον υπερκαταψύκτη και τοποθετούνται πάνω σε πάγο μέχρι να ρευστοποιηθούν. Στη συνέχεια, γίνεται καμπύλη αναφοράς με πρωτεΐνη αναφοράς τη βόεια αλβουμίνη ορού (Bovine Serum Albumin ή BSA) (συγκέντρωση συναρτήσει απορρόφησης) με σκοπό τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν την προηγούμενη μέρα με τη μέθοδο Lowry.

Η BSA βρίσκεται αποθηκευμένη στον καταψύκτη του εργαστηρίου στους -20°C , σε stock των 5 mL με συγκέντρωση 40 mg/mL.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των αραιώσεων που απαιτούνται στη μέθοδο προσδιορισμού πρωτεΐνης Lowry.

Στο πρώτο Eppendorf (stock) προστίθενται 45 µL lysis buffer. Το διάλυμα που προκύπτει έχει όγκο 50 µL με συγκέντρωση 4 mg/mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις με λήψη 25 µL από το πιο πυκνό δείγμα και αραιώνονται με 25 µL lysis buffer. Έτσι δημιουργούνται τα εξής δείγματα BSA με συγκεντρώσεις 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0 mg/mL (χωρίς BSA) που αποτελούν την καμπύλη αναφοράς. Να σημειωθεί ότι ο τελικός όγκος του δείγματος με συγκέντρωση 0,125 mg/mL είναι 50 µL και όχι 25 µL όπως όλα τα υπόλοιπα, επειδή δε μεταφέρονται στο τελευταίο

δείγμα (blank) τα 25 μL από το προηγούμενο Eppendorf. Από αυτά τα δείγματα που παρασκευάστηκαν, λήφθηκαν 5 μL , τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε κελιά μιας μικροπλάκας (plate). Κάτω από τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς προστίθενται 5 μL από τα δείγματα αγνώστου συγκέντρωσης πρωτεΐνης που παρασκευάστηκαν την προηγούμενη μέρα (lysates). Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το αντιδραστήριο A+S με αναλογία 50:1, δηλαδή 20 μL αντιδραστήριου S ανά mL αντιδραστήριου A. Το αντιδραστήριο A (Reagent A) είναι αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού (φωτοευαίσθητο) και το αντιδραστήριο S (Reagent S) είναι επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις. Σε κάθε κελί που έχουν προστεθεί 5 μL δείγματος, τοποθετούνται 25 μL από το διάλυμα A+S. Επιπρόσθετα τοποθετούνται σε κάθε κελί 200 μL από το αντιδραστήριο B (Reagent B), το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός και μετريέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της BSA με τη βοήθεια του προγράμματος Graphpad® και υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης των lysates.

Τα δείγματα της Western Blot παράγονται με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου εργασίας EXCELL®, που υποδεικνύει τις κατάλληλες ποσότητες που πρέπει να προστεθούν από τα Lysates, το Lysis Buffer, και το Daves Buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris/HCl) σε κάθε δείγμα, ώστε όλα τα δείγματα που παρασκευάζονται να έχουν συγκέντρωση πρωτεΐνης 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τελικό όγκο 42 μL . Αφού πραγματοποιηθεί η προσθήκη των ανωτέρω συστατικών, τα δείγματα επωάζονται στους 100°C για 10 λεπτά και τέλος φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Ηλεκτροφόρηση

Όταν εφαρμόζεται τάση κατά μήκος της γέλης, οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν σε αυτήν με διαφορετικές ταχύτητες με κινητήριο δύναμη το φορτίο τους, καθώς από το SDS έχουν φορτιστεί αρνητικά και κινούνται προς τον θετικό πόλο μέσω της γέλης ακρυλαμιδίου, και ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η διαφορετική ταχύτητα ανάπτυξης της κάθε πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα αυτές να χωρίζονται σε ζώνες.

Αρχικά, παρασκευάζονται δύο ειδών γέλες ακρυλαμιδίου με διαφορετικό ρόλο και διαφορετική σύσταση η κάθε μια.

- **Stacking gel:** η γέλη στην οποία δημιουργούνται τα κελία φόρτωσης στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα και πραγματοποιείται ο πρώτος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.
- **Running gel:** η γέλη στην οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε διακριτές ζώνες λόγω του μοριακού τους βάρους.

Η σύσταση του stacking gel είναι 5% σε ακρυλαμίδιο και παραμένει σταθερή. Η σύσταση του running gel διαφέρει στην αναλογία νερού-ακρυλαμιδίου ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που μελετώνται. Ο κανόνας που ισχύει γενικά είναι ότι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες απαιτούν μεγάλο ποσοστό (12-15%) σε ακρυλαμίδιο στο running gel, ενώ οι μεγάλοι μοριακού βάρους πρωτεΐνες το αντίθετο (6-8%).

Τα gels παρασκευάζονται σε ειδικές γυάλινες πλάκες στο στατώ της Western , οι οποίες αφήνουν κενό 1,5 mm ανάμεσά τους. Προηγουμένως οι πλάκες εκπλένονται με απιονισμένο νερό (ddH₂O) . Στη συνέχεια προστίθεται απιονισμένο νερό ανάμεσα από τις πλάκες και αφήνεται για χρονικό διάστημα περίπου 5 λεπτών με σκοπό την εξακρίβωση της στεγανότητας των δύο πλακών. Σε περίπτωση διαρροής οι πλάκες διαχωρίζονται η μία από την άλλη, επανατοποθετούνται στο στατώ και επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου να μην υπάρχει διαρροή.

Σε δύο πλαστικά falcons παρασκευάζονται δύο γέλες ακρυλαμιδίου διαφορετικής σύστασης. Οι δύο αυτές γέλες διαφέρουν στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, αλλά και στην συγκέντρωση των συστατικών και το PH του buffer που χρησιμοποιείται. Η σύσταση των γελών φαίνεται στους πίνακες 5 και 6.

Πίνακας 5: Συστάσεις γελών Running και Stacking. Οι ποσότητες είναι υπολογισμένες για την παρασκευή 2 γελών.

	Running gel 7.5%	Running gel 8 %	Running gel 9.5 %	Running gel 10 %	Stacking gel 5 %
Acrylamide 30 %	4 mL	4.266 mL	5.066 mL	5.33 mL	650 μ L
Running Gel Buffer	4.16 mL	4.16 mL	4.16 mL	4.16 mL	
Stacking Gel Buffer					1.25 mL
dd H₂O	7.68 mL	7.412 mL	6.613 mL	6.35 mL	3 mL
APS 10 %	160 μ L	160 μ L	160 μ L	160 μ L	70 μ L
TEMED	16 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L	7 μ L
Bromophenol blue					12 μ L

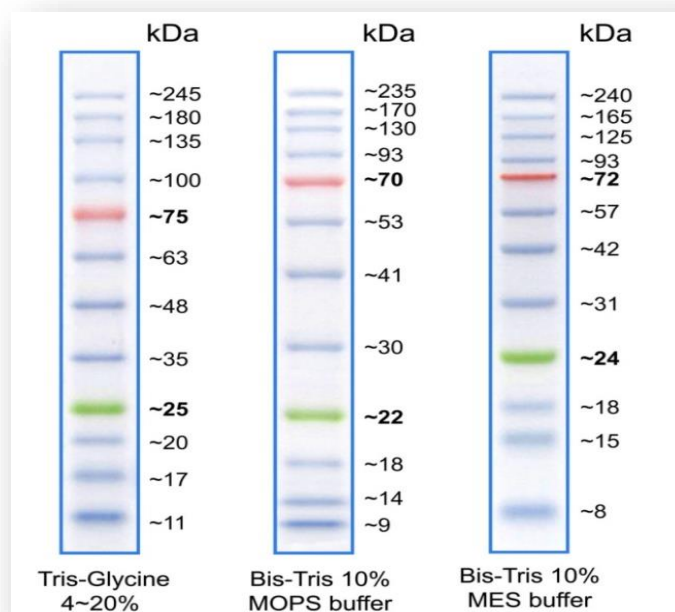
Πίνακας 6: Συστάσεις διαλυμάτων Running Gel Buffer και Stacking Gel Buffer

Running Gel Buffer		Stacking Gel Buffer	
TRIS	91 g	TRIS	6 g
SDS	2 g	SDS	0.4 g
dd H₂O	q.s 500 mL	dd H₂O	q.s 100 mL
Παρασκευή: 91 g TRIS διαλύονται σε ~400 mL dd H ₂ O και μετριέται το pH στο 8,8. Συμπληρώνεται dd H ₂ O έως τα 500 mL και προστίθενται 2 g SDS. Το μείγμα ανακινείται μέχρι να ομοιογενοποιηθεί.		Παρασκευή: 6 g TRIS διαλύονται σε 40 mL dd H ₂ O και μετριέται το pH στο 6,8. Συμπληρώνεται dd H ₂ O έως τα 100 mL και προστίθενται τα 0,4 g SDS. Το μείγμα ανακινείται μέχρι να ομοιογενοποιηθεί.	

Αφού προστεθούν στα running gel το TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) και το APS 10% (Ammonium persulfate), το μείγμα τοποθετείται άμεσα ανάμεσα στις πλάκες μέχρι το επιθυμητό ύψος, καθώς αυτοί αποτελούν τους παράγοντες πολυμερισμού του ακρυλαμίδιου και δίνουν την τελική μορφή στη γέλη. Το APS παρέχει το όξινο περιβάλλον που απαιτείται για τον πολυμερισμό και το TEMED προσδίδει την αμινομάδα που χρειάζεται το ακρυλαμίδιο για να αρχίσει τον πολυμερισμό. Ακολουθεί η προσθήκη dd H₂O μέχρι τα επάνω χείλη των πλακών ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σχηματιζόμενες φυσαλίδες και να υπάρχει υγρασία ώστε να μη στεγνώσει το gel αφού δημιουργηθεί. Επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της γέλης όταν παρατηρηθεί πήξη στην περίσσεια του μείγματος μέσα στο falcon. Αφού πραγματοποιηθεί η πήξη, η περίσσεια του νερού που προστέθηκε πάνω από το running gel, απορρίπτεται.

Στη συνέχεια, κατασκευάζεται σε άλλο falcon το stacking gel και αφού προστεθούν στο μείγμα οι παράγοντες APS και TEMED περιχύνονται άμεσα ανάμεσα στις πλάκες πάνω από το running gel. Αφού πλέον οι πλάκες έχουν γεμίσει μέχρι το άνω χείλος, προστίθενται με προσοχή ειδικό πλαστικό εξάρτημα-χτενάκι για τη δημιουργία των κελιών στο stacking gel, στο οποίο θα φορτωθούν τα δείγματα. Το χτενάκι τοποθετείται απότομα και με μια κίνηση για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων ανάμεσα στα κελιά. Τα gels που παρασκευάζονται πρέπει να είναι φρέσκα την ημέρα της ηλεκτροφόρησης ή να έχουν φυλαχτεί μέσα σε dd H₂O στο ψυγείο για το πολύ μία μέρα.

Τα δείγματα της Western Blot και ο marker μεταφέρονται από τους -80 °C σε πάγο την ημέρα που ξεκινά η ανάλυση. Όλα φυγοκεντρούνται μέχρι τις 1000xg (spin down) με σκοπό τη συγκέντρωση όλου του όγκου του δείγματος στον πυθμένα του Eppendorf και όχι στα τοιχώματα. Ο marker αποτελεί ένα μείγμα πρωτεϊνών με συγκεκριμένα μοριακά βάρη. Κάθε πρωτεΐνη του marker έχει συγκεκριμένο χρώμα (μπλε, κόκκινο ή πράσινο) και αυτό καθιστά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται στα gel σαφή και κατανοητό καθώς δημιουργούνται ορατές μπάντες που συμβάλλουν στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που αναπτύσσονται στα δείγματα. Ο marker που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της Western Blot είναι ο Nippon Bluestar prestained protein marker (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Απεικόνιση του marker που χρησιμοποιείται στη WesternBlot για διαφορετικά είδη Running Buffers. (https://www.nippongenetics.eu/bilder/products/protein-elektrophorese/prestained-protein-marker/blue-star0_500x5200_481x500.jpg)

Οι πλάκες που περιέχουν τα gel απομακρύνονται από τα ειδικά στατώ και μεταφέρονται στην ειδική κασέτα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τον κατάλληλο προσανατολισμό. Ανάμεσα στα δύο ζεύγη πλακών τοποθετείται Running Buffer 1x, το οποίο παρασκευάζεται με αραίωση 100ml από το Running Buffer 10x (stock) σε 900ml dd H₂O.

Πίνακας 7: Σύσταση Running Buffer 10x

Running Buffer	
Γλυκίνη	142 g
Tris	30.2 g
SDS	10 g
dd H ₂ O	q.s 1000 mL

Τα χτενάκια απομακρύνονται προσεκτικά από το separating gel, με σταθερή πίεση προς τα πάνω. Ο όγκος που χάνεται από την αφαίρεση των πλαστικών αυτών εξαρτημάτων (χτενάκια) συμπληρώνεται με πιπέτα χωρίς καθόλου ανατάραξη του ενδιάμεσου Running Buffer. Στη συνέχεια, ο απαιτούμενος όγκος Running Buffer συμπληρώνεται είτε στην ένδειξη 2 gels είτε 4 gels ανάλογα με τον αριθμό των γελών που έχουν τοποθετηθεί. Καθ'όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ελέγχεται η στάθμη του Running Buffer ώστε να μη χάνεται ποσότητα από το ενδιάμεσο της κασέτας, ειδάλλως συμπληρώνεται ποσότητα ενδιάμεσα από τα δύο ζεύγη πλακών μέχρι να ξεχειλίσει. Ακολουθεί η διαδικασία του flashing. Με μια σύριγγα ινσουλίνης του 1 mL προστίθεται, όσο το δυνατόν, σταθερός όγκος με σταθερή πίεση από το Running Buffer εντός των κελιών που έχουν σχηματιστεί με στόχο την απομάκρυνση του μη πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου και τυχόν ακαθαρσιών.

Στο πρώτο κελί από τα αριστερά τοποθετείται ο marker όγκου 5 μ L που αραιώνεται μέχρι τον όγκο που έχει κάθε δείγμα, πχ 42 μ L, με διάλυμα Blank. Το Blank διάλυμα αποτελείται από Daves Buffer (7 μ L) και Lysis Buffer (35 μ L). Στα υπόλοιπα κελιά τοποθετούνται τα δείγματα όπως είναι επιθυμητό. Στο τελευταίο κελί στα δεξιά μπορεί να τοποθετηθεί ακόμα ένας marker, ο οποίος είναι αραιωμένος με Blank διάλυμα αναλογίας 1:4. Για να είναι τα αποτελέσματα αξιοποιήσιμα, πρέπει σε κάθε γέλη να φορτώνονται δείγματα από όλες τις ομάδες.

Αφού ολοκληρωθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα κελιά, αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 80 Volt έως ότου διαχωριστεί καλά ο marker και εμφανιστούν διαχωρισμένες οι έγχρωμες μπάντες. Έπειτα, ανεβαίνει η τάση στα 120-130 Volt μέχρι να παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με βάση τα μοριακά τους βάρη, που αντιστοιχούν στην αντίστοιχη έγχρωμη μπάντα του marker όπως έχει προαναφερθεί. Η διάρκεια της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5 ώρες ανάλογα με την περιεκτικότητα της κάθε γέλης σε ακρυλαμίδιο.

Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα (Transportation)

Λίγο πριν το τέλος της ηλεκτροφόρησης, κόβονται μεμβράνες Polyvinylidene Difluoride (PVDF) με πόρους 0,45 nm στο μέγεθος των gels και επωάζονται σε μεθανόλη για 10 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθούν και να είναι σε θέση να δεσμεύσουν τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί πάνω στη κάθε γέλη. Ακολουθεί επώαση για άλλα 10 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς (Transportation ή Transfer Buffer). Παράλληλα αφαιρείται προσεκτικά η κασέτα από τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και οι δύο πλάκες που περιέχουν το gel

διαχωρίζονται προσεκτικά με ειδική σπάτουλα. Η γυάλινη πλάκα φέρεται προς την πλευρά εκείνη που κολλάει η γέλη και το stacking gel αποκόπτεται με την ειδική σπάτουλα με βάση τη διαχωριστική γραμμή που έχει σχηματιστεί ανάμεσα σε αυτό και στο running gel. Στη συνέχεια, το running gel, που περιέχει τις ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες, επωάζεται σε transfer buffer, ίδιας σύστασης με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά, για 10 λεπτά με στόχο την εξισορρόπηση της διαφοράς pH και SDS μεταξύ των running και transfer buffer.

Σε γυάλινο σκεύος τοποθετούνται και διαβρέχονται με transfer buffer οι κασέτες του transportation, 4 διηθητικά χαρτιά για κάθε gel (2 σε κάθε μεριά) κομμένα στο ίδιο μέγεθος με αυτό, τα ειδικά σφουγγάρια των κασετών και ένας γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας. Οι κασέτες ανοίγονται με τη μαύρη μεριά προς τα κάτω και τοποθετείται το ειδικό σφουγγάρι. Με τα δύο διηθητικά χαρτιά ανασηκώνεται το gel μέσα από το transfer buffer και μεταφέρεται ολόκληρο πάνω στο διηθητικό αέρας. Η μπάντα του πυκνού marker πρέπει να βρίσκεται προς τα δεξιά. Τα διηθητικά χαρτιά με τη γέλη τοποθετούνται πάνω από το σφουγγάρι στην κασέτα και τοποθετείται η μεμβράνη PVDF ακουμπώντας πρώτα στο κέντρο και μετά στα άκρα. Με τον γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα διαβρέχεται η μεμβράνη για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων που έχουν παγιδευτεί. Στη συνέχεια τοποθετούνται πάνω από την PVDF ακόμη 2 διηθητικά χαρτιά, διαβρέχονται με το γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με transfer buffer, και τέλος τοποθετείται ένα ακόμη σφουγγάρι. Η κασέτα κλείνει με προσοχή, ώστε να μη μετακινηθεί κανένα από τα υλικά που τοποθετήθηκαν μέσα σε αυτήν, και τοποθετείται μέσα στη συσκευή του transportation με τη μαύρη πλευρά της κασέτας στη μαύρη πλευρά της συσκευής. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία για όσα gels έχουν ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες. Μέσα στο tank του transportation εκτός των κασετών τοποθετείται και μία παγοκύστη, ενώ το ίδιο το tank τοποθετείται μέσα σε πάγο για να διατηρείται το σύστημα σε χαμηλή θερμοκρασία. Η διάρκεια της διαδικασίας του transportation είναι 90 λεπτά στη τάση των 100 Volt.

Πίνακας 8: Σύσταση Transfer Buffer 1 L

Transportation/Transfer Buffer	
TRIS	1.5 g
Γλυκίνη	7.5 g
dd H ₂ O	900 mL
MeOH	100 mL

Μετά την ολοκλήρωση του transportation, ελέγχεται αν έχει μεταφερθεί ο marker στη μεμβράνη. Αν αυτό δεν έχει συμβεί, πιθανότατα για κάποιο λόγο η μεταφορά δεν ήταν επιτυχής και γι' αυτό δεν πρέπει να μετακινηθεί το gel από τη μεμβράνη για να επαναληφθεί η ίδια διαδικασία εκ νέου. Εάν η διαδικασία έγινε επιτυχώς, ανοίγεται η κασέτα με τη μαύρη πλευρά προς τα πάνω, αφαιρούνται το σφουγγάρι και τα δύο διηθητικά χαρτιά και εμφανίζεται η PVDF με τον πυκνό marker στα αριστερά και την πλευρά στην οποία έχει γίνει η μεταφορά. Η PVDF κόβεται περιμετρικά του gel καθώς επίσης και στην άνω αριστερή γωνία της μεμβράνης υποδηλώνοντας έτσι τη πλευρά στην οποία έγινε η μεταφορά.

Blocking

Το Blocking είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τη WesternBlot καθώς εξυπηρετεί την ανάγκη αποκλεισμού των περιοχών πρόσδεσης της μεμβράνης που δεν έχουν πρωτεΐνες ώστε να μειωθεί η σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων εκεί και να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Με αυτόν τον τρόπο όταν προστίθεται το αντίσωμα προσδένεται μόνο με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Το διάλυμα Blocking έχει σύσταση 5% γάλα σε TBS Tween 1%. Το γάλα είναι αποβουτυρωμένο και βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Το διάλυμα TBS Tween 1% παρασκευάζεται με αραιώση 100 mL TBS 10x σε 900 mL ddH₂O και τη προσθήκη 1 mL Tween 20.

Πίνακας 9: Σύσταση Buffer TBS 10x (stock)

TBS 10x	
NaCl	80 g
TRIS	30 g
HCl 37%	q.s pH 7.4
dd H ₂ O	q.s 1000 mL

Η ποσότητα στην οποία εμβαπτίζεται κάθε μεμβράνη αντιστοιχεί σε περίπου 25 mL και η διάρκεια επώασης είναι τουλάχιστον 1 ώρα. Έπειτα, το διάλυμα Blocking απορρίπτεται και η PVDF εκπλένεται για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, η PVDF καλύπτεται με ζελατίνα και με τη βοήθεια χάρακα και νυστεριού κόβεται σε λωρίδες με οδηγό τις μπάντες του marker, μεταξύ των kDa όπου αναμένονται να ληφθούν οι προσδιοριζόμενες πρωτεΐνες.

Πρωτογενές Αντίσωμα

Κατά την περίοδο επώασης της μεμβράνης στο διάλυμα Blocking, γίνεται προετοιμασία του πρωτογενούς αντισώματος (Primary Antibody) με αραιώση 1:1.000 (ή ανάλογα την αραιώση που προτείνει ο προμηθευτής) σε διάλυμα BSA 5% σε TBS-Tween. Οι κομμένες μεμβράνες επωάζονται με το αντίστοιχο πρωτογενές αντίσωμα για 18 ώρες στους 4°C.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία είναι:

1. phospho-STAT3 (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #9561)
2. STAT3 (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #12640)
3. Phospho-AMPK (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #2535)
4. AMPKα (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #2603)
5. Phospho-ERK1/2 (σε διάλυση 1:1000, Mouse mAb #9106)
6. ERK1/2 (σε διάλυση 1:1000, Mouse mAb #9107)
7. SOD2 (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #13141)
8. β-tubulin (σε διάλυση 1:1000, Mouse mAb #1317)
9. GAPDH (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #2118)

Τα παραπάνω αντισώματα αγοράστηκαν από την εταιρεία Cell Signalling Technology εκτός του αντισώματος της β-tubulin (Santa Cruz Biotechnology) και αραιώθηκαν σε διάλυμα 5% BSA σε TBS 1X 0.1% Tween.

Δευτερογενές Αντίσωμα

Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα οι μεμβράνες εκπλένονται για 5 λεπτά με TBS-Tween 1%. Ταυτόχρονα παρασκευάζεται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (Secondary antibody). Σε διάλυμα Blocking (5% γάλα διαλυμένο σε TBS 1x 0.1% Tween) αραιώνεται το δευτερογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:2000. Το δευτερογενές αντίσωμα που επιλέγεται εξαρτάται από την προέλευση του πρωτογενούς. Για παράδειγμα εάν το πρωτογενές έχει παρασκευαστεί σε κόνικλο, το δευτερογενές που θα χρησιμοποιηθεί θα

είναι Anti-Rabbit. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε το δευτερογενές αντίσωμα να μην προορίζεται για το ίδιο ζώο από το οποίο προέρχονται τα αρχικά δείγματα διότι κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε σημαντική μείωση της εκλεκτικότητας δεδομένου ότι το αντίσωμα θα συνδεόταν και με τις IgG ανοσοσφαιρίνες του ζώου. Οι μεμβράνες επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εκπλένονται με TBS-Tween 1% 2 φορές για 10 λεπτά έκαστη ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων που δεν προσκολλήθηκε στη μεμβράνη.

Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο

Μετά το πέρας των εκπλύσεων, οι μεμβράνες επωάζονται, η κάθε μία ξεχωριστά για 5 λεπτά στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (GE Healthcare ECL Western Blotting Detection Reagents) προστατευμένες από την έκθεση στο φως. Έπειτα, η μεμβράνη μεταφέρεται στην κασέτα εμφάνισης και εμφανίζεται μέσα στον σκοτεινό θάλαμο.

Μέσα στο σκοτεινό θάλαμο φυλάσσονται τα ειδικά φωτογραφικά φιλμ και τα αντιδραστήρια εμφάνισης, δηλαδή το διάλυμα ανάπτυξης σήματος (detector /developer) και το διάλυμα σταθεροποίησης (fixer). Με την βοήθεια, κόκκινου φωτός (IR) εντός του θαλάμου τα διαλύματα developer και fixer τοποθετούνται σε λεκάνες, αφού αραιωθούν πρώτα με νερό (σε 200 ml πυκνού διαλύματος detector ή fixer προστίθεται 800 ml νερού), ώστε να επιτευχθεί η σωστή επώαση των φωτογραφικών φιλμ. Κομμάτια φωτογραφικού φιλμ τοποθετούνται πάνω από τις μεμβράνες, που εκπέμπουν χημειοφωταύγεια ανάλογη της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε, και η κασέτα κλείνει με προσοχή, αρχικά για 40 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το φιλμ εμβαπτίζεται στο detector μέχρι την εμφάνιση σήματος. Εφόσον η εικόνα είναι ευκρινής, τότε το φιλμ εκπλένεται ελαφρώς με νερό και εμβαπτίζεται στο fixer που το αδρανοποιεί και σταθεροποιεί το σήμα που αποτυπώθηκε. Σε περίπτωση που αυτό είναι πολύ έντονο ή πολύ αχνό η μεμβράνη εκτίθεται εκ νέου σε φιλμ για λιγότερο ή περισσότερο χρόνο αντίστοιχα, έως τη λήψη μία εικόνας με διακριτές μπάντες.

Μετά την εμφάνιση, οι μεμβράνες εκπλένονται με TBS-Tween 1 % και μπορούν είτε να φυλαχθούν στους -20°C ώστε να επαναχρησιμοποιηθούν αν είναι απαραίτητο σε σύντομο χρονικό διάστημα είτε να υποστούν τη διαδικασία αποδέσμευσης από παλιά αντισώματα (stripping) .

Διαδικασία αποδέσμευσης μεμβρανών από παλιά αντισώματα-Stripping

Στην περίπτωση προσδιορισμού ολικής ή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ή μέτρησης κάποιας άλλης πρωτεΐνης παρόμοιου μοριακού βάρους με την προσδιοριζόμενη, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης των ίδιων μεμβρανών με τη διαδικασία Stripping. Υπάρχουν δύο τύποι stripping. Ο πρώτος γίνεται κάτω από ισχυρές αναγωγικές συνθήκες και ο δεύτερος κάτω από ηπιότερες συνθήκες (mild stripping).

- Στην πρώτη περίπτωση που αφορά το ισχυρό stripping , πραγματοποιείται επώαση των μεμβρανών σε 20 mL Stripping Buffer (stock) μαζί με 175 μl 2-Μερκαπτοαιθανόλης για 20 λεπτά στους 50 °C με συνεχή έντονη ανακίνηση. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση της μερκαπτοαιθανόλης, η οποία γίνεται αποκλειστικά και μόνο στον απαγωγό, εξαιτίας της τοξικότητάς της. Σκοπός της προσθήκης της είναι να διασπαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί και να απομακρυνθούν τα αντισώματα από τις δεσμευμένες πρωτεΐνες.
- Στη δεύτερη περίπτωση του Mild Stripping πραγματοποιείται επώαση των μεμβρανών για 20 λεπτά Mild Stripping Buffer σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση.

Ύστερα το πέρας του χρονικού ορίου της επώασης σε οποιοδήποτε από τα δύο Stripping Buffer ακολουθούν πέντε εκπλύσεις των πέντε λεπτών με TBS-Tween 1 %. Μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων ακολουθείται η διαδικασία του Blocking για μία ώρα και οι διαδικασίες της επώασης με πρωτογενές, δευτερογενές αντισώματος και εμφάνισης στο σκοτεινό θάλαμο όπως έχει προαναφερθεί.

Να αναφερθεί ότι για κάθε σκαφίδιο χρησιμοποιούνται περίπου 20 mL Stripping Buffer. Η σύσταση των δύο Buffer είναι η εξής:

Πίνακας 10: Σύσταση Stripping Buffer

Stripping Buffer	
Tris	7.6 g
SDS	20 g
dd H₂O	q.s 1000 mL
Παρασκευή: Σε 800 mL ddH ₂ O προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά, το pH μετريέται στο 6,8 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1000 mL. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το stock.	

Πίνακας 11: Σύσταση Mild Stripping Buffer

Mild Stripping Buffer	
Glycine 25 mM	9 mL
SDS 10 %	1 mL
Tween	50 µL
Παρασκευή: Απλή ανάμιξη των συστατικών. Το SDS 10% παρασκευάζεται τελευταία στιγμή και αυτό πραγματοποιείται με τη ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας SDS που διαλυτοποιείται στην γλυκίνη.	

3.8.2 Χρωματομετρική μέθοδος μέτρησης κυτταροτοξικότητας - MTT

Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου MTT βασίζεται στη σταθερή μιτοχονδριακή δραστηριότητα των βιώσιμων κυττάρων. Συνεπώς, μια αύξηση ή μείωση στον αριθμό τους σχετίζεται γραμμικά με τη μιτοχονδριακή τους δραστηριότητα. Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων αντανakλάται από τη μετατροπή του άλατος τετραζολίου MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι διαλυτοποιούνται για ομοιογενή μέτρηση. Έτσι, οποιαδήποτε αύξηση ή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μπορεί να ανιχνευθεί με μέτρηση της συγκέντρωσης της φορμαζάνης που ανακλάται στην οπτική πυκνότητα (OD) με τη χρήση φασματοφωτομέτρου. Η συνηθέστερη χρήση της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας διάφορων φαρμακευτικών ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Langdon, 2003).

Πειραματική Διαδικασία

Στη παρούσα μελέτη η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κιτ MTT. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 10 μ L MTT (Sigma, St. Louis, MO, ΗΠΑ) σε κάθε φρεάτιο. Τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον δύο ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μ L διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, Sigma, St Louis, MO, ΗΠΑ) σε κάθε φρεάτιο και τα τρυβλία ανακινήθηκαν για πέντε λεπτά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τέλος έγινε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με τη χρήση φασματοφωτομέτρου στα 570 nm.

3.9 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

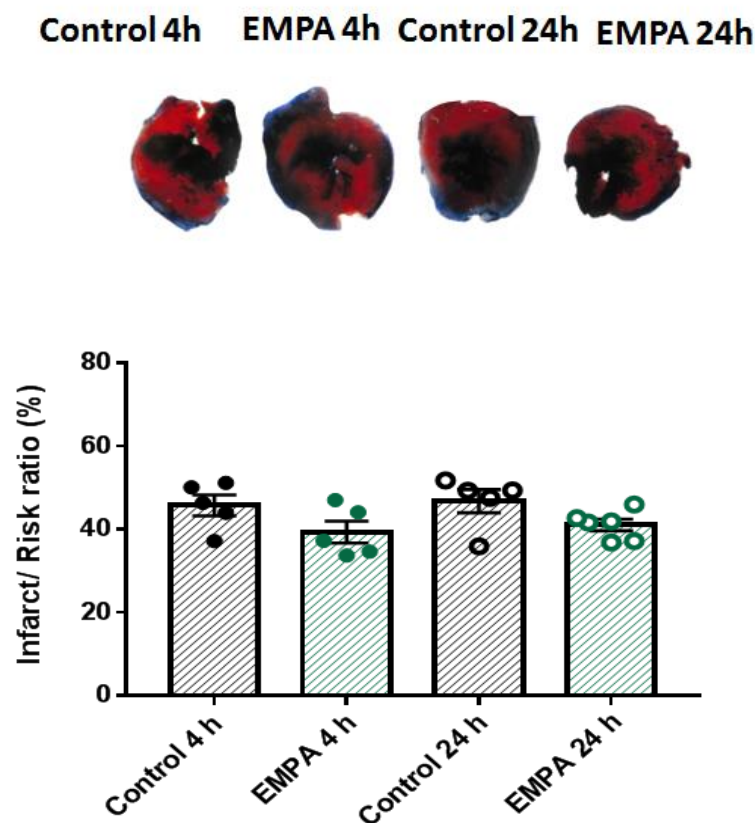
Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα (S.E.M). Για τις μελέτες στα πειραματόζωα και την πυκνομετρική ανάλυση των κηλίδων της Western Blot χρησιμοποιήθηκε ανάλυση unpaired T-test. Η στατιστική σημαντικότητα ταξινομήθηκε ως * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism έκδοση 6 (GraphPad Software, Inc.). Για τις μελέτες κυτταρικής βιωσιμότητας (in vitro) και την ανάλυση MTT χρησιμοποιήθηκαν

ανάλυση διασποράς μίας κατεύθυνσης (ANOVA). Η στατιστική σημαντικότητα ταξινομήθηκε ως * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

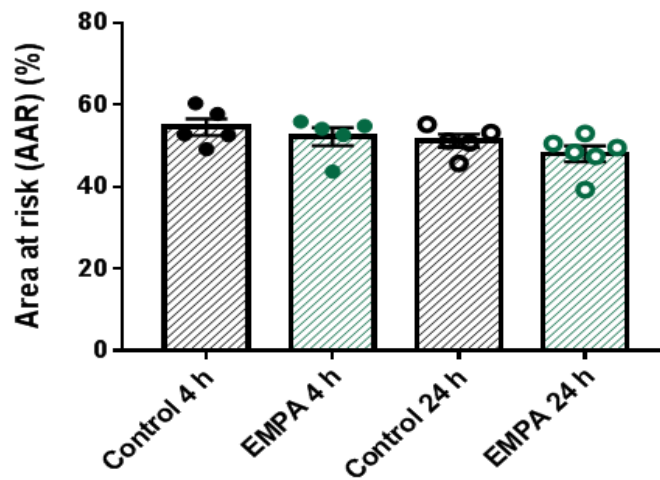
4. Αποτελέσματα

4.1 Η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν μείωσε την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε υγιείς μύες

Η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης σε υγιείς ενήλικους μύες 4 ή 24 ώρες πριν την υποβολή τους στη χειρουργική παρέμβαση 30 λεπτών ισχαιμίας και 10 λεπτών επαναιμάτωσης, δεν επηρέασε την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (Control 4h, Control 24hr), ενώ παράλληλα, ο βαθμός ισχαιμικής προσβολής παρέμεινε αμετάβλητος και στις τέσσερις ομάδες όπως φαίνεται στα διαγράμματα 1 και 2 αντίστοιχα.



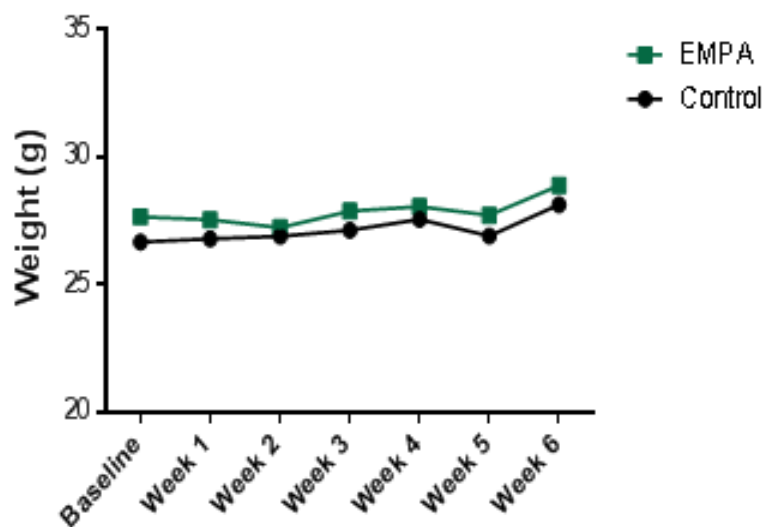
Διάγραμμα 1: Περιοχή του εμφράγματος ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I/R) ($p > 0,05$)



Διάγραμμα 2: Περιοχή σε κίνδυνο (AAR%) ($p > 0,05$)

4.2 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε τα βάρη υγιών μυών

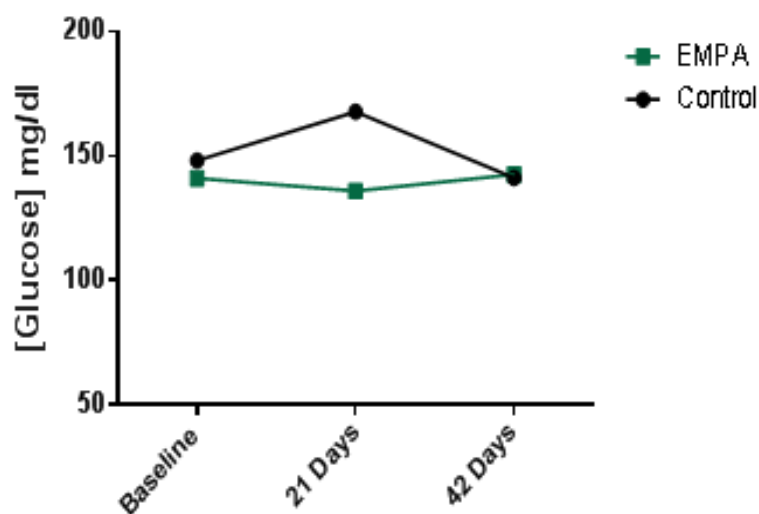
Πραγματοποιήθηκε εβδομαδιαία ζύγιση των μυών με σκοπό τη παρακολούθηση του βάρους τους καθ' όλη τη διάρκεια του 2^{ου} πρωτοκόλλου. Η χρόνια χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν επηρέασε το σωματικό βάρος των υγιών μυών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 3: Σωματικό βάρος μυών.

4.3 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης υγιών μυών

Η Εμπαγλιφλοζίνη δεν μετάβαλε τα επίπεδα γλυκόζης των υγιών μυών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου κατά την έναρξη και λήξη των χορηγήσεων όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4: Επίπεδα γλυκόζης αίματος μυών ανα ομάδα.

4.4 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε την αρτηριακή πίεση των υγιών μυών

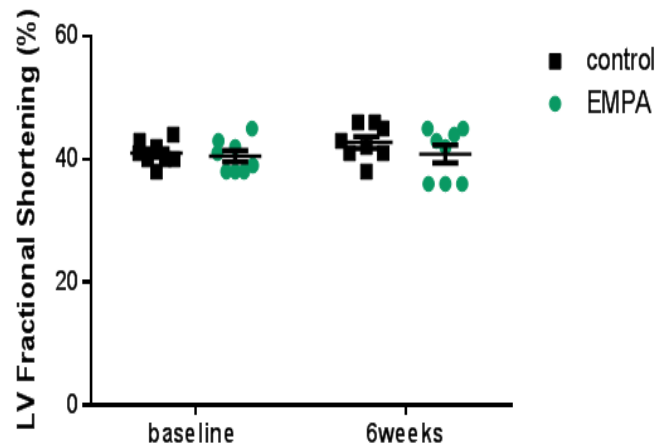
Όπως φαίνεται στο πίνακα 12 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην αρτηριακή πίεση κατά την έναρξη και τη λήξη του 2^{ου} πρωτοκόλλου και στις ομάδες Control και EMPA.

Πίνακας 12: Μέση, Συστολική και Διαστολική Πίεση ανα ομάδα μυών.

Αρτηριακή Πίεση	CONTROL	EMPA
Μέση Αρτηριακή Πίεση (Εναρξη πρωτοκόλλου)	108.3 ± 3.6	113.5 ± 2.3
Μέση Αρτηριακή Πίεση (6 εβδομάδες)	92.4 ± 4.9	98.1 ± 6.1
Συστολική Πίεση (Εναρξη πρωτοκόλλου)	126.7 ± 3.9	135.1 ± 2.0
Συστολική Πίεση (6 εβδομάδες)	111.8 ± 5.8	117.5 ± 7.1
Διαστολική Πίεση (Εναρξη πρωτοκόλλου)	99.5 ± 3.6	103.0 ± 2.5
Διαστολική Πίεση (6 εβδομάδες)	83.0 ± 4.5	88.9 ± 5.7

4.5 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε τη καρδιακή λειτουργία και τους δείκτες καρδιακής μορφολογίας των υγιών μυών

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα 5 δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές FS% μεταξύ των ομάδων υποδηλώνοντας φυσιολογική συστολική λειτουργία. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στους δείκτες καρδιακής λειτουργίας και μορφολογίας (Πίνακες 13-16).



Διάγραμμα 5: % κλάσμα συστολικής βράχυνσης ανά ομάδα μυών

Πίνακας 13. Δείκτες καρδιακής λειτουργίας και μορφολογίας κατά την υπερηχογραφική αξιολόγηση πριν την έναρξη των χορηγήσεων. Πραγματοποιήθηκε t-test για τη σύγκριση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας EMPA.

	Control	EMPA	p value
Έναρξη πρωτοκόλλου	n=8	n=8	
Καρδιακός Ρυθμός HR	546.25±22.68	538.41±10.63	0.7591
Τελοδιαστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVEDD (mm)	3.77±0.08	3.70±0.06	0.4889
Τελοσυστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVEDD (mm)	2.20±0.08	2.19±0.05	0.9300
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη διαστολή LVPWd (mm)	0.79±0.01	0.78±0.01	0.6038
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη συστολή LVPWs (mm)	1.28±0.01	1.28±0.01	0.9547
Κλάσμα Συστολικής Βράχυνσης FS (%)	41.57±1.04	40.56±0.64	0.4228
Ακτίνα αριστερής κοιλίας προς πάχος οπίσθιου τοιχώματος (r/h)	2.37±0.06	2.35±0.06	0.8302

Πίνακας 14. Δείκτες καρδιακής λειτουργίας και μορφολογίας κατά την υπερηχογραφική αξιολόγηση κατά τη λήξη των χορηγήσεων. Πραγματοποιήθηκε t-test για τη σύγκριση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας EMPA.

	Control	EMPA	p value
6 εβδομάδες	n=8	n=8	
Καρδιακός Ρυθμός HR	573.87±10.93	511.62±22.31	0.0252
Τελοδιαστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVEDD (mm)	3.56±0.06	3.60±0.10	0.7560
Τελοσυστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVESD (mm)	2.02±0.04	2.12±0.08	0.3131
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη διαστολή LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.76±0.01	0.7207
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη συστολή LVPWs (mm)	1.28±0.01	1.26±0.01	0.1750
Κλάσμα Συστολικής Βράχυνσης FS (%)	43.16±0.83	41.01±1.52	0.2367
Ακτίνα αριστερής κοιλίας προς πάχος οπίσθιου τοιχώματος (r/h)	2.32±0.05	2.36±0.05	0.6864

Πίνακας 15. Δείκτες καρδιακής λειτουργίας και μορφολογίας κατά την υπερηχογραφική αξιολόγηση πριν την έναρξη και κατά τη λήξη των χορηγήσεων για την ομάδα ελέγχου.

	Έναρξη πρωτοκόλλου	6 εβδομάδες	p value
Control	n=8	n=8	
Καρδιακός Ρυθμός HR	546.25±22.68	573.87±10.93	0.1470
Τελοδιαστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVEDD (mm)	3.77±0.08	3.56±0.06	0.0350
Τελοσυστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVESD (mm)	2.20±0.08	2.02±0.04	0.0447
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη διαστολή LVPWd (mm)	0.79±0.01	0.77±0.01	0.1665
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη συστολή LVPWs (mm)	1.28±0.01	1.28±0.01	0.9456
Κλάσμα Συστολικής Βράχυνσης FS (%)	41.57±1.04	43.16±0.83	0.1301
Ακτίνα αριστερής κοιλίας προς πάχος οπίσθιου τοιχώματος (r/h)	2.37±0.06	2.32±0.05	0.5159

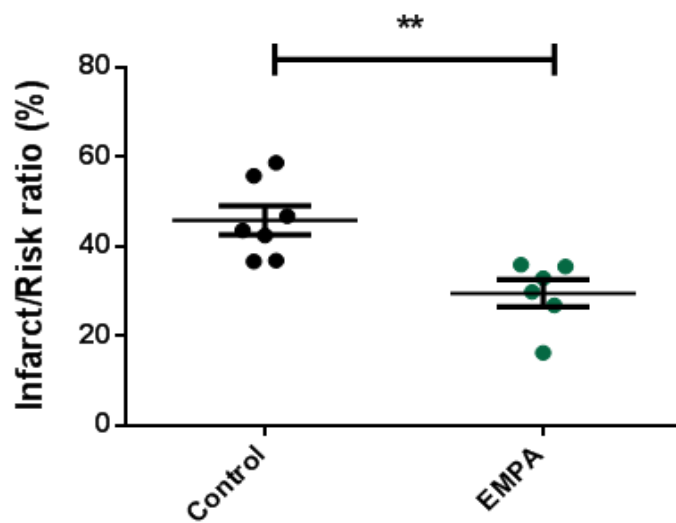
Πίνακας 16. Δείκτες καρδιακής λειτουργίας και μορφολογίας κατά την υπερηχογραφική αξιολόγηση πριν την έναρξη και κατά τη λήξη των χορηγήσεων για την ομάδα EMPA.

	Έναρξη πρωτοκόλλου	6 εβδομάδες	p value
EMPA	n=8	n=8	
Καρδιακός Ρυθμός HR	538.41±10.63	511.62±22.31	0.3566
Τελοδιαστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVEDD (mm)	3.70±0.06	3.60±0.10	0.4155
Τελοσυστολική Διάμετρος Αριστερής Κοιλίας LVESD (mm)	2.19±0.05	2.12±0.08	0.5104
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη διαστολή LVPWd (mm)	0.78±0.01	0.76±0.01	0.0306
Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος Αριστερής Κοιλίας στη συστολή LVPWs (mm)	1.28±0.01	1.26±0.01	0.2753
Κλάσμα Συστολικής Βράχυνσης FS (%)	40.56±0.64	41.01±1.52	0.8255
Ακτίνα αριστερής κοιλίας προς πάχος οπίσθιου τοιχώματος (r/h)	2.35±0.06	2.36±0.05	0.9163

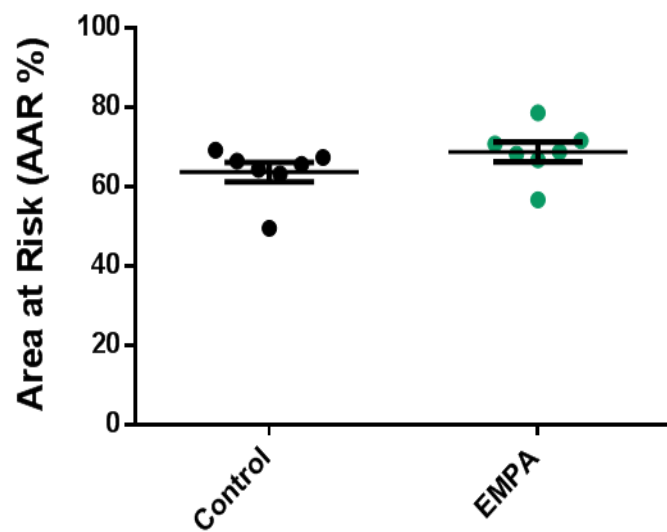
4.6 Η χρόνια χορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης μείωσε σημαντικά την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου στους υγιείς μύες

Η χρόνια χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης σε υγιείς ενήλικους μύες μείωσε σημαντικά την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control) , όπως φαίνεται από το διάγραμμα 6, ενώ παράλληλα, ο βαθμός ισχαιμικής προσβολής παρέμεινε αμετάβλητος και στις δύο ομάδες (διάγραμμα 7).





Διάγραμμα 6: Περιοχή του εμφράγματος ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I/R) (** $p < 0.01$ EMPA vs Control).

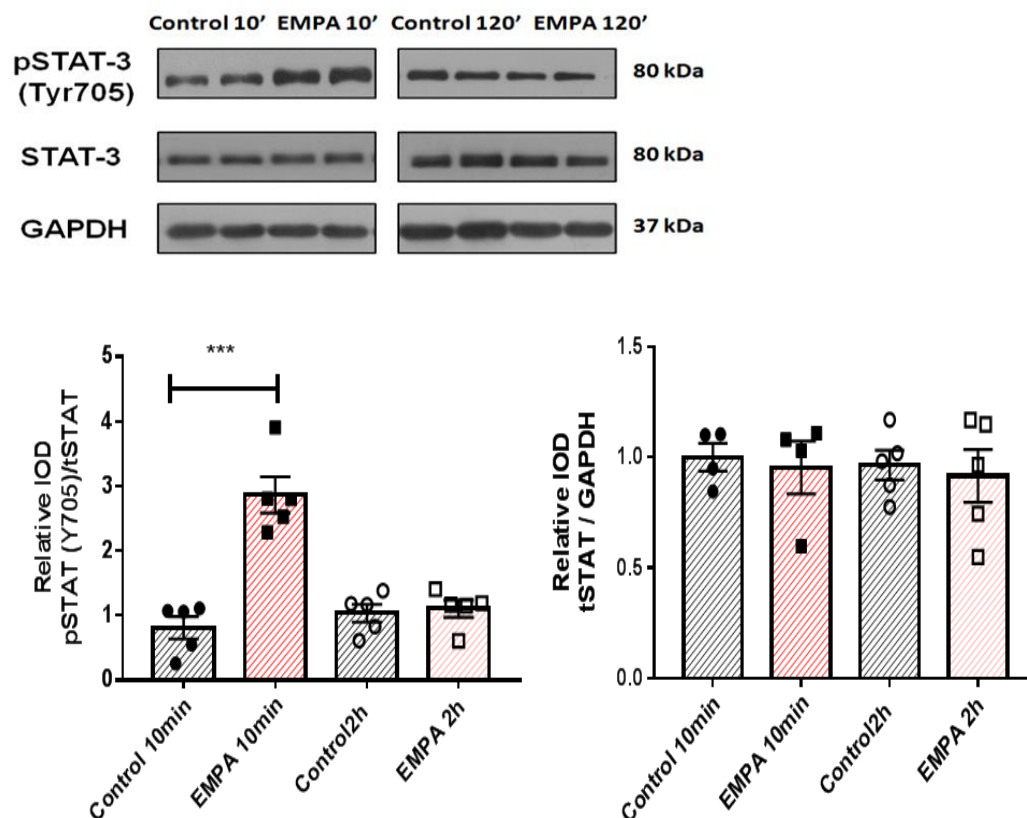


Διάγραμμα 7: Περιοχή σε κίνδυνο ως προς ολόκληρη την περιοχή των τομών του μυοκαρδίου (% R/A) ($p > 0,05$).

4.7 Αποτελέσματα WB

- **Μεταγραφικός Παράγοντας STAT-3**

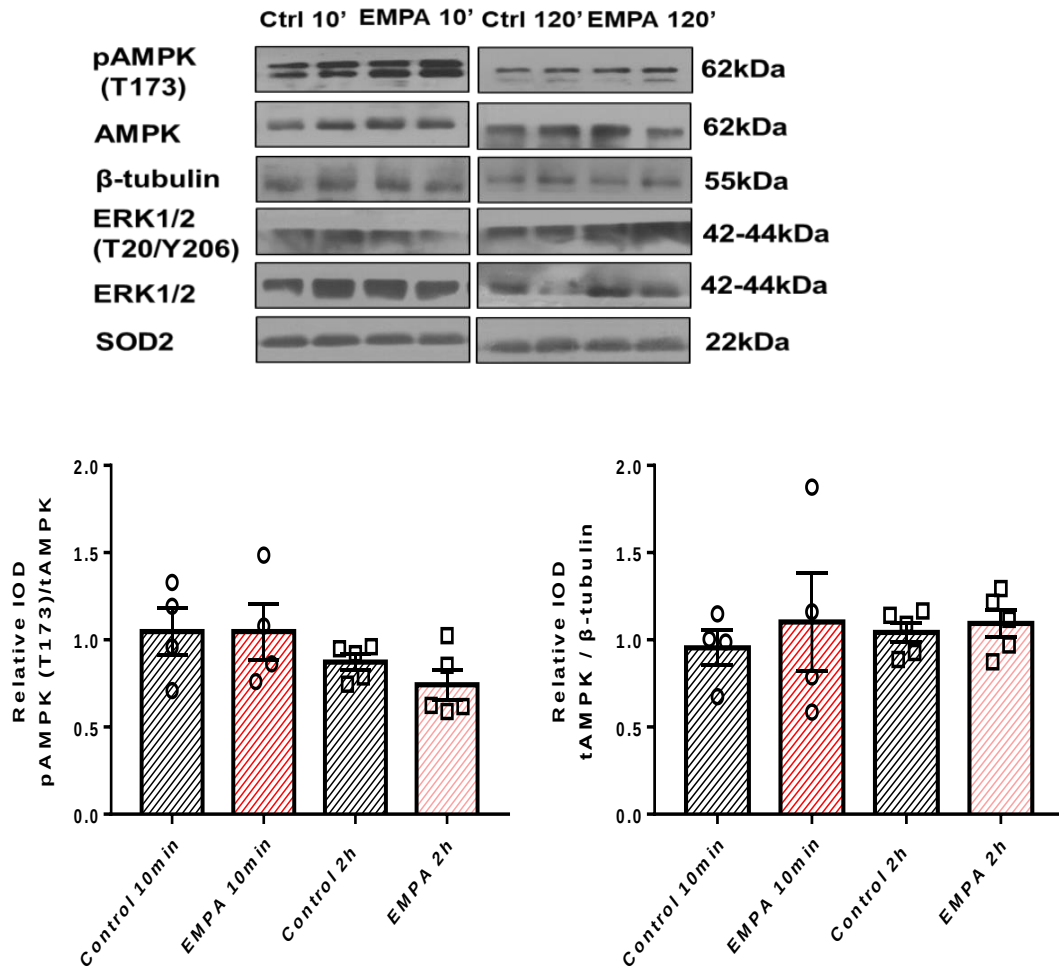
Η ανάλυση Western Blot για τον προσδιορισμό της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων του μεταξύ των διαφορετικών ομάδων Control και EMPA. Συγκεκριμένα, έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του STAT-3 στους ιστούς της ομάδας EMPA που λήφθηκαν στο 10^ο λεπτό της επαναιμάτωσης, σε σύγκριση την ομάδα Control. Αντίθετα, όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, η έκφρασή του παρέμεινε αμετάβλητη στους ιστούς που λήφθηκαν στις 2 ώρες της επαναιμάτωσης και από τις δύο ομάδες.



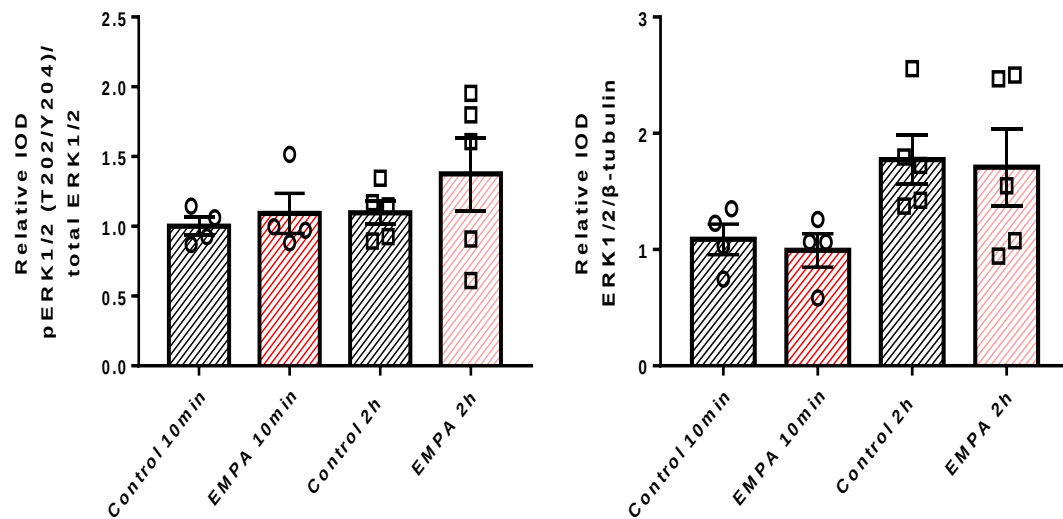
Διαγράμματα 8 και 9 : αποτελέσματα WB για την p(Y705)-STAT3 σχετικά με την ολική πρωτεΐνη σε υγιείς μύες. (***) $p < 0.001$ EMPA 10' vs Control 10' με τη χρήση unpaired T-test)

- **AMPK, ERK1/2, MnSOD**

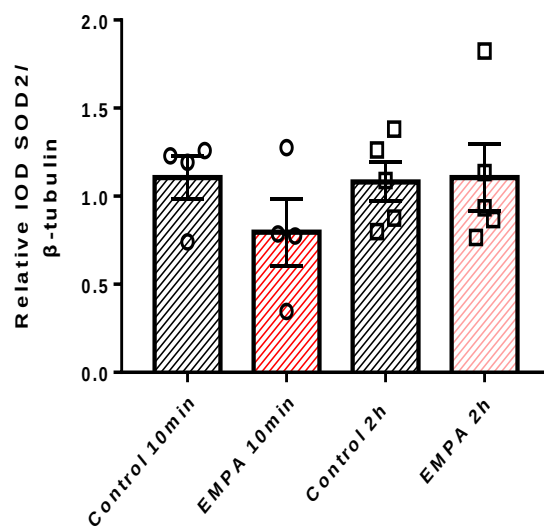
Η ανάλυση Western Blot για τον προσδιορισμό των AMPK (AMP-activated protein kinase), ERK1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2) και MnSOD2 (Manganese-dependent superoxide dismutase 2), δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων τους μεταξύ των διαφορετικών ομάδων Control και EMPA στους ιστούς που λήφθηκαν στα 10 και στα 120 λεπτά.



Διαγράμματα 10 και 11: Αποτελέσματα WB για την p(T173)-AMPK σχετικά με την ολική πρωτεΐνη σε υγιείς μύες.



Διαγράμματα 12 και 13: Αποτελέσματα WB για την p(T202/Y204)-ERK1/2 σχετικά με την ολική πρωτεΐνη σε υγιείς μύες.

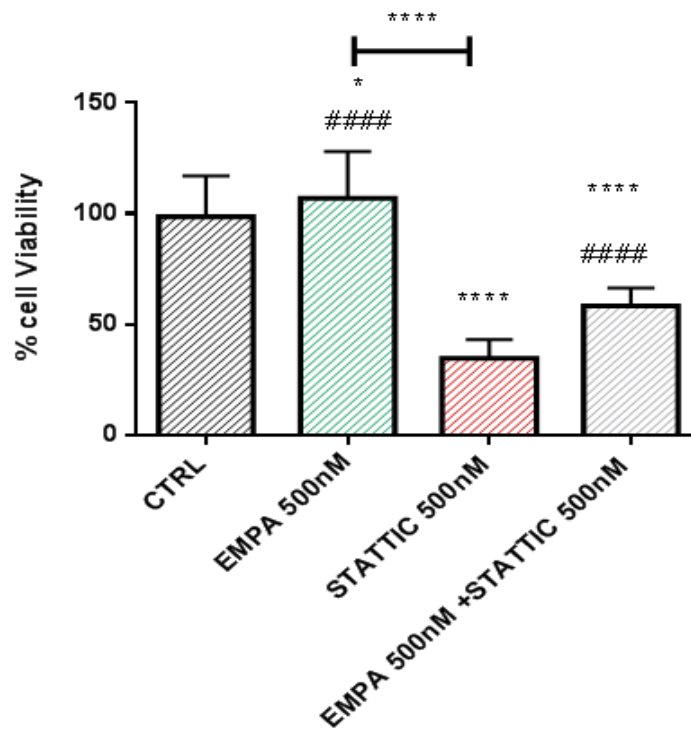


Διάγραμμα 14: Αποτελέσματα WB για την SOD2 σχετικά με την ολική πρωτεΐνη σε υγιείς μύες.

4.8 Η Εμπαγλιφλοζίνη επανέφερε μερικώς τη κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων H9C2 και HUVEC ύστερα από τη βλάβη υποξίας/επανοξυγόνωσης παρουσία του STATTC

- Κύτταρα H9C2

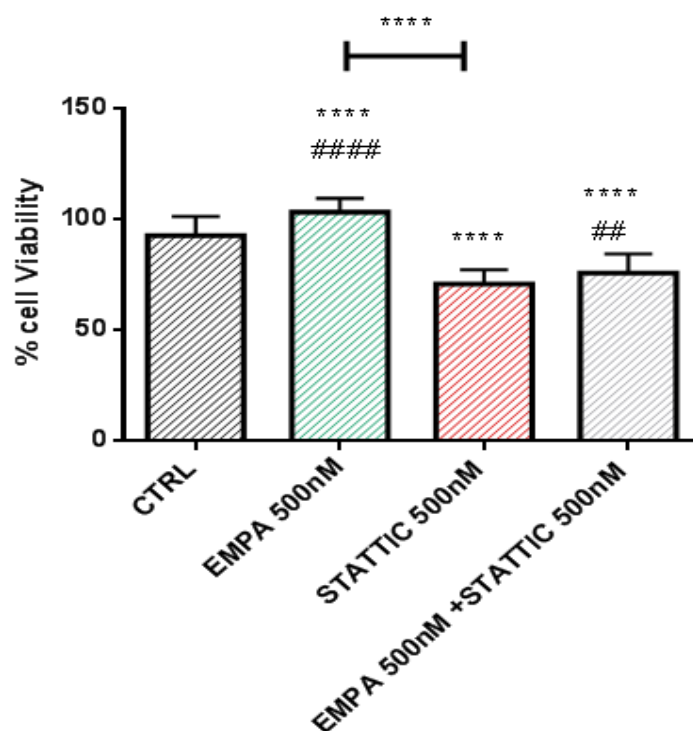
Η MTT ανάλυση στους καρδιομυοβλάστες H9C2 έδειξε ότι η Εμπαγλιφλοζίνη αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενώ ο αναστολέας του STAT-3, STATTC, τη μείωσε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα EMPA. Η συγχορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης και STATTC την επανέφερε μερικώς. Επιπλέον, σε σύγκριση με την ομάδα STATTC, η συγχορήγηση με την Εμπαγλιφλοζίνη αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων.



Διάγραμμα 15: % Κυτταρική βιωσιμότητα καρδιομυοβλαστών H9C2 (* $p < 0.05$ vs CTRL, **** $p < 0.0001$ vs CTRL, #### $p < 0.0001$ vs STATTC)

- **Κύτταρα HUVEC**

Η MTT ανάλυση σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC έδειξε επίσης ότι η Εμπαγλιφλοζίνη, αύξησε τη βιωσιμότητα τους ενώ ο STATTC, τη μείωσε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα EMPA. Η συγχορήγηση Εμπαγλιφλοζίνης και STATTC την επανέφερε μερικώς σε σύγκριση με την ομάδα STATTC ενώ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου τη μείωσε σημαντικά.



Διάγραμμα 16: % Κυτταρική βιωσιμότητα ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC (****p<0.0001 vs CTRL, ##p<0.01 vs STATTC, #### p<0.0001 vs STATTC)

5. Συζήτηση

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η καρδιοπροστατευτική δράση της Εμπαγλιφλοζίνης στο έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ένα πειραματικό μοντέλο υγιών μυών ύστερα από την οξεία και χρόνια από του στόματος χορήγηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης σε υγιείς μύες 4 ή 24 ώρες πριν την επαγωγή ισχαιμίας/επαναιμάτωσης δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αντίθετα, η χρόνια χορήγησή της (6 εβδομάδες) μείωσε σημαντικά την έκταση του εμφράγματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η Εμπαγλιφλοζίνη δεν επηρέασε τις βιομετρικές παραμέτρους (σωματικό βάρος, επίπεδα γλυκόζης) των υγιών πειραματοζώων καθώς επίσης δεν μετέβαλε την αρτηριακή πίεση και τη καρδιακή λειτουργία. Στο πρωτόκολλο διερεύνησης του εμπλεκόμενου καρδιοπροστατευτικού μηχανισμού, η Εμπαγλιφλοζίνη αύξησε σημαντικά την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 στους ιστούς που λήφθηκαν από το ισχαιμικό μυοκάρδιο στο 10^ο λεπτό της επαναιμάτωσης χωρίς να μεταβάλλει τη φωσφορυλίωσή του στους ιστούς που λήφθηκαν στα 120 λεπτά της επαναιμάτωσης. Επίσης, η Εμπαγλιφλοζίνη δεν μετέβαλε τη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 και AMPK υποδηλώνοντας ότι η καρδιοπροστατευτική της δράση πιθανόν να οφείλεται στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού SAFE ανεξάρτητα από τις κινάσες ERK1/2 και AMPK. Το 10^ο λεπτό της επαναιμάτωσης επιλέχθηκε λαμβάνοντας υπόψιν ότι όλοι οι καρδιοπροστατευτικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη διάσωση του μυοκαρδίου και την προστασία του από τη μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ενεργοποιούνται μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης (Andreadou et al., 2012; Bibli et al., 2015). Επιπλέον διερευνήθηκε η δράση της Εμπαγλιφλοζίνης σε καρδιομυοβλάστες H9C2 και ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC παρουσία και μη του αναστολέα του STAT-3, Stattic. Η Εμπαγλιφλοζίνη αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων υπό συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης ενώ η παρουσία του Stattic οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα EMPA υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή του STAT-3 στην επαγόμενη από την Εμπαγλιφλοζίνη προστασία.

Είναι γνωστο ότι οι αναστολείς των συμμεταφορέων Νατρίου-Γλυκόζης 2 μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος σε διαβητικά μοντέλα προκαλώντας γλυκοζουρία, και συνεπώς και το σωματικό βάρος λόγω της επαγόμενης από τη γλυκοζουρία θερμιδικής απώλειας (Andreadou et al., 2017; Zinman et al., 2015). Στη παρούσα μελέτη τα επίπεδα γλυκόζης και τα βάρη των υγιών μυών παρέμειναν αμετάβλητα και στις δύο ομάδες. Το αποτέλεσμα

αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Yellon et al., (Lim et al., 2019) όπου υγιείς επίμυες υποβλήθηκαν σε χρόνια χορήγηση της Καναγλιφλοζίνης και τα επίπεδα γλυκόζης παρέμειναν επίσης αμετάβλητα. Στην ίδια μελέτη, το σωματικό βάρος των υγιών μυών μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα που έλαβε Καναγλιφλοζίνη, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη με τη χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης (Lim et al., 2019). Παρομοίως, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μη διαβητικό μοντέλο επίμυων η χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης μείωσε το σωματικό βάρος αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα της γλυκόζης (Yurista et al., 2019). Οι διαφορές αυτές μεταξύ των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας και των παραπάνω μελετών πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό πειραματικό μοντέλο αλλά και στη διαφορά στη διάρκεια χορήγησης των αναστολέων SGLT-2, καθώς παρατηρείται ότι και η Καναγλιφλοζίνη και η Εμπαγλιφλοζίνη οδήγησαν σε μείωση του βάρους στους επίμυες σε διάστημα χορήγησης 4 και 2 εβδομάδων αντίστοιχα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μεγαλύτερο διάστημα χορήγησης της Εμπαγλιφλοζίνης στη παρούσα εργασία που μπορεί να οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός αντιρροπιστικού μηχανισμού που επαναφέρει τη θερμιδική απώλεια που παρατηρείται κατά την έναρξη της θεραπείας με τους αναστολείς SGLT2 αυξάνοντας τη θερμιδική πρόσληψη (Neal et al., 2017; Zinman et al., 2015).

Στη παρούσα μελέτη η χρόνια χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε την αρτηριακή πίεση ούτε την καρδιακή λειτουργία των υγιών μυών. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, έρχεται και μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μη διαβητικούς επίμυες που υποβλήθηκαν σε μόνιμη στεφανιαία απόφραξη, όπου η χρόνια χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν επηρέασε τις παραμέτρους καρδιακής λειτουργίας (Yurista et al., 2019). Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί ότι η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας είναι εμφανής μόνο παρουσία συννοσηροτήτων που οδηγούν σε αιμοδυναμικές και μεταβολικές διαταραχές τις οποίες έχουν αποδείξει να βελτιώνουν οι αναστολείς των συμμεταφορέων νατρίου-γλυκόζης 2 (Kashiwagi & Maegawa, 2017), καθώς στη προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας η Εμπαγλιφλοζίνη βελτίωσε τη καρδιακή λειτουργία μυών με επαγόμενο από διατροφική παρέμβαση ΣΔ2 (Andreou et al., 2017). Επιπλέον, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μη διαβητικό μοντέλο επίμυων με ΚΑ, η χρόνια χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης δεν μετέβαλε την αρτηριακή πίεση αλλά βελτίωσε σημαντικά την καρδιακή λειτουργία (Connolly et al., 2019).

Το μέγεθος του εμφράγματος στα υγιή πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε χρόνια από του στόματος χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα

ελέγχου, ενώ κατά την οξεία χορήγηση 4 ή 24 ωρών πριν τη χειρουργική παρέμβαση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του εμφράγματος. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Lim et al., οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της Καναγλιφλοζίνης στην έκταση του εμφράγματος ύστερα από χρόνια και οξεία χορήγηση σε πειραματικό μοντέλο επίμυων. Κατά την οξεία χορήγηση της Καναγλιφλοζίνης σε υγιείς επίμυες το μέγεθος του εμφράγματος δεν μειώθηκε αλλά υπήρξε σημαντική μείωση ύστερα από τη χρόνια χορήγησή της (Lim et al., 2019). Επίσης, η μελέτη μας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Jespersen et al., όπου η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης 10 λεπτά πριν από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου δεν μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος σε απομονωμένες καρδιές μη διαβητικών επίμυων (Jespersen et al., 2017). Η παρατήρηση ότι η οξεία χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης αλλά και της Καναγλιφλοζίνης αποτυγχάνει να προστατεύσει την καρδιά μειώνοντας το έμφραγμα του μυοκαρδίου προσφέρει κάποιες περαιτέρω ενδείξεις για το πιθανό μηχανισμό δράσης, καθώς φαίνεται να αποκλείει την άμεση καρδιοπροστατευτική δράση του φαρμάκου στο μυοκαρδίο και υποδεικνύει την ενεργοποίηση μιας ενδοκρινούς σηματοδότησης ή κάποιου μεταβολικού αποτελέσματος που μπορεί να εξηγεί την ευεργετική δράση της χρόνιας χορήγησής της.

Οι σηματοδοτικές οδοί SAFE και RISK αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές της καρδιοπροστασίας που οδηγεί στη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος (Heusch, 2015). Στη παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας στην οποία χορηγήθηκε η Εμπαγλιφλοζίνη και της ομάδας ελέγχου στη φωσφορυλίωση και την έκφραση των ERK1/2 στο ισχαιμικό μυοκάρδιο, ούτε στα 10' ούτε στα 120' της επαναιμάτωσης, υποδεικνύοντας μια πιθανόν ανεξάρτητη από την οδό RISK καρδιοπροστασία που όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Habibi et al., που πραγματοποιήθηκε σε καρδιομυοκύτταρα και έδειξε ότι η Εμπαγλιφλοζίνη δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση των ERK1/2 (Habibi et al., 2017). Επιπλέον η Εμπαγλιφλοζίνη δεν ενεργοποίησε την AMPK κινάση υποδεικνύοντας ότι η καρδιοπροστατευτική της δράση είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησής της. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα *in vitro* πειράματα των Mancini et al., όπου κύτταρα HUVEC και ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής HAEC υποβλήθηκαν σε αγωγή με Καναγλιφλοζίνη, Δαπαγλιφλοζίνη, Εμπαγλιφλοζίνη ή τον ενεργοποιητή της κινάσης AMPK, A769662. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο η Καναγλιφλοζίνη και ο A769662 οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης της AMPK ενώ οι Δαπαγλιφλοζίνη και Εμπαγλιφλοζίνη ακόμα και σε υψηλότερες δόσεις δεν είχαν καμία επίδραση στην έκφρασή της (Mancini et al., 2018).

Εκτός από την οδό RISK και τη κινάση AMPK, η οδός SAFE και ιδιαίτερα ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-3, αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της ενεργοποίησης της καρδιοπροστασίας (Andreadou et al., 2015; Kleinbongard et al., 2018). Σε μελέτη διερεύνησης του ρόλου του STAT-3 στο έμφραγμα του μυοκαρδίου σε μοντέλο χοίρων, η αναστολή της οδού JAK/STAT μέσω της χορήγησης του αναστολέα της JAK, AG490, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του STAT-3 και κατά συνέπεια αναστολή της επαγόμενης από μετισταθμική προετοιμασία μείωσης του εμφράγματος (Heusch et al., 2011). Στην παρούσα εργασία, αποδείξαμε ότι η χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης για 6 εβδομάδες σε υγιή πειραματόζωα οδήγησε σε σημαντική ενεργοποίηση του STAT-3 στη τυροσίνη 705 στα 10 της επαναιμάτωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Διερευνήσαμε τη φωσφορυλίωση του STAT-3 στην Tyr705, καθώς αυτή είναι η πρωτεύουσα θέση φωσφορυλίωσής του και έχει συσχετιστεί με την καρδιοπροστασία κατά τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης (Andreadou et al., 2015). Παρομοίως, η χρόνια χορήγηση της Δαπαγλιφλοζίνης σε πειραματικό μοντέλο μη διαβητικών επίμυων, αύξησε την έκφραση του STAT-3, ο οποίος με την σειρά του αύξησε την ενεργοποίηση των μακροφάγων τύπου M2c, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διήθηση μυοϊνοβλαστών και συνεπώς καρδιακή ίνωση μέσω μείωσης των επιπέδων των iNOS και IL-6 και αύξησης των επιπέδων της IL-10 στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Αντίθετα, η χορήγηση του αναστολέα του STAT-3, S3I-201 ανέστειλλε τη δράση της Δαπαγλιφλοζίνης στην προστασία κατά της καρδιακής ίνωσης (Lee et al., 2017). Το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών υποδηλώνει τη πιθανή καρδιοπροστασία που επάγει η ενεργοποίηση του STAT-3 στο ισχαιμικό μυοκάρδιο.

Η χορήγηση του αναστολέα ενεργοποίησης του STAT-3, Stattic οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων H9C2 και HUVEC που υποβλήθηκαν σε συνθήκες υποξίας/επανοξυγόνωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα EMPA, καθώς η ενεργοποίηση του STAT-3 κατέχει σημαντικό ρόλο στη καρδιοπροστασία (Heusch, 2015) και συνεπώς και στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η συγχορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης, οδήγησε σε μερική επαναφορά της βιωσιμότητας των κυττάρων υποδηλώνοντας την εμπλοκή του STAT-3 στη προστασία τους κατά την υποξία/επανοξυγόνωση. Σε μελέτη των Andreadou et al., η Εμπαγλιφλοζίνη διατήρησε τη βιωσιμότητα ενδοθηλιακών και H9C2 κυττάρων από τη βλάβη υποξίας/επανοξυγόνωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Andreadou et al., 2017). Η προστασία αυτή πιθανόν να οφείλεται στην επαγόμενη από την Εμπαγλιφλοζίνη ενεργοποίηση του STAT-3, καθώς η αναστολή του στη παρούσα μελέτη οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

6. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η χρόνια από του στόματος χορήγηση της Εμπαγλιφλοζίνης έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του μεγέθους του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ανεξάρτητα από τη παρουσία ΣΔ2. Η καρδιοπροστατευτική της δράση φαίνεται να μεσολαβείται μέσω ενός μηχανισμού σηματοδότησης στον οποίο φαίνεται να εμπλέκεται ο μεταγραφικός παράγοντας STAT-3 που όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η Εμπαγλιφλοζίνη, δεν έχει καρδιοπροστατευτική επίδραση κατά την οξεία χορήγησή της στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι οι SGLT-2 υποδοχείς δεν εκφράζονται στα καρδιομυοκύτταρα αλλά έχουν εντοπιστεί στο μυοκάρδιο. Έτσι λοιπόν, είναι σημαντικό να διερευνηθεί η επίδραση της Εμπαγλιφλοζίνης στους κυτταρικούς πληθυσμούς του μυοκαρδίου και στις αλληλεπιδράσεις αυτών. Η παρούσα εργασία, συνεπώς, παρέχει νέες γνώσεις σχετικά με τα πιθανά καρδιαγγειακά οφέλη της αναστολής των SGLT-2 που θα μπορούσε μελλοντικά να οδηγήσει σε μια πιθανή και σημαντική επαναστόχευση αυτής της ομάδας φαρμάκων για τη μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας και σε μη διαβητικούς ασθενείς.

Βιβλιογραφία

- Abdelgadir, E., F. R., Bashier, A., & Ali Rashid, R. (2018). SGLT-2 Inhibitors and Cardiovascular Protection: Lessons and Gaps in Understanding the Current Outcome Trials and Possible Benefits of Combining SGLT-2 Inhibitors With GLP-1 Agonists. *Journal of Clinical Medicine Research*, 10. <https://doi.org/10.14740/jocmr3467w>
- Abdul-Ghani, M. A., Norton, L., & Defronzo, R. A. (2011). Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 32(4), 515–531. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0029>
- Adingupu, D. D., Gopel, S. O., Gronros, J., Behrendt, M., Sotak, M., Miliotis, T., ... Jonsson-Rylander, A.-C. (2019). SGLT2 inhibition with empagliflozin improves coronary microvascular function and cardiac contractility in prediabetic ob/ob(-/-) mice. *Cardiovascular Diabetology*, 18(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0820-6>
- Andreadou, I., Bibli, S.-I., Mastromanolis, E., Zoga, A., Efentakis, P., Papaioannou, N., ... Iliodromitis, E. K. (2015). Transient carotid ischemia as a remote conditioning stimulus for myocardial protection in anesthetized rabbits: Insights into intracellular signaling. *International Journal of Cardiology*, 184, 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.01.079>
- Andreadou, I., Efentakis, P., Balafas, E., Togliatto, G., Davos, C. H., Varela, A., ... Iliodromitis, E. K. (2017). Empagliflozin limits myocardial infarction in vivo and cell death in vitro: Role of STAT3, mitochondria, and redox aspects. *Frontiers in Physiology*, 8(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01077>
- Andreadou, I., Farmakis, D., Prokovas, E., Sigala, F., Zoga, A., Spyridaki, K., ... Iliodromitis, E. (2012). Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: Effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. *Cardiovascular Research*, 94, 501–509. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs121>
- Avkiran, M., & Marber, M. S. (2002). Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(5), 747–753.
- Baartscheer, A., Schumacher, C. A., Wüst, R. C. I., Fiolet, J. W. T., Stienen, G. J. M., Coronel,

- R., & Zuurbier, C. J. (2016). Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺ / H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*, 6–11. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4134-x>
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., ... Molkentin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658–662. <https://doi.org/10.1038/nature03434>
- Banerjee, S. K., McGaffin, K. R., Pastor-Soler, N. M., & Ahmad, F. (2009). SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovascular Research*, 84(1), 111–118. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp190>
- Bays, H. (2013). Sodium Glucose Co-transporter Type 2 (SGLT2) Inhibitors : Targeting the Kidney to Improve Glycemic Control in Diabetes Mellitus, 2, 195–220. <https://doi.org/10.1007/s13300-013-0042-y>
- Bharadwaj, U., Kasembeli, M. M., Eckols, T. K., Kolosov, M., Lang, P., Christensen, K., ... Tweardy, D. J. (2014). Monoclonal Antibodies Specific for STAT3 β Reveal Its Contribution to Constitutive STAT3 Phosphorylation in Breast Cancer. *Cancers*, 6(4), 2012–2034. <https://doi.org/10.3390/cancers6042012>
- Bhuiyan, M. S., & Fukunaga, K. (2007). Inhibition of HtrA2/Omi ameliorates heart dysfunction following ischemia/reperfusion injury in rat heart in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 557(2–3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.10.067>
- Bibli, S.-I., Andreadou, I., Chatzianastasiou, A., Tzimas, C., Sanoudou, D., Kranias, E., ... Papapetropoulos, A. (2015). Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. *Cardiovascular Research*, 106(3), 432–442. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv129>
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., & Schulz, R. (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), 771–785. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0124-1>
- Bonner, C., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Queniat, G., Moerman, E., Thevenet, J., ... Pattou, F. (2015). Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nature Medicine*, 21(5), 512–517.

<https://doi.org/10.1038/nm.3828>

Buss, S. J., Muenz, S., Riffel, J. H., Malekar, P., Hagenmueller, M., Weiss, C. S., ... Hardt, S. E. (2009). Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(25), 2435–2446. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.031>

INDICATIONS AND USAGE JARDIANCE.

Chao, E. C., & Henry, R. R. (2010). SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment, 9(july). <https://doi.org/10.1038/nrd3180>

Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. (2001). Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280(5), H2313-20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2313>

Cherney, D. Z. I., Perkins, B. A., Soleymanlou, N., Maione, M., Lai, V., Lee, A., ... von Eynatten, M. (2014). Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation*, 129(5), 587–597. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005081>

Cherney, D. Z., Perkins, B. A., Soleymanlou, N., Har, R., Fagan, N., Johansen, O. E., ... Broedl, U. C. (2014). The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 13, 28. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-28>

Chilton, R., Tikkanen, I., Cannon, C. P., Crowe, S., Woerle, H. J., Broedl, U. C., & Johansen, O. E. (2015). Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 17(12), 1180–1193. <https://doi.org/10.1111/dom.12572>

Chiong, M., Wang, Z. V, Pedrozo, Z., Cao, D. J., Troncoso, R., Ibacache, M., ... Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*, 2(12), e244. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.130>

Chua, C. C., Gao, J., Ho, Y.-S., Xiong, Y., Xu, X., Chen, Z., ... Chua, B. H. L. (2007). Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(4),

577–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.007>

- Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., ... Lembo, G. (1999). Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*, 99(23), 3071–3078.
- Connelly, K. A., Zhang, Y., Visram, A., Advani, A., Batchu, S. N., Desjardins, J.-F., ... Gilbert, R. E. (2019). Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.11.010>
- Davies, M. J., Trujillo, A., Vijapurkar, U., Damaraju, C. V., & Meininger, G. (2015). Effect of canagliflozin on serum uric acid in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 17(4), 426–429. <https://doi.org/10.1111/dom.12439>
- DeFronzo, R. A., Hompesch, M., Kasichayanula, S., Liu, X., Hong, Y., Pfister, M., ... Griffen, S. C. (2013). Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 36(10), 3169–3176. <https://doi.org/10.2337/dc13-0387>
- Efentakis, P., Rizakou, A., Christodoulou, E., Chatzianastasiou, A., López, M., Leon, R., ... Andreadou, I. (2017). P5324: Saffron (*Crocus sativus*) intake provides nutritional preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury in wild type and Apo-E(–/–) mice: involvement of Nrf2 activation European Heart Journal, Volume 38, Issue suppl_1, 1 August 2017, eh. In *European Heart Journal* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx493.P5324>
- Ehrenkranz, J. R. L., Lewis, N. G., Kahn, C. R., & Roth, J. (2005). Phlorizin: A review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(1), 31–38. <https://doi.org/10.1002/dmrr.532>
- FARBER, S. J., BERGER, E. Y., & EARLE, D. P. (1951). Effect of diabetes and insulin on the maximum capacity of the renal tubules to reabsorb glucose. *The Journal of Clinical Investigation*, 30(2), 125–129. <https://doi.org/10.1172/JCI102424>
- Felicetta, J. V., & Sowers, J. R. (1988). Systemic hypertension in diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, 61(16), 34H-40H.

- Ferrannini, E., & DeFronzo, R. A. (2015). Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *European Heart Journal*, 36(34), 2288–2296.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv239>
- Ferrannini, G., Hach, T., Crowe, S., Sanghvi, A., Hall, K. D., & Ferrannini, E. (2015). Energy Balance After Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition. *Diabetes Care*, 38(9), 1730–1735. <https://doi.org/10.2337/dc15-0355>
- Fischer, P., & Hilfiker-Kleiner, D. (2008). Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl(Suppl 1), S414–27. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.1>
- Fliss, H., & Gattinger, D. (1996). Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation Research*, 79(5), 949–956.
- Garama, D. J., White, C. L., Balic, J. J., & Gough, D. J. (2016). Mitochondrial STAT3: Powering up a potent factor. *Cytokine*, 87, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.05.019>
- Gerich, J. E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 27(2), 136–142.
<https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x>
- Grempler, R., Thomas, L., Eckhardt, M., Himmelsbach, F., Sauer, A., Sharp, D. E., ... Eickelmann, P. (2012). Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 14(1), 83–90. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01517.x>
- Gustafsson, A. B., & Gottlieb, R. A. (2009). Autophagy in ischemic heart disease. *Circulation Research*, 104(2), 150–158. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187427>
- Habibi, J., Aroor, A. R., Sowers, J. R., Jia, G., Hayden, M. R., Garro, M., ... DeMarco, V. G. (2017). Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 16(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0489-z>
- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., Logue, S. E., Sayen, M. R., Jinno, M., Kirshenbaum, L. A., ... Gustafsson, A. B. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves

- Bnip3 and autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 146–157.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401936>
- Hamacher-Brady, Anne, Brady, N. R., & Gottlieb, R. A. (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29776–29787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603783200>
- Han, J. H., Oh, T. J., Lee, G., Maeng, H. J., Lee, D. H., Kim, K. M., ... Lim, S. (2017). The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE (-/-) mice fed a western diet. *Diabetologia*, 60(2), 364–376.
<https://doi.org/10.1007/s00125-016-4158-2>
- Hausenloy, D J, Barrabes, J. A., Bøtker, H., Davidson, S., Di Lisa, F., Downey, J., ... Garcia-Dorado, D. (2016). Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Research in Cardiology*, 111.
- Hausenloy, Derek J, & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 92–100.
<https://doi.org/10.1172/JCI62874>
- Heise, T., Seewaldt-Becker, E., Macha, S., Hantel, S., Pinnetti, S., Seman, L., & Woerle, H. J. (2013). Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics following 4 weeks' treatment with empagliflozin once daily in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 15(7), 613–621. <https://doi.org/10.1111/dom.12073>
- Henriquez, M., Armisen, R., Stutzin, A., & Quest, A. F. G. (2008). Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Current Molecular Medicine*, 8(3), 187–206.
- Henry, R. R. (2016). Can a Shift in Fuel Energetics Explain the Beneficial Cardiorenal Outcomes in the EMPA-REG OUTCOME Study ? A Unifying Hypothesis, (March), 1–8.
<https://doi.org/10.2337/dc16-0542>
- Heusch, G. (2013). Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *The Lancet*, 381(9861), 166–175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60916-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60916-7)
- Heusch, G. (2015). Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circulation Research*, 116(4), 674–699.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>

- Heusch, G., Bøtker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A., & Yellon, D. (2015). Remote ischemic conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(2), 177–195.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.031>
- Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N., & Skyschally, A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation Research*, 109(11), 1302–1308.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255604>
- Hochhauser, E., Cheporko, Y., Yasovich, N., Pinchas, L., Offen, D., Barhum, Y., ... Birk, E. (2007). Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47, 11–20.
<https://doi.org/10.1385/CBB:47:1:11>
- Hummel, C. S., Lu, C., Loo, D. D. F., Hirayama, B. A., Voss, A. A., & Wright, E. M. (2011). Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(1), C14–21.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00388.2010>
- J Hausenloy, D., Tsang, A., & M Yellon, D. (2005). The Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway: A Common Target for Both Ischemic Preconditioning and Postconditioning. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15, 69–75.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.03.001>
- Jespersen, N. R. ; Lassen, T. ; Hjortbak, M. V. ; Støttrup, N. ; & Bøtker, H. E. (2017). Sodium Glucose Transporter 2 (SGLT2) Inhibition does not Protect the Myocardium from Acute Ischemic Reperfusion Injury but Modulates Post- Ischemic Mitochondrial Function, 6(2), 5–7. <https://doi.org/10.4172/2329-6607.1000210>
- Juhaszova, M., Zorov, D. B., Yaniv, Y., Nuss, H. B., Wang, S., & Sollott, S. J. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3 β in cardioprotection. *Circulation Research*, 104(11), 1240–1252. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197996>
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., ... Anversa, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 74(1), 86–107.
- Kamran, M., Peterson, R. G., & Dominguez, J. H. (1997). Overexpression of GLUT2 gene in

- renal proximal tubules of diabetic Zucker rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 8(6), 943–948.
- Kashiwagi, A., & Maegawa, H. (2017). Metabolic and hemodynamic effects of sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitors on cardio-renal protection in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*, 8(4), 416–427. <https://doi.org/10.1111/jdi.12644>
- Kleinbongard, P., & Heusch, G. (2015). Extracellular signalling molecules in the ischaemic/reperfused heart - druggable and translatable for cardioprotection? *British Journal of Pharmacology*, 172(8), 2010–2025. <https://doi.org/10.1111/bph.12902>
- Kleinbongard, Petra, Skyschally, A., Gent, S., Pesch, M., & Heusch, G. (2018). STAT3 as a common signal of ischemic conditioning: a lesson on “rigor and reproducibility” in preclinical studies on cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 113(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0660-z>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., ... Feldman, A. M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circulation Research*, 81(4), 627–635.
- Kurrelmeyer, K. M., Michael, L. H., Baumgarten, G., Taffet, G. E., Peschon, J. J., Sivasubramanian, N., ... Mann, D. L. (2000). Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5456–5461. <https://doi.org/10.1073/pnas.070036297>
- Langdon, S. P. (2003). Cancer Cell Culture. *Cancer Cell Culture*, 731, 237–245. <https://doi.org/10.1385/1592594069>
- Lecour, S. (2009). Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(1), 32–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.019>

- Lee, P., Sata, M., Lefer, D. J., Factor, S. M., Walsh, K., & Kitsis, R. N. (2003). Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(2), H456-63. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00777.2002>
- Lee, T.-M., Chang, N.-C., & Lin, S.-Z. (2017). Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radical Biology & Medicine*, 104, 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.035>
- Lee, Y., & Gustafsson, A. B. (2009). Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 14(4), 536–548. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0302-x>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Liao, X., Wang, X., Gu, Y., Chen, Q., & Chen, L.-Y. (2005). Involvement of death receptor signaling in mechanical stretch-induced cardiomyocyte apoptosis. *Life Sciences*, 77(2), 160–174. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.029>
- Libby, P. (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England Journal of Medicine*, 368(21), 2004–2013. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1216063>
- Lin, B., Koibuchi, N., Hasegawa, Y., Sueta, D., Toyama, K., Uekawa, K., ... Kim-Mitsuyama, S. (2014). Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology*, 13, 148. <https://doi.org/10.1186/s12933-014-0148-1>
- Lipinski, M. M., Hoffman, G., Ng, A., Zhou, W., Py, B. F., Hsu, E., ... Yuan, J. (2010). A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Developmental Cell*, 18(6), 1041–1052. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.005>
- Ma, X., Liu, H., Foyil, S. R., Godar, R. J., Weinheimer, C. J., Hill, J. A., & Diwan, A. (2012). Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 125(25), 3170–3181.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041814>

- Macha, S., Mattheus, M., Halabi, A., Pinnetti, S., Woerle, H. J., & Broedl, U. C. (2014). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in subjects with renal impairment. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16(3), 215–222. <https://doi.org/10.1111/dom.12182>
- Mancini, S. J., Boyd, D., Katwan, O. J., Strembitska, A., Almabrouk, T. A., Kennedy, S., ... Salt, I. P. (2018). Canagliflozin inhibits interleukin-1 β -stimulated cytokine and chemokine secretion in vascular endothelial cells by AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *Scientific Reports*, 8(1), 5276. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23420-4>
- Marambio, P., Toro, B., Sanhueza, C., Troncoso, R., Parra, V., Verdejo, H., ... Lavandero, S. (2010). Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(6), 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.002>
- Marsenic, O. (2009). Glucose control by the kidney: an emerging target in diabetes. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 53(5), 875–883. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.12.031>
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., ... Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation Research*, 100(6), 914–922. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261924.76669.36>
- Mavroidis, M., Davos, C. H., Psarras, S., Varela, A., C Athanasiadis, N., Katsimpoulas, M., ... Capetanaki, Y. (2015). Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, 110(3), 27. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0485-6>
- McCormick, J., Suleman, N., Scarabelli, T. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., & Stephanou, A. (2012). STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(2), 386–393. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01323.x>
- Merovci, A., Solis-Herrera, C., Daniele, G., Eldor, R., Fiorentino, T. V., Tripathy, D., ... DeFronzo, R. A. (2014). Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances

- endogenous glucose production. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 509–514.
<https://doi.org/10.1172/JCI70704>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136.
- Nagareddy, P. R., Murphy, A. J., Stirzaker, R. A., Hu, Y., Yu, S., Miller, R. G., ... Goldberg, I. J. (2013). Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 17(5), 695–708.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.001>
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., ... Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033), 652–658.
<https://doi.org/10.1038/nature03317>
- Nakamura, T., Ueda, Y., Juan, Y., Katsuda, S., Takahashi, H., & Koh, E. (2000). Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation*, 102(5), 572–578.
- Nauck, M. A. (2014). Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1335–1380.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S50773>
- Ndefo, U. A., Anidiobi, N. O., Basheer, E., & Eaton, A. T. (2015). Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(6), 364–368. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045645>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4450666>
- Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K. W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erond, N., ... Matthews, D. R. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 377(7), 644–657.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611925>
- Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., & Rayner, M. (2014). Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European Heart Journal*, 35(42), 2950–2959.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu299>

- O’Gara, P. T., Kushner, F. G., Ascheim, D. D., Casey, D. E. J., Chung, M. K., de Lemos, J. A., ... Yancy, C. W. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 127(4), e362-425. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182742cf6>
- Osorio, H., Coronel-Morales, I., Arellano, A., Pacheco, U., Bautista, R., Franco, M., & Escalante, B. (2012). Sodium-Glucose Cotransporter Inhibition Prevents Oxidative Stress in the Kidney of Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 542042. <https://doi.org/10.1155/2012/542042>
- Panchapakesan, U., Pegg, K., Gross, S., Komala, M. G., Mudaliar, H., Forbes, J., ... Mather, A. (2013). Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy? *PloS One*, 8(2), e54442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054442>
- Pancholia, A. K. (2018). Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition for the reduction of cardiovascular events in high-risk patients with diabetes mellitus. *Indian Heart Journal*, 70(6), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.08.022>
- Pipicz, M., Demján, V., Sárközy, M., & Csont, T. (2018). Effects of Cardiovascular Risk Factors on Cardiac STAT3. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3572. <https://doi.org/10.3390/ijms19113572>
- Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C., & Deshmukh, M. (2005). Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *The Journal of Cell Biology*, 171(6), 925–930. <https://doi.org/10.1083/jcb.200504082>
- Rahmoune, H., Thompson, P. W., Ward, J. M., Smith, C. D., Hong, G., & Brown, J. (2005). Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 54(12), 3427–3434.
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56(5), 786–794.
- Rieg, T., Masuda, T., Gerasimova, M., Mayoux, E., Platt, K., Powell, D. R., ... Vallon, V. (2014). Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during

- genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 306(2), F188-93.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00518.2013>
- Røder, M. E. (2018). Major adverse cardiovascular event reduction with GLP-1 and SGLT2 agents: evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 9(1), 33–50. <https://doi.org/10.1177/2040622317735283>
- Russell, R. R. 3rd, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., ... Young, L. H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 495–503. <https://doi.org/10.1172/JCI19297>
- Saeed, M. A., & Narendran, P. (2014). Dapagliflozin for the treatment of type 2 diabetes: a review of the literature. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 2493–2505.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S50963>
- Santer, R., & Calado, J. (2010). Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 5(1), 133–141. <https://doi.org/10.2215/CJN.04010609>
- Santos-Gallego, C. G., Requena-Ibanez, J. A., San Antonio, R., Ishikawa, K., Watanabe, S., Picatoste, B., ... Badimon, J. J. (2019). Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(15), 1931–1944.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.056>
- Scheubel, R. J., Bartling, B., Simm, A., Silber, R.-E., Drogaris, K., Darmer, D., & Holtz, J. (2002). Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: Fragile balance of myocyte survival? *Journal of the American College of Cardiology*, 39(3), 481–488.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01769-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01769-7)
- Sha, S., Polidori, D., Heise, T., Natarajan, J., Farrell, K., Wang, S.-S., ... Plum-Morschel, L. (2014). Effect of the sodium glucose co-transporter 2 inhibitor canagliflozin on plasma volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16(11), 1087–1095. <https://doi.org/10.1111/dom.12322>
- Sinclair, A., Bode, B., Harris, S., Vijapurkar, U., Mayer, C., Fung, A., ... Meininger, G. (2014).

- Efficacy and safety of canagliflozin compared with placebo in older patients with type 2 diabetes mellitus: a pooled analysis of clinical studies. *BMC Endocrine Disorders*, 14, 37. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-14-37>
- Skyschally, A., Schulz, R., & Heusch, G. (2008). Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz*, 33(2), 88–100. <https://doi.org/10.1007/s00059-008-3101-9>
- Steg, P. G., James, S. K., Atar, D., Badano, L. P., Blomstrom-Lundqvist, C., Borger, M. A., ... Zahger, D. (2012). ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 33(20), 2569–2619. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs215>
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163–1167. <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
- Tahara, A., Kurosaki, E., Yokono, M., Yamajuku, D., Kihara, R., Hayashizaki, Y., ... Shibasaki, M. (2013). Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 715(1–3), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.05.014>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., & White, H. D. (2007). Universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 28(20), 2525–2538. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm355>
- Timmis, A. (2015). Acute coronary syndromes. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 351, h5153. <https://doi.org/10.1136/bmj.h5153>
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M., ... Group, E. S. C. S. D. (2017). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Journal*, 39(7), 508–579. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx628>
- Toth, A., Jeffers, J. R., Nickson, P., Min, J.-Y., Morgan, J. P., Zambetti, G. P., & Erhardt, P. (2006). Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(1), H52–60. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01046.2005>

- Uthman, L., Baartscheer, A., Bleijlevens, B., Schumacher, C. A., Fiolet, J. W. T., Koeman, A., ... Zuurbier, C. J. (2018). Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia*, 61(3). <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4509-7>
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D. V., Festjens, N., & Vandenabeele, P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine*, 8(3), 207–220.
- Vasilakou, D., Karagiannis, T., Athanasiadou, E., Mainou, M., Liakos, A., Bekiari, E., ... Tsapas, A. (2013). Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 159(4), 262–274. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-4-201308200-00007>
- Ven G. Lim, Robert M. Bell, Sapna Arjun, Maria Kolatsi-Joannou, D. A. L. and D. M. Y. (2019). SGLT2 Inhibitor , Canagliflozin , Attenuates Myocardial Infarction in the Diabetic and Nondiabetic Heart. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(1). <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.10.002>
- Verma, S., Rawat, S., Ho, K. L., Wagg, C. S., Zhang, L., Teoh, H., ... Lopaschuk, G. D. (2018). Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes: Novel Translational Insights Into the Heart Failure Benefits of SGLT2 Inhibitors. *JACC. Basic to Translational Science*, 3(5), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.07.006>
- Weintraub, W. S., Daniels, S. R., Burke, L. E., Franklin, B. A., Goff, D. C. J., Hayman, L. L., ... Whitsel, L. P. (2011). Value of primordial and primary prevention for cardiovascular disease: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, 124(8), 967–990. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182285a81>
- Whalen, K., Miller, S., & Onge, E. S. (2015). The Role of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Clinical Therapeutics*, 37(6), 1150–1166. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.004>
- Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual Review of Physiology*, 72, 19–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163111>
- Wiviott, S. D., Raz, I., Bonaca, M. P., Mosenzon, O., Kato, E. T., Cahn, A., ... Sabatine, M. S. (2019). Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England*

- Journal of Medicine*, 380(4), 347–357. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812389>
- Wright, E. M., Loo, D. D. F., & Hirayama, B. A. (2011). Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews*, 91(2), 733–794.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009>
- Yan, L., Vatner, D. E., Kim, S.-J., Ge, H., Masarekar, M., Massover, W. H., ... Vatner, S. F. (2005). Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13807–13812.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506843102>
- Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Yang, R., & Rincon, M. (2016). Mitochondrial Stat3, the Need for Design Thinking. *International Journal of Biological Sciences*, 12(5), 532–544.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.15153>
- Yeh, R. W., Sidney, S., Chandra, M., Sorel, M., Selby, J. V., & Go, A. S. (2010). Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 362(23), 2155–2165. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908610>
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121–1135. <https://doi.org/10.1056/NEJMr071667>
- Younis, Firas M and Hollander, Kenneth and Mayoux, Eric W and Landa-Rouben, Natalie and Nachman, Rachel and Leor, Yoni and Rosenthal, T. (n.d.). Effect of prophylactic treatment with empagliflozin on cardiac function and diabetes in CRDH rats.
- Yurista, S. R., Sillje, H. H. W., Oberdorf-Maass, S. U., Schouten, E.-M., Pavez Giani, M. G., Hillebrands, J.-L., ... Westenbrink, B. D. (2019). Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure*.
<https://doi.org/10.1002/ejhf.1473>
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of*

Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 285(2), H579-88.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J. M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., ... Inzucchi, S. E.
(2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 373(22), 2117–2128.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504720>