



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Σχεδιασμός και
Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων - Ειδίκευση:
Φαρμακολογία**

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Φαρμακευτική
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας
Διπλωματική εργασία με θέμα:

«Μελέτη της μιτοχονδριακής FoF1 ATP συνθάσης ως
μοριακό στόχο έναντι ισχαιμικών καταστάσεων του
μυοκαρδίου με τη χρήση νέων φαρμακολογικών
αναστολέων»

Μπέσης-Λαζάρου Παύλος

A.M:180222
Φαρμακοποιός
Ιούλιος 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ανδρεάδου Ιωάννα, Καθηγήτρια φαρμακολογίας, επιβλέπουσα
καθηγήτρια

Παπαπετρόπουλος Ανδρέας, Καθηγητής φαρμακολογίας

Δρακούλης Νικόλαος, Αναπληρωτής καθηγητής φαρμακολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το ένζυμο ATP συνθάση, κατά τη φάση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου, αναστρέφει τη λειτουργία του και θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση του καρδιομυοκυττάρου, καταναλώνοντας ATP. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι διάφορες ενώσεις, μπορούν να αναστείλουν την υδρολυτική δράση του ενζύμου. Ακόμη, έχει φανεί ότι η αναστολή του στη φάση αυτή, οδηγεί σε καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα. Όμως, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αρκετές *in vivo* μελέτες που να καταδεικνύουν ότι αναστέλλοντας το ένζυμο κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, οδηγεί σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος και των νεκρωτικών βλαβών στο μυοκάρδιο. **Σκοπός:** Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό να αναδείξει νέους αναστολείς του ενζύμου ATP συνθάση (για την υδρολυτική λειτουργία του) μέσα από μία σειρά 53 ενώσεων. Κατόπιν, οι αναστολείς που επελέγησαν, αξιολογήθηκαν περαιτέρω *in vitro* και *in vivo*, ώστε να προσδιοριστεί η ικανότητα μείωσης της έκτασης του εμφράγματος. **Μέθοδοι:** *In silico* αξιολόγηση: Ενώσεις από δύο βιβλιοθήκες (pharmalab και NCI) αξιολογήθηκαν με *in silico* τεχνικές και προέκυψε ένα σύνολο 53 πιθανών αναστολέων. **Τεχνική I:** Το σύνολο των ενώσεων αξιολογήθηκε *in vitro* σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιακό ιστό μυών. Στόχος, ήταν να επιλεγούν οι δραστικότεροι αναστολείς στη συγκέντρωση των 200 μ M. Κατόπιν, για τις πλέον δραστικές ενώσεις, προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} με παρόμοια διαδικασία. **Τεχνική II:** Οι δραστικές ενώσεις αξιολογήθηκαν για το αν επηρεάζουν τον μιτοχονδριακό πόρο διαπερατότητας (mPTP). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από καρδιακό ιστό μυών. **Τεχνική III:** Οι πλέον δραστικές ενώσεις αξιολογήθηκαν ως προς: α) την ανασταλτική τους ικανότητα επί του ενζύμου, β) την εκλεκτικότητά τους για την αναστολή της υδρολυτικής λειτουργίας και γ) την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Η αξιολόγηση είναι έμμεση και πραγματοποιήθηκε σε H2C9 κύτταρα. Αξιολογήθηκε και ο πρότυπος εκλεκτικός αναστολέας BTB 06584 (τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο πανεπιστήμιο UCL στην Αγγλία). **Τεχνική IV:** Οι καλύτερες ενώσεις, και η ένωση BTB, εξετάστηκαν ως προς τη δραστικότητά και την τοξικότητά τους σε απομονωμένα καρδιομυοκύτταρα από καρδιακό ιστό επιμύων (τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο πανεπιστήμιο UCL στην Αγγλία). **In vivo πρωτόκολλο:** 30 μύες C57BL/6 τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες και υποβλήθηκαν χειρουργικά σε 30' ισχαιμία ακολουθούμενη από 2 ώρες επαναιμάτωση. 5' πριν την ισχαιμία, χορηγήθηκαν: στην ομάδα ελέγχου I φυσιολογικός ορός με Tween 5% (διαλύτης των μορίων 1117, 1119), στην ομάδα ελέγχου II φυσιολογικός ορός με 5% DMSO (διαλύτης της ολιγομυκίνης και του BTB), στην ομάδα A η ένωση 1117 με δοσολογία 3,6 mg/Kg, στην ομάδα B η ένωση 1119 με δοσολογία 3,5 mg/Kg, στην ομάδα Γ η ένωση ολιγομυκίνη με δοσολογία 0,95 mg/Kg και στην ομάδα Δ η ένωση BTB με δοσολογία 5 mg/Kg. Κάθε ομάδα είχε n=5 ζώα και η χορήγηση των μορίων πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια. **Αποτελέσματα:** Από τις 53 ενώσεις που δοκιμάστηκαν, ενώσεις με σκελετό πυραζολοπυριδίνης και

βενζοφουρανίου έδειξαν ανασταλτική δράση. Επελέγησαν 3 από τις καλύτερες ενώσεις για περαιτέρω διερεύνηση βάσει της τιμής IC_{50} . Οι ενώσεις 1117, 1119 και 1124 εμφάνισαν $75,93\% \pm 4,22$, $57,80\% \pm 9,75$ και $50,86\% \pm 17,34$ αναστολή του ενζύμου στα $200\mu M$ αντίστοιχα. Οι παραπάνω ενώσεις εμφάνισαν τιμές IC_{50} $81,7 \pm 1,3\mu M$, $99,8 \pm 1,2\mu M$ και $144,8 \pm 1,3\mu M$ αντίστοιχα. Καμία από τις παραπάνω ενώσεις δεν αλληλεπιδρά με τον mPTP. Και οι 3 ενώσεις διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Οι 2 εξ' αυτών (1117,1119) είναι εκλεκτικές σε συγκέντρωση $50\mu M$, ενώ όλες οι ενώσεις εμφάνισαν τοξικότητα σε συγκεντρώσεις άνω των $50\mu M$. Τελικά οι ενώσεις 1117 και 1119 δοκιμάστηκαν *in vivo*. Και οι 2 μειώνουν στατιστικά σημαντικά την έκταση της εμφραγματικής περιοχής. Το ποσοστό της ισχαιμικής περιοχής ως προς την περιοχή σε κίνδυνο για την ομάδα της ένωσης 1119 είναι ίσο με $33,4\% \pm 4,8$ και για την ομάδα της ένωσης 1117 $34,8\% \pm 3,7$ (έναντι της ομάδας control Tween με $45,4\% \pm 3,8$). Η ένωση BTB δεν επέδειξε στατιστικά σημαντική μείωση ($39,6\% \pm 3,9$ έναντι της ομάδας control DMSO με $44,4\% \pm 3,5$), ενώ η ολιγομυκίνη επέδειξε ($28,3\% \pm 2,8$). **Συμπεράσματα:** Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν δύο νέοι μοριακοί σκελετοί και 3 νέοι αναστολείς της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης. Οι 2 από τους 3 αναστολείς και η ολιγομυκίνη κατάφεραν να μειώσουν την έκταση της εμφραγματικής περιοχής που δημιουργείται σε κατάσταση ισχαιμίας όταν χορηγηθούν 5' πριν από αυτή. Χρειάζονται περεταίρω μελέτες για τη διερεύνηση της δράσης των ενώσεων κατά την χορήγησή τους κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας καθώς και για την εξακρίβωση του ακριβή μηχανισμού δράσης.

ABSTRACT

Introduction: F1Fo ATP synthase is the mitochondrial complex responsible for ATP production. During myocardial ischemia, ATP synthase reverses its activity to hydrolyse ATP leading to cellular energetic deficit, contracture and lethal cardiomyocyte injury. Therefore, inhibition of ATP hydrolase is of major significance and the discovery of selective hydrolase inhibitors could be of particular interest in terms of cardioprotection.

Purpose: In the present study we aimed to: 1) identify and evaluate novel specific inhibitors of the hydrolytic activity of ATP synthase and investigate the infarct size limitation properties of the best candidates *in vivo* in a mouse model of ischemia reperfusion injury.

Methods: Initially, inhibitors of the hydrolytic activity of ATP synthase were identified using virtual screening methods. Docking-scoring calculations were performed targeting the three major inhibition sites of a holistic model of ATP synthase. *In silico* ligand-based virtual screening was carried out using known binders such as BMS199264. The workflow was implemented on University of Athens (UOA) in-house library of 2000 compounds, Pharnalab, plus the compounds of the National Cancer Institute (NCI) database. The best candidates were evaluated *in vitro* on isolated murine heart mitochondria to verify their inhibitory effect on ATP synthase hydrolytic activity. Moreover, their action was confirmed at a cellular level. H9C2 cells were treated with the three best candidates in the presence of rotenone and their ability to maintain membrane potential was monitored. The experiment was repeated in absence of rotenone in order to detect toxic or non-specific effects (n=5 independent experiments). For the *in vitro* experiments, oligomycin, a non-selective ATPase inhibitor and BTB06584 a selective hydrolase inhibitor were used as positive controls. Finally, 2 from 3 best candidates and the molecules BTB and oligomycin were evaluated *in vivo*. More precisely, mice were treated *iv* bolus with the molecules 5' before ischemia. After that, 30' minutes of ischemia and 2 hours of reperfusion followed, and the heart tissue was measured.

Results: Different steps of filtering through the virtual screening provided 38 molecules from Pharnalab and 15 candidates from NCI database. From the 53 candidates in total, five compounds displayed *in vitro* inhibitory activity at 200 μ M on isolated mitochondria and their IC₅₀ values were determined. Among them, three synthetic derivatives possessing a central pyrazolopyridine core displayed the best IC₅₀ values (81.7 $\pm$ 1.3 μ M, 99.8 $\pm$ 1.2 μ M, 144.8 $\pm$ 1.3 μ M) and were evaluated on the H9C2 cells (molecule codes: 1117, 1119 and 1124). They exhibited significant inhibitory activity at 50 μ M (p<0.01 compared to vehicle) while the

BTB06584 inhibitor was inactive at the same concentration and two of them were selective. Finally, the 2 candidates which were evaluated *in vivo* (1117 and 1119) and the molecule oligomycin proved that they can significantly decrease the infarct size ($33,4\% \pm 4,8$, $34,8\% \pm 3,7$ and $28,3\% \pm 2,8$ respectively), in compare with the control values ($45,4\% \pm 3,8$ for the Tween control group (compare with 1117 and 1119) and $44,4\% \pm 3,5$ for the DMSO control group (compare with oligomycin)). On the other hand, the molecule BTB failed to prove a significant decrease ($39,6\% \pm 3,9$, compared to the DMSO control group).

Conclusion: 2 novel scaffolds and 2 novel agents were discovered that act as selective inhibitors of ATP hydrolase and decrease *in vivo* the infarct size against myocardial ischemia.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εν πρώτοις θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Ανδρεάδου Ιωάννα τόσο για την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος θέματος και την ευκαιρία που μου παρείχε να ασχοληθώ με αυτό το τόσο ενδιαφέρον τομέα του επιστητού, την φαρμακολογία, όσο και για τις πολύτιμες και καίριες συμβουλές της, την καθοδήγησή της και τη γενικότερη αρωγή της για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Χάρη στις γνώσεις της και τις υποδείξεις της, πραγματοποιήθηκε αυτή η ενδιαφέρουσα ερευνητική προσπάθεια. Επίσης, ευχαριστώ την τριμελή επιτροπή για τις εποικοδομητικές διορθώσεις τους καθώς και τον χρόνο που διέθεσαν στην παρούσα εργασία.

Κατόπιν οφείλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές Μαράκο Παναγιώτη, Πουλή Νικολαΐς και Λουγιάκη Νικόλαο, για την έγκαιρη παροχή των ποσοτήτων των μορίων που απαιτήθηκαν για την εργασία αυτή.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μικρό Εμμανουήλ και το εργαστήριο μοριακών προσομοιώσεων του τμήματος φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ για την πολύτιμη αρωγή τους στο κομμάτι της αξιολόγησης και επιλογής των μορίων και των λοιπών *in silico* μελετών αλλά και για την γενικότερη συνεισφορά τους.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον τομέα φαρμακογνωσίας και χημείας φυσικών προϊόντων του τμήματος φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ για την γενικότερη βοήθεια που παρείχαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Παναγιώτα Ευσταθία Νικολάου, χάρη στην υπομονή, την επιμονή, την συστηματική επικοινωνία και το πείσμα της οποίας κατέστη δυνατή η διεκπεραίωση του πονήματος αυτού. Την ευχαριστώ για όλα όσα μου δίδαξε αλλά και για την ηθική στήριξη που μου παρείχε τα τελευταία τρία χρόνια.

Ευχαριστώ επιπλέον τους συναδέλφους Χατζηστεφάνου Μιχαήλ και Ψαρράκου Γαρυφαλιά για τις ευχάριστες στιγμές και την ψυχολογική υποστήριξη που μου χάρισαν τα τελευταία τρία χρόνια εντός και εκτός εργαστηρίου, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την στήριξη τους.

Κλείνοντας οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους εκείνους που δεν ανήκουν στην ακαδημαϊκή κοινότητα, αλλά συνέβαλαν με τον δικό τους μοναδικό τρόπο στην περάτωση αυτής της εργασίας, τους γονείς μου, τον αδελφό μου και τους φίλους μου.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
Καρδιά: Μία βασική ανασκόπηση της δομής και της λειτουργίας της	10
Έμφραγμα του μυοκαρδίου: μία γενική ανασκόπηση	10
Συνήθεις θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	12
Επαναϊμάτωση: ένα παράδοξο φαινόμενο	12
Μοριακοί μηχανισμοί της βλάβης ισχαιμίας-επαναϊμάτωσης.....	14
Βλάβες που προκαλούνται από κύτταρα πλην των καρδιομυοκυττάρων	14
Βλάβες που υφίστανται τα καρδιομυοκύτταρα από την ανισορροπία ιόντων.....	15
Μεταβολή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας.....	17
Η δομή του mPTP	18
Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών O ₂ στην βλάβη της ισχαιμίας/επαναϊμάτωσης.....	19
Μιτοχόνδριο: το ενεργειακό κέντρο του κυττάρου	21
Αναπνευστική αλυσίδα	22
FoF1 ATP συνθάση ή σύμπλοκο V της αναπνευστικής αλυσίδας.....	24
Α. Δομή	24
Β. Περιστροφική κατάλυση: ο μηχανισμός λειτουργίας της ATP συνθάσης.....	25
Γ. Έμφραγμα του μυοκαρδίου: η περιστροφική κατάλυση αναστρέφεται.....	27
IF1: Ο ενδογενής αναστολέας της FoF1 ATP συνθάσης.....	28
Θέσεις πρόσδεσης αναστολέων της ATP συνθάσης και μη εκλεκτικοί αναστολείς αυτής	30
Εκλεκτικοί αναστολείς της ATP συνθάσης: οι ενώσεις BMS199264 και BTB 06584	31
Άλλες ενώσεις με ανασταλτικές ιδιότητες επί της ATP συνθάσης	32
Η προετοιμασία του μυοκαρδίου ως μέσο προστασίας αυτού	32
Η ATP συνθάση ως πιθανός καρδιοπροστατευτικός στόχος	34
Σκοπός της εργασίας	35
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	36
Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυοκαρδιακό ιστό.....	36
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	36

Μέθοδος <i>in vitro</i> αξιολόγησης αναστολέων της ATP συνθάσης.....	38
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	40
Μέθοδος <i>in vitro</i> απόδοσης IC ₅₀ των αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης.....	40
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	41
Τεχνική αξιολόγησης της μιτοχονδριακής συγκράτησης ασβεστίου (Calcium Retention Capacity).....	41
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	43
Προσδιορισμός μεταβολής δυναμικού μεμβράνης σε H9C2 κύτταρα, με τη χρήση χρωστικής τετραμεθυλοροδαμίνης (TMRM).	43
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	45
Διαχείριση πειραματοζώων.....	46
<i>In vivo</i> πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μυών.....	46
Χειρουργική διαδικασία.....	46
Λήψη και κατεργασία του ιστού και περεταίρω επεξεργασία.....	46
Πειραματικό πρωτόκολλο.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
Αξιολόγηση και επιλογή των ενώσεων.....	50
Προσδιορισμός της τιμής IC ₅₀	53
Αξιολόγηση της πιθανής δράσης των ενώσεων επί του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mPTP).....	55
Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής, της εκλεκτικότητας, της τοξικότητας και της ικανότητας διάβασης των κυτταρικών μεμβρανών από τους αναστολείς με την τεχνική TMRM.	58
Προσδιορισμός της επίδρασης των 3 ενώσεων ως προς την ικανότητα αύξησης του χρόνου επιβίωσης καρδιομυοκυττάρων.....	62
Προσδιορισμός της επίδρασης των 2 καλύτερων ενώσεων στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε <i>in vivo</i> πειράματα σε μύες.....	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
Αξιολόγηση των ενώσεων της χημειοθήκης pharmlab.....	65
Έλεγχος της πιθανής επίδρασης των επιλεχθέντων αναστολέων στον mPTP.....	66
Αξιολόγηση των αναστολέων με την τεχνική TMRM.....	67
Αξιολόγηση της επίδρασης των 3 ενώσεων ως προς την ικανότητα αύξησης του χρόνου επιβίωσης καρδιομυοκυττάρων.....	67
Αξιολόγηση της επίδρασης των δύο καλύτερων ενώσεων στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε <i>in vivo</i> πειραματικό μοντέλο μυών.....	68

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	74

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καρδιά: Μία βασική ανασκόπηση της δομής και της λειτουργίας της

Η καρδιά είναι ένα κοίλο μυϊκό όργανο που βρίσκεται στη κάτω μοίρα του μέσου μεσοθωρακίου, πάνω από το διάφραγμα και πίσω από το στέρνο. Περιβάλλεται από έναν ινώδη σάκο, το περικάρδιο, μεταξύ του οποίου και της καρδιάς υπάρχει ένα ορώδες υγρό το οποίο βοηθά στη λίπανση κατά την κίνηση της τελευταίας, όταν αυτή πάλλεται για την προώθηση του αίματος στο υπόλοιπο σώμα. Αποτελείται κυρίως από μυϊκά κύτταρα, τα καρδιομυοκύτταρα, αλλά και από άλλα κύτταρα όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επαλείφουν τις κοιλότητες της καρδιάς (Drake et al., 2007; Vander et al., 2011). Οι ιστοί της καρδιάς συμπεριλαμβανομένου και του μυοκαρδίου, αιματώνονται από τις δύο στεφανιαίες αρτηρίες, οι οποίες εκφύονται από το αρχικό τμήμα της ανιούσας αορτής, την δεξιά στεφανιαία αρτηρία, η οποία διχάζεται στην οπισθοπλάγια αρτηρία και τον οπίσθιο κατιόντα κλάδο και την αριστερή στεφανιαία αρτηρία που διαιρείται στην περισπωμένη αρτηρία και τον πρόσθιο κατιόντα κλάδο (ο οποίος είναι ο σημαντικότερος των στεφανιαίων αγγείων, καθώς από αυτόν διέρχεται το 50% του αίματος που χρειάζεται η αριστερή κοιλία) και από τους κλάδους αυτών (Drake et al., 2007).

Εξαιτίας της διαρκούς λειτουργίας της καρδιάς ως αντλία, τα κύτταρα που την απαρτιώνουν (και ειδικά τα καρδιομυοκύτταρα) έχουν πολύ μεγάλες ανάγκες σε ενέργεια και ως εκ τούτου σε οξυγόνο. Η καρδιά η οποία βρίσκεται σε ηρεμία καταναλώνει περίπου 9ml/100g/min O₂ ενώ μόνο το μυοκάρδιο καταναλώνει 2ml/100g/min O₂ (περισσότερο από το 1/5 του συνολικού όγκου O₂ που καταναλώνει η καρδιά). Όταν δε, οι ανάγκες του οργανισμού σε O₂ μεγαλώνουν (π.χ. κατά την άσκηση) οι τιμές αυτές υπερπολλαπλασιάζονται (Barrett et al., 2011). Επομένως γίνεται εύκολα καταληπτό ότι, αν η στεφανιαία αιματική ροή παρεμποδιστεί (π.χ. από έναν θρόμβο) για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο καρδιακός ιστός θα βρεθεί σύντομα σε ένδεια οξυγόνου, γεγονός που θα οδηγήσει σύντομα στη νέκρωσή του.

Έμφραγμα του μυοκαρδίου: μία γενική ανασκόπηση

Τα οξεία στεφανιαία σύνδρομα, είναι κλινικά επείγουσες καταστάσεις, οι οποίες οφείλονται σε οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου και χρήζουν άμεσης ιατρικής παρέμβασης. Σε αυτά περιλαμβάνονται:

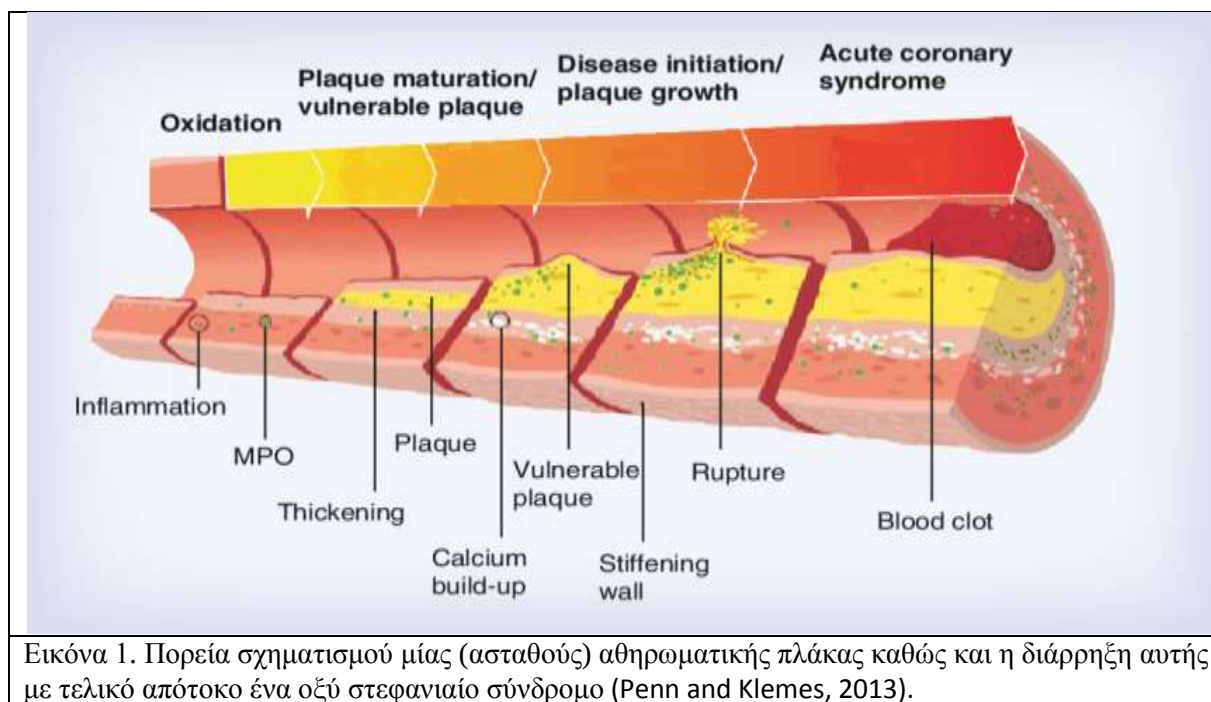
- Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος
- Η ασταθής στηθάγχη
- Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος (NSTEMI)
- Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος (STEMI)

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου θεωρείται η πρώτη αιτία θανάτου στις ηλικίες 40 ως 82 ετών τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Ως οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) ορίζεται η αιφνίδια θρόμβωση και απόφραξη του αυλού της στεφανιαίας αρτηρίας, η οποία προκαλεί νέκρωση της περιοχής του μυοκαρδίου την οποία αρδεύει.

Όταν το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εμφανίζει ανύψωση του ST διαστήματος, αυτό είναι ενδεικτικό του γεγονότος ότι έχει λάβει χώρα μία εκτεταμένη νέκρωση όλων των στιβάδων του μυοκαρδίου (διατοιχωματικό έμφραγμα), ενώ απουσία ανύψωσης του ST διαστήματος καταδεικνύει εν μέρει μόνο απόφραξη του αυλού της αρτηρίας και έτσι η νέκρωση περιορίζεται στην υπενδοκάρδια περιοχή του μυοκαρδίου (μη διατοιχωματικό έμφραγμα) (Drake et al., 2007).

Το συνηθέστερο αίτιο ενός οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και ειδικά του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι η ρήξη μίας αθηρωματικής πλάκας (σπανιότερα η διάβρωση του ενδοθηλίου της) η οποία έχει δημιουργηθεί στα στεφανιαία αγγεία, εξ' αιτίας της εναπόθεσης χοληστερόλης και της επακόλουθης δημιουργίας αφρωδών κυττάρων, καθώς και ο συνεπαγόμενος τραυματισμός του ενδοθηλίου. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί μία αλληλουχία αντιδράσεων διαφόρων κυττάρων (με κύρια τα αιμοπετάλια) και ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης, με τελικό απότοκο τη δημιουργία θρόμβου, ο οποίος αποφράσει το αγγείο στο οποίο δημιουργήθηκε (εικόνα 1). Όσο κεντρικότερα εμφανίζεται δε η νέκρωση στο στεφανιαίο αγγειακό δίκτυο, τόσο πιο εκτεταμένη θα είναι η υποξική περιοχή και η παρελκόμενη βλάβη και άρα χειρότερη η πρόγνωση του ασθενούς (Vander et al., 2011).



Εικόνα 1. Πορεία σχηματισμού μίας (ασταθούς) αθηρωματικής πλάκας καθώς και η διάρρηξη αυτής με τελικό απότοκο ένα οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (Penn and Klemes, 2013).

Συνήθεις θεραπευτικές προσεγγίσεις

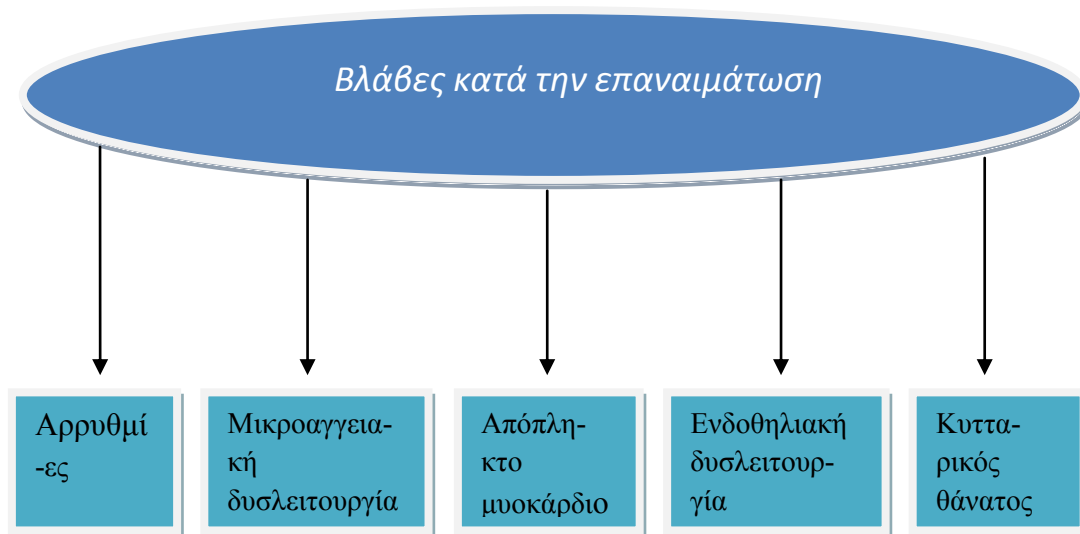
Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου θεωρείται επείγον περιστατικό και απαιτείται άμεση διακομιδή του πάσχοντος στο νοσοκομείο. Ο κύριος θεραπευτικός στόχος είναι η όσο το δυνατό ταχύτερη απόφραξη της έμφρακτης στεφανιαίας αρτηρίας ώστε να ακολουθήσει η επαναιμάτωση της μέχρι τότε υποξικής περιοχής και η διάσωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου μέρους του μυοκαρδιακού ιστού. Για την επίτευξη της επαναιμάτωσης χρησιμοποιούνται κυρίως χειρουργικές τεχνικές όπως η διαδερμική στεφανιαία αγγειοπλαστική (PTCA), η αορτοστεφανιαία παράκαμψη (CABG) κ.α. Επικουρικά γίνεται χρήση φαρμάκων τα οποία διαλύουν τους θρόμβους (θρομβολυτικά), εμποδίζουν την περεταίρω δημιουργία θρόμβου (π.χ. ασπιρίνη) ή αποτρέπουν περεταίρω βλάβες και διάφορες μετεγχειρητικές επιπλοκές (αντιπηκτική αγωγή, β αδρενεργικοί αναστολείς, νιτρώδη κ.α.).

Επαναιμάτωση: ένα παράδοξο φαινόμενο

Όπως φάνηκε και από τα ανωτέρω, η απόφραξη του πάσχοντος στεφανιαίου αγγείου και η επακόλουθη επαναιμάτωση αποτελεί το κύριο στόχο της θεραπείας ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παραδόξως όμως, η απότομη αποκατάσταση της αιματικής ροής και η επανοξυγόνωση του υποξικού τμήματος του μυοκαρδίου, προκαλεί συνήθως πλήθος παθοφυσιολογικών καταστάσεων, οι οποίες καλούνται συλλήβδην βλάβη κατά την επαναιμάτωση (Eltzschig and Eckle, 2011). Οι βλάβες αυτές (εικόνα 2) συνεισφέρουν τόσο στη επιδείνωση του υποξικού καρδιακού ιστού και στην επέκταση της νεκρωτικής βλάβης αλλά

και στην εγκαθίδρυση βλαβών στα στεφανιαία αγγεία. Συνοπτικά, οι βλάβες που λαμβάνουν χώρα κατά τη φάση αυτή είναι οι κάτωθι:

- Αρρυθμίες κατά την επαναιμάτωση, με κυριότερους εκπροσώπους την κοιλιακή μαρμαρυγή και την ιδιοκοιλιακή ταχυαρρυθμία οι οποίες συχνά οδηγούν σε αιφνίδιο καρδιακό θάνατο.
- Απόπληκτο μυοκάρδιο, μία παθολογική κατάσταση η οποία αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη της βλάβης κατά την επαναιμάτωση. Παρατηρείται μία διαρκής και ανθεκτική μεταϊσχαιμική μηχανική (συστολική ή και διαστολική) καρδιακή δυσλειτουργία, η οποία παρατηρείται απουσία μη αναστρέψιμης βλάβης (συμπεριλαμβανομένης της μυοκαρδιακής νέκρωσης), στον μέχρι πρότινος ισχαιμικό ιστό, και η οποία ανάλογα με τη διάρκειά της μπορεί να οδηγήσει σε καρδιομυοπάθειες.
- Θάνατος των καρδιομυοκυττάρων, κατάσταση η οποία αποτελεί συνέχεια της νέκρωσης κατά τη φάση της ισχαιμίας. Στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης σχετίζεται με τη εμφάνιση συστολής στα καρδιομυοκύτταρα ενώ στην πορεία συμβάλλουν και άλλοι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου όπως η νέκρωση και η απόπτωση.
- Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία των στεφανιαίων αγγείων, η οποία ορίζεται ως η υπέρμετρη απόκριση του ενδοθηλίου σε αγγειοσυσπαστικές ουσίες όπως η ενδοθηλίνη 1 και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (O_2) (ROS), η αυξημένη παραγωγή των ουσιών αυτών και η επακόλουθη αγγειοσυστολή. Λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια της επαναιμάτωσης και έχει μεγάλη διάρκεια.
- Μικροαγγειακή δυσλειτουργία η οποία δημιουργείται με τον σχηματισμό μικροεμβόλων από αιμοπετάλια, de novo θρόμβωση και τριχοειδική σύνδεση ουδετερόφιλων (τα οποία συλλογικά οδηγούν σε μικροαγγειακή παρεμπόδιση της ροής του αίματος), σε συνδυασμό με το οίδημα και το οξειδωτικό στρες. Όταν το φαινόμενο αυτό συμβεί εκτεταμένα, τότε υπάρχει περίπτωση να περιοριστεί η επαρκής αιματική ροή κατά την επαναιμάτωση, ένα φαινόμενο που καλείται φαινόμενο μη επαναροής (Moens et al., 2005).



Εικόνα 2. Οι βλάβες που λαμβάνουν χώρα κατά την φάση της επαναιμάτωσης.

Μοριακοί μηχανισμοί της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Πίσω από την σωρεία βλαβών που συνοπτικά καλούνται βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης υποκρύπτονται πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί. Αυτοί χωρίζονται πρωταρχικά σε αυτούς που επάγονται από τα μη νοσούντα κύτταρα και σε αυτούς που λαμβάνουν χώρα στα πάσχοντα κύτταρα.

Βλάβες που προκαλούνται από κύτταρα πλιν των καρδιομυοκυττάρων

Στην πρώτη κατηγορία, υπάγονται οι βλάβες που προξενούν στο πάσχον τμήμα της καρδιάς κύτταρα ή τμήματα κυττάρων όπως τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκυττάρια και τα αιμοπετάλια και η συμμετοχή των κυττάρων αυτών μπορεί να είναι και έμμεση (μέσω παραγωγής ουσιών που επιτείνουν τη βλάβη). Συγκεκριμένα, τα αιμοπετάλια κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση, ενεργοποιούνται, δρώντας τόσο άμεσα (δημιουργώντας μικρούς θρόμβους), όσο και έμμεσα (με την παραγωγή ουσιών όπως η θρομβοξάνη A2 και η σεροτονίνη οι οποίες προκαλούν επιδείνωση του γενικευμένου αγγειόσπασμου στη μικροκυκλοφορία του ισχαιμικού τμήματος του μυοκαρδίου), συμβάλλοντας καθοριστικά στην εμφάνιση μικροαγγειακής δυσλειτουργίας. Παράλληλα, αμέσως μετά την εγκαθίδρυση της επαναιμάτωσης, ακολουθεί ενεργοποίηση πολυμορφοπύρρηνων, ουδετερόφιλων, λευκοκυττάρων και συνάθροιση αυτών στην πάσχουσα περιοχή, οι οποίες οδηγούν, μέσω απελευθέρωσης ROS, προφλεγμονωδών παραγόντων και πρωτεασών, σε επέκταση της βλάβης της επαναιμάτωσης μέσω αύξησης της διήθησης της κατεστραμμένης περιοχής του μυοκαρδίου από ουδετερόφιλα. Τέλος, άλλα παραδείγματα βλαπτικών μηχανισμών για το

πάσχων τμήμα της καρδιάς που επάγονται από άλλα κύτταρα αποτελούν οι βλάβες που δημιουργούνται από τη δράση της αγγειοτασίνης 2. Η ενεργοποίηση του άξονα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης που καταλήγει στη σύνθεση και απελευθέρωση της αγγειοτασίνης 2, μέσω του παραγώγου αυτού, οδηγεί σε βλάβη της διαστολικής λειτουργίας και στεφανιαίας αγγειοσυστολής μέσω αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων συγκέντρωσης Ca^{+2} (Moens et al., 2005).

Βλάβες που υφίστανται τα καρδιομυοκύτταρα από την ανισορροπία ιόντων

Κατόπιν, εστιάζοντας στους μηχανισμούς των βλαβών που λαμβάνουν χώρα άμεσα στο βεβλαμένο τμήμα της καρδιάς και ειδικά του μυοκαρδίου, αυτοί χωρίζονται στην διαταραχή της ιοντικής ισορροπίας εντός και εκτός του κυττάρου, στη μεταβολή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και στις βλάβες που επάγονται από τις ελεύθερες ρίζες.

Αρχικά, κατά τη φάση της ισχαιμίας αλλά και της επαναιμάτωσης, έχει παρατηρηθεί ότι διαταράσσεται η δυνατότητα των καρδιομυοκυττάρων (τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ισχαιμίας) να διατηρήσουν την ομοιόσταση των συγκεντρώσεων διαφόρων ιόντων, ειδικά του ασβεστίου (Ca^{+2}), γεγονός που συνήθως έχει ως απότοκο την ενεργοποίηση διαφόρων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και τελικά τον θάνατο αυτών. Η ανισορροπία των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των ιόντων Ca^{+2} , ξεκινά ως αδυναμία διατήρησης της ομοιόστασης των ιόντων νατρίου (Na^{+}), η οποία έχοντας χαρακτήρα αλυσιδωτών αντιδράσεων καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο. Κατά τη φάση της ισχαιμίας, τα κύτταρα του μυοκαρδίου, βρίσκονται σε έλλειψη οξυγόνου. Έτσι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η διαδικασία δηλαδή παραγωγής ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σταματά, καθώς το κύτταρο αδυνατεί να παράγει ATP. Στη φάση αυτή, η αντλία $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase σταματά να λειτουργεί, καθώς η λειτουργία της απαιτεί ενέργεια, και έτσι αρχίζει να αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Na^{+} ($[\text{Na}^{+}]$) (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009a). Ένας ακόμα μηχανισμός για την αύξηση της ενδοκυττάριας $[\text{Na}^{+}]$ είναι η αυξημένη παραγωγή πρωτονίων κατά τη φάση της ισχαιμίας η οποία οδηγεί στην έξοδό τους από το κύτταρο μέσω του $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ ανταλλάκτη. Ακόμη Na^{+} εισρέει στα κύτταρα και από τους μη απενεργοποιημένους διαύλους Na^{+} . Η αθρόα αύξηση της $[\text{Na}^{+}]$ οδηγεί στη αναστροφή της λειτουργίας του $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ ανταλλάκτη με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{+2} ενδοκυτταρικά. Ταυτόχρονα δε, Ca^{+2} εισέρχονται στο κύτταρο και από τους L-τύπους διαύλων Ca^{+2} (η είσοδος Ca^{+2} στα κύτταρα, από τους L-τύπους διαύλων Ca^{+2} συμβαίνει φυσιολογικά καθώς μικρός αριθμός Ca^{+2} είναι απαραίτητα για τη μυϊκή συστολή). Στο στάδιο της επαναιμάτωσης καθώς αποκαθίσταται η αιματική ροή, παρασύρονται και απομακρύνονται λόγω αυτής από το εξωκυττάριο περιβάλλον πολλοί καταβολίτες μέσα στους οποίους ανήκουν και τα H^{+} με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία βαθμίδωση του pH

μεταξύ ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Η βαθμίδωση αυτή, πυροδοτεί στη συνέχεια την λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης της ενδοκυττάριας οξέωσης (τον Na^+/H^+ ανταλλάκτη καθώς και τον συµμεταφορέα $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$). Με αυτόν τον τρόπο η επαναιμάτωση επιδεινώνει την ιοντική ανισορροπία που υπάρχει εντός του κυττάρου και αυξάνει περαιτέρω την ήδη υπεραυξηµένη $[\text{Na}^+]$ η οποία µε τη σειρά της θα υπερπολλαπλασιάσει την ήδη εκτός ελέγχου αύξηση των Ca^{+2} (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009a; Turer and Hill, 2010). Ακόµα, η µη επαρκή πρόσληψη Ca^{+2} από το σαρκοπλασµατικό δίκτυο λόγω απενεργοποίησης της SERCA (σαρκο/ενδοπλασµατικού δικτύου Ca -εξαρτώµενη ATPase) -η ενεργοποίηση της οποίας απαιτεί ATP- ενισχύει την αύξηση της συγκέντρωσης των Ca^{+2} στο κυτοσόλιο (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009a). Η αθρόα εισροή Ca^{+2} οδηγεί σε περεταίρω µείωση της ATP, μυοϊνική υπευσταλτικότητα, απόπληκτο μυοκάρδιο (Turer and Hill, 2010) και τέλος στον κυτταρικό θάνατο µέσω πολλών µηχανισµών :

- Ενεργοποίηση των καλπαϊνών (Murphy and Steenbergen, 2008). Οι καλπαΐνες είναι Ca -εξαρτώµενα πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες) οι οποίες φαίνεται να διαδραµατίζουν σηµαντικό ρόλο στον καρδιοµυϊκό θάνατο (Eltzschig and Eckle, 2011; Murphy and Steenbergen, 2008). Πέραν της πρωτεόλυσης την οποία επάγουν και την πιθανή ρήξη της κυτταρικής µεµβράνης, ενεργοποιούν τον προαποπτωτικό παράγοντα BID (αγωνιστής θανάτου της BH3 αλληλεπιδρώσας επικράτειας) και διασπούν την πρωτεΐνη Atg5 (σχετιζόµενη µε την αυτοφαγία πρωτεΐνη 5). Η διανοιγµένη Atg5 μετατοπίζεται στα µιτοχόνδρια, όπου και φαίνεται να συνδέεται µε την Bcl-2, µία αντιαποπτωτική πρωτεΐνη µεταβάλλοντας τη λειτουργία της (Murphy and Steenbergen, 2008).
- Παλινδρόµηση των ενδοκυττάρων Ca^{+2} . Με την επαναιµάτωση και την έναρξη παραγωγής ATP, επανενεργοποιείται και η SERCA η οποία µεταφέρει κυτοσολικά ιόντα Ca^{+2} στο σαρκοπλασµατικό δίκτυο. Όµως το τελευταίο είναι ήδη υπερφορτωµένο µε Ca^{+2} από τη φάση της ισχαιµίας µε αποτέλεσµα Ca^{+2} εξέρχονται από το σαρκοπλασµατικό δίκτυο προς το κυτοσόλιο µέσω των υποδοχέων ρυανοδίνης. Κατόπιν επαναλαµβάνεται η πρόσληψή τους από τη SERCA µε αποτέλεσµα τη δηµιουργία µίας ταχείας "ταλάντωσης" των Ca^{+2} εντός του κυττάρου η οποία δηµιουργεί µία µηχανική δύναµη που ορισµένες φορές υπερβαίνει την ελαστική ικανότητα των σαρκοµερών (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009b).
- Αρρυθµίες. Η διαταραχή της οµοιόστασης των Ca^{+2} µπορεί να πυροδοτήσει θανατηφόρες αρρυθµίες οι οποίες είναι η κύρια αιτία θανάτου του πάσχοντα κατά την ισχαιµία/επαναιµάτωση. Τόσο τα υψηλά επίπεδα Ca^{+2} όσο και η ταλάντωση αυτών που προαναφέρθηκε, µπορεί να οδηγήσει σε περεταίρω µείωση της ATP και αρρυθµίες (Murphy and Steenbergen, 2008).

Μεταβολή της μιτοχονδριακής διαπερατότητας

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από τους περισσότερους μεταβολίτες και ιόντα. Κατά την φάση της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης τα ιόντα Ca^{+2} πέραν της εισροής τους στο καρδιομυοκύτταρο, εισέρχονται κατόπιν και στο μιτοχόνδριο. Αυτό πραγματοποιείται μέσω του διαύλου Ca^{+2} (ο οποίος χρησιμοποιεί το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό ($\Delta\psi$) ως πηγή ενέργειας), αλλά και μέσω αναστροφής του ιοντοανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ του μιτοχονδρίου ο οποίος αναστρέφει τη λειτουργία του και εισάγει Ca^{+2} στη μιτοχονδριακή μήτρα (Eltzschig and Eckle, 2011). Η ανεξέλεγκτη είσοδος Ca^{+2} στο μιτοχόνδριο είναι ο ένας εκ' των δύο κύριων μηχανισμών πυροδότησης της διάνοιξης ενός μεγάλου μιτοχονδριακού διαύλου ο οποίος είναι γνωστός ως μιτοχονδριακός πόρος μεταβλητής διαπερατότητας (mPTP). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η υπέρμετρη και απότομη αύξηση των ROS. Το άνοιγμα του πόρου αυτού, λαμβάνει χώρα κατά τη φάση της επαναιμάτωσης και δημιουργεί έναν διάυλο ανεξέλεγκτης μεταφοράς διαφόρων ουσιών και ιόντων από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου στο σαρκόπλασμα και το αντίστροφο (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009b; Turer and Hill, 2010). Πιο συγκεκριμένα η διάνοιξη του mPTP επιτρέπει την είσοδο και έξοδο μορίων μεγέθους κάτω από 1500 Da από και προς την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Εξ αιτίας της διαφοράς ωσμωτικής πίεσης (η μιτοχονδριακή μήτρα είναι γεμάτη πρωτεΐνες) η ωσμωτική δύναμη εισάγει υγρό εντός του μιτοχονδρίου και σταδιακά αυτό οδηγείται σε μία παθολογική διόγκωση (swelling) (Gateau-Roesch et al., 2006). Αν η διόγκωση αυτή, υπερβεί την μηχανική αντοχή της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, η τελευταία θα οδηγηθεί σε ρήξη και το μιτοχονδριακό περιεχόμενο θα απελευθερωθεί στο κυττόςόλιο (Gateau-Roesch et al., 2006; Lesnefsky et al., 2017). Αυτό συνεπάγεται απελευθέρωση διαφόρων προαποποτοτικών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα C και τον παράγοντα που επάγει την απόπτωση (AIF), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των κασπασο-εξαρτώμενων και κασπασο-ανεξάρτητων μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, οδηγώντας τελικά το κύτταρο σε απόπτωση (Lesnefsky et al., 2017).

Παράλληλα, με τη βλάβη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, διαταράσσεται και το διαμεμβρανικό δυναμικό ($\Delta\psi$) οδηγώντας το ένζυμο ATP συνθάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ATP των κυττάρων, στο να αναστρέψει τη λειτουργία του σε ATP υδρολάση- με παράλληλη άντληση H^+ από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου- και να καταναλώσει τα πολύτιμα αποθέματα ATP του κυττάρου (τα οποία αποτελούνται από τα προϋπάρχοντα αποθέματα ATP και από μικρές ποσότητες που παράγονται από αναερόβια γλυκόλυση). Η διαδικασία αυτή, αποτελεί τη μοναδική πηγή ATP σε ολική ισχαιμία, ενώ ταυτόχρονα είναι υπεύθυνη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και για την κυτταρική οξέωση (Murphy and Steenbergen, 2008) επιβαρύνοντας τη βλάβη της ισχαιμίας (Gateau-Roesch

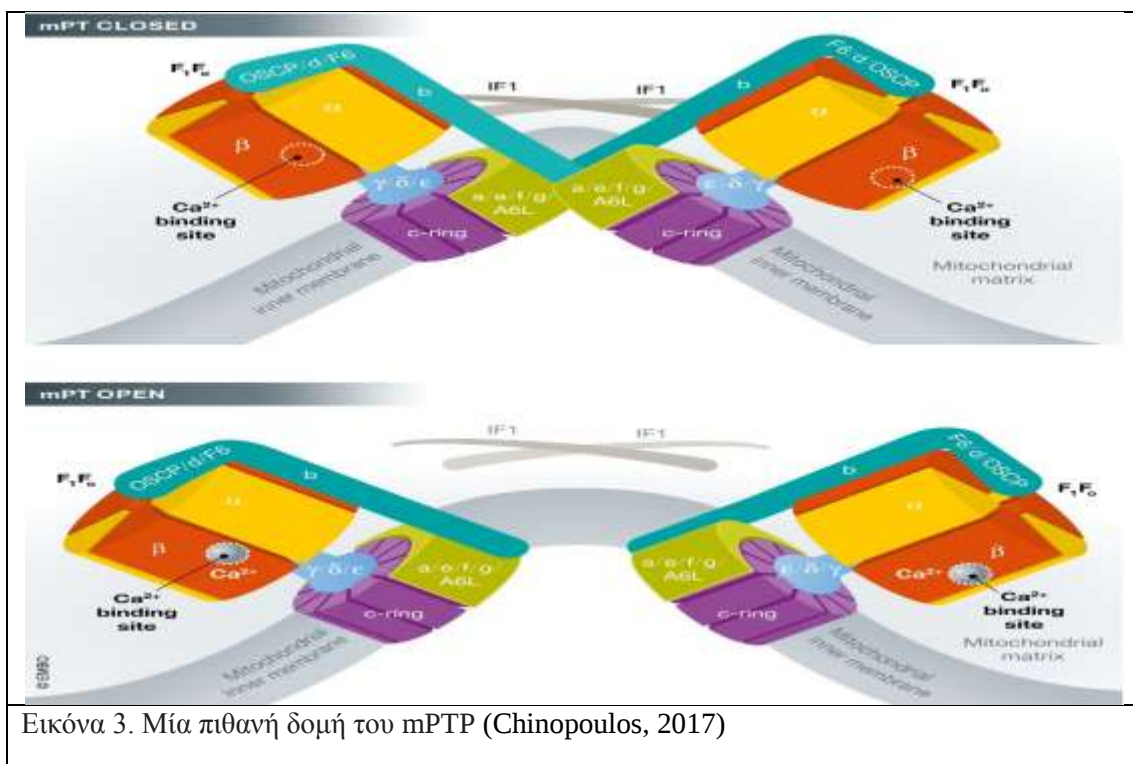
et al., 2006). Η σπατάλη αυτή της ATP, η οποία λαμβάνει χώρα από τα πρώτα στάδια της ισχαιμίας (λόγω έλλειψης O₂ και αδυναμία λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας) και φαίνεται να σχετίζεται με τη διατήρηση του καταρρέοντος πρηνούς δυναμικού (Takeda et al., 2004), αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς που επιδεινώνουν τη βλάβη της ισχαιμίας και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο κατά τη φάση αυτή.

Η δομή του mPTP

Τα τελευταία χρόνια, έχουν καταγραφεί έντονες ερευνητικές προσπάθειες για την ανεύρεση της δομής του mPTP, καθώς ο πόρος αυτός φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πληθώρα ασθενειών (έμφραγμα του μυοκαρδίου, μυϊκές δυστροφίες, νευροεκφυλιστικές νόσους και νεοπλασίες). Ορισμένες πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι μία υπομονάδα του ενζυμικού συμπλόκου ATP συνθάση είναι εν μέρει υπεύθυνη για το σχηματισμό πόρων αντίστοιχων του mPTP, ενώ κυριαρχεί η υπόθεση ότι μία ειδική αναδιαμόρφωση του ενζύμου αυτού είναι αυτή που σχηματίζει τον μιτοχονδριακό PTP (Giorgio et al., 2018; Neginskaya et al., 2019). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η C υπομονάδα αποτελεί δομική υπομονάδα του mPTP και η απουσία της οδηγεί στη δημιουργία και λειτουργία άλλων καναλιών, μικρότερων του mPTP τα οποία αναλαμβάνουν την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης (Neginskaya et al., 2019). Μάλιστα θεωρείται ότι για να βρεθεί ο μιτοχονδριακός αυτός πόρος σε ανοικτή διαμόρφωση, είναι απαραίτητη η πρόσδεση Ca⁺² στην β υπομονάδα της ATP συνθάσης (Chinopoulos, 2017) (εικόνα 3). Άλλες υποθέσεις που εμπλέκουν την ATP συνθάση στον σχηματισμό του mPTP συνηγορούν υπέρ του σχηματισμού διμερούς του ενζύμου για τη δημιουργία του mPTP, χωρίς όμως να θεωρείται ότι η υπομονάδα c είναι το μόνο τμήμα του ενζύμου που παίρνει μέρος στο σχηματισμό του πόρου ενώ ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι το μονομερές της ATP συνθάσης σχετίζεται δομικά με τον πόρο. Υπάρχουν επίσης ορισμένες έρευνες που αναφέρονται στον σχηματισμό του ‘‘συνθασώματος’’, ενός συμπλόκου που απαρτίζεται από την ATP συνθάση και ορισμένες άλλες πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την ικανότητα διάνοιξης του mPTP μέσω της δράσης τους στην ATP συνθάση (που και στην υπόθεση αυτή θεωρείται ότι δομεί τον πόρο mPT) (Silva et al., 2018).

Όμως, τα τελευταία χρόνια, εξίσου πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι, η ATP συνθάση δεν συμμετέχει καθόλου (ούτε καν κάποιο τμήμα της) ή συμμετέχει ελάχιστα στον σχηματισμό του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (Carroll et al., 2019; Patel and Karch, 2020). Συνεπώς, αν και ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί η ακριβής δομή του mPTP, αρκετές υποθέσεις (που στηρίζονταν και σε πειραματικά δεδομένα) και καταδείκνυαν τον ρόλο της ATP συνθάσης ως δομικό λίθο του πόρου, έρχονται σε σύγκρουση με νεώτερες μελέτες.

Συνεπώς, χρειάζονται περαιτέρω πειράματα και δεδομένα για να διαπιστωθεί ο ακριβής ρόλος του ενζύμου, η συμμετοχή του ή όχι στη συγκρότηση του mPTP και σε ποιο βαθμό.

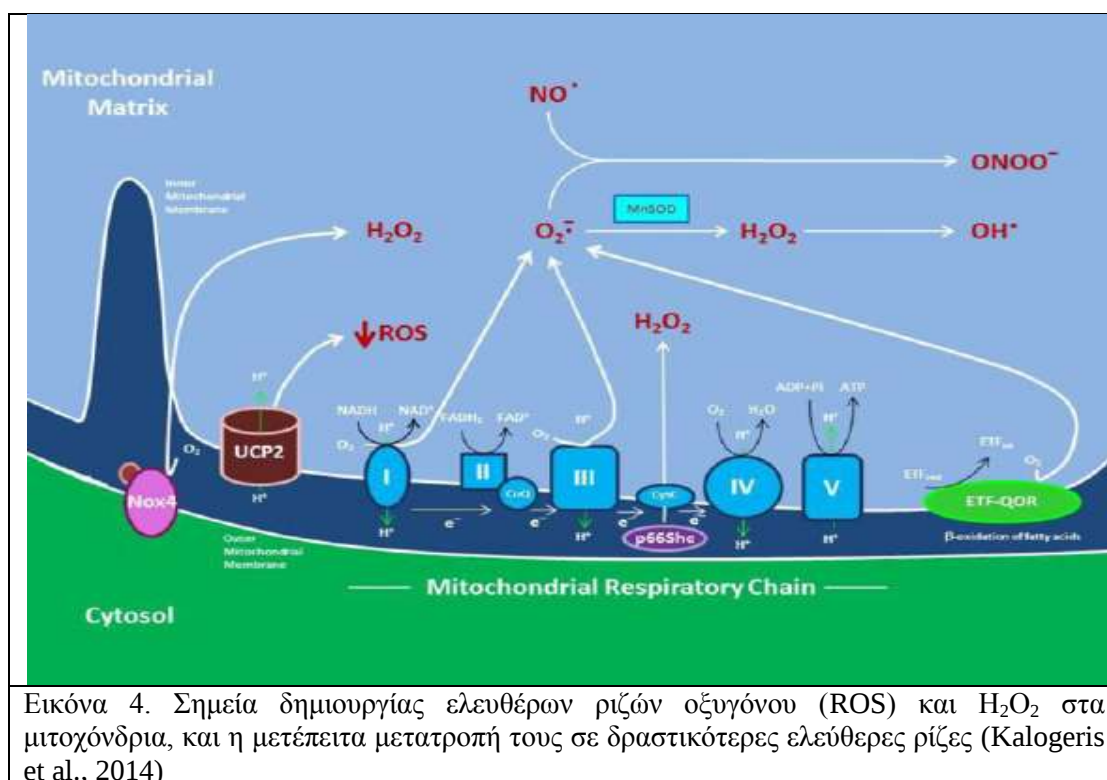


Εικόνα 3. Μία πιθανή δομή του mPTP (Chinopoulos, 2017)

Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών O₂ στην βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

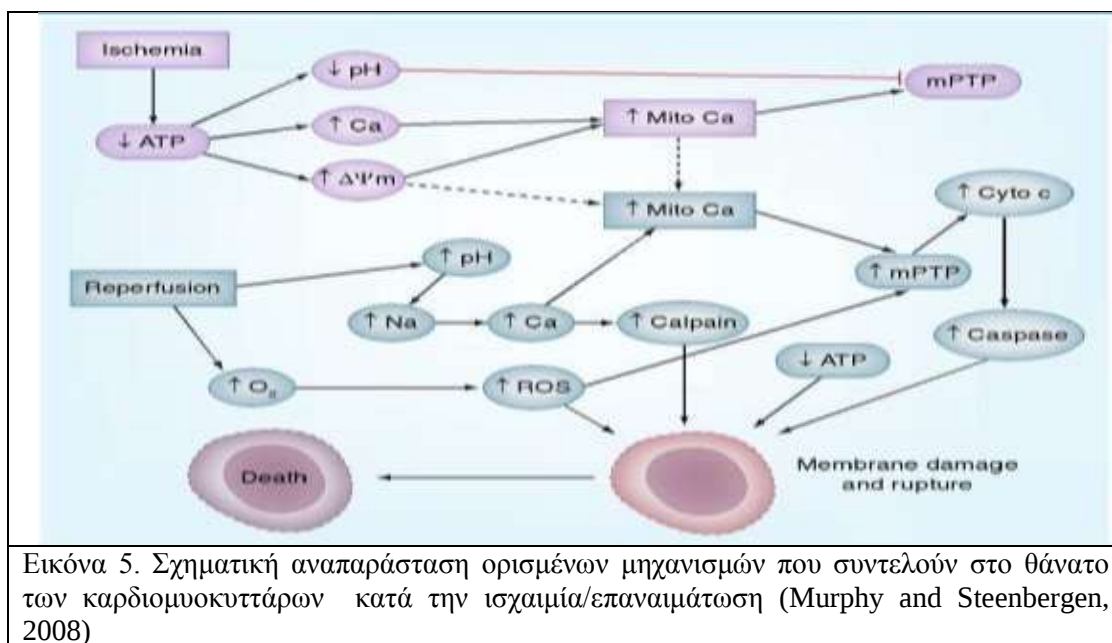
Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται τα άτομα ή μόρια εκείνα τα οποία μπορούν να υπάρξουν, ως ξεχωριστές οντότητες, με ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στο εξώτατο τροχιακό τους. Εξ' αιτίας της ύπαρξης ενός μη συζευγμένου ηλεκτρονίου τα άτομα ή μόρια αυτά, καθίστανται ιδιαιτέρως ασταθή και δραστικά. Φυσιολογικά, μικρός αριθμός ελευθέρων ριζών, παράγεται κατά τον μεταβολισμό των κυττάρων. Όμως οι ελεύθερες αυτές ρίζες πριν προλάβουν να δημιουργήσουν κάποια βλάβη στο κύτταρο, αδρανοποιούνται από ενδογενείς μηχανισμούς (Moens et al., 2005). Αν και κατά τη φάση της ισχαιμίας υπάρχει μία μικρή παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, εν τούτοις ο ρόλος τους στη βλάβη του μυοκαρδίου παραμένει αβέβαιος. Έχει προταθεί, ότι ο μικρός αυτός αριθμός των ROS μπορεί να είναι αρκετός για να δημιουργήσει βλάβες στην αναπνευστική αλυσίδα η οποία στη φάση της επαναιμάτωσης είναι η σημαντικότερη πηγή ROS (Murphy and Steenbergen, 2008). Στη φάση αυτή, λόγω της απότομης επιστροφής O₂ στον ισχαιμικό ιστό, λαμβάνει χώρα μία εκρηκτική αύξηση των ROS (Kalogeris et al., 2014; Moens et al., 2005; Murphy and Steenbergen, 2008). Οι ROS, κυρίως υπεροξειδικά ανιόντα (O₂⁻) και υδροξυλικές ρίζες (OH[·]) (Moens et al., 2005) δημιουργούνται πρωταρχικά στα μιτοχόνδρια, ως αποτέλεσμα της βλάβης της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία δημιουργεί μία ανεπαρκή μεταφορά ηλεκτρονίων και η οποία είναι

υπεύθυνη για τη δημιουργία των ROS (Murphy and Steenbergen, 2008). Η βλάβη λαμβάνει χώρα στα συμπλέγματα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας όπου και αρχικά παράγονται ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου (Kalogeris et al., 2014; Murphy and Steenbergen, 2008; Neginskaya et al., 2019). Στην πορεία, είτε μέσω αυθόρμητης διάσπασης, είτε μέσω της επίδρασης της μαγγάνιο-υπεροξειδικής δεσμουτάσης (MnSOD), οι ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου θα δημιουργήσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Τα μόρια H_2O_2 μπορούν να μετατραπούν παρουσία μεταλλοϊόντων (π.χ. του ελεύθερου σιδήρου) σε υδροξυλικές ρίζες ($OH^\cdot$), ή αλληλεπιδρώντας με το NO (που αρχίζει να παράγεται εκ νέου στο ενδοθήλιο των αγγείων κατά την επαναιμάτωση) σε υπεροξυνιτρώδη ανιόντα ($ONOO^\cdot$), τα οποία είναι σε θέση να δημιουργήσουν μεγαλύτερες βλάβες σε κυτταρικό επίπεδο από τα μόρια H_2O_2 . Άλλα ένζυμα υπεύθυνα για την παραγωγή ROS είναι NADPH οξειδάση 4 (Nox4) η γλυκερολ-3-φωσφατοδιυδρογενάση (G3PD), ο παράγοντας p66Shc (όλα τα παραπάνω εδράζονται στα μιτοχόνδρια) (Kalogeris et al., 2014), η οξειδάση της ξανθίνης (Turer and Hill, 2010) ενώ και η β οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς και ο μιτοχονδριακός μεταφορέας (UCP2) συνεισφέρουν στον σχηματισμό των ROS (εικόνα 4).



Οι ελεύθερες ρίζες, λόγω της μεγάλης τους δραστηριότητας, μπορούν να δημιουργήσουν σωρεία παθολογικών καταστάσεων. Τα μιτοχόνδρια, εκτός από τόπος παραγωγής αυτών, είναι και ένας από τους στόχους τους, καθότι όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απότομη εμφάνιση μεγάλων αριθμών ROS είναι ένας από τους δύο πιο σημαντικούς παράγοντες που

πυροδοτούν την διάνοιξη του mPTP (γεγονός που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση, καθώς το χαμηλό pH του μιτοχονδρίου στη φάση της ισχαιμίας δεν επιτρέπει τη διάνοιξη του πόρου αυτού (Kalogeris et al., 2014)). Επίσης, μπορεί να ακολουθήσουν αποπόλωση του διαμεμβρανικού δυναμικού, καταστροφή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αδυναμία παραγωγής ATP ενώ οι ROS επιτείνουν και τις βλάβες της αναπνευστικής αλυσίδας (Lesnefsky et al., 2017). Με τους παραπάνω μηχανισμούς τα κύτταρα θα οδηγηθούν σε θάνατο, κυρίως μέσω απόπτωσης αλλά και μέσω νέκρωσης λόγω εκτεταμένων βλαβών των διάφορων βιομορίων (καθώς οι ROS μπορούν να δράσουν απ'ευθείας πάνω σε κάποιο βιομόριο και να το καταστρέψουν μέσω δημιουργίας χημικών δεσμών με αυτό που οδηγεί σε απώλεια φυσιολογικής δομής και λειτουργικότητας, π.χ. τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών). Ταυτόχρονα με τη δράση των ROS έχουν συσχετιστεί πλήθος παθολογικών εκδηλώσεων, όπως καρδιακή ίνωση, αναδιαμόρφωση και υπερτροφία, διακοπή σύζευξης διέγερσης-συστολής του καρδιακού μυός, γένεση αρρυθμιών και απόπληκτο μυοκάρδιο (Kalogeris et al., 2014). Όμως αξίζει να αναφερθεί, ότι οι ROS σε μικρά επίπεδα μπορούν να ενεργήσουν θετικά είτε επάγοντας μονοπάτια καρδιοπροστασίας (Murphy and Steenbergen, 2008), είτε ενεργοποιώντας κυτταρικά μονοπάτια επιβίωσης όταν η καρδιά έχει εκτεθεί σε ερεθίσματα ισχαιμικής προετοιμασίας (Kalogeris et al., 2014).



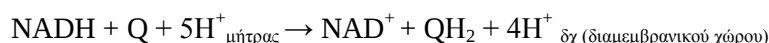
Μιτοχόνδριο: το ενεργειακό κέντρο του κυττάρου

Τα μιτοχόνδρια είναι ωοειδή ενδοκυτταρικά οργανίδια με σύνηθες μήκος 2 μm και διάμετρο 0,5μm. Το μιτοχόνδριο περιχαρακώνεται από δύο μεμβράνες, μία εξωτερική μεγάλων διαστάσεων και μία εσωτερική η οποία δημιουργεί εσωτερικές πτυχώσεις. Ο εσωτερικός πτυχωτός χώρος καλείται μήτρα του μιτοχονδρίου και οι πτυχώσεις αυτές ακρολοφίες.

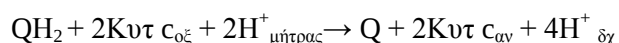
Ταυτόχρονα δημιουργείται ένας χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών που ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Μεταξύ των δύο χώρων, της μήτρας και του διαμεμβρανικού χώρου, φυσιολογικά υπάρχει διαφορά δυναμικού καθώς η μήτρα είναι φορτισμένη αρνητικά και ο διαμεμβρανικός χώρος θετικά και το δυναμικό αυτό (το οποίο συντελεί στην δημιουργία της ATP) διατηρείται εξ αιτίας της δράσης της αναπνευστικής αλυσίδας και του γεγονότος ότι η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα ιόντα. Στα μιτοχόνδρια και ειδικά στη μήτρα αυτών, πραγματοποιούνται οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων, ενώ στην εσωτερική μεμβράνη του βρίσκονται τοποθετημένα τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Έτσι στο μιτοχόνδριο συμβαίνουν σχεδόν όλες οι αντιδράσεις που έχουν σχέση με την παραγωγή ενέργειας (κυτταρική αναπνοή) και για τον λόγο αυτό καλείται ενεργειακό κέντρο του κυττάρου. Η F0F1 ATP συνθάση ή απλά ATP συνθάση, είναι το ένζυμο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ATP, το μόριο δηλαδή το οποίο χρησιμοποιούν τα κύτταρα ως ενεργειακό νόμισμα. Ονομάζεται και σύμπλοκο V της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς αποτελεί τον υπ αριθμόν 5 ένζυμο αυτής (αν και δεν προσμετρείται συνήθως σε αυτά) (J.Berg et al., 2014).

Αναπνευστική αλυσίδα

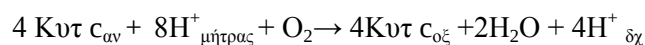
Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από 4 μεγαλοενζυμικά συστήματα και ορισμένα συνένζυμα, τα οποία έχουν αλληλοεξαρτώμενη δράση και έχουν ως στόχο την παραγωγή ενέργειας με την μορφή ATP, μέσω κατάλυσης οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και αξιοποιώντας το μοριακό οξυγόνο. Η αλυσίδα, η οποία βρίσκεται εντός της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, ξεκινά με το σύμπλοκο I ή οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, ένα ευμέγεθες ένζυμο (>900 kd) το οποίο εισάγει στην αλυσίδα τα ηλεκτρόνια των μορίων νικοτιναμιδο-αδενινο-νουκλεοτιδίων (NADH), τα οποία έχουν παραχθεί από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, καταλύοντας την παρακάτω αντίδραση:



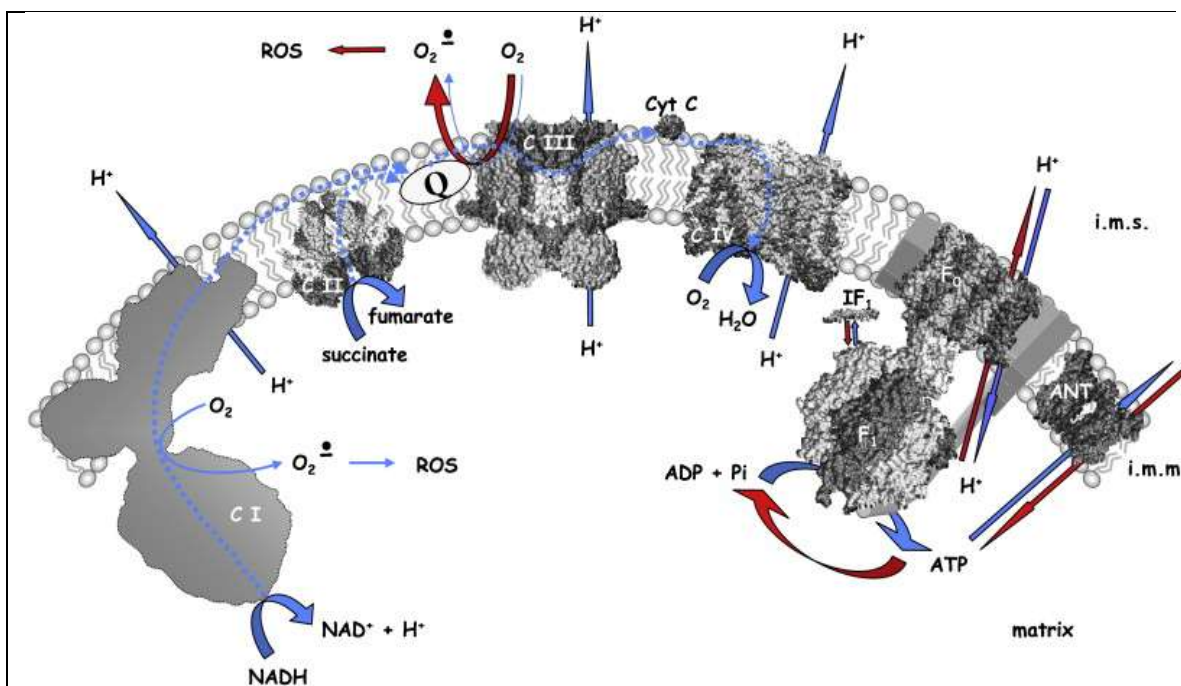
ενώ παράλληλα αντλεί πρωτόνια από τη μήτρα και τα αποδίδει στον διαμεμβρανικό χώρο. Κατόπιν τα δύο ηλεκτρόνια που αποδίδει κάθε μόριο NADH, μεταφέρονται από το σύμπλοκο I στο συνένζυμο Q (ή ουβικινόνη) οδηγώντας στον σχηματισμό του μορίου QH₂ (ή ουβικινόλη). Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο λειτουργεί και το σύμπλοκο II ή αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-QH₂ με τη διαφορά ότι αυτή εισάγει στην αλυσίδα, ηλεκτρόνια μέσω των μορίων φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FADH₂) και όχι NADH. Έπειτα το μόριο QH₂ μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που έχει αποκτήσει είτε από το I είτε από το II σύμπλοκο στο κυτόχρωμα c με την μεσολάβηση του ενζύμου οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c ή σύμπλοκο III το οποίο και καταλύει την αντίδραση:



με παράλληλη άντληση πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τέλος τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται από το κυτόχρωμα c αποδίδονται στο μοριακό O₂ μέσω του συμπλόκου IV ή οξειδάση του κυτοχρώματος c η οποία και καταλύει την αντίδραση:



(και στην αντίδραση αυτή υπάρχει η μεταφορά πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο). Στην παραπάνω αντίδραση φαίνεται παράλληλα και η σπουδαιότητα του O₂, καθώς σε αυτό αποδίδονται τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, όταν υπάρχει ροή ηλεκτρονίων από τα σύμπλοκα I, II και IV παρατηρείται ταυτόχρονη άντληση H⁺ από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Η μεταφορά αυτή είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία της διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού που υπάρχει μεταξύ της μήτρας και του διάμεσου χώρου του μιτοχονδρίου. Στη διατήρηση αυτού του πρηνούς δυναμικού συμβάλλει το γεγονός ότι η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου είναι αδιαπέραστη από H⁺. Έτσι, αν και τα πρωτόνια ωθούνται από τη διαφορά δυναμικού και συγκέντρωσης να εισέλθουν στη μήτρα, αυτό δεν είναι εφικτό από κανένα άλλο σημείο πλην του διαύλου που αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου V της αναπνευστικής αλυσίδας ή αλλιώς της ATP συνθάσης (εικόνα 6) (J.Berg et al., 2014).

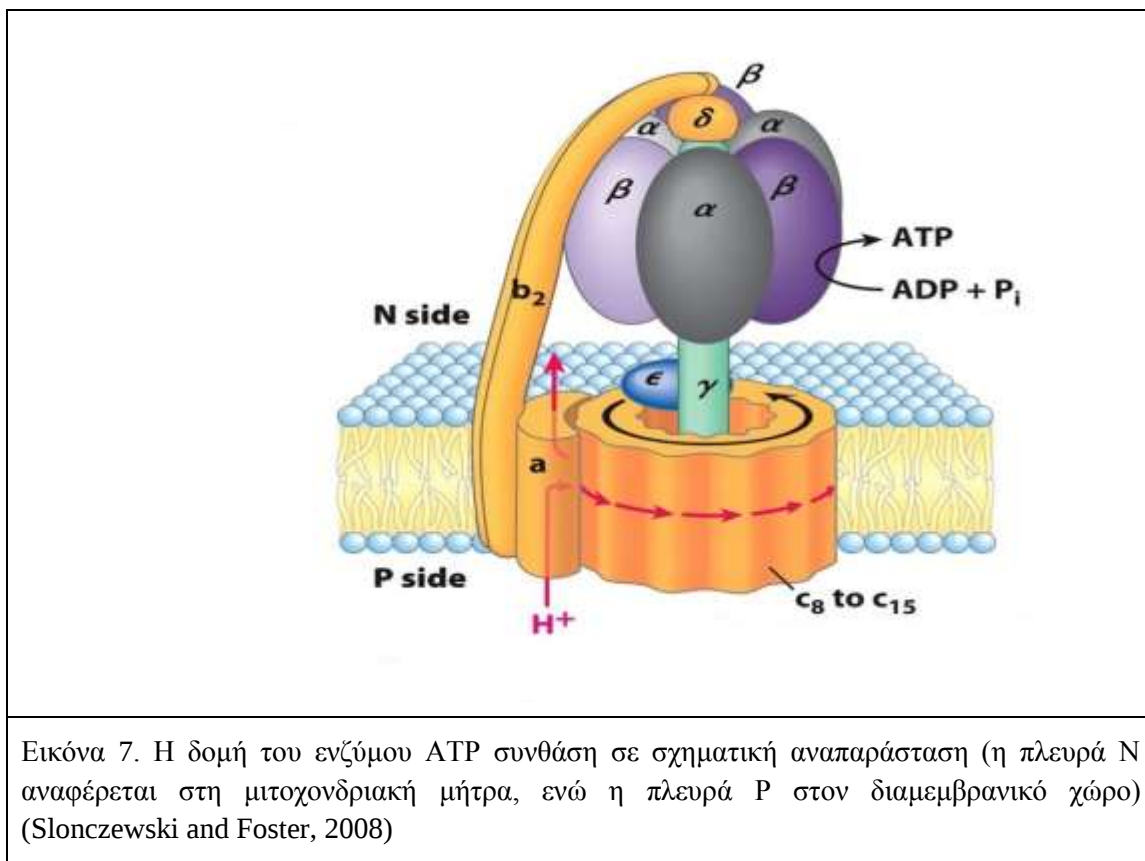


Εικόνα 6. Η αναπνευστική αλυσίδα και ο ρόλος του κάθε συμπλόκου σε αυτή (Solaini et al., 2010)

FoF1 ATP συνθάση ή σύμπλοκο V της αναπνευστικής αλυσίδας

A. Δομή

Η ATP συνθάση είναι ένα μεγάλο, πολύπλοκο, διαμεμβρανικό ένζυμο το οποίο αποτελείται από δύο βασικές υπομονάδες, την υπομονάδα Fo και την υπομονάδα F1. Η υπομονάδα Fo αποτελεί ένα υδρόφοβο τμήμα το οποίο διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελεί τον διάυλο πρωτονίων της ATP συνθάσης. Αποτελείται από οκτώ έως δεκαπέντε υπομονάδες c και μία υπομονάδα a. Οι υπομονάδες c σχηματίζουν ένα κύλινδρο ο οποίος διολισθαίνει πάνω στην υπομονάδα a (η οποία συμβάλλει και στη σύνδεση των υπομονάδων Fo και F1 του ενζύμου) καθώς μεταφέρει τα H^+ . Η υπομονάδα F1 μοιάζει σαν μία σφαίρα με διάμετρο 85 Å, η οποία προβάλλει προς τη μιτοχονδριακή μήτρα και είναι η υπεύθυνη για την καταλυτική δράση του ενζύμου. Αποτελείται από πέντε τύπος πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή υπομονάδες (τρεις α, τρεις β, γ, δ, και ε). Οι α και β είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της σφαίρας και παρόλο που και οι δύο εμφανίζουν προσδετική ικανότητα με νουκλεοτίδια, μόνο οι υπομονάδες β έχουν καταλυτικό ρόλο. Η υπομονάδα γ, η οποία βρίσκεται εντός της σφαίρας που δημιουργείται από τις α και β υπομονάδες, εξ αιτίας των 3 άνισων τμημάτων της αναιρεί τη συμμετρία της εξαμερούς σφαίρας καθώς με την κάθε διαφορετική της πλευρά, αλληλεπιδρά διαδοχικά με τις υπομονάδες β (όλες οι πλευρές της γ αλληλεπιδρούν με τις β υπομονάδες διαδοχικά) έτσι ώστε κάθε υπομονάδα β, λόγω της αλληλεπίδρασής της με τη γ, είναι κάθε στιγμή διακριτή από δύο άλλες. Οι υπομονάδες Fo και F1 συνδέονται μεταξύ τους με έναν κεντρικό μίσχο (που αποτελείται από τις αλυσίδες γ και ε) και από μία εξωτερική στήλη (η οποία αποτελείται από μια υπομονάδα a, δύο υπομονάδες b και μία υπομονάδα δ) (J.Berg et al., 2014). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι μιτοχονδριακή ATP συνθάση σχηματίζει διμερή τα οποία συναθροίζονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δημιουργώντας μακρούς γραμμικούς ή συστρεμμένους σχηματισμούς (εικόνα 7) (Blum et al., 2019).

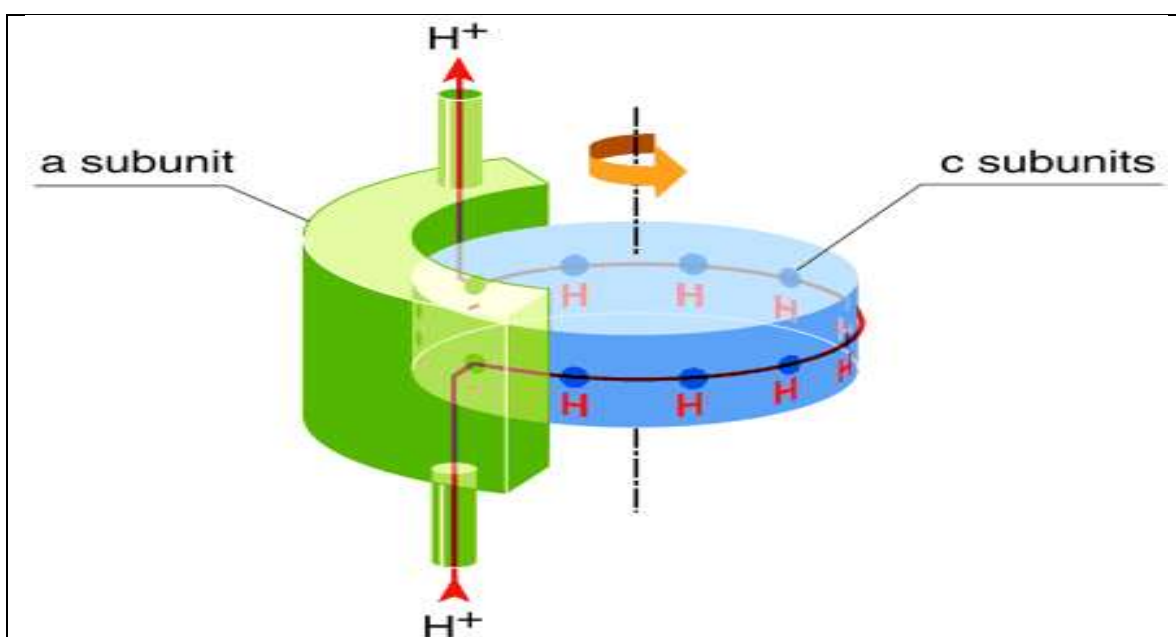


Εικόνα 7. Η δομή του ενζύμου ATP συνθάσης σε σχηματική αναπαράσταση (η πλευρά N αναφέρεται στη μιτοχονδριακή μήτρα, ενώ η πλευρά P στον διαμεμβρανικό χώρο) (Slonczewski and Foster, 2008)

B. Περιστροφική κατάλυση: ο μηχανισμός λειτουργίας της ATP συνθάσης

Το 1997 οι Paul Boyer και John Walker μοιράστηκαν το βραβείο Nobel χημείας για την ανακάλυψη του καταλυτικού μηχανισμού της ATP συνθάσης. Ο μηχανισμός για την παραγωγή ATP μέσω της πρωτονιοκινητικής δύναμης είναι η περιστροφική κίνηση και μάλιστα η ενεργή περιστροφή της υπομονάδας της Fo η οποία οδηγεί σε παθητική περιστροφή της υπομονάδας γ. Η υπομονάδα Fo, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, αποτελείται από μία υπομονάδα a και έναν κύλινδρο ο οποίος αποτελείται από υπομονάδες c. Η δομή της a φαίνεται να παρουσιάζει την ύπαρξη δύο υδρόφιλων ημιδιαύλων πρωτονίων οι οποίοι όμως δεν διαπερνούν την μεμβράνη. Έτσι λοιπόν, ανά πάσα στιγμή, κάθε ημιδιαύλος της υπομονάδας a βρίσκεται σε επαφή με μία υπομονάδα c. Ο ένας ημιδιαύλος βρίσκεται στραμμένος προς τον διαμεμβρανικό χώρο και αυτός είναι που υποδέχεται τα πρωτόνια. Καθώς το πρωτόνιο εισέρχεται σε αυτόν, αντιδρά και πρωτονιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος που βρίσκεται στην υπομονάδα c που βρίσκεται σε επαφή με τον διάυλο. Έτσι το πρωτόνιο προσδένεται στην υπομονάδα c, η οποία παύει πλέον να είναι φορτισμένη και για τον λόγο αυτό ευνοείται η περιστροφή της προς το υδρόφοβο περιβάλλον της μεμβράνης, ενώ ταυτόχρονα, η απαιτούμενη ώθηση για την κίνηση αυτή δίνεται λόγω της διαβαθμισμένης συγκέντρωσης πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης, από το περιβάλλον που είναι πλούσιο σε H^+ προς το περιβάλλον που είναι πτωχό σε H^+ . Κατά τη μετακίνηση της

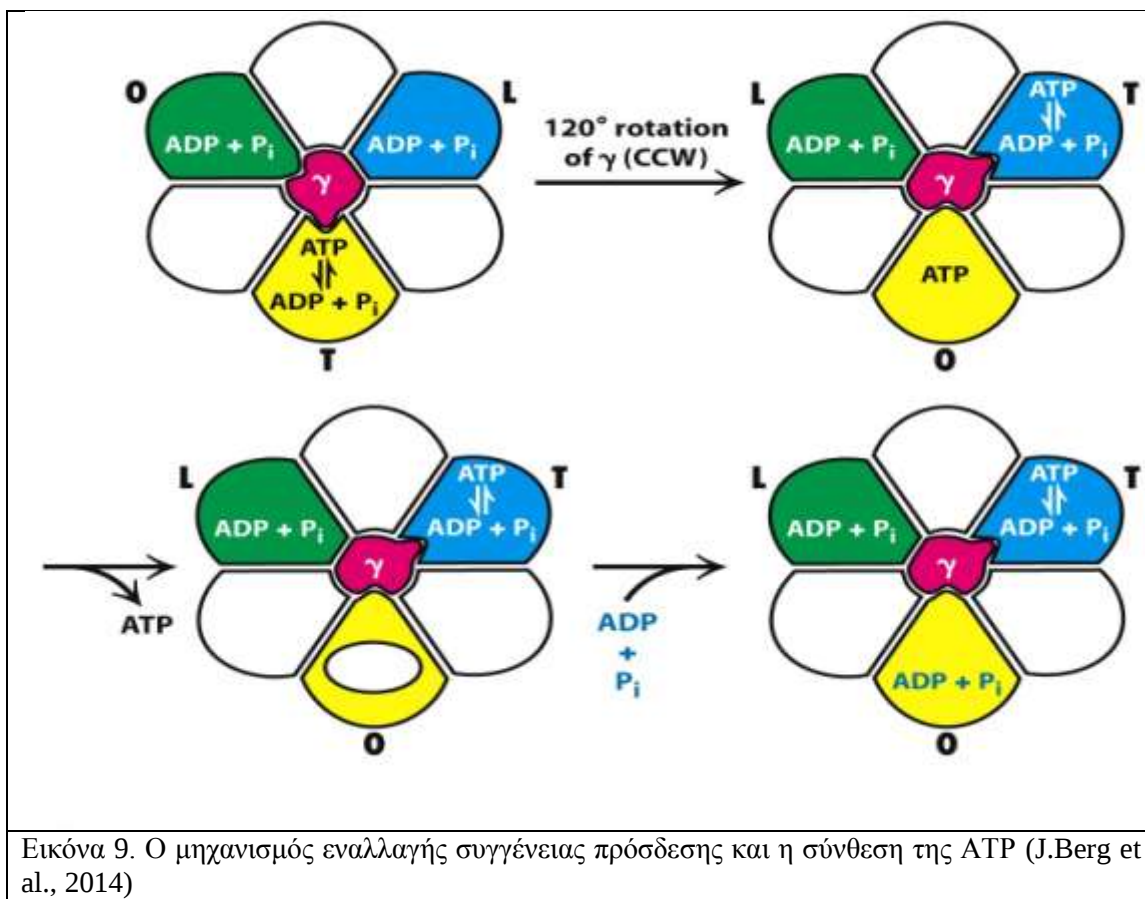
υπομονάδας c παρατηρείται ταυτόχρονη στρέψη όλων των υπομονάδων που συγκροτούν τον κύλινδρο αυτό οπότε μία νέα υπομονάδα c θα πρωτονιωθεί και κατόπιν θα στραφεί περεταίρω ο κύλινδρος. Μόλις μία πρωτονιωμένη υπομονάδα c φτάσει στον "έσω" ημιδιάυλο, ο οποίος είναι στραμμένος προς τη μήτρα του μιτοχονδρίου, τότε λόγω του ότι εκτίθεται σε περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση H^+ , το πρωτόνιο αποδεσμεύεται από το κατάλοιπο του ασπαραγινικού οξέος και μέσω του ημιδιαύλου οδηγείται εντός της μήτρας του μιτοχονδρίου. Στη συνέχεια μία νέα υπομονάδα c θα έρθει σε επαφή με τον έσω ημιδιάυλο, απελευθερώνοντας το H^+ που μεταφέρει κ.ο.κ (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Η στροφική κίνηση της υπομονάδας Fo και η μεταφορά ηλεκτρονίων από τον διαμεμβρανικό χώρο στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Walker, 2013)

Έτσι λοιπόν, η ροή ηλεκτρονίων στρέφει τον δακτύλιο της υπομονάδας Fo. Ο δακτύλιος αυτός, στρέφει την υπομονάδα γ, η οποία είναι συνδεδεμένη επάνω του, μέσα στον εξαμερή κύλινδρο της F1, ενώ η υπομονάδα δ και οι δύο αλυσίδες b, μέσω του άξονα που σχηματίζουν, κρατούν στατική την υπομονάδα F1. Η υπομονάδα γ, λόγω της ασυμμετρίας της, καθώς στρέφεται αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο, με την κάθε υπομονάδα β, οδηγώντας αυτές σε μία αλλαγή συγγένειας πρόσδεσης. Καθώς η αντίδραση που καταλύει η ATP συνθάση είναι η σύνθεση ATP από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ορθοφωσφορικό: ($ADP^{-3} + HPO_4^{-2} + H^+ \rightleftharpoons ATP^{-4} + H_2O$), η υπομονάδα γ μεταβάλλει τη συγγένεια πρόσδεσης της κάθε υπομονάδας β ως προς την ATP και την ADP αντίστοιχα, έτσι ώστε κάθε φορά η κάθε υπομονάδα β να βρίσκεται σε διαφορετική στερεοδιάταξη από κάθε άλλη και σε μία από τις ακόλουθες: στερεοδιάταξη L (χαλαρή) όπου τότε η υπομονάδα β

δεσμεύει ADP και P_i , στερεοδιάταξη T (σφικτή) όπου τότε η υπομονάδα β δημιουργεί ATP και το κρατά ισχυρά συνδεδεμένο και η στρεοδιάταξη O (ανοικτή) όπου η υπομονάδα β απελευθερώνει ATP και είναι έτοιμη να προσδέσει ADP και P_i . Με την εναλλαγή αυτών των καταστάσεων των υπομονάδων β, η υπομονάδα F1 συνθέτει ATP. Έχει μάλιστα αποδειχθεί ότι η ροή πρωτονίων αξιοποιείται από το ένζυμο όχι για να συνθέσει ATP, αλλά για να μεταβεί από την κατάσταση ισχυρής σύνδεσης στην κατάσταση χαλαρής και να το απελευθερώσει (εικόνα 9) (J.Berg et al., 2014).

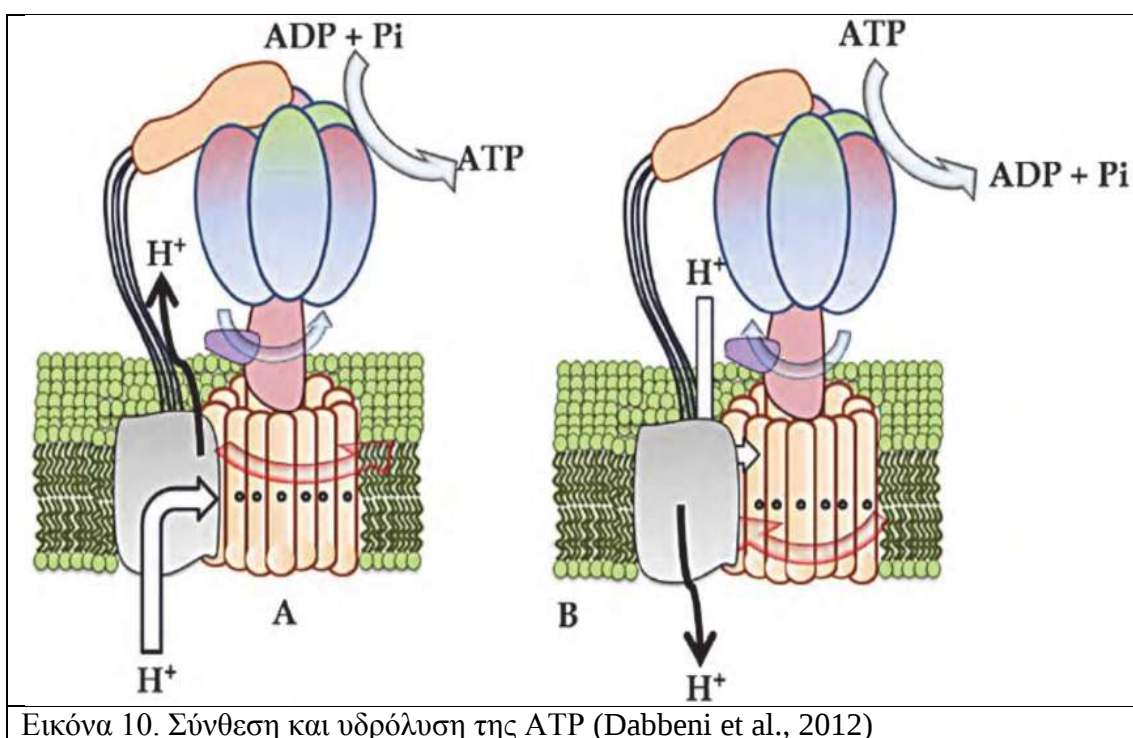


Εικόνα 9. Ο μηχανισμός εναλλαγής συγγένειας πρόσδεσης και η σύνθεση της ATP (J.Berg et al., 2014)

Γ. Έμφραγμα του μυοκαρδίου: η περιστροφική κατάλυση αναστρέφεται

Όταν η ATP συνθάση λειτουργεί φυσιολογικά και συνθέτει ATP, έχει παρατηρηθεί ότι η υπομονάδα γ και ο κύλινδρος που σχηματίζουν οι υπομονάδες c, στρέφονται αντίστροφα από τους δείκτες του ρολογιού (αριστερόστροφα). Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, όπου η ATP συνθάση μεταβάλλει τη λειτουργία της σε ATP υδρολάση, έχει αποδειχθεί ότι η μεταβολή της λειτουργίας του ενζύμου, είναι απότοκο της μεταβολής της κίνησης του κινητού μέρους της ATP συνθάσης το οποίο τότε και στρέφεται σύμφωνα με τους δείκτες του ρολογιού (δεξιόστροφα) (εικόνα 10) (Bosetti et al., 2000). Έτσι, υδρολύει ATP και εξωθεί H^+ προς τον διαμεμβρανικό χώρο προκειμένου να διατηρήσει το

πρανές δυναμικού. Συνεπώς η αποτροπή της δεξιόστροφης πορείας του άξονα γ και των υπομονάδων c , θα οδηγήσει σε αναστολή της υδρόλυσης και διατήρηση των αποθεμάτων της ATP κατά τη φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (η σπουδαιότητα των οποίων έχει καταφανεί παραπάνω). Ταυτόχρονα όμως είναι επιθυμητή η μη αναστολή της αριστερόστροφης κίνησης του κινητού μέρους του ενζύμου, η οποία λαμβάνει κυρίως χώρα κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης έτσι ώστε να είναι εφικτή η επαναλειτουργία της συνθετικής δραστηριότητας της ATP συνθάσης το συντομότερο δυνατό (εκλεκτική αναστολή) (Walker, 2013). Ωστόσο, ορισμένες πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αναστροφή της λειτουργίας του ενζύμου δεν λαμβάνει χώρα σε καταστάσεις υποξίας αλλά μόνο σε προσθήκη αντιδραστηρίων αποσύνδεξης της μιτοχονδριακής αλυσίδας (García-Aguilar and Cuezva, 2018). Συνεπώς, απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να προκύψει ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα.

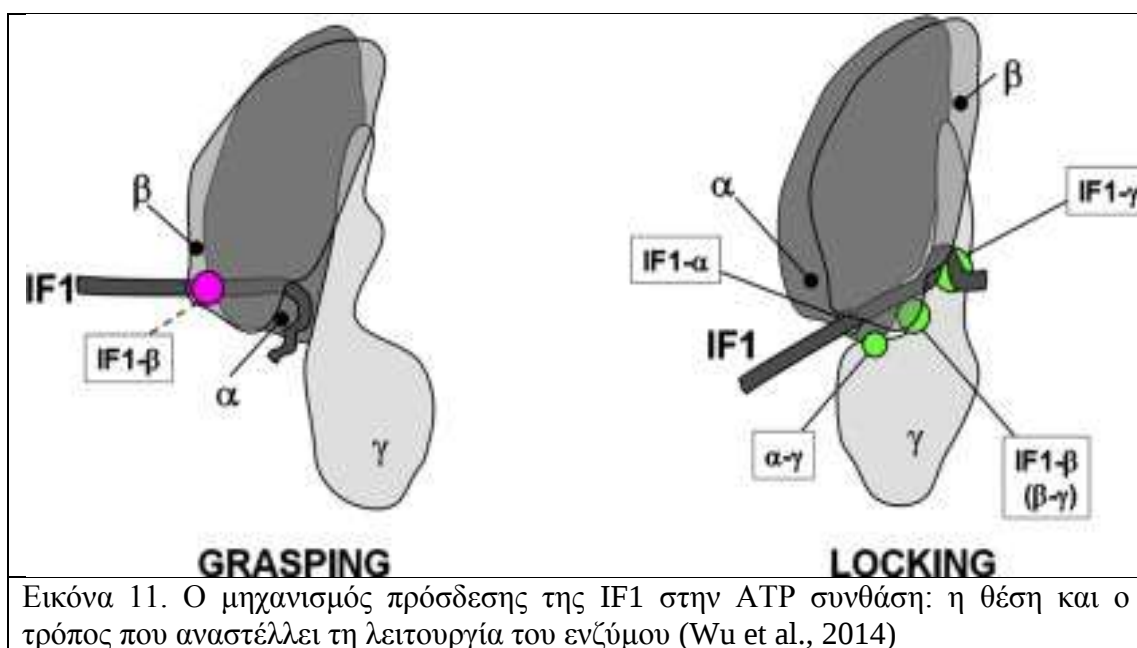


Εικόνα 10. Σύνθεση και υδρόλυση της ATP (Dabbeni et al., 2012)

IF1: Ο ενδογενής αναστολέας της FoF1 ATP συνθάσης

Η ανασταλτική πρωτεΐνη του τμήματος F1 (inhibitory factor 1, IF1) είναι ένας ενδογενής αντιστρεπτός μη συναγωνιστικός αναστολέας της ATP συνθάσης. Το μόριο αυτό, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναστολή της λειτουργίας της ATP συνθάσης σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, φαίνεται να εμφανίζει καρδιοπροστατευτικό ρόλο αφού όταν συνδεθεί με την ATP συνθάση, όταν αυτή λειτουργεί ως υδρολάση, μπορεί να αποτρέψει την άσκοπη υδρόλυση της ATP ως και 80% (Ivanov et al., 2014). Φαίνεται πως επιτελεί το ρόλο αυτό, αφού

προσδεθεί μεταξύ των υπομονάδων α και β της F1, λειτουργεί σαν μία γέφυρα που σταθεροποιεί τις υπομονάδες β και γ (όπως φάνηκε σε πειράματα με βόεια ATP συνθάση) και έτσι εμποδίζει την αλλαγή συγγένειας πρόσδεσης μεταξύ των υπομονάδων β (εικόνα 11). Αν και το μόριο αυτό δεν αναστέλλει εκλεκτικά την υδρόλυση της ATP, και παράγεται και σε φυσιολογικές συνθήκες, εν τούτοις ενεργοποιείται σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς η ενεργοποίησή του ελέγχεται από μηχανισμούς οι οποίοι μεταβάλλονται σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις (Esparza-Moltó et al., 2017). Η IF1 για να εμφανίζει δραστηριότητα, θα πρέπει να βρίσκεται στην ενεργό της κατάσταση ως ελεύθερο διμερές. Ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός ελέγχου ενεργότητας της IF1 είναι το pH του περιβάλλοντα χώρου, καθώς σε υψηλές τιμές pH (μεγαλύτερες του 6,7) δημιουργείται ένα αδρανές τετραμερές. Όταν όμως το pH μειωθεί κάτω από το 6,7 (όπως για παράδειγμα κατά το OEM), τότε το τετραμερές διασπάται σε ενεργά διμερή. Άλλοι μηχανισμοί ελέγχου είναι η φωσφορυλίωση από την PKA (το φωσφορυλιωμένο διμερές δεν είναι ενεργό), η σύνδεση με δεσμευτικές πρωτεΐνες, καθώς και πιθανές αντιδράσεις αδρανοποίησης όπως η ακετυλίωση (Esparza-Moltó et al., 2017; García-Bermúdez and Cuezva, 2016).



Εικόνα 11. Ο μηχανισμός πρόσδεσης της IF1 στην ATP συνθάση: η θέση και ο τρόπος που αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου (Wu et al., 2014)

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης IF1 και η ιδέα να ανασταλεί φαρμακολογικά η λειτουργία της ATP συνθάσης όταν αυτή υδρολύει την ATP, οδήγησε στην μελέτη πιθανών θέσεων αναστολής του ενζύμου, πέραν αυτής της πρωτεΐνης IF1, και στην ανακάλυψη μορίων τα οποία είχαν αυτή την ικανότητα. Αρχικά έκαναν την εμφάνισή τους, μόρια τα οποία ανέστελλαν μη εκλεκτικά την λειτουργία της ATP συνθάσης όπως η ολιγομυκίνη, ενώ έπειτα εμφανίστηκαν και εκλεκτικοί αναστολείς της υδρόλυσης.

Θέσεις πρόσδεσης αναστολέων της ATP συνθάσης και μη εκλεκτικοί αναστολείς αυτής

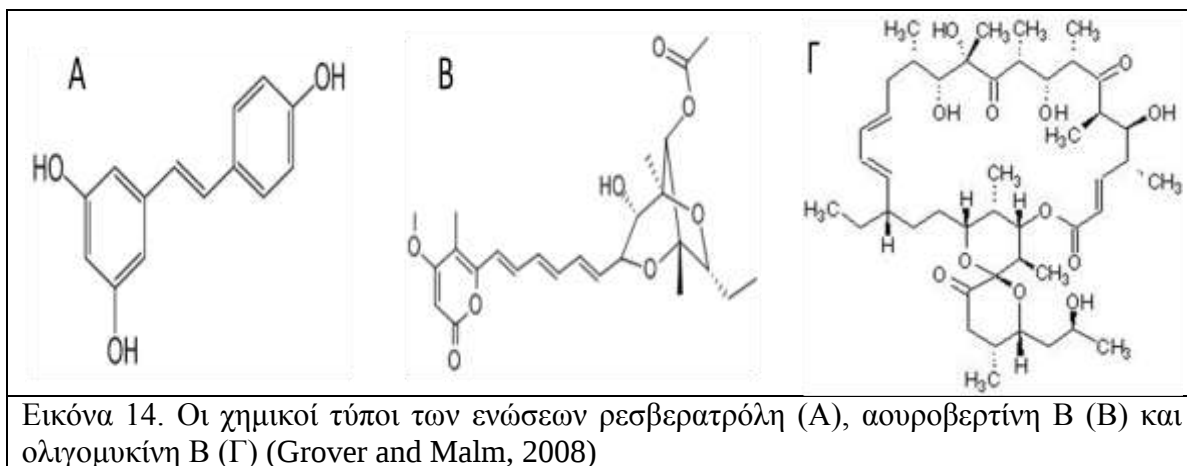
Κατόπιν κρυσταλλογραφικών και άλλων μελετών, έχουν καταδειχθεί διάφορες θέσεις πρόσδεσης αναστολέων της ATP συνθάσης (σε διάφορα ζωικά πρότυπα όπως βόεια ATP συνθάση κ.α.), από τις οποίες περισσότερο μελετημένες είναι οι εξής τρεις:

- Η θέση πρόσδεσης του ενδογενή αναστολέα IF1
- Η θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης, η οποία βρίσκεται στην υπομονάδα Fo
- Η θέση πρόσδεσης των πολυφαινολών, η οποία βρίσκεται στην υπομονάδα F1(Gledhill et al., 2007)

Η θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης IF1, όπως έχει ήδη αναφερθεί, βρίσκεται μεταξύ των υπομονάδων α και β. Η θέση πρόσδεσης της ολιγομυκίνης B, αντιθέτως, βρίσκεται πάνω στον δακτύλιο που συγκροτούν οι υπομονάδες c του τμήματος Fo, δηλαδή πάνω στις υπομονάδες αυτές.

Η ολιγομυκίνη είναι ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους στρεπτομύκητες του γένους *streptomyces diastatochromogenes* το 1954. Χημικά, ανήκει στην οικογένεια των μακρολιδών. Εκτός από αντιμυκητιασικές, έχει και ανοσοκατασταλτικές και νηματοκτόνες ιδιότητες. Η ολιγομυκίνη βρέθηκε ότι αναστέλλει την ATP συνθάση. Είναι μη εκλεκτικός αναστολέας και χρησιμοποιείται σε πολλά πειράματα ως πρότυπος αναστολέας, καθώς το μόριο αυτό επιδεικνύει ισχυρή αναστολή για το υπό μελέτη ένζυμο (Smith et al., 1954; Symersky et al., 2012).

Το αποτέλεσμα είναι να μην είναι δυνατή η πρόσδεση H^+ πάνω τους και τελικά να διακόπτεται η ροή των H^+ και η δράση του ενζύμου (Grover and Malm, 2008; Symersky et al., 2012). Η θέση πρόσδεσης των πολυφαινολών (με κυριότερους εκπροσώπους, ως προς την αναστολή του ενζύμου, την ρεσβερατρόλη και την αουροβερίνη B οι οποίοι είναι και οι δύο μη εκλεκτικοί αναστολείς της ATP συνθάσης) βρίσκεται στις υπομονάδες α και β του τμήματος F1. Η δράση τους σχετίζεται με την παρεμπόδιση της περιστροφής της υπομονάδας γ και συνεπώς του μηχανισμού εναλλαγής συγγένειας (Gledhill et al., 2007).

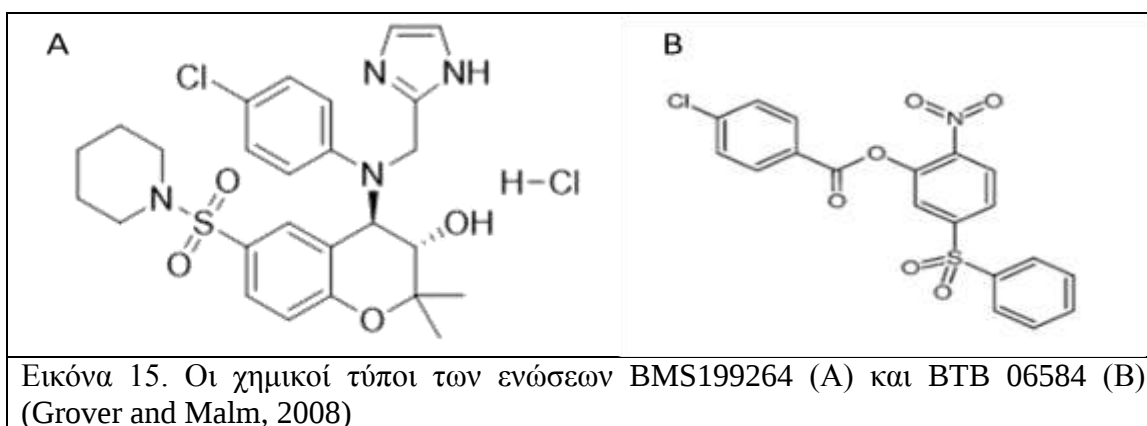


Εκλεκτικοί αναστολείς της ATP συνθάσης: οι ενώσεις BMS199264 και BTB 06584

Ενώσεις όπως η ολιγομυκίνη και οι πολυφαινόλες είναι σε θέση να ελαττώσουν τον ρυθμό υδρόλυσης της ATP κατά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, όμως επειδή αναστέλλουν και τη σύνθεσή της, αυτό μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ανάκαμψη των κυττάρων στη φάση της επαναιμάτωσης, καθώς και να προκαλεί βλάβες στα υγιή γειτονικά κύτταρα (Symersky et al., 2012). Για τους παραπάνω λόγους τα μόρια αυτά, αποτελούν μεν ένα χρήσιμο φαρμακολογικό εργαλείο, αλλά δεν θα ήταν προτιμητέα η χορήγησή τους σε ασθενείς στην κλινική πράξη. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκαν ενώσεις οι οποίες μπορούν να αναστέλλουν εκλεκτικά μόνο την υδρολυτική δράση του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζουν τη συνθετική. Δύο ενώσεις που εμφάνισαν τέτοιες ιδιότητες είναι οι BMS199264 (ή BMS) και BTB 06584 (ή BTB).

Η ένωση BMS, η οποία κατατάσσεται με βάση τον χημικό του τύπο στα βενζοπυράνια, επέδειξε καρδιοπροστατευτικό ρόλο σε απομονωμένες καρδιές καθώς ήταν σε θέση να αναστείλει την υδρόλυση της ATP σε μεγάλο βαθμό, χωρίς όμως να έχει κάποια επίδραση στην σύνθεσή της κατά τη φάση της επαναιμάτωσης. Παράλληλα μείωσε τα ποσοστά θανάτου των κυττάρων του ισχαιμικού ιστού και βελτίωσε τη συστολική λειτουργία. Αν και δεν είναι ακόμη κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της, πιστεύεται ότι της αναστροφής της λειτουργίας των υπομονάδων της ATP συνθάσης, υποκρύπτεται κάποια διαμορφωτική μεταβολή του ενζύμου, με αποτέλεσμα μια νέα διαμορφωτική κατάσταση. Την κατάσταση αυτή λοιπόν θεωρείται ότι αναστέλλει η BMS και έτσι αναστέλλει την υδρόλυση εκλεκτικά. Μολαταύτα ο μηχανισμός δράσης της χρήζει επιπλέον διερεύνησης (Grover et al., 2004).

Η ένωση BTB, η οποία επιλέχθηκε χρησιμοποιώντας ως βάση την BMS, εμφάνισε και αυτή αναστολή επί της ATP συνθάσης (και συνεπώς μείωση του ρυθμού ελάττωσης της ATP) όταν η κυτταρική αναπνοή είχε αναστέλλει, χωρίς όμως να επηρεάζει την σύνθεση της ATP. Κατόπιν μελετών (σε κύτταρα με υπερέκφραση και αποσιώπηση της πρωτεΐνης IF1) φάνηκε ότι η ένωση BTB πιθανώς να εμφανίζει αυτή την αναστολή της υδρόλυσης της ATP μέσω του παράγοντα IF1, με έναν πιθανό μηχανισμό την επαγωγή της δημιουργίας αδρανών τετραμερών της IF1 όταν το ένζυμο ATP συνθάση λειτουργεί φυσιολογικά, με ταυτόχρονη διατήρηση της ικανότητας διμερισμού (και άρα ενεργοποίησης) στην παθολογική λειτουργία του ενζύμου (Ivanov et al., 2014).



Άλλες ενώσεις με ανασταλτικές ιδιότητες επί της ATP συνθάσης

Άλλα ενώσεις, γνωστές από τη βιβλιογραφία ότι αναστέλλουν την λειτουργία της ATP συνθάσης είναι διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις, δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών ενώ και διάφορες φλαβόνες εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες καθώς και πλήθος άλλων ενώσεων ή ατόμων όπως το μαγνήσιο, τα οιστρογόνα, οι κατεχίνες, η κεμφερόλη κ.α. (πάνω από 300 φυσικά και συνθετικά μόρια έχουν καταγραφεί) (Kühlbrandt, 2019).

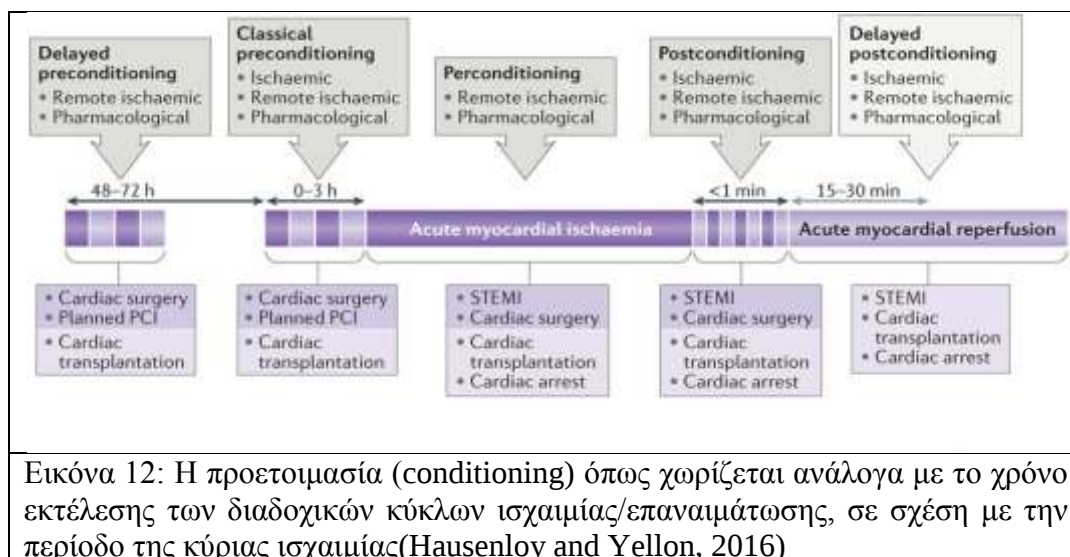
Η προετοιμασία του μυοκαρδίου ως μέσο προστασίας αυτού

Η προετοιμασία (conditioning), του μυοκαρδίου αναφέρετε ως όρος στην διαδικασία μέσω της οποίας είναι δυνατή η προστασία των καρδιομυοκυττάρων (από τη βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης), μέσω ενεργοποίησης ή/και ρύθμισης ενδογενών σηματοδοτικών μηχανισμών καρδιοπροστασίας. Το conditioning είναι όρος ‘‘ομπρέλα’’ και περιλαμβάνει:

- Τον όρο ισχαιμική προετοιμασία (ischemic preconditioning, IPC), περιγράφουμε τη διαδικασία κατά την οποία ολιγόλεπτοι κύκλοι ισχαιμίας ακολουθούμενοι από επαναιμάτωση εφαρμόζονται πριν την παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας (εικόνα 12). Το IPC, όταν εφαρμόζεται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές πριν την ολική

ισχαιμία, μειώνει την έκταση του εμφράγματος και αποτρέπει την εμφάνιση κολπικής μαρμαρυγής (Caricati-Neto et al., 2019; Heusch, 2015; Lesnefsky et al., 2017).

- Τον όρο μετ ισχαιμική προετοιμασία (ischemic postconditioning, POC), περιγράφουμε τη διαδικασία κατά την οποία ολιγόλεπτοι κύκλοι ισχαιμίας ακολουθούμενη από επαναιμάτωση εφαρμόζονται μετά το πέρας της παρατεταμένης περιόδου ισχαιμίας (εικόνα 12). Το POC, μπορεί να επιτύχει μείωση της έκτασης του εμφράγματος IPC και βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας.
- Τον όρο απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία (remote ischemic conditioning), περιγράφουμε τη διαδικασία κατά την οποία ολιγόλεπτοι κύκλοι ισχαιμίας ακολουθούμενη από επαναιμάτωση εφαρμόζονται σε ένα απομακρυσμένο σημείο σε σχέση με την καρδιά (π.χ. ένα άκρο). Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την κύρια ισχαιμία στην καρδιά και αξιοποιείται επίσης στην κλινική πράξη.



Εικόνα 12: Η προετοιμασία (conditioning) όπως χωρίζεται ανάλογα με το χρόνο εκτέλεσης των διαδοχικών κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, σε σχέση με την περίοδο της κύριας ισχαιμίας (Hausenloy and Yellon, 2016)

- Τέλος, υπάρχει και ο όρος φαρμακολογικό conditioning, ο οποίος ουσιαστικά αναφέρεται στην προσπάθεια ενεργοποίησης ή/και ρύθμισης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών ή συγκεκριμένων στόχων μέσω εξωγενούς χορήγησης διαφόρων ουσιών. Αν και πειραματικά μελετώνται διάφορες πιθανές κατηγορίες μορίων όπως επί παραδείγματι αγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης ή αναστολείς των L-τύπων διαύλων ασβεστίου εν τούτοις δεν έχουν καταφέρει να εισαχθούν στην κλινική πράξη. Για τον λόγο αυτό η εξεύρεση νέων στόχων αλλά και μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτούς καθίσταται επιτακτική, καθώς η φαρμακολογική παρέμβαση θα πρέπει πάντα να υφίσταται ως μία ακόμη επιλογή στην φαρέτρα της κλινικής αντιμετώπισης των βλαβών της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (που μέχρι και σήμερα είναι σχετικά πτωχή σε θεραπευτικές επιλογές) (Caricati-Neto et al., 2019).

Η ATP συνθάση ως πιθανός καρδιοπροστατευτικός στόχος

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, το ένζυμο ATP συνθάση, εξ' αιτίας της αναστροφής της λειτουργίας του σε υδρολάση, (κυρίως) στη φάση της ισχαιμίας επιδεινώνει τη νοσηρότητα των κυττάρων σε υποξικές καταστάσεις όπως το OEM ή η στηθάγχη ενισχύοντας τον κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι η ανεύρεση μορίων ικανών να αναστείλουν την υδρολυτική λειτουργία του ενζύμου, θα έχει θεραπευτική αξία για τις παθοφυσιολογικές καταστάσεις αυτές που εμπλέκουν ισχαιμικές καταστάσεις του μυοκαρδίου. Συνεπώς η ATP συνθάση πιθανώς να αποτελεί έναν νέο και υποσχόμενο καρδιοπροστατευτικό στόχο με προοπτική να αποτελέσει ένα παράδειγμα φαρμακολογικής προετοιμασίας (conditioning). Άλλωστε, οι όποιες απόπειρες με άλλους στόχους έχουν σχετικά αποτύχει στην κλινική πράξη, ενώ μόνο οι τεχνικές της προ/μετα/απομακρυσμένης ισχαιμικής προετοιμασίας (pre/post/remote conditioning) έχουν αποδείξει κλινικό όφελος. Επειδή δε, έχει φανεί η σπουδαιότητα του μιτοχονδρίου στους διάφορους πολύπλοκους μοριακούς σηματοδοτικούς καρδιοπροστατευτικούς μηχανισμούς, η μιτοχονδριακή ATP συνθάση είναι πιθανό να επιδείξει πράγματι προφίλ καρδιοπροστατευτικού στόχου (εικόνα 13). Αυτό άλλωστε έχει φανεί και από μελέτες με αναστολείς της ATP συνθάσης οι οποίοι κατάφεραν να μειώσουν την έκταση του εμφράγματος (Grover and Malm, 2008; Silva et al., 2018). Μάλιστα είναι πιθανό, ενώσεις η οποίες αναστέλλουν τη λειτουργία της ATP συνθάσης στη φάση της ισχαιμίας, να δρουν έμμεσα στον mPTP, αφού διατηρούν τα αποθέματα αδευνλικών νουκλεοτιδίων (π.χ. ATP) του κυττάρου, ασκώντας τελικά μια ευεργετική επίδραση στη ρύθμιση της λειτουργίας του mPTP (Silva et al., 2018).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυοκαρδιακό ιστό

Αρχικά, μύες C57BL/6, αρσενικοί, ηλικίας 2-3 μηνών και βάρους 25-30 γραμμαρίων, θυσιάζονται με τραχηλική απεξάρθρωση και το μυοκάρδιο παραλαμβάνεται, εκπλένεται με φυσιολογικό ορό και τέμνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (isolation buffer A) του οποίου η σύσταση απεικονίζεται παρακάτω (πίνακας 1). Το pH του isolation buffer A ρυθμίζεται με Tris στο 7,4, παρασκευάζεται φρέσκο για την απομόνωση μιτοχονδρίων και διατηρείται προσωρινά σε ψυγείο στους 4°C. Ακολούθως, ο μυοκαρδιακός ιστός ομογενοποιείται στο isolation buffer με την προσθήκη 0,1mg/mL Nagarse (ή 8 U/g nagarse αν τα μιτοχόνδρια πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την τεχνική μιτοχονδριακής συγκράτησης ασβεστίου) με τη χρήση υάλου – τεφλόν ομογενοποιητή. Το ομογενοποίημα, αραιώνεται με την προσθήκη διπλάσιου όγκου 0,2 % w/v BSA σε isolation buffer, φυγοκεντρείται στα 500 x g στους 4°C για 10 λεπτά. Έτσι, στο ίζημα αποβάλλονται τα μη λυμένα κύτταρα και άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια, φυγοκεντρείται στα 8000 x g για 10min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο αποτελεί το κυτοσολικό κλάσμα το οποίο απορρίπτεται. Το ίζημα που προκύπτει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα, το οποίο επαναδιαλυτοποιείται και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση στα 8000 x g για 10min. Το τελικό ίζημα ανασυσταίνεται σε μικρό όγκο isolation buffer και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις (Andreadou et al., 2017; Nikolaou et al., 2019).

Συστατικά	Συγκέντρωση
Μανιτόλη	225 mM
Σουκρόζη	75 mM
Hepes	10 mM
EGTA	1 mM
Πίνακας 1. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης (isolation buffer A)	

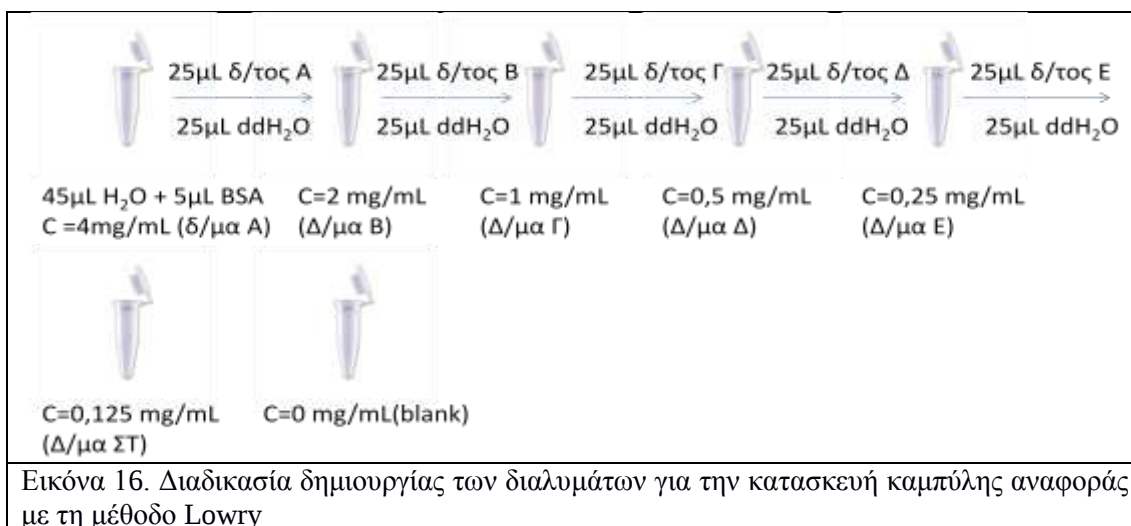
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Αρχικά παρασκευάζονται:

- 1) Υδατικό διάλυμα BSA (bovine serum albumin-βόεια αλβουμίνη ορού) συγκέντρωσης 4 mg/ml από το stock BSA (40mg/ml).
- 2) Αντιδραστήριο A+S το οποίο περιέχει το αντιδραστήριο A (Reagent A) (αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού), μαζί με το αντιδραστήριο S (Reagent S) (ένα επιφανειοδραστικό

διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις) με αναλογία 20 μL αντιδραστήριου S ανά 1 ml αντιδραστήριου A (1 μέρος S σε 50 μέρη A).

Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ακολουθείται το πρωτόκολλο Lowry, όπου κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς μέσω διαλυμάτων BSA και μετρούνται δείγματα του υπό εξέταση διαλύματος μιτοχονδρίων. Για την καμπύλη αναφοράς, αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα 4 mg/ml BSA. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις λαμβάνοντας 25 μL από την πιο πυκνή αραιώση και προστίθενται 25 μL isolation buffer A. Με αυτό το τρόπο, δημιουργούνται οι εξής αραιώσεις BSA: 4 mg/ml (αρχικό διάλυμα), 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml και 0 mg/ml (χωρίς BSA). Από αυτά τα διαλύματα λαμβάνουμε 5 μL τα οποία τοποθετούμε πάνω στις κυψελίδες (well) της μικροπλάκας (εικόνα 16). Αντιστοίχως, λαμβάνονται δείγματα 5 μL από το μητρικό διάλυμα μιτοχονδρίων και διάλυμα μιτοχονδρίων με αραιώση 1 προς 2 και 1 προς 4 και τα δείγματα τοποθετούνται πάνω στην ίδια μικροπλάκα (plate).



Στη συνέχεια τοποθετούνται 25 μL από το αντιδραστήριο A+S σε κάθε κυψελίδα δείγματος. Ακολούθως, τοποθετούνται 200 μL αντιδραστήριου B (Reagent B) σε κάθε κυψελίδα το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm, και υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων που απομονώθηκαν με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς (Lowry et al., 1951). Για την εξαγωγή της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Graph Pad Prism 6 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

Με βάση την συγκέντρωση της πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων από την μέθοδο Lowry, υπολογίζουμε τον όγκο των μιτοχονδρίων που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε για κάθε τεχνική.

Μέθοδος *in vitro* αξιολόγησης αναστολέων της ATP συνθάσης

Αρχικά παρασκευάζονται:

1) ATPase reaction buffer (ρύθμιση pH 7,2 με Tris) (πίνακας 2)

Συστατικά	Συγκέντρωση
Σουκρόζη	125 mM
Χλωριούχο Κάλιο (KCl)	65 mM
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂)	2,5 mM
HEPES	50 mM
Πίνακας 2. Σύσταση του διαλύματος ATPase reaction buffer.	

2) Τριχλωροοξικό οξύ (TCA) 40% w/v σε ddH₂O

3) Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) 0,5 mM

4) Μολυβδαινικό αντιδραστήριο 10% (διάλυση 5g δισθενούς θειικού σιδήρου (FeSO₄) σε 60 mL νερό και στη συνέχεια προσθήκη 10 mL από διάλυμα 10% μολυβδαινικού αμμωνίου ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) διαλυμένο σε H₂SO₄ 10N και ρύθμιση του όγκου στα 100 mL με ddH₂O).

5) Διάλυμα ολιγομυκίνης συγκέντρωσης 0,1 μg/mL από αρχικό stock 100 μg/mL. Η ολιγομυκίνη χρησιμοποιείται ως πρότυπος αναστολέας της ATP συνθάσης.

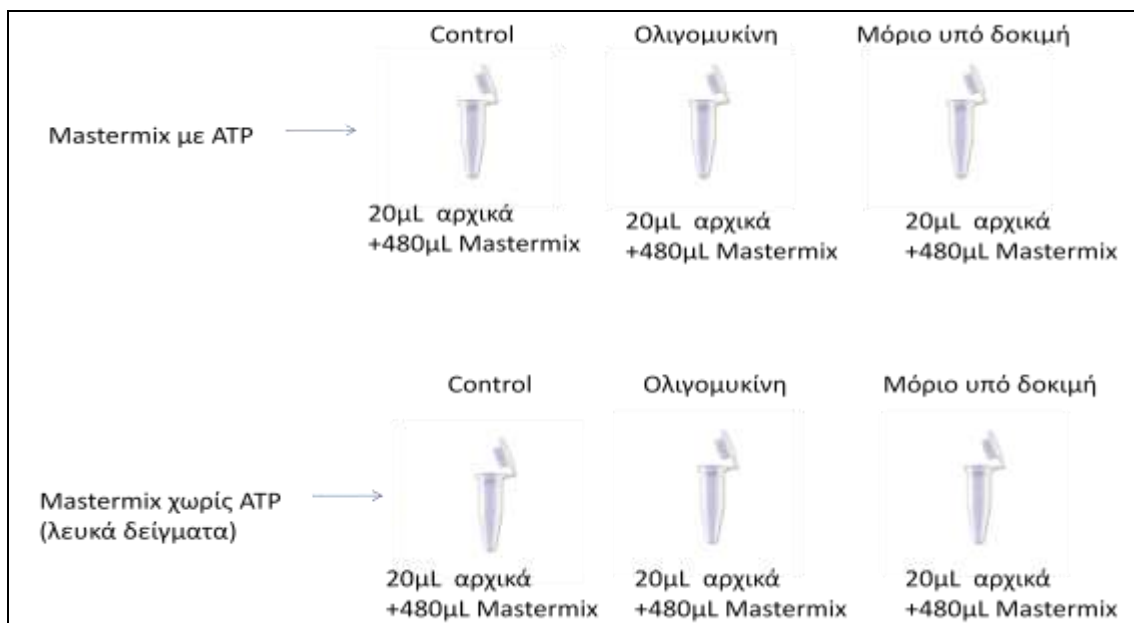
6) Διαλύματα παρακαταθήκης των ενώσεων προς δοκιμή σε DMSO (συνήθης διαλύτης), συγκέντρωσης 5mM.

Για κάθε ένωση ή control, προσημειώνεται ένας περιέκτης (eppendorf) με το διάλυμα προς έλεγχο (test) και ένας που χρησιμοποιείται ως λευκό διάλυμα (blank). Για τον πειραματικό προσδιορισμό της αναστολής της υδρόλυσης του ATP λαμβάνονται 20μL από τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναστολέων συγκέντρωσης 5mM σε κάθε περιέκτη ώστε η τελική τους συγκέντρωση στον προσδιορισμό να είναι, 200μM. Χρησιμοποιούνται επίσης διαλύματα δείγματος ελέγχου (control), τα οποία περιέχουν 20μL του εκάστοτε διαλύτη (DMSO, EtOH ή ddH₂O).

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ένας κύκλος ψύξης-απόψυξης (1min σε υγρό N₂, 1min στους 37°C) των μιτοχονδρίων ο οποίος αντιστρέφει τη δράση της ATP συνθάσης.

Ακολούθως, παρασκευάζονται δύο διαλύματα εργασίας (mastermix) τα οποία περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα μιτοχονδρίων (0,130mg/mL), ATPase reaction buffer και ATP τελικής συγκέντρωσης ATP 2,5 mM. Η ATP προστίθεται σε στερεή μορφή. Το διάλυμα εργασίας που προστίθεται στους περιέκτες Blank δεν περιέχει ATP.

Έπειτα προστίθεται σε κάθε eppendorf, 480 μL από το εκάστοτε mastermix όπως φαίνεται στην εικόνα 17.



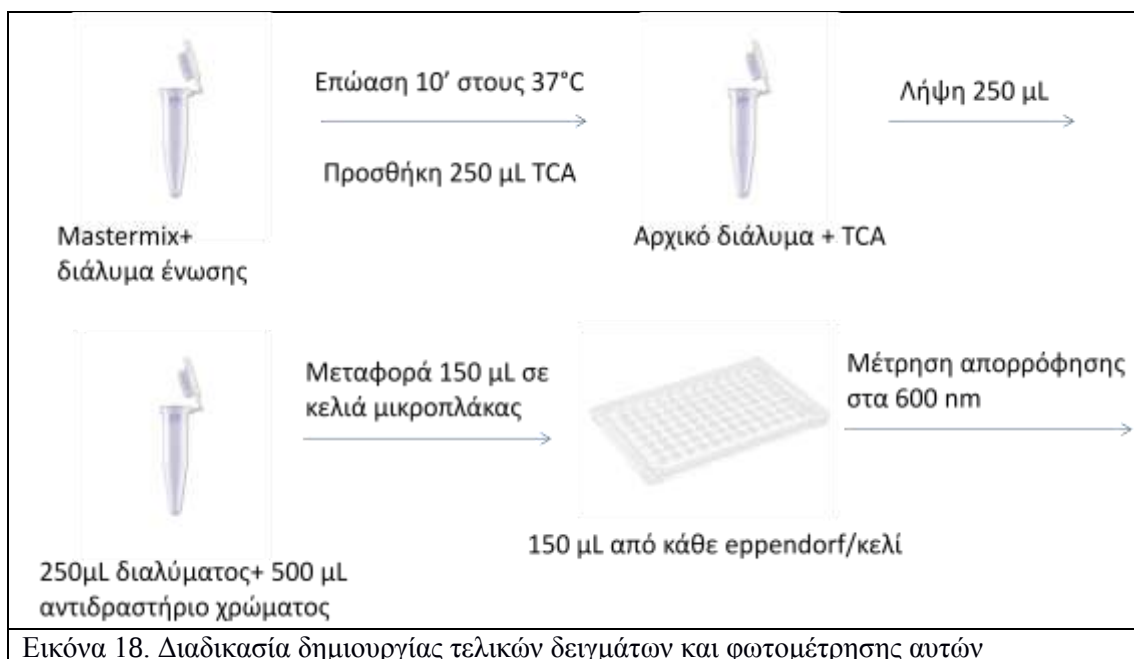
Εικόνα 17. Διαδικασία παρασκευής αρχικών δειγμάτων για την *in vitro* αξιολόγηση των μορίων.

Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 λεπτά ακριβώς και η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 250 μL διαλύματος TCA και ακολουθεί ανακίνηση σε vortex. Στα 10 λεπτά που πραγματοποιείται η αντίδραση στο υδατόλουτρο, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς των nmol Pi σύμφωνα με τον πίνακα 3 από το διάλυμα KH_2PO_4 0,5 mM:

Δείγμα	KH_2PO_4 0,5 mM (μL)	H_2O (μL)	nmol Pi
1	0	1000	0
2	100	900	100
3	250	750	250
4	500	500	500
5	750	250	750
6	1000	0	1000

Πίνακας 3: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των nmol Pi.

Λαμβάνονται 250 μL από κάθε eppendorf συμπεριλαμβανομένων και αυτών της καμπύλης αναφοράς και μεταφέρονται σε νέα eppendorf. Προστίθενται 500 μL αντιδραστηρίου χρώματος (Molybdate Reagent) και επωάζονται για 5 λεπτά. Τέλος, τοποθετούνται στις κυψελίδες της μικροπλάκας 150 μL από κάθε δείγμα, μαζί με τα 6 δείγματα της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος ολοκληρώνεται με την μέτρηση της απορρόφησης των κυψελίδων της μικροπλάκας στα 600 nm (στο μηχάνημα Tecan) (εικόνα 18).



Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν επεξεργάζονται και υπολογίζονται οι διορθωμένες τιμές απορρόφησης με την αφαίρεση του blank. Με το λογισμικό GraphPad Prism 6 εξάγεται η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και προκύπτουν τα nmol Pi σε κάθε δείγμα. Με χρήση του τύπου: $\frac{\text{Απορρόφηση Control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση Control}} \times 100$ υπολογίζεται το % της αναστολής που παρέχει κάθε ένωση έναντι του control (Teodoro et al., 2015).

Μέθοδος in vitro απόδοσης IC₅₀ των αναστολέων της υδρολυτικής δράσης της ATP συνθάσης

Για την απόδοση των τιμών IC₅₀ των αναστολέων, η πορεία της μεθόδου είναι παρόμοια με την παραπάνω. Η διαφορά έγκειται στην διαδικασία παρασκευής των υπό μελέτη δειγμάτων. Παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης αναστολέων συγκέντρωσης 25mM ώστε η τελική συγκέντρωση στην πειραματική δοκιμή να είναι 1mM. Ακολουθώς, 10 μL από το κάθε υπό εξέταση αρχικό διάλυμα και μεταφέρονται σε νέο erpendorf, στο οποίο προστίθενται 90 μL H₂O. Με αυτό το τρόπο προκύπτει η πρώτη αραιώση (από το αρχικό διάλυμα που είναι 1mM, η πρώτη αραιώση είναι 0,1mM). Στη συνέχεια, η διαδικασία συνεχίζεται με τον ίδιο τρόπο μέχρι να προκύψουν όλες οι αραιώσεις. Συνολικά, δοκιμάζονται 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις ανά μόριο (1mM, 0,1mM, 10μM, 1μM, 0,1μM και 0,01μM) όπως περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω (εικόνες 17 και 18).

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν επεξεργάζονται και υπολογίζονται οι διορθωμένες τιμές απορρόφησης με την αφαίρεση του blank. Με το λογισμικό GraphPad Prism 7 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com εξάγεται η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και προκύπτουν τα nmol Pi σε κάθε δείγμα. Με χρήση του τύπου:
$$\frac{\text{Απορρόφηση Control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση Control}} \times 100$$
 υπολογίζεται το % της αναστολής που παρέχει κάθε ένωση έναντι του control.

Στη συνέχεια, ακολουθεί λογαρίθμιση τις τιμές των συγκεντρώσεων των αραιώσεων που αποτελούν τον άξονα X του γραφήματος της IC₅₀ και στον άξονα Y τοποθετούνται οι τιμές των nmol Pi που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της καμπύλης. Τέλος, αναλύονται τα δεδομένα με “Nonlinear regression (curve fit), log (inhibitor) vs. Normalized response (three parameters)” χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 7 και προκύπτει το γράφημα της IC₅₀ των υπό μελέτη ενώσεων (Teodoro et al., 2015) .

Τεχνική αξιολόγησης της μιτοχονδριακής συγκράτησης ασβεστίου (Calcium Retention Capacity)

Πρόκειται για μία τεχνική συγκράτησης ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια και διατήρησής του στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η αποθήκευση ιόντων ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, συμβάλλει στην ικανότητα ρύθμισης του ελεύθερου ασβεστίου εντός του κυτοσολίου και συνεπώς στη ρύθμιση των επαγόμενων ή εξαρτώμενων από το ασβέστιο, κυτταρικών λειτουργιών. Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα συγκράτησης του ασβεστίου- Calcium Retention Capacity (CRC), εκτίθενται απομονωμένα μιτοχόνδρια σε διαδοχικές ώσεις ασβεστίου (υπό τη μορφή CaCl₂) και παράλληλα πραγματοποιείται μέτρηση της έντασης του φθορισμού του συμπλόκου της χρωστικής Calcium Green με το ασβέστιο που βρίσκεται εκτός του μιτοχονδρίου (καθότι η χρωστική αυτή συμπλοκοποιείται με το ασβέστιο, παράγοντας ένα φθορίζον σύμπλοκο, στερούμενη όμως της ικανότητας διάβασης της μιτοχονδριακής μεμβράνης). Με την παρούσα τεχνική, προσδιορίζεται ο αριθμός των κύκλων προσθήκης ιόντων ασβεστίου έως την διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας και τον συνεπακόλουθο θάνατο του μιτοχονδρίου (Andreadou et al., 2017) .

Προ της έναρξης της πειραματικής πορείας, παρασκευάζεται το απαιτούμενο για την εκτέλεση των πειραμάτων ρυθμιστικό διάλυμα επώασης το οποίο καλείται CRC Assay Buffer, η σύσταση του οποίου φαίνεται παρακάτω (πίνακας 4):

Συστατικά	Ποσότητα
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0.511g
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH ₂ PO ₄	0.0136g
Hepes	0.2383
EDTA(0.02mM)	Προσθήκη καταλλήλου όγκου από stock 0.5mM
ddH ₂ O	q.s. 50mL
Πίνακας 4. Η σύσταση του διαλύματος CRC Assay Buffer	

Το παραπάνω διάλυμα πεχαμετρείται με Tris 0,5M μέχρι pH 7,2 (δεν επιλέγεται όξινο pH, λόγω της ανθεκτικότητας των μιτοχονδρίων στην διάνοιξη σε αυτές τις τιμές pH).

Το διάλυμα εργασίας που χρησιμοποιείται για την εκτέλεση του πειράματος και την δοκιμασία των μορίων, καλείται Master Mix και αποτελείται από:

- Το CRC Assay Buffer
- Απομονωμένα λειτουργικά μιτοχόνδρια σε συγκέντρωση 0.25mg/mL
- 80μL φθορίζουσας χρωστικής Calcium Green
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέως 100mM (με σκοπό να ενεργοποιηθεί η μιτοχονδριακή αλυσίδα και να εξασφαλιστεί η σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων)

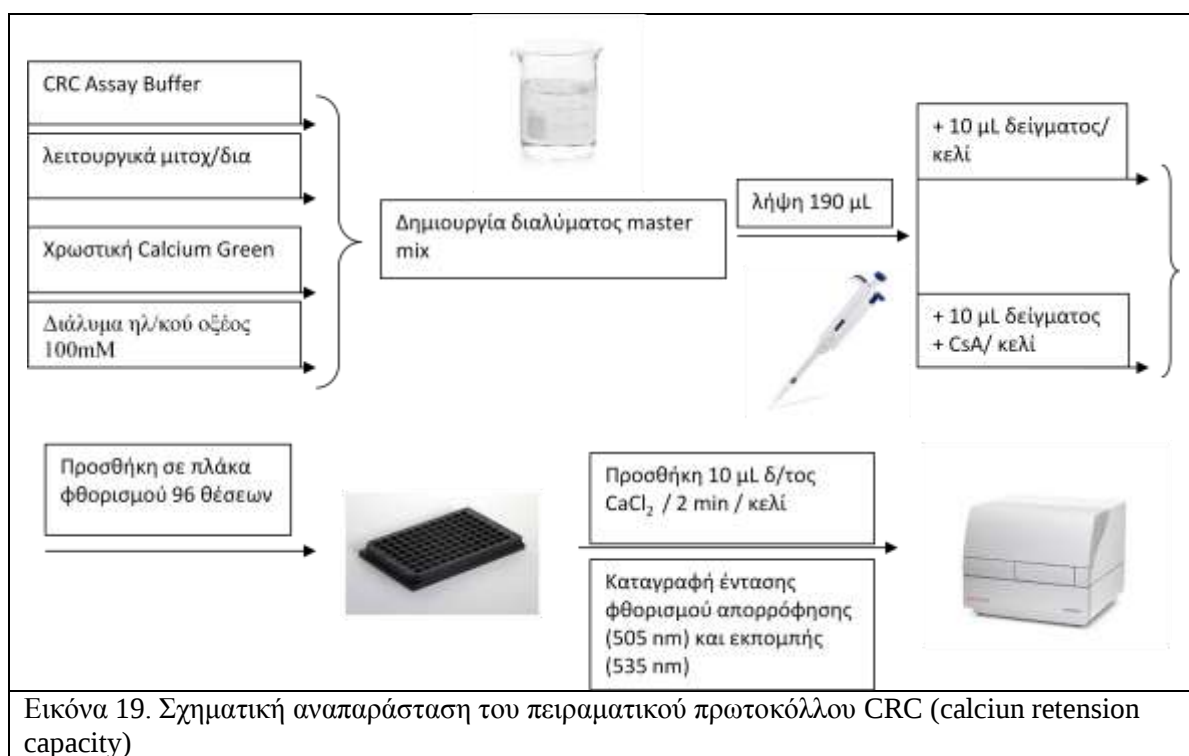
Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση των αναστολέων στην μιτοχονδριακή ομοιοστασία του ασβεστίου και την ικανότητα διάνοιξης του μιτοχονδριακού πόρου, προσδιορίστηκε η CRC των μορίων σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (100μM, 50μM, 10μM και 1μM + ένα τυφλό, + θετικού μάρτυρα). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε το μόριο κυκλοσπορίνη (CsA) (που αποτελεί τον πρότυπο αναστολέα του mPTP).

Συγκεκριμένα, 190 μL από το διάλυμα Master Mix προστείνονται διαδοχικά σε κελιά μαύρης πλάκας 96 θέσεων (κατάλληλης για μέτρηση φθορισμού), τα οποία περιέχουν 10 μL από διαλύματα των αναστολέων σε συγκεντρώσεις τέτοιες ώστε στον τελικό όγκο των 200 μL να προκύπτουν οι ως άνω αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Η διαδικασία αυτή, λαμβάνει χώρα 2 φορές. Στη δεύτερη σειρά προστίθεται 1 μL CsA 200 μg/mL ώστε να ελεγχθεί ο μηχανισμός της πιθανής επίδρασης των αναστολέων στην διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου. Η ως άνω διαδικασία πραγματοποιείται συλλήβδην 2 φορές (μία κανονική και μία επαναληπτική σειρά, ώστε να ληφθεί ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων).

Τέλος, με τη χρήση φθορισμόμετρου Fluoroskan Ascent FL plate reader (Thermo Electron, Waltham, MA) πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές προσθήκες χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) στα κελιά που έλαβε χώρα το πείραμα και η καταγραφή των αποτελεσμάτων (στην εικόνα 19 φαίνεται σχηματική η πειραματική διαδικασία). Το παραπάνω φθορισμόμετρο διαθέτει αυτόματο δειγματολήπτη και επιτυγχάνει την προσθήκη 10 μL διαλύματος CaCl_2 0,5mM κάθε δύο λεπτά σε κάθε κελί και ταυτόχρονα μετρά και καταγράφει την ένταση του φθορισμού με απορρόφηση στα 505 nm και εκπομπή στα 535 nm.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Αρχικά, μετρήθηκε ο λόγος των mg Ca^{+2} ως προς τα mg πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων και ακολούθησε κανονικοποίηση των τιμών ως προς την τιμή του control. Έπειτα, όλες οι τιμές παρουσιάστηκαν ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση (S.D.). Τέλος έγινε χρήση μονοπαραγοντικής ανάλυσης διασποράς (ANOVA), και ακολούθησε δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων με τη μέθοδο Tukey.



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου CRC (calcium retention capacity)

Προσδιορισμός μεταβολής δυναμικού μεμβράνης σε H9C2 κύτταρα, με τη χρήση χρωστικής τετραμεθυλοροδαμίνης (TMRM).

Η παρούσα τεχνική πραγματοποιήθηκε στο πανεπιστήμιο UCL (University College of London), στο εργαστήριο Hatter Cardiovascular Institute.

Η TMRM είναι μία κατιονική, διαπερνώσα τα κύτταρα, ερυθροπορτοκαλί, φθορίζουσα χρωστική. Η τελευταία έχει την ικανότητα να απορροφάται ταχέως από τα ζωντανά και λειτουργικά μιτοχόνδρια, καθώς τα ανενεργά ή αποπολωμένα μιτοχόνδρια λόγω του χαμηλού δυναμικού μεμβράνης, αποτυγχάνουν να συγκρατήσουν την χρωστική και για τον λόγο αυτό εμφανίζουν χαμηλό σήμα κατά τη μέτρηση του φθορισμού (Ivanov et al., 2014). Έτσι, η τεχνική TMRM, χρησιμοποιείται για τον άμεσο προσδιορισμό της μεταβολής του δυναμικού μεμβράνης των μιτοχονδρίων ($\Delta\psi$), και έμμεσα, τόσο για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής ικανότητας διαφόρων παραγόντων επί της υδρολυτικής λειτουργίας του ενζύμου ATP συνθάση, όσο και για την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας των παραγόντων αυτών ως προς την αναστολή μόνον αυτής της λειτουργίας.

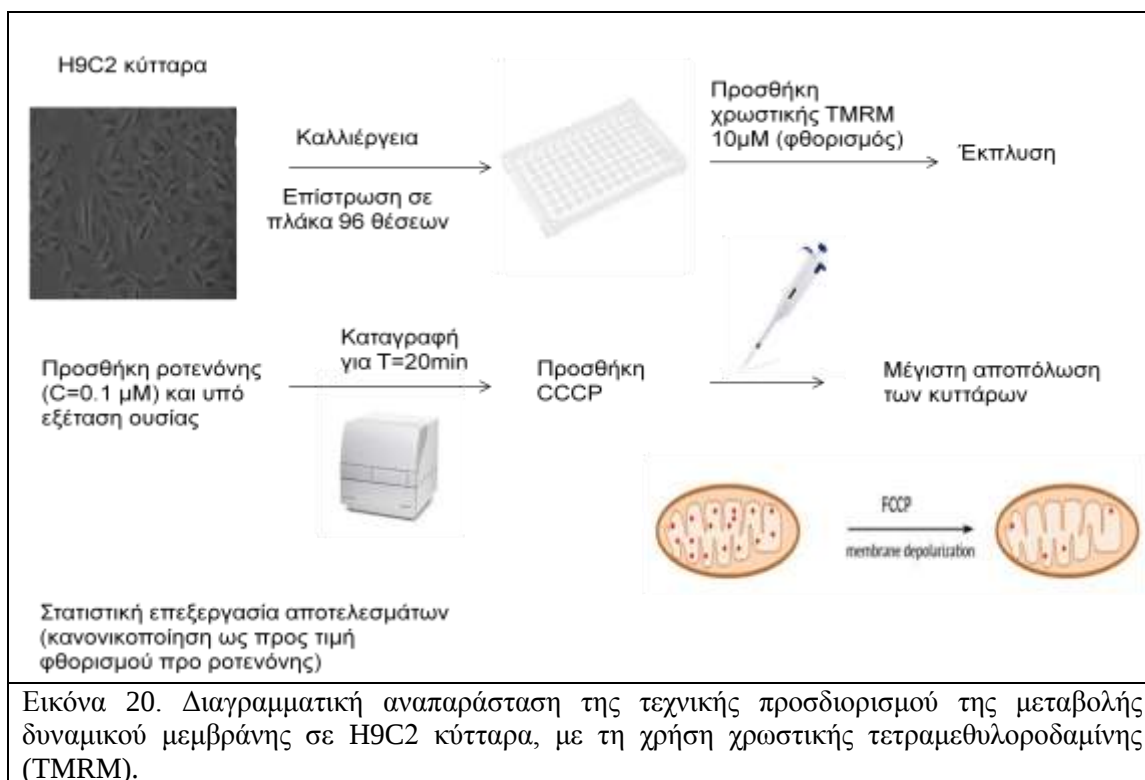
Αρχικά, κύτταρα H2C9 καλλιεργήθηκαν σε τυπικό θρεπτικό υλικό Gilco DMEM F-12 το οποίο περιείχε 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, 10% FBS (Fetal bovine serum albumin) στους 37 °C για 24h με 5% CO₂ και 95% ατμοσφαιρικό αέρα σε ειδικό επωαστήριο. Κατόπιν επιστρώθηκαν σε κελιά πλάκας 96 θέσεων (με τον βέλτιστο αριθμό κυττάρων να προκύπτει κατόπιν πειραματικού σχεδιασμού στα 2×10^4 κύτταρα/κελί). Στη συνέχεια, αφού τα κύτταρα εκπλήθηκαν με PBS (pH= 7,4) επωάστηκαν στους 37°C για 10 min με την χρωστική TMRM 10μM (εστέρας της τετραμεθυλοροδαμίνης) η οποία διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα καταγραφής (η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 5). Έπειτα η πλάκα εκπλένεται δύο φορές με PBS προς απομάκρυνση τυχόν περίσσιας χρωστικής και ακολουθεί τοποθέτηση της πλάκας σε καταγραφικό μηχάνημα φθορισμού (BMG labtech, με μήκος κύματος απορρόφησης στα 544 nm και εκπομπής στα 590 nm) η προσθήκη διαλύματος καταγραφής του αντιδραστηρίου ροτενόνη σε συγκέντρωση 0,1 μM και του δείγματος της εκάστοτε υπό εξέταση ουσίας (διαλυμένα σε DMSO) ή της πρότυπης ουσίας (ολιγομυκίνη σε συγκέντρωση 3μM). Η καταγραφή του φθορισμού πραγματοποιείται για 20 λεπτά. Η ροτενόνη προστίθεται, καθώς αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αλυσού, με αποτέλεσμα η τελευταία να δυσλειτουργεί και έτσι αναστρέφεται η λειτουργία της ATP συνθάσης από συνθάση της ATP σε υδρολάση αυτής, ενώ παράλληλα διαταράσσει και το πρηνές δυναμικού πρωτονίων μεταξύ του διαμεμβρανικού χώρου και της μιτοχονδριακής μήτρας. Τέλος γίνεται προσθήκη του αντιδραστηρίου CCCP (καρβονυλικό κυανίδιο της μέτα-χλωροφαινυλ-υδραζόνης), το οποίο προκαλεί έντονη διαταραχή του πρηνούς δυναμικού, ενώ εμποδίζει την ATP συνθάση να το διατηρήσει, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πλήρης εκπόλωση και τελικά θάνατος του κυττάρου. Μετά την προσθήκη CCCP παρατηρείται η μέγιστη δυνατή αποπόλωση των κυττάρων. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, συλλέγονται τα αποτελέσματα και ακολουθεί στατιστική επεξεργασία (κατά την οποία οι τιμές κανονικοποιούνται με την τελευταία μετρηθείσα τιμή πριν την προσθήκη ροτενόνης) (στην εικόνα 20 φαίνεται σχηματική η πειραματική διαδικασία). Αν δε, στην

παραπάνω πειραματική διαδικασία δεν γίνει προσθήκη ροτενόνης, τότε τα αποτελέσματα που προκύπτουν ενέχουν την ικανότητα έμμεσου προσδιορισμού της εκλεκτικότητας και της τοξικότητας των υπό εξέταση ουσιών ως προς την αναστολή μόνο της υδρολυτικής λειτουργίας τη ATP συνθάσης σε σχέση με την καθολική αναστολή και των δύο λειτουργιών του ενζύμου.

Συστατικά	Συγκέντρωση (mM)
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	156
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	3
Θεικό μαγνήσιο (MgSO ₄)	2
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (K ₂ HPO ₄)	1,25
Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂)	2
Hepes	10
D-Glucose	10
Πίνακας 5. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος καταγραφής	

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Αρχικά, προσδιορίζεται ο ρυθμός (κλίση) ανόδου λόγω της υπερπόλωσης της μεμβράνης. Κατόπιν, κανονικοποιούνται οι ρυθμοί κλίσης πρώτον, των μορίων με ροτενόνη ως προς την κλίση της ροτενόνης για τον υπολογισμό της % αναστολής της ATP συνθάσης, και δεύτερον των μορίων χωρίς ροτενόνη για την εκτίμηση της εκλεκτικότητας ή της τοξικότητας των παραγόντων.



Διαχείριση πειραματοζώων

Στο πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες C57BL / 6J ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, οι οποίοι χορηγήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος, από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ). Όλοι οι χειρισμοί των ζώων ήταν σύμφωνοι με τις κατευθυντήριες γραμμές της οδηγίας 86/609, του Συμβουλίου Ευρωπαϊκής Ένωσης και με το Προεδρικό Διάταγμα (ΠΔ) 160 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Όλες οι διαδικασίες για ζώα εγκρίθηκαν από την Κτηνιατρική Επιτροπή Νομαρχίας Αθηνών και υλοποιήθηκαν στο ΙΒΕΑΑ. Τα πειραματικά πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Κτηνιατρική Επιτροπή της Νομαρχίας Αθηνών. (Αριθμός αδείας: 449428/30-06-2020).

***In vivo* πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μύων**

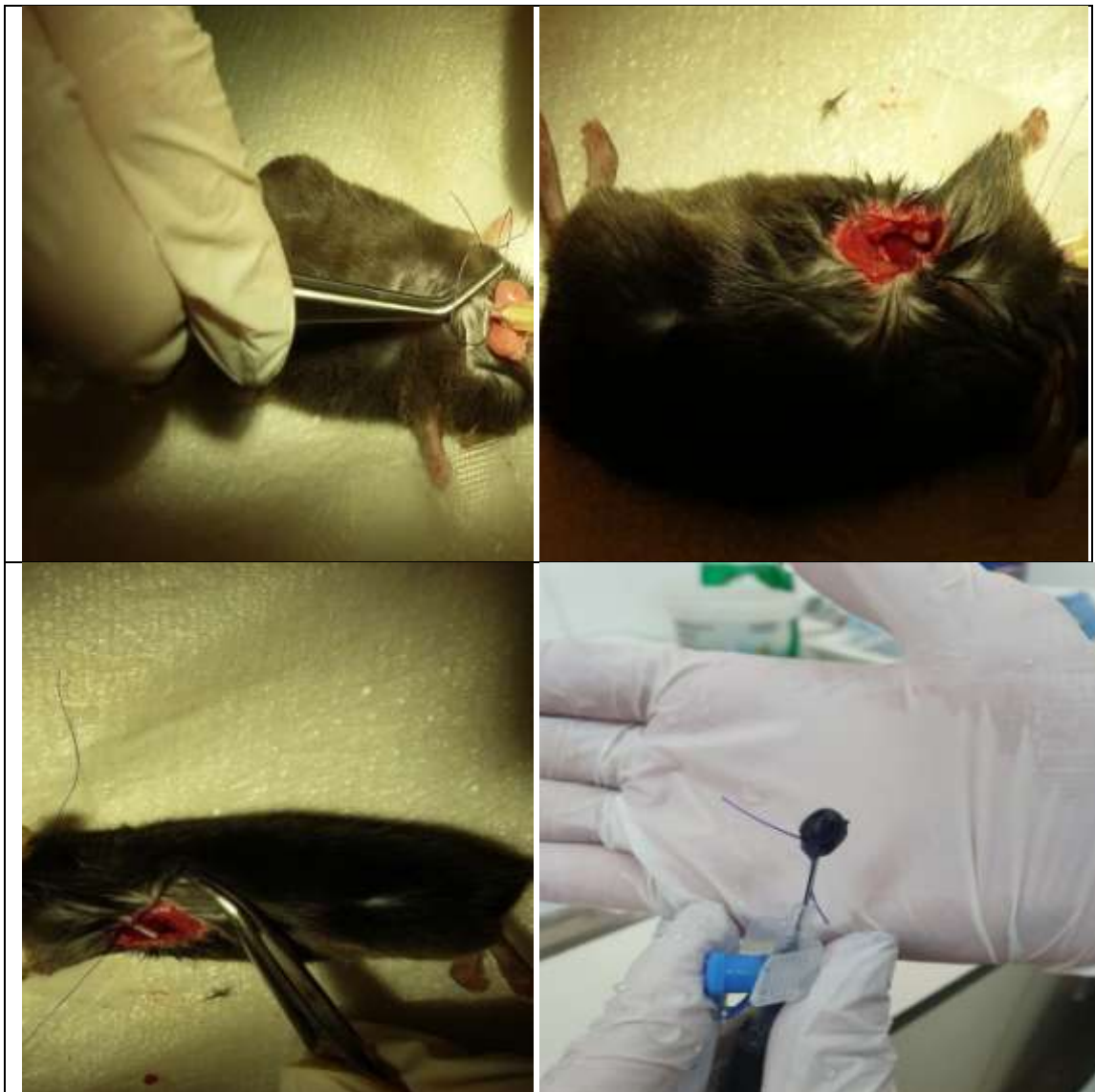
Χειρουργική διαδικασία

Οι μύες τυχαιοποιήθηκαν και αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση συνδυασμού κεταμίνης (100 mg / kg), ξυλαζίνης (20 mg / kg) και ατροπίνης (0,6 mg / kg). Το βάθος της αναισθησίας παρακολουθούνταν από την απώλεια του αντανακλαστικού και η θερμοκρασία του σώματος διατηρήθηκε στους 37 ° C καθ' όλη τη διάρκεια της χειρουργικής διαδικασίας με τη χρήση ενός θερμαινόμενου υποστρώματος. Μετά την αναισθητοποίηση, διεξήχθη τραχειοστομία για την διασφάλιση τεχνητής αναπνοής από έναν αναπνευστήρα μικρών ζώων με ρυθμό 125 αναπνοές / λεπτό και με όγκο 0,25-0,33 mL. Το στήθος ανοίχθηκε μέσω θωρακοτομής από την αριστερή μεριά του ζώου και πραγματοποιήθηκε περικαρδιοτομή για την καλύτερη απεικόνιση της καρδιάς. Ο πρόσθιος κατιόντας απολινώθηκε περίπου 3-4 mm πιο κάτω από την βάση της αρτηρίας χρησιμοποιώντας ένα 6-0 μεταξωτό ράμμα και η καρδιά αφέθηκε να σταθεροποιηθεί (σε ισχαιμία) για 30 λεπτά. Η επαγωγή της ισχαιμίας επαληθεύθηκε ελέγχοντας την εμφάνιση ενός πιο παλ ροζ χρώματος στο πρόσθιο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας και με ηλεκτροκαρδιογραφία (ΗΚΓ). Μετά την ισχαιμική περίοδο, η απολίνωση απελευθερώθηκε και η επαναιμάτωση πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες (Bibli et al., 2015) (εικόνα 22) .

Λήψη και κατεργασία του ιστού και περεταίρω επεξεργασία

Το μυοκάρδιο στο τέλος της επαναιμάτωσης απομακρύνθηκε ήπια και η αορτή διαχύθηκε με 5 ml φυσιολογικού ορού. Ακολούθως, εγχύθηκαν αργά 0,2mL διαλύματος 1% Evans Blue (σε ενέσιμο ύδωρ) για να καταστεί δυνατή η οριοθέτηση της ισχαιμικής από μη ισχαιμική ζώνη. Οι καρδιές καταψύχθηκαν στους -20 °C, κόπηκαν σε διατομές 1-2 mm και επωάστηκαν με 1% χλωριούχο τριφαίνυλ-τετραζόλιο (TTC) στους 37 °C για 20 λεπτά. Οι τομές επωάστηκαν σε φορμαλδεΰδη κατά τη διάρκεια της νύχτας και η περιοχή εμφράγματος οριοθετήθηκε ως λευκή περιοχή ενώ το βιώσιμο μυοκάρδιο εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα.

Ακολούθως, οι φέτες φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα Canon Powershot A620 (Canon, Tokyo, Japan) κάτω από μικροσκόπιο Zeiss 459300 (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany). Το συνολικό μέγεθος της κάθε φέτας (All / A), η περιοχή κινδύνου (R) και η περιοχή εμφράγματος (I) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας λογισμικό ImageJ (μέτρηση εμβαδού) και υπολογίστηκαν τα ποσοστά των λόγων των εμβαδών $R / A\%$ και I / R (Andreadou et al., 2017) .



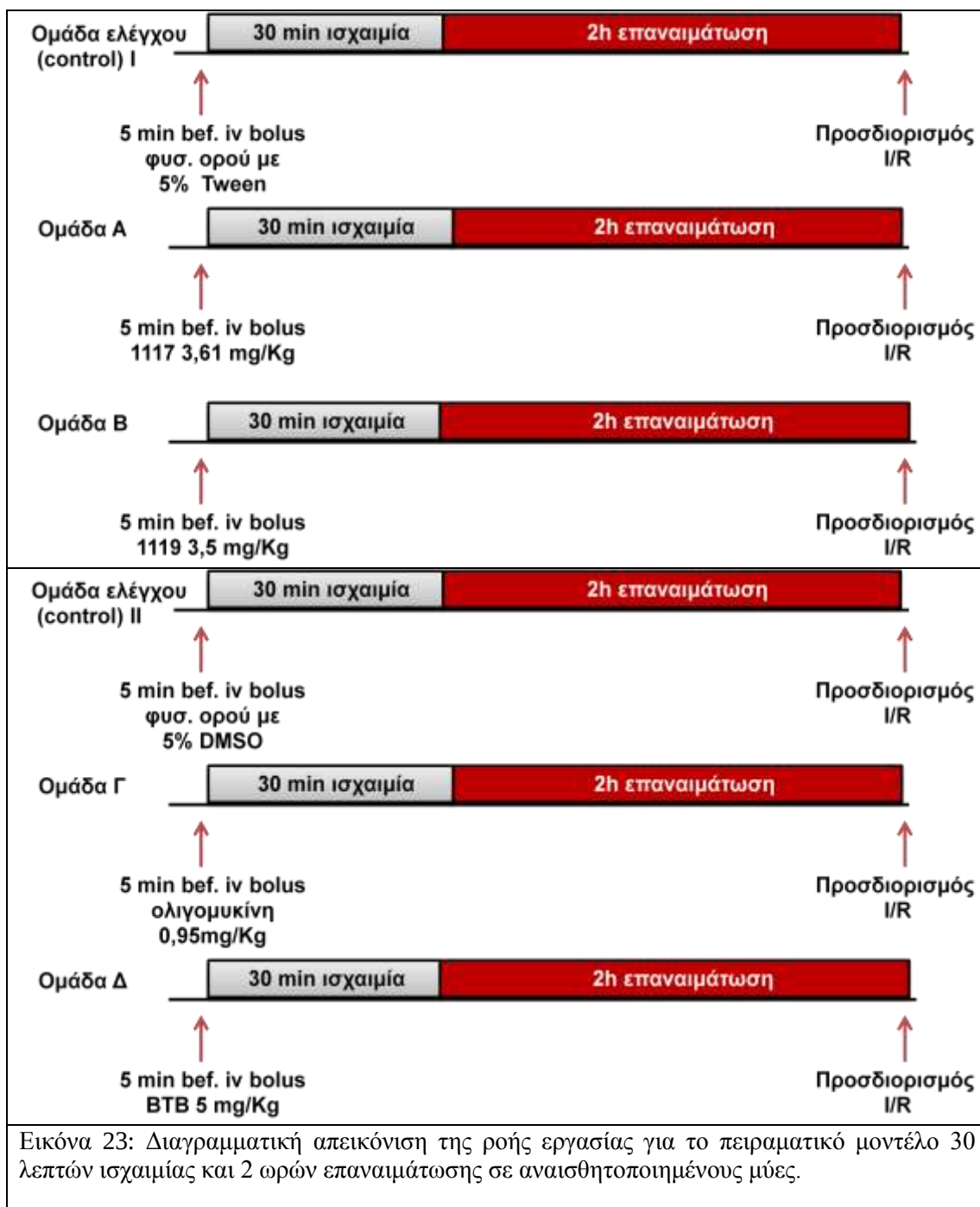
Εικόνα 22. Φωτογραφίες από την πορεία της χειρουργικής διαδικασίας. Από πάνω και αριστερά: η τοποθέτηση του ακροφύσιου του αναπνευστήρα, η θωρακοτομή στην αριστερή πλευρά του ζώου, η απολίνωση του πρόσθιου κατιόντα κλάδου και τέλος η χρώση του καρδιακού ιστού με την χρωστική Evans Blue.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Στη σειρά περαμάτων που πραγματοποιήθηκε, 30 συνολικά μύες υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας ακολουθούμενα από 2 ώρες επαναιμάτωσης και τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες (εικόνα 23):

- Ομάδα ελέγχου I (control) (n=5): Χορήγηση φυσιολογικού ορού με 5% DMSO (που αποτελεί τον διαλύτη της ολιγομυκίνης και του μορίου BTB)
- Ομάδα ελέγχου II (control) (n=5): Χορήγηση φυσιολογικού ορού με Tween 5% (που αποτελεί τον διαλύτη των ενώσεων 1117,1119).
- Ομάδα Α(n=5): Χορήγηση της ένωσης 1117 με δοσολογία 3,61 mg/Kg (συγκέντρωση της ένωσης στο αίμα ίση με 50 μ M).
- Ομάδα Β (n=5): Χορήγηση της ένωσης 1119 με δοσολογία 3,5 mg/Kg (συγκέντρωση της ένωσης στο αίμα ίση με 50 μ M).
- Ομάδα Γ(n=5): Χορήγηση της ένωσης ολιγομυκίνη με δοσολογία 0,95 mg/Kg (συγκέντρωση της ένωσης στο αίμα ίση με 10 μ M).
- Ομάδα Δ (n=5): Χορήγηση της ένωσης BTB με δοσολογία 5 mg/Kg (συγκέντρωση της ένωσης στο αίμα ίση με 100 μ M).

Τα μόρια χορηγήθηκαν ενδοφλέβια μέσω της σφαγίτιδας φλέβας 5 λεπτά πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (ο χρόνος επιλέγει ώστε τα μόρια να φτάσουν στην περιοχή όπου δρουν και στην κατάλληλη συγκέντρωση, προκειμένου να ελέγχει η δράση τους).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση και επιλογή των ενώσεων

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αφορούσε την αξιολόγηση ενός πλήθους 53 ενώσεων, τα οποία προέρχονταν τόσο από τη χημειοθήκη του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ (pharmalab), όσο και από τη χημειοθήκη του εθνικού ινστιτούτου για τον καρκίνο (NCI) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, με την τεχνική *in vitro* αξιολόγησης της ικανότητας αναστολής της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης στη συγκέντρωση των 200μΜ.

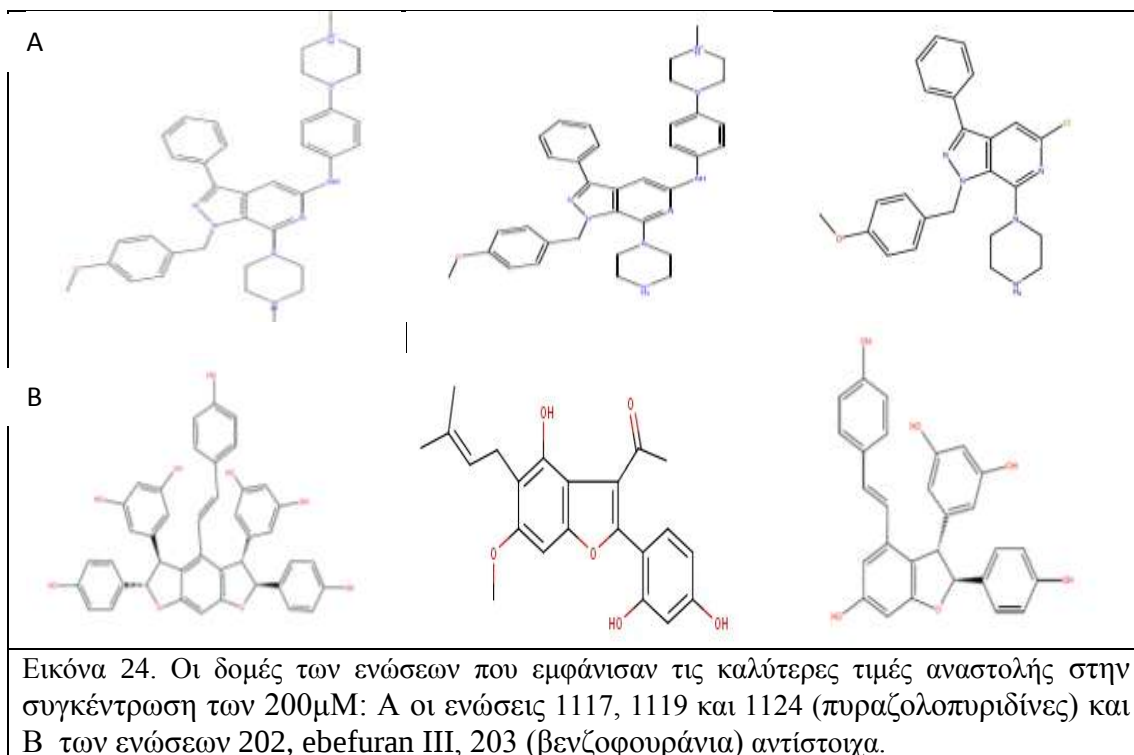
Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μοριακών προσομοιώσεων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη τέτοιων ενώσεων στη χημειοθήκη του τμήματος φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ (pharmalab), η οποία αριθμεί περισσότερα από 2000 ενώσεις, πολλές εκ' των οποίων είναι φυσικά προϊόντα αλλά και ενώσεις που έχουν συντεθεί στο οικείο τμήμα. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ομοιότητας, μεταξύ των μορίων BMS και BTB (τα οποία είναι πρότυποι αναστολείς) και των μορίων της χημειοθήκης pharmalab. Ακολούθησαν μελέτες υπολογισμού πρόσδεσης και αποτίμησης των επιλεχθέντων μορίων με τις 3 κύριες θέσεις αναστολής του μοντέλου του ενζύμου ATP συνθάση μυός (mus musculus) το οποίο μοντελοποιήθηκε για πρώτη φορά από το εργαστήριο μοριακών προσομοιώσεων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των ενώσεων που δοκιμάστηκαν *in vitro*. Συνολικά δοκιμάστηκαν *in vitro* σε απομονωμένα μιτοχόνδρια 38 ενώσεις από την χημειοθήκη Pharmalab.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι 2 μοριακοί σκελετοί οι οποίοι εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα ως προς την αναστολή της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης: η χημική κατηγορία των πυραζολοπυριδινών και η χημική κατηγορία των βενζοφουρανίων.

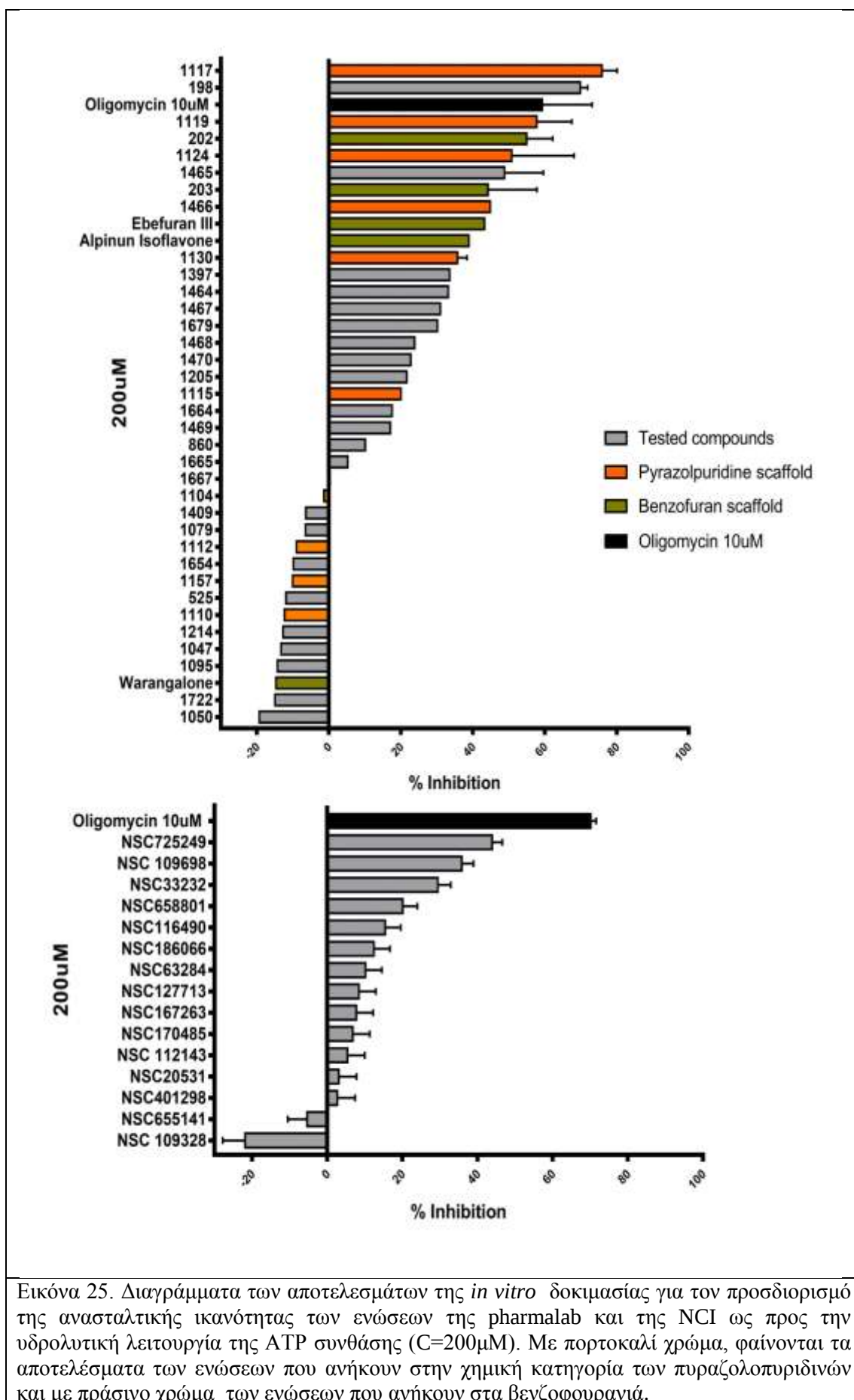
Η ένωση 1117 εμφάνισε την ισχυρότερη αναστολή επί του ενζύμου ($75,93\% \pm 4,22$). Ακολούθησε η ένωση 198 ή ρεσβερατρόλη ($69,89\% \pm 2,05$), η ένωση 1119 ($57,80\% \pm 9,75$) και οι ενώσεις 202 ($54,99\% \pm 7,28$), 1124 ($50,86\% \pm 17,34$) και 1465 ($48,85\% \pm 10,78$). Ο πρότυπος αναστολέας ολιγομυκίνη εμφάνισε ισχυρή αναστολή στα 10 μΜ ($59,35\% \pm 13,83$) (εμφανίζονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση) (Εικόνα 24). Αξίζει να σημειωθεί σχετικά με την χημική κατηγορία των βενζοφουρανίων, ότι οι ενώσεις ebefuran III και alpinum isoflavone, είναι μόρια φυσικής προέλευσης (όπως και κάποια άλλα βενζοφουράνια που μελετήθηκαν). Το ebefuran III απομονώθηκε από το εκχυλίσμα της ρίζας του φυτού *Onobrychis alba* subsp. *laconic*. Το alpinum isoflavone ή αλπινομισοφλαβόνη, είναι

παράγωγο της γενιστεΐνης και παραλήφθηκε, από του κλάσμα το εκχυλίσματος του φλοιού του φυτού *Erythrina excelsa*. Και τα δύο βενζοφουράνια έχουν μελετηθεί *in vitro* για διάφορες παθολογικές καταστάσεις (ωστόσο μόνο η πρώτη επέδειξε σχετικά καλή ανασταλτική δράση). Οι δομές των καλύτερων ενώσεων των δύο χημικών κατηγοριών που προέκυψαν, φαίνονται παρακάτω (εικόνα 24)



Ακόμη, διενεργήθηκε μελέτη 3D likeness από το εργαστήριο μοριακών προσομοιώσεων του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, η οποία χρησιμοποιείται για την σύγκριση σκελετών μορίων και κοινών στοιχείων σύνδεσης και στηρίζεται στην ιδέα ότι τα μόρια έχουν παρόμοιο σχήμα αν οι μοριακοί όγκοι τους στο χώρο επικαλύπτονται καλά και έχουν την πιθανότητα να εμφανίσουν παρόμοιες δράσεις. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μεταξύ των ενώσεων BMS, BTB του σκελετού των πυραζολοπυριδινών που επέδειξαν αναστολή επί του ενζύμου και ενώσεων της βιβλιοθήκης NCI (η οποία αριθμεί περί τα 266,150 μόρια). Τελικά επιλέχθηκαν 15 ενώσεις της προαναφερθείσας βιβλιοθήκης, τα οποία δοκιμάστηκαν κατόπιν *in vitro*. Καθώς όμως, οι ενώσεις αυτές, δεν εμφάνισαν ικανοποιητική αναστολή, δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω (η καλύτερη ένωση της κατηγορίας εμφάνισε επίπεδα αναστολής $43,90 \% \pm 2,73$).

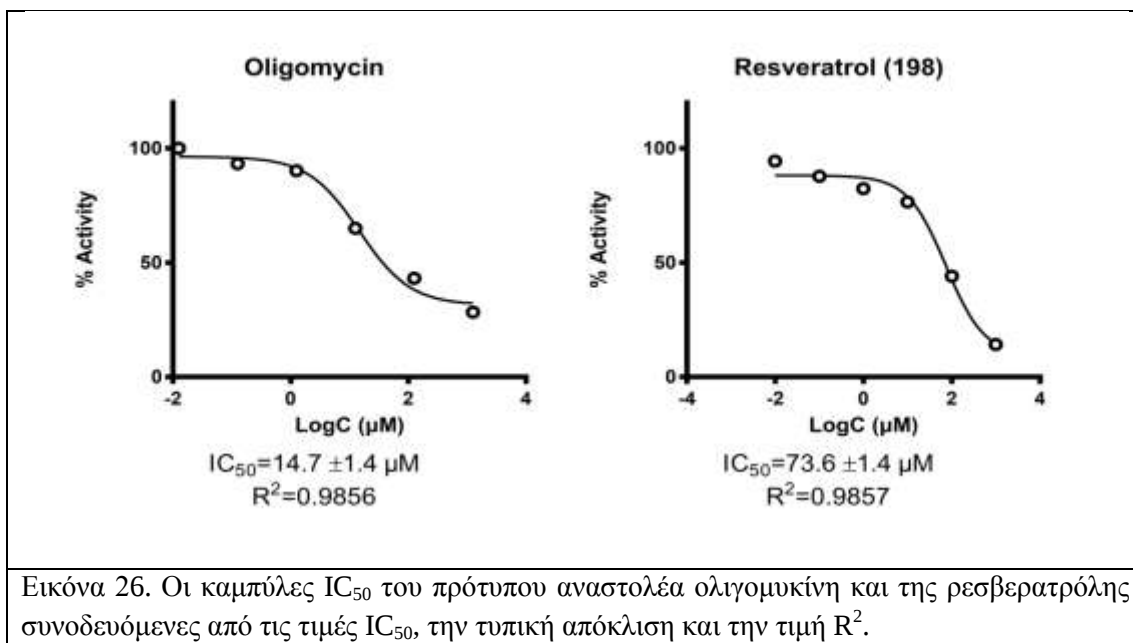
Παρακάτω (εικόνα 25) φαίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων της *in vitro* δοκιμασίας, τόσο για τις ενώσεις της pharmlab στο πάνω μέρος, όσο και της βιβλιοθήκης του NCI στη συγκέντρωση των 200μΜ στο κάτω μέρος:



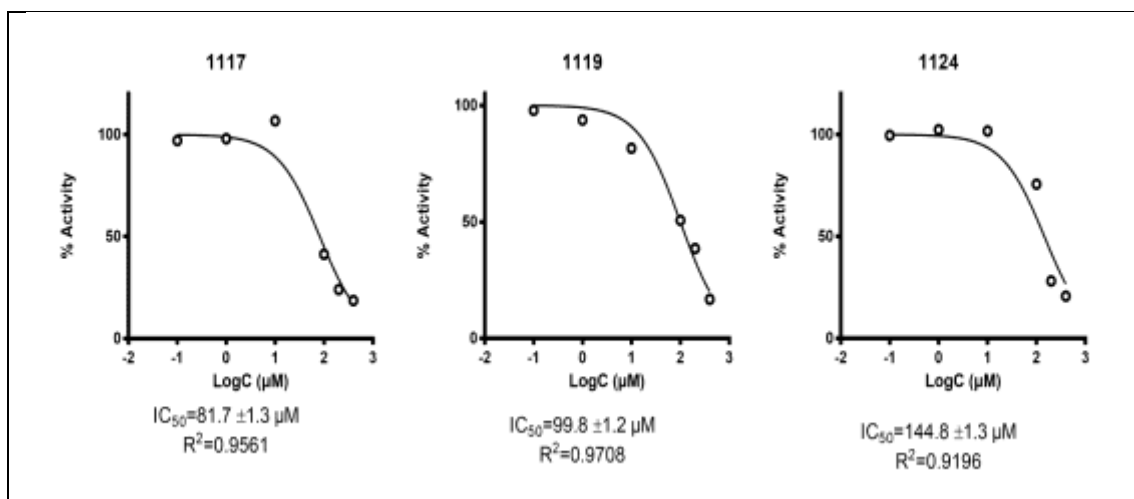
Εικόνα 25. Διαγράμματα των αποτελεσμάτων της *in vitro* δοκιμασίας για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής ικανότητας των ενώσεων της pharmlab και της NCI ως προς την υδρολυτική λειτουργία της ATP συνθάσης (C=200μM). Με πορτοκαλί χρώμα, φαίνονται τα αποτελέσματα των ενώσεων που ανήκουν στην χημική κατηγορία των πυραζολοπυριδινών και με πράσινο χρώμα των ενώσεων που ανήκουν στα βενζοφουρανιά.

Προσδιορισμός της τιμής IC_{50}

Οι ενώσεις οι οποίες εμφάνισαν το μεγαλύτερο % ποσοστό αναστολής της υδρόλυσης, επελέγησαν μεταξύ των υπολοίπων και η δράση τους αξιολογήθηκε περαιτέρω με τον προσδιορισμό της ανασταλτικής ικανότητας των ενώσεων επί του ενζύμου ως προς το 50% της λειτουργίας αυτού (IC_{50}). Στις παρακάτω εικόνες (εικόνες 25-27), εμφανίζονται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών IC_{50} που προέκυψαν καθώς και οι προσδιορισθείσες τιμές (για κάθε μόριο πραγματοποιήθηκαν $n=3$ βιολογικές επαναλήψεις-μετρήσεις). Αρχικά, εμφανίζονται οι καμπύλες IC_{50} των πρότυπων μορίων (ολιγομυκίνη και ρεσβερατρόλη (198)) (εικόνα 26).

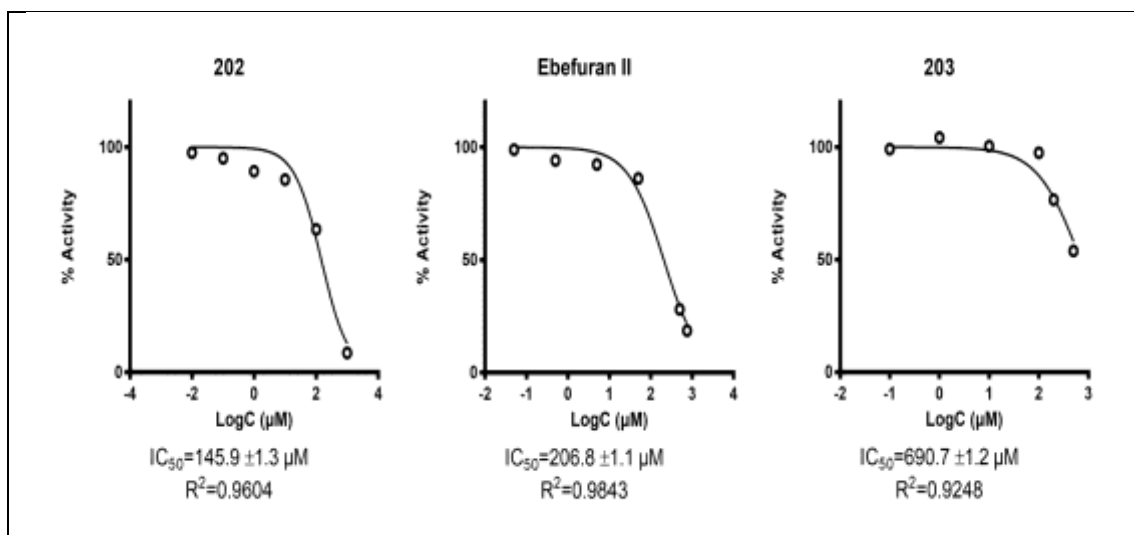


Στη συνέχεια (εικόνα 27) παρατίθενται οι καμπύλες IC_{50} των τριών καλύτερων αναστολέων που ανήκουν στις πυραζολοπυριδίνες (1117, 1119, 1124):



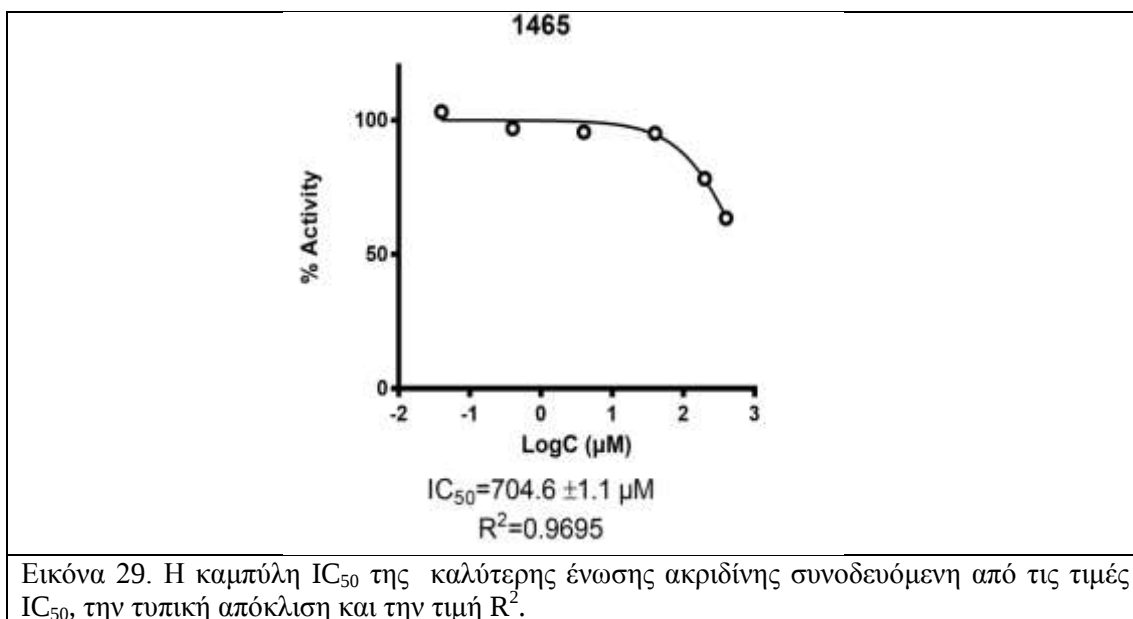
Εικόνα 27. Οι καμπύλες IC_{50} των 3 καλύτερων πυραζολοπυριδινών συνοδευόμενες από τις τιμές IC_{50} , την τυπική απόκλιση και την τιμή R^2 (παρατίθενται σε αυξανόμενη σειρά των τιμών IC_{50}).

Ακολούθως, (εικόνα 28) φαίνονται οι καμπύλες IC_{50} των τριών καλύτερων αναστολέων που ανήκουν στα βενζοφουρανία (1117,1119,1124):



Εικόνα 28. Οι καμπύλες IC_{50} των 3 καλύτερων βενζοφουρανίων συνοδευόμενες από τις τιμές IC_{50} , την τυπική απόκλιση και την τιμή R^2 (παρατίθενται σε αυξανόμενη σειρά των τιμών IC_{50}).

Τέλος παρατίθενται η καμπύλη IC_{50} του καλύτερου αναστολέα που ανήκει στην κατηγορία των ακριδινών (εικόνα 29):



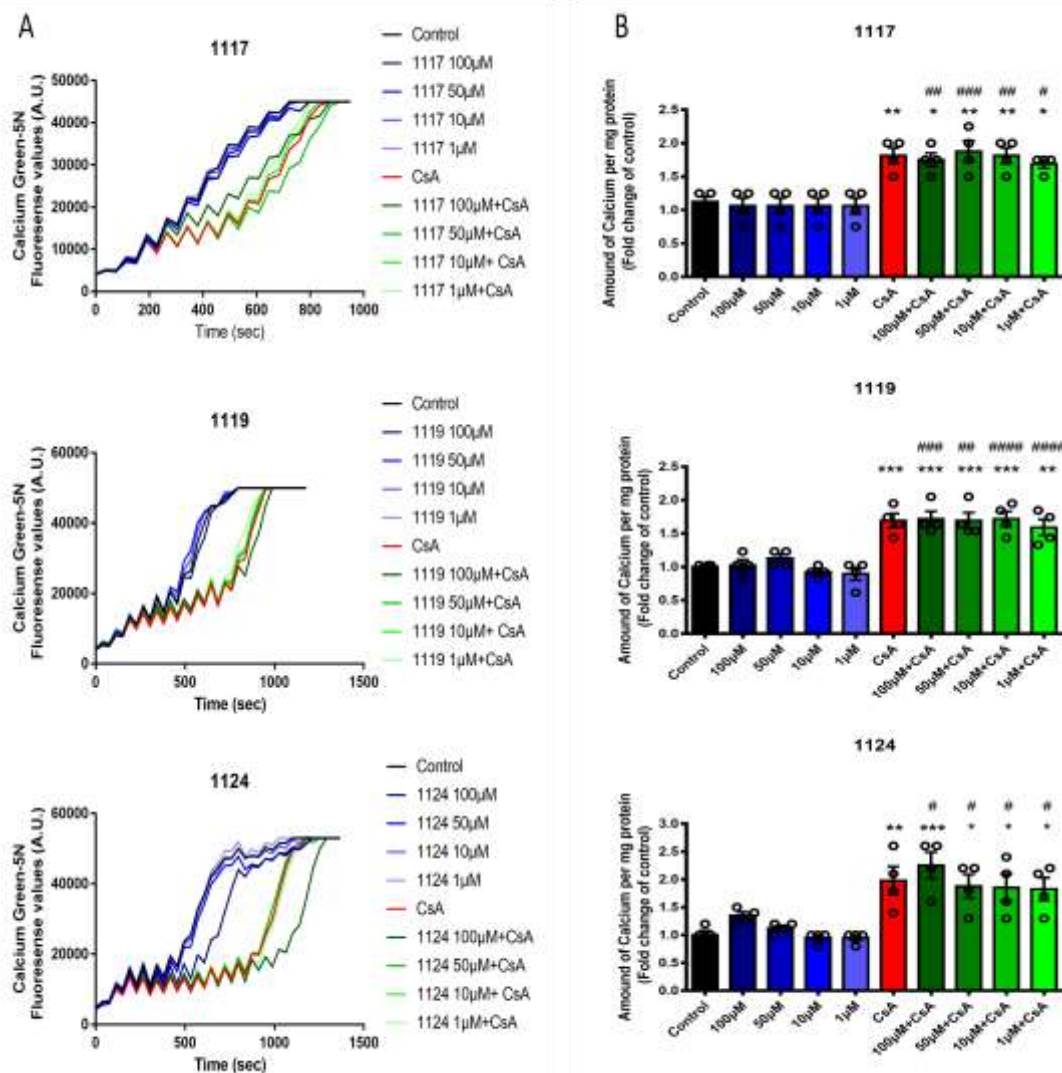
Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6) φαίνονται οι τιμές IC_{50} και του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) για κάθε ένωση (με πορτοκαλί χρώμα, φαίνονται τα αποτελέσματα των ενώσεων που ανήκουν στην χημική κατηγορία των πυραζολοπυριδινών, με πράσινο χρώμα αυτών των βενζοφουρανίων, με μαύρο της ολιγομυκίνης και της ένωσης 198 (ρεσβερατρόλη) και με γκρι της ένωσης 1465(ακριδίνη)):

Όνομα/κωδικός ένωσης	$IC_{50}(\mu M)$	Goodness fit (R^2)
1117	81,7	0,9561
1119	99,8	0,9708
1124	144,8	0,9196
202	145,9	0,9604
Ebefuran III	206,8	0,9843
203	690,07	0,9248
Ολιγομυκίνη	14,7 (μg/mL)	0,9856
198	73,6	0,9857
1465	704,6	0,9695
Πίνακας 6. Τα ονόματα, οι τιμές IC_{50} και του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) για κάθε ένωση.		

Αξιολόγηση της πιθανής δράσης των ενώσεων επί του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mPTP)

Εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης που εμφανίζουν οι παραπάνω ενώσεις επί της ATP συνθάσης, θεωρήθηκε εύλογο να εξετασθεί η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των αναστολέων

με τον μιτοχονδριακό πόρο μεταβλητής διαπερατότητας (mPTP), καθώς, έχει καταφανεί από πλήθος μελετών ότι η ATP συνθάση αποτελεί δομικό συστατικό του mPTP. Έτσι, οι ενώσεις υποβλήθηκαν στη δοκιμασία αξιολόγησης της μιτοχονδριακής συγκράτησης ασβεστίου (CRC), σε συγκεντρώσεις από 100 μ M ως 1 μ M όπως αναφέρθηκαν παραπάνω (για κάθε ένωση πραγματοποιήθηκαν $n=3$ μετρήσεις με 2 επαναλήψεις ανά μέτρηση). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι παραπάνω ενώσεις δεν επηρεάζουν τη λειτουργία του mPTP και επιπλέον δεν φαίνεται να επηρεάζουν και τη δράση του πρότυπου αναστολέα. Στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνα 30) φαίνονται τόσο η ανίχνευση φθορισμού του εξωμιτοχονδριακού ασβεστίου, όσο και τα αποτελέσματα της δράσης των ενώσεων επί του mPTP.

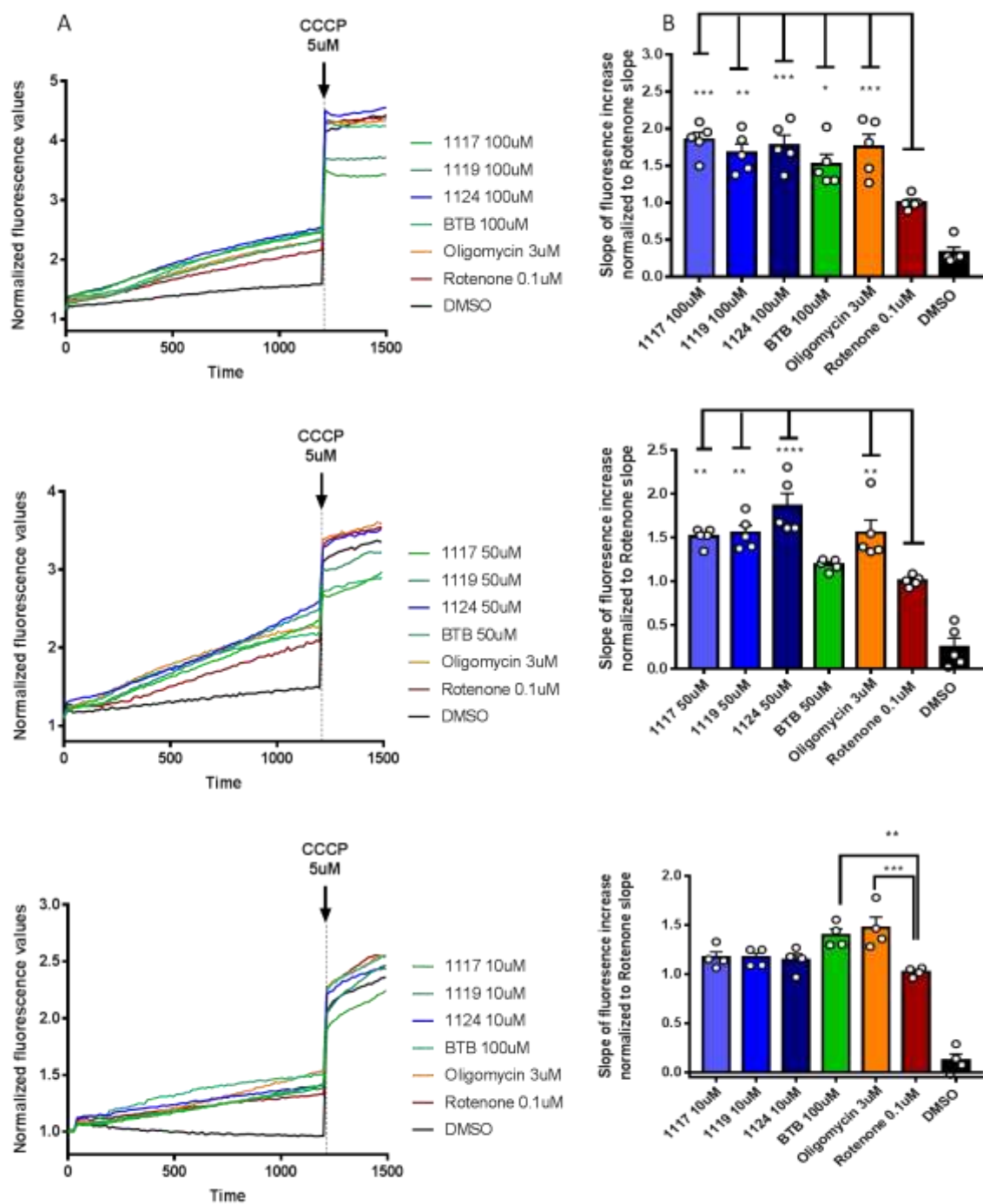


Εικόνα 30. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη δράση των ενώσεων επί της διάνοιξης του mPTP σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Η ικανότητα κατακράτησης ασβεστίου προσδιορίστηκε σε μιτοχόνδρια μυών που υποβλήθηκαν σε *in vitro* επώαση με τους αναστολείς και συγκρίθηκε με αυτά που υποβλήθηκαν σε επώαση με τον διαλύτη. Το γράφημα αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού του εξωμιτοχονδριακού ασβεστίου (Σχήμα A). Οι ράβδοι εμφανίζουν μέση τιμή $\pm$ SD (Σχήμα B) ($n = 3$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ σε σύγκριση με την ομάδα του control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ σε σύγκριση με τις ομάδες συνδυασμού κυκλοσπορίνης/ένωσης)

Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής, της εκλεκτικότητας, της τοξικότητας και της ικανότητας διάβασης των κυτταρικών μεμβρανών από τους αναστολείς με την τεχνική TMRM.

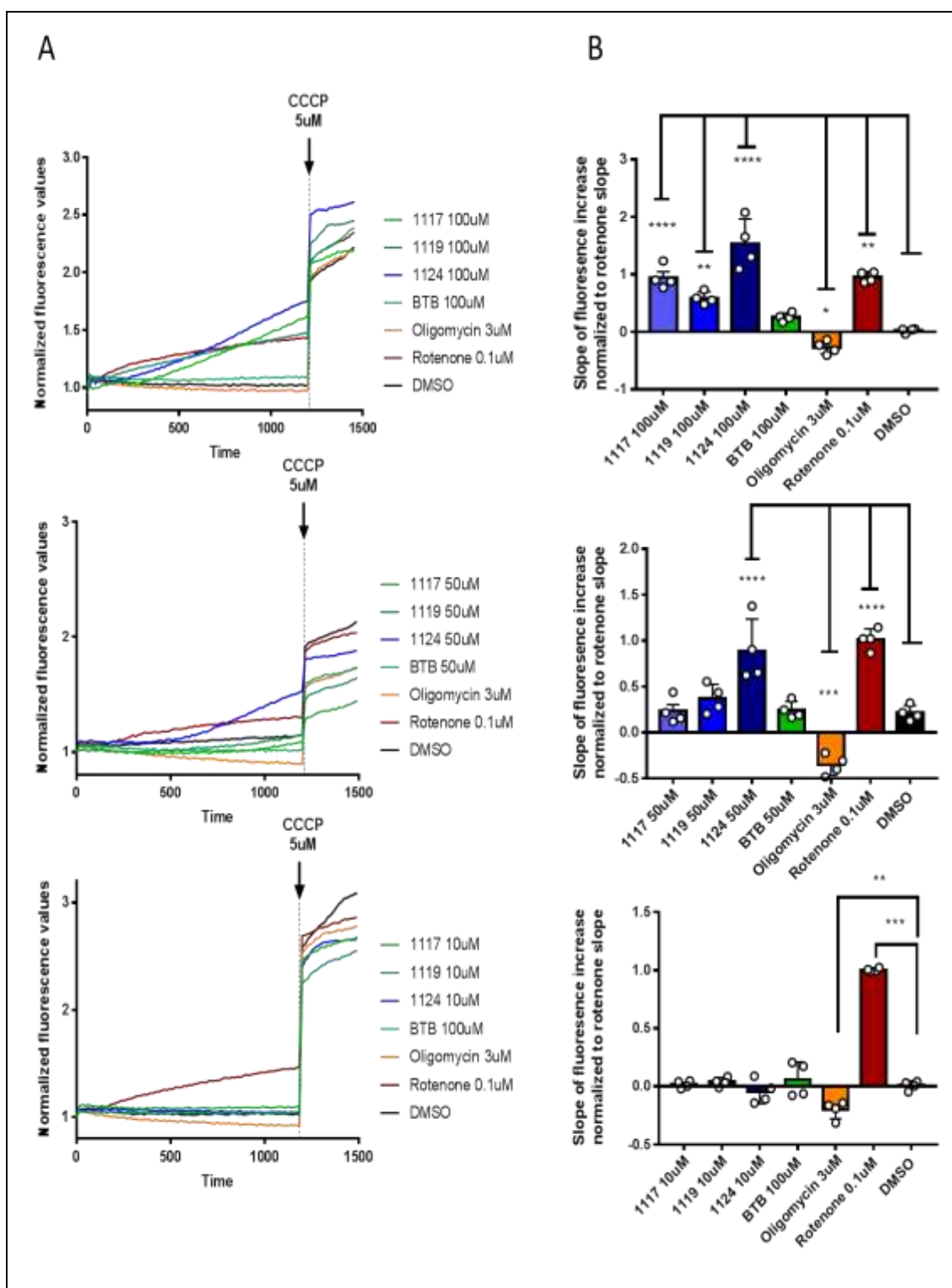
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ενώσεις εμφάνιζαν ανασταλτική δράση, όχι μόνο όταν το μιτοχόνδριο είναι απομονωμένο αλλά και όταν βρίσκεται εντός του κυττάρου, οι ενώσεις υποβλήθηκαν στην τεχνική προσδιορισμού δυναμικού μεμβράνης με τη χρωστική TMRM. Όλοι οι αναστολείς, δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 100μM, 50μM και 10μM. Τα αποτελέσματα αυτής της αξιολόγησης, τα οποία φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνα 31), ήλθαν σε συμφωνία με αυτά των προηγούμενων δοκιμασιών και επιπλέον κατέστη σαφές, ότι οι ενώσεις έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να εκδηλώνουν τη δράση τους και εντός του κυτταρικού περιβάλλοντος (για κάθε ένωση πραγματοποιήθηκαν $n=3$ μετρήσεις με 2 επαναλήψεις ανά μέτρηση). Συγκεκριμένα, οι ενώσεις 1117, 1119 και 1124, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αναστολή του ενζύμου στις συγκεντρώσεις των 100μM και 50μM, ενώ δεν φάνηκε (οριακά) να αναστέλλουν το ένζυμο στη συγκέντρωση των 10μM.

Θεωρήθηκε δε σκόπιμη η σύγκριση των παραπάνω μορίων με τον εκλεκτικό αναστολέα BTB 06584, ο οποίος θεωρείται ένας από τους πρότυπους εκλεκτικούς αναστολείς στη βιβλιογραφία (Ivanov et al., 2014). Τα αποτελέσματα, έδειξαν ότι και οι τρεις υπό εξέταση αναστολείς εμφάνισαν ισχυρότερη αναστολή επί του ενζύμου σε σχέση με το μόριο BTB 06584. Μάλιστα, ενώ οι τρεις αναστολείς εμφάνισαν δράση στη συγκέντρωση των 50μM, το μόριο BTB δεν ανέστειλε τη λειτουργία του ενζύμου στατιστικά σημαντικά στη συγκέντρωση αυτή (και για αυτόν το λόγο, δεν δοκιμάστηκε στη συγκέντρωση των 10μM).



Εικόνα 31. Η ικανότητα αναστολής της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης των 3 αναστολέων και του μορίου BTB (εκλεκτικός πρότυπος αναστολέας) στις συγκεντρώσεις των 100 μM, 50 μM και 10 μM αντίστοιχα, όπως προσδιορίστηκαν με την τεχνική TMRM. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ολιγομυκίνη. Τα αριστερά διαγράμματα (σχήμα A) απεικονίζουν τις καμπύλες ανέγερσης φθορισμού, ενώ τα ραβδογράμματα (σχήμα B) τις κανονικοποιημένες τιμές των αναστολέων ως προς την καμπύλη της ροτενόνης (οι ράβδοι εμφανίζουν τη μέση τιμή $\pm$ SD) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με την ομάδα της ροτενόνης)

Προκειμένου να ελεγχθεί το εκλεκτικό ή μη προφίλ των αναστολέων, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε με μία τροποποίηση: δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη του μορίου ροτενόνη. Η ροτενόνη εξαιτίας της αποπόλωσης που προκαλεί, επιφέρει μεγάλη αύξηση στο καταγραφόμενο σήμα του φθορισμού. Αν παρατηρηθεί σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, πάνω από τη γραμμή βάσης απουσία ροτενόνης, τότε η ένωση θεωρείται τοξική, καθώς προκαλεί αποπόλωση του κυττάρου. Αν εμφανίσει σημαντική μείωση του καταγραφόμενου σήματος τότε η ένωση θεωρείται ότι διαθέτει προφίλ μη εκλεκτικού αναστολέα, καθώς υπερπολώνει το κύτταρο λόγω του γεγονότος ότι αναστέλλει και τις δύο λειτουργίες του ενζύμου ATP συνθάση. Αν τα επίπεδα του φθορισμού παραμείνουν σχετικά κοντά στη γραμμή βάσης, τότε η ένωση θεωρείται εκλεκτική, καθώς αναστέλλει μόνο την υδρολυτική λειτουργία του ενζύμου και δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές στο καταγραφόμενο σήμα. Τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνα 32), υποδεικνύουν πως οι ενώσεις 1117, 1119 και 1124 εμφανίζουν εκλεκτικό προφίλ στη συγκέντρωση των 10μM ενώ οι ενώσεις 1117 και 1119 εμφανίζουν εκλεκτικό προφίλ και στη συγκέντρωση των 50μM. Καμία ένωση ωστόσο δεν εμφάνισε εκλεκτικότητα στη συγκέντρωση των 100μM, ενώ η ένωση 1124 απεδείχθη τοξική για τα κύτταρα στις συγκεντρώσεις των 100μM και 50μM. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι όλες οι ενώσεις εμφάνισαν τοξικότητα σε συγκεντρώσεις από 100μM και πάνω. Αντίθετα η ένωση BTB δεν εμφάνισε τοξικότητα σε καμία από τις δοκιμασθείσες συγκεντρώσεις.

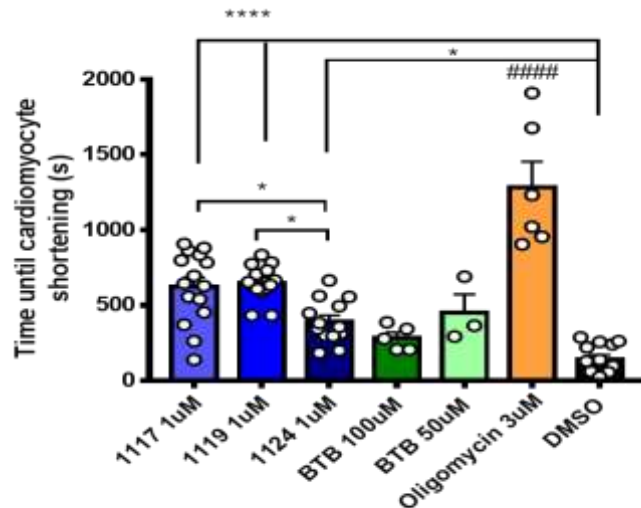


Εικόνα 32. Έμμεσος προσδιορισμός της εκλεκτικότητας των 3 αναστολέων μέσω παραλλαγής της τεχνικής TMRM. Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 100μM, των 50μM και των 10μM. Τα αριστερά διαγράμματα (σχήμα A) απεικονίζουν τις καμπύλες ανίχνευσης φθορισμού, ενώ τα ραβδογράμματα τις κανονικοποιημένες τιμές των αναστολέων ως προς την καμπύλη της ροτενόνης (οι ράβδοι εμφανίζουν τη μέση τιμή ± SD) (σχήμα B) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με την ομάδα της ροδαμίνης)

Προσδιορισμός της επίδρασης των 3 ενώσεων ως προς την ικανότητα αύξησης του χρόνου επιβίωσης καρδιομυοκυττάρων

Αφού ολοκληρώθηκε ο αξιολόγηση των ενώσεων με την τεχνική TMRM, ακολούθησε η πειραματική διαδικασία εκτίμησης του χρόνου επιβίωσης των καρδιομυοκυττάρων. Ο στόχος ήταν να αξιολογηθεί, αν η ικανότητα αναστολής της υδρολυτικής λειτουργίας του ενζύμου ATP συνθάση είναι ικανή να διασφαλίσει την αύξηση της επιβίωσης των καρδιομυοκυττάρων σε κατάσταση αποσύζευξης της μιτοχονδριακής αλύσου καθώς και αν οι παραπάνω αναστολείς επιτυγχάνουν αυτό το αποτέλεσμα. Η παρούσα τεχνική πραγματοποιήθηκε στο πανεπιστήμιο UCL (University College of London), στο εργαστήριο Hatter Cardiovascular Institute (δεν παρατίθεται πειραματική διαδικασία για το παρόν πείραμα).

Έτσι, αφού απομονώθηκαν μυϊκά κύτταρα από καρδιές επιμύων, με τη χρήση του αντιδραστηρίου καρβονυλκυανιδο-4-(τριφθορομεθοξυ)-φαινυλδραζόνη (FCCP), επετεύχθη αποσύζευξη της αναπνευστικής αλυσίδας. Μέρος των κυττάρων είχε επωαστεί στα διαλύματα των διαφόρων αναστολέων σε συγκέντρωση 1μM, (εκτός από το μόριο BTB το οποίο δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις των 100μM και 50μM και την ολιγομυκίνη που δοκιμάστηκε στα 3μM), καθώς σε συγκεντρώσεις άνω των 50μM, όλα τα μόρια εμφάνισαν τοξικότητα επί των κυττάρων. Ακολούθως με τη χρήση μικροσκοπίου confocal παρατηρήθηκαν οι χρόνοι επιβίωσης των κυττάρων (χρόνος μέχρι την έναρξη της βράχυνσης των κυττάρων) και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία. Τα αποτελέσματα της πειραματικής αυτής διαδικασίας φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (για κάθε μόριο πραγματοποιήθηκαν n=3-15 μετρήσεις με n=2 απομονώσεις καρδιομυοκυττάρων –βιολογικές επαναλήψεις) (εικόνα 33).

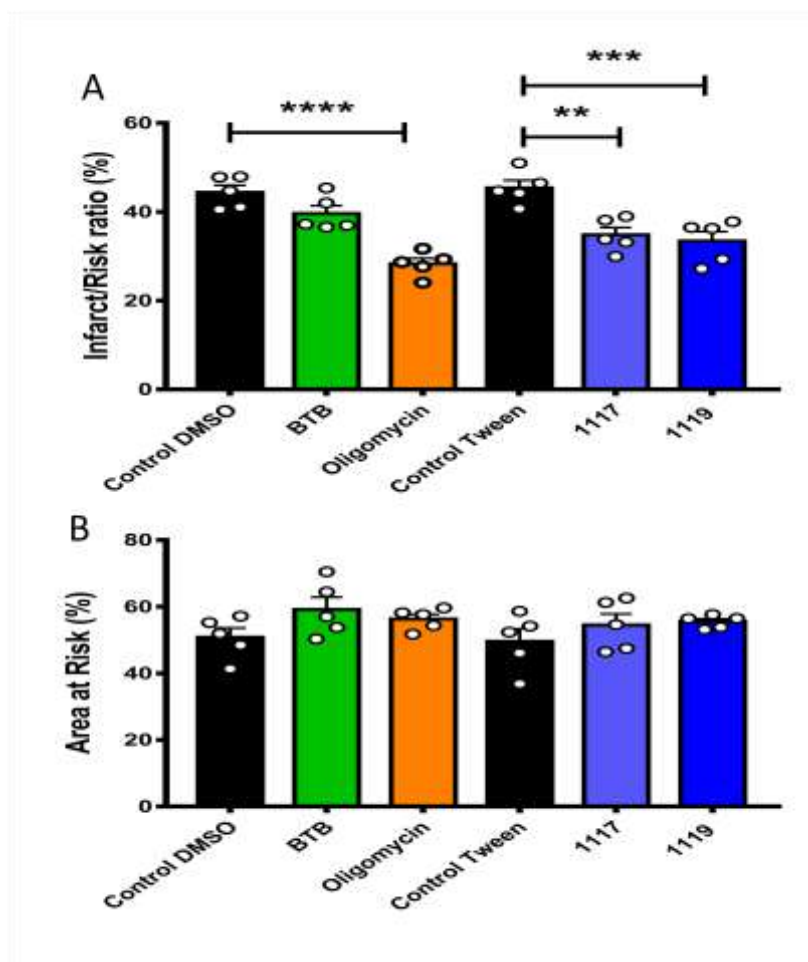


Εικόνα 33. Η ικανότητα των αναστολέων της ATP υδρολάσης να επηρεάσουν τον χρόνο επιβίωσης των καρδιομυοκυττάρων μετά από αποσύζευξη της αναπνευστικής αλυσίδας, όταν αυτά έχουν επωασθεί με τον εκάστοτε αναστολέα αντίστοιχα (οι ράβδοι εμφανίζουν τη μέση τιμή $\pm$ SD). (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ σε σύγκριση με τις ενδεδειγμένες ομάδες, #### $p < 0.001$ σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες)

Προσδιορισμός της επίδρασης των 2 καλύτερων ενώσεων στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε *in vivo* πειράματα σε μύες

Μετά την εκτίμηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, 2 ενώσεις εκ των 3 να προχώρησαν σε *in vivo* μελέτες. Έτσι οι ενώσεις 1117 και 1119 δοκιμάστηκαν σε *in vivo* μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μυών. Στόχος ήταν η διερεύνηση της ικανότητάς τους να μειώνουν την έκταση του εμφράγματος και συνεπώς της νεκρωτικής βλάβης στο μυοκάρδιο. Για τον σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν με εφάπαξ δόση 5 λεπτά πριν την έναρξη της ισχαιμίας. Ο χρόνος επιλέχθηκε ώστε τα μόρια να φτάσουν στην περιοχή που θα ισχαιμίζει και να εμφανίσουν την δράση τους. Παράλληλα δοκιμάστηκαν και το μόριο ολιγομυκίνη (πρότυπος μη εκλεκτικός αναστολέας) και το μόριο BTB (πρότυπος εκλεκτικός αναστολέας). Για κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκαν $n=5$ πειραματόζωα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις ολιγομυκίνη, 1117 και 1119 μειώνουν στατιστικά σημαντικά την έκταση του εμφράγματος σε αντίθεση με την ένωση BTB το οποίο δεν την μειώνει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνα 34) φαίνονται τα αποτελέσματα του *in vivo* πρωτοκόλλου για τις παραπάνω ενώσεις.



Εικόνα 34. Διαγραμματική αναπαράσταση της περιοχής του εμφράγματος ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I / R) (Σχήμα 3A) και της περιοχής σε κίνδυνο ως προς ολόκληρη την περιοχή των τομών του μυοκαρδίου (% R / A) (Σχήμα 3B). Τα ζώα υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά καρδιακής ισχαιμίας με απόφραξη του αριστερού πρόσθιου κατιόντα κλάδου της στεφανιαίας αρτηρίας, ακολουθούμενη από 2 ώρες επαναιμάτωσης. Οι ενώσεις χορηγήθηκαν i.v. bolus 5 λεπτά πριν από την ισχαιμία. (μέσος όρος $\pm$ SD) (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 σε σύγκριση με την ομάδα control)

Συγκεκριμένα το ποσοστό της εμφραγματικής περιοχής στην ομάδα της ένωσης 1119, εμφανίστηκε ίσο με $33,4\% \pm 4,8$ ενώ στην ομάδα της ένωσης 1117, $34,8\% \pm 3,7$ (έναντι της ομάδας control Tween με $45,4\% \pm 3,8$). Το ποσοστό της εμφραγματικής περιοχής στην ομάδα της ολιγομυκίνης ανήλθε στο ποσοστό $28,3\% \pm 2,8$ ενώ της ένωσης BTB στο $39,6\% \pm 3,9$ (έναντι της ομάδας control DMSO με $44,4\% \pm 3,5$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την ανάδειξη νέων ενώσεων με ικανοποιητική ανασταλτική ικανότητα επί της υδρολυτικής λειτουργίας του ενζύμου FoF1 ATP συνθάσης και τον έλεγχο των επιπτώσεων μίας τέτοιας δράσης, αρχικά *in vitro* και κατόπιν *in vivo*, όταν οι αντίστοιχοι αναστολείς χορηγηθούν σε κατάσταση ισχαιμίας του μυοκαρδίου.

Αξιολόγηση των ενώσεων της χημειοθήκης pharmalab

Ο *in vitro* έλεγχος σε περίπου 38 ενώσεις της pharmalab και 15 ενώσεις της NCI, κατέδειξε δύο μοριακούς σκελετούς ως τους πλέον υποσχόμενους για τον σκοπό της μελέτης, των σκελετό των πυραζολοπυριδινών και των βενζοφουρανίων. Στις ενώσεις οι οποίες επέδειξαν την μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα στην συγκέντρωση των 200μM (εικόνα 33), προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀. Επιπλέον προσδιορίστηκε και στην ένωση 1465 το οποίο εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά αναστολής από την χημική κατηγορία των ακριδινών (αρκετά χαμηλά όμως σε σχέση με τα προαναφερθέντα). Με γνώμονα τις τιμές IC₅₀ των ενώσεων (οι οποίες προσδιορίστηκαν n=3 φορές) επελέγησαν 3 ενώσεις για την επόμενο πειραματικό στάδιο. Οι ενώσεις αυτές ήταν οι εκπρόσωποι της κατηγορίας των πυράζολοπυριδινών (καθώς η ένωση 198 ή ρεσβερατρόλη, ήταν ήδη γνωστή για αυτήν την δράση της και οι άλλες ενώσεις που αξιολογήθηκαν εμφάνιζαν αναλογικά υψηλή τιμή IC₅₀ σε σχέση με τις επιλεχθείσες και άρα χαμηλή έως μέτρια ανασταλτική ισχύ).

Στη βιβλιογραφία, ειδικά την τελευταία δεκαετία, έχει αναφερθεί πλήθος ενώσεων οι οποίες εμφανίζουν ιδιότητες αναστολέα της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης. Μόρια, γνωστά από τη βιβλιογραφία ότι αναστέλλουν την λειτουργία της ATP συνθάσης είναι διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις, δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών όπως η ρεσβερατρόλη, η γενιστεΐνη και η κερκετίνη, ενώ και διάφορες φλαβόνες εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες καθώς και πλήθος άλλων ενώσεων ή ατόμων όπως το μαγνήσιο, τα οιστρογόνα, οι κατεχίνες, η κεμπερόλη κ.α. (πάνω από 300 φυσικά και συνθετικά μόρια έχουν καταγραφεί) (Kühlbrandt, 2019). Ειδικά για την κατηγορία των πολυφαινολών, έχει φανεί ότι εμφανίζουν ισχυρή αναστολή του ενζύμου και μάλιστα για τη δράση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη του φαινολικού δακτυλίου τουλάχιστον δύο φορές όπως π.χ. η ρεσβερατρόλη (Hong and Pedersen, 2008; Zheng and Ramirez, 2000), γεγονός που επιβεβαιώθηκε πειραματικά και στην παρούσα μελέτη. Επίσης ενώσεις όπως τα στιλβένια ή οι φλαβόνες είναι δυνατό να εμφανίσουν ανασταλτική δράση επί του ενζύμου καθώς και ορισμένα παράγωγα α-πυρονών (π.χ. αουροβερίνη), ορισμένα στεροειδή, ορισμένες αμφίφιλες κατιονικές χρωστικές (οι οποίες περιέχουν αμινομάδες) καθώς και τα 4 (N-αρυλμιδάζολο)-υποκατεστημένα βενζοπυράνια (Hong and Pedersen, 2008). Στην κατηγορία αυτή υπάγεται και ο πρότυπος και εκλεκτικός αναστολέα, το μόριο BMS. Ακόμη φυσικά προϊόντα όπως

μακρολίδες (που ομοιάζουν με την ολιγομυκίνη) και συνθετικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των διαρυλοκινολινών έχουν μελετηθεί για τον σκοπό αυτό. Μάλιστα, οι κατηγορίες αυτές των αναστολέων έχει βρεθεί ότι στοχεύουν την υπομονάδα c του ενζύμου και για τον λόγο αυτό δρουν ως μη εκλεκτικοί αναστολείς όπως και η ολιγομυκίνη (Pagliarani et al., 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι δράση της ολιγομυκίνης επιβεβαιώθηκε πειραματικά και στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, η μελέτη αυτή, κατέδειξε 2 νέους μοριακούς σκελετούς οι οποίοι δεν έχουν μέχρι πρότινος αναφερθεί ως αναστολείς της ATP συνθάσης. Από τις δύο κατηγορίες που προέκυψαν, οι πυράζολοπυριδίνες εμφάνισαν την πιο ισχυρή αναστολή επί του ενζύμου και για τον λόγο αυτό, οι τρεις καλύτερες ενώσεις της κατηγορίας αυτής αξιολογήθηκαν περαιτέρω.

Έλεγχος της πιθανής επίδρασης των επιλεχθέντων αναστολέων στον mPTP

Στο δεύτερο στάδιο των πειραμάτων, οι αναστολείς που επελέχθησαν, δηλαδή οι ενώσεις 1117, 1119 και 1124 αξιολογήθηκαν ως προς το αν αλληλεπιδρούν με τον mPTP. Μελέτες καταδεικνύουν ότι είτε ολόκληρο το ένζυμο, είτε διμερή του είτε η υπομονάδα c του ενζύμου ATP συνθάση αποτελεί δομικό συστατικό του μιτοχονδριακού πόρου (Neginakaya et al., 2019). Ο μιτοχονδριακός πόρος διαπερατότητας, διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην επιβίωση ή όχι του κυττάρου σε καταστάσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Η αναστολή του στη φάση της επαναιμάτωσης οδηγεί σε καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα και το πλέον γνωστό μόριο με τέτοια δράση είναι το μόριο της κυκλοσπορίνης (Nesci et al., 2018).

Στη βιβλιογραφία, τα τελευταία χρόνια, έχουν εμφανιστεί διάφοροι αναστολείς του mPTP. Ορισμένοι εξ' αυτών έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται και παράλληλα αναστέλλουν και την υπομονάδα c της ATP συνθάσης και άρα και τις δύο λειτουργίες αυτής. Μάλιστα συσχετίζουν τις δύο δράσεις μέσω της υπόθεσης ότι η c υπομονάδα του ενζύμου αποτελεί και συστατικό του πόρου. Ορισμένα είναι φυσικά προϊόντα (όπως ο απομονωμένος μεταβολίτης DSS από το φυτό Danshen) (Gao et al., 2017), ενώ άλλα συνθετικές ενώσεις (παράγωγα του 1,3,8 αζασπυρο[4.5]δεκάνια) (Morciano et al., 2018). Μολαταύτα, νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ATP συνθάση παίζει μικρό ή και καθόλου ρόλο στον σχηματισμό του mPTP (Carroll et al., 2019). Έτσι, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστούν τα υπό μελέτη τρία μόρια και ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον μιτοχονδριακό πόρο διαπερατότητας.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι οι ενώσεις δεν επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας και έτσι έρχονται σε συμφωνία με την

νεώτερη άποψη ότι η ATP συνθάση δεν αποτελεί σημαντικό δομικό στοιχείο του mPTP. Επίσης, οι ενώσεις, δεν επηρεάζουν την αναστολή της λειτουργίας του πόρου όταν αυτή επιτυγχάνεται από τον αναστολέα του κυκλοσπορίνη. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι οι αναστολείς που δοκιμάσθηκαν δεν εμφανίζουν τοξικότητα μέσω του mPTP, καθώς δεν μειώνουν το CRC. Ταυτόχρονα, οι υπό μελέτη ενώσεις δεν θα μπορούσαν να δράσουν ευεργετικά στη φάση της επαναιμάτωσης καθώς η κύρια αιτία θανάτου των καρδιομυοκυττάρων στη φάση της επαναιμάτωσης είναι η διάνοιξη του mPTP. Συνεπώς οι ενώσεις, για να εμφανίζουν μία δυνητική καρδιοπροστασία, θα πρέπει να χορηγηθούν στη φάση της ισχαιμίας ή πριν από αυτή. Έτσι οι ενώσεις, αφού δεν αποδείχθηκαν τοξικές ως προς την διάνοιξη του πόρου, προχώρησαν σε περεταίρω αξιολόγηση της δράσης τους αλλά και της ικανότητάς τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες.

Στην παρούσα μελέτη ωστόσο, υπάρχει ο περιορισμός ότι τα μιτοχόνδρια που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονταν από ζώα φυσιολογικής οξυγόνωσης και όχι από ζώα που είχαν υποστεί ισχαιμία.

Αξιολόγηση των αναστολέων με την τεχνική TMRM

Η επόμενη σειρά πειραμάτων αφορούσε την περεταίρω αξιολόγηση της ανασταλτικής ικανότητας, αλλά και της τοξικότητας και της εκλεκτικότητας των ενώσεων μέσω της τεχνικής TMRM.

Στη βιβλιογραφία η τεχνική TMRM έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της δραστηριότητας της ένωσης BTB έναντι της ATP συνθάσης (Ivanov et al., 2014). Για το λόγο αυτό αξιολογήθηκε και η ένωση BTB μαζί με τα υπόλοιπα μόρια. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας, καθώς η ένωση BTB επέδειξε δράση αναστολέα στη συγκέντρωση των 100 μM . Οι ενώσεις 1117, 1119 και 1124 ωστόσο επέδειξαν ισχυρότερη αναστολή επί της ATP συνθάσης και στα 100 και στα 50 μM . Παράλληλα φάνηκε ότι η ένωση 1124 εμφάνισε αυξημένη τοξικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα που δοκιμάσθηκαν.

Αξιολόγηση της επίδρασης των 3 ενώσεων ως προς την ικανότητα αύξησης του χρόνου επιβίωσης καρδιομυοκυττάρων

Προκειμένου να υπάρξει ένα προκαταρκτικό πείραμα πριν τη μετάβαση στα *in vivo* πειράματα, προαγαποποιήθηκε ένα πείραμα αποσύζευξης της αναπνευστικής αλυσίδας σε καρδιομυοκύτταρα επίμυα. Συγκεκριμένα, με τη χρήση του αντιδραστηρίου FCCP επιτυγχάνεται η αποσύζευξη της αναπνευστικής αλυσίδας των κυττάρων, μέσω διαταραχής της εισόδου των πρωτονίων στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η αποσύζευξη της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, είναι ένα από τα φαινόμενα που λαμβάνει χώρα στη φάση της

ισχαιμίας (ή υποξίας στα κύτταρα), και το πιο σημαντικό για τη μελέτη του ρόλου των αναστολέων της υδρόλυσης της ATP από την ATP συνθάση. Όταν λάβει δε χώρα σε παρατεταμένη περίοδο, οδηγεί σε βράχυνση και συρρίκνωση των κυττάρων (και τελικά στον θάνατο). Αν και υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που συσχετίζουν τη χρήση FCCP σε καρδιομυοκύτταρα για τη μελέτη των επιπέδων ATP και το ρόλο της ATP συνθάσης στη φάση αυτή (ως εναλλακτική της υποξίας) (Das, 2003), εν τούτοις το συγκεκριμένο πείραμα για την αξιολόγηση της δράσης αναστολέων της ATP συνθάσης στην επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων δεν έχει πραγματοποιηθεί πιο πριν. Πραγματοποιήθηκε η μελέτη των 3 ενώσεων στο μοντέλο αυτό, και επειδή οι ενώσεις 1117 και 1119 έδειξαν ευεργετικότερη επίδραση από την 1124, επιλέχθηκαν για τα *in vivo* πειράματα.

Αξιολόγηση της επίδρασης των δύο καλύτερων ενώσεων στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο μυών

Οι δύο από τα τρεις παραπάνω ενώσεις που επελέγησαν αξιολογήθηκαν σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε μύες.

Στη βιβλιογραφία, υπάρχει μικρός αριθμός πειραμάτων, τα οποία αποδεικνύουν ότι η χορήγηση αναστολέων της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης, έχουν καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα σε ισχαιμία/επαναιμάτωση. Συγκεκριμένα, *ex vivo* μελέτες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε απομονωμένες καρδιές επίμυων, απέδειξαν μείωση του εμφράγματος και της κατανάλωσης ATP με τη χορήγηση πριν την ισχαιμία του μορίου BMS (Grover et al., 2004). Ακόμη *ex vivo* μελέτες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε απομονωμένες καρδιές κυνών, απέδειξαν μείωση του εμφράγματος και της κατανάλωσης ATP, όταν είχε προηγηθεί χορήγηση ολιγομυκίνης (Jennings and Reimer, 1991). Τέλος, μελέτες σε κυτταρικές σειρές της ένωσης BTB πριν την υποξία έδειξαν μείωση της νέκρωσης και της κατανάλωσης ATP σε κυτταρικό μοντέλο υποξίας/επανοξυγόνωσης (Ivanov et al., 2014).

Εξ' αιτίας του επιστημονικού "κενού" που υπάρχει σε *in vivo* πειράματα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση τέτοιων *in vivo* πειραμάτων. Έτσι οι δύο ενώσεις με το καλύτερο προφίλ ανασταλτικής ικανότητας και τοξικότητας, χορηγήθηκαν 5 λεπτά πριν την ισχαιμία σε μύες. Παράλληλα δοκιμάστηκαν και οι βιβλιογραφικοί αναστολείς ολιγομυκίνη και BTB για τους οποίους δεν υπήρχαν παρόμοια βιβλιογραφικά δεδομένα.

Η δοσολογία βασίστηκε δε στο γεγονός ότι οι υπό δοκιμή ενώσεις εμφανίζουν δράση σε συγκέντρωση 50μM, χωρίς να εμφανίζουν τοξικότητα. Μάλιστα, ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των πυραζολοπυριδινών έχουν χορηγηθεί ασφαλώς σε πειραματόζωα, σε υψηλότερες δόσεις στη βιβλιογραφία (Wenglowsky et al., 2011).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο ενώσεις έχουν την ικανότητα να μειώνουν στατιστικά σημαντικά την έκταση του εμφράγματος. Το ίδιο ισχύει και για την ολιγομυκίνη και έτσι η παρούσα μελέτη έρχεται σε συμφωνία με τα *ex vivo* πειράματα της βιβλιογραφίας για την ολιγομυκίνη. Μολαταύτα, η ένωση BTB δεν κατάφερε να μειώσει στατιστικά σημαντικά την έκταση του εμφράγματος, γεγονός που χρήζει περεταίρω διερεύνησης (καθώς δεν υπάρχουν παρόμοια πειράματα για το μόριο αυτό στη βιβλιογραφία).

Νεώτερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αναστροφή της λειτουργίας του ενζύμου δεν λαμβάνει χώρα σε καταστάσεις ισχαιμίας (πάρα μόνο αν συμβεί κατάλληλη πειραματική παρέμβαση) (García-Aguilar and Cuezva, 2018). Με βάση, λοιπόν τα παραπάνω, είναι δυνατό να υποτεθεί ότι το καρδιοπροστατευτικό όφελος που προκύπτει από την αναστολή της ATP συνθάσης, μπορεί να οφείλεται στην πλήρη αναστολή του και όχι μόνο στην αναστολή της υδρόλυσης. Καθώς όμως η υπόθεση αυτή, έρχεται σε αντίθεση με ορισμένα παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα (Symersky et al., 2012), πρέπει να υπάρξει μεγαλύτερη εμβάθυνση στον μηχανισμό επίτευξης της καρδιοπροστασίας από την αναστολή του ενζύμου αυτού. Παράλληλα, καθώς οι ενώσεις 1117 και 1119, οι οποίες είναι και αυτές εκλεκτικές (στη συγκέντρωση του πειράματος), εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση της εμφραγματικής περιοχής, πρέπει να υπάρξουν περαιτέρω μελέτες για τη διαλεύκανση του πλήρη μηχανισμού δράσης των ενώσεων αυτών.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα μελέτη κατέδειξε 2 ενώσεις οι οποίες έχοντας προφίλ αναστολέα της ATP συνθάσης, κατάφεραν να μειώσουν *in vivo* της έκταση του εμφράγματος σε μοντέλο ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης όταν χορηγούνται πριν από την κύρια περίοδο της ισχαιμίας. Με γνώμονα τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σχεδιάστηκε ως επόμενο βήμα η χορήγησή τους 5 λεπτά μετά την έναρξη της ισχαιμίας. Σκοπός είναι η διαπίστωση του αν οι ενώσεις μπορούν να φτάσουν και να δράσουν αν χορηγηθούν μετά την απόφραξη του αγγείου, ώστε τα αποτελέσματα να αποκτήσουν μεταφραστική αξία. Ακόμη θα πρέπει να διενεργηθούν περεταίρω πειράματα ώστε να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός των παραπάνω δράσεων (αν δηλαδή τα αποτελέσματα οφείλονται μόνο στην αναστολή της υδρολυτικής λειτουργίας της ATP συνθάσης ή υποκρύπτονται και άλλοι μηχανισμοί). Η μελέτη αυτή αποτέλεσε συνέχεια της ερευνητικής προσπάθειας του εργαστηρίου φαρμακολογίας σχετικά με το ένζυμο ATP συνθάση, όχι όμως και το οριστικό επιστέγασμα αυτής. Φώτισε μόνον μία πολύ μικρή γωνία του απέραντου χώρου του επιστητού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

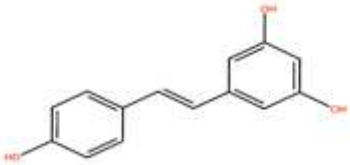
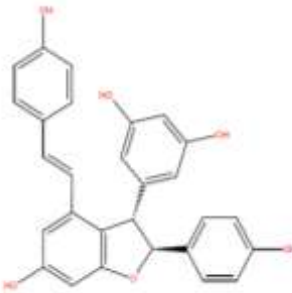
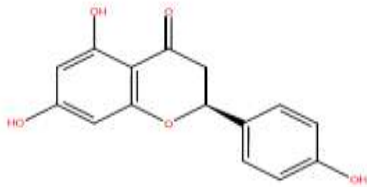
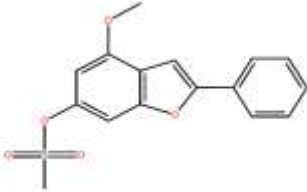
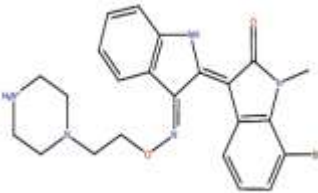
- Andreadou, I., Efentakis, P., Balafas, E., Togliatto, G., Davos, C.H., Varela, A., Dimitriou, C.A., Nikolaou, P.-E., Maratou, E., Lambadiari, V., Ikonomidis, I., Kostomitsopoulos, N., Brizzi, M.F., Dimitriadis, G., Iliodromitis, E.K., 2017. Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. *Front. Physiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01077>
- Barrett, K., Barman, S., Boitano, S., Brooks, H., 2011. Ganong's Ιατρική φυσιολογία.
- Bibli, S.-I., Andreadou, I., Chatzianastasiou, A., Tzimas, C., Sanoudou, D., Kranias, E., Brouckaert, P., Coletta, C., Szabo, C., Kremastinos, D.T., Iliodromitis, E.K., Papapetropoulos, A., 2015. Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. *Cardiovasc. Res.* 106, 432–442. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv129>
- Blum, T.B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K.M., Kühlbrandt, W., 2019. Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 4250–4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>
- Bosetti, F., Yu, G., Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., Solaini, G., 2000. Myocardial ischemic preconditioning and mitochondrial F₁F₀-ATPase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 215, 31–38. <https://doi.org/10.1023/A:1026558922596>
- Caricati-Neto, A., Errante, P.R., Menezes-Rodrigues, F.S., 2019. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4002. <https://doi.org/10.3390/ijms20164002>
- Carroll, J., He, J., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 2019. Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 12816–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904005116>
- Chinopoulos, C., 2017. ATP synthase complex and the mitochondrial permeability transition pore: poles of attraction. *EMBO Rep.* e201744412. <https://doi.org/10.15252/embr.201744412>
- Dabbeni, F., Rai, A., Lippe, G., 2012. F₀F₁ ATP Synthase: A Fascinating Challenge for Proteomics, in: *Proteomics-Human Diseases and Protein Functions*. <https://doi.org/10.5772/31082>
- Das, A.M., 2003. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol. Genet. Metab.* 79, 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(03\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(03)00069-6)
- Drake, R., Vogl, W., Mitcell, A., 2007. Gray's Ανατομία.
- Eltzschig, H.K., Eckle, T., 2011. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* 17, 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Esparza-Moltó, P.B., Nuevo-Tapióles, C., Cuezva, J.M., 2017. Regulation of the H⁺-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2151–2166. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2462-8>
- Gao, Q., Zhao, J., Fan, Z., Bao, J., Sun, D., Li, H., Sun, C., Jiang, X., 2017. Cardioprotective Effect of Danshensu against Ischemic/Reperfusion Injury via c-Subunit of ATP Synthase Inhibition [WWW Document]. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* <https://doi.org/10.1155/2017/7986184>
- García-Aguilar, A., Cuezva, J.M., 2018. A Review of the Inhibition of the Mitochondrial ATP Synthase by IF1 in vivo: Reprogramming Energy Metabolism and Inducing Mitohormesis. *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01322>
- García-Bermúdez, J., Cuezva, J.M., 2016. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference 1857, 1167–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.02.004>

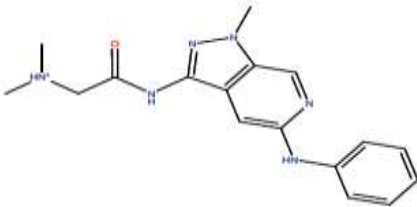
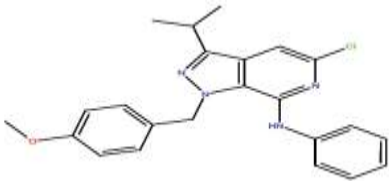
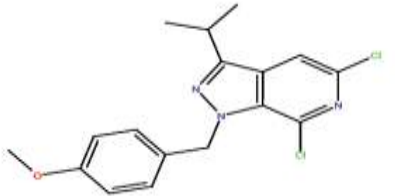
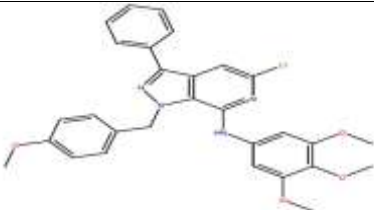
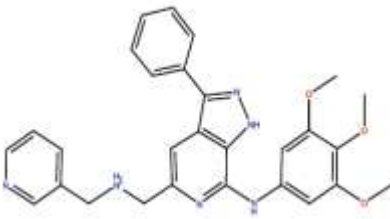
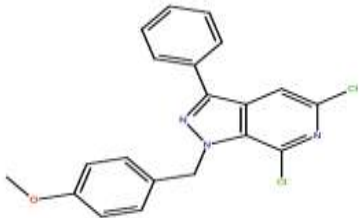
- Gateau-Roesch, O., Argaud, L., Ovize, M., 2006. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* 70, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.024>
- Giorgio, V., Fogolari, F., Lippe, G., Bernardi, P., 2018. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br. J. Pharmacol.* 0. <https://doi.org/10.1111/bph.14513>
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2007. Mechanism of inhibition of bovine F₁-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13632–13637. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706290104>
- Grover, G.J., Atwal, K.S., Sleph, P.G., Wang, F.-L., Monshizadegan, H., Monticello, T., Green, D.W., 2004. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F₁F₀-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 287, H1747–H1755. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01019.2003>
- Grover, G.J., Malm, J., 2008. Pharmacological profile of the selective mitochondrial F₁F₀ ATP hydrolase inhibitor BMS-199264 in myocardial ischemia. *Cardiovasc. Ther.* 26, 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2008.00065.x>
- Hausenloy, D.J., Garcia-Dorado, D., Bøtker, H.E., Davidson, S.M., Downey, J., Engel, F.B., Jennings, R., Lecour, S., Leor, J., Madonna, R., Ovize, M., Perrino, C., Prunier, F., Schulz, R., Sluijter, J.P.G., Van Laake, L.W., Vinten-Johansen, J., Yellon, D.M., Ytrehus, K., Heusch, G., Ferdinandy, P., 2017. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc. Res.* 113, 564–585. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx049>
- Hausenloy, D.J., Yellon, D.M., 2016. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat. Rev. Cardiol.* 13, 193–209. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.5>
- Heusch, G., 2015. Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning, in: *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 1123–1145. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140075>
- Hong, S., Pedersen, P.L., 2008. ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 590–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-08>
- Ivan, F., Faccenda, D., Gatliff, J., Ahmed, A.A., Cocco, S., Cheng, C.H.K., Allan, E., Russell, C., Duchon, M.R., Campanella, M., 2014. The compound BTB06584 is an IF₁-dependent selective inhibitor of the mitochondrial F₁F₀-ATPase: Pharmacological regulation of the F₁F₀-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4193–4206. <https://doi.org/10.1111/bph.12638>
- J.Berg, J.Tymoczko, L.Stryer, 2014. Βιοχημεία.
- Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1991. The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia. *Annu. Rev. Med.* 42, 225–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.42.020191.001301>
- Kalogeris, T., Bao, Y., Korthuis, R.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Kühlbrandt, W., 2019. Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 88, null. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
- Lesnefsky, E.J., Chen, Q., Tandler, B., Hoppel, C.L., 2017. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57, 535–565. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

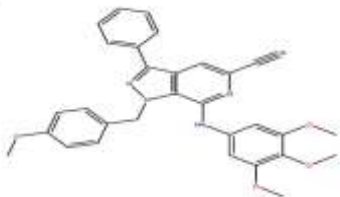
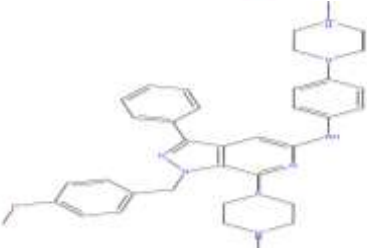
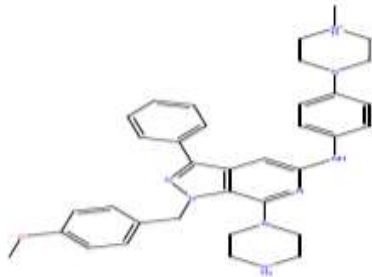
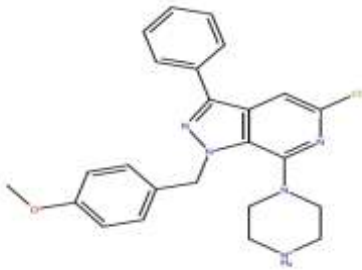
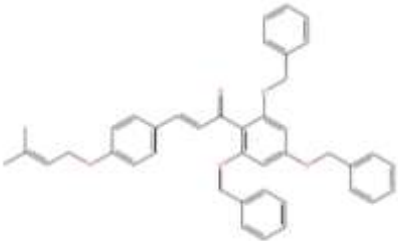
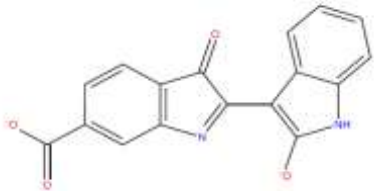
- Moens, A.L., Claeys, M.J., Timmermans, J.P., Vrints, C.J., 2005. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int. J. Cardiol.* 100, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2004.04.013>
- Morciano, G., Preti, D., Pedriali, G., Aquila, G., Missiroli, S., Fantinati, A., Caroccia, N., Pacifico, S., Bonora, M., Talarico, A., Morganti, C., Rizzo, P., Ferrari, R., Wieckowski, M.R., Campo, G., Giorgi, C., Trapella, C., Pinton, P., 2018. Discovery of Novel 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decane Derivatives That Target the c Subunit of F1/FO-Adenosine Triphosphate (ATP) Synthase for the Treatment of Reperfusion Damage in Myocardial Infarction. *J. Med. Chem.* 61, 7131–7143. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00278>
- Murphy, E., Steenbergen, C., 2008. Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol. Rev.* 88, 581–609. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>
- Neginskaya, M.A., Solesio, M.E., Berezhnaya, E.V., Amodeo, G.F., Mnatsakanyan, N., Jonas, E.A., Pavlov, E.V., 2019. ATP Synthase C-Subunit-Deficient Mitochondria Have a Small Cyclosporine A-Sensitive Channel, but Lack the Permeability Transition Pore. *Cell Rep.* 26, 11-17.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.033>
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., Pagliarani, A., 2018. From the Ca²⁺-activated F1FO-ATPase to the mitochondrial permeability transition pore: an overview. *Biochimie* 152, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.022>
- Nikolaou, P.-E., Boengler, K., Efentakis, P., Vouvogiannopoulou, K., Zoga, A., Gaboriaud-Kolar, N., Myriantopoulos, V., Alexakos, P., Kostomitsopoulos, N., Rerras, I., Tsantili-Kakoulidou, A., Skaltsounis, A.L., Papapetropoulos, A., Iliodromitis, E.K., Schulz, R., Andreadou, I., 2019. Investigating and re-evaluating the role of glycogen synthase kinase 3 beta kinase as a molecular target for cardioprotection by using novel pharmacological inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 115, 1228–1243. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz061>
- Pagliarani, A., Nesci, S., Ventrella, V., 2016. Novel Drugs Targeting the c-Ring of the F1FO-ATP Synthase. *Mini Rev. Med. Chem.* 16, 815–824.
- Patel, P., Karch, J., 2020. Regulation of cell death in the cardiovascular system, in: Spetz, J.K.E., Galluzzi, L. (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology, Cell Death Regulation In Health And Disease - Part C*. Academic Press, pp. 153–209. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.11.005>
- Penn, M., Klemes, A., 2013. Multimarker approach for identifying and documenting mitigation of cardiovascular risk. <https://doi.org/10.2217/fca.13.27>
- Ruiz-Meana, M., García-Dorado, D., 2009a. Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev. Esp. Cardiol.* 62, 199–209.
- Ruiz-Meana, M., García-Dorado, D., 2009b. Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury: New Therapeutic Options for Acute Myocardial Infarction. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.* 62, 199–209. [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(09\)71538-5](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(09)71538-5)
- Silva, F.S.G., Costa, C.F., Marques, R.J., Oliveira, P.J., Pereira, G.C., 2018. Pharmacological Targeting of the Mitochondrial Permeability Transition Pore for Cardioprotection, in: Oliveira, P.J. (Ed.), *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics*. Springer International Publishing, Cham, pp. 423–490. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73344-9_20
- Slonczewski, Foster, 2008. *An Evolving Science*, First Edition. W. W. Norton & Co. and Sumanas, Inc.
- Smith, R.M., Peterson, W.H., McCoy, E., 1954. Oligomycin, a New Antifungal Antibiotic. *Antibiot. Amp Chemother.* 4, 962–70.

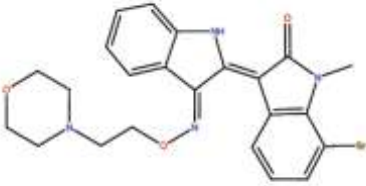
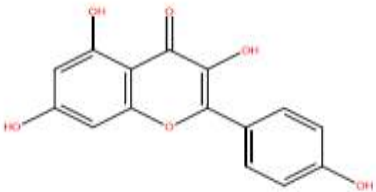
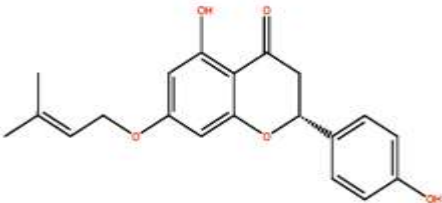
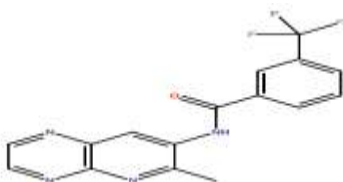
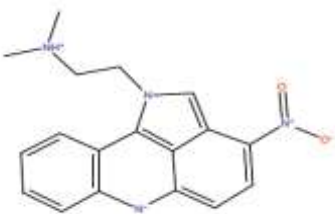
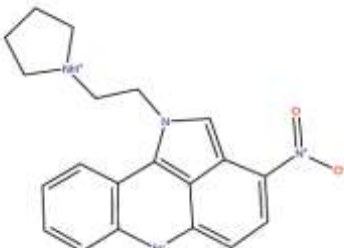
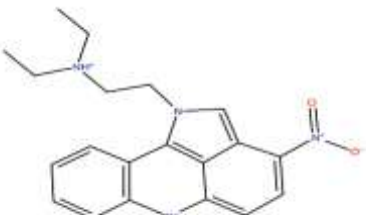
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., Sgarbi, G., 2010. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 16th European Bioenergetics Conference 2010 1797, 1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.02.011>
- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D.E., Mueller, D.M., 2012. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13961–13965. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207912109>
- Takeda, Y., Pérez-Pinzón, M.A., Ginsberg, M.D., Sick, T.J., 2004. Mitochondria Consume Energy and Compromise Cellular Membrane Potential by Reversing ATP Synthetase Activity during Focal Ischemia in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 986–992. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000127966.84050.61>
- Teodoro, J.S., Palmeira, C.M., Rolo, A.P., 2015. Determination of Oxidative Phosphorylation Complexes Activities, in: Palmeira, C.M., Rolo, A.P. (Eds.), *Mitochondrial Regulation: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 71–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1875-1_7
- Turer, A.T., Hill, J.A., 2010. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *Am. J. Cardiol.* 106, 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.03.032>
- Vander, A., Sherman, J., Luciano, D.E., Τσακόπουλος, 2011. Φυσιολογία του ανθρώπου.
- Walker, J.E., 2013. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
- Wenglowsky, S., Ren, L., Ahrendt, K.A., Laird, E.R., Aliagas, I., Alicke, B., Buckmelter, A.J., Choo, E.F., Dinkel, V., Feng, B., Gloor, S.L., Gould, S.E., Gross, S., Gunzner-Toste, J., Hansen, J.D., Hatzivassiliou, G., Liu, B., Malesky, K., Mathieu, S., Newhouse, B., Raddatz, N.J., Ran, Y., Rana, S., Randolph, N., Risom, T., Rudolph, J., Savage, S., Selby, L.T., Shrag, M., Song, K., Sturgis, H.L., Voegtli, W.C., Wen, Z., Willis, B.S., Woessner, R.D., Wu, W.-I., Young, W.B., Grina, J., 2011. Pyrazolopyridine Inhibitors of B-RafV600E. Part 1: The Development of Selective, Orally Bioavailable, and Efficacious Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 342–347. <https://doi.org/10.1021/ml200025q>
- Wu, Q., Andrianaivomananjaona, T., Tetaud, E., Corvest, V., Haraux, F., 2014. Interactions involved in grasping and locking of the inhibitory peptide IF1 by mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1837, 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.01.023>
- Zheng, J., Ramirez, V.D., 2000. Inhibition of mitochondrial proton FOF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1115–1123. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703397>

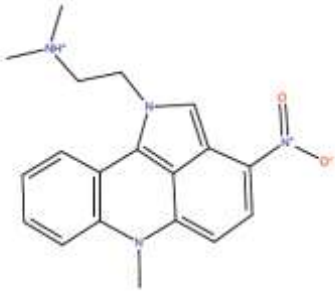
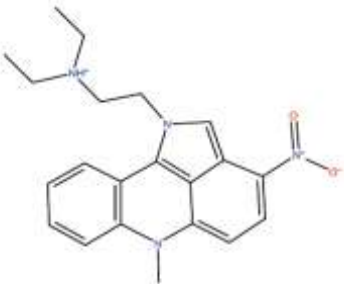
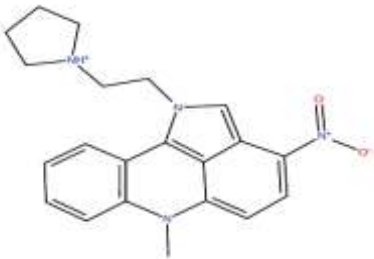
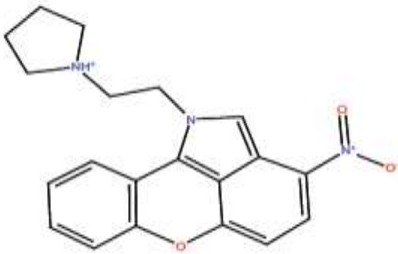
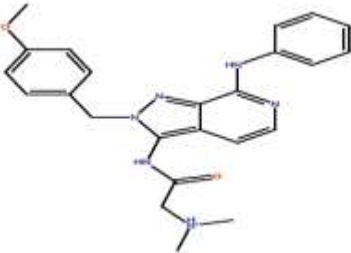
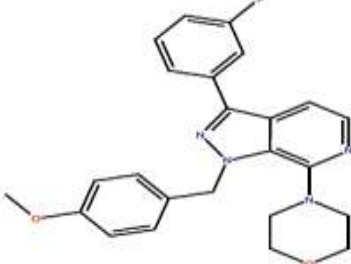
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

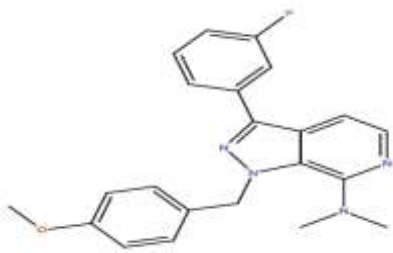
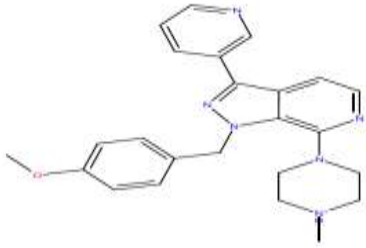
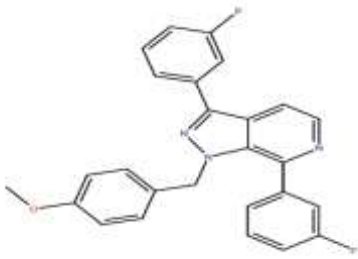
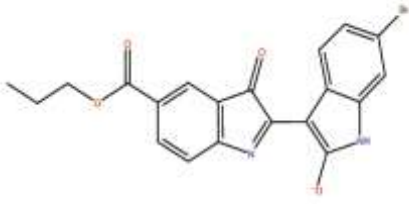
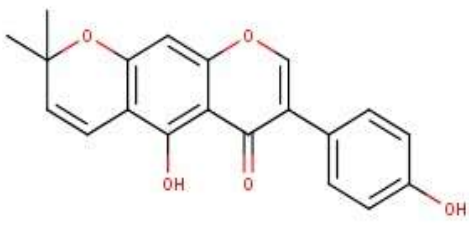
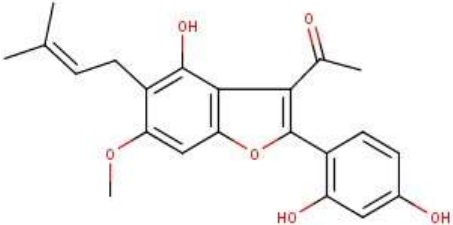
Κωδικός μορίου από pharmalab	Χημικός τύπος	Μοριακό βάρος
198		228.243
202		680.698
203		454.471
220		272.253
525		318.344
860		482.373

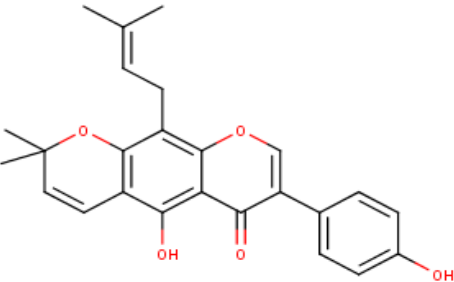
1047		430.502
1050		324.38
1079		406.908
1095		350.242
1104		531.002
1110		496.56
1112		384.259

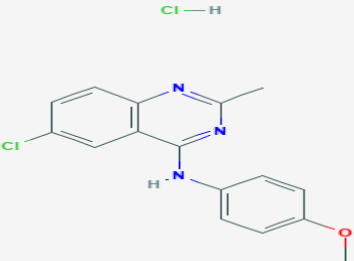
1115		521.567
1117		602.772
1119		588.745
1124		433.933
1130		610.737
1157	-	-
1205		306.272

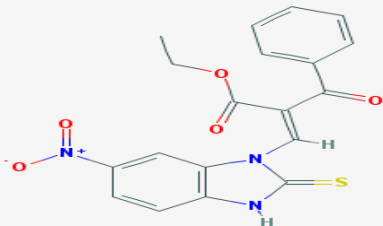
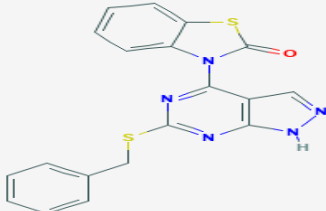
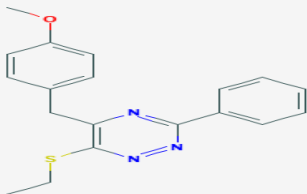
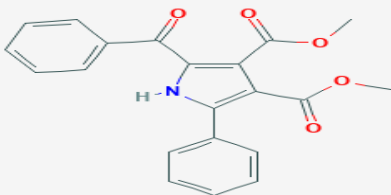
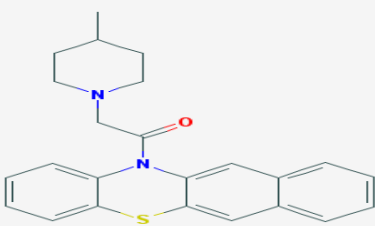
1214		519.819
1369		286.236
1397		340.37
1409		332.28
1464		322.361
1465		348.398
1466		350.414

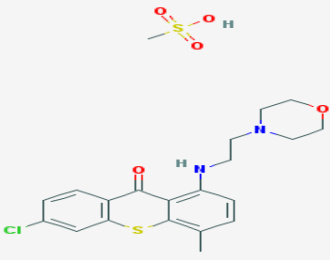
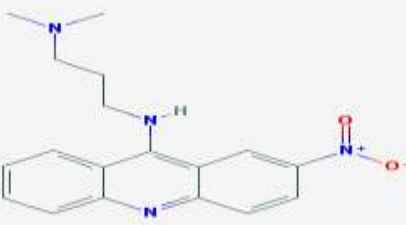
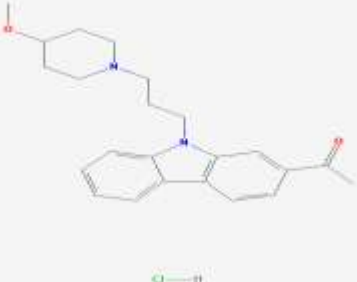
1467		336.388
1468		364.441
1469		362.425
1470		322.361
1654		430.502
1664		418.463

1665		376.427
1667		414.503
1679		427.445
1722		427.248
Alpinum Isoflavone		336.092
Ebefuran III		368.119

Warangalone		404.455
-------------	--	---------

Κωδικός μορίων χημειοθήκης NCI	Χημικός τύπος	Μοριακό βάρος
127713		337,423
112143		323,394
63284		304,393
401298		336,216

658801		397,405
725249		337,439
655141		391,469
167263		363,363
116490		388,529
186066		389,590

33232		542,728
20531		485,010
109328		324,384
109698		315,242
170485		400,947