

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ Εдνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αδηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837-

# Μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης:

# «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων με κατεύθυνση την Φαρμακολογία»

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Θετικών Επιστημών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Διπλωματική διατριβή με θέμα:

«Μελέτη του ρόλου της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β) στην καρδιοπροστασία μέσω φαρμακολογικής

αναστολής»

Νικολάου Παναγιώτα Ευσταθία

AM:160422

Φαρμακοποιός

Μάϊος 2018

# Πρόλογος

Για την εκπόνηση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του ΕΚΠΑ κα Ανδρεάδου Ιωάννα για την εμπιστοσύνη της και την ανάθεση του θέματος. Ακόμη, την ευχαριστώ για την αμέριστη υποστήριξή της σε επιστημονικό και συγγραφικό επίπεδο κατά τη διάκεια των 2 ετών της συνεργασίας μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς επιτροπής για την διόρθωση της παρούσας εργασίας και τις συμβουλές τους. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ ιδιαιτέρως την μεταδιδάκτορα και ερευνήτρια κα Βουγογιανοπούλου Νάντια για την άμεση ανταπόκρισή της στην σύνθεση των μορίων που χρειάστηκαν για την εκπόνηση αυτής της διατριβής και τον Καθηγητή κο Αλέξανδρο Λέανδρο Σκαλτσούνη για την ευγενική προσφορά των μορίων. Ευχαριστώ επίσης τους συνεργάτες του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών και της εταιρείας ΕΛΠΕΝ για την φιλοξενία τους για την διεκπεραίωση των χειρουργικών διαδικασιών.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω σε δύο μοναδικούς επιστήμονες και συνεργάτες του εργαστηρίου μας. Ευχαριστώ , λοιπόν τον Δρ Παναγιώτη Εφεντάκη για την αμέριστη υπομονή και επιμονή του κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο και την μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου μας Μαρία Τσουμάνη που συνέχισε αδιάκοπα και με πάθος την εκπαιδευτική και επιστημονική μου κατάρτιση. Ευχαριστώ επίσης τον μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου μας τον Γεώργιο Κρεμαστιώτη που με την ηρεμία και την κατάρτισή του με στήριζε ιδιαίτερα. Ευχαριστώ επίσης τους προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου μας που στις τεχνικές δυσκολίες μίας εργασίας μας γεμίζουν με αισιοδοξία και αυτοπεποίθηση.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδελφή μου, καθώς μου μετέδωσαν την αξία της παιδείας και στηρίζουν τις προσπάθειές μου, και όλους μου τους φίλους με συντροφεύουν με νότες χαράς και διασκέδασης.

# Περιεχόμενα

Περίληψη	4
1.Γενικό Μέρος – Εισαγωγή	7
1.1 Η επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου	7
1.2 Η στεφανιαία νόσος και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου	7
1.3 Η διάγνωση του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου	8
1.4 Παθοφυσιολογία του οξέως εμφράγματος μυοκαρδίου	9
1.5 Αποτελέσματα ενός οξέως εμφράγματος μυοκαρδίου	0
1.6 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια ενός οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου 	, 1
1.7 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στη βλάβη της επαναιμάτωσης	7
1.8 Καρδιοπροστατευτικοί μηχανισμοί2	3
1.9 Η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου GSK3β και ο ρόλος της	1
1.10 Παράγωγα ινδιρουμπινών ως εκλεκτικοί αναστολείς της GSK3	5
1.11 Σκοπός της παρούσας μελέτης	9
2. Πειραματικό μέρος	0
2.1 Αντιδραστήρια- Φαρμακολογικοί αναστολείς40	0
2.2 Διαχείριση πειραματόζωων	1
2.3 Χειρουργικές διαδικασίες	1
2.4 Πειραματικά πρωτόκολλα4	3
2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry	5
2.6 Western blot	6
2.7 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυοκαρδιακό ιστό	2
2.8 Τεχνική αξιολόγησης της συγκράτησης ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια (Calcium Retention Capacity)	2
2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός μηλονικής διαλδεϋδης ως δείκτη του οξειδωτικού στρες	
	3
2.10 Στατιστική ανάλυση54	4
<ol> <li>Αποτελέσματα</li></ol>	4
3.1 Η οξεία χορήγηση σειράς ενώσεων MLS είναι καρδιοπροστατευτική στο μοντέλο ισχαιμίας / επαναιμάτωσης κονίκλων54	4
3.2 Η φωσφορυλίωση της GSK3β στην ανασταλτική της θέση δεν συσχετίζεται με την καρδιοπροστασία in vivo	5
3.3 Αξιολόγηση των μορίων MLS2776, MLS2778 και BIO σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από μυοκαρδιακό ιστό κονίκλων50	6

3.4 Η χορήγηση των μορίων MLS2776 και MLS2778 μειώνει το μέγεθος εμφράγματος σε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών57
3.6 Η φαρμακολογική αναστολή της GSK3β με τα MLS2776 και MLS2778 δεν μεταβάλλει το οξειδωτικό στρες κατά την επαναιμάτωση
3.7 Αξιολόγηση των αναστολέων MLS2776 και MLS2778 σε ισχαιμικά και φυσιολογικά μυοκαρδιακά μιτοχόνδρια μυών61
3.8 Η GSK3β δεν μετατοπίζεται σε μιτοχόνδρια κατά την επαναιμάτωση μετά από ισχαιμία in vivo
3.9 Η αναστολή της GSK3β παρέχει καρδιοπροστασία πέρα από την αναστολή του CYPD64
4. Συζήτηση
5. Συμπεράσματα
Παράρτημα
Βιβλιογραφία

# Περίληψη

Εισαγωγή: Η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK3β) έχει προταθεί ως ρυθμιστής του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mPTP) που θεωρείται τελικός στόχος της καρδιοπροστασίας. Ωστόσο, ο ρόλος της GSK3β στην ισχαιμία (Ι) και επαναιμάτωση (R) παραμένει αμφιλεγόμενος. Σκοπός: Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου της GSK3β σε in vivo μοντέλο I/R, η συσχέτιση της φωσφορυλίωσής της με την καρδιοπροστασία και η μελέτη της αλληλεπίδρασης της GSK3β και του mPTP. Μέθοδοι: Πρωτόκολλο 1: Για την μελέτη της φαρμακολογικής αναστολής της GSK3β στην καρδιοπροστασία χρησιμοποιήθηκε ο γνωστός αναστολέας της κινάσης, η ΒΙΟ, και 5 δομικά ανάλογα αυτού (MLS2776-MLS2779). Συνολικά τριάντα επτά κόνικλοι υποβλήθηκαν σε 30' Ι ακολουθούμενα από 3 ώρες R και τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες. Στις πέντε ομάδες χορηγήθηκαν οι αναστολείς στην στοιχειομετρικώς ισοδύναμη καρδιοπροστατευτική δόση του μορίου BIO στο 20° λεπτό της Ι, ενώ στην έκτη ομάδα (Ομάδα ελέγχου) χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός με Tween 80, που αποτελεί τον διαλύτη των μορίων. Στο τέλος της R προσδιορίστηκε το % ποσοστό της εμφραγματικής προς την ισχαιμική περιοχή (I/R ratio) ενώ σε δεύτερη σειρά πειραμάτων λήφθηκαν δείγματα ιστών για τον προσδιορισμό της pS9-GSK3β. Πρωτόκολλο 2: Αρσενικοί μύες C57BL/6 υποβλήθησαν σε 30'Ι/2 ώρες R και τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες (n=9 ανά ομάδα): I) Ομάδα ελέγχου: Χορήγηση φυσιολογικού ορού με Tween 80, II) Ομάδα MLS2776: Χορήγηση MLS2776 στα 31,6 mg/kg, III) Ομάδα MLS2778: Χορήγηση MLS2778 στα 29,52 mg/kg. Η χορήγηση των μορίων πραγματοποιήθηκε στο 20° λεπτό της Ι και στο τέλος της R προσδιορίστηκε το % I/R ratio. Σε δεύτερη σειρά πειραμάτων, λήφθηκαν δείγματα μυοκαρδιακού ιστού από την ισχαιμική ζώνη για τη διερεύνηση της αναστολής της GSK3β. Πρωτόκολλο 3: Αρσενικοί μύες C57BL/6 τυχαιοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες Ι) Control (εικονικό χειρουργείο) και ΙΙ) I/R (30' ισγαιμίας/10' επαναιμάτωσης). Ακολούθησε λήψη μυοκαρδιακού ιστού, απομόνωση μιτοχονδρίων από την αριστερή κοιλία και προσδιορισμός της ικανότητας συγκράτησης Ca<sup>2+</sup> (CRC) μετά από χορήγηση των εκλεκτικών αναστολέων ώστε να μελετηθεί η άμεση επίδρασή τους στον mPTP σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης και μετά από I/R. Το κυτοσολικό και μιτογονδριακό κλάσμα αναλύθηκαν με Western Blot για τον εντοπισμό της GSK3β. Πρωτόκολλο 4: C57BL/6 μύες υποβλήθησαν σε 30'Ι/2 ώρες R και τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Ι) Κυκλοσπορίνης (CsA) στην οποία η CsA χορηγήθηκε στα 10 mg/kg, II) MLS2776 + CsA και III) MLS2778 + CsA (n=7 ανά ομάδα) όπου η CsA συγχορηγήθηκε με τους αναστολείς στις προαναφερθείσες δόσεις για τον προσδιορισμό του %I/R ratio. Αποτελέσματα: Η χορήγηση των αναστολέων οδήγησε σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος στους κονίκλους (9.1±3.1%, 26.8±2.9%, 10.2±1.9%, 28.5±4.0%, και  $33.1\pm 2.6\%$ , αντίστοιγα, έναντι  $49.5\pm 3.9\%$  της ομάδας ελέγχου, p<0.05). Αυζημένη pS9-GSK3β παρατηρήθηκε μόνο στις ομάδες MLS2776, MLS2777 και BIO (p<0.05). Καρδιοπροστατευτική δράση από τα MLS2776 και MLS2778 παρατηρήθηκε και στους μύες  $(14,7 \pm 1,4\%$  και  $15,4 \pm 1,9\%$  αντίστοιχα, έναντι  $47,2 \pm 2,8\%$  για την ομάδα ελέγχου, p<0.001). Η μείωση της ενεργότητας της GSK3β επιβεβαιώθηκε στις δύο ομάδες των δύο αναστολέων από την μείωση της p(Y216)-GSK3β και της p(S33/37/T41)-β κατετίνης (p<0.05), αλλά όχι από την αύξηση της pS9-GSK3β. Παράλληλα, οι αναστολείς MLS2776 και MLS2778 είχαν επιπρόσθετο καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα όταν συγχορηγήθηκαν με την CsA (10,23 ± 0,47% και 11,17 ± 0,76%, αντίστοιχα, έναντι 25,03 ± 1,03% για την ομάδα CsA, p <0,01), γεγονός που υποδεικνύει έναν παράλληλο μηγανισμό δράσης, ανεξάρτητο της αναστολής του mPTP μέσω CYPD. Τα μιτοχόνδρια I/R παρουσίασαν

μειωμένη CRC σε σύκριση με τα control (p<0.05). Τα μόρια, ωστόσο δεν άλλαξαν την ανθεκτικότητα των μιτοχονδίων στην υπερφόρτωση με Ca<sup>2+</sup> στις υπό μελέτη ομάδες αποκλείοντας άμεσες επιδράσεις στον mPTP. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μετανάστευση της GSK3β στα μιτοχόνδρια στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης. Συμπεράσματα:. Η φαρμακολογική αναστολή της GSK3β μειώνει την ενεργότητα της κινάσης και επάγει καρδιοπροστασία με μηχανισμό επιπρόσθετο του αποκλεισμού των mPTP διαύλων. Ωστόσο, άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της κινάσης και του πόρου δεν παρατηρείται και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των καθοδικών στόχων της GSK3β στον mPTP.

# 1. Γενικό Μέρος – Εισαγωγή

# 1.1 Η επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου

Η στεφανιαία νόσος παραμένει μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως με βάση τα στατιστικά δεδομένα του 2017 (Timmis et al., 2018). Στην Δυτική Ευρώπη, στις χώρες με υψηλό εισόδημα, ο ετήσιος αριθμός των θανάτων από τα καρδιαγγειακά νοσήματα μειώθηκε μεταξύ των ετών 1990 και 2013, αλλά σε παγκόσμιο επίπεδο η θνησιμότητα αυξήθηκε κατά 41%. Το ποσοστό αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση της θνησιμότητας λόγω της αύξησης της ηλικίας του πληθυσμού αλλά κατά 25% αποδίδεται στην θνητότητα του υπό ανάπτυξη πληθυσμού. Τα τελευταία διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η καρδιαγγειακή νόσος αντιστοιχεί σε πάνω από 3,8 εκατομμύρια θανάτους (20% της συνολικής θνησιμότητας). Τα δεδομένα αυτά αποτελούν μια υπενθύμιση ότι η καρδιαγγειακή νόσος παραμένει παγκοσμίως απειλή ειδικότερα για τον Δυτικό κόσμο (Timmis et al., 2018).

# 1.2 Η στεφανιαία νόσος και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Ως στεφανιαία νόσος (ΣΝ), χαρακτηρίζεται η προοδευτική στένωση των στεφανιαίων αρτηριών που οφείλεται στην εναπόθεση αθηρωματικών πλακών στα αγγεία και στην υποκείμενη φλεγμονή του ενδοθηλίου σε αυτά. Η στεφανιαία νόσος αρχικά παραμένει ασυμπτωματική και εκδηλώνεται κλινικά με συμπτώματα που υποδηλώνουν μυοκαρδιακή ισχαιμία. Η ισχαιμία αποτελεί την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της προσφοράς και της ανάγκης του μυοκαρδίου για οξυγόνο, οδηγώντας σε ανεπαρκή οξυγόνωση και παροχή θρεπτικών ουσιών στο μυοκάρδιο. Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΣΝ περιλαμβάνουν την στηθάγχη, την ασταθή στηθάγχη,το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και τον αιφνίδιο θάνατο. Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα αποτελούν εκείνες τις εκδηλώσεις της ΣΝ που οφείλονται σε οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου και χρήζουν άμεσης ιατρικής παρέμβασης. Σε αυτά περιλαμβάνονται:

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

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου προκαλείται από αιφνίδια θρόμβωση και απόφραξη μίας εκ των στεφανιαίων αρτηριών, οδηγώντας σε νέκρωση της περιοχής του μυοκαρδίου την οποία αρδεύει. Εν έτη 2000, συγκροτήθηκε για πρώτη φορά η παγκόσμια ομάδα εργασίας για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) (First Global MI Task) και παρουσίασε έναν νέο ορισμό του ΟΕΜ βάση του οποίου η κάθε ένδειξη νέκρωσης του μυοκαρδίου στο πλαίσιο της μυοκαρδιακής ισχαιμίας πρέπει να χαρακτηρίζεται ως ΟΕΜ (Antman et al., 2000). Στη συνέχεια, το 2007 στη 2<sup>η</sup> παγκόσμια σύνοδο διαμορφώθηκε το έγγραφο «Universal Definition of Myocardial Infarction Consensus Document» στο οποίο διασαφηνίζονται περαιτέρω οι διαφορετικές καταστάσεις που οδηγούν στην εκδήλωση του OEM (Thygesen et al., 2007). Το έγγραφο αυτό χαίρει άκρας αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα και ανανεώνεται κατά περιόδους ενσωματώνοντας τα σύγχρονα κλινικά δεδομένα. Έτσι σήμερα, είναι σε ισχύς ο «Τρίτος καθολικός ορισμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου» (Third Universal Definition of Myocardial Infarction) βάση του οποίου ο όρος OEM πρέπει να χρησιμοποιείται όταν υπάρχουν ενδείξεις μυοκαρδιακής νέκρωσης σε κλινικό περιβάλλον συμβατό με οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου (Thygesen et al., 2012).

# 1.3 Η διάγνωση του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου

Η υποψία ενός ΟΕΜ γεννάται όταν εκδηλώνεται στον ασθενή ένας χαρακτηριστικός θωρακικός πόνος με παράλληλη αίσθηση πίεσης ή βαρύτητας στο στήθος («στηθάγχη») που αντανακλάται στον αριστερό βραχίονα (λιγότερο συχνά ο πόνος μπορεί να αντανακλάται στους βραχίονες ή στον δεξιό βραχίονα), στον αυχένα ή στη σιαγόνα. Η αίσθηση του πόνου μπορεί να είναι διαλείπουσα (με διάρκεια συνήθως μερικών λεπτών) ή επίμονη. Επιπροσθέτως, μπορεί να συνυπάρχουν και συμπτώματα όπως εφίδρωση, ναυτία, κοιλιακό άλγος, δύσπνοια και συγκοπή. Άτυπες κλινικές εκδηλώσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί και περιλαμβάνουν επιγαστρικό πόνο, δυσπεψία και δύσπνοια. Τα άτυπα συμπτώματα παρατηρούνται συχνότερα στους ηλικιωμένους, στις γυναίκες και στους ασθενείς με διαβήτη, χρόνια νεφρική νόσο ή άνοια (Canto et al., 2002; Murphy et al., 2007).

Οι ασθενείς που βιώνουν ΟΕΜ κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες που χρήζουν διαφορετικής θεραπευτικής αντιμετώπισης (Roffi et al., 2016). Η θεραπευτική προσέγγιση που μέχρι στιγμής εφαρμόζεται για την βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών είναι η όσο το δυνατόν πιο σύντομη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου (Kumar and Cannon 2009). Η διάκριση των ασθενών πραγματοποιείται με βάση τα ευρήματα στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) και καθορίζει την θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών:

- <u>Ασθενείς με οξύ πόνο στο στήθος και ανάσπαση του ST επάρματος που εμμένει (></u> <u>20 λεπτά)</u>: Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως οξύ στεφανιαίο σύνδρομο με ανάσπαση ST και αντανακλά μια οξεία ολική στεφανιαία απόφραξη από ένα ή περισσότερους θρόμβους. Στους περισσότερους ασθενείς η κατάσταση αυτή εξελίσσεται σε OEM με ανάσπαση ST (STEMI) που αποτελεί διατοιχωματικό έμφραγμα με νέκρωση όλων των μυοκαρδιακών στιβάδων. Η αντιμετώπιση των ασθενών αυτών πραγματοποιείται με άμεση αποκατάσταση της αιματικής ροής στο αποφραγμένο αγγείο (επαναιμάτωση) η οποία επιτυγχάνεται με πρωτογενή αγγειοπλαστική ή ινωδολυτική θεραπεία (Task Force on the management of STsegment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) et al., 2012).
- <u>Ασθενείς με οξύ θωρακικό πόνο αλλά χωρίς ανάσπαση του ST-τμήματος</u>: Η κλινική αυτή εκδήλωση είναι αποτέλεσμα των ασταθών αθηροσκληρωτικών πλακών και το σχηματισμό θρόμβων χωρίς να αναστέλλεται πλήρως η αιμάτωση στο τμήμα του μυοκαρδίου που πάσχει. Οι μεταβολές που εμφανίζονται στο ΗΚΓ μπορεί να περιλαμβάνουν ποικίλες αλλοιώσεις όπως: μεταβατική ανάσπαση του τμήματος ST, επίμονη ή παροδική κατάσπαση του τμήματος ST, αντιστροφή κύματος T, επίπεδη κύματα T ή μπορεί ακόμη και το ΗΚΓ να είναι φυσιολογικό. Μετά τη διάγνωση, ο ασθενής αντιμετωπίζεται με αναλγητικά, νιτρώδη και διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή. Ταυτόχρονα, η διαστρωμάτωση κινδύνου κάθε ασθενούς για ενδεχόμενη αιμορραγία σε ήπιο, μέτριο και σοβαρό βαθμό βοηθά στον προσδιορισμό της

πορείας της περαιτέρω θεραπείας που θα παρέχεται στον ασθενή (Anantharaman and Lim, 2013).

#### 1.4 Παθοφυσιολογία του οξέως εμφράγματος μυοκαρδίου

Απαρχή της στεφανιαίας νόσου είναι ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας στο ενδοθήλιο των αγγείων με αποτέλεσμα τόσο τη δημιουργία στενώσεων του αυλού των αγγείων όσο και τη ρήξη των αθηρωματικών πλακών και τον επακόλουθο σχηματισμό του θρόμβου. Η υπεργοληστερολαιμία θεωρείται ένας από τους κύριους παράγοντες που οδηγούν στην αθηροσκλήρωση. Η αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές της ενδοθηλιακής διαπερατότητας των αγγείων που επιτρέπουν τη μετανάστευση λιπιδίων, ειδικά των σωματιδίων της οξειδωμένης λιποπρωτεϊνικής λιπάσης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, όπως το μόριο αγγειακής προσκόλλησης-1 (VCAM-1) και τις σελεκτίνες και, κατά συνέπεια, μεταναστεύουν μέσω διασυνδέσεων στον υποενδοθηλιακό χώρο. Μόλις βρίσκονται στον υποενδοθηλιακό χώρο, τα μονοκύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μακροφάγων και αφού φαγωκυτταρώσουν τα σωματίδια της LDL μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα σωματίδια LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο οξειδώνονται και συμπεριφέρονται ως χημειοτακτικοί παράγοντες οδηγώντας στην μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών. Ακολουθεί ασβεστιοποίηση της πλάκας και αναδιαμόρφωση του αγγείου. Ανάλογα με την σύσταση της πλάκας, αυτή καθίσταται λιγότερο ή περισσότερο ανθεκτική σε ρήξη. Η αναδιαμόρφωση του αγγείου μειώνει τη διάμετρό του και κατ'επέκταση την ικανότητά του να μεταφέρει επαρκείς ποσότητες αίματος προς τους ιστούς (Bergheanu et al., 2017). Κλινικά επακόλουθα της αθηροσκλήρωσης είναι η στένωση των αγγείων με συμπτώματα (στηθάγχη) και τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα λόγω της αστάθειας της πλάκας. Σε περίπτωση που η αθηρωματική πλάκα υποστεί ρήξη ενεργοποιεί τον σχηματισμό του θρόμβου. Στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα ο θρόμβος αποκλείει την αιμάτωση σε κάποια από τις στεφανιαίες αρτηρίες του μυοκαρδίου (Bentzon et al. 2014).

Η σχετική σημασία των στεφανιαίων αρτηριών στο έμφραγμα διαφαίνεται από τη συμμετοχή τους στην αιμάτωση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Ο πρόσθιος κατιόν κλάδος αιματώνει το μεγαλύτερο μέρος της αριστερής κοιλίας της καρδιάς, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του μυοκαρδίου αιματώνεται από την περισπωμένη και τη δεξιά στεφανιαία αρτηρία. Επομένως στο έμφραγμα η απόφραξη στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο θεωρείται σημαντικότερη από αυτήν στις άλλες δύο στεφανιαίες αρτηρίες, ακριβώς λόγω της αυξημένης συμμετοχής του στην αιμάτωση της αριστερής κοιλίας του μυοκαρδίου (Karwowski et al., 2017; Perlmutt et al., 1983).



# 1.5 Αποτελέσματα ενός οξέως εμφράγματος μυοκαρδίου

Η αναστολή της αιμάτωσης του μυοκαρδίου εξαιτίας της στεφανιαίας απόφραξης είναι ένα γεγονός που ενδέχεται να αποβεί θανατηφόρο ως συνέπεια μηχανικής ανεπάρκειας των κοιλιών ή λόγω της εμφάνισης επικίνδυνων για τη ζωή αρρυθμιών. Αρρυθμίες συμβαίνουν και κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, όπως η κοιλιακή μαρμαρυγή και συχνά οδηγούν σε αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Η έκβαση του ασθενούς φαίνεται να είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους του εμφράκτου το οποίο καθορίζεται από το ποσοστό της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου μετά την επιτυχή επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Μικρά έμφρακτα μπορούν να έχουν μικρή επίδραση στην αγγειακή και καρδιακή λειτουργία σε αντίθεση με τα μεγάλα έμφρακτα που θέτουν σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα του μυοκαρδίου. Όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα του μυοκαρδίου που προσβάλλεται τόσο αυξάνεται το στρες που υποβάλλεται, γεγονός που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε εκτεταμένη καρδιακή αναδιαμόρφωση και καρδιακή ανεπάρκεια. Αρκετά νωρίς τη δεκαετία του 1970 αναγνωρίστηκε η προγνωστική αξία της έκτασης ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου και ότι η έκταση του εμφράγματος συσχετίζεται με την σοβαρότητα των αρρυθμιών, την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας και τη θνητότητα (Ferreira 2010).

Ένα οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλοιώσεις στην τοπογραφία τόσο της ισχαιμικής όσο και της μη ισχαιμικής περιοχής των κοιλιών. Εφόσον τα μυοκαρδιακά κύτταρα στηρίζονται σε αερόβιο μεταβολισμό αν η παροχή του οξυγόνου παραμείνει κάτω από μια κρίσιμη τιμή, ακολουθούν μια σειρά γεγονότων που οδηγούν στον

κυτταρικό θάνατο. Η αιφνίδια απώλεια μυοκαρδιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα μια απότομη αύξηση των συνθηκών φόρτωσης που προκαλεί ένα μοναδικό πρότυπο αναδιαμόρφωσης τόσο στο ισχαιμικό όσο και στο μη ισχαιμικό μυοκάρδιο.. Η νέκρωση των καρδιομυοκυττάρων και η επακόλουθη αύξηση του φορτίου προκαλούν μια σειρά βιοχημικών μεταβολών που οδηγούν στην διαστολή των κοιλιών, στην πάχυνση των τοιχωμάτων και υπερτροφία και στο σχηματισμό διακριτής ουλής κολλαγόνου. Η κοιλιακή αναδιαμόρφωση μπορεί να συνεχιστεί για εβδομάδες ή μήνες, μέχρις ότου οι δυνάμεις που οδηγούν στη διεύρυνση της κοιλότητας της κοιλίας να αντισταθμιστούν από την δύναμη εφελκυσμού της ουλής κολλαγόνου. Η ισορροπία αυτή καθορίζεται από το μέγεθος, τη θέση και την έκταση του εμφράγματος (Pfeffer and Braunwald, 1990).

Πιο συγκεκριμένα, η καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά το ΟΕΜ έχει διαιρεθεί αυθαίρετα σε μια πρώιμη φάση (εντός 72 ωρών) και σε μια επόμενη φάση (πέραν των 72 ωρών). Η πρώιμη φάση περιλαμβάνει επέκταση της περιοχής που υπέστη ισχαιμία, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ρήξη της κοιλίας και σχηματισμό ανευρύσματος. Η μυοκαρδιακή νέκρωση οδηγεί στη μετανάστευση μακροφάγων, μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων στην ισχαιμική περιοχή και εκτεταμένη φλεγμονώδη απόκριση. Η επέκταση του εμφράγματος προκύπτει από την αποικοδόμηση των ινιδίων κολλαγόνου μεταξύ των καρδιομυοκυττάρων από πρωτεάσες σερίνης και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνασών μήτρας (MMPs) που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα. Παράλληλα, λόγω της αύξησης του μυοκαρδιακού έργου, προκαλείται την ανύψωση των διαστολικών και συστολικών τάσεων των τοιχωμάτων. Μεταβολές στις αιμοδυναμικές παραμέτρους επίσης συνυπάρχουν και καθορίζονται από τη διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης και την απελευθέρωση νατριουρητικών πεπτιδίων (Sutton and Sharpe, 2000).

Η επόμενη φάση της αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνει μεταβολές στην κοιλιακή αρχιτεκτονική για να κατανέμεται η αυξημένη τάση τοιχώματος πιο ομοιόμορφα. Η εξωκυτταρική μήτρα σχηματίζει την ουλή κολλαγόνου για να σταθεροποιήσει τις δυνάμεις διαστολής και να αποτρέψει περαιτέρω παραμόρφωση. Η αναδιαμόρφωση περιλαμβάνει υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων, η οποία αποδεικνύεται μικροσκοπικά, με αύξηση έως και 70% στον όγκο των κυττάρων. Η παρατεταμένη διαστολή, η παραμόρφωση του κοιλιακό τοιχώματος και η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας οδηγούν σταδιακά σε συστολική δυσλειτουργία και καρδιακή ανεπάρκεια γεγονός που καθορίζει την πρόγνωση των ασθενών στα έτη που έπονται ενός ΟΕΜ.

Η δριμύτητα των ανωτέρω μεταβολών είναι ανάλογη της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης. Κατ'επέκταση στα επόμενα κεφάλαια θα αναλυθούν οι ενδοκυτταρικές μεταβολές κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση που καθορίζουν το μέγεθος του εμφράγματος.

# 1.6 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια ενός οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου

#### 1.6.1 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας

Κατά τη διάρκεια ενός ισχαιμικού επεισοδίου τα μυοκαρδιακά κύτταρα υποβάλλονται σε ανεπαρκή οξυγόνωση με αποτέλεσμα να επιτελείται αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια και κατ'επέκταση το κύτταρο να χάνει την ικανότητα παραγωγής της κύριας πηγής ενέργειάς του, της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Για να αντιρροπήσει αυτήν την απώλεια το κύτταρο αλλάζει το μεταβολισμό του και αντισταθμιστικά αυξάνει την αναερόβια γλυκόλυση. Έτσι, σταδιακά συσσωρεύεται γαλακτικό οξύ και αυξάνεται σημαντικά η συσσώρευση των πρωτονίων. Υπάρχει μία σαφής διαταραχή στα συστήματα μεταφοράς των ιόντων τόσο στην κυτταροπλασματική όσο και στην σαρκοπλασματική μεμβράνη του κυττάρου (Buja 2013).

Οι μεταβολές στην ισορροπία των ιόντων που παρατηρούνται κατά την ισχαιμία έχουν περιγραφεί εκτενώς και περιλαμβάνουν αυξημένη εκροή ιόντων Κ<sup>+</sup>, αύξηση του ελεύθερου  $Mg^{2\scriptscriptstyle +}$  και μείωση του συνολικού  $Mg^{2\scriptscriptstyle +}$  . Η αντλία  $N\alpha^{\scriptscriptstyle +}\text{-}~K^{\scriptscriptstyle +}$  ATP άση αναστέλλεται με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικού Να<sup>+</sup> και την ακόμη μεγαλύτερη μείωση του ενδοκυτταρικού Κ<sup>+</sup>. Εξαιτίας φαινομένων ώσμωσης εισρέει ύδωρ το οποίο οδηγεί σε διόγκωση των κυττάρων. Η ενεργοποίηση του ανταλλάκτη  $Na^+-Ca^{2+}$ , αυξάνει τη συγκέντρωση των ιόντων Ca<sup>2+</sup> εντός του κυττάρου. Έτσι, στο κύτταρο πραγματοποιείται η επαγόμενη από το  $Ca^{2+}$  απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα να προκαλείται ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στην κυτοσολική συγκέντρωση ασβεστίου (Gourdin and Dubois, 2013). Παράλληλα, οι μεταφορείς ασβεστίου εξαρτώμενοι από το ATP ( $Ca^{2+}$  -ATPάσες) του ενδοπλασματικού δικτύου δυσλειτουργούν με αποτέλεσμα να μειώνεται η επαναπρόσληψη των ιόντων Ca<sup>2+</sup> εντός του ενδοπλασματικού δικτύου. Παραδόξως, η συσταλτικότητα του μυοκαρδιακού ιστού είναι ανεπαρκής (Jennings and Reimer 1991). Η αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου μπορεί να ενεργοποιήσει τις επαγόμενες από το Ca<sup>2+</sup> πρωτεάσες όπως τις καλπαϊνες. Οι καλπαϊνες αποτελούν πρωτεάσες κυστεϊνης οι οποίες μπορούν να αποκόπτουν πεπτιδικά τμήματα των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Η ενεργοποίησή τους από το ασβέστιο σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης και απόπτωσης. Η δράση τους αυτή αποδίδεται στην ικανότητα να αποσπούν πρωτεϊνικά τμήματα από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η κασπάση 12 και από αντίαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bcl-2 (Inserte et al., 2012).

Το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βλάβη της ισχαιμίας. Οι πηγές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου μπορεί να είναι είτε ενζυμικής είτε μη ενζυμικής προέλευσης. Αρχικά, οι οξειδοαναγωγάσες της ξανθίνης είναι πολύπλοκα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στον καταβολισμό των πουρινών. Η οικογένεια αυτών των ενζύμων περιλαμβάνει την αφυδρογονάση της ξανθίνης και την οξειδάση της ξανθίνης. Η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών συνοδεύεται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Σε ισχαιμική κατάσταση, η έλλειψη του ΑΤΡ οδηγεί σε υδρόλυση του ΑΜΡ και παραγωγή υποξανθίνης που δρα ως υπόστρωμα της οξειδάσης της ξανθίνης με αποτέλεσμα να παράγονται ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) που προκαλούν επιπρόσθετες βλάβες στις μεμβράνες λόγω οξείδωσης των φωσφολιπιδίων και μπορεί να οδηγήσουν σε ρήξη τους. Μία ακόμη οικογένεια ενζύμων συμβάλλει στην αύξηση του οξειδωτικού στρές και αποτελείται από τις μόνο-οξειδάσες του NADPH (NOX), (π.χ. NOX-1, NOX-5) και τις διπλές οξειδάσες του NADPH (DUOX) (π.χ. DUOX -1 και DUOX-2). Η οικογένεια NOX/DUOX είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ROS κατά την ισχαιμία. Τα ένζυμα NOX πραγματοποιούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και χρησιμοποιούν μόρια οξυγόνου ως τελικούς δέκτες των ηλεκτρονίων. Παράγεται η ρίζα 02, που μεταφέρεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) μέσω των ενζύμων. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διέρχεται μέσω της μεμβράνης ή μέσω των πόρων των καναλιών ανιόντων, οδηγώντας σε αποικοδόμηση του μονοξειδίου του αζώτου ΝΟ, σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους ανιόντος και νίτρωση των πρωτεϊνών. Η υποξία επάγει επίσης τον παράγοντα επαγόμενο από την υποξία 1α (HIF-1α) ο οποίος επάγει την ενεργοποίηση των ενζύμων NOX και ενισχύει το οξειδωτικό στρες (Wu et al., 2018). Σημαντικό ρόλο στην αύξηση του οξειδωτικού στρες διαδραματίζει και η ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου eNOS. Η eNOS υφίσταται αποσύζευξη εξαιτίας της οξείδωσης του συμπαράγοντά της, τετραυδροβιοπτερίνη, με αποτέλεσμα τη διαφυγή των ηλεκτρονίων και την αύξηση της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.

Όλες αυτές οι αλλαγές τελικά αυξάνουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών που σε συνδυασμό με την ηλεκτρολυτική διαταραχή και την εξάντληση του ATP οδηγεί σε διάρρηξη της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο ο οποίος αποδίδεται τελικά στην αστάθεια των μεμβρανών και την κυτταρική διόγκωση (Kalogeris et al. 2012).





# 1.6.2 Κυτταρικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης και η βλάβη της επαναιμάτωσης

Η έγκαιρη αποκατάσταση της αιματικής ροής στο αποφραγμένο αγγείο είναι απαραίτητη ώστε να αποκατασταθεί η λειτουργία του μυοκαρδίου. Ωστόσο, κατά την επαναιμάτωση προκαλείται ένα πλήθος παθοφυσιολογικών καταστάσεων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, αναιρώντας τις ωφέλειες της επαναφοράς της κυκλοφορίας. Το παράδοξο φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως βλάβη επαναιμάτωσης και συνεισφέρει στη επιδείνωση της κατάστασης του υποξικού καρδιακού ιστού και στην επέκταση της νέκρωσης. Η βλάβη της επαναιμάτωσης οδηγεί στον θάνατο των καρδιακών κυττάρων και συντελεί στην αύξηση της έκτασης του εμφράγματος έως και 50% (Yellon and Hausenloy, 2007).

Κατά τη φάση της επαναιμάτωσης οι ραγδαίες βιοχημικές μεταβολές του κυττάρου οδηγούν τα κύτταρα που έχουν υποστεί σημαντικές βλάβες σε θάνατο. Κύριοι μεσολαβητές της βλάβης είναι η αθρόα παραγωγή ROS, η αύξηση της φλεγμονής και η διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mPTP). Η αποκατάσταση της αιματικής ροής αυξάνει τα μόρια του οξυγόνου στο κύτταρο τα οποία γίνονται ωστόσο δέκτες των ελευθέρων ηλεκτρονίων οδηγώντας σε υπερπαραγωγή ROS. Το οξειδωτικό στρες της επαναιμάτωσης οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυτοκινών και στην έκφραση πρωτεϊνών προσκόλλησης, όπως η Ρ-σελεκτίνη και ο ICAM-1. Πιο συγκεκριμένα, απελευθερώνονται αρκετοί χημικοί μεσολαβητές όπως η φωσφολιπάση A2, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α, ιντερλευκίνες (ΙL1β) και αγγειστενσίνη ΙΙ. Η απελευθέρωση της φωσφολιπάσης Α2 επάγει την παραγωγή του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων του θρομβοξανίου και των λευκοτριενίων στους ιστούς γεγονός που προάγει την τοπική φλεγμονή. Οι κυτοκίνες και η ενεργοποίηση των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης ΙΙ επάγουν την έκφραση της ΝΟΧ και επιτείνουν τον κύκλο παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ο TNF-a αποτελεί σηματοδοτικό μόριο για την εκκίνηση της απόπτωσης των κυττάρων και οδηγεί σε επέκταση του νεκρωτικού ιστού.

Στην επαναιμάτωση, η υπερφόρτωση του κυττάρου σε Ca<sup>2+</sup>, η ανεπαρκής ανασύνθεση του ATP, η απώλεια των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, η χαμηλή παραγωγή του NO και το οξειδωτικό στρες συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο. Ακόμη, η ανάκαμψη του pH, το οξειδωτικό στρες και η υψηλή συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> προκαλεί την απότομη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (mPTP), έναν μεγάλο πόρο υψηλής διαπερατότητας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Parlakpinar et al., 2013).



Όπως θα αναλυθεί εκτενώς στο υποκεφάλαιο 1.7 ο mPTP συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην υπερσύσπαση των μυοκαρδιακών ινών, στην απόπτωση και νέκρωση των μυοκαρδιακών κυττάρων (Parlakpinar, Orum, and Sagir 2013).

# 1.6.3 Μορφές κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης

Ο κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μπορεί να επέλθει με διαφορετικούς μηχανισμούς και εξαρτάται από το βαθμό της ισχαιμικής προσβολής. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επάγεται μέσω απόπτωσης, αυτοφαγίας, νέκρωσης και νεκρόπτωσης. Μέτριου βαθμού ισχαιμική προσβολή μπορεί να προκαλέσει κυτταρική δυσλειτουργία με αυτοφαγία και να ενεργοποιήσει τα συστήματα επιβίωσης του κυττάρου. Μία βραχεία περίοδος ισχαιμίας είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα προγράμματα ελέγχου της δημιουργίας των ROS και να αντιμετωπιστεί η κυτταρική βλάβη. Ωστόσο, εάν η βλάβη είναι πιο σοβαρή, ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης (Przyklenk et al., 2012)

Η απόπτωση είναι μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιείται κάτω από την υποξική καταπόνηση της ισχαιμίας και λόγω των ROS κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Οι αποπτωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο κύριες οδούς, την εξωγενή και την ενδογενή οδό, και συγνά συνυπάργουν ή αλληλεπιδρούν. Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται την πρόσδεση των πρωτεϊνών TNF-α, TWEAK, προσδέτης Fas, TRAIL και TL1 στους υποδοχείς τους. Αυτή η πρόσδεση ενεργοποιεί μια πρωτεάση, την κασπάση-8, για να διασπάσει την κασπάση-3, που στη συνέγεια προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω πρωτεόλυσης των κατεστραμμένων κυττάρων. Η ενδογενής πορεία, επίσης γνωστή ως μιτοχονδριακή οδός, ενεργοποιείται από την υποξία και μεταβάλλει την ακεραιότητα της μιτογονδριακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οικογένειας των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Στην βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, αυξάνεται η κυτταροπλασματική Bad και δεσμεύεται με την Bcl-2 και Bcl-XL. Παράλληλα, οι Bax και Bak επεξεργάζονται και εισάγονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να οδηγήσουν στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως το κυτόγρωμα C, οι Smac / Diablo, τον παράγοντα επαγόμενο από απόπτωση (AIF) και την ενδονουκλεάση G. Το κυτόχρωμα C δεσμεύει τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (APAP-1) για να ενεργοποιήσει την προ-κασπάση-9 και να σχηματίσει το αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα οδηγεί στην διαδοχική ενεργοποίηση των κασπασών που καταλήγει στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Η ενδονουκλεάση G αλληλεπιδρά επίσης με τον AIF για να προκαλέσει κατακερματισμό του DNA. Στην ισχαιμία-επαναιμάτωση, η απόπτωση είναι λιγότερο συχνή από την νέκρωση και οφείλεται στα ROS και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω της διάνοιξης των mPTP. Η απόπτωση δεν συνοδεύεται από φλεγμονώδη απόκριση τοπικά (Lopez-Neblina et al., 2005).

Τα μιτοχόνδρια κατακερματίζονται για να επιτύχουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε μια διαδικασία που ονομάζεται μιτόπτωση (Di Lisa and Bernardi, 2006; Hall et al., 2014). Κατά τη διάρκεια της μιτόπτωσης τα Bax και Bak συνδέονται με την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη συσχετιζόμενη με την δυναμίνη (Drp1) και ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή διάσπαση. Παρατηρείται και η συμμετοχή άλλων πρωτεϊνών όπως τη πρωτεΐνης μιτοχονδριακής σχάσης 1 (Fis1) και της πρωτεΐνης μιτοχονδριακής διαίρεσης 1 (Mdv1). Η ρύθμιση της μιτοχονδριακής διάσπασης και σύντηξης (mitochondrial fission and fussion) επηρεάζεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης γεγονός που διαφαίνεται από τις μορφολογικές διαταραχές των μιτοχονδρίων. Η Drp1 είναι κυρίως υπεύθυνη για την μιτοχονδριακή διάσπαση. Υπερβολική έκφραση του Drp1 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάσπασης των μιτοχονδρίων, σημαντική μείωση της διαμέτρου των μιτοχονδρίων, αυξημένο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση κυτοχρώματος c και κυτταρικό θάνατο. Η προ-αποπτωτική BAX είναι πρωτεϊνη που ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή διαίρεση με διαφορετικό τρόπο από την Drp1, και συγκεκριμένα προάγει την μιτοχονδριακή σύντηξη μέσω της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης σύντηξης Mitofussion2 (Mfn2). Επιπροσθέτως, η δομή των Fis1 στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτογρώματος c κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Σημαντική πρωτεΐνη των αναπληπλώσεων της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (cristae) είναι η Optic Atrophy 1 (OPA1). Μη φυσιολογική λειτουργία της ΟΡΑ1μπορεί να προωθήσει τον μιτοχονδριακό κατακερματισμό και την απόπτωση. Αντίθετα, η υπερέκφραση του ΟΡΑ1 καθυστερεί τις δομικές αλλαγές στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και ελαττώνει τη βλάβη που προκαλείται από την ισχαιμία και επαναιμάτωση (Cipolat et al., 2006).

Η νέκρωση, όπως η απόπτωση, θεωρείται μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αν και οι συνέπειες του νεκρωτικού και αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου είναι τελείως διαφορετικές. Η νέκρωση είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζεται από αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων. Η νέκρωση εμφανίζεται όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε στρες και θεωρείται παθητική και άναρχη. Η νέκρωση προκαλείται από δραματικές βιοχημικές μεταβολές στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και χαρακτηρίζεται από διάλυση ή διόγκωση των οργανιδίων και απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η νέκρωση είναι η εκείνη η διαδικασία θανάτου που προκαλεί μεγάλο αριθμό τοπικών φλεγμονωδών αποκρίσεων στον ισχαιμικό ιστό.

Η νεκρόπτωση είναι επίσης μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ελέγχεται από κυτταρικά σήματα θανάτου όπως αυτά της απόπτωσης και εμφανίζει ένα πρότυπο θανάτου όπως αυτό της νέκρωσης. Η νεκρόπτωση πραγματοποιείται μέσω ρυθμιστικών πρωτεϊνών της οικογένειας RIP (RIP1, RIP3) και αυτός ο τρόπος θανάτου οδηγεί σε φλεγμονή. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ νεκρόπτωσης και της φλεγμονής στην παθοφυσιολογία της βλάβης της επαναιμάτωσης. Επομένως, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της νεκρόπτωσης παραμένει ένας σημαντικός στόχος της έρευνας στην βλάβη της επαναιμάτωσης. (Hausenloy et al., 2017)

Η αυτοφαγία είναι μια φυσιολογική διαδικασία των κυττάρων στην οποία τα βιολογικά μακρομόρια και τα κατεστραμμένα οργανίδιά του αποικοδομούνται εντός κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα. Κατά τον εγκλεισμό των μορίων και οργανιδίων με τα λυσοσώματα δημιουργείται το αυτοφαγόσωμα. Η διαδικασία αυτοφαγίας χωρίζεται κατά προσέγγιση σε τρείς κύριους τύπους: 1.Την μακροαυτοφαγία: όπου η κύρια πηγή της μεμβράνης του εγκλεισμού προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi. Μετά τον εγκλεισμού η μεμβράνη αυτή συντήκεται με την λυσοσωμική και τα περιεχόμενα αποικοδομούνται από λυσοσωμικά ένζυμα. 2. Την μικροαυτοφαγία: η λυσοσωμική μεμβράνη είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος και 3.Την αυτοφαγία με μεσολάβηση chaperone-πρωτεΐνης συνοδού (Chaperone Mediated Autophagy): Σε αυτήν το chaperone συνδέεται με την πρωτεΐνη που πρόκειται να αποικοδομηθεί για να καθοδηγήσει τη μεταφορά της ουσίας στα λυσοσώματα, αφομοιώνεται και αποσυντίθεται με ενζυματική

δράση. Επομένως, η οδός CMA έχει μια σαφή επιλεκτικότητα στα μόρια προς καταστροφή γεγονός που την διαφοροποιεί από τις δύο πρώτες οδούς (Ghosh and Pattison, 2018; Wu et al., 2018).

Η αυτοφαγία παρατηρείται κατά την βλάβη της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Ρυθμίζεται από πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια που σχετίζονται με αυτοφαγία (ATG). Το σύμπλοκο ULK1-Atg13-RB1CC1-Atg10 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο mTORC1 και συμμετέχει στην αρχική φάση της αυτοφαγίας. Ελλείψει θρεπτικών στοιχείων και ενέργειας στο κύτταρο, παρατηρείται αναστολή του mTOR και ενεργοποίηση του συμπλόκου ULK, γεγονός που οδηγεί στην αυτοφαγία. Η επέκταση των αυτοφαγικών κυστιδίων απαιτεί τη συμμετοχή των συμπλεγμάτων Atg12-Atg5-Atg16 και Atg8 / LC3, δύο συστήματα δέσμευσης ουμπικουιτίνης. Κατά την επαναιμάτωση, η αύξηση του ATP οδηγεί σε αυτοφαγία των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων είναι ευεργετική ωστόσο η επέκταση του φαινομένου συμβάλλει στην βλάβη της επαναιμάτωσης (Hamacher-Brady et al., 2007; Hao et al., 2017).

# 1.7 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στη βλάβη της επαναιμάτωσης

#### 1.7.1 Διαταραχές της λειτουργίας του μιτοχονδρίου κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση

Τα μιτογόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια που αποτελούνται από 2 μεμβράνες την εξωτερική και μία εσωτερική η οποία δημιουργεί πτυχώσεις. Ο εσωτερικός χώρος ονομάζεται μήτρα του μιτοχονδρίου και ο χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Κατά την φυσιολογική λειτουργία του μυοκαρδιακού κυττάρου υπάρχει μια διαφορά ανάμεσα στην μήτρα και στον διαμεμβρανικό γώρο καθώς η μήτρα είναι δυναμικού φορτισμένη αρνητικά και ο διαμεμβρανικός χώρος θετικά. Η διαφορά δυναμικού οφείλεται στη δράσης της αναπνευστικής αλυσίδας και στην εσωτερική μεμβράνη που είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα ιόντα. Στη μήτρα των μιτοχονδρίων πραγματοποιούνται οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων ενώ στην εσωτερική μεμβράνη βρίσκονται τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας υπεύθυνα για την παραγωγή ATP. Η αναπνευστική αλυσίδα, ξεκινά με το σύμπλοκο Ι ή οξειδοαναγωγάση του ζεύγους NADH-Q το οποίο εισάγει στην αλυσίδα τα ηλεκτρόνια των μορίων NADH, τα οποία έχουν παραχθεί από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Τα δύο ηλεκτρόνια που αποδίδει κάθε μόριο NADH, μεταφέρονται από το σύμπλοκο Ι στο συνένζυμο Q (ή ουβικινόνη) οδηγώντας στον σχηματισμό του μορίου QH<sub>2</sub> (ή ουβικινόλη). Το σύμπλοκο ΙΙ είναι η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέως και είναι το δεύτερο ανεξάρτητο σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Οξειδώνει το ηλεκτρικό οξύ και μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη. Το σύμπλοκο ΙΙ δεν είναι αντλία πρωτονίων και δεν συμβάλλει άμεσα στην δημιουργία της ηλεκτροχημικής κλίσης των πρωτονίων. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τα συμπλέγματα Ι και ΙΙ μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c ή σύμπλοκο III. Τα ηλεκτρόνια που μεταφέρονται από το κυτόχρωμα c αποδίδονται στο μοριακό Ο2 μέσω της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Η ροή των ηλεκτρονίων από τα σύμπλοκα I,III και IV συνοδεύεται από ταυτόγρονη άντληση  $H^+$  από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται διαφορά δυναμικού μεταξύ της μήτρας και του διάμεσου γώρου του μιτοχονδρίου και η διατήρηση του δυναμικού οφείλεται στο ότι η εσωτερική μεμβράνη του μιτογονδρίου είναι αδιαπέραστη από H<sup>+</sup>. Το σύμπλοκο IV ή ATP συνθάση είναι ένα ογκώδες ένζυμο της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας που σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης αξιοποιεί τη διαφορά της συγκέντρωσης  $H^+$  και τη ροή τους από τον διαμεμβρανικό χώρο προς την μιτοχονδριακή μήτρα και παράγει ATP (Chaban et al., 2014).

Τα μιτογόνδρια επομένως κατά την φυσιολογική τους λειτουργία παράγουν ΑΤΡ, και καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου συμβάλλοντας έτσι σε μια ισορροπημένη παραγωγή και απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου ROS. Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται επίσης στην ομοιόσταση κυτταρικών ιόντων, συμπεριλαμβανομένης και της ομοιόστασης ασβεστίου. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η έλλειψη του Ο2 εμποδίζει τη ροή ηλεκτρονίων, και η παραγωγή και χρησιμοποίηση του ΑΤΡ γίνεται αναποτελεσματική. Η F0F1ATP συνθάση που παράγει ATP, κατά την ισγαιμία, μεταβαίνει σε αντίστροφο τρόπο, οπότε καταναλώνει ATP για την άντληση πρωτονίων από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στο διαμεμβρανικό χώρο. (Grover et al. 2004). Σε παρατεταμένη ισχαιμία, η λειτουργία της Na<sup>+</sup>/ Κ + ΑΤΡάσης της πλασματικής και μιτοχονδριακής μεμβράνης αναστέλλεται (λόγω της πτώσης των επιπέδων ATP) και η ενδοκυτταρική πτώση του pH (που επάγεται από την παραγωγή γαλακτικού οξέως και την υδρόλυση του ΑΤΡ) ενεργοποιεί τον ανταλλάκτη Νa + / H  $^{\scriptscriptstyle +}$  . Η προκύπτουσα αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Na  $^{\scriptscriptstyle +}$  ενεργοποιεί τον ανταλλάκτη Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> και παρατηρείται υπερφόρτωση του κυττάρου σε Ca<sup>2+</sup>. Αυξημένες συγκεντρώσεις κυτοσολικό Ca<sup>2+</sup> μπορούν να συμβάλουν στην κυτταρική βλάβη από την ενεργοποίηση των ενζύμων αποικοδόμησης όπως νουκλεάσες, φωσφολιπάσες και πρωτεάσες και την καταστροφή της ακεραιότητας της μεμβράνης οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο (O'Rourke, Cortassa, and Aon 2005). Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών αποτελεί και η διάνοιξη του μιτογονδριακού πόρου διαπερατότητας (mPTP).

# 1.7.2 Ο ρόλος του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας

Ο μη εκλεκτικός πόρος mPTP περιγράφηκε πρώτη φορά ως φαινόμενο από τους Hunter και Haworth το 1979 (Hunter and Haworth, 1979). Ο mPTP θεωρούνταν μέγρι πρόσφατα ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που διαπερνά και τις δύο μεμβράνες του μιτοχονδρίου και που απαρτίζεται από: τον εξαρτώμενο από δυναμικό δίαυλο voltage-dependent anion channel (VDAC) στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ως διμερές, τον μεταφορέα του ADP adenine nucleotide transporter (ANT) στην εσωτερική μεμβράνη ως διμερές και την κυκλοφυλλίνη D (CypD) στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Είναι ένας πόρος υψηλής διαπερατότητας που όταν σχηματίζεται επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της μιτοχονδριακής μήτρας. Η διάνοιξη των mPTP φαίνεται να διευκολύνεται από σύνδεση της πρωτεΐνης μήτρας Cyp D με μια διαδικασία που ρυθμίζεται τόσο από τα ιόντα  $Ca^{2+}$  όσο και από ανόργανα φωσφορικά (Pi). Οι συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο επηρεάζουν τον mPTP οδηγώντας τον σε παροδική ή ενδιάμεσης / μακράς διάρκειας διάνοιξης. Η διάνοιξη μικρής διάρκειας είναι αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία και έχει αποδειγτεί ότι εμπλέκεται στην ρύθμιση της ενδοκυτταρικής NAD<sup>+</sup> κυκλοφορίας, και στον παροδικό σχηματισμό ROS οι οποίες έχουν σηματοδοτικό ρόλο (Kwong and Molkentin, 2015). Μάλιστα, το παροδικό άνοιγμα των mPTP ενδέχεται να εμπλέκεται σε έναν καρδιοπροστατευτικό μηγανισμό που αναφέρεται ως ισγαιμική προετοιμασία (ischaimic preconditioning)(IPC)(Zorov et al., 2009).

Η ικανότητα διάνοιξης του mPTP σε μιτοχόνδρια που έχουν χαμηλό ενεργειακό φορτίο και pH κάτω από 7.4 είναι εξαιρετικά μειωμένη επομένως το άνοιγμα του πόρου δεν επιτελείται κατά την φάση της οξείας ισχαιμίας. Κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, είναι εντελώς διαφορετικές οι συνθήκες που δημιουργούνται στο μυοκαρδιακό κύτταρο και ο σχηματισμός και το παρατεταμένο άνοιγμα του πόρου οδηγεί σε μη αναστρέψιμη βλάβη. Ο mPTP οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων στα ιόντα και διαλυμένες ουσίες με μοριακά βάρη έως και 1,5 kDa, διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας και απώλεια δυναμικού μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της διάνοιξης του mPTP, η εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου υφίσταται διάνοιξη επιτρέποντας έτσι στους αποπτωτικούς παράγοντες όπως το κυτόχρωμα c, Smac/DIABLO, και AIF να απελευθερώνονται από Tην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προς το κυτοσόλιο (Perrelli, Pagliaro, and Penna 2011).



Η μοριακή ταυτότητα των πρωτεϊνών που σχηματίζουν αυτόν τον πόρο είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Η επικρατέστερη στη βιβλιογραφία προτεινόμενη δομή του πόρου είναι η δημιουργία ενός διμερούς του μιτοχονδριακού ενζύμου ATP συνθάση (Amodeo et al., 2018; Bernardi et al., 2015; Giorgio et al., 2013; Halestrap, 2014; Morganti et al., 2018; Nesci, 2018).

Η ΑΤΡ συνθάση είναι ένα μεγάλο, πολύπλοκο, διαμεμβρανικό ένζυμο το οποίο αποτελείται από δύο βασικές υπομονάδες, την υπομονάδα F0 και την υπομονάδα F1. Η υπομονάδα F0 αποτελεί ένα υδρόφοβο τμήμα το οποίο διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελεί τον δίαυλο πρωτονίων της ATP συνθάσης. Αποτελείται από οκτώ έως δεκαπέντε υπομονάδες c και μία υπομονάδα a, η οποία συμβάλλει και στη σύνδεση των υπομονάδων F0 και F1 του ενζύμου. Οι υπομονάδες c σχηματίζουν ένα κύλινδρο ο οποίος διολισθαίνει πάνω στην υπομονάδα a, καθώς μεταφέρει τα H<sup>+</sup>. 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. Ο σχηματισμός των διμερών της ATPάσης για τη δημιουργία των πόρων αποτελεί ένα περίπλοκο φαινόμενο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Giorgio et al., 2013; Nesci, 2018).



# 1.7.3 Η δράση της κυκλοσπορίνης ως αναστολέας του mPTP

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα λιπόφιλο πεπτίδιο αποτελούμενο από 11 αμινοξέα και μοριακό βάρος 1202 kDa που ανακαλύφθηκε περί το 1970 κατά τη διάρκεια εντός προγράμματος ανακάλυψης νέων αντιμυκυτησιακών φαρμάκων. Σύντομα οι ερευνητές της Santoz Ltd ανακάλυψαν ότι ο μύκητας *Tolypocladium inflatum Gams* παράγει ένα μεγάλο αριθμό ουδέτερων λιπόφιλων μεταβολιτών που ασκούσαν ανοσοκατασταλτική δράση με έναν μοναδικό μηχανισμό. Πρακτικά, η κυκλοσπορίνη CsA που είναι ο δραστικότερος μεταβολίτης αναστέλλει εκλεκτικά τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και όχι τον πολλαπλασιασμό των σωματικών κυττάρων. (Tribe, 1998). Η CsA αναπτύχθηκε περαιτέρω ως ανοσοκατασταλτικό και το 1983 αδειοδοτήθηκε από τον FDA (US Food and Drug Administration) για κλινική χρήση για την πρόληψη της απόρριψης του μοσχεύματος στις μεταμοσχεύσεις.

Αρχικά, οι δράσεις της CsA στα μιτοχόνδρια αναγνωρίστηκαν από την νεφροτοξική της δράση στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων. Σημαντική ήταν η συνεισφορά των Fournier και συνεργάτες που διαπίστωσαν ότι η κυκλοσπορίνη όχι μόνο αναστέλλει την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα αλλά και εμποδίζει την μιτοχονδριακή εισροή ιόντων ασβεστίου Ca <sup>2+</sup> (Fournier, Ducet, and Crevat 1987). Η γνώση αυτή σε συνδυασμό με το ότι η αντίστροφη λειτουργία του mPTP μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη εισροή Ca <sup>2+</sup> στο μιτοχόνδριο οδήγησε τους ερευνητές να εξετάσουν αν η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την διάνοιξη του

mPTP (Crompton et al., 1988). Αποδείχθηκε ότι σε απομονωμένα μιτοχόνδρια καρδιάς επίμυων, η CsA μπορεί να αναστείλει την διάνοιξη του mPTP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφορικών (Crompton et al., 1988).



Το 1990 περίπου είναι η περίοδος που δημοσιεύεται από τους Halestrap και Davidson ότι η κυκλοσπορίνη αναστέλλει τη διάνοιξη του mPTP μέσω πρόσδεσής της στην κυκλοφιλίνη D (CypD) μία πεπτίδυλο-πρόπυλο-cis ισομεράση 21 kDa που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. (Halestrap and Davidson 1990). Έγινε, λοιπόν νωρίς κατανοητό ότι η κυκλοσπορίνη μπορεί να αναστέλλει την CypD τόσο εντός του κυττάρου όσο και στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη αποτρέποντάς της να αλληλεπιδράσει με άλλα δομικά τμήματα της μεμβράνης σχηματίζοντας τον mPTP. Πιο πρόσφατες μελέτες με μύες γενετικά τροποποιημένους ώστε να μην εκφράζουν την CypD επιβεβαίωσαν ότι ο φαρμακολογικός στόχος της CsA είναι η CypD και ότι η τελευταία είναι σημαντικός ρυθμιστής του mPTP (Baines et al. 2005; Basso et al. 2005).

Δεδομένου ότι ο mPTP οδηγεί σε επέκταση της μυοκαρδιακής βλάβης, η αναστολή της διάνοιξής του αποδείχθηκε ότι έχει ευεργετικά αποτελέσματα για το μυοκάρδιο. Η κυκλοσπορίνη κέντρισε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των ερευνητών όταν μία μελέτη αποκάλυψε ότι σε πειράματα ισγαιμίας επαναιμάτωσης σε μοντέλο απομονωμένου μυοκαρδίου αρουραίων η CsA άσκησε καρδιοπροστατευτική δράση. Συγκεκριμένα στο απομονωμένο μυοκάρδιο πραγματοποιήθηκε έγχυση CsA 0.2mM κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και αποκαταστάθηκε η αναλογία ΑΤΡ/διφωσφορικής αδενοσίνης και η ποσότητα της μονοφωσφορικής αδενοσίνης σε επίπεδα παρόμοια με τα αυτά πρίν από την ισχαιμία. Επίσης αποκαταστάθηκε μερικώς η διαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας. Στο μοντέλο του απομονωμένου μυοκαρδίου η CsA σε χαμηλότερες (0.1 mM) ή υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.4 to 1.0 mM) δεν παρουσίασε καρδιοπροστατευτική επίδραση (Griffiths and Halestrap 1993). Ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων σε πειραματόζωα (μύες, επίμυες και κονίκλους) επιβεβαίωσαν ότι η χορήγηση της CsA έχει καρδιοπροστατευτική δράση και μειώνει την έκταση του εμφράγματος. Τα πειράματα in vivo προσδιόρισαν ότι η προστατευτική δράση της CsA βρίσκεται σε δόσεις 2,5mg/kg και όχι σε δόση 1,0 mg/kg ενώ αποτελεσματικότητα έδειζαν μελέτες σε τρωκτικά σε δόση 5,0 mg/kg και 10mg/kg (D. Hausenloy, BostonGriffiths, and Yellon 2012). Η καρδιοπροστατευτική δράση της CsA είναι χρονικά εξαρτώμενη. Όταν χορηγείται πριν την ισχαιμία ή 15 λεπτά πριν την επαναιμάτωση παρέχει πλήρη καρδιοπροστασία η οποία χάνεται όταν η χορήγηση πραγματοποιείται στα 7, στα 5, στα 3 ή στα 2 λεπτά πριν την επαναιμάτωση (Trankle et al. 2016).

# 1.7.4 Η κυκλοσπορίνη σε κλινικές μελέτες καρδιοπροστασίας

Η CsA αφού αποδείχθηκε αποτελεσματική στα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης δοκιμάστηκε και σε κλινικές μελέτες.

Αρχικά, το 2008 πραγματοποιήθηκε η πρώτη κλινική μελέτη με την CsA όπου έλαβαν μέρος 58 ασθενείς που STEMI. Η χορήγηση της CsA (Sandimmune, Novartis) πραγματοποιήθηκε σε δόση 2,5 mg/kg αμέσως πριν την επαναιμάτωση με αγγειοπλαστική. Το μέγεθος του εμφράγματος εκτιμήθηκε σε όλους τους ασθενείς μέσω μέτρησης της απελευθέρωσης της τροπονίνης Ι και της κρεατινικής κινάσης στο πλάσμα και σε μία υποομάδα ασθενών με μαγνητική τομογραφία - Magnetic Pesonance Imaging (MRI) στην 5<sup>η</sup> μέρα μετά το επεισόδειο του εμφράγματος. Η κρεατινική κινάση και το μέγεθος του εμφράγματος με MRI ήταν μειωμένα στην ομάδα της CsA (p<0.05) ενώ τα υπόλοιπα σημεία της μελέτης δεν εμφάνισαν διαφορές (Piot et al., 2008). Σε κλινική μελέτη με πολύ μικρό αριθμό ασθενών και το ίδιο πρωτόκολλο, η χορήγηση της CsA μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος στους 6 μήνες (βάση αποτελεσμάτων της MRI) (Mewton et al., 2010).

Η επίδραση της CsA μελετήθηκε επίσης σε 101 ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με θρομβολυτική αγωγή (TLT). Οι συμμετέχοντες εμφάνιζαν OEM και χορηγήθηκε CsA σε δόση 2.5 mg/kg (Sandimmune, Novartis) Οι παράμετροι που προσδιορίστικαν ήταν το μέγεθος του εμφράγματος, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας, οι επιπλοκές της θρομβολυτικής θεραπείας και η εμφάνηση σοβαρών αρρυθμιών και η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας. Δείκτης της έκτασης του εμφράγματος ήταν η μέτρηση της κρεατινικής κινάσης (CK-MB) και της καρδιακής τροπονίνης I (c-TnI). Η μελέτη έδειξε ότι δεν υπήρξε καμία διαφορά με στατιστικά σημαντικό τρόπο σε καμία παράμετρο που εξετάστηκε (Ghaffari et al., 2013).

Η μεγαλύτερη κλινική μελέτη που έχει γίνει μέχρι στιγμής για την δράση της CsA στην έκβαση των ασθενών με οξύ OEM είναι η CIRCUS (Does Cyclosporine Improve Clinical Outcome in ST Elevation Myocardial Infarction Patients). Η CIRCUS είναι μία παγκόμια, πολυκεντρική,τυχαιοποιημένη και διπλά τυφλή με έλεγχο placebo κλινική μελέτη. Η CsA (CicloMulsion,NeuroVive Pharmaceutical) χορηγήθηκε σε δόση 2,5 mg/kg 2-3 λεπτά πρίν την επαναιμάτωση με αγγειπλαστική. Η μελέτη εξέτασε πρωταρχικά τον θάνατο από οποιοδήποτε αίτιο, την επιδεινούμενη καρδιακή ανεπάρκεια κατά την αρχική νοσηλεία και επιπλέον τις αλλαγές στο κλάσμα εξώθησης και την επανεμφάνηση οξέων ισχαιμικών επεισοδίων. Όλες οι μελετούμενες παράμετροι ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες γεγονός που καταδεικνύει την αποτυχία της CsA στην καρδιοπροστασία (Cung et al., 2015). Η μελέτη CYCLE (CYCLosporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction) είναι μία

πολυκεντρική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 410 ασθενείς με STEMI οι οποίοι υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική. Η CsA απέτυχε να επιδείξει καρδιοπροστατευτική δράση ως προς τους δείκτες βελτίωσης της πρόγνωσης των ασθενών, όπως η επίπτωση του θανάτου και άλλων καρδιαγγειακών συμβαμάτων (Ottani et al., 2016).

Η αποτυχία της CsA στις κλινικές μελέτες έχει αποδοθεί στις συνοδές νόσους και στην παράλληλη φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν οι ασθενείς και επιδρούν στη βλάβη της επαναιμάτωσης ή στην βιολογική απάντηση στον καρδιοπροστατευτικό παράγοντα. Πολλά βιοχημικά μονοπάτια που οδηγούν σε καρδιοπροστασία δυσλειτουργούν όταν υπάρχουν συνοσηρότητες, όπως ο διαβήτης. Συγκεκριμένα, ο διαβήτης τύπου ΙΙ μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο μιτοχόνδριο τόσο στην έκφραση και ενεργότητα των καρδιοπροστατευτικών διαύλων K<sub>ATP</sub> όσο και στην τάση διάνοιξης του mPTP σε απάντηση στο αυξημένο ασβέστιο του διαβητικού μυοκαρδίου. (Wider and Przyklenk, 2014) Επιπροσθέτως, ο μεταβολισμός της CsA γίνεται κυρίως από το κυτόχρωμα P450 και το σύστημα των μικροσωμικών ενζύμων CYP3A4 που εμφανίζει πολλούς πολυμορφισμούς και αλληλεπιδράσεις με την λαμβανόμενη φαρμακευτική αγωγή. Συνεπώς, λόγω του μικρού θεραπευτικού παράθυρου της CsA πιθανώς οι ιδιόμορφες φαρμακοκινητικές της ιδιότητες απέτρεψαν το θεραπευτικό αποτέλεσμα στη χορηγούμενη δόση των κλινικών μελετών (Yingzhong et al., 2016).

# 1.8 Καρδιοπροστατευτικοί μηχανισμοί

Η έννοια της καρδιοπροστασίας, αφορά την μείωση των αναστρέψιμων και μη αναστρέψιμων βλαβών που υφίσταται το μυοκάρδιο, και κλινικά αξιολογείται με την μείωση της εμφάνισης αρρυθμιών και της καρδιακή δυσλειτουργίας, με μειωμένο μέγεθος εμφράγματος, με βελτίωση της μικροαγγειακής λειτουργίας και αναγαίτιση της καρδιακής αναδιαμόρφωσης που οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια (Heusch, 2015). Στην παρούσα εργασία, η έννοια αυτή χρησιμοποιείται σε πιο στενά πλαίσια και αφορά στη μείωση των μη αναστρέψιμων βλαβών που υφίσταται το μυοκάρδιο κατά τη φάση της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης κυρίως όσον αφορά το μέγεθος του εμφράγματος. Η βλάβη της επαναιμάτωσης προκαλεί το 20-70% της συνολικής μη αναστρέψιμης μυοκαρδιακής βλάβης και κατά συνέπεια ο περιορισμός της βλάβης επαναιμάτωσης αποτελεί έναν μείζονα θεραπευτικό στόχο της σύγχρονης θεραπευτικής.



#### <u>1.8.1 Ισχαιμική προετοιμασία</u>

Ιστορικά, η πρώτη φορά που κατέστη εφικτή η μείωση της έκτασης του εμφράγματος και η έννοια της καρδιοπροστασίας απέκτησε υπόσταση ήταν η εφαρμογή της ισχαιμικής προετοιμασίας. Με τον όρο ισχαιμική προετοιμασία (ischemic preconditioning (IPC)) περιγράφουμε τη διαδικασία κατά την οποία ολιγόλεπτοι κύκλοι ισχαιμίας ακολουθούμενοι από επαναιμάτωση εφαρμόζονται ακριβώς πριν την παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας. Πρώτη φορά το IPC εφαρμόστηκε το 1986, από τον Charles Murry, στο εργαστήριο του Reimer και του Jennings (Murry et al., 1986).

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο 40 λεπτών στεφανιαίας απόφραξης σε κύνες που υποβλήθηκαν σε τέσσερις κύκλους 5 λεπτών ισχαιμίας / 5 λεπτών επαναιμάτωσης και μειώθηκε το ποσοστό της εμφραγματικής περιοχής από 28% στο 7%. Η πτώση του ποσοστού της εμφραγματικής περιογής αντανακλά μείωση κατά 75% του μεγέθους του εμφράγματος η οποία ήταν επίσης δυνατή ακόμη και σε παρατεταμένη ισχαιμία μία ώρας. Η παρατήρηση ότι η ισχαιμία μικρής διάρκειας (IPC) προστατεύει από την ισχαιμία μικρής διάρκειας αρχικά φαινόταν αντιθετική, ωστόσο τα επόμενα χρόνια επιβεβαιώθηκε ότι η καρδιοπροστασία από το IPC είναι δυνατή σε πολλά είδη πειραματόζωων (Weber, 2015). Έτσι, υπήρξε οριστική απόδειξη ότι το μέγεθος του εμφράγματος θα μπορούσε να τροποποιηθεί. Φυσικά, η επεμβατική IPC της καρδιάς θα ήταν αδύνατο να εφαρμοστεί κλινικά σε οποιοδήποτε περιβάλλον, εκτός, και αν πρόκειται για ανοικτή χειρουργική επέμβαση καρδιάς. Η μετάφραση της IPC στην κλινική πρακτική απαιτούσε την κατανόηση του μηχανισμού μείωσης της μυοκαρδιακής βλάβης ώστε να προσδιοριστεί η θεραπεία που θα μπορούσε να γορηγηθεί μετά την έναρξη της ισχαιμίας. Το IPC αποτελεί μία ενδογενή απόκριση που γαρακτηρίζεται από πληθώρα ενδοκυτταρικών καταρρακτών σηματοδότησης. Για την καλύτερη κατανόηση των μηγανισμών καρδιοπροστασίας οι παράγοντες που συμμετέχουν

διακρίνονται σε παράγοντες πρόκλησης,-πυροδότες, μεσολαβητές και τελικούς στόχους της καρδιοπροστασίας.

# <u>1.8.2 Μετιχαιμική προστασία</u>

Μια άλλη ενδογενής μορφή καρδιοπροστασίας που αναγνωρίστηκε ως κλινικά εφαρμόσιμη, είναι παρόμοια με το IPC, αλλά εφαρμόζεται κατά το χρόνο της επαναιμάτωσης. Το 2003 διαπιστώθηκε ότι μετά την ισχαιμική προσβολή μία σύντομη σειρά από επαναλαμβανόμενους κύκλους σύντομης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης που εφαρμόστηκε σε κύνες είναι ικανή να μειώσει το μέγεθος του εμφράγματος και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία της στεφανιαίας αρτηρίας. Η εφαρμογή conditioning κατά την επαναιμάτωση χαρακτηρίζεται ως μετισχαιμική προστασία- postconditioning (POC).(Zhao et al., 2003)

Το POC έχει περιγραφεί σε διάφορα άλλα πειραματικά είδη (μύες, επίμυες, κονίκλους και χοίρους) in vivo. Το κύριο χαρακτηριστικό της παρέμβασης είναι ότι οι σύντομες (συνήθως 10-30 δευτερόλεπτα), επαναλαμβανόμενες περίοδοι (3-10 κύκλοι) ισχαιμίας, με εναλλαγή με σύντομες περιόδους επαναιμάτωσης (10-30 s) επιτυγγάνουν να μειώσουν το μέγεθος του εμφράγματος. Οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο χρόνος που εφαρμόζεται η παρέμβαση είναι κρίσιμος για τη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος. Μια καθυστέρηση μεγαλύτερη από 1 λεπτό στην έναρξη της πρώτης επαναιμάτωσης συσγετίστηκε με απώλεια προστασίας (Skyschally et al., 2009). Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την επικρατούσα άποψη ότι η βλάβη της επαναιμάτωσης, που οφείλεται στη διάνοιξη των mPTP συμβαίνει στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης (Di Lisa et al., 2001). Η εφαρμογή του POC σε κλινικές μελέτες δεν έχει επιτύχει καρδιοπροστατευτική επίδραση όπως αυτή που παρατηρήθηκε σε πειραματόζωα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι οι ασθενείς που συμμετέχουν στις κλινικές μελέτες είναι μεγάλοι σε ηλικία, έχουν συνοδά νοσήματα, λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή που μπορεί από μόνη της να λειτουργεί καρδιοπροστατευτικά ή να καταργεί τις ευργετικές επιδράσεις της POC. Έτσι, αξίζει να διερευνηθούν οι μηγανισμοί καρδιοπροστασίας που επάγονται από POC ώστε να είναι δυνατόν ενεργοποιηθούν φαρμακολογικά (Heusch, 2012).

# 1.8.3 Απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία

Πολυάριθμες πειραματικές και κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η διαλείπουσα ισχαιμία και επαναιμάτωση ιστών και οργάνων απομακρυσμένων από την καρδιά μπορεί να περιορίσει το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αυτό το φαινόμενο, ονομάζεται απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένου από την καρδιά μπορεί να ποριάκρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένη ισχαιμική προστασία. Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη απομακρυσμένη ισχαιμική προποίνηση σε πειραματικά και κλινικά μοντέλα είναι η διαλείπουσα ισχαιμία ενός άκρου η οποία εκτελείται κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου ή κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης ισχαιμίας. Η ενδεχόμενη χρησιμότητα μιας τέτοιας απλής παρέμβασης (π.χ. επαναλαμβανόμενο φούσκωμα στο χέρι όπως αυτό που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της πίεσης του αίματος) είναι σημαντική και ενδιαφέρουσα. Περαιτέρω η σημασία αυτής της παρέμβασης ενισχύεται από την διαπίστωση ότι η καρδιοπροστατευτική ωφέλεια υπάρχει ακόμη και όταν η απομακρυσμένη παρέμβαση εφαρμόζεται μετά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Οι βιολογικοί μηχανισμοί απομακρυσμένης ισχαιμικής προπόνησης είναι ακόμη υπό διερεύνηση, αλλά φαίνεται να υπάρχει εξάρτηση από διάφορους παράγοντες που βρίσκονται στην κυκλοφορία, συμπεριλαμβανομένων των νευρωνικών και χυμικών σημάτων (Schmidt et al., 2015).

#### 1.8.4 Μοριακοί μηχανισμοί καρδιοπροστασίας

Όλα τα ανωτέρω φαινόμενα ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών μοριακής σηματοδότησης που αυξάνουν την επιβίωση του καρδιομυοκυττάρου. Οι καρδιοπροστατευτικοί καταρράκτες σηματοδότησης διακρίνονται σε εκκινητές (triggers) που αφορούν μόρια που ξεκινούν έναν καταρράκτη επιβίωσης, σε μεσολαβητές (mediators) στους οποίους περιλαμβάνονται τα ενδοκυτταρικά μόρια της σηματοδότησης και στους τελεστές που είναι οι αποδέκτες των σημάτων και αποτρέπουν τον θάνατο του καρδιομυοκυττάρου.

# Εκκινητές

Τα ενδογενώς απελευθερούμενα χημικά ερεθίσματα που επιτελούν στην καρδιοπροστασία είναι μικρά μόρια, όπως τα ιόντα ασβεστίου, οι ROS, το μονοξείδιο του αζώτου και οι δραστικές μορφές αυτού (RNS) και οι περισσότεροι προσδέτες των μεμβρανικών υποδοχέων. Οι ROS έχουν διφορούμενο ρόλο στα φαινόμενα conditioning: ενώ η υπερβολική παραγωγή ROS συμβάλλει σε μη αναστρέψιμη βλάβη, μικρές ποσότητες ROS, που μπορεί να παράγονται μετά την ενεργοποίηση των μιτοχονδριακών ΚΑΤΡ διαύλων ή του mPTP συμβάλλει στην καρδιοπροστασία, ενδεχομένως μέσω της οξείδωσης των προστατευτικών κυτοσολικών κινασών (Andreadou et al., 2012; Tullio et al., 2013). Τα RNS δρούν επίσης με το ίδιο παράδοξο και δοσοεξαρτώμενο τρόπο με τα ROS, καθώς μικρές συγκεντρώσεις NO βελτιώνουν την συσταλτικότητα ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την καταστέλλουν. Η χορήγηση εξωγενούς ΝΟ έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προστατέψει το μυακάρδιο και να προκαλέσει conditioning. Το ενδογενές ΝΟ εμπλέκεται επίσης στο POC και στην απομακρυσμένη ισχαιμική προπόνηση. Και άλλοι αέριοι διαβιβαστές όπως το υδρόθειο και το μονοξείδιο του άνθρακα έχουν επιδείξει καρδιοπροστατευτικές δράσεις, καθώς και τα δύο μειώνουν το έμφραγμα όταν χορηγούνται εξωγενώς (Andreadou et al., 2014).

Τα αυτακοειδή, όπως η αδενοσίνη και η βραδυκινίνη, απελευθερώνονται από τα καρδιομυοκύτταρα, το ενδοθήλιο και τα ενδιάμεσα κύτταρα κατά τη διάρκεια του conditioning. Τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς αδενοσίνης που είναι συζευγμένοι με G πρωτεϊνες, τους A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> και A<sub>3</sub> και τον υποδοχέα A<sub>2B</sub>, που εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια. Οι υποδοχείς A2A είναι υποδοχείς συζευγμένοι με Gs, που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση και αυξάνουν το cAMP. Μέσω αυτού ενεργοποιείται η κινάση PKA, ενώ οι υποδοχείς A<sub>1</sub> και A<sub>3</sub> συνδέονται με τις πρωτεΐνες Gi και Gq οι οποίες αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση. Η αδενοσίνη ενεργοποιεί επίσης άμεσα την κινάση PKC, και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό καταρράκτη των κινασών διάσωσης από την βλάβη της επαναιμάτωσης (RISK) που θα αναλυθεί παρακάτω. Ενεργοποιεί ακόμη και την σηματοδότηση eNOS / πρωτεϊνική κινάση G (PKG). Οι υποδοχείς A<sub>1</sub> και A<sub>3</sub> είναι απαραίτητες για το IPC και ο αποκλεισμός τους καταργεί την προστασία ενώ οι υποδοχείς A<sub>2A</sub> και A<sub>2B</sub> είναι σημαντικοί για το POC. Η κύρια δράση της αδενοσίνης στην καρδιοπροστασία είναι η επακόλουθη ενεργοποιήση του RISK (Downey et al., 2007; Vuorinen et al., 1995).

Η συγκέντρωση της βραδυκινίνης αυξάνεται επίσης κατά την ισχαιμική προπόνηση και οδηγεί στην ενεργοποίηση του υπότυπου του υποδοχέα της βραδυκινίνης 2 στα καρδιομυοκύτταρα, ο οποίος είναι συζευγμένος με πρωτεΐνες Gi. Έτσι, ενεργοποιούνται οι καθοδικές οδοί eNOS / PKG και RISK. Η βραδυκινίνη ενεργοποιεί επίσης τη σύνθεση της κυκλοξυγενάσης (COX) και της προστακυκλίνης και μειώνει την έκταση του εμφράγματος (Heusch et al., 2008).

Οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες, όπως η ακετυλοχολίνη, η αγγειοτενσίνη, οι κατεχολαμίνες, η ενδοθηλίνη και οπιοειδή μπορούν να προκαλέσουν καρδιοπροστασία όταν χορηγούνται εξωγενώς μέσω ενεργοποίησης των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Οι κατεχολαμίνες δρουν καρδιοπροστατευτικά μέσω της ενεργοποίησης του α αδρενεργικού υποδοχέα μέσω σχηματισμού αδενοσίνης και ενεργοποίησης της PKC και αυξορύθμιση της eNOS. Τα οπιοειδή απελευθερώνονται από νευρικές απολήξεις αλλά συντίθενται και στα καρδιομυοκύτταρα. Τα οπιοειδή συνδέονται και ενεργοποιόν τους δ και κ υποδοχείς τους που είναι συζευγμένοι με Gi πρωτεΐνες και λειτουργούν ενεργοποιώντας την σηματοδότηση της αδενοσίνης και της βραδικινίνης.

Αρκετές πεπτιδικές ορμόνες, όπως η αδρενομοδουλίνη, τα νατριουρητικά πεπτίδια, οι ουροκορτίνες και η λεπτίνη, έχει βρεθεί ότι προστατεύουν μετά από εξωγενή χορήγηση από την βλάβη της επαναιμάτωσης. Αυτές οι πεπτιδικές ορμόνες δρουν μέσω μεταγωγής σήματος από το NO, το cGMP, τους μιτοχονδριακούς διαύλους KATP, τον καταρράκτη RISK ή την ενίσχυση του καταρράκτη επιβίωσης (SAFE). Δεν υπάρχουν ωστόσο σαφή δεδομένα ότι συσχετίζονται με τα φαινόμενα conditioning. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση αυξητικών παραγόντων έχει αποδειχθεί καρδιοπροστατευτική (Heusch, 2015).

Σε αντίθεση με τις πεπτιδικές ορμόνες και τους αυξητικούς παράγοντες, οι κυτοκίνες και οι χημειοκίνες συσχετίζονται άμεσα με το IPC και το POC. Ο TNFa μειώνει την έκταση του εμφράγματος στο IPC και στο POC μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων TNF2, του παράγοντα STAT 3 και των μιτοχονδριακών διαύλων KATP. Η ιντερλευκίνη 6 με επακόλουθη ενεργοποίηση του STAT 3 είναι απαραίτητη κατά το IPC.

Παράλληλα με τους ανωτέρω μηχανισμούς έχει διαπιστωθεί ότι η ήπια υποθερμία κατά την συνεχιζόμενη ισχαιμία παρέχει προστασία μειώνοντας το μέγεθος του εμφράγματος όχι μόνο με επιβράδυνση του ενεργειακού μεταβολισμού αλλά και με ενεργοποίηση της προστατευτικής σηματοδότησης μέσω των κινασών ERKs. Η υπερθερμία παρέχει καθυστερημένη προστασία μέσω της αυξημένης ρύθμισης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat shock proteins). Η υποθερμία και η υπερθερμία δεν σχετίζονται με τα φαινόμενα conditioning (Hale and Kloner, 1997; Tissier et al., 2011).

# Μεσολαβητές

Η πρωτεϊνική κινάση PKC αποτέλεσε τον πρώτο ενδοκυττάριο μεσολαβητή της καρδιοπροστασίας. Η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C οδηγεί στο σχηματισμό της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλογλυκερόλης ως δεύτερους αγγελιοφόρους. Στη συνέχεια η διακυλογλυκερόλη οδηγεί στην φωσφορυλίωση, ενεργοποίηση, και μετατόπιση της PKC. Η κινάση PI3K παράγει φωσφατιδυλινοσιτόλη και μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την PKC. Σε θηλαστικά, η ισομορφή PKCα είναι η πιο σημαντική για την προστασία από IPC μέσω του σχηματισμού της αδενοσίνης και την αλληλεπίδραση με την κονεξίνη 43 (Cx 43). Στα τρωκτικά, η ισομορφή PKCε είναι σημαντική για την προστασία από IPC, καθώς μετατοπίζεται στον μιτοχόνδρια μέσω μίας πρωτεΐνης θερμικού σοκ και ενεργοποιεί τους μιτοχονδριακούς διαύλους KATP. Οι KATP αυξάνουν το σχηματισμό ROS, που περαιτέρω ενεργοποιούν την PKCε. Η PKCε επίσης μετατοπίζεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο και

μειώνει την υπερφόρτωση σε ασβέστιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει ένας βρόχος θετικής ανάδρασης μεταξύ της ενεργοποίησης της PKC και του σήματος ενεργοποίησης αδενοσίνης, καθώς η PKC ευαισθητοποιεί τον υποδοχέα A2B κατά την πρώιμη επαναιμάτωση και έτσι συμβάλλει στην έκφραση της PKCε (Heusch, 2015).

Μεταξύ των κινασών ενεργοποιούμενων από το μιτογόνο (MAPK) η p38 έχει συσχετιστεί με το IPC. Η p38 ενεργοποιείται και μειώνει την έκταση του εμφράγματος. Ωστόσο, η p38 εμφανίζει διαφορετικές ισομορφές p38a και p38β που φαίνεται ότι εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες και ενεργοποιούνται σε διαφορετικές στιγμές κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση. Δεδομένων των αντίθετων αποτελεσμάτων των 2 ισομορφών πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η δράση των p38 σε καθοδικούς στόχους (Steenbergen, 2002).

Η eNOS ενεργοποιείται μετά από την ενεργοποίηση των υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνη. Αρχικά, ενεργοποιείται η PI3K και στη συνέχεια η πρωτεϊνική κινάση B (Akt), που με την σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την eNOS. Η παραγωγή του NO αυξάνεται και ενεργοποιείται η διαλυτή γουανυλική κυκλάση για να σχηματίσει cGMP, το οποίο ακολούθως ενεργοποιεί την PKG. Ο στόχος της PKG είναι οι μιτοχονδριακοί δίαυλοι KATP και ο σχηματισμός προστατευτικών ROS μέσω αυτού (Inserte and Garcia-Dorado, 2015). Το NO είναι ένα σημαντικό καρδιοπροστατευτικό μόριο. Ωστόσο, όλες οι δράσεις του NO στην καρδιοπροστασία δεν διαμεσολαβούνται μόνο μέσω αυξημένου σχηματισμού cGMP και επακόλουθης ενεργοποίησης PKG. Στην πραγματικότητα, το NO είναι υπεύθυνο για αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών μέσω νίτρωσης ή νιτροζυλίωσης. Η νιτροζυλίωση προστατεύει τα κατάλοιπα κυστεΐνης από την οξείδωση και η μείωση του εμφράγματος έχει συσχετιστεί με αρκετές νιτροζυλιώσεις πρωτεϊνών ανεξάρτητα από την PKG (Wang et al., 2018).

Η οδός RISK ξεκινά με την ενεργοποίηση της PI3K, των κινασών Akt και ERK κατά την πρώιμη επαναιμάτωση σε απόκριση εξωγενών καρδιοπροστατευτικών παραγόντων. Καθοδικός στόχος της Akt είναι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK 3β) και η ενεργοποίηση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα από τις ERKs. Το RISK ενεργοποιείται από το IPC και συμβάλλει στην μείωση της έκτασης του εμφράγματος. Η GSK 3β προτάθηκε να είναι το καθοδικό σημείο σύγκλισης της οδού RISK, η οποία όταν φωσφορυλιώνεται και αναστέλλεται αναστέλλει την διάνοιξη των mPTP. Πρόσφατες μελέτες επίσης έδειξαν μορφολογική προστασία των μιτοχονδρίων από ενεργοποίηση της Akt (Hausenloy and Yellon, 2007; Rossello and Yellon, 2018).

Το μονοπάτι Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway έχει προταθεί ότι συνεισφέρει στην καρδιοπροστασία μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNFa και του υποδοχέα του και της οδού των κινασών Janus kinase (JAK) /Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3. Η ενεργοποίηση του STAT 3 κατέχει σημαντικό ρόλο στην πιο μακροπρόθεσμη μεταγραφική ρύθμιση προς τα πάνω των καρδιοπροστατευτικών πρωτεϊνών, αλλά επίσης επιφέρει και ένα οξύ αποτέλεσμα στη βελτίωση της αναπνοής των μιτοχονδρίων και στη μείωση της απόπτωσης.



Εικονά 8: Συνοψη των μοριακών μηχανισμών καρδιοπροστασιας. Το μονοπατι NO/PKG απεικονίζεται με πράσινο χρώμα, το μονοπάτι RISK με κίτρινο χρώμα και το μονοπάτι SAFE με κόκκινο χρώμα (Heusch, 2015).

# Τελεστές

Υπάρχει η θεωρία ότι τα μιτοχόνδρια είναι ο σημαντικότερος τελεστής της προστασίας του conditioning, καθώς τα περισσότερα, αν όχι όλα, από τα παραπάνω μονοπάτια σηματοδότησης συγκλίνουν στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια έχουν καθοριστικό ρόλο για την κυτταρική επιβίωση ή το θάνατο, αντίστοιχα. Ο πρώτος μηχανισμός καρδιοπροστασίας που επάγεται άμεσα από τα μιτοχόνδρια είναι η αναστολή των mPTP μετά την ενεργοποίηση του RISK και την απενεργοποίηση της GSK3β.

Επιπροσθέτως, οι δίαυλοι ΚΑΤΡ που εντοπίζονται στο σαρκόλλημα και στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη λειτουργούν ως τελεστές της καρδιοπροστασίας. Η ενεργοποίησή τους στο σαρκόλλημα μειώνει την υπερφόρτωση του κυττάρου από το ασβέστιο ενώ οι μιτοχονδριακοί ΚΑΤΡ όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή καρδιοπροστατευτικών ROS και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PKCε. Υπάρχει επίσης μια στενή αλληλεπίδραση των μιτοχονδριακών ΚΑΤΡ με την μιτοχονδριακή Cx 43 στην απελευθέρωση των ROS.

Η Cx43 εντοπίζεται επίσης στο σαρκόλημα και στα μιτοχόνδρια. Στο κυτοσόλιο, η διατήρηση της ενεργότητας της Cx43 έχει συσχετιστεί με την μείωση του κυτταρικού οιδήματος. Ο κυρίαρχος ρόλος της Cx43 στην καρδιοπροστασία, ωστόσο, βρίσκεται στην εσωτερική

μιτοχονδριακή μεμβράνη. Κατά το IPC η Cx43 μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς που εξαρτάται από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ. Η ενεργοποίηση των μιτοχονδριακών διαύλων Cx 43 συμβάλλει στην πρόσληψη καλίου από το μιτοχονδρίου και βελτιώνει την μιτοχονδριακή αναπνοή (Boengler et al., 2006; Schulz et al., 2015).

Ο STAT3 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που εμπλέκεται σε αρκετές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες στην καρδιά. Ο STAT3 εντοπίστηκε στα μιτοχόνδρια και η καρδιοπροστατευτική του δράση συσχετίστηκε με την αύξηση της μιτοχονδριακής αναπνοής μέσω του συμπλόκου Ι και αναστολή διάνοιξης των mPTP (Gross et al., 2006; Heusch et al., 2011).

Η εξοκινάση 2 είναι η κυρίαρχη μορφή της εξοκινάσης στην καρδιά και παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό της γλυκόζης ενώ η μετατόπισή της στα μιτοχόνδρια ευνοεί τη γλυκόλυση. Η σύνδεση της εξοκινάσης 2 με τα μιτοχόνδρια είναι καρδιοπροστατευτική, ενώ η αποσύνδεσή της από τα μιτοχόνδρια απελευθερώνει το κυτόχρωμα C από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυτοσόλιο προκαλώντας τον θάνατο των κυττάρων. Οι σαφείς μηχανισμοί καρδιοπροστασίας της μιτοχονδριακής εξοκινάσης δεν έχουν εξακριβωθεί, αλλά σίγουρα περιλαμβάνουν την αναστολή της διάνοιξης των mPTP. Τέλος, στους τελεστές συγκαταλέγεται και η σχέση του σαρκοπλασματικού δικτύου με τον mPTP μέσω της διακίνησης ιόντων ασβεστίου (Gomez et al., 2016a).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των καρδιοπροστατευτικών σημάτων που στοχεύουν στα μιτοχόνδρια(Heusch, 2015)

#### 1.9 Η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου GSK3β και ο ρόλος της

#### 1.9.1 Η δομή και η λειτουργία της GSK3β

Η GSK 3 είναι μία κινάση σερίνης θρεονίνης και το όνομά της οφείλεται στην ιδιότητά της να φωσφορυλιώνει και κατ'επέκταση να απενεργοποιεί τη συνθετάση του γλυκογόνου. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί δύο ισομορφές κάθε μία από τις οποίες εκφράζεται από διακριτό γονίδιο, η GSK3β και η GSK3α με μοριακά βάρη 47 και 51 kDa αντίστοιχα. Η διαφορά στο μοριακό τους βάρος αποδίδεται σε ένα πλούσιο τμήμα γλυκίνης στο αμινοτελικό άκρο της GSK3β. Οι δύο ισομορφές εμφανίζουν υψηλή ομολογία στο τμήμα της κινάσης (≈98% ομοιότητα) ωστόσο μοιράζονται μόνο το 36% κοινό στα τελευταία 76 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου (Woodgett, 1990). Η GSK3β εμφανίζει επίσης υψηλή ομολογία μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Όσον αφορά τη λειτουργία της φαίνεται ότι σε αντίθεση με τις περισσότερες κινάσες όταν το κύτταρο βρίσκεται στη βασική του κατάσταση η GSK3 είναι ενεργή και ασκεί ανασταλτικό τόνο στα σηματοδοτικά μονοπάτια που έπονται αυτής.

Η δράση της GSK3β ως κινάση εμφανίζει ιδιαιτερότητες. Είναι πλέον κατανοητό ότι η GSK3β στοχεύει και επιδρά κατά προτίμηση σε ήδη φωσφορυλιωμένα υποστρώματα. Η αλληλουχία των υποστρωμάτων τα οποία μπορεί να αναγνωρίσει εκλεκτικά είναι Ser/Thr-X-X-Ser/Thr-P, όπου η πρώτη σερίνη ή θρεονίνη είναι το αμινοξύ-στόχος της GSK3β, τα αμινοξέα X είναι οποιαδήποτε αμινοξέα αλλά συνήθως η αλληλουχία περιέχει προλίνη και η τελευταία σερίνη ή θρεονίνη αποτελεί το σημείο στο οποίο το υπόστρωμα έχει ήδη φωσφορυλιωθεί. Αν και η υπάρχουσα φωσφορυλίωση του υποστρώματος δεν είναι πάντα προαπαιτούμενη, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της GSK3β κατά 100 εως 1000 φορές. Για παράδειγμα, η συνθάση του γλυκογόνου απαιτεί μία πρώτη φωσφορυλίωση από την κινάση της καζεΐνης (CK2) πριν φωσφορυλιωθεί σε διάφορα σημεία από την GSK3β (Fiol et al., 1988, 1990). Ωστόσο, όλα τα υποστρώματα της GSK3 δεν φωσφορυλιώνονται με τον ίδιο τρόπο ή την ίδια αποτελεσματικότητα. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Γαμ, β-κατενίνη και η αξίνη φωσφορυλιώνονται χωρίς να απαιτείται προηγούμενη φωσφορυλίωση σε θέση [P + 4] από την θέση φωσφορυλίωσης (Frame and Cohen, 2001; Wu and Pan, 2010).

Η ανακάλυψη της κρυσταλλικής δομής της GSK3β αρκετά χρόνια αργότερα από την περιγραφή της λειτουργίας της (Bax et al., 2001; Dajani et al., 2001; Haar et al., 2001) επιβεβαίωσε τον μηχανισμό με τον οποίο η κινάση εμφανίζει προτίμηση σε ήδη φωσφορυλιωμένα υποστρώματα. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η δράση της μοιάζει με αυτή των κινασών CDK2, p38 και ERK2 οι οποίες επίσης δρούν σε υποστρώματα κοντά σε ένα ήδη φωσφορυλιωμένο αμινοξύ. Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε ότι η GSK3 φέρει μία φωσφορυλιωμένη τυροσίνη στις θέσεις Y216 / Y279 (για την GSK-3β / GSK-3α, αντίστοιχα). Η τυροσίνη αυτή εντοπίζεται σε έναν βρόγχο ενεργοποίησης που χαρακτηρίζεται ως «Τ-βρόγχος». Η ενεργοποιητική αυτή φωσφορυλίωση θα μπορούσε να ήταν απαραίτητη για την κατάλληλη διαμόρφωση της κινάσης δεν εμφανίζει περιορισμούς (Dajani et al., 2001). Επομένως, προτείνεται ότι η φωσφορυλίωση του υποστρώματος, αλλά δεν απαιτείται αυστηρά για την δραστηριότητα της κινάσης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η GSK3 εντοπίζεται στο κύτταρο και σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή (Krishnankutty et al., 2017).

Απουσία ερεθισμάτων στο κύτταρο όπως π.χ. της ινσουλίνης, των αυξητικών παραγόντων ή των αμινοξέων, η GSK3 είναι πλήρως ενεργή. Σε αυτή την κατάσταση, υποστρώματα που είναι ήδη φωσφορυλιωμένα δεσμεύονται και ευθυγραμμίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η GSK3 να μπορεί να φωσφορυλιώσει σε σερίνες ή θρεονίνες ευρισκόμενες σε απόσταση τεσσάρων αμινοξέων. Η διέγερση των κυττάρων με αγωνιστή, όπως η ινσουλίνη, προκαλεί την απενεργοποίηση της GSK-3 μέσω μηχανισμού εξαρτώμενο από την κινάση της φωσφατιδυλο - ινοσιτόλης 3 (PI3K). Η επαγόμενη από την PI3K ενεργοποίηση της Akt (επίσης ονομαζόμενη PKB) έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της Akt , η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει και τις δύο ισομορφές της GSK-3 στην σερίνη 9 της GSK-3β και στην σερίνη 21 της GSK-3α) (Cross et al., 1995). Η φωσφορυλίωση αυτή προκαλεί το αμινοτελικό άκρο της GSK3β να έχει μία διευθέτηση και να λειτουργεί ως ψευδουπόστρωμα. Τοποθετείται, δηλαδή, στην θέση κατάλυσης και έτσι η ανασταλτική φωσφορυλίωση στην S9/21 GSK3 αποκλείει την φωσφορυλίωση των (ήδη φωσφορυλιωμένων) υποστρωμάτων της GSK3. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μηχανισμός αναστολής είναι ανταγωνιστικός. Έτσι, ορισμένα υποστρώματα, σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να ανταγωνιστούν το ψευδουπόστρωμα και να αλληλεπιδράσουν με την GSK3 γεγονός που οδηγεί στη φωσφορυλίωσή τους (Frame and Cohen, 2001). Έχει προταθεί, λοιπόν, η μέτρηση της δραστηριότητας της GSK3 μέσω προσδιορισμού των μη φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων της GSK3 ως πιο αξιόπιστη. Τέλος, έχει διαπιστωθεί και ακόμη μία φωσφορυλίωση της GSK3β που επάγεται από την p38 της οικογένειας των MAPK κινασών στην S389 στους μύες και στην Thr390 στον άνθρωπο, η οποία λειτουργεί επίσης ανασταλτικά. Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής είναι υπό διερεύνηση (Thornton et al., 2008).



#### 1.9.2 Ο ρόλος της GSK3 στο μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης

Τα Wnts είναι μια οικογένεια εκκρινόμενων, πλούσιων σε κυστεΐνη, γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνικών προσδεμάτων που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και μετανάστευση των κυττάρων (Miller, 2002). Ένα από τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από την

οικογένεια Wnt χαρακτηρίζεται ως η κανονική οδός Wnt ή η οδός Wnt / β-κατενίνης. Σε αυτό το μονοπάτι όπως και στην οδό ινσουλίνης, η GSK-3 παίζει έναν βασικό ανασταλτικό ρόλο. Υπάρχουν γενικά δύο ομάδες β-κατενίνης στα κύτταρα: μία δεξαμενή που συνδέεται στενά με τις cadherins στα τμήματα που συνενώνονται τα κύτταρα και η άλλη είναι «ελεύθερη» στο κυτοσόλιο και τον πυρήνα. Η τελευταία δεξαμενή εμπλέκεται στη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Στην κατάσταση ηρεμίας, η κυτοσολική / πυρηνική β-κατενίνη πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ενός συμπλέγματος πολλών πρωτεϊνών, που ονομάζεται σύμπλοκο καταστροφής β-κατενίνης, συνδεδεμένο με αξίνη και την πρωτεΐνη APC. Σε αυτό το σύμπλοκο, η κινάση της καζεΐνης Ι-άλφα (CKIa) και η GSK3, που αποτελούν δύο άλλα σημαντικά συστατικά του συμπλόκου, φωσφορυλιώνουν διαδοχικά την β-κατενίνη. Η φωσφορυλίωση από την CKIa πραγματοποιείται στην S45 της β κατενίνης και την «προετοιμάζει» για την επακόλουθη φωσφορυλίωση από την GSK3β στις θέσεις S33/S37/T41. Η φωσφορυλίωση της β κατενίνης από την GSK3β, με την σειρά της, στοχεύει την β κατενίνη ώστε να υποστεί ουβικιτιλίωση και αποικοδόμηση μέσω του 26S πρωτεασώματος (Wu and Pan, 2010). Σε μικρότερο βαθμό συνυπάρχει και μηγανισμός αναστολής της GSK3 στο μονοπάτι Wnt. Η έκθεση των κυττάρων στα Wnt, ενδέχεται να οδηγεί και στην αδρανοποίηση της GSK-3 μέσω ενός ασαφούς μηχανισμού. Ως αποτέλεσμα αυτού, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται και διαφεύγει από τον μηγανισμό αποικοδόμησης της ουμπικουιτίνης. Η μη φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός ρυθμιστής.

#### 1.9.3 Αναστολείς της GSK3

Έχουν περιγραφεί τρεις κατηγορίες αναστολέων της GSK-3: 1) κατιόντα που ανταγωνίζονται το Mg<sup>2+2</sup>) συναγωνιστικοί αναστολείς που δρουν στην κοιλότητα δέσμευσης του ATP και 3) μη συναγωνιστικοί αναστολείς που αλληλεπιδρούν με την περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Το ιόν λιθίου είναι ο πιο διαδεδομένος αναστολέας της GSK-3 και πιθανώς λειτουργεί συναγωνιζόμενος τη δέσμευση του Mg<sup>2+</sup>, που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της κινάσης. Ένας αριθμός ισχυρών και αρκετά εκλεκτικών αναστολέων της GSK-3 μικρού μοριακού βάρους έχουν αναπτυχθεί αλλά αναστέλλουν αδιάκριτα τις δύο ισομορφές της GSK3 (GSK-3a kai GSK-3b) kai οι περισσότεροι ενεργούν ως συναγωνιστικοί ανταγωνιστές στη θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ. Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των συναγωνιστικών αναστολέων που έχουν σχεδιαστεί είναι: 1) το χαμηλό μοριακό βάρος 2) η παρουσία ετερόκυκλων δακτυλίων που είναι κυρίως υδρόφοβοι και παρέχουν στο μόριο επιπεδότητα, 3) είναι συναγωνιστικοί αναστολείς ανταγωνιζόμενοι την πρόσδεση του ΑΤΡ στην κοιλότητα της κινάσης που αυτό προσδένεται 4) συνδέονται στην GSK3 με τρόπο όπως οι ανταγωνιστές των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs, δηλαδή συνδέονται κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και κάποια αμινοξέα (όπως η βαλίνη 135 και η ασπαραγίνη λειτουργούν ως δέκτες ή δότες δεσμών υδρογόνου. Το μειονέκτημα των 133) συναγωνιστικών αναστολέων είναι ότι θέση δράσης τους στην κοιλότητα του ΑΤΡ εμφανίζει υψηλό βαθμό ομολογίας σε ένα ευρύ φάσμα κινασών και επομένως είναι απαραίτητο να μελετάται η εξειδίκευση αυτών των αναστολέων. Η ταυτοποίηση της κρυσταλλικής δομής της GSK3β με ακτίνες X επέτρεψε τον ορθολογικό σχεδιασμό νέων αναστολέων για την GSK-3β. Για παράδειγμα, μελέτες δομής-δράσης οδήγησαν στην ανάπτυξη 2,4δισυποκατεστημένων θειαδιαζολιδινών (TDZDs), που αποτελεί την πρώτη κατηγορία αναστολέων GSK-3 μη-ανταγωνιστικού τύπου με το ATP.

#### 1.9.4 Η GSK3β στην καρδιοπροστασία

Η ενεργοποίηση σε διάφορα σημεία κατά μήκος των διαφόρων σηματοδοτικών οδών έχει ως αποτέλεσμα να επάγονται παρόμοια επίπεδα προστασίας των καρδιομυοκυττάρων από βλάβη επαναιμάτωσης. Για παράδειγμα, ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων από ποικιλία προσδεμάτων (όπως η αδενοσίνη, η ενδοθηλίνη, η αγγειοτενσίνη, η βραδυκινίνη, κλπ.) έχει αποδειχθεί ότι είναι εξίσου αποτελεσματική στην καρδιοπροστασία με την άμεση επέμβαση με φαρμακολογικούς παράγοντες στους καθοδικούς μηχανισμούς μοριακής σηματοδότησης όπως η ενεργοποίηση της PKA, της Akt, της PKC και η απενεργοποίηση της GSK3β. Φαρμακολογική ενεργοποίηση του υποτιθέμενου μιτοχονδριακού ΚΑΤΡ διαύλου και η θεραπεία με αναστολείς CyP-D (π.χ. CsA ή sanglifehrin A-SfA) προκαλεί παρόμοια επίπεδα προστασίας των κυττάρων. Η προστασία σε παρόμοιο βαθμό εξηγείται μέσω της κοινής σηματοδοτικής πορείας αυτών των κινασών ενδοκυτταρικά. Οι κινάσες αυτές δρούν με έναν γενικό μηγανισμό προστασίας που είναι η φωσφορυλίωση και αναστολή της GSK3β και όχι της GSK3α είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η GSK3β, στη συνέγεια επιδρά στον τελεστή της καρδιοπροστασίας τον mPTP και οδηγεί σε αναστολή της διάνοιξής του (Juhaszova et al., 2004). Ωστόσο, ο μηγανισμός με τον οποίο η GSK3β μπορεί να αλληλεπιδρά με τον mPTP είναι ακόμη ασαφής και έχουν προταθεί πληθώρα ρυθμιστικών πρωτεϊνών που μπορεί να μεσολαβούνται ανάμεσα στην GSK3β και τον mPTP. Μεταξύ αυτών, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 που σχετίζονται με την απόπτωση, φέρουν το χαρακτηριστικό μοτίβο που αναγνωρίζεται από την GSK3β και αλληλεπιδρούν με τα μιτοχόνδρια. Παρόλα, αυτά δεν έχει εδραιωθεί ο ρόλος της οικογένειας αυτής ως ο συνδετικός κρίκος στην σηματοδότηση της GSK3β στον mPTP.

Η σχέση της GSK3β με τους ενδογενείς μηγανισμούς καρδιοπροστασίας έχει διερευνηθεί για περισσότερο από μια δεκαετία και στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η αναστολή της GSK3β έχει συσχετιστεί με τις καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις της ισχαιμικής προετοιμασίας (Nishihara et al., 2007), την μετα-ισχαιμική προστασία (POC) (Gomez et al., 2008) και την φαρμακολογική επαγωγή των οδών του conditioning (Chen et al., 2017; Korzick et al., 2007). Ο ρόλος της αναστολής της GSK3β στην καρδιοπροστασία έχει εξεταστεί μέχρι στιγμής με δύο τρόπους. η μία προσέγγιση έχει εφαρμόσει γενετικά τροποποιημένους μύες για GSK3β και ο άλλος αφορά την χρήση των αναστολέων της GSK3β. Για να εξεταστεί ο ρόλος της GSK3β στην καρδιοπροστασία, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο γονιδιακών μυών οι οποίοι εκφράζουν εκλεκτικά στην καρδιά την κινάση GSK3β που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί στην σερίνη 9 με αποτέλεσμα η κινάση να παραμένει διαρκώς σε ενεργή κατάσταση. Σε αυτό το μοντέλο, η εφαρμογή POC (3 κύκλοι ενός λεπτού ισχαιμίας και 1 λεπτού επαναιμάτωσης πριν την πλήρη αποκατάσταση της αιματικής ροής) δεν ήταν αποτελεσματική. Με αυτόν τον τρόπο, διατυπώθηκε ότι η αναστολή της GSK3β είναι απαραίτητη για την καρδιοπροστασία (Gomez et al., 2008; Juhaszova et al., 2004). Αντίθετα, οι Nishino et al., χρησιμοποίησαν διαγονιδιακό μοντέλο μυών οι οποίοι είχαν έλλειψη της αμινοτελικής σερίνης 9 για GSK3β και της σερίνης 21 για καρδιές GSK3a. Σε απομονωμένες των διαγονιδιακών αυτών πειραματόζωων προσδιορίστηκε η επίδραση διαφορετικών πρωτοκόλλων ισχαιμικής προετοιμασίας και POC στο μέγεθος του εμφράγματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι απενεργοποίηση της GSK3 δεν εμπλέκεται στην καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση της ισχαιμικής προετοιμασίας και της POC (Nishino et al., 2008). Στην ίδια μελέτη προτάθηκε ότι η αναστολή της GSK3β είναι απίθανο να χρησιμεύσει ως μεσολαβητής της καρδιοπροστασίας από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη cGMP / PKG. Οι γενετικές τροποποιήσεις, ιδίως αυτές που εμφανίζονται καθ 'όλη τη διάρκεια ζωής του πειραματόζωου, μπορούν να οδηγήσουν σε αντισταθμιστικές αλλαγές, οπότε είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα Ωστόσο, το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση της GSK3β δεν παίζει έναν αιτιώδη ρόλο στην προστασία με POC υποστηρίζεται επίσης από δεδομένα από το in situ μοντέλο χοίρου και την ex νίνο μοντέλο απομονωμένων καρδιών επιμύων (Inserte and Garcia-Dorado, 2015).

Η άλλη προσέγγιση βασίζεται στη χορήγηση φαρμακολογικών αναστολέων της GSK3β όπως τα μόρια SB216763, SB415286 και η 6-βρωμοινδιρουμπίνη-3΄-οξίμη (BIO) που δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς. Αυτά τα μόρια, σε αντίθεση με τους προαναφερθέντες γενετικούς χειρισμούς, προτείνονται να δεσμεύονται στη θέση πρόσδεσης ΑΤΡ και να καταργούν τη μεταφορά φωσφορικών προς τους καθοδικούς στόχους της GSK3β (Beurel κ.ά., 2015). Στις μελέτες που ανασκοπούνται στον παρακάτω πίνακα, η χορήγηση των αναστολέων GSK3β (SB 216763) σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα έδειξαν καρδιοπροστατευτική δράση που προσδιορίζεται βάση της μείωσης του μεγέθους του η αναστολή της έχει εμφράγματος. Ακόμη, GSK3 αποδειχθεί ότι παρέχει καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα παρουσία υπέρτασης (González Arbeláez et al., 2013).

Το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα της αναστολής της GSK3β στις περισσότερες μελέτες αποδίδεται στην αναστολή του mPTP. Η συσχέτιση της GSK3β με τον mPTP έχει αποδοθεί σε διαφορετικούς μηγανισμούς. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν τη συσχέτιση της GSK3β με ρυθμιστικά τμήματα του πόρου όπως ο μεταφορέας ANT, ο VDAC και η εξοκινάση 2 (Zhai et al., 2011). In vitro αποδείχθηκε ότι η GSK3β μπορεί να μετατοπιστεί στα μιτοχόνδρια κατά τρόπο εξαρτώμενο από την φωσφορυλίωση στην σερίνη 9 και να αλληλεπιδράσει με τον VDAC κυρίως την ισομορφή 2 (Tanno et al., 2014). Η δράση της GSK3β στην καρδιοπροστασία έχει επίσης συσχετιστεί και με διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς πλην της αναστολής του mPTP. Ωστόσο, οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν εδραιωθεί. Η αναστολή της GSK3β εμπλέκεται με την αυτοφαγία τόσο κατά την περίοδο της ισχαιμίας όσο και κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης. Η σχέση της καρδιοπροστασίας με τον mTOR και την αυτοφαγία αποδείχθηκε όταν η συγχορήγηση του αναστολέα SB216763 με την ραπαμυκίνη αναίρεσε το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα επαγόμενο από την γορήγηση του αναστολέα της GSK3β μόνο (Vigneron et al., 2011). Η αναστολή της GSK3β και η δράση της στην οδό Wnt έχει επίσης συσχετιστεί με την μείωση της έκτασης του εμφράγματος (Barandon et al., 2005; Foulquier et al., 2018). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ευεργετική επίδραση της GSK3β στα μιτοχόνδρια οφείλεται στη βελτίωση της ρύθμισης των ιόντων ασβεστίου στο ενδοπλασματικό και σαρκοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα να μειώνεται η υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων στο ασβέστιο (Gomez et al., 2016a).

# 1.10 Παράγωγα ινδιρουμπινών ως εκλεκτικοί αναστολείς της GSK3.

# 1.10.1 Προέλευση της ινδιρουμπίνης

Η ινδιρουμπίνη είναι η χημική ουσία που περιέχεται στην χρωστική (ίντιγκο) της οποίας η χρήση χρονολογείται στην εποχή του χαλκού (7000 π.Χ.) και χρησιμοποιούνταν για τη βαφή των υφασμάτων. Γαστερόποδα μαλάκια των οικογενειών Muricidae και Thaididae έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά μέρη του κόσμου ως πηγές της πορφυρής βαφής, γνωστής ως ''Πορφύρα της Τύρου'' ή ''Βασιλικό μπλε''. Στη Μεσόγειο κυρίως πηγή της βαφής είναι τα είδη Murex brandaris και Hexaplex trunculus. Δρογοετυμολογικά η λέξη πορφύρα (μπορεί

να αναφέρεται και ως ''Tyrian purple", ή ως 'Royal purple'), προέρχεται από το Ομηρικό ρήμα φύρω (με την πανάρχαια ρίζα φυρ), που σημαίνει ''αναμειγνύω κάποια ξηρά ουσία με υγρή", ραντίζω, βρέχω, ανακατεύω, βάφω, διεργασίες που παραπέμπουν στην πορεία εξαγωγής και χρήσης της πορφύρας. Ακόμα και το αγγλικό purple, έχει τις ρίζες του στο Λατινικό ''purpura", το οποίο προέρχεται άμεσα από το αρχαιοελληνικό «φύρω» (McGovern and Michel, 1990).

Η βαφή προέρχεται από τις βλεννώδεις εκκρίσεις ενός αδένα που βρίσκεται κοντά στο στόμιο του κελύφους των μαλακίων. Οι εκκρίσεις του Hexaplex trunculus, εμπεριέχουν ινδοξύλια και 6-βρωμοϊνδοξύλια, υποκατεστημένα και μη στη 2 θέση, ενώ οι εκκρίσεις των Thais haemastoma και Bolinus brandaris περιέχουν μόνο τα 2 υποκατεστημένα 6-βρωμοϊνδοξύλια. Κατά συνέπεια, το Hexaplex παράγει ιντιγκοτίνη (ίντιγκο) και 6,6'-διβρωμοϊντιγκοτίνη, ενώ τα άλλα δύο είδη, αποκλειστικά σχεδόν 6,6'-διβρωμοϊντιγκοτίνη.



Εικόνα 11 : Θαλάσσια είδη που παράγουν πορφύρα Murex brandaris Muridaceae (στα αριστερά) και Hexaplex trunculus Muridaceae (στα δεζιά)

Η ινδιρουμπίνη αποτελεί επίσης το δραστικό συστατικό της δρόγης Danggui Longhui Wan, που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική (Hoessel et al., 1999). Το ενδιαφέρον για κλινική χρήση της ινδιρουμπίνης προκλήθηκε στη δεκαετία του 1980 όταν δοκιμάστηκε για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (XMA). Η δραστικότητα της δρόγης στη νόσο αποδείχθηκε όταν πάνω από το 50% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με XMA παρουσίασαν μερική ή πλήρη ύφεση. (Blažević et al., 2015) Η ινδιρουμπίνη (Indigo naturalis) έχει εντοπιστεί σε αρκετά φαρμακευτικά φυτά. Κάποια από αυτά είναι: Baphicacanthus cusia (Acanthaceae) ,Polygonum tinctorium (Polygonaceae), Satis indigotica (Brassicaceae), Indigofera suffrutticosa (Fabaceae), Indigofera tinctoria (Fabaceae) (Meijer et al., 2003).

Η δομή της ινδιρουμπίνης απεικονίζεται παρακάτω και η επίσημη ονομασία κατά IUPAC είναι (3Z)-3-(3-Oxo-1,3-dihydro-2H-indol-2-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one.


#### 1.10.2 Ο αναστολέας της GSK3β, BIO

Έχει αποδειχθεί ότι οι ινδιρουμπίνες είναι ισχυροί αναστολείς (IC<sub>50</sub> = 5-50 nM) της GSK-3β, ενώ άλλα παράγωγα ιντιγκοειδών είναι ανενεργά. Μεταξύ των μορίων που φέρουν μία ομάδα ινδολίου και αυτών που φέρουν δύο ομάδες ινδολίου έχει αποδειχτεί ότι μόνο τα δις-ινδόλια (ινδιρουμπίνες) έχουν δραστικότητα έναντι των κινασών GSK-3β, CDK1 / κυκλίνη B και CDK5 / p25. Κατά γενική ομολογία, οι καλοί αναστολείς των CDKs είναι ταυτόχρονα καλοί GSK-3αναστολείς. Υπάρχουν όμως, δύο εξαιρέσεις, που είναι το μόριο 5,5'διβρωμοδιδιρουβίνη, η οποία είναι αρκετά δραστική στην GSK-3 αλλά έχει ελάχιστη δράση στις CDKs και η 5-σουλφονική ινδιρουβίνη-3'-μονοξίμη, η οποία εμφανίζει δέκα φορές μειωμένη δραστικότητα επί της GSK-3β έναντι των CDKs. Αυτές οι δύο εξαιρέσεις υποδεικνύουν ότι μπορεί να είναι δυνατόν να ληφθούν παράγωγα ινδιρουμπίνης υψηλής επιλεκτικότητας για είτε για την GSK-3 είτε για τα CDKs (Cohen and Goedert, 2004).

Ο αναστολέας BIO έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει in vitro την GSK3 με IC<sub>50</sub> της τάξης του 0,005μM. Η δράση του ως αναστολέας της GSK3 έχει αποδειχθεί και in vivo καθώς έχει επιδείξει καρδιοπροστατευτική δράση σε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης και παράλληλα νευροπροστατευτική δράση στη νόσο του Alzheimers (Eldar-Finkelman and Martinez, 2011; Llorens-Marítin et al., 2014; Meijer et al., 2003).



Προκαταρτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας επιβεβαίωσαν τη δράση της BIO στην καρδιοπροστασία. Για να εξετάσουμε αν η χορήγηση της BIO μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε αναισθητοποιημένους κονίκλους. Είκοσι πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά περιφερειακής ισχαιμίας της καρδιάς, ακολουθούμενα από 3 ώρες επαναιμάτωσης και τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες:

- Ομάδα ελέγχου (n = 6): χορήγηση φυσιολογικού ορού με λίγες σταγόνες Tween 80 (vehicle)
- BIO A ( $\eta$  = 7): To BIO corhyhbhre endowlebiwg sta 5 mg / Kg
- BIO B (n = 7): Το BIO χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε 10 mg / Kg

Η ενδοφλέβια χορήγηση πραγματοποιήθηκε στο 20 λεπτό της παρατεταμένης ισχαιμίας και ο προσδιορισμός του μεγέθους του εμφράγματος πραγματοποιήθηκε στο τέλος της επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο δόσεις της ΒΙΟ μειώνουν την έκταση του εμφράγματος. Επομένως, θεωρήθηκε ότι η καρδιοπροστατευτική επίδραση εκδηλώνεται σε δόση μεγαλύτερη των 5mg/kg που αντιστοιχεί σε μοριακή δόση ίση με 0,0146mmoles/kg. Αφού επιβεβαιώθηκε η δράση της ΒΙΟ στην καρδιοπροστασία.

#### 1.10.3 Η σειρά αναλόγων MLS με βελτιωμένη εκλεκτικότητα και υδατοδιαλυτότητα

Η χρήση του μορίου ΒΙΟ εμφανίζει περιορισμούς εξαιτίας της χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς του. Ο σχεδιασμός των παραγώγων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη αποτελεί προϊόν της μελέτης της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης. Είναι βασισμένος σε μία ορθολογιστική προσέγγιση αναστολής της συγκεκριμένης κινάσης με βάση την κρυσταλλογραφική απεικόνιση του συνκρυστάλλου της ινδιρουμπίνης στην πλευρά σύνδεσης του ATP σε διαφορετικές κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Polychronopoulos et al., 2004). Από τα ανάλογα των ινδιρουμπινών η 3'οξίμη της (2'Z,3'E)-6- βρωμοινδιρουμπίνης, (BIO) έχει γρησιμοποιηθεί ως πιθανό θεραπευτικό μόριο και ως φαρμακολογικό εργαλείο δεδομένου ότι δρα ως ικανός και εκλεκτικός συναγωνιστικός αναστολέας της GSK3β στη θέση του ATP Οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα μόρια της εργασίας αυτής στόχευσαν στην βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας και τη βελτιστοποίηση της δραστικότητας και της εκλεκτικότητας έναντι άλλων κινασών. Η ογκώδης υποκατάσταση στην θέση 6 είναι απαραίτητη για την εκλεκτικότητα των μορίων για την GSK3β έναντι των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs η οποία παρέχει στερεοχημική παρεμπόδιση στο ενεργό κέντρο. Η εκλεκτικότητα οφείλεται στις διαμοριακές επιδράσεις των παραγόντων με το αμινοξύ ιντερλευκίνη 132 της GSK3 και επιτρέπει τη διευθέτηση των 6 υποκατετημένων ινδιρουμπινών έναντι της φαινυλαλανίνη 80 των CDKsπου βρίσκεται στην αντίστοιγη θέση στο ενεργό κέντρο. Οι υποκαταστάσεις στην 3΄ θέση της οξίμης με μία υδρόφιλη αλυσίδα είναι ευνοϊκές για την αλληλεπίδραση με τα κατάλοιπα ριβόζης και φωσφορικών στην κοιλότητα του ΑΤΡ της κινάσης.

Τα παράγωγα που μελετώνται στην παρούσα εργασία αναφέρονται ως MLS2776-MLS2779 και προέκυψαν από ημισυνθετικές διαδικασίες επί του μορίου BIO. Τα παράγωγα εμφανίζουν πολύ καλή αναστολή της GSK-3, βελτιωμένη εκλεκτικότητα και δραματικά αυξημένη διαλυτότητα που αποδίδεται σε μία επιμήκη αλυσίδα αμίνης στη θέση 3' με δακτυλίους πιπεραζίνης της μορφολίνης (Vougogiannopoulou et al., 2008).

Η ανασταλτική δράση των παραγώγων των ινδιρουμπινών μελετήθηκε σε GSK3a/β που απομονώθηκε από εγκέφαλο χοίρου με τη βοήθεια χρωματογραφίας συγγένειας που ως στατική φάση είχε ακινητοποιημένη αξίνη. Επιπροσθέτως, επιτελέστηκε επιβεβαίωση της ενδοκυτταρικής αναστολής της GSK3 από τη μέτρηση της επίδρασης στην φωσφορυλίωση της β κατενίνης στην ειδική θέση της πρωτεΐνης για την GSK3 σε κύτταρα νευροβλαστώματος (SH-SY5Y). Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις από τους αναστολείς, παρουσία MG132, ενός αναστολέα πρωτεάσης που παρεμποδίζει την ταχεία αποδόμηση της β κατενίνης αφού αυτή φωσφορυλιωθεί από την GSK3. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης εκτιμήθηκαν είτε με Western Blot με χρήση ειδικού αντισώματος που αλληλεπιδρά με την β κατενίνη που έχει φωσφορυλιωθεί από την GSK3, είτε με τη χρήση της μεθόδου ELISA. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία δοσοεξαρτώμενη αναστολή της GSK3 εδοκυτταρικά (Vougogiannopoulou et al., 2008).

Compounds	IC50 GSK3α/β	IC50 CDK 1	IC50 CDK5
BIO	0.005	0.320	0.083
MLS2776	0.0033	0.3	0.2
MLS2777	0.007	0.4	0.4
MLS2778	0.06	1.10	0.60
MLS2779	0.005	0.6	0.2

Πίνακας 1: Πειραματικά δεδομένα της ικανότητας αναστολής της GSK3 από τα παράγωγα MLS και της εκλεκτικότητας έναντι των CDKs (Vougogiannopoulou et al., 2008)

### 1.11 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Από την ανασκόπηση των βιβλιογραφικών δεδομένων για την δράση της GSK3β συνάγεται ότι η κινάση αυτή εμφανίζει πλειοτροπικές δράσεις που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Συγκεκριμένα, η δράση της GSK3β στο έμφραγμα του μυοκαρδίου στην πλειοψηφία των μελετών αποδίδεται στην ικανότητα της GSK3β να αναστέλλεται και να αποτρέπει τη διάνοιξη του mPTP. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο η απενεργοποίηση της GSK3β καταστέλλει το άνοιγμα του mPTP δεν είναι πλήρως κατανοητό και έτσι η συμμετοχή της GSK3β στην καρδιοπροστασία εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη (Chinopoulos and Szabadkai, 2013)

Πολλοί αναστολείς της GSK3β υπάρχουν, και μερικοί από αυτούς παρουσιάζουν ικανοποιητική ισχύ και εκλεκτικότητα όπως το μόριο SB216763(Kramer et al., 2012) και η BIO (Kim et al., 2016) Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά ενώσεων σχεδιασμένων στο σκελετό της BIO που παρουσιάζουν in vitro μεγαλύτερη εξειδίκευση και ισχύ έναντι της GSK3β ώστε να μελετηθεί ο ρόλος της φαρμακολογικής αναστολής της GSK3β. Αναλυτικότερα οι σκοποί αυτής της μελέτης ήταν:

- Η διερεύνηση του ρόλου της φαρμακολογικής αναστολής της GSK3β στην καρδιοπροστασία κατόπιν χορήγησης των μορίων κατά τη διάρκεια της ισχαιμίκής περιόδου in vivo
- 2. Προσδιορισμός της συσχέτισης της φωσφορυλίωσης της GSK3β σε δύο διαφορετικές θέσεις με την καρδιοπροστασία
- 3. Μελέτη της άμεσης επίδρασης των αναστολέων της GSK3β στη διάνοιξη του mPTP σε απομονωμένα μιτοχόνδρια
- 4. Μελέτη της εντόπισης της κινάσης υπό συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης και συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης

# 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1 Αντιδραστήρια- Φαρμακολογικοί αναστολείς

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η 3'οξίμη της 6-βρωμοϊνδιρουμπίίνης (BIO) ως ένας ισχυρός αναστολέας της GSK3β. Επιπλέον τέσσερις αναστολείς της GSK3β, συγκεκριμένα τα μόρια MLS2776, MLS2777, MLS2778 και MLS2779, επελέγησαν με βάση την in vitro εκλεκτικότητα και δραστικότητα έναντι της GSK3β. Τα προαναφερθέντα μόρια συντέθηκαν όπως έχει περιγραφεί αλλού (Polychronopoulos et al., 2004). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι χημικές δομές και οι τιμές IC50 των μορίων προς την GSK3β που προσδιορίστηκε in vitro. Οι αναστολείς που ανασυστάθηκαν σε DMSO και αραιώθηκαν σε απεσταγμένο νερό για in vitro αξιολόγηση σε απομονωμένα μιτοχόνδρια . Για την χορήγηση των μορίων στα πειραματόζωα παρασκευάστηκε ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό που περιείχε κάθε ένωση με μερικές σταγόνες Tween 80 σε φυσιολογικό ορό (N / S). Η μέθοδος αυτή για την αύξηση της διαλυτοποίησης δυσδιάλυτων μορίων περιγράφηκε προηγουμένως (Andreadou et al., 2006).

Compound	IC50 (µM)	R Substitute
BIO	0.005	R:H
MLS2776	0.0033	HN NCH2CH2
MLS2777	0.0070	-NNCH2CH2
MLS2778	0.060	ONCH2CH2
MLS2779	0.0050	HON_NCH2CH2

Πίνακας 2: Οι υποκαταστάτες των μορίων MLS που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη

Χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για την αναστολή του mPTP, το φαρμακευτικό σκεύασμα SANDIMMUN (CsA), Injection, 50 mg / mL, (Novartis) ως δραστικό συστατικό περιέχει

κυκλοσπορίνη. Το SANDIMMUN διαλύθηκε σε 5 mg / mL σε και χορηγήθηκε ενδοφλέβια (σε δόση 10mg / kg). Όλα τα άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση αυτής της εργασίας προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich (μέσω Lab Supplies, P. Galanis & Co., Αθήνα, Ελλάδα) εκτός εάν δηλώνεται διαφορετικά.

### 2.2 Διαχείριση πειραματόζωων

Στο πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν συνολικά εβδομήντα τρείς λευκοί αρσενικοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας ηλικίας 18-20 εβδομάδων βάρους μεταξύ 2,6 και 3,2 kg. Έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα σύμφωνα την ισχύουσα νομοθεσία η οποία εναρμονίστηκε με την Οδηγία 86/609, του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης με το Προεδρικό Διάταγμα (ΠΔ) 160 περί της προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Όλες οι διαδικασίες για ζώα εγκρίθηκαν από την Κτηνιατρική Επιτροπής Νομαρχίας Αθηνών και υλοποιήθηκαν στο Πειραματικό -Ερευνητικό Κέντρο ELPEN Pharmaceuticals (Οδηγία 609/1986). Οι κόνικλοι τρέφονταν με τη συνήθη εργαστηριακή διατροφή κατά βούληση. Επιπλέον, σε δεύτερο πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες C57BL / 6J ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, οι οποίοι μας δόθηκαν από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών. Οι μύες στεγάζονταν σε μια εγκατάσταση χωρίς ειδικά παθογόνα στους 20 - 25°C και κατανάλωναν καθημερινά εργαστηριακή διατροφή ζώων ad libitum. Όλες οι χειρισμοί των ζώων ήταν σύμφωνες με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για τη χρήση πειραματόζωων. Τα πειραματικά πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Κτηνιατρική Επιτροπή της Νομαρχίας Αθηνών. (Αριθμός αδείας: 1760 / 24-03-2017)

### 2.3 Χειρουργικές διαδικασίες

### 2.3.1 Πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης κονίκλων

Εν συντομία, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με έγχυση νατριούχου θειοπεντάλης (Pentothal, Abbott) σε δόση 30 mg / kg μέσω στην περιφερειακή ωτιαία φλέβα. Καθόλη τη διάρκεια του γειρουργείου, χορηγήθηκε επιπλέον αναισθησία όπως απαιτείται (5 mg / 15 λεπτά). Οι κόνικλοι υποβλήθηκαν σε τραχειοστομία και διασφαλίστηκε μηχανικά ο αερισμός των ζώων μέσω ενός αναπνευστήρα για μικρά ζώα (MD Industries, Mobile, AL, USA) ώστε να διατηρηθούν φυσιολογικά τα αέρια του αίματος. Η σφαγίτιδα φλέβα εκτέθηκε και καθετηριάστηκε για να διευκολύνει την ενδοφλέβια χορήγηση υγρών και των GSK3β αναστολέων. Το στήθος ανοίχτηκε, και πραγματοποιήθηκε πλάγια θωρακοτομή στον τέταρτο μεσοπλεύριο χώρο. Με αυτές τις επεμβάσεις, το μυοκάρδιο εκτέθηκε και το περικάρδιο ανοίχτηκε. Ο πρόσθιος κατιόντας κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας είναι εμφανής και έτσι περιδέθηκε το τμήμα του μυοκαρδίου γύρω από το αγγείο με ράμμα μεταξιού 3-0. Η ισχαιμία προκλήθηκε τραβώντας τα άκρα του ράμματος μέσω ενός μικρού μαλακού σωλήνα που στερεώθηκε σταθερά πάνω στην αρτηρία χρησιμοποιώντας ένα σφιγκτήρα. Στο τέλος της ισχαιμικής περιόδου (30 λεπτά), ο σφιγκτήρας απελευθερώθηκε και η επαναιμάτωση επιβεβαιώθηκε με την πλήρωση της αρτηρίας (Andreadou et al., 2012; Iliodromitis et al., 2010).

Στο τέλος της περιόδου επαναιμάτωσης (3 ώρες), το μυοκάρδιο των κονίκλων απομακρύνθηκε γρήγορα, και τοποθετήθηκε σε συσκευή διάχυσης (Langendorf) και εγχύθηκε φυσιολογικός ορός για 2 λεπτά (2 ml / min σε θερμοκρασία δωματίου) μέσω της αορτής. Όταν το απομένον αίμα απομακρύνθηκε, το ράμμα περιδέθηκε εκ νέου και

φθορίζοντα σωματίδια (διαμέτρου 2-9 mm, Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA, απαιωρούμενα σε φυσιολογικό ορό) εγχύθηκαν για τον προσδιορισμό του ορίου μεταξύ της φυσιολογικά αιματούμενης καρδιάς και της περιοχής σε κίνδυνο. Οι καρδιές διατηρήθηκαν στους -20 ° C για 24 ώρες, κόπηκαν σε φέτες περίπου 3mm και επωάστηκαν στους 37 ° C για 20 λεπτά.σε χλωριούχο τριφαινυλοτετραζόλιο 1% (Triphenyl Tetrazolium Chloride TTC) Το TTC διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων ρυθμισμένο σε pH = 7,4. Στη συνέχεια, οι φέτες των καρδιών επωάστηκαν σε φορμαλδεΰδη. Το συνολικό μέγεθος κάθε τμήματος (Όλος / All), η περιοχή εμφράγματος (Ι) και η περιοχή κινδύνου (Risk-R) εντοπίστηκαν κάτω από λάμπα UV και δια γυμνού οφθαλμού. Οι περιοχές αυτές σημειώθηκαν σε διαφανές φύλλο. Οι περιοχές εμφράγματος και κινδύνου εκφράστηκαν ως όγκοι σε cm<sup>3</sup> και υπολογίστηκαν τα ποσοστά των λόγων εμφραγματική περιοχή ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I / R) και περιοχή σε κίνδυνο ως προς την ολική περιοχή της φέτας (R / A%) (Andreadou et al., 2012).

#### 2.3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών

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 τραχειοτομία για την διασφάλιση τεχνητής αναπνοής από έναν αναπνευστήρα μικρών ζώων με ρυθμό 125 αναπνοές / λεπτό και με όγκο όγκου 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 για 15 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 απειλευθερώθηκε και η επαναιμάτωση πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες (Bibli et al., 2015).

To 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% 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).

### 2.4 Πειραματικά πρωτόκολλα

# 2.4.1 Διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης των ινδιρουμπινικών αναλόγων σε μοντέλο αναισθητοποιημένων κονίκλων

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (Σχήμα 1), συνολικά τριάντα επτά κόνικλοι υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας ακολουθούμενα από 3 ώρες επαναιμάτωσης και τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες ως εξής:

- Ομάδα ελέγχου (n = 6): Χορήγηση φυσιολογικού ορού με σταγόνες Tween 80 (που αποτελεί τον διαλύτη των μορίων), (I)
- Ομάδα BIO(n=7): Χορήγηση του μορίου BIO στα 5mg/kg (II)
- Ομάδα MLS2776 (n = 7): Το MLS2776 χορηγήθηκε στα 7,9 mg / kg (III),
- Ομάδα MLS2777 (n = 5): Το MLS2777 χορηγήθηκε σε 7,57 mg / kg (IV),
- Ομάδα MLS2778 (n = 7): Το MLS2778 χορηγήθηκε σε 7,38 mg / kg (V),
- Ομάδα MLS2779 (n = 5): Το MLS2779 χορηγήθηκε σε 8,66 mg / kg (VI).

Οι ανωτέρω δόσεις είναι ισομοριακές και στοιχειομετρικώς ισοδύναμες με την καρδιοπροστατευτική δόση του μορίου BIO. Τα μόρια χορηγήθηκαν ενδοφλέβια μέσω της σφαγίτιδας φλέβας 10 λεπτά πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης.



Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η αναστολή της GSK3β in vivo. Για το λόγο αυτό, δεκαοκτώ κόνικλοι (τρεις σε κάθε μία από τις προαναφερθείσες ομάδες Control, BIO, MLS2776, MLS2777, MLS2778, MLS2779) υποβλήθηκαν στις παρεμβάσεις που

περιγράφηκαν στο πρωτόκολλο μέχρι το δέκατο λεπτό της επαναιμάτωσης. Τη χρονική αυτή στιγμή, η ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου συλλέχθηκε, καταψύχθηκε στιγμιαία σε υγρό άζωτο και αποθηκεύθηκε στους -80 ° C για ανοσοαποτύπωση με τη μέθοδο της western blot της ολικής και φωσφορυλιωμένης (S9) GSK3β.

Για να διερευνηθούν οι άμεσες επιδράσεις της σειράς MLS σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, πέντε επιπλέον κόνικλοι υποβλήθηκαν σε ευθανασία με χορήγηση υπερδοσολογίας νατριούχου θειοπεντάλης και το μυοκάρδιο συλλέχθηκε από κάθε ζώο γρήγορα. Τα μιτοχόνδρια που προέρχονται από την αριστερή κοιλία απομονώθηκαν (Andreadou et al., 2017; Chatzianastasiou et al., 2016) και οι ενώσεις δοκιμάστηκαν in vitro όπως περιγράφεται στο παρακάτω υποκεφάλαιο «Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυακρδιακού ιστό».

#### 2.4.2 Διερεύνηση της αναστολής της GSK3β σε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών

Μύες C57BL / 6 βάρους 25-32 g υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας με περίδεση του πρόσθιου κατιόντα, ακολουθούμενα από 2 ώρες επαναιμάτωσης. Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες και οι ακόλουθες παρεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο 20° λεπτό της παρατεταμένης ισχαιμίας (Σχήμα 2):

• Ομάδα ελέγχου (n=9): Χορήγηση φυσιολογικού ορού με σταγόνες Tween 80 (που αποτελεί τον διαλύτη των μορίων),

• Ομάδα MLS2776 (n=9): Το MLS2776 χορηγήθηκε με στιγμιαία ενδοφλέβια έγχυση στα 31,6 mg / kg,

• Ομάδα MLS2778 (n=9): Το MLS2778 χορηγήθηκε με στιγμιαία ενδοφλέβια έγχυση 29,52 mg / kg.

Οι δόσεις που καθορίστηκαν με την εξίσωση της Ισοδύναμης Δόσης μεταξύ των πειραματόζωων που προτάθηκε από τους Nair AB και Jacob S. (Nair and Jacob, 2016). Στο τέλος της επαναιμάτωσης προσδιορίστηκε το μέγεθος του εμφράγματος.



Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, δεκαπέντε ακόμη μύες (πέντε σε κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες, Ομάδα ελέγχου, MLS2776, MLS2778) υποβλήθηκαν στο πρωτόκολλο της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μέχρι το δέκατο λεπτό της επαναιμάτωσης. Σε αυτό το χρονικό σημείο, πραγματοποιήθηκε λήψη ιστού από ισχαιμικό μυοκάρδιο όπως στο μοντέλο των κονίκλων και το αίμα συλλέχθηκε μέσω καρδιακής παρακέντησης και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω προσδιορισμούς.

Σε τρίτη σειρά πειραμάτων, έξι επιπλέον μύες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες:

 Ομάδα εικονικού χειρουργείου (μιτοχόνδρια ελέγχου n = 3): Οι μύες υποβλήθηκαν σε όλη την χειρουργική διαδικασία με την ομάδα της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης με την εξαίρεση ότι δεν πραγματοποιήθηκε περίδεση του πρόσθιου κατιόντα και δεν υπήρξε ισχαιμία στο μυοκάρδιο.

• Υποξική ομάδα (μιτοχόνδρια I / R n = 3): Οι μύες υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας και 10 λεπτά επαναιμάτωσης.

Το μυοκάρδιο από κάθε πειραματόζωο παρελήφθη και τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν από την ισχαιμική ζώνη ή το ισοδύναμο τμήμα της αριστερής κοιλίας στα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν στο εικονικό χειρουργείο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των μιτοχονδρίων (Chatzianastasiou et al., 2016) όπως περιγράφεται στην παράγραφο «Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυοκαρδιακό ιστό» όπου με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ελήφθησαν δύο κλάσματα : το υπερκείμενο κυτοσόλιο και το μιτοχονδριακό κλάσμα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό πρωτεΐνης ή για περαιτέρω προσδιορισμούς.

#### 2.4.3 Πειραματικό πρωτόκολλο συγχορήγησης των αναστολέων της GSK3β με την CsA

Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο 30 λεπτών ισχαιμίας και επαναιμάτωσης 2 ωρών σε μύες και συγχρόνως χορηγήθηκε η CsA με τα μόρια MSL2776 και MLS2778 στο 20° λεπτό της παρατεταμένης ισχαιμίας ως στιγμιαία ενδοφλέβια έγχυση. Είκοσι ένα αρσενικοί μύες C57BL / 6J τυχαιοποιήθηκαν ως εξής:

• Ομάδα CsA (n = 7): Η CsA χορηγήθηκε στα 10 mg / kg,

• Ομάδα MLS2776 + CsA (n = 7): Το MLS2776 συγχορηγήθηκε στα 31,6 mg / kg με CsA στα 10 mg / kg,

• Ομάδα MLS2778 + CsA (η = 7): Το MLS2778 συγχορηγήθηκε στα 29,52 mg / kg με CsA στα 10 mg / kg

Στο τέλος της επαναιμάτωσης προσδιορίστηκε το μέγεθος του εμφράγματος. Η δόση CsA επιλέχθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Gomez et al., 2008)

#### 2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ακολουθείται η μέθοδος Lowry. Η διαδικασία ξεκινάει με την κατασκευή της καμπύλη αναφοράς μέσω διαλυμάτων Βόειας αλβουμίνης ορού (bovine serum albumin, BSA) με τη βοήθεια της οποίας προσδιορίζεται ποσοτικά η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που περιλαμβάνεται σε όλα τα δείγματα (Lowry et al., 1951). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές

αραιώσεις ενός μητρικού διαλύματος BSA 40mg/mL. Χρησιμοποιήθηκαν 5μL από το μητρικό διάλυμα και αραιώθηκαν με 45μL διαλύματος εργασίας (Lysis Buffer αν πρόκειται για προσδιορισμό πρωτεΐνης στα δείγματα της WB ή Isolation Buffer αν μετράται η πρωτεΐνη των απομονωμένων μιτοχονδρίων). Προκύπτει ένα διάλυμα 50μL συγκέντρωσης 4mg/mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με λήψη 25 μL από την πιο μεγάλη συγκέντρωση και αραίωση με 25 μL διαλύματος εργασίας. Έτσι, δημιουργήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις BSA της καμπύλης αναφοράς: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml (χωρίς BSA). Από αυτά τα διαλύματα λήφθησαν 5 μL τα οποία τοποθετήθηκαν πάνω στις κυψελίδες (well) της μικροπλάκας. Επιπροσθέτως, τοποθετήθηκαν 5 μL από τα δείγματα με την άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε αντιδραστήριο A+S με την προσθήκη του αντιδραστηρίου A (Reagent A) το οποίο είναι ένα αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού, και του αντιδραστηρίου S (Reagent S) το οποίο είναι ένα επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις. Η αναλογία αντιδραστηρίου A+S είναι 1:50 δηλαδή 20 μl αντιδραστηρίου S είναι ανά ml αντιδραστηρίου Α. Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 25 μL από το διάλυμα A+S. Ακολούθως, προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα 200 μL αντιδραστηρίου B (Reagent B) το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm, κατασκευάστηκε με τη χρήση λογισμικού Graph Pad Prism η καμπύλη αναφοράς της BSA και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων.

#### 2.6 Western blot

#### Αρχή Μεθόδου

Η τεχνική Western blot είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα του ομογενοποιημένου ιστού ή εκχύλισμα. Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με τρισδιάστατη δομή ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες από πολυπεπτίδια χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση πηκτής. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (τυπικά νιτροκυτταρίνης ή πολυ-βίνυλοπυρρολιδόνης PVDF), πάνω στην οποία συνδέονται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο (Mahmood and Yang, 2012).

#### 2.6.1.Προετοιμασία δειγμάτων

Το τμήμα του μυοκαρδιακού ιστού που παραλήφθηκε στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης ομογενοποιείται σε γουδί με τη βοήθεια ιγδίου. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε ξηρό πάγο με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Από την ομογενοποίηση προκύπτει μία πούδρα η οποία ζυγίζεται. Ακολούθως προτίθενται σε κάθε δείγμα διάλυμα λύσης (Lysis buffer) το οποίο παρασκευάζεται βάση της συνταγής που περιγράφεται στο παράρτημα.

Στα δείγματα του κυτοσολίου και των μιτοχονδρίων που παραλαμβάνονται από τη διαδικασία απομόνωσης που αναλύεται στην παράγραφο 2.7 επεξεργάζονται ως εξής:

Δείγμα μιτοχονδρίων: Το ίζημα των μιτοχονδρίων από κάθε δείγμα ανασυστείνεται σε 200μL διαλύματος Lysis Buffer με PMSF Protease phosphatase Inhibitor cocktail που παρασκευάζεται με προσθήκη 10μL Inhibitors σε 5mL Lysis Buffer

Δείγμα κυτοσολίου: Στα δείγματα των κυτοσολίων προστίθενται 2 μL PMSF Protease phosphatase Inhibitor cocktail αμέσως μετά την απομόνωσή του.

Στα δείγματα του μυοκαρδιακού ιστού αμέσως μετά την προσθήκη του Lysis Buffer ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση με vortex. Περαιτέρω εκχύλιση των συστατικών επιτυγχάνεται με υπερήχους για 3 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρούνται στα 11.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Κατακρημνίζονται με αυτόν τον τρόπο τα μη λυμένα ή αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά. Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα το οποίο είναι το πυκνό εκχύλισμα του ιστού (Lysate). Ακολούθως, πραγματοποιείται στα lysates ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.5. Με την μέτρηση της πρωτεΐνης εξασφαλίζεται ότι σε κάθε κελί της γέλης ηλεκτροφόρησης θα φορτώσουμε ίση ποσότητα πρωτεϊνών ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η ποσότητα των πρωτεϊνών που φορτώνουμε σε κάθε δείγμα πρέπει να είναι εντός των ορίων ανίγχευσης των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται.

Τα δείγματα της Western Blot παράγονται με αραίωση των lysates σε Lysis Buffer και προσθήκη Daves Buffer (4% SDS,10% 2-mercaptoethanol, 0,004% bromophenol blue, 0.125M Tris/HCl). Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν από τα lysates, το Lysis Buffer και το Daves Buffer υπολογίστηκαν σε φύλλο Excel ώστε όλα τα δείγματα της Western Blot να έχουν συγκέντρωση πρωτεΐνης 50μg/mL και τελικό όγκο 42μL. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη των ανωτέρω συστατικών, τα δείγματα επωάζονται στους 100°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα της Western Blot μόλις παρασκευαστούν μπορούν να φυλάσσονται στους -80°C για 15 ημέρες μέχρι την ανάλυση.

#### 2.6.2 Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

Κατά την ηλεκτροφόρηση πήκτης, οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος της γέλης και διαχωρίζονται με βάση τη διαφορά δυναμικού με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά, για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάζονται δύο ειδών πήκτες ακρυλαμιδίου που έχουν διακριτούς ρόλους:

- το stacking gel στο οποίο δημιουργούνται κελιά για να τοποθετηθούν τα δείγματα και αμέσως μετά την έναρξη της ηλεκτροφόρησης και πραγματοποιείται ένας αδρός διαχωρισμός των πρωτεϊνών και
- το running gel στο οποίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε διακριτές ζώνες βάση του μοριακού τους βάρους.

Η σύσταση του stacking gel είναι 5% σε πολυακρυλαμίδιο και είναι σταθερή. Η σύσταση του running gel διαφοροποιείται ως προς την αναλογία νερού/ πολυακρυλαμίδιο ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών έως 60kDa χρησιμοποιούνται γέλες 9-15% σε ακρυλαμίδιο, για πρωτεΐνες με μέγεθος 60-85 kDa

Κατά την πειραματική πορεία που ακολουθήσαμε επιδιώξαμε την ποσοτικοποίηση των ακόλουθων πρωτεϊνών

- ολική GSK3β και την φωσφορυλιωμένη GSK3β στην S9 και στην Y216 με μοριακό βάρος 46kDa
- β-κατενίνη και την φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη στην S31/S33/T41 με μοριακό βάρος 90kDa
- β τουμπουλίνη ως κυτοσολική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 55kDa
- COX -4 ως μιτοχονδριακή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 17kDa

Χρησιμοποιήθηκαν πήκτες διαφορετικής συγκέντρωσης για την ανάλυσή τους και συγκεκριμένα gel 13% για των διαχωρισμό των GSK3β( 46kDa) και COX IV (17kDa) και gel 7.5% για το διαχωρισμό της GSK3β και της β-κατενίνης.

Τα gel παρασκευάστηκαν βάση των συνταγών που περιγράφονται στο παράρτημα.

Η παρασκευή των gel πραγματοποιείται σε ειδικά ζεύγη πλακών που αφήνουν μεταξύ τους κενό 1.5mm. Οι πλάκες αυτές πλένονται επαρκώς με απιονισμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) και τοποθετούνται σε ειδική συσκευή (Biorad). Ακολούθως, προστίθεται το running gel συμπληρώνεται ο όγκος της πλάκας με ddH<sub>2</sub>O ώστε να ευθυγραμμιστεί η γέλη και αφήνεται έως ότου να πήξει. Μόλις επιτευχθεί η πήξη προστίθεται το separating gel και τοποθετείται ειδικό πλαστικό εξάρτημα –χτενάκι για την δημιουργία των πηγαδιών εντός του separating gel όπου θα φορτωθούν τα δείγματα.

Τα gel μπορούν να παρασκευάζονται φρέσκα, την ημέρα της ηλεκτροφόρησης, ή να φυλάσσονται μέσα σε ddH<sub>2</sub>O στο ψυγείο για μία μέρα. Την ημέρα της ανάλυσης τα δείγματα της Western Blot μεταφέρονται από την κατάψυξη σε πάγο μέχρι την φόρτωση. Φυγοκεντρούνται έως τις 1000 x g (spin down) ώστε ο συνολικός όγκος του δείγματος να βρίσκεται στον πυθμένα του περιέκτη και όχι στα τοιχώματα. Μαζί με τα δείγματα, υποβάλλεται σε spin down και ο ιχνηθέτης – marker. O marker αποτελείται από ένα μίγμα πρωτεϊνών με συγκεκριμένα μοριακά βάρη. Είναι διαθέσιμος στο εμπόριο και κάθε πρωτεΐνη που περιέχει έχει συγκεκριμένο χρώμα (μπλε, πράσινο ή κόκκινο) και έτσι έχουμε σαφή εικόνα για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται στο gel. O marker που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα Western Blot είναι ο Nippon Bluestar prestained protein marker.



Μόλις τα gels είναι έτοιμα τοποθετούνται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης ανά 2 και η συσκευή τοποθετείται μέσα στο δοχείο tank της Western Blot. Το κενό ανάμεσα στις πλάκες και το tank γεμίζονται με το Buffer της ηλεκτροφόρησης που είναι το Running Buffer 1X. Το Running Buffer παρασκευάζεται βάση της συνταγής που παρατίθεται στο παράρτημα σε συγκέντρωση 10X και φυλάσσεται στο ψυγείο. Χρησιμοποιούνται 100mL Running buffer 10X και αραιώνονται σε 1L με ddH<sub>2</sub>O πριν από κάθε χρήση.

Ακολούθως αφαιρούνται τα πλαστικά εξαρτήματα – χτενάκια από το separating gel και έτσι είναι εμφανή τα κελάκια φόρτωσης των δειγμάτων. Με λεπτή σύριγγα του 1mL προστίθεται Running Buffer εντός των κελιών προκειμένου να καθαριστούν από τα υπολείμματα της πολυακριλαμιδίου που δεν πολυμερίστηκε, μία διαδικασία που γαρακτηρίζεται ως flashing.

Σε κάθε γέλη χρησιμοποιούνται 5μL marker και αραιώνονται στον κατάλληλο όγκο με Blank ώστε το δείγμα του ιχνηθέτη να έχει τον ίδιο όγκο με τα δείγματα. Το Blank είναι μείγμα Daves Buffer (7μL) και Lysis Buffer (35μL). Μετά το flashing προστίθενται με πιπέτα σε κάθε κελάκι τα δείγματα και ο marker. Η σειρά των δειγμάτων εξαρτάται από την απόφαση του ερευνητή αλλά γενικά προστίθεται στο πρώτο κελί ο marker και έπειτα 2 ή 3 δείγματα από κάθε ομάδα πειραματόζωων. Για να επιτευχτεί η σύγκριση της ποσότητας των πρωτεϊνών ανάμεσα στις ομάδες είναι απαραίτητο να φορτώνονται δείγματα από όλες τις ομάδες. Στην παρούσα εργασία φορτώθηκαν 2 δείγματα ανά ομάδα με κενά ανάμεσά τους ως απόδειξη ότι δεν υπάρχει μόλυνση εκ μεταφοράς κατά την διάρκεια της φόρτωσης. Τα κενά κελάκια φορτώνονται με Blank. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στα 80Volt εως ότου να διαχωριστεί ο marker. Έπειτα, επιλέγεται ηλεκτροφόρηση στα 120-130Volt μέχρι να παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των επιθυμητων πρωτεϊνών με βάση τα μοριακά βάρη που διαφαίνονται στον marker.

#### 2.6.3 Η διαδικασία του transportation

Λίγο πριν το τέλος της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζεται η διαδικασία του Transportation. Μεμβράνες PVDF 0,2μm χρησιμοποιήθηκαν στον προσδιορισμό της β κατενίνης και στην ανάλυση κυτοσολικών και μιτοχονδριακών κλασμάτων και 0, 45μm χρησιμοποιήθηκε στο transportation των υπόλοιπων πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες κόβονται στο μέγεθος του gel και επωάζονται σε μεθανόλη για 10 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθούν και ακολούθως σε Transportation buffer για ακόμη 10λεπτά ώστε να γίνει ομαλά η μετάβαση στο επόμενο περιβάλλον της διαδικασίας. Το Transportation buffer παρασκευάζεται κάθε φορά φρέσκο βάση της συνταγής που περιγράφεται στο παράρτημα. Σε γυάλινο σκεύος τοποθετούνται επίσης και οι κασσέτες του transportation buffer για 10 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση οι κασσέτες με τα gel αφαιρούνται από το tank και οι δύο πλάκες που περιέχουν τη γέλη διαχωρίζονται προσεκτικά. Το separating gel αφαιρείται με τη χρήση ειδικής σπάτουλας και οι γέλες που περιέχουν τις ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες επωάζονται σε transportation buffer για 10 λεπτά.

Οι κασσέτες του transportation ανοίγονται και τοποθετούνται διαδοχικά σφουγγαράκι, δύο διηθητικά φύλλα, το gel, η μεμβράνη PVDF και ακόμη 2 διηθητικά φύλλα και ένα σφουγγαράκι. Κατά την τοποθέτηση της μεμβράνης και των διηθητικών φύλλων βεβαιώνεται ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες για την ορθή επίτευξη της μεταφοράς των διαχωρισμένων πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε gel. Οι κασσέτες τοποθετούνται μέσα στο tank του transportation μαζί με μία παγοκύστη και το tank τοποθετείται μέσα σε πάγο. Η διαδικασία του transportation πραγματοποιείται για 90 λεπτά στα 100 Volt. Για την επαρκή μεταφορά της φωσφορυλιωμένης β-κατενίνης πραγματοποιήθηκε transportation στα 35 Volt για 18 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.

#### 2.6.5 Επώαση με το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα

Μόλις ολοκληρωθεί το transportation, η μεμβράνη αφαιρείται και σημαίνεται καταλλήλως για την αποφυγή λαθών. Η σωστή διαδικασία transportation επιβεβαιώνεται από τον marker. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται Blocking Buffer σύστασης 5% γάλα σε TBS 1X 0.1% Tween. Η μεμβράνη PVDF επωάζεται για μία ώρα σε Blocking Buffer. Το Blocking της μεμβράνης αποτρέπει την μη ειδική σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος. Μετά την ολοκλήρωση του Blocking οι μεμβράνες εκπλένονται για 5 λεπτά με TBS 1X 0.1% Tween. Οι μεμβράνες κόβονται σε ζώνες που περιλαμβάνουν τα επιθυμητά μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που στοχεύουμε να ανιχνεύσουμε. Οι μεμβράνες στη συνέχεια επωάζονται με τα πρωτογενή αντισώματα. Η επώαση πραγματοποιείται για 18 ώρες στους 4°C.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. phospho-GSK3β (S9) (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #9323),

- 2. GSK3β (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #9315),
- 3. phospho-β-catenin Ser 33/37/Thr41 (σε διάλυση 1:500, Rabbit mAb #9561),

4. β-catenin (σε διάλυση 1:1000 mouse mAb ,cat. No. sc-7963 από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology, Germany),

5. β-tubulin (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #2146) και

6. COXIV (σε διάλυση 1:1000, Rabbit mAb #4850).

Τα αντισώματα αγοράστηκαν από την εταιρεία Cell Signalling Technology πλήν αυτού της βκατενίνης και αραιώθηκαν σε διάλυμα 5% BSA σε TBS 1X 0.1% Tween.

Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα οι μεμβράνες οι μεμβράνες εκπλένονται για 5 λεπτά σε TBS 1X 0.1% Tween. Ακολούθως παρασκευάζεται το διάλυμα των δευτερογενών αντισωμάτων. Σε διάλυμα Blocking (5% γάλα διαλυμένο σε TBS 1X 0.1% Tween) αραιώνεται το δευτερογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:2000 με εξαίρεση της μεμβράνης της φωσφορυλιωμένης β- κατενίνης που χρησιμοποιήθηκε αραίωση 1:1000. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν anti-rabbit και anti-mouse (Biorad goat anti-mouse and goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated) σε αντιστοιχία με το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Οι μεμβράνες επωάστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερογενές αντίσωμα. Μετά την επώαση, οι μεμβράνες εκπλένονται 2 φορές με TBS-Tween για να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων που δεν προσκολλήθηκε στη μεμβράνη.

#### 2.6.6 Εμφάνιση των πρωτεϊνών σε φωτογραφικό φίλμ

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (GE Healthcare ECL Western Blot-ting Detection Reagents) με το οποίο επωάζεται η μεμβράνη για 5 λεπτά προστατευμένη από το φώς. Μετά την επώαση, η μεμβράνη προσκολλάται την κασέτα εμφάνισης και εμφανίζεται μέσα στο σκοτεινό θάλαμο. Για την εμφάνιση των πρωτείνών σε φωτογραφικό φίλμ χρησιμοποιείται ο σκοτεινός θάλαμος. Εντός αυτού, φυλάσσονται τα αντιδραστήρια της εμφάνισης δηλαδή το διάλυμα delevopper και το διάλυμα fixer. Σε αυτόν τον θάλαμο φυλάσσονται επίσης προστατευμένα από το φως και τα φωτογραφικά φίλμ. Με την βοήθεια, κόκκινου φωτός (IR) εντός του θαλάμου τα διαλύματα developer και fixer τοποθετούνται σε λεκάνες ώστε να είναι δυνατή η επώαση των φωτογραφικών φίλμ. Τα φωτογραφικά φίλμ αφήνονται πάνω από τις μεμβράνες που

εκπέμπουν χημειοφωταύγεια ανάλογη της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε αρχικά για 40 δευτερόλεπτα. Το φωτογραφικό φιλμ επωάζεται με τον developer μέχρι να εμφανιστούν τα αποτυπώματα των πρωτεϊνών και ακολούθως εκπλένεται και επωάζεται με το διάλυμα fixer που αδρανοποιεί το φιλμ και σταθεροποιεί το ίχνος του αποτυπώθηκε. Σε περίπτωση που το σήμα που αποτυπώθηκε είναι πολύ έντονο ή πολύ αχνό η μεμβράνη εκτίθεται εκ νέου σε φιλμ για λιγότερο ή περισσότερο χρόνο αντίστοιχα, εως τη λήψη μία εικόνας ανοσοαποτύπωσης με διακριτές μπάντες.

Μετά την εμφάνιση, οι μεμβράνες εκπλένονται με TBS-Tween και μπορούν να φυλαχθούν στους -20°C ώστε να επαναχρησιμοποιηθούν αν είναι απαραίτητο.



#### 2.6.7 Η διαδικασία του stripping

Η διαδικασία του stripping επιπρέπει την αποκόλληση των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που έχουν προσκολληθεί για την εμφάνιση. Είναι απαραίτητο κατά τον προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης και ολικής πρωτεΐνης στην ίδια μεμβράνη καθώς και για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών με παρόμοια μοριακά βάρη. Υπάρχουν δύο διαδικασίες που ακολουθούνται στο stripping : η πρώτη γίνεται κάτω από ισχυρές αναγωγικές συνθήκες και η δεύτερη κάτω από περισσότερο ήπιες συνθήκες (mild stripping). Το stripping πραγματοποιείται με επώαση των μεμβρανών σε Stripping Buffer για 20 λεπτά στους 50°C. Το mild stripping πραγματοποιείται με επώαση των μεμβρανών για 20 λεπτά στο Mild stripping Buffer σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση του stripping, ακολουθεί η επώαση σε Blocking Buffer για μία ώρα και η διαδικασία της επώασης του πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

#### 2.6.8 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

Τα φωτογραφικά φιλμ σκανάρονται με ειδική ανάλυση 600ppi σε grey scale και μορφή αρχείου Tiff. Χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Image J για την αποκοπή της εικόνας και την απομόνωση κάθε μπάντας κάθε πρωτεϊνης. Ακολούθως, η μέτρηση του σήματος επιτυγχάνεται με πυκνομετρική ανάλυση με τη βοήθεια του προγράμματος Gel Pro analyser. Πραγματοποιείται σχετική ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος ως προς την πρωτεΐνη ελέγχου φόρτωσης και της φωσφορυλιωμένης ως προς την ολική πρωτεΐνη. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism όπως περιγράφεται στο τμήμα 2.9

### 2.7 Απομόνωση μιτοχονδρίων από τον μυοκαρδιακό ιστό

Από τα πειραματικά πρωτόκολλα που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.4 λήφθηκε μυοκαρδιακός ιστός ο οποίος τεμαχίστηκε ταχέως και εκπλύθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (isolation buffer: 225 mM Mannitol,75 mM Sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, ενώ το pH ρυθμίζεται με Tris στο 7,4 και διατηρείται σε ψυγείο στους 4°C). Ακολούθως, ο ιστός ομογενοποιήθηκε στο isolation buffer με την προσθήκη 0,1mg/ml Nagarse με τη χρήση υάλου – τεφλόν ομογενοποιητή. Το ομογενοποίημα, αραιώθηκε με την προσθήκη διπλάσιου όγκου 0,2 % w/v BSA σε isolation buffer, φυγοκεντρήθηκε στα 500 xg στους 4°C. Έτσι, στο ίζημα αποβλήθησαν τα μη λυμένα κύτταρα και άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στα 5000 xg 20min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα. Το ίζημα εκπλύθηκε με isolation buffer, χωρίς BSA και φυγοκεντρήθηκε και στα 5000 xg 20min. Το τελικό ίζημα ανασυστήθηκε σε μικρό όγκο isolation buffer και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις (Andreadou et al., 2017).

# 2.8 Τεχνική αξιολόγησης της συγκράτησης ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια (Calcium Retention Capacity)

Πρόκειται για μία τεχνική στην οποία προσδιορίζεται η ικανότητα των μιτοχονδρίων να κατακρατούν το ασβέστιο, κυρίως με τη μορφή των φωσφορικών αλάτων ασβεστίου, στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η αποθήκευση του ασβεστίου εντός των μιτοχονδρίων συμβάλλει στη ρύθμιση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ασβεστίου στο κυτοσόλιο και ως εκ τούτου στη ρύθμιση των κυτταρικών διαδικασιών εξατώμενων από το ασβέστιο. Για να προσδιορίσουμε την ικανότητα συγκράτησης του ασβεστίου – Calcium Retention Capacity (CRC) εκθέτουμε απομονωμένα μιτοχόνδρια σε διαδοχικές ώσεις ασβεστίου με προσθήκη CaCl<sub>2</sub>. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται προσδιορισμός της έντασης φθορισμού ενός συμπλόκου της χρωστικής Calcium Green με το εξωμιτοχονδρικό ασβέστιο δεδομένου ότι η χρωστική δεν μπορεί να διαπεράσει την μιτοχονδριακή μεμβάνη. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται ο αριθμός των κύκλων-προσθηκών Ca<sup>2+</sup> που το μιτοχόνδριο ανθίσταται στη διάνοιξη (Andreadou et al., 2017; Chatzianastasiou et al., 2016).

Για την εκτέλεση της πορείας χρησιμοποιείται το CRC Assay Buffer με την ακόλουθη σύσταση:

### Σύσταση CRC Assay Buffer

KCl	0.511g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0136g
Hepes	0.2383
EDTA(0.02mM)	Προσθήκη κατάλληλου όγκου από stock
	0.5mM
ddH <sub>2</sub> O	q.s. 50mL

Αρχικά προστίθενται τα στερεά αντιδραστήρια και 40mL περίπου νερού. Ακολούθως, το διάλυμα πεχαμετρείται με Tris 0.5M εως pH 7.2. Το όξινο pH καθιστά τα μιτοχόνδρια λιγότερο ευάλωτα στη διάνοιξη. Για την εκτέλεση της μεθόδου, παρασκευάζουμε ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο θα δοκιμαστούν οι αναστολείς και καλείται Master Mix. Το Master mix περιέχει :

- To CRC Assay Buffer
- Απομονωμένα λειτουργικά μιτοχόνδρια σε συγκέντρωση 0.25mg/mL
- 80μL φθορίζουσας χρωστικής Calcium Green
- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέως 100mM για την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής αλυσίδας και την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας των μιτοχονδρίων

Για τον εντοπισμό των άμεσων επιδράσεων των παραγώγων ινδιρουμπίνης στα μιτοχόνδρια προσδιορίστηκε η CRC σε των μορίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η κυκλοσπορίνη, ο αναστολέας της διάνοιξης του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Το πρωτόκολλο ακολουθήθηκε ως εξής:

200μL Master mix εναποτίθενται στα κελιά μαύρης πλάκας 96 θέσεων κατάλληλης για προσδιορισμό της έντασης φθορισμού και εκτός του τυφλού κάθε παράγωγο ινδιρουμπίνης προστίθεται σε συγκεντρώσεις 10μΜ,1μΜ.,100nM και 10 nM με αποτέλεσμα να έχουμε μία σειρά 5 δειγμάτων. Για να ελεχγθεί αν ο μηχανισμός δράσης είναι εξαρτώμενος από την κυκλοφυλλίνη D επαναλαμβάνουμε την ίδια σειρά δειγμάτων και αυτήν την φορά σε κάθε κελί προστίθεται 0.3μL CsA. Για κάθε μόριο πραγματοποιήθηκε επαναληπτική σειρά και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

Το φθορισμόμετρο που χρησιμοποιήσαμε είναι το Fluoscan που διαθέτει αυτόματο δειγματολήπτη και επιτυγχάνει την προσθήκη 10μL διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 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.

### 2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός μηλονικής διαλδεϋδης ως δείκτη του οξειδωτικού στρες

Στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης λήφθηκε αίμα με τη μέθοδο της καρδιακής παρακέντησης με τη χρήση βελόνης 23G για την αποφυγή της αιμόλυσης και σύριγγας ινσουλίνης 1mL. Τα δείγματα αίματος αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά έως ότου σχηματιστεί θρόμβος. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 x g για 15 λεπτά στους 25°C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο διαυγές διάλυμα που αποτελεί τον ορό του αίματος ο οποίος φυλλάχθηκε στους -80°C εως την ημέρα της ανάλυσης. Για τον προσδιορισμό της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA), τα δείγματα αφέθηκαν σε πάγο ώστε να υποστούν σταδιακή απόψυξη και παρασκευάστηκε το διάλυμα Beaker με διάλυση 106mg του αντιδραστηρίου 1-μεθυλ-2φαινυλ-ινδόλιο σε 50mL ακετονιτριλίου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν 170μL ορού από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 552,5μL διαλύματος Beaker. Προστέθηκαν ακόμη 127,5μL διαλύματος HCl 12N. Τα δείγματα επωάστηκαν για μία ώρα στους 45°C. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 3.500 x g για 15 λεπτά στους 4°C. Από το υπερκείμενο διάλυμα λαμβάνονται 150μL και τοποθετούνται σε διαφανή πλάκα 96 θέσεων. Χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό δείγμα διάλυμα Beaker με HCl 12N. Οι τιμές των απορροφήσεων μετρήθηκαν στο όργανο ανάγνωσης πλακών Infinite F 200 pro microplate reader (Tecan). Η συγκέντρωση της MDA σε μΜ προσδιορίστηκε βάση καμπύλης αναφοράς της MDA.

#### 2.10 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσον ± τυπικό σφάλμα (S.E.M). Για τις μελέτες στα πειραματόζωα και την πυκνομετρική ανάλυση των κηλίδων της Western Blot χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διασποράς μίας κατεύθυνσης (ANOVA), ακολουθούμενης από πολλαπλές δοκιμές σύγκρισης Tukey. Για τα αποτελέσματα των μιτοχονδρίων, στην αρχή πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία D'Agostino-Pearson για να ελεγχτεί η κανονικότητα των δειγμάτων. Διεξήχθη unpaired t-test για σύγκριση των δύο ομάδων των μιτοχονδρίων μυών. Ένα υπολογιζόμενο p <0.05 θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντικό. Η στατιστική σημαντικότητα ταξινομήθηκε ως \* P <0,05. \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism έκδοση 5.04 (Graph Pad Software, Inc.).

### 3. Αποτελέσματα

# 3.1 Η οξεία χορήγηση σειράς ενώσεων MLS είναι καρδιοπροστατευτική στο μοντέλο ισχαιμίας / επαναιμάτωσης κονίκλων

Η σειρά των τεσσάρων νέων αναστολέων της GSK3β, συγκεκριμένα τα μόρια MLS2776, MLS2777, MLS2778 και MLS2779, χορηγήθηκαν στην στοιχειομετρικώς ισοδύναμη δόση του αναστολέα BIO στα 0,0140mmoles / Kg. Όλες οι ομάδες υπέστησαν στον ίδιο βαθμό την ισχαιμική απόφραξη όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι είχαν όμοιο λόγο της περιοχής σε κίνδυνο ως προς το όλον των τομών του μυοκαρδιακού ιστού (Σχήμα 3B) (45.7 ± 3.1% για την ομάδα MLS2776, 48.0 ± 3.7% για την ομάδα MLS2777, 58.0 ± 4.6% για την ομάδα MLS2778, 51.9 ± 4.1% για την ομάδα MLS2779, 49.7 ± 4.2 για την ομάδα BIO, έναντι 53.7 ± 2.2%για την ομάδα ελέγχου, p>0.05). Οι κόνικλοι που υποβλήθησαν σε θεραπεία με την σειρά μορίων MLS είχαν σημαντική μείωση στο μέγεθος του εμφράγματος σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν φυσιολογικό ορό (Σχήμα 3A) (10,6 ± 3,0% για την ομάδα MLS2776, 49.7 ± 4.2 για την ομάδα MLS2777, 26,9 ± 2,9% για την ομάδα MLS2778, 51,9 ± 4,1% για την ομάδα BIO έναντι 53,7 ± 2,2% για την ομάδα MLS2777, 26,9 ± 2,9% για την ομάδα MLS2778, 51,9 ± 4,1% για την ομάδα BIO έναντι 53,7 ± 2,2% για την ομάδα MLS2779, 49.7 ± 4.2 για την ομάδα MLS2776, 49.7 ± 4.2 για την ομάδα MLS2779, και 33.1 ± 2.6%, για την ομάδα BIO έναντι 53,7 ± 2,2% για την ομάδα ελέγχου, p> 0,05). Τα MLS 2776 και MLS2778 παρουσιάζουν επίσης μια σημαντική μείωση σε σύγκριση με το BIO (p <0.001).



επαναιμάτωσης. Οι σειρές MLS χορηγήθηκαν ως i.v. bolus 10 λεπτά πριν από την αποκατάσταση της ροής του αίματος. Η περιοχή του εμφράγματος ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I / R) (Σχήμα 3A) και η περιοχή σε κίνδυνο ως προς ολόκληρη την περιοχή των τομών του μυοκαρδίου (% R / A) (Σχήμα 3B) παρουσιάζονται με ένα διάγραμμα διασποράς (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα- SEM). \*\*\* στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (p <0,001) ††† στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την ομάδα BIO (p <0,001)

# 3.2 Η φωσφορυλίωση της GSK3β στην ανασταλτική της θέση δεν συσχετίζεται με την καρδιοπροστασία in vivo

Προκειμένου να εκτιμηθεί η αναστολή της GSK3β, συλλέχθηκε μυοκαρδιακός ιστός από την περιοχή της ισχαιμίας στο 10ο λεπτό της επαναιμάτωσης. Μέχρι αυτό το χρονικό σημείο επιτελούνται κρίσιμες μορικές μεταβολές που οδηγούν στην μυοκαρδιακή νέκρωση(Piper et al., 2004). Η αυξημένη φωσφορυλίωση της GSK-3β (S9) παρατηρήθηκε στις ομάδες MLS2776, MLS2777 και BIO (\*\*\* p <0.001) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, ο λόγος της p-GSK-3β / GSK-3β των πειραματόζωων που έλαβαν MLS2778 και MLS2779 βρέθηκε εξίσου χαμηλός με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 4). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι δεν μπορεί να εδραιωθεί μία συσχέτιση μεταξύ της φωσφορυλίωσης της GSK3β στην σερίνη 9 και την μείωση της έκτασης του εμφράγματος.



αίματος. Οι ισχαιμικοί ιστοί συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η φωσφορυλίωση της GSK3β (S9). Απεικονίζονται χαρακτηριστικές μεμβράνες Western Blot από αντιπροσωπευτικά ζώα. και η πυκνομετρική ανάλυση μετά από την κανονικοποίηση ως προς την ολική πρωτεΐνη για κάθε ομάδα. Ο λόγος p (Ser9) / ολικής GSK3β αυξάνεται στην ομάδα των MLS2776, MLS2777 και BIO αλλά όχι στις ομάδες MLS2778 και MLS2779. Οι ράβδοι παρουσιάζουν μέση ± SEM. \*\*\*στατιστική σημαντικότητα σε σε σύγκριση με την ομάδα έλεγχου (p <0,001)

# 3.3 Αξιολόγηση των μορίων MLS2776, MLS2778 και BIO σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από μυοκαρδιακό ιστό κονίκλων

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν τα μόρια MLS2776 και MLS2778 μείωσαν το μέγεθος του εμφράγματος σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με το μόριο BIO λόγω της ύπαρξης ενός μικρού ποσοστού της GSK3β στα μιτοχόνδρια. Διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι δύο ενώσεις μπορούν να δράσουν στην μιτοχονδριακή GSK3β και να ασκήσουν άμεσες επιδράσεις στη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκαν οι άμεσες επιδράσεις των δύο ενώσεων στον mPTP χρησιμοποιώντας το in vitro πείραμα CRC σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από το μυοκάρδιο των κονίκλων. Οι καρδιές των κονίκλων αφαιρέθηκαν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης των μιτοχονδρίων σύμφωνα με την παράγραφο 2.7. Τα MLS2776, MLS2778 και BIO δοκιμάστηκαν σε συγκεντρώσεις 10 μM -0,01μM και βρέθηκε ότι δεν έχουν επίδραση στη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων στο ασβέστιο (p>

0,05). Η κυκλοσπορίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και αύξησε την μιτοχονδριακή CRC σε δόση 1 μg / ml (\*\*\* p <0.001 έναντι όλων των άλλων ομάδων της μελέτης). Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν εις διπλούν σε τρεις επαναλήψεις (Σχήμα 5). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι αναστολείς GSK3β δεν ασκούν άμεσες μιτοχονδριακές επιδράσεις και δεν δρουν ως απευαισθητοποιητές του mPTP.



Σχήμα 5: Τα μόρια MLS2776, MLS2778 και BIO δεν αναστέλλουν τη διάνοιζη του mPTP σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. Η ικανότητα κατακράτησης ασβεστίου προσδιορίστηκε σε μιτοχόνδρια κονίκλων που υποβλήθησαν σε in vitro επώαση με τους αναστολείς και συγκρίθηκε με αυτά που υποβλήθησαν σε επώαση με τον διαλύτη. Το γράφημα αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού του εζωμιτοχονδριακού ασβεστίο (Σχήμα 5A). Κανένας από τους αναστολείς της GSK3β δεν αυζάνει τη μιτοχονδριακή ευαισθησία στη διαπερατότητας του ασβεστίου ,δηλαδή κανένα μόριο δεν αναστέλλει τον mPTP (p > 0,05) (\*\*\* p < 0,001 σε σύγκριση με άλλες ομάδες.) Οι ράβδοι εμφανίζουν μέση τιμή ± SD (Σχήμα 5B) (n = 3).

# 3.4 Η χορήγηση των μορίων MLS2776 και MLS2778 μειώνει το μέγεθος εμφράγματος σε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν περαιτέρω τα προαναφερθέντα ευρήματα σχετικά με την αναστολή της GSKβ στην βλάβη ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Οι δύο αναστολείς της GSK3β, MLS2776 και MLS2778, που άσκησαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με τον αναστολέα BIO αλλά διαφορετική φωσφορυλίωση της GSK3β στην ανασταλτική της θέση, επιλέχθηκαν. Για να αξιολογηθεί εάν το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα των MLS2776 και MLS2778 υφίσταται στο μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών, τα πειραματόζωα υποβλήθησαν σε 30 λεπτά περιφερειακής ισχαιμίας του μυοκαρδίου, ακολουθούμενα από 2 ώρες επαναιμάτωσης. Όλες οι ομάδες (n = 9 ανά ομάδα) εμφάνισαν όμοιο λόγο της περιοχής σε κίνδυνο ως προς το όλον των τομών του μυοκαρδιακού ιστού ( $52,1 \pm 2,8\%$  για την ομάδα MLS2776,  $51,9 \pm 2,3\%$  για την ομάδα MLS2778 έναντι  $50,10 \pm 1,9\%$  για την ομάδα ελέγχου, p> 0,05) (Σχήμα 6 B). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι μύες υπέστησαν ισχαιμική προσβολή στον ίδιο βαθμό. Παρατηρήσαμε ότι οι δύο αναστολείς GSK3β μείωσαν την μυοκαρδιακή βλάβη σε παρόμοια βαθμό (Σχήμα 6 A). Το ποσοστό I / R% για την ομάδα ελέγχου ήταν 47,2 ± 2,8% ενώ κατά τη χορήγηση των MLS2776 και MLS2778, μειώθηκε στα 14,7 ± 1,4% και 15,4 ± 1,9% αντίστοιχα (μέσοι όροι ± SEM, \*\*\* p <0,001).



Σχήμα 6: Τα μόρια MLS2776 και MLS2778 μειώνουν το μέγεθος του εμφράγματος στο μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών. Οι μύες υποβλήθησαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας ακολουθούμενα από 2 ώρες επαναιμάτωσης. Οι επιδράσεις των MLS2776 και MLS2778 επί του μεγέθους του εμφράγματος που εκφράζονται ως ποσοστό της ισχαιμικής ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I / R) στις τομές του μυοκαρδίου των μυών. Κάθε σημείο του διαγράμματος σκέδασης αποτελεί την τιμή για τα μεμονωμένα πειραματόζωα στο οποίο χρησιμοποιούνται κουκίδες, τετράγωνα και τρίγωνα για την ομάδα ελέγχου, την ομάδα MLS2776 και την ομάδα MLS2278 αντίστοιχα (Σχήμα 6Α). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου (το μπλε / σκούρο οφείλεται στην χρώση του Evans Blue, το κόκκινο και το λευκό αντιπροσωπεύουν την περιοχή που κινδυνεύει και η λευκή περιοχή υποδηλώνει τον εμφραγματικό ιστό) (n = 9 ανά ομάδα, απεικόνιση μέσων όρων ± SEM, \*\*\* P <0,001, έναντι της ομάδας ελέγχου). (Σχήμα 6Β) Περιοχή σε κίνδυνο / Όλη τη περιοχή των μυοκαρδιακών τομών (%R / A)(p>0,05).

# 3.5 Η μείωση της ενεργότητας της GSK3β αλλά όχι η φωσφορυλίωση της S9 συσχετίζεται με την καρδιοπροστασία

Για την μελέτη της αναστολής της GSK3β στο μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μυών συλλέχθηκε μυοκαρδιακός ιστό από την εμφραγματική περιοχή στο δέκατο λεπτό της επαναιμάτωσης. Διερευνήθηκαν οι καταστάσεις φωσφορυλίωσης της GSK3β ως δείκτες της ενεργότητάς της με προσδιορισμό της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης S9, της διεγερτικής φωσφορυλίωσης Y216 και της φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης στα σημεία S31 / 33 / T41.

Autéς οι θέσεις φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης διαμεσολαβούνται ειδικά μέσω της GSK3β και είναι ενδεικτικές της δραστικότητας της GSK3β. Ο λόγος p(S9)-GSK-3β /ολική GSK-3β αυξάνεται μετά τη χορήγηση του MLS2776 (p <0,05) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ αυτή η αναλογία (p(S9)-GSK-3β /ολική GSK-3β) της ομάδας MLS2778 παραμένει αμετάβλητη (p> 0,05) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 7B,D). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μειωμένη φωσφορυλίωση της GSK-3β (Y216) σε αμφότερες τις ομάδες MLS2776 και MLS2778 (p <0.01) όπως διαφαίνεται από τον λόγο p(Y216) -GSK3β /ολική GSK3β, ο λόγος p(S31 / 33 / T41) -β-κατενίνης / ολική β-κατενίνη παρουσιάζει σημαντική μείωση και στις δύο ομάδες MLS2776 και MLS2778 (p<0,01)(Σχήμα 8B) ενώ η ολική β-κατενίνη παραμένει αμετάβλητη σε όλες τις ομάδες (p>0,05) (Σχήμα 8C).



Σχήμα 7: Οι αναστολείς GSK3β επάγουν καρδιοπροστασία μέσω της μείωσης της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης 216 και ανεξάρτητα από τη φωσφορυλίωση της σερίνης 9 της GSK3β. Απεικονίζονται σχετικές πυκνομετρικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο 10ο λεπτό της επαναιμάτωσης μετά από κανονικοποίηση ως προς την ολική πρωτεΐνη των δειγμάτων και αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις Western Blot (Σχήμα 7Α). Τα γραφήματα αναπαριστούν τους λόγους p (S9) -GSK3β / t-GSK3β, p (Y216) -GSK3β / t-GSK3β και tGSK3β / β-τουμπουλίνη (\*\* p < 0.01)(Σχήμα 7B,7C,7D αντίστοιχα). Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν στην ίδια εικόνα της β-τουμπουλίνης, πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της φόρτωσης.



2χημα 8: Η χορηγηση των αναστολεών της GSK3β μειώνει την ενεργοτητά της GSK3β οπώς επιβεβαιώνεται από την μείωση της φωσφορυλίωσης της β κατενίνης. Απεικονίζονται σχετικές πυκνομετρικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης μετά από κανονικοποίηση ως προς την ολική πρωτεΐνη των δειγμάτων και αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις Western Blot (Σχήμα 8Α). Τα γραφήματα αναπαριστούν τους λόγους pS33/S37/Thr41 / t-β κατενίνη (Σχήμα 8Β) και t-β κατενίνη / β-τουμπουλίνη (Σχήμα 8C) (\*\* p <0.01.) Η β-τουμπουλίνης είναι η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αζιοπιστίας της φόρτωσης..

# 3.6 Η φαρμακολογική αναστολή της GSK3β με τα MLS2776 και MLS2778 δεν μεταβάλλει το οξειδωτικό στρες κατά την επαναιμάτωση

Ακολούθως, μελετήθηκε αν η αναστολή της GSK3β μπορεί να μεταβάλει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται κατά την επαναιμάτωση. Έτσι, εξετάστηκε η παραγωγή της MDA ως δείκτης οξειδωτικού στρες στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης μετά τη χορήγηση των MLS2776 και MLS2778 που πραγματοποιήθηκε στο 20° λεπτό της παρατεταμένης ισχαιμίας. Βρέθηκε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αναστολή της GSK3β με τα MLS παράγωγα δεν επιδρά στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες (p>0,05).



# 3.7 Αξιολόγηση των αναστολέων MLS2776 και MLS2778 σε ισχαιμικά και φυσιολογικά μυοκαρδιακά μιτοχόνδρια μυών

Εφόσον διαπιστώθηκε ότι τα μόρια MLS2776 και το MLS2778 μείωσαν την ενεργότητα της GSK3β, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι αναστολείς πιθανώς να έχουν άμεσες επιδράσεις στα μιτοχόνδρια με τη μεσολάβηση της μιτοχονδριακής GSK3β. Προσδιορίστηκαν, λοιπόν τα άμεσα αποτελέσματα των δύο ενώσεων σε κατάσταση ισχαιμίας και φυσιολογικής οξυγόνωσης στην μεταβολή της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε η τεχνική CRC χρησιμοποιώντας απομονωμένα μιτοχόνδρια από δύο ομάδες μυών: την ομάδα που υποβλήθηκε σε εικονικό χειρουργείο (μιτοχόνδρια σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης) και αυτήν που υποβλήθηκε σε 30 λεπτά ισχαιμίας ακολουθούμενη από 10 λεπτά επαναιμάτωσης (ισχαιμικά μιτοχόνδρια- Ι / R). Ο μυοκαρδιακός ιστός από την ισχαιμική περιοχή ή το αντίστοιχο τμήμα στην ομάδα που δεν υπέστη ισγαιμία συλλέγτηκε γρήγορα και απομονώθηκαν τα μιτογόνδρια. Η in vitro επώαση των μιτοχονδρίων με διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 μΜ-0.01 μΜ) των δύο αναστολέων της GSK3β (MLS2776 και MLS2778) σε φυσιολογικά (Σγήμα A,C) και μιτογόνδρια Ι / R (Σχήμα B,D) απέτυχε να μεταβάλει την ευαισθησία των μιτοχονδρίων στη διαπερατότητα από το ασβέστιο αποκαλύπτοντας ότι η μιτοχονδριακή GSK3β δεν συσχετίζεται με την αντίσταση στην υπερφόρτωση από ασβέστιο. Καμία από τις ενώσεις σε οποιαδήποτε συγκέντρωση δεν αύξησε το CRC (Σχήμα 10 E,F). Επομένως, τα μόρια MLS2776 και MLS2778 δεν αναστέλλουν την διάνοιξη του mPTP. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα ευρήματά μας στα φυσιολογικά μιτοχόνδρια κονίκλων (p> 0.05). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι τα μιτοχόνδρια Ι / R είναι πιο ευαίσθητα στη διάνοιξη του πόρου mPTP (unpaired T-test μεταξύ ομάδας μιτοχονδρίων φυσιολογικής οξυγόνωσης και



μιτοχονδριακής ομάδας Ι / R που επωάστηκαν χωρίς την προσθήκη των αναστολέων \*\* p $<\!\!0,\!\!01\!$  (Σχήμα 10G).

απομονωμένα μιτοχόνδρια μυών σε κατάσταση ισχαιμίας και φυσιολογικής οξυγόνωσης. Οι μύες τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα που χειρουργήθηκε εικονικά και τη ομάδα των 30 λεπτών ισχαιμίας / 10 λεπτών επαναιμάτωσης Η ικανότητα συγκράτησης ασβεστίου προσδιορίστηκε σε φυσιολογικά και ισχαιμικά μιτοχόνδρια που υποβλήθηκαν σε επώαση με τους αναστολείς (10 μM-0.01 μM) και συγκρίθηκαν με εκείνα που επωάστηκαν απουσία αναστολέα. Οι αναστολείς της GSK3β δεν μεταβάλλουν τη μιτοχονδριακή ευαισθησία στη διαπερατότητα προκαλούμενη από το ασβέστιο (p> 0,05). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η CsA (1μg / mL) (\*\*\* p <0,001 σε σύγκριση με άλλες ομάδες) Οι ράβδοι εμφανίζουν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση SD (n = 3). (Σχήμα 10E,10F) Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν την ανίχνευση φθορισμού του εξωμιτοχονδριακού ασβεστίου (Σχήμα 10A,B,C,D). Τα ισχαιμικά μιτοχόνδρια I / R εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στην διαπερατότητα (\*\* p <0,01)(Σχήμα 10G).

### 3.8 Η GSK3β δεν μετατοπίζεται σε μιτοχόνδρια κατά την επαναιμάτωση μετά από ισχαιμία in vivo

Δεν είναι σαφές πώς συμπεριφέρεται η GSK3β κάτω από τις μοριακές μεταβολές που προκαλούνται από την ισχαιμία και επαναιμάτωση. Μία υπόθεση που έχει διατυπωθεί αναφέρει ότι η GSK3β μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια in vitro και δρα ως μείζων θετικός ρυθμιστής του mPTP, διευκολύνοντας την διάνοιξή του κάτω από καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Tanno et al., 2014). Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη σειρά από τα ανωτέρω πειράματα μιτοχονδριακής απομόνωσης από μύες με σκοπό να διερευνηθεί ο εντοπισμός της GSK3β σε ισχαιμία και επαναιμάτωση μυών. Οι μύες τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα που χειρουργήθηκε εικονικά και αυτή που υποβλήθηκε σε 30 λεπτά της ισχαιμίας και 10 λεπτά επαναιμάτωσης. Στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης λήφθηκε ισχαιμικός ιστός (ή ισοδύναμο τμήμα από τα εικονικώς χειρουργημένα πειραματόζωα) και διαχωρίστηκε το κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια. Η αναλογία pGSK3β /ολική GSK3β υπολογίστηκε για το κυτοσολικό (CC: cytosol control, CI: cytosol ischemic conditions) και το μιτοχονδριακό κλάσμα (MC: mitochondria control, MI: mitochondria ischemic conditions). Η βτουμπουλίνη και η COXIV χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες ελέγχου της φόρτωσης για το κυτοσολικό και το μιτοχονδριακό κλάσμα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η GSK3β δεν μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια μέχρι το 10° λεπτό της επαναιμάτωσης (Σχήμα 11A,C,D). Η ανασταλτική φωσφορυλίωση (S9) της GSK3β μειώνεται σημαντικά (p <0,05) (Σχήμα 11 B) στο κυτταρόπλασμα του ισχαιμικού μυοκαρδίου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό μυοκάρδιο.



γραφικές παραστάσεις στο 10ο λεπτό της επαναιμάτωσης μετά την κανονικοποίηση ως προς την ολική πρωτεΐνη και αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις Western Blot για το κυτοσολικό (CC: cytosol control, CI: cytosol ischemic conditions) και το μιτοχονδριακό κλάσμα (MC: mitochondria control, MI: mitochondria ischemic conditions) (Σχήμα 11 A). Τα ραβδογράμματα αναπαριστούν τους λόγους p(S9) -GSK3β /ολική -GSK3β, ολική GSG3β/βτουμπουλίνη και ολική-GSK3β / COXIV (Σχήμα 11B,C,D αντίστοιχα) (\* p < 0,05).

# 3.9 Η αναστολή της GSK3β παρέχει καρδιοπροστασία πέρα από την αναστολή του CYPD

Τέλος, αξιολογήθηκε αν η αναστολή της GSK3β μειώνει την βλάβη της επαναιμάτωσης ανεξάρτητα από την αναστολή του mPTP. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο 30 λεπτών ισχαιμίας και επαναιμάτωσης 2 ωρών στους μύες και συγχορηγήθηκε ένας εδραιωμένος αναστολέας του mPTP, η CsA, με τις ενώσεις MLS2776 και MLS2778. Οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν στο 10° λεπτό πριν την επαναιμάτωση σε δόσεις που αναφέρονται στην παράγραφο 2.4. Η ομάδα MLS2776 + CsA και η MLS2778 + CsA έδειξε σημαντική μείωση στο μέγεθος του εμφράγματος σε σύγκριση με την ομάδα CsA (n = 7 ανά ομάδα)  $(11,4 \pm 1,2\%$  για την ομάδα MLS2776+CsA και  $11,2 \pm 0,8\%$  για την ομάδα MLS2778+CsA αντιστοίχως έναντι 25,0 ± 1,0% για την ομάδα CsA, \*\*\* p <0.001)(Σχήμα 12A). Ελέγχτηκε, επίσης, ο βαθμός της ισχαιμικής προσβολής μεταξύ των ομάδων. (Σχήμα 12B). Ο λόγος της περιοχής σε κίνδυνο του μυοκαρδίου ως προς την συνολική επιφάνεια των τομών ήταν παρόμοιος σε όλες τις ομάδες. (54,8 ± 1,8% για την ομάδα MLS2776+CsA και 53,2 ± 1,6% για την ομάδα MLS2778+CsA έναντι 51,2 ± 3,0% για την ομάδα CsA, p> 0,05).



Σχήμα 12: Η συγχορήγηση των αναστολέων MLS2776 και MLS2778 με την CsA μειώνει σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος σε μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε σύγκριση με την μονοθεραπεία με CsA. Οι μύες υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά ισχαιμίας ακολουθούμενα από 2 ώρες επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα των ομάδων CsA, MLS2776 + CsA και MLS2778 + CsA για το μέγεθος εμφράγματος εκφράζονται ως ποσοστό της εμφραγματικής ως προς την περιοχή σε κίνδυνο (% I / R) στο μυοκάρδιο των μυών (Σχήμα 12A) Τα ποσοστά των μεμονωμένων πειραματόζωων παρουσιάζονται σε διάγραμμα διασποράς. Οι κουκίδες χρησιμοποιούνται για την ομάδα CsA ενώ χρησιμοποιούνται τρίγωνα για τις ομάδες MLS2776 + CsA και MLS2278 + CsA. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου (το μπλε / σκούρο οφείλεται στη χρώση του Evans Blue, το κόκκινο και το λευκό αντιπροσωπεύουν την περιοχή που κινδυνεύει, ενώ η λευκή περιοχή αποτελεί τον εμφραγματικό ιστό)(n = 7 ανά ομάδα, μέσος όρος ± SEM, \*\*\* p<0.001, έναντι της ομάδας ελέγχου,††† p< 0.001 σε σύγκριση με την ομάδα CsA). Διάγραμμα των λόγων της περιοχής σε κίνδυνος προς την συνολική επιφάνεια των τομών. (%R / A) (p>0,001) (Σχήμα 12B)

# 4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε ο ρόλος της GSK3β στην καρδιοπροστασία με την χρήση εκλεκτικών αναστολέων παραγώγων ινδιρουμπίνης. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής επιβεβαιώνουν ότι η μείωση της ενεργότητας της GSK3β είναι απαραίτητη για την καρδιοπροστασία. Επίσης, αναδεικνύεται η περιπλοκότητα της ρύθμισης της GSK3β. Με βάση τα αποτελέσματά μας, φαίνεται ότι η μείωση της ενεργότητας της GSK3β μέσω μείωση της φωσφορυλίωσής της στην Υ216 συσχετίζεται με την μείωση της βλάβης της επαναιμάτωσης, γεγονός που αποδεικνύεται πρώτη φορά in vivo με βάση τα όσο γνωρίζουμε βιβλιογραφικά. Ακόμη, η δράση της GSK3β στον mPTP κατά την επαναιμάτωση αποδείχθηκε ότι δεν επιτελείται μέσω μετατόπισης της GSK3β στα μιτοχόνδρια και ο μηγανισμός αλληλεπίδρασής τους παραμένει υπό διερεύνηση. Επιπροσθέτως, αποδείξαμε ότι οι αναστολείς της GSK3β δεν δρούν απευθείας στα μιτοχόνδρια και δεν δρουν ως απευαισθητοποιητές του mPTP. Τέλος, η χορήγηση in vivo των αναστολέων επιφέρει καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα που εξαρτάται μερικώς μόνο από την αναστολή του CYPD και του mPTP, όπως φάνηκε από την συγχορήγηση των αναστολέων με την CsA στο 20° λεπτό της ισχαιμικής περιόδου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει για πρώτη φορά ότι η καρδιοπροστασία μέσω της αναστολής της GSK3β επάγεται και από άλλον παράλληλο μηχανισμό εκτός από την αναστολή του mPTP.

### Η μείωση της έκτασης του εμφράγματος από τους αναστολείς της GSK3β

Η συμμετοχή της GSK3β στην καρδιοπροστασία μελετάται για περισσότερο από 15 χρόνια. Η προστασία του μυοκαρδίου από την GSK3β έχει συσχετιστεί με το IPC, (Nishihara et al., 2007), με το POC (Gomez et al., 2008) και με την επαγωγή καρδιοπροστασίας μέσω μορίων που ενεργοποιούν τις σηματοδοτικές οδούς των φαινομένων conditioning (Chen et al., 2017; Korzick et al., 2007). Όπως αναλύθηκε εκτενώς στο εδάφιο 1.9 της εισαγωγής η συμμετοχή της GSK3β στην μείωση της βλάβης της επαναιμάτωσης έχει μελετηθεί με τη χρήση διαγονιδιακών ζώων όσο και με τη χρήση φαρμακολογικών αναστολέων. Τα αποτελέσματα σε αυτές τις μελέτες ήταν αντικρουόμενα (Gomez et al., 2008; Inserte and Garcia-Dorado, 2015; Juhaszova et al., 2009). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η σειρά αναλόγων MLS που δρούν ως συναγωνιστικοί αναστολείς της GSK3β μειώνουν την έκταση του εμφράγματος σε δύο ζωικά μοντέλα (κόνικλοι και μύες) όταν χορηγούνται 10 λεπτά πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης. Έτσι, τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με τις μελέτες του Gross, Gomez και Arbelaez που έδειξαν ότι η χορήγηση του SB216763 ενός άλλου συναγωνιστικού αναστολέα σε μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης τρωκτικών (μύες και επίμυες) επιφέρει μείωση του μεγέθους του εμφράγματος (Arbeláez et al., 2013; Gomez et al., 2008; Gross et al., 2008; Kaga et al., 2006).

### Οι μεταβολές της φωσφορυλίωσης της GSK3β κατά την επαναιμάτωση

Παρά την πολυπλοκότητα της ρύθμισης της GSK3β, οι περισσότερες από τις μελέτες για την καρδιοπροστασία εξετάζουν την κατάσταση αναστολής της GSK3β που προκαλείται από φωσφορυλίωση σε σερίνη 9 και δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με το ρόλο της αυτοφωσφορυλίωσης της Y216 της GSK3β στην καρδιοπροστασία. Μάλιστα, όπως διαφαίνεται από τον Πίνακα 1 στο εδάφιο 1.9 της παρούσας εργασίας αρκετές μελέτες δεν έχουν εξετάσει την κατάσταση φωσφορυλίωσης της GSK3β μετά από την χορήγηση αναστολέων. Συνοπτικά, αναφέρεται επίσης ότι η ανασταλτική φωσφορυλίωση της S9 είναι μια ρυθμιστική διαδικασία που εμποδίζει την GSK3β να αλληλεπιδράσει με ήδη φωσφορυλιωμένα υποστρώματα χωρίς να καταργεί τη συνολική λειτουργία της. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση στην Υ216 αποτελεί μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που προετοιμάζει την διαθέσιμη κοιλότητα για τη σύνδεση ενός υποστρώματος και αυξάνει τη συνολική της ενεργότητα (Cole et al., 2004; Frame and Cohen, 2001). Σε αυτή την κατάσταση φωσφορυλίωσης, η GSK3β μεταβάλλει τη δραστικότητα μίας ποικιλίας υποστρωμάτων φωσφορυλιωμένων και μη. Έτσι, όταν η φωσφορυλίωση της τυροσίνης μειώνεται, η συνολική δραστηριότητά της μειώνεται. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης της β-κατενίνης, αποτελεί έναν αξιόπιστο τρόπο προσδιορισμού της ενεργότητας της GSK3β σε αυτήν την περίπτωση καθώς δεν επηρεάζεται από την ανασταλτική φωσφορυλίωση S9 (Cole et al., 2004; Frame and Cohen, 2001).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η σειρά των αναστολέων της GSK3β όταν χορηγούνται σε αναισθητοποιημένους κονίκλους παρουσιάζουν καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα, ωστόσο η αυξημένη φωσφορυλίωση της GSK-3β -S9 ελήφθη μόνο στις ομάδες MLS2776, MLS2777 και BIO. Η επίδραση των αναστολέων της GSK3β στην αναστολτική φωσφορλίωση μπορεί να οφείλεται στην ρύθμιση της φωσφατάσης PP1A από την GSK3β αλλά η εικασία αυτή αποτελεί αντικείμενο μελλοντικών μας μελετών. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα που παρέχεται από τους αναστολείς της GSK3β δεν εξαρτάται από την αδρανοποίηση της GSK3β μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης και πιθανά οι συναγωνιστικοί αναστολείς της GSK3β μπορεί να μην επηρεάζουν αυτήν την φωσφορυλίωση. Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των αναστολέων στην φωσφορυλίωση της GSK3β τα παράγωγα MLS2776 και MLS2778 επιλέχθηκαν με βάση τα εξής κριτήρια για να χορηγηθούν στο μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης στους μύες:

- 1. Ο αναστολέας MLS2778 ήταν 10 φορές λιγότερο δραστικός in vitro από τον αναστολέα MLS2776 αλλά μείωσε την έκταση του εμφράγματος στον ίδιο βαθμό in vivo σε αναισθητοποιημένους κονίκλους
- 2. Η αναστολή της GSK3β μέσω φωσφορυλίωσης της S9 ήταν ανάλογη των in vitro αποτελεσμάτων αλλά ανεξάρτητη από την καρδιοπροστασία

Για να προσδιοριστεί εάν η χορήγηση των αναστολέων της GSK-3β μειώνει τη δραστικότητα της GSK-3β στον ιστό του μυοκαρδίου στους μύες εξετάσαμε επιπλέον τη φωσφορυλίωση στην Y216 και τον καθοδικό στόχο της GSK-3β, την β-κατενίνη. Και οι δύο αναστολείς μείωσαν την φωσφορυλίωση στην Υ216 και την φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση συναγωνιστικών αναστολέων μειώνει την δραστηριότητα της GSK3β. Επομένως, μπορεί να εδραιωθεί η συσχέτιση της μείωσης της Y216 και της καρδιοπροστασίας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την κατάσταση φωσφορυλίωσης της GSK3β μετά την οξεία χορήγηση των δύο GSK3β αναστολέων συμφωνούν με μια μελέτη που αποκάλυψε ότι το SB415286 μείωσε τη φωσφορυλίωση του Y216 και αύξησε την ποσότητα της μη φωσφορυλιωμένης GSK3β (Krishnankutty et al., 2017). Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η μειωμένη φωσφορυλίωση β-κατενίνης μπορεί να δράσει ευνοϊκά στην καρδιοπροστασία. Η GSK3β άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι επάγει καρδιοπροστασίας μέσω της εμπλοκής της στην κανονική οδό των Wnts (Barandon et al., 2005; Foulquier et al., 2018; Hahn et al., 2006; Hermida et al., 2017; Jope and Johnson, 2004). Μάλιστα, ο καταρράκτης Wnt ως καθοδικός στόχος της GSK3β έχει μελετηθεί επίσης στην ισχαιμική προετοιμασία (Vigneron et al., 2011), ωστόσο, η δράση του δεν έχει ακόμη εδραιωθεί λόγω της περιπλοκότητας της μοριακής αυτής σηματοδότησης στη λειτουργία των κυττάρων.

Η GSK3β θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της διάνοιξης των mPTP. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι η κινάση αυτή είναι ο αποδέκτης όλων των ανοδικών καρδιοπροστατευτικών σημάτων και δρα αναστέλλοντας τον mPTP (Juhaszova et al., 2009). Ο μηχανισμός της αναστολής της διάνοιξης του mPTP από την GSK3β δεν έχει διασαφηνιστεί και στη βιβλιογραφία υπάρχουν διαφορετικές θεωρίες για το φαινόμενο αυτό. Σε καρδιομυοβλάστες H9C2 έχει αναφερθεί ότι η GSK3β μετατοπίζεται κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια ώστε να αλληλεπιδράσει με το VDAC2 κατά τρόπο εξαρτώμενο από την φωσφορυλίωση στην σερίνη 9 (Tanno et al., 2014). Η GSK3β έχει επίσης προταθεί να αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά του mPTP όπως τον μεταφορέα νουκλεοτιδίων ANT και την εξοκινάση II (Yang et al., 2017; Zhu et al., 2013). Έχει διατυπωθεί επίσης ότι υπάρχουν έμμεσες συσχετίσεις μεταξύ της GSK3β και της λειτουργίας των μιτογονδρίων. Βρέθηκε ότι η αναστολή της GSK3β μπορεί να μεταβάλει τη μεταφορά  $Ca^{2+}$  από το σάρκοπλασματικό και ενδοπλασματικό δίκτυο στα μιτοχόνδρια κατά την επαναιμάτωση, περιορίζοντας την υπερφόρτωση σε ασβέστιο και τον κυτταρικό θάνατο. (Gomez et al., 2016b). Άλλες μελέτες κατέδειξαν ότι η GSK3β μπορεί να αποτρέψει την διάνοιξη των mPTP μέσω φωσφορυλίωσης σε ρυθμιστές του mPTP. Ωστόσο, δεδομένου ότι η δομή του πόρου δεν είναι σαφώς διευκρινισμένη, οι συσχετίσεις της GSK3β με τις πρωτεϊνες που ρυθμίζουν την διάνοιξη του πόρου (VDAC, ANT, κ.α.) δεν είναι να δυνατό να οδηγούν σε απόλυτα συμπεράσματα όσον αφορά την καρδιοπροστασία.

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της GSK3β με τα μιτοχόνδρια in vivo, διερευνήθηκε εάν οι αναστολείς έχουν άμεση επίδραση στη διάνοιξη του mPTP και αν η κινάση μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Η απευθείας δράση των αναστολέων στα μιτοχόνδρια μελετήθηκε καθώς βιβλιογραφικά έχει διαπιστωθεί ότι η κινάση έχει μιτοχονδριακή εντόπιση στο 1% του συνολικού ενδοκυτταρικού περιεχομένου.(Frame and Cohen, 2001) Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η GSK3β δεν εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια κάτω από συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης και ότι οι συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης δεν προκαλούν μετατόπιση της GSK3β στα μιτοχόνδρια in vivo σε μύες. Μία εξήγηση για αυτό το εύρημα θα ήταν ότι η μετατόπιση της GSK3β είναι εξαρτώμενη από το χρόνο και κατά το χρόνο συλλογής των ιστών (δέκατο λεπτό επαναιμάτωσης) αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται. Ακολούθως, ερευνήθηκε αν οι αναστολείς μπορούν να αναστείλουν άμεσα το άνοιγμα του mPTP. Ο προσδιορισμός του CRC επιβεβαιώνει ότι οι αναστολείς GSK3β δεν μεταβάλλουν την ευαισθησία στο ασβέστιο. Τα μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από την ομάδα Ι / R δείχνουν σημαντική μείωση της ανθεκτικότητας στη υπερφόρτωση από το ασβέστιο. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλη μελέτη σε απομονωμένα μιτοχόνδρια επίμυων μετά από ισχαιμία (González Arbeláez et al., 2013). Επομένως, φαίνεται ότι ο μηχανισμός της καρδιοπροστατευτικής δράσης των αναστολέων της GSK3β δεν περιλαμβάνει την αναστολή της mPTP με άμεσο τρόπο και είναι πιθανότερο ότι οι αναστολείς αλληλεπιδρούν με την GSK3β στο κυτταρόπλασμα, καθώς αυτή η κινάση δεν εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό κλάσμα.

Επιπροσθέτως, η κατάσταση φωσφορυλίωσης της σερίνης 9 GSK3β στο κυτοσόλιο μειώνεται στην ομάδα Ι / R, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της κυτοσολικής δραστηριότητας της GSK3β είναι καθοριστική για τον κυτταρικό θάνατο αλλά δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τον εντοπισμό της GSK3β in vivo. Τα αποτελέσματά μας είναι συναφή με τον Arbeláez, (González Arbeláez et al., 2013) που έδειξε ότι η σύνδεση GSK-3β / VDAC ήταν αμελητέα σε απομονωμένες καρδιές επίμυων που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση. Στην ίδια μελέτη η μέγιστη συσχέτιση ήταν παρούσα στις καρδιές που έλαβαν αγωγή με αναστολείς GSK-3β. Αυτό θέτει το ερώτημα εάν οι συναγωνιστικοί αναστολείς της GSK3β θα μπορούσαν να ευνοήσουν την αλληλεπίδραση GSK3β με ρυθμιστές του mPTP. Επιπλέον, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η καρδιοπροστατευτική δράση των αναστολέων είναι ανεξάρτητη από το άνοιγμα του mPTP. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η GSK3β μειώνει την έκταση του εμφράγματος σε μεγαλύτερο βαθμό από την CsA. Συνεπώς, εικάζουμε ότι η μείωση της δραστικότητας της GSK3β έχει παράλληλους μηχανισμούς καρδιοπροστασίας πέρα της αναστολής της CYPD.

Η παρούσα μελέτη εμφανίζει συγκεκριμένους περιορισμούς. Αρχικά, για την μελέτη της φυσιολογίας της κινάσης χρησιμοποιήθηκαν συναγωνιστικοί αναστολείς μόνο και μάλιστα δομικά ανάλογοι. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της μελέτης δεν μπορούν να επεκταθούν για τη δράση των μη συναγωνιστικών αναστολέων ή των αναστολέων που δρούν στη θέση του Mg<sup>2+</sup> όπως τα άλατα λιθίου. Η χορήγηση των αναστολέων πραγματοποιήθηκε κατά το 20° λεπτό της ισχαιμικής περιόδου. Η καρδιοπροστατευτική δράση των μορίων και η αναστολή της GSK3β, λοιπόν μπορεί να αποδοθεί σε αυτό μόνο το χρονικό πλαίσιο. Η ανασταλτική φωσφορυλίωση της GSK3β από τις MAPK κινάσες στην σερίνη 389 δεν προσδιορίστηκε καθώς ο ρόλος της δεν έχει εδραιωθεί στην καρδιοπροστασία και θα αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω μελετών. Τέλος, η μετατόπιση της GSK3β μελετήθηκε στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης. Δεδομένης της ταχύτητας των κυτταρικών μεταβολών το φαινόμενο της μετατόπισης μπορεί να εξαρτάται από το χρόνο και κατ' επέκταση τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποκλείουν την άμεση αλληλεπίδραση της κυτοσολικής GSK3β με τα μιτοχόνδρια στο 10° λεπτό της επαναιμάτωσης.



# 5. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνάγεται ότι οι μελέτες που εξετάζουν την δράση της GSK3β στην καρδιοπροστασία πρέπει να λαμβάνουν υπόψιν την περιπλοκότητα της φυσιολογίας της κινάσης. Προτείνουμε τη διερεύνηση και όλων καταστάσεων φωσφορυλίωσης της GSK3β στα φαινόμενα conditioning και την επαναξιολόγηση του ρόλου της GSK3β στην καρδιοπροστασία εν γένη. Η χορήγηση αναστολέων της GSK3β in vivo πρέπει να συνοδεύεται με δεδομένα που να αποδεικνύουν την αναστολή της κινάσης in vivo μέσω δοκιμασιών ενεργότητας ή προσδιορισμού των καθοδικών της στόχων. Ακόμη, μένει να διευκρινιστεί το δίκτυο των καρδιοπροστατευτικών καταρρακτών της GSK3β τόσο στη συσχέτιση με τον mPTP όσο και ανεξάρτητα από αυτών. Καθώς νέα δεδομένα αναδύονται για την δομή του πόρου ως διμερές της ATP συνθάσης του μιτοχονδρίου απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων της GSK3β με την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα.

# Παράρτημα

### Σύσταση διαλυμάτων Western Blot

### <u>Σύσταση Lysis Buffer</u>

- 1% Triton X100: Μη ιοντικός επιφανειοδραστικό παράγοντας υπεύθυνος για την καταστρ οφή των λιπιδίων μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των διαμεμβρανικός πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που εντοπίζονται εντός των κυτταρικών οργανιδίων που περικλείονται από τις μεμβράνες
- 20mM Tris: Το Tris χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που υπάρχουν εντός του κυττάρου (pH 7,4-7,6)
- 150 mM NaCl: Αναστέλλει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών
- 50 mM NaF: Αναστολέας φωσφατάσης ώστε να μην χωνευτεί το δείγμα.
- 1 mM EDTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca2+ με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των ασβεστιοεπαγόμενων ενζύμων
- 1 mM EGTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca2+
- 1 mM Glycerolphosphatase: Ανταγωνισμός των ενδογενών φωσφατασών που αποσπούν φωσφορικές ομάδες από τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες
- 1% SDS: Φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφ όρηση. Επιφανειοδραστικό.
- 100 mM PMSF
- Protease phosphatase inhibitors

Στο εργαστήριο παρασκευάζονται 100mL διαλύματος Lysis με την προσθήκη των στερεών σε ποτήρι ζέσεως και την προσθήκη 80mL περίπου νερού. Το διάλυμα πεχαμετρείται με HCl 2N εως το pH να φτάσει στο 7,4. Έπειτα, σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθεται όγκος νερού εως τα 100mL.

Για την παρασκευή των gel υπάρχουν τα διαλύματα Stacking gel Buffer και Running gel Buffer που δημιουργούν τις κατάλληλες αναγωγικές συνθήκες και συνθήκες pH ώστε οι πρωτεΐνες να αναδιατάσσονται και να διαχωρίζονται αντίστοιχα.

### Σύσταση του Stacking gel Buffer

Tris Base (0.5M)	30.285g
SDS(0.4%)	2g
ddH <sub>2</sub> O	q.s 500mL

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 450mL ddH<sub>2</sub>Oκαι αναδεύονται. Το διάλυμα πεχαμετρείται εως το 6,8 με πυκνό HCl 12N. Ακολούθως προστίθεται ddH<sub>2</sub>O εως τα 500mL

# Σύσταση του Running gel Buffer

Tris Base (1.5M)	91g
SDS(0.4%)	2g
ddH <sub>2</sub> O	q.s 500mL

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 450mL ddH<sub>2</sub>Oκαι αναδεύονται. Το διάλυμα πεχαμετρείται εως το 8.8 με αραιό HCl 1N. Ακολούθως προστίθεται ddH<sub>2</sub>O εως τα 500mL

# <u>Σύσταση των gel</u>

Συστατικά	Running gel 12% Συνταγή για 2 gel	Running gel 7,5% Συνταγή για 2 gel	Stacking gel Συνταγή για 2 gel
30% Acrylamide/Bisacrylamide	6.4mL	4mL	650µl
Separating buffer 4x/	4.16mL	4.16mL	-
Stacking Gel Buffer			1.25ml
ddH2O	5.3mL	7.7mL	3.05ml
10% APS	160µL	160µL	50µl
TEMED	16μL	16μL	5µl
8% Bromophenol blue	-	-	12µl

# Σύσταση του Running buffer 5X και 10X

Glycine	71.1g	144.2g
SDS	5g	10g
Tris	15.15g	30.3g
dH2O	0.5L	q.s.1L
## Σύσταση διαλύματος Transportation Buffer 1X

Glycine	7,5 g
MeOH	100ml
dH2O	900ml
Tris	1,5 g

## <u>Σύσταση διαλύματος TBS 10X</u>

Tris Base	30g
NaCl	80g
ddH <sub>2</sub> O	q.s 1L

### Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με HCl 12N στο 7,4

### Παρασκευή διαλύματος TBS Tween 1X 0.1% Tween

Χρησιμοποιούνται 100mL διαλύματος TBS 10X και αραιώνονται σε 1L ddH<sub>2</sub>O. Ακολούθως προστίθενται 1mL Tween 20 και αναδεύονται ήπια για την αποφυγή αφρισμού.

#### Σύσταση stripping buffer

Tris Base	7.6g
SDS(2%)	20g
ddH <sub>2</sub> O	q.s 1L

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 900mL ddH<sub>2</sub>Oκαι αναδεύονται. Το διάλυμα πεχαμετρείται εως το 6.8 με πυκνό HCl 12N. Ακολούθως προστίθεται ddH<sub>2</sub>O εως τα 1000mL

Κατά την διαδικασία του stripping με έντονες αναγωγικές συνθήκες παρασκευάζεται ένα διάλυμα όπου γι α κάθε 20 mL stripping buffer προστίθενται 175μL μερκαπτοαιθανόλης με ιδιαίτερη προσοχή στον απαγωγό.

#### Σύσταση Mild Stripping Buffer

Διάλυμα γλυκίνης 25mM	9mL
Διάλυμα SDS 10%	1mL
Tween 20	50µL

# Βιβλιογραφία

Amodeo, G.F., Mnatsakanyan, N., Solesio, M.E., Klim, M., Kurcok, P., Zakharian, E., Jonas, E.A., and Pavlov, E.V. (2018). Molecular Assembly of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Biophys. J. *114*, 658a.

Anantharaman, V., and Lim, S.H. (2013). Treatment of NSTEMI (Non-ST Elevation Myocardial Infarction). Curr. Emerg. Hosp. Med. Rep. 1, 18–28.

Andreadou, I., Farmakis, D., Prokovas, E., Sigala, F., Zoga, A., Spyridaki, K., Papalois, A., Papapetropoulos, A., Anastasiou-Nana, M., Kremastinos, D.T., et al. (2012). Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. Cardiovasc. Res. *94*, 501–509.

Andreadou, I., Efentakis, P., Balafas, E., Togliatto, G., Davos, C.H., Varela, A., Dimitriou, C.A., Nikolaou, P.-E., Maratou, E., Lambadiari, V., et al. (2017). Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. Front. Physiol. *8*.

Andreadou Ioanna, Iliodromitis Efstathios K, Rassaf Tienush, Schulz Rainer, Papapetropoulos Andreas, and Ferdinandy Péter (2014). The role of gasotransmitters NO, H2S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. Br. J. Pharmacol. *172*, 1587–1606.

Antman, E., Bassand, J.-P., Klein, W., Ohman, M., Sendon, J.L.L., Rydén, L., Simoons, M., and Tendera, M. (2000). Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction: The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. J. Am. Coll. Cardiol. *36*, 959–969.

Arbeláez, G., F, L., Núñez, P., A, I., and Mosca, S.M. (2013). Gsk-3β Inhibitors Mimic the Cardioprotection Mediated by Ischemic Pre- and Postconditioning in Hypertensive Rats.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., et al. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature *434*, 658–662.

Barandon, L., Dufourcq, P., Costet, P., Moreau, C., Allières, C., Daret, D., Dos Santos, P., Daniel Lamazière, J.-M., Couffinhal, T., and Duplàa, C. (2005). Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning. Circ. Res. *96*, 1299–1306.

Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., and Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. J. Biol. Chem. *280*, 18558–18561.

Bax, B., Carter, P.S., Lewis, C., Guy, A.R., Bridges, A., Tanner, R., Pettman, G., Mannix, C., Culbert, A.A., Brown, M.J.B., et al. (2001). The Structure of Phosphorylated GSK-3 $\beta$  Complexed with a Peptide, FRATtide, that Inhibits  $\beta$ -Catenin Phosphorylation. Structure *9*, 1143–1152.

Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., and Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. Circ. Res. *114*, 1852–1866.

Bergheanu, S.C., Bodde, M.C., and Jukema, J.W. (2017). Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. Neth. Heart J. 25, 231–242.

Bernardi, P., Di Lisa, F., Fogolari, F., and Lippe, G. (2015). From ATP to PTP and back. A dual function for the mitochondrial ATP synthase. Circ. Res. *116*, 1850–1862.

Bibli, S.-I., Andreadou, I., Chatzianastasiou, A., Tzimas, C., Sanoudou, D., Kranias, E., Brouckaert, P., Coletta, C., Szabo, C., Kremastinos, D.T., et al. (2015). Cardioprotection by H2S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. Cardiovasc. Res. *106*, 432–442.

Blažević, T., Heiss, E.H., Atanasov, A.G., Breuss, J.M., Dirsch, V.M., and Uhrin, P. (2015). Indirubin and Indirubin Derivatives for Counteracting Proliferative Diseases. Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM *2015*.

Boengler, K., Schulz, R., and Heusch, G. (2006). Connexin 43 signalling and cardioprotection. Heart *92*, 1724–1727.

Buja, L.M. (2013). The Pathobiology of Acute Coronary Syndromes. Tex. Heart Inst. J. 40, 221–228.

Canto, J.G., Fincher, C., Kiefe, C.I., Allison, J.J., Li, Q., Funkhouser, E., Centor, R.M., Selker, H.P., and Weissman, N.W. (2002). Atypical presentations among Medicare beneficiaries with unstable angina pectoris. Am. J. Cardiol. *90*, 248–253.

Chaban, Y., Boekema, E.J., and Dudkina, N.V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1837*, 418–426.

Chatzianastasiou, A., Bibli, S.-I., Andreadou, I., Efentakis, P., Kaludercic, N., Wood, M.E., Whiteman, M., Lisa, F.D., Daiber, A., Manolopoulos, V.G., et al. (2016). Cardioprotection by H2S Donors: Nitric Oxide-Dependent and -Independent Mechanisms. J. Pharmacol. Exp. Ther. *358*, 431–440.

Chen, L., Cai, P., Cheng, Z., Zhang, Z., and Fang, J. (2017). Pharmacological postconditioning with atorvastatin calcium attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by phosphorylating GSK3β. Exp. Ther. Med. *14*, 25–34.

Chinopoulos, C., and Szabadkai, G. (2013). What makes you can also break you: mitochondrial permeability transition pore formation by the c subunit of the F1F0 ATP-synthase? Front. Oncol. *3*.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., et al. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. Cell *126*, 163–175.

Cohen, P., and Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. Nat. Rev. Drug Discov. *3*, 479–487.

Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004). Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. Biochem. J. *377*, 249–255.

Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca2+dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. Biochem. J. *255*, 357–360.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature *378*, 785–789.

Cung, T.-T., Morel, O., Cayla, G., Rioufol, G., Garcia-Dorado, D., Angoulvant, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Guérin, P., Elbaz, M., Delarche, N., et al. (2015). Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. N. Engl. J. Med. *373*, 1021–1031.

Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. Cell *105*, 721–732.

Di Lisa, F., and Bernardi, P. (2006). Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. Cardiovasc. Res. *70*, 191–199.

Di Lisa, F., Menabò, R., Canton, M., Barile, M., and Bernardi, P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. J. Biol. Chem. *276*, 2571–2575.

Downey, J.M., Davis, A.M., and Cohen, M.V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. Heart Fail. Rev. *12*, 181–188.

Eldar-Finkelman, H., and Martinez, A. (2011). GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. Front. Mol. Neurosci. *4*.

Ferreira, R. (2010). The reduction of infarct size--forty years of research. Rev. Port. Cardiol. Orgao Of. Soc. Port. Cardiol. Port. J. Cardiol. Off. J. Port. Soc. Cardiol. 29, 1037–1053.

Fiol, C.J., Haseman, J.H., Wang, Y.H., Roach, P.J., Roeske, R.W., Kowalczuk, M., and DePaoli-Roach, A.A. (1988). Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1. Arch. Biochem. Biophys. *267*, 797–802.

Fiol, C.J., Wang, A., Roeske, R.W., and Roach, P.J. (1990). Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates. J. Biol. Chem. *265*, 6061–6065.

Foulquier, S., Daskalopoulos, E.P., Lluri, G., Hermans, K.C.M., Deb, A., and Blankesteijn, W.M. (2018). WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. Pharmacol. Rev. *70*, 68–141.

Fournier, N., Ducet, G., and Crevat, A. (1987). Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. J. Bioenerg. Biomembr. *19*, 297–303.

Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem. J. *359*, 1–16.

Ghaffari, S., Kazemi, B., Toluey, M., and Sepehrvand, N. (2013). The Effect of Prethrombolytic Cyclosporine-A Injection on Clinical Outcome of Acute Anterior ST-Elevation Myocardial Infarction. Cardiovasc. Ther. *31*, e34–e39.

Ghosh, R., and Pattison, J.S. (2018). Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart Failure: The Known and the Unknown.

Giorgio, V., Stockum, S. von, Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., et al. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 5887–5892.

Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., and Ovize, M. (2008). Inhibition of GSK3β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion. Circulation *117*, 2761–2768.

Gomez, L., Thiebaut, P.-A., Paillard, M., Ducreux, S., Abrial, M., Crola Da Silva, C., Durand, A., Alam, M.R., Van Coppenolle, F., Sheu, S.-S., et al. (2016a). The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3β during reperfusion injury. Cell Death Differ. *23*, 313–322.

Gomez, L., Thiebaut, P.-A., Paillard, M., Ducreux, S., Abrial, M., Crola Da Silva, C., Durand, A., Alam, M.R., Van Coppenolle, F., Sheu, S.-S., et al. (2016b). The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3β during reperfusion injury. Cell Death Differ. *23*, 313–322.

Gourdin, M., and Dubois, P. (2013). Impact of Ischemia on Cellular Metabolism. p.

Griffiths, E.J., and Halestrap, A.P. (1993). Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. J. Mol. Cell. Cardiol. 25, 1461–1469.

Gross, E.R., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (2006). The JAK/STAT pathway is essential for opioidinduced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3β. Am. J. Physiol. -Heart Circ. Physiol. *291*, H827–H834.

Gross, E.R., Hsu, A.K., and Gross, G.J. (2008). Delayed cardioprotection afforded by the glycogen synthase kinase 3 inhibitor SB-216763 occurs via a KATP- and MPTP-dependent mechanism at reperfusion. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. *294*, H1497–H1500.

Grover, G.J., Atwal, K.S., Sleph, P.G., Wang, F.-L., Monshizadegan, H., Monticello, T., and 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*, H1747-1755.

Haar, E. ter, Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.-M., Swenson, L., and Jain, J. (2001). Structure of GSK3β reveals a primed phosphorylation mechanism. Nat. Struct. Mol. Biol. *8*, 593–596.

Hahn, J.-Y., Cho, H.-J., Bae, J.-W., Yuk, H.-S., Kim, K.-I., Park, K.-W., Koo, B.-K., Chae, I.-H., Shin, C.-S., Oh, B.-H., et al. (2006). Beta-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. J. Biol. Chem. *281*, 30979–30989.

Hale, S.L., and Kloner, R.A. (1997). Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. *273*, H220–H227.

Halestrap, A.P. (2014). The C Ring of the F1Fo ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. Front. Oncol. *4*.

Halestrap, A.P., and Davidson, A.M. (1990). Inhibition of Ca2(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. Biochem. J. *268*, 153–160.

Hall, A.R., Burke, N., Dongworth, R.K., and Hausenloy, D.J. (2014). Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. Br. J. Pharmacol. *171*, 1890–1906.

Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A., and Gustafsson, A.B. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. Cell Death Differ. *14*, 146–157.

Hao, M., Zhu, S., Hu, L., Zhu, H., Wu, X., and Li, Q. (2017). Myocardial Ischemic Postconditioning Promotes Autophagy against Ischemia Reperfusion Injury via the Activation of the nNOS/AMPK/mTOR Pathway. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2007). Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. Heart Fail. Rev. *12*, 217–234.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. J. Clin. Invest. *123*, 92–100.

Hausenloy, D., Boston-Griffiths, E., and Yellon, D. (2012). Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. Br. J. Pharmacol. *165*, 1235–1245.

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., et al. (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.

Hermida, M.A., Dinesh Kumar, J., and Leslie, N.R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. Adv. Biol. Regul. 65, 5–15.

Heusch, G. (2012). Reduction of infarct size by ischaemic post-conditioning in humans: fact or fiction? Eur. Heart J. *33*, 13–15.

Heusch, G. (2015). Molecular Basis of Cardioprotection. Circ. Res. 116, 674–699.

Heusch, G., Boengler, K., and Schulz, R. (2008). Cardioprotection: Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. Circulation *118*, 1915–1919.

Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N., and Skyschally, A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. Circ. Res. *109*, 1302–1308.

Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., et al. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. Nat. Cell Biol. *1*, 60–67.

Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979). The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. Arch. Biochem. Biophys. *195*, 453–459.

Iliodromitis, E.K., Andreadou, I., Prokovas, E., Zoga, A., Farmakis, D., Fotopoulou, T., Ioannidis, K., Paraskevaidis, I.A., and Kremastinos, D.T. (2010). Simvastatin in contrast to postconditioning reduces infarct size in hyperlipidemic rabbits: possible role of oxidative/nitrosative stress attenuation. Basic Res. Cardiol. *105*, 193–203.

Inserte, J., and Garcia-Dorado, D. (2015). The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism. Br. J. Pharmacol. *172*, 1996–2009.

Inserte, J., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D. (2012). Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc. Res. *96*, 23–31.

Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. Annu. Rev. Med. 42, 225–246.

Jope, R.S., and Johnson, G.V.W. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem. Sci. *29*, 95–102.

Juhaszova, M., Zorov, D.B., Kim, S.-H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K.W., Ziman, B.D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C.L., et al. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. J. Clin. Invest. *113*, 1535–1549.

Juhaszova, M., Zorov, D.B., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., and Sollott, S.J. (2009). Role of glycogen synthase kinase-3β in cardioprotection. Circ. Res. *104*, 1240–1252.

Kaga, S., Zhan, L., Altaf, E., and Maulik, N. (2006). Glycogen synthase kinase- $3\beta/\beta$ -catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol. 40, 138–147.

Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., and Korthuis, R.J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *298*, 229–317.

Karwowski, J., Gierlotka, M., Gąsior, M., Poloński, L., Ciszewski, J., Bęćkowski, M., Kowalik, I., and Szwed, H. (2017). Relationship between infarct artery location, acute total coronary occlusion, and mortality in STEMI and NSTEMI patients. Pol. Arch. Intern. Med. *127*, 401–411.

Kim, Y.S., Jeong, H., Kim, A.R., Kim, W.-H., Cho, H., Um, J., Seo, Y., Kang, W.S., Jin, S.-W., Kim, M.C., et al. (2016). Natural product derivative BIO promotes recovery after myocardial infarction via unique modulation of the cardiac microenvironment. Sci. Rep. *6*, 30726.

Korzick, D.H., Kostyak, J.C., Hunter, J.C., and Saupe, K.W. (2007). Local delivery of PKCεactivating peptide mimics ischemic preconditioning in aged hearts through GSK-3β but not F1-ATPase inactivation. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. *293*, H2056–H2063.

Kramer, T., Schmidt, B., and Lo Monte, F. (2012). Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models. Int. J. Alzheimer's Dis. *2012*, e381029.

Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., Takahashi, S.-I., Ando, K., Ohara-Imaizumi, M., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. (2017). In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3β activity in neurons and brains. Sci. Rep. *7*, 8602. Kumar, A., and Cannon, C.P. (2009). Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I. Mayo Clin. Proc. *84*, 917–938.

Kwong, J.Q., and Molkentin, J.D. (2015). Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. Cell Metab. *21*, 206–214.

Llorens-Marítin, M., Jurado, J., Hernández, F., and Ávila, J. (2014). GSK-3β, a pivotal kinase in Alzheimer disease. Front. Mol. Neurosci. 7.

Long, Q., Yang, K., and Yang, Q. (2015). Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. Am. J. Cardiovasc. Dis. *5*, 19–32.

Lopez-Neblina, F., Toledo, A.H., and Toledo-Pereyra, L.H. (2005). Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res. *18*, 335–350.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265–275.

Mahmood, T., and Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. North Am. J. Med. Sci. *4*, 429–434.

Meijer, L., Skaltsounis, A.-L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X.P., Vonica, C.A., Brivanlou, A., Dajani, R., et al. (2003). GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. Chem. Biol. *10*, 1255–1266.

Mewton, N., Croisille, P., Gahide, G., Rioufol, G., Bonnefoy, E., Sanchez, I., Cung, T.T., Sportouch, C., Angoulvant, D., Finet, G., et al. (2010). Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. J. Am. Coll. Cardiol. *55*, 1200– 1205.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. Genome Biol. 3, REVIEWS3001.

Morganti, C., Bonora, M., Sbano, L., Morciano, G., Aquila, G., Campo, G., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., and Pinton, P. (2018). The Mitochondrial Permeability Transition Pore. In Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics, (Springer, Cham), pp. 47–73.

MURPHY, E., and STEENBERGEN, C. (2007). Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia–reperfusion injury. Cardiovasc. Res. *75*, 478–486.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation *74*, 1124–1136.

Nair, A.B., and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J. Basic Clin. Pharm. 7, 27–31.

Nesci, S. (2018). New insight in a new entity: the mitochondrial permeability transition pore arises from the Ca2+-activated F1FO-ATPases. Sci. Bull. *63*, 143–145.

Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., Ohori, K., Hotta, H., Terashima, Y., and Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. J. Mol. Cell. Cardiol. *43*, 564–570. Nishino, Y., Webb, I.G., Davidson, S.M., Ahmed, A.I., Clark, J.E., Jacquet, S., Shah, A.M., Miura, T., Yellon, D.M., Avkiran, M., et al. (2008). Glycogen Synthase Kinase-3 Inactivation Is Not Required for Ischemic Preconditioning or Postconditioning in the Mouse. Circ. Res. *103*, 307–314.

O'Rourke, B., Cortassa, S., and Aon, M.A. (2005). Mitochondrial Ion Channels: Gatekeepers of Life and Death. Physiology *20*, 303–315.

Ottani, F., Latini, R., Staszewsky, L., La Vecchia, L., Locuratolo, N., Sicuro, M., Masson, S., Barlera, S., Milani, V., Lombardi, M., et al. (2016). Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. J. Am. Coll. Cardiol. *67*, 365–374.

Parlakpinar, H., Orum, M.H., and Sagir, M. (2013). Pathophysiology of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: A Review. Med. Sci. Int. Med. J. 2, 935–954.

Perlmutt, L.M., Jay, M.E., and Levin, D.C. (1983). Variations in the blood supply of the left ventricular apex. Invest. Radiol. *18*, 138–140.

Perrelli, M.-G., Pagliaro, P., and Penna, C. (2011). Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. World J. Cardiol. *3*, 186–200.

Pfeffer, M.A., and Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation *81*, 1161–1172.

Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., et al. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. N. Engl. J. Med. *359*, 473–481.

Piper, H.M., Abdallah, Y., and Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. Cardiovasc. Res. *61*, 365–371.

Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S.M., Pearl, L., Leost, M., et al. (2004). Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. J. Med. Chem. *47*, 935–946.

Przyklenk, K., Dong, Y., Undyala, V.V., and Whittaker, P. (2012). Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. Cardiovasc. Res. *94*, 197–205.

Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J.J., Borger, M.A., Brotons, C., Chew, D.P., et al. (2016). 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur. Heart J. *37*, 267–315.

Rossello, X., and Yellon, D.M. (2018). The RISK pathway and beyond. Basic Res. Cardiol. 113.

Schmidt, M.R., Redington, A., and Bøtker, H.E. (2015). Remote conditioning the heart overview: translatability and mechanism. Br. J. Pharmacol. *172*, 1947–1960.

Schulz, R., Görge, P.M., Görbe, A., Ferdinandy, P., Lampe, P.D., and Leybaert, L. (2015). Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. Pharmacol. Ther. *153*, 90–106.

Skyschally, A., Caster, P., Iliodromitis, E.K., Schulz, R., Kremastinos, D.T., and Heusch, G. (2009). Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. Basic Res. Cardiol. *104*, 469–483.

Steenbergen, C. (2002). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in myocardial ischemia/reperfusion injury; relationship to ischemic preconditioning. Basic Res. Cardiol. *97*, 276–285.

Sutton, M.G.S.J., and Sharpe, N. (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy. Circulation *101*, 2981–2988.

Tanno, M., Kuno, A., Ishikawa, S., Miki, T., Kouzu, H., Yano, T., Murase, H., Tobisawa, T., Ogasawara, M., Horio, Y., et al. (2014). Translocation of Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β), a Trigger of Permeability Transition, Is Kinase Activity-dependent and Mediated by Interaction with Voltage-dependent Anion Channel 2 (VDAC2). J. Biol. Chem. *289*, 29285– 29296.

Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg, P.G., James, S.K., Atar, D., Badano, L.P., Blömstrom-Lundqvist, C., Borger, M.A., Di Mario, C., Dickstein, K., Ducrocq, G., et al. (2012). ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Eur. Heart J. *33*, 2569–2619.

Thornton, T.M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C.D., Aronshtam, A., Clements, J.L., Sabio, G., Davis, R.J., Matthews, D.E., Doble, B., et al. (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. Science *320*, 667–670.

Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Jaffe, A.S., Apple, F.S., Galvani, M., Katus, H.A., Newby, L.K., Ravkilde, J., Chaitman, B., et al. (2007). Universal definition of myocardial infarctionKristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Eur. Heart J. *28*, 2525–2538.

Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., and White, H.D. (2012). Third Universal Definition of Myocardial Infarction. Circulation *126*, 2020–2035.

Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M., Wilkins, E., Wright, L., Vos, R., Bax, J., et al. (2018). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. Eur. Heart J. *39*, 508–579.

Tissier, R., Ghaleh, B., Cohen, M.V., Downey, J.M., and Berdeaux, A. (2011). Myocardial protection with mild hypothermia. Cardiovasc. Res. *94*, 217–225.

Trankle, C., Thurber, C.J., Toldo, S., and Abbate, A. (2016). Mitochondrial Membrane Permeability Inhibitors in Acute Myocardial Infarction. JACC Basic Transl. Sci. 1, 524–535.

Tribe, H.T. (1998). The discovery and development of cyclosporin. Mycologist 12, 20–22.

Tullio, F., Angotti, C., Perrelli, M.-G., Penna, C., and Pagliaro, P. (2013). Redox balance and cardioprotection. Basic Res. Cardiol. *108*, 392.

Vigneron, F., Dos Santos, P., Lemoine, S., Bonnet, M., Tariosse, L., Couffinhal, T., Duplaà, C., and Jaspard-Vinassa, B. (2011). GSK-3β at the crossroads in the signalling of heart preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways. Cardiovasc. Res. *90*, 49–56.

Vougogiannopoulou, K., FERANDIN, Y., BETTAYEB, K., MYRIANTHOPOULOS, V., LOZACH, O., FAN, Y., JOHNSON, C.H., MAGIATIS, P., SKALTSOUNIS, A.-L., MIKROS, E., et al. (2008). Soluble 3', 6-substituted indirubins with enhanced selectivity towards glycogen synthase kinase -3 alter circadian period. J. Med. Chem. *51*, 6421–6431.

Vuorinen, K., Ylitalo, K., Peuhkurinen, K., Raatikainen, P., Ala-Rämi, A., and Hassinen, I.E. (1995). Mechanisms of Ischemic Preconditioning in Rat Myocardium: Roles of Adenosine, Cellular Energy State, and Mitochondrial F1Fo-ATPase. Circulation *91*, 2810–2818.

Wang, S., Venkatraman, V., Crowgey, E.L., Liu, T., Fu, Z., Holewinski, R.J., Ranek, M.J.J., Kass, D.A., O'Rourke, B., and Van Eyk, J.E. (2018). Protein S-Nitrosylation Controls Glycogen Synthase Kinase 3β Function Independent of its Phosphorylation State. Circ. Res.

Weber, N.C. (2015). 'Conditioning the heart' – lessons we have learned from the past and future perspectives for new and old conditioning 'drugs.' Br. J. Pharmacol. *172*, 1909–1912.

Wider, J., and Przyklenk, K. (2014). Ischemic conditioning: the challenge of protecting the diabetic heart. Cardiovasc. Diagn. Ther. *4*, 383–396.

Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. EMBO J. *9*, 2431–2438.

Wu, D., and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. Trends Biochem. Sci. *35*, 161–168.

Wu, M.-Y., Yiang, G.-T., Liao, W.-T., Tsai, A.P.-Y., Cheng, Y.-L., Cheng, P.-W., Li, C.-Y., and Li, C.-J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *46*, 1650–1667.

Yang, K., Chen, Z., Gao, J., Shi, W., Li, L., Jiang, S., Hu, H., Liu, Z., Xu, D., and Wu, L. (2017). The Key Roles of GSK-3β in Regulating Mitochondrial Activity. Cell. Physiol. Biochem. *44*, 1445–1459.

Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. N. Engl. J. Med. 357, 1121–1135.

Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M., and Sadoshima, J. (2011). Differential Roles of GSK-3β during Myocardial Ischemia and Ischemia/Reperfusion. Circ. Res. *109*, 502–511.

Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., and Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. *285*, H579–H588. Zhu, J., Rebecchi, M.J., Glass, P.S.A., Brink, P.R., and Liu, L. (2013). Interactions of GSK-3 $\beta$  with mitochondrial permeability transition pore modulators during preconditioning: ageassociated differences. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *68*, 395–403.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., and Sollott, S.J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. Cardiovasc. Res. *83*, 213–225.