



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Διπλωματική εργασία με θέμα:

**"Η επίδραση της υπερλιπιδαιμίας και  
της αθηρωμάτωσης στην επαγόμενη  
καρδιοτοξικότητα από την  
καρφιλζομίμη"**

Χατζηστεφάνου Μιχαήλ

A.M: 180522

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Ιωάννα Ανδρεάδου, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τομέα  
Φαρμακευτικής Χημείας

Ιούλιος

2020

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα για την επιλογή, την εμπιστοσύνη και την ανάθεση του θέματος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Παπαπετρόπουλο Ανδρέα, καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του ΕΚΠΑ και τον κύριο Νικόλαο Δρακούλη, αναπληρωτή καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, για τη διόρθωση της παρούσας εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευάγγελο Τέρπο, Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας του ΕΚΠΑ, τους συνεργάτες του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών, του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ που συντέλεσαν καταλυτικά στη διεκπεραίωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ Παναγιώτη Εφεντάκη που με το πλήθος των γνώσεών του, την αριστοτεχνία και την ηρεμία του, όχι μόνο μου μετέδωσε απαραίτητες πληροφορίες αλλά συνέβαλε στην επέκταση του τρόπου της ερευνητικής μου σκέψης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Δρ Μαρία Τσουμάνη που είναι πάντα δίπλα μας με θετική διάθεση και έτοιμη να μας μεταλαμπαδεύσει γνώσεις και εμπειρίες και να συζητήσει τα προβλήματά μας προσφέροντας λύση, την υποψήφια διδάκτορα Παναγιώτα Ευσταθία (Νάγια) Νικολάου που με τις γνώσεις της, θεωρητικές και πρακτικές, συμβάλλει στην επιστημονική μας κατάρτιση και τη δια βίου μάθηση. Τέλος, τους συμφοιτητές μου Παύλο Μπέση-Λαζάρου, για τον επαγγελματισμό και την απαιτούμενη ψυχολογική στήριξη, και ιδιαίτερα τη Γαρυφαλιά Ψαρράκου που επί καθημερινής βάσεως βρισκόμασταν για τη διεκπεραίωση των διπλωματικών μας εργασιών, συζητώντας λύσεις και προβλήματα για ζητήματα εντός και εκτός του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Στέφανο και Αλεξάνδρα, την αδελφή μου Ειρήνη και τη Σταματία Βιτωράκη που με στήριξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα έχοντας πίστη στις δυνατότητές μου και δίνοντας μου κουράγιο και δύναμη για να ανταπεξέλθω όλα τα εμπόδια που παρουσιάστηκαν στην πορεία. Φυσικά δεν ξεχνώ όλους τους φίλους μου που με στηρίζουν και με εμπυχώνουν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Το πολλαπλό μυέλωμα αποτελεί τη συχνότερη κυτταροπλασματική δυσκρασία και εκδηλώνεται κυρίως σε άτομα τρίτης ηλικίας τα οποία παράλληλα πάσχουν από καρδιαγγειακές συννοσηρότητες. Η καρφιλζομίμη χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής έναντι του υποτροπιάζοντος/ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος, ωστόσο παρουσιάζει σημαντική καρδιαγγειακή τοξικότητα. Καθώς η υπερλιπιδαιμία αποτελεί μια συχνά απαντούμενη συννοσηρότητα στους ασθενείς υπό θεραπεία με καρφιλζομίμη και αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση i) της επίδρασης της υπερλιπιδαιμίας-αθηρωμάτωσης στην επαγόμενη καρδιοτοξικότητα της καρφιλζομίμης (Cfz) ii) της καρδιοπροστατευτικής δράσης της μετοφομίνης (Met) η οποία έχει προταθεί ως πιθανή προφυλακτική θεραπεία iii) της πιθανής καρδιοπροστατευτικής δράσης της ατορβαστατίνης στον παρατηρούμενο φαινότυπο *in vivo*. **Μέθοδοι:** Αρσενικοί ApoE<sup>-/-</sup> μύες τυχαιοποιήθηκαν ως εξής: Οξύ πρωτόκολλο: ApoE<sup>-/-</sup> 5 μηνών: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz για 2 ημέρες Υπο-οξύ πρωτόκολλο: ApoE<sup>-/-</sup> 5 μηνών: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz για 6 ημέρες. Στη συνέχεια το υπο-οξύ πρωτόκολλο επαναλήφθηκε σε ApoE<sup>-/-</sup> πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε διατροφή δυτικού τύπου (HFD), ενώ επίσης ελέγχθηκε η καρδιοπροστατευτική δράση της μετοφομίνης παρουσία ή απουσία ατορβαστατίνης. Έτσι τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες: ApoE<sup>-/-</sup> HFD: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz 3. Cfz+Met για 6 ημέρες και ApoE<sup>-/-</sup> HFD+ατορβαστατίνη: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz 3. Cfz+Met για 6 ημέρες. Το Cfz (8 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά) στο πρωτόκολλο των δύο δόσεων χορηγήθηκε και τις δύο ημέρες, ενώ στα υπόλοιπα πρωτόκολλα χορηγήθηκε ανά 48 ώρες. Η Met (140 mg/kg, per os) χορηγήθηκε κάθε 24 ώρες. Η ατορβαστατίνη χορηγήθηκε στο νερό των μυών σε συγκέντρωση 20mg/kg/ημερησίως. Στη γραμμή βάσης και στο καταληκτικό σημείο των πειραμάτων, έγινε υπερηχογραφική αξιολόγηση, ενώ στη συνέχεια οι μύες θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος και καρδιακού ιστού. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των λιπιδίων στο πλάσμα, μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος τόσο στα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα του αίματος όσο και στο μυοκάρδιο, ενώ τμήμα του μυοκαρδίου υποβλήθηκε σε ανάλυση Western Blot. **Αποτελέσματα:** Η χορήγηση Cfz μείωσε την ενεργότητα του πρωτεασώματος καθώς και το κλάσμα συστολικής βράχυνσης (FS%) σε όλα τα πρωτόκολλα. Στα πρωτόκολλα της συγχορήγησης Cfz+Met παρατηρήθηκε επαναφορά του FS% στις τιμές των ομάδων ελέγχου. Στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών, η Cfz μείωσε τη φωσφορυλίωση της eNOS και του Raptor μετά από 2 δόσεις, ενώ μετά από 4 δόσεις μείωσε τη φωσφορυλίωση της Akt και ανέστειλε τον άξονα AMPKα/Raptor. Στους ApoE<sup>-/-</sup> υπό διατροφή HFD η Cfz ανέστειλε τον άξονα Akt/eNOS, ενώ η συγχορήγηση Cfz+Met οδήγησε σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της AMPKα και της έκφρασης της LC3B. Επιπρόσθετα, οι ApoE<sup>-/-</sup> εμφάνισαν διαταραγμένη λιπιδική ομοιόσταση, η οποία επιδεινώθηκε από τη χορήγηση HFD όπως υποδηλώνεται από τα αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η μετοφομίνη στην ομάδα της συγχορήγησης αύξησε τα επίπεδα HDL στο

πλάσμα. Τέλος, η ατορβαστατίνη βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ των πειραματόζων χωρίς να επιφέρει καρδιοπροστασία έναντι της Cfz-επαγόμενης καρδιοτοξικότητας. **Συμπεράσματα:** Η χορήγηση Cfz επάγει καρδιοτοξικότητα σε όλα τα ανωτέρω μοντέλα σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας. Η Met διατηρεί τη καρδιοπροστατευτική της δράση σε καταστάσεις υπερλιπιδαιμίας και υπερέχει της ατορβαστατίνης πιθανώς μέσω της μεταβολικής δράσης της επί του μυοκαρδίου.

## ABSTRACT

**Introduction:** Multiple myeloma is the most common hematological dyscrasia and is primarily manifested in the elderly patients who also suffer from cardiovascular comorbidities. Carfilzomib is used as a first-line treatment for relapsed/refractory multiple myeloma, but exhibits a significant cardiovascular toxicity. Taking under consideration that hyperlipidemia is a common comorbidity in patients treated with carfilzomib and stands as an independent risk factor for cardiovascular events manifestation, the aim of the present study was to investigate (i) the effect of hyperlipidemia-atherosclerosis in terms of carfilzomib-induced cardiotoxicity (ii) the cardioprotective effect of metformin (Met) which has been recently suggested as a potential prophylactic treatment act (iii) the potential cardioprotective effect of atorvastatin in the observed phenotype *in vivo*. **Methods:** Male ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomized as follows: **Acute protocol:** ApoE<sup>-/-</sup> 5 months of age: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz for 2 days. **Sub-acute protocol:** ApoE<sup>-/-</sup> 5 months of age: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz for 6 days. The sub-acute protocol was then repeated in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with Western diet (HFD), and the cardioprotective potential of metformin was evaluated in the presence or absence of atorvastatin. Thus, ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomized as follows: ApoE<sup>-/-</sup> HFD: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz 3. Cfz + Met for 6 days, ApoE<sup>-/-</sup> HFD + atorvastatin: 1. Control (N/S 0.9%) 2. Cfz 3. Cfz + Met for 6 days. Cfz (8 mg / kg, intraperitoneally) in the two-dose protocol was administered daily, while in the sub-acute setting Cfz was administered on alternate days. Met (140 mg / kg, per os) and atorvastatin (20mg/kg per os) were administered every 24 hours. At the baseline and at the end of the experiments, ultrasound evaluation was performed and mice were sacrificed for blood and heart tissue collection. Plasma lipids were determined, proteasome activity was measured in both polymorphonuclear cells of the blood (PBMCS) and myocardium, and a part of the myocardium was subjected to Western Blot analysis. **Results:** Cfz reduced proteasome activity as well as the fractional shortening (FS%) in all protocols. Cfz+Met co-administration led to a restoration of cardiac contractility. In ApoE<sup>-/-</sup> mice, Cfz decreased eNOS and Raptor phosphorylation after 2 doses, while 4 doses of Cfz reduced Akt phosphorylation and inhibited the AMPK $\alpha$  / Raptor axis. In ApoE<sup>-/-</sup> mice on HFD, Cfz inhibited the Akt/eNOS axis, while co-administration of Cfz + Met resulted in increased AMPK $\alpha$  phosphorylation and LC3B expression. In addition, ApoE<sup>-/-</sup> showed impaired lipid homeostasis, which was exacerbated by HFD as indicated by elevated levels of total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL). Metformin co-administration increased plasma HDL levels. Finally, atorvastatin improved the lipid profile of experimental animals without providing cardioprotection against Cfz-induced cardiotoxicity. **Conclusions:** Cfz administration induces cardiotoxicity in all the above models in compliance with our previous findings. Met retains its cardioprotective action despite hyperlipidemia and is superior to atorvastatin possibly through its metabolic action on the myocardium.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Πολλαπλό Μυέλωμα (Multiple Myeloma) .....	11
1.1.1 Κατάταξη ΠΜ .....	11
1.1.2 Διάγνωση ΠΜ <sup>11</sup> .....	12
1.1.3 Θεραπεία ΠΜ .....	13
1.2 Πρωτεάσωμα .....	14
1.2.1 Δομή και λειτουργία πρωτεασώματος.....	14
.....	15
1.2.2 Σύνδεση ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος .....	16
1.2.3. Το πρωτεάσωμα ως θεραπευτικός στόχος.....	17
1.3 Αναστολείς Πρωτεασώματος .....	17
1.3.1 Σύνδεση αναστολέων πρωτεασώματος με το πρωτεάσωμα.....	18
1.3.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεασώματος .....	19
1.4 Επαγόμενη καρδιοτοξικότητα από τον αναστολέα πρωτεασώματος Καρφιλζομίμη .....	21
1.5 Μηχανισμός καρδιοτοξικότητας καρφιλζομίμης και φαρμακευτική παρέμβαση με καρδιοπροστατευτική δράση .....	22
1.7 Αυτοφαγία .....	23
1.7.1 Φάσεις κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας .....	24
1.7.2 Μοριακή ρύθμιση της αυτοφαγίας .....	25
1.7.3 Ενεργειακή παροχή κυττάρου και αυτοφαγία .....	26
1.8 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο Πολλαπλό Μυέλωμα .....	27
1.9 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο μυοκάρδιο.....	27
1.10 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt/eNOS και αναστολείς πρωτεασώματος.....	27
1.11 Η παρουσία συννοσηροτήτων στο Πολλαπλό Μυέλωμα .....	28
1.12 Υπερλιπιδαιμία και Πολλαπλό Μυέλωμα.....	28
1.13 Εύρεση πειραματικού μοντέλου.....	29
1.13.1 Το πειραματικό μοντέλο μυών ApoE <sup>-/-</sup> .....	29
1.14 Μεταβολικό σύνδρομο και Αυτοφαγία .....	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.1 Φαρμακολογικοί παράγοντες .....	34
2.2 Επιλογή δόσεων .....	34
2.3 Ζωικό μοντέλο μυών .....	34

2.3.1 Μοντέλο Υπερλιπιδαιμίας.....	35
2.3.1.1 Οξύ Πρωτόκολλο 2 δόσεων .....	35
2.3.1.2 Υπο-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων .....	35
2.3.2 Μοντέλο Αθηρωμάτωσης-Δριμύς φαινότυπος .....	35
2.3.2.1 Διατροφή δυτικού τύπου –High Fat Diet (HFD) .....	35
2.3.2.2 Υπο-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων, ApoE <sup>-/-</sup> HFD .....	35
2.3.3 Φαρμακολογική παρέμβαση στο μοντέλο της αθηρωμάτωσης με δριμύ φαινότυπο-Ο ρόλος της ατορβαστατίνης .....	36
2.3.3.1 Υπό-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων, ApoE <sup>-/-</sup> HFD+Ατορβαστατίνη.....	36
2.4 Υπερηχοκαρδιογραφικές μετρήσεις.....	37
2.5 Συλλογή ιστών.....	38
2.6 Western Blot.....	39
2.6.1 Περιγραφή μεθόδου.....	39
2.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	39
2.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών .....	40
2.6.4 Ηλεκτροφόρηση .....	42
2.6.5 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα- Transportation.....	46
2.6.6 Blocking.....	47
2.6.7 Πρωτογενές Αντίσωμα .....	48
2.6.8 Δευτερογενές Αντίσωμα.....	48
2.6.9 Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο.....	48
2.6.10 Διαδικασία αποδέσμευσης μεμβρανών από παλιά αντισώματα-Stripping	49
2.7 Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης στο πλάσμα των πειραματόζωων.....	50
2.8 Προσδιορισμός Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνης (HDL) στα πλάσματα των πειραματόζωων .....	51
2.9 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων στο πλάσμα των πειραματόζωων.....	52
2.10 Προσδιορισμός της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) στο πλάσμα των πειραματόζωων .....	53
2.11 Απομόνωση μονοκυτταρικών κυττάρων περιφερικού αίματος.....	53
2.12 Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος.....	53
2.13 Μέτρηση γλυκόζης στο πλάσμα των πειραματόζωων .....	53
2.14 Στατιστική Ανάλυση .....	54
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	55

3.1	Η ενεργότητα του πρωτεασώματος των ApoE <sup>-/-</sup> μυών σε σύγκριση με μύες C57BL/6 δε μεταβάλλεται, ενώ η Cfz αναστέλλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στα πρωτόκολλα 2 και 4 δόσεων στους ApoE <sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών. ...	55
3.2	Το FS% δε μεταβάλλεται μεταξύ των ApoE <sup>-/-</sup> και C57BL/6 μυών, ενώ η Cfz μειώνει το FS% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για τα πρωτόκολλα των 2 και των 4 δόσεων.....	56
3.3	Οι ApoE <sup>-/-</sup> μύες έχουν αυξημένη την ολική και LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με φυσιολογικούς μύες C57BL/6, ενώ δε μεταβάλλονται τα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ αυτών των ομάδων.....	57
3.4	Αποτελέσματα από τις Western Blot στο πρωτόκολλο 2 δόσεων Cfz στους ApoE <sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών. ....	57
3.4.1	Η Cfz μειώνει την φωσφορυλίωση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφραση της eNOS μεταξύ των ομάδων.....	57
3.4.2	Η Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση του Raptor σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή του.....	58
3.4.3	Η φωσφορυλίωση και η έκφραση των AMPKα, Akt και Erk ½, δεν μεταβάλλονται με τη χορήγηση καρφιλζομίμπης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. ....	59
3.5	Αποτελέσματα Western Blot από το πρωτόκολλο των 4 δόσεων Cfz στους ApoE <sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών. ....	60
3.5.1	Η χορήγηση της Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση του Raptor σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή του. ....	60
3.5.2	Η Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση της Akt και της AMPKα, χωρίς να μεταβάλλεται η έκφρασή τους σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ....	60
3.5.3	Η χορήγηση της Cfz δε μεταβάλλει τη φωσφορυλίωση και την έκφραση της eNOS και των Erk1/2 στο πρωτόκολλο των 4 δόσεων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. ....	62
3.6	Η ενεργότητα του πρωτεασώματος δε μεταβάλλεται μεταξύ των μυών ApoE <sup>-/-</sup> +HFD σε σύγκριση με μύες C57BL/6, ενώ η διατροφή δυτικού τύπου οδηγεί σε μείωση του FS% στους ApoE <sup>-/-</sup> μύες. ....	63
3.6.1	Η χορήγηση της Cfz μειώνει το FS% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της συγχορήγησης με μετοφορμίνη και παράλληλα μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος. ....	64
3.7	Η ομάδα Cfz και η ομάδα Cfz+Met μειώνουν την ολική και LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα η συγχορήγηση με μετοφορμίνη αυξάνει την HDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα Cfz. ....	65
3.8	Αποτελέσματα Western blot από τους μύες ApoE <sup>-/-</sup> που έλαβαν HFD .....	66

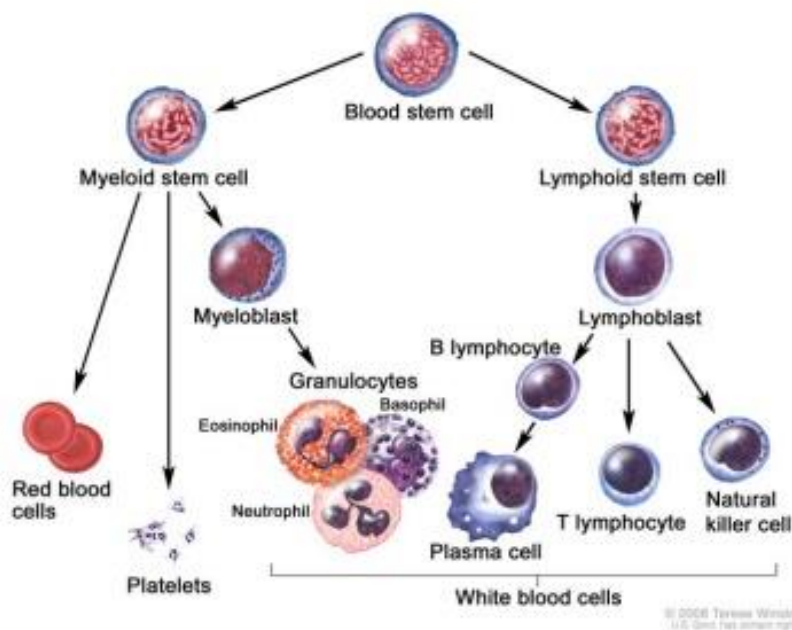


3.8.1 Η χορήγηση της Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση της Akt στις ομάδες Cfz και Cfz+Met σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μειώνει τη φωσφορυλίωση της eNOS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και δε μεταβάλλει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών.....	66
3.8.2 Η συγχορήγηση με μετοφορμίνη αυξάνει τη φωσφορυλίωση της AMPKα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της Cfz, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή της.....	67
3.8.3 Η φωσφορυλίωση και η έκφραση των πρωτεϊνών mTOR και Raptor δεν μεταβάλλονται σε καμία από τις ομάδες των πειραματόζωων.....	69
3.8.4 Η έκφραση της LC3B αυξάνεται στην ομάδα της συγχορήγησης Cfz με μετοφορμίνη σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και Cfz. ....	70
3.9 Η χορήγηση ατορβαστατίνης αυξάνει το ΔFS%, δε μεταβάλλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος σε σύγκριση με μύες ApoE <sup>-/-</sup> που έλαβαν HFD χωρίς ατορβαστατίνη και μειώνει την ολική και LDL χοληστερόλη. ....	71
3.10 Η χορήγηση της Cfz μειώνει το ΔFS% σε σύγκριση με τις ομάδες Control και Cfz+Met και μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στις ομάδες Cfz και Cfz+Met σε σύγκριση με το Control. Η ολική χοληστερόλη και η HDL αυξήθηκαν σε όλες τις ομάδες, ενώ η LDL αυξήθηκε μόνο στην ομάδα του Control.....	72
3.11 Western Blot αποτελέσματα στους ApoE <sup>-/-</sup> μύες που έλαβαν ατορβαστατίνη και HFD.....	74
3.11.1 Η φωσφορυλίωση του mTOR και η έκφραση της LC3B μειώνεται στις ομάδες Cfz και συγχορήγησης με μετοφορμίνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ....	74
3.11.2 Η έκφραση και η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt και eNOS δεν μεταβάλλονται στους μύες που έλαβαν HFD μαζί με ατορβαστατίνη.....	75
3.11.3 Η φωσφορυλίωση και η έκφραση της AMPKα και του Raptor δε μεταβάλλονται στους μύες που έλαβαν HFD μαζί με ατορβαστατίνη.....	76
3.12 Το βάρος των ApoE <sup>-/-</sup> HFD δε μεταβάλλεται ανάλογα με την χορήγηση ή μη της ατορβαστατίνης.....	78
.....	79
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	80
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	84

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μυελός των οστών είναι υπεύθυνος για την παραγωγή και την ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων του οργανισμού. Τα κύτταρα του αίματος στην παιδική ηλικία παράγονται στο μυελό των οστών. Κατά την ενηλικίωση όμως τα οστά που διατηρούν την ικανότητα παραγωγής αιμοποιητικών κυττάρων είναι τα οστά του θώρακα, η βάση του κρανίου και τα άνω τμήματα των άκρων. Όλοι οι τύποι των κυττάρων του αίματος προέρχονται από τα πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά όταν διαιρούνται είτε παραμένουν στην ίδια κατάσταση είτε λαμβάνουν κάποια διαφοροποίηση. Η πρώτη πιθανή διαφοροποίηση οδηγεί στα λεμφικά αρχέγονα κύτταρα, από τα οποία προέρχονται οι λεμφοβλάστες. Οι λεμφοβλάστες διαχωρίζονται στη συνέχεια σε Β λεμφοκύτταρα, σε Τ λεμφοκύτταρα και σε φυσικά φονικά κύτταρα. Η δεύτερη πιθανή διαφοροποίηση οδηγεί στα μυελοειδή αρχέγονα (προγονικά) κύτταρα που αποτελούν του προγόνους όλων των άλλων ειδών κυττάρων του αίματος (ερυθροκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και αιμοπετάλια).

Τα πλασματοκύτταρα προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών κατά τη διάρκεια αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλο που η ονομασία που τους έχει δοθεί μπορεί να παραπλανήσει για τη θέση τους, τα πλασματοκύτταρα βρίσκονται συνήθως στους ιστούς όπου έλαβε χώρα η διαφοροποίησή τους από τα Β λεμφοκύτταρα. Η σημαντικότερη λειτουργία τους είναι η σύνθεση αλλά και η έκκριση αντισωμάτων στη γενική κυκλοφορία. **(Εικόνα 1)**



**Εικόνα 1:** Τα κύτταρα του αίματος και τα πρόδρομα του κύτταρα (3)

Οι νεοπλασίες στα κύτταρα του αίματος προκαλούνται από μη φυσιολογικά πλασματοκύτταρα που σχηματίζουν όγκους στα οστά. Αυτά τα πλασματοκύτταρα παράγουν επίσης διάφορα κλάσματα ανοσοσφαιρινών που είναι ανενεργά. Αυτού του τύπου τα κλάσματα αναφέρονται συχνά ως Μ πρωτεΐνη, η οποία στερείται βιολογικής

δράσης και χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης, καθώς ανιχνεύεται στο πλάσμα και στα ούρα.<sup>1 2 3 4</sup>

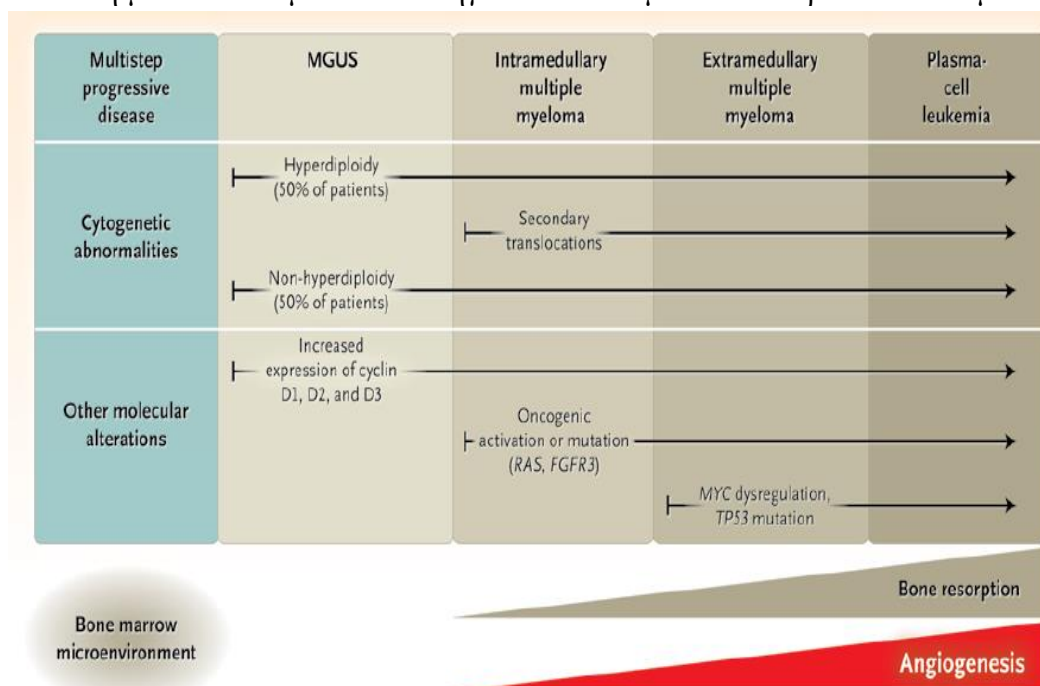
## 1.1 Πολλαπλό Μυέλωμα (Multiple Myeloma)

Το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί μια μη θεραπεύσιμη ασθένεια των πλασματοκυττάρων. Είναι ο δεύτερος πιο κοινός αιματολογικός καρκίνος και ευθύνεται για το 20% των θανάτων από αιματολογικούς καρκίνους και το 2% των θανάτων από όλους τους καρκίνους. Η πιο συνηθής ηλικία για διάγνωση είναι τα 65 έτη και η πενταετής επιβίωση έχει ποσοστό 46,6%.<sup>5</sup> Το 37% των ασθενών είναι κάτω των 65 ετών, 26% είναι μεταξύ των 65 και 74 ετών και το 37% άνω των 75 ετών. Για τους ασθενείς κάτω των 60 ετών η δεκαετής επιβίωση έχει ποσοστό 30%.<sup>6</sup>

Στο ΠΜ οι μη φυσιολογικές ανοσοσφαιρίνες συγκεντρώνονται στο μυελό των οστών καθώς και η αλληλεπίδραση των μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων με άλλα κύτταρα του μυελού των οστών οδηγούν στο σχηματισμό όγκων σε πολλά οστά ταυτόχρονα, αναιμία, φλεγμονές και πόνο. Όσο περισσότερο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων του ΠΜ τόσο λιγότερα συστατικά του αίματος παράγονται με συνέπεια τη βλάβη και την αδυναμία των οστών. Αυτή η καταστροφή των οστών προκαλεί υπερασβεστιαϊμία που με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε άλλα όργανα όπως είναι οι νεφροί.<sup>3,7</sup>

### 1.1.1 Κατάταξη ΠΜ

Το μυέλωμα εμφανίζεται αρχικά με έναν ασυμπτωματικό προκαρκινικό πολλαπλασιασμό ενός κλώνου των πλασματοκυττάρων. Στη συνέχεια, πολλές διαδοχικές αλλαγές σε γενετικό επίπεδο και στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων οδηγεί τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό χωρίς να υπόκεινται σε απόπτωση με αποτέλεσμα να καταλήγουν νεοπλασματικά. Θεωρείται ότι το μυέλωμα



Εικόνα 2: Τα στάδια της παθογένεσης του πολλαπλού μυελώματος.(6)

εξελίσσεται από τη μονοκλωνική γαμμοπάθεια αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined clinical significance-MGUS). Στο 3-4 % του πληθυσμού άνω των 50 ετών παρατηρείται MGUS. Εάν και μόνο το 10% των ασθενών που πάσχουν από ΠΜ είχαν βρεθεί με MGUS, λόγω της απουσίας συμπτωμάτων, εικάζεται ότι πάντα προηγείται του ΠΜ. Η MGUS εξελίσσεται σε έρπον μυέλωμα (smoldering multiple myeloma) και βρίσκεται ένα στάδιο πριν το συμπτωματικό μυέλωμα.<sup>6,8,9</sup>

Το συμπτωματικό πλέον ΠΜ διακρίνεται σε τρία στάδια ανάλογα τη συγκέντρωση της βήτα-2-μικρογλοβουλίνης (β2Μ) και αλβουμίνης στο αίμα σύμφωνα με τον πίνακα 1:

Παγκόσμιο σύστημα κατάταξης πολλαπλού μυελώματος	
Στάδιο I	β2Μ ορού < 3,5 mg/mL και αλβουμίνη ορού ≥ 3,5 g/dL
Στάδιο II (α)	β2Μ ορού < 3,5 mg/mL και αλβουμίνη ορού ≤ 3,5 g/dL
Στάδιο II (β)	β2Μ ορού 3,5-5.5 mg/mL ανεξάρτητα από την αλβουμίνη του ορού
Στάδιο III	β2Μ ορού ≥ 5,5 mg/mL

**Πίνακας 1 :** Τροποποίηση σχήματος<sup>10</sup>. Κατάταξη σταδίων του πολλαπλού μυελώματος ανάλογα τις τιμές βήτα-2-μικρογλοβουλίνης (β2Μ) και αλβουμίνης στο αίμα.

### 1.1.2 Διάγνωση ΠΜ<sup>11</sup>

Το 2014 η διεθνής ομάδα εργασίας για το μυέλωμα (International Myeloma Working Group (IMWG)) καθιέρωσε τα κριτήρια για τη διάγνωση του συμπτωματικού πολλαπλού μυελώματος. Η διάγνωση περιλαμβάνει την εύρεση μεταλλαγμένου κλώνου σε πάνω από 10% των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και είτε την εύρεση βλάβης σε όργανα στόχους βάσει των κριτηρίων **CRAB**:

- Υπερασβεστιαμία (HyperCalcaemia): ασβέστιο ορού > 0,25 mmol/L υψηλότερο από το ανώτατο φυσιολογικό όριο ή > 2,75 mmol/L.
- Νεφρική ανεπάρκεια (Renal insufficiency): ρυθμός κάθαρσης κρεατινίνης < 40 mL/min ή κρεατινίνη ορού > 177 μmol/L.
- Αναιμία (Anaemia): τιμή αιμοσφαιρίνης > 20 g / L κάτω από το κατώτερο όριο της φυσιολογικής τιμής ή τιμή αιμοσφαιρίνης < 100 g / L.
- Οστικές βλάβες (Bone lesions) : μία ή περισσότερες οστεολυτικές βλάβες επιβεβαιωμένες μέσω ακτινογραφίας, αξονικής τομογραφίας (CT) ή τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET-CT).

είτε κάποιον από τους παρακάτω βιοδείκτες κακοηθειών:

- ≥ 60% κλωνικά μυελικά πλασματοκύτταρα
- Εμπλεκόμενη ή μη ελεύθερη στο πλάσμα ελαφριά αλυσίδα σε αναλογία ≥ 100

- Πάνω από μία εστιακή βλάβη σε απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού.

### 1.1.3 Θεραπεία ΠΜ

Στην Ευρώπη η θεραπευτική προσέγγιση που προτιμάται για τους ασθενείς κάτω των 65 ετών, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν άλλες συννοσηρότητες, είναι η αυτόλογη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων (Autologous stem cell transplant-ASCT). Για τους ασθενείς άνω των 65 ετών χρησιμοποιούνται ποικίλες συμβατικές χημειοθεραπείες. Παρόλα αυτά το πολλαπλό μυέλωμα ανεξαρτήτως της θεραπευτικής επιλογής που θα ακολουθηθεί, θα εξελιχθεί, θα υποτροπιάσει και θα αναπτύξει αντοχή στις υπάρχουσες θεραπείες και στα θεραπευτικά σχήματα.

Οι πιο χαρακτηριστικές θεραπευτικές κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στο ΠΜ είναι οι εξής:

- **Ανοσορυθμιστικά φάρμακα** όπως είναι η θαλιδομίδη, η λεναλιδομίδη (δεύτερης γενιάς) και η πομαλιδομίδη (τρίτης γενιάς).
- **Αναστολείς πρωτεασώματος:** Αυτή η κατηγορία φαρμάκων έχουν στόχο το πρωτεάσωμα και έχουν αυξημένη δράση έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων. Η Βορτεζομίμη (Bortezomib-Btz) είναι πρώτης γενιάς ενώ η καρφιλζομίμη (Carfilzomib-Cfz) και η ιξαζομίμη (Ixazomib) είναι δεύτερης γενιάς. Ταυτόχρονα μελετούνται και άλλοι αναστολείς πρωτεασώματος όπως είναι οι Oprozomib και Marizomib.
- **Αναστολείς αποακετυλάσης ιστονών:** Οι αποακετυλάσες είναι ένζυμα που ρυθμίζουν την λειτουργία των πρωτεϊνών μέσω μετα-μεταγραφικών αλλαγών και έχουν σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η έκφραση των γονιδίων και η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η Πανομπινοστάτη και η Μπενδαμουστίνη.
- **Μονοκλωνικά αντισώματα:** Σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων ανήκουν η Ελοτουζομάμη (Anti-CS1), η Νταρατουμουμάμη (Anti-CD38) και το SAR650984.<sup>12</sup>

Θεραπεία για το μη συμπτωματικό μυέλωμα δεν ενδείκνυται ενώ για το έρπον μυέλωμα με μεγάλο ρίσκο εξέλιξης σε πολλαπλό μυέλωμα, ενθαρρύνεται η έναρξή της. Τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για το ΠΜ χωρίζονται σε πρώτης γραμμής και σε σχήματα για την αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος και ανθεκτικού μυελώματος όπως φαίνεται στον πίνακα 2.<sup>10</sup>

Τα κυριότερα θεραπευτικά σχήματα στο πολλαπλό μυέλωμα	
Πρώτης Γραμμής	Υποτροπιάζον και ανθεκτικό μυέλωμα
Bortezomib/melphalan/prednisone (VMP)	Carfilzomib/lenalidomide/dexamethasone(KRd)
Lenalidomide/low-dose dexamethasone (Rd)	Bortezomib/dexamethasone/panobinostat (VD-Pano)
Melphalan/prednisone/thalidomide (MPT)	Carfilzomib/dexamethasone (Kd)
Bortezomib/cyclophosphamide/dexamethasone (VCD)	Lenalidomide/dexamethasone/elotuzumab (Rd-Elo)
Bortezomib/thalidomide/dexamethasone (VTD)	Lenalidomide/dexamethasone/ixazomib (IRd)
Bortezomib/lenalidomide/dexamethasone (VRd)	Bortezomib/dexamethasone/daratumumab(DVd)
	Lenalidomide/dexamethasone/daratumumab(DRd)

**Πίνακας 2:** Τροποποίηση σχήματος<sup>10</sup>. Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που προτείνονται ανάλογα την εξέλιξη της νόσου του πολλαπλού μυελώματος.

Παρατηρώντας τον Πίνακα 2, γίνεται αντιληπτή η θεραπευτική σημασία των αναστολέων πρωτεασώματος τόσο στη θεραπευτική προσέγγιση πρώτης γραμμής όσο και στο υποτροπιάζον και ανθεκτικό μυέλωμα.

## 1.2 Πρωτεάσωμα

Το 26S πρωτεάσωμα, που συχνά αναφέρεται απλώς πρωτεάσωμα, είναι ένα ένζυμο με έντονη καταλυτική δραστηριότητα τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Κύρια λειτουργία του είναι η αποικοδόμηση πρωτεϊνών όλων των κατηγοριών όπως είναι σηματοδοτικά μόρια, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, μεταγραφικοί παράγοντες κ.ά με σκοπό τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού<sup>4</sup> αφού εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως είναι η απόπτωση, η κυτταρική επιβίωση, η επιδιόρθωση του DNA κ.ά.<sup>13</sup>

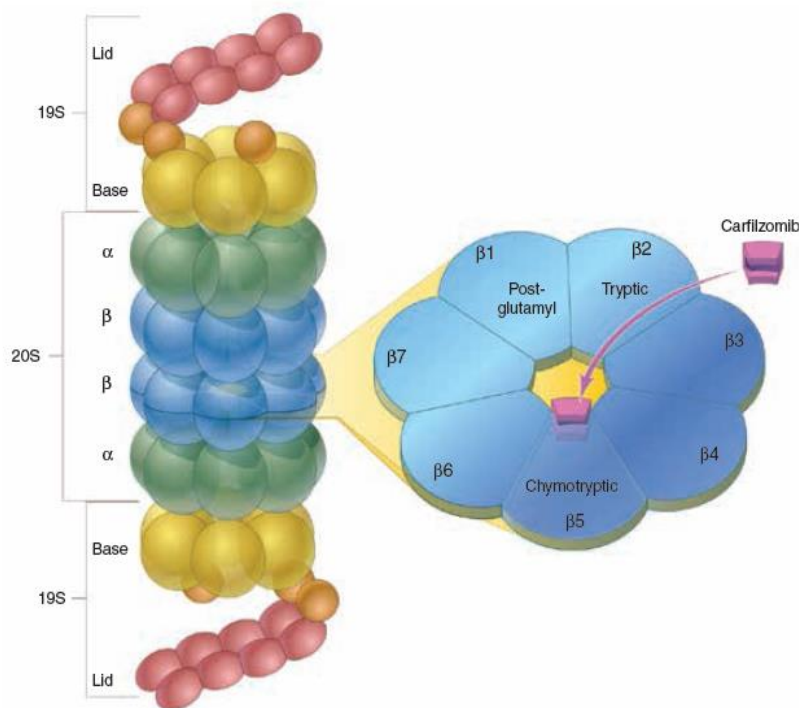
### 1.2.1 Δομή και λειτουργία πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που αποτελείται από τον 20S πυρήνα και από δύο 19S ρυθμιστικές περιοχές-σύμπλοκα.<sup>4,14</sup> Κάθε 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο απαρτίζεται από 20 υπομονάδες. Κύρια συστατικά του 19S συμπλόκου είναι έξι ATPάσες. Η υδρόλυση του ATP δίνει τη δυνατότητα στο σύμπλοκο 19S να μετουσιώσει την πρωτεΐνη-υπόστρωμα και να προκαλέσει τις κατάλληλες αλλαγές

στη στερεοδιάταξη της εισόδου του 20S πυρήνα για να εισέλθει το υπόστρωμα στο κέντρο του και να αποικοδομηθεί. Όπως προαναφέρθηκε, δύο τέτοια σύμπλοκα πλαισιώνουν τον 20S πυρήνα, ένα σε κάθε άκρο, και σχηματίζουν το 26S πρωτεάσωμα. Συνοπτικά οι λειτουργίες των 19S ρυθμιστικών περιοχών είναι οι εξής:

- Δεσμεύουν μόνο τις ουβικουιτυλιωμένες πρωτεΐνες εξασφαλίζοντας την εκλεκτική αποικοδόμησή τους.
- Μια ισοπεπτιδάση στην 19S περιοχή απομακρύνει άθικτα τα μόρια της ουβικουιτίνης από τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.
- Η επεξεργασμένη πρωτεΐνη οδηγείται στον καταλυτικό πυρήνα.

Ο 20S πυρήνας είναι ένα σύμπλοκο με πρωτεολυτική δράση. Αποτελείται από 14 αντίγραφα κάθε μίας από δύο ομόλογες υπομονάδες α και β που σχηματίζουν τέσσερις δακτύλιους των 7 υπομονάδων ο καθένας, οι οποίοι επιστοιβάζονται ο ένας πάνω στον άλλον και σχηματίζουν μια δομή σε σχήμα βαρελιού. Οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι ονομάζονται άλφα (α) και δύο εσωτερικοί βήτα (β). Οι α δακτύλιοι ενώνονται με τις 19S ρυθμιστικές περιοχές και έτσι σφραγίζεται ο 20S πυρήνας. Κάθε β δακτύλιος έχει τρεις καταλυτικές περιοχές με πρωτεολυτική δραστηριότητα, που κάθε μία παρουσιάζει εκλεκτικότητα για διαφορετικά υποστρώματα. Τα ενεργά αυτά κέντρα είναι οι θέσεις chymotrypsin-like, trypsin-like και post-glutamyl peptide hydrolase-like (PGPH) ή αλλιώς caspase-like, που βρίσκονται στις υπομονάδες β5, β2 και β1 αντίστοιχα. **(Εικόνα 3)**

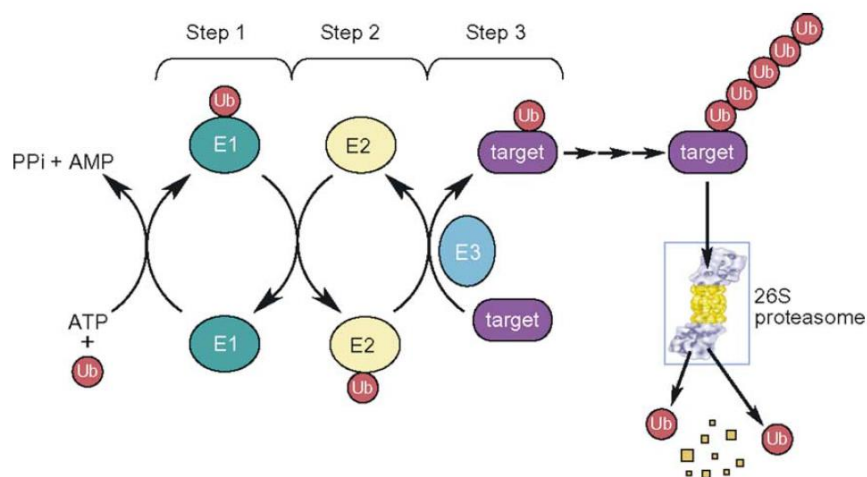


**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση των δομών του 26S πρωτεασώματος και η θέση πρόσδεσης της Cfz (11)



## 1.2.2 Σύνδεση ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από τις 19S ρυθμιστικές περιοχές του πρωτεασώματος από τα πολυμερή ουβικουιτίνης που έχουν προσκολληθεί πάνω τους.<sup>4,15,16</sup> Η διαδικασία της προσκόλλησης πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας αλληλουχίας ενζύμων που ονομάζονται E1 (ένζυμο που ενεργοποιεί την ουβικουιτίνη), E2 (ένζυμο σύζευξης με την ουβικουιτίνη) και E3 (ουβικουιτίνη-πρωτεΐνη λιγάση). Αυτά ενεργοποιούν την ελεύθερη ουβικουιτίνη και τη μεταφέρουν στην πρωτεΐνη στόχο. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο E1 συνδέεται με μια σουλφυδρυλομάδα με την ουβικουιτίνη με θειοεστερικό δεσμό, μια διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ATP, την ενεργοποιεί και μεταφέρει την ουβικουιτίνη στο ένζυμο E2. Το E2 δρα καταλυτικά και απελευθερώνει την ενεργοποιημένη ουβικουιτίνη από το E1 και προσδένεται με αυτή με μια δική του σουλφυδρυλομάδα. Τέλος, το ένζυμο E3 καταλύει τη μεταφορά της ουβικουιτίνης στην πρωτεΐνη στόχο, αφού αλληλεπιδρώντας πρώτα με το E2, προσδένεται ομοιοπολικά με την ουβικουιτίνη. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια πολυουβικουιτινυλιωμένη αλυσίδα πάνω στην πρωτεΐνη στόχο και λειτουργεί ως το διακριτό σήμα για την αναγνώριση και την καταστροφή της από το πρωτεάσωμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο αριθμός των E3 ενζύμων είναι σημαντικά μεγαλύτερος των άλλων δύο και αυτό επιτρέπει την υψηλά εκλεκτική αλληλεπίδραση του ενζύμου με την πρωτεΐνη στόχο-υπόστρωμα. (Εικόνα 4)



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των ενζύμων E1, E2, E3 που συμμετέχουν στην ουβικουιτινυλίωση. (4)



### 1.2.3. Το πρωτεάσωμα ως θεραπευτικός στόχος

Εξαιτίας της αναγκαίας εύρυθμης λειτουργίας του πρωτεασώματος για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και κατ' επέκταση όλου του οργανισμού, το πρωτεάσωμα έχει μελετηθεί για πολλές ασθένειες ως θεραπευτικός στόχος. Μερικές από αυτές είναι ο καρκίνος, στον οποίο θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην παρούσα εργασία, ασθένειες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα όπως είναι η απόρριψη μοσχεύματος από τον ξενιστή, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως για παράδειγμα οι νόσοι Parkinson και Alzheimer.<sup>17</sup>

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν πιο ανεπτυγμένο το μονοπάτι του πρωτεασώματος σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να συνθέτουν, να μετακινούν και να τροποποιούν πρωτεΐνες εξαιτίας του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους. Για να διαχειριστούν το stress το οποίο προκύπτει από τη συνεχή παραγωγή και τροποποίηση πρωτεϊνών, τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από το μονοπάτι αποικοδόμησης του πρωτεασώματος. Στα καρκινικά κύτταρα πολλαπλού μυελώματος οι πρωτεΐνες, οι οποίες δεν έχουν λάβει τη σωστή τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή (unfolded), οδηγούνται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου-σχετιζόμενο με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation system-ERAD), στο οποίο οδηγούνται και οι πρωτεΐνες μη σωστής δομής (misfolded), οι οποίες καθώς εξέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, συζεύγνυνται με την ουβικουιτίνη και οδηγούνται για πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η αναστολή του πρωτεασώματος θα αυξήσει το ενδοκυττάριο stress και ενδέχεται να οδηγήσει τα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος σε απόπτωση.<sup>18</sup>

### 1.3 Αναστολείς Πρωτεασώματος

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι και καλύτερα μελετημένοι αναστολείς πρωτεασώματος είναι αυτοί που στοχεύουν στον 20S πυρήνα<sup>16</sup> χωρίς αυτό να αποκλείει τη συνεχή αναζήτηση για νέους θεραπευτικούς στόχους όπως είναι η αναστολή των αποουβικουιτινινασών, ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα στη σύζευξη της αλυσίδας της ουβικουιτίνης στο πρωτεάσωμα.<sup>19</sup>

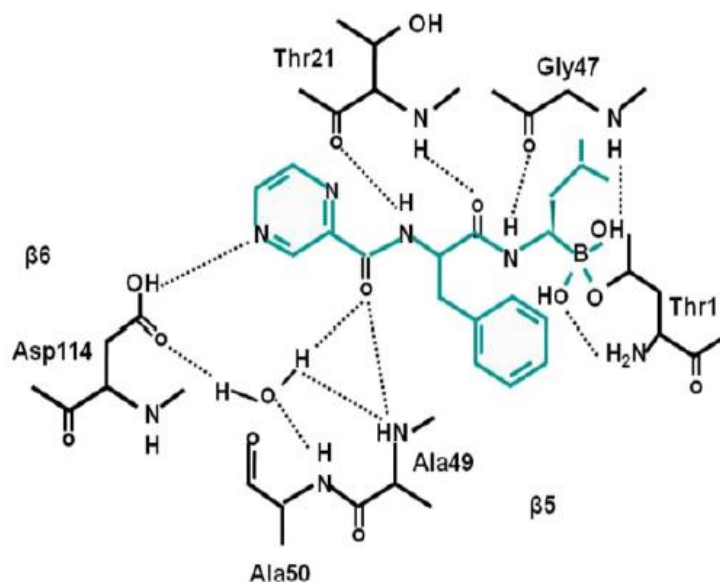
Οι αναστολείς πρωτεασώματος που αναστέλλουν τον 20S πυρήνα του πρωτεασώματος χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα συνθετικά και τα φυσικά ανάλογα μόρια. Τα συνθετικά μόρια βασίζονται σε δομές πεπτιδίων ενωμένες με μια ποικιλία φαρμακοφόρων και τα φυσικά μόρια σε γραμμικά πεπτίδια παραγόμενα από μικροοργανισμούς.<sup>16</sup> Πιο εκτεταμένη αναφορά θα γίνει στα συνθετικά μόρια μιας κι αυτά χρησιμοποιούνται ή μελετούνται για τη θεραπευτική.

Το πρώτο φαρμακευτικό μόριο το οποίο πήρε έγκριση το 2003 από τον FDA είναι η βορτεζομίμη, το οποίο είναι ανάλογο του βορονικού οξέος και αποτελεί έναν

αντιστρεπτό αναστολέα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στη β5 υπομονάδα του β δακτυλίου του 20S πυρήνα σε σχέση με τις β1 και β2 υπομονάδες. Χορηγείται ενδοφλεβίως ή υποδοριώς. Στη συνέχεια, εγκρίθηκε το 2012 ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας η καρφιζομίμη που είναι ανάλογο μόριο της εποξυκετόνης, χορηγείται ενδοφλεβίως, έχει ως εκλεκτικό στόχο τη β5 υπομονάδα και ακολουθούν οι β1/β2 υπομονάδες. Το τελευταίο φάρμακο το οποίο έχει πάρει έγκριση το 2015 είναι η ιξαζομίμη (ixazomib-Ixz), ένας αντιστρεπτός αναστολέας παράγωγο του βορονικού οξέος, με στόχο τη β5 υπομονάδα και εν συνεχεία τη β1 με τη σημαντική διαφορά ότι η λήψη του γίνεται από το στόμα. Τέλος, η οπροζομίμη (oprizomib) ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας ανάλογο εποξυ-κετόνης, με εκλεκτικότητα στη β5 υπομονάδα και από του στόματος λήψη και η μαριζομίμη (marizomib) ανάλογο β-λακτόνης, μη αναστρέψιμος αναστολέας με σειρά εκλεκτικότητας β5>β2>β1 και ενδοφλέβια χορήγηση, είναι δύο νέα φάρμακα που βρίσκονται σε αρχικά στάδια κλινικών μελετών.<sup>13</sup>

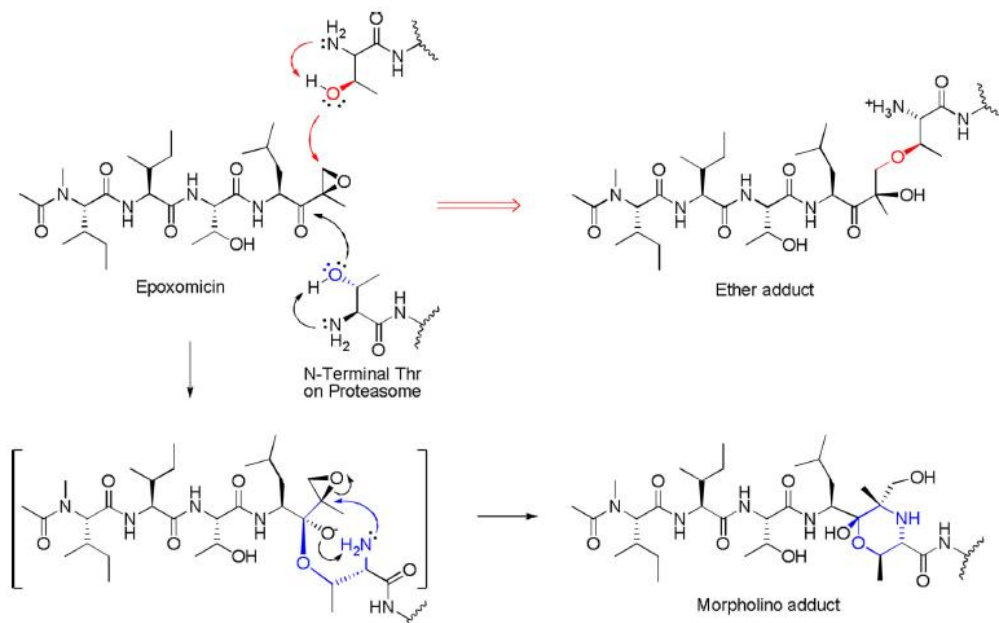
### 1.3.1 Σύνδεση αναστολέων πρωτεασώματος με το πρωτεάσωμα

Οι αναστολείς πρωτεασώματος Btz και Ixz, όπως προαναφέρθηκε, είναι παράγωγα βορονικού οξέος και συνδέονται αντιστρεπτά κυρίως με την υπομονάδα β5. Αυτό συμβαίνει με το σχηματισμό ενός τετραεδρικού συμπλόκου με το αμινοτελικό άκρο της Thr1, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά για το Btz στην **εικόνα 5**<sup>20</sup>.



**Εικόνα 5:** Μοντέλο αλληλεπίδρασης της βορτεζομίμης με το ενεργό κέντρο της β5 υπομονάδας του 20S κυλίνδρου του 26S πρωτεασώματος<sup>20</sup>.

Η καρφιλζομίμη, ως παράγωγο εποξυκετόνης ακολουθεί το μηχανισμό σύνδεσης που παρουσιάζεται στην **εικόνα 6**, δημιουργώντας ένα μη αναστρέψιμο μορφολινικό δακτυλίου μεταξύ της θρεονίνης 1 του 20S πρωτεασώματος και του φαρμακοφόρου τμήματος ως α,β επόξυ κετόνης. Θεωρείται ότι μόνο οι πρωτεάσες που έχουν ένα πυρηνόφιλο στο αμινοτελικό τους άκρο όπως είναι η β5 υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος μπορούν να σχηματίσουν έναν μορφολινικό δακτύλιο από τις εποξυκετόνες, καθιστώντας τα παράγωγα εποξυκετόνης εκλεκτικά για το πρωτεάσωμα.<sup>21</sup>



**Εικόνα 6:** Μηχανισμός σύνδεσης παραγώγων εποξυκετόνης με τη β5 υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος.<sup>21</sup>

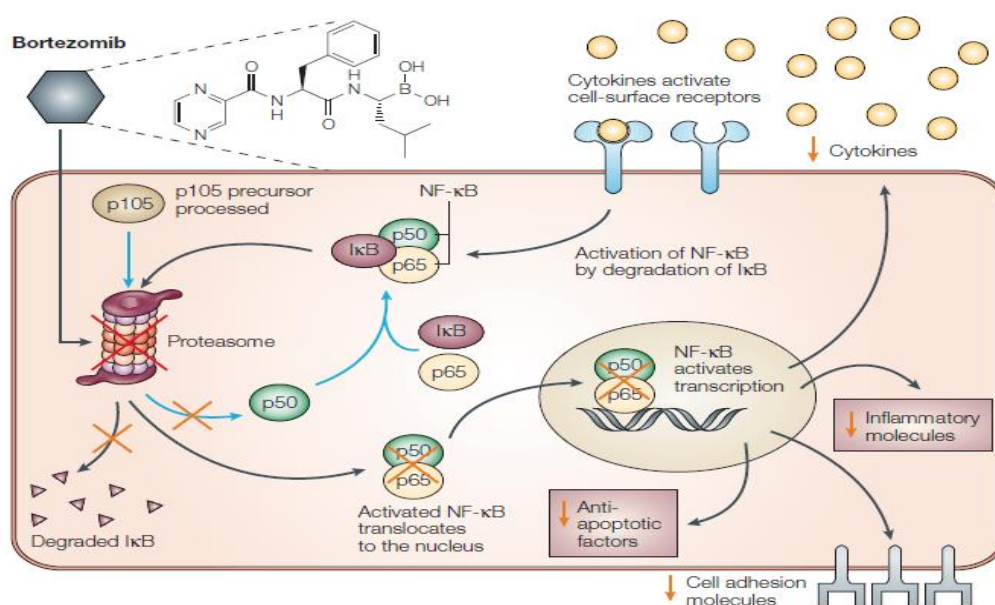
### 1.3.2 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεασώματος

Οι πρωτεΐνες που δεν έχουν λάβει τη σωστή τριτοταγή ή/και τεταρτοταγή δομή και οι φυσιολογικές πρωτεΐνες για να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα συσσωρεύονται πρώτα στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Πιο αναλυτικά, οι νέες πρωτεΐνες που εκκρίνονται στο κύτταρο όπως είναι οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες κλπ, μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να αναδιπλωθούν και να τροποποιηθούν ώστε να γίνουν λειτουργικές. Όταν η αναδίπλωση δεν εκτελείται ορθά, η πρωτεΐνη καθίσταται ελαττωματική και τότε απομακρύνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και οδηγείται στο κυτοσόλιο από το σύστημα ERAD ώστε να αποικοδομηθεί από το πρωτεάσωμα με την συμβολή των ενζύμων E1, E2 και E3 με τη διαδικασία που έχει προαναφερθεί. Επομένως, όταν το πρωτεάσωμα θα ανασταλεί, η ανακύκλωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων από τις λανθασμένα αναδιπλούμενες πρωτεΐνες ελαττώνεται και προκαλείται συσσώρευση ελαττωματικών

πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παρόλο που τα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος έχουν πολύ καλά ανεπτυγμένο το ενδοπλασματικό τους δίκτυο, εξαιτίας του ταχύτερου πολλαπλασιασμού τους σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα και συνεπώς τις αυξημένες ανάγκες στην παραγωγή πρωτεϊνών, η αναστολή του πρωτεασώματος προκαλεί stress στο ενδοπλασματικό τους δίκτυο σε τέτοιο βαθμό που δεν καταφέρνουν να το διαχειριστούν και να προσαρμοστούν. Τελικώς, το υπερβολικό stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τη συσσώρευση των μη σωστά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών προάγει την απόπτωση μέσω, της αύξησης του προαποπτωτικού παράγοντα C/EBP-ομόλογης πρωτεΐνης (CHOP), της ενεργοποίησης δύο καταρρακτωδών αντιδράσεων από τις κασπάσες 4 και 12 καθώς και της φωσφορυλίωσης του αμινοτελικού άκρου των c-Jun πρωτεϊνικών κινασών που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την απόπτωση των κυττάρων πολλαπλού μυελώματος που εξαρτάται από τις κασπάσες.

Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου. Συνεπώς με την αναστολή του πρωτεασώματος παρατηρείται υπερπαραγωγή ελευθέρων μορφών οξυγόνου στο ενδοπλασματικό δίκτυο που έχει ως αποτέλεσμα το αυξημένο οξειδωτικό stress στα κύτταρα.<sup>18</sup>

Στον μηχανισμό δράσης της Btz φαίνεται να προστίθεται και η αναστολή της ενεργοποίησης του ενδοπυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος ευθύνεται για την παραγωγή μορίων που επάγουν τη φλεγμονή στα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος αλλά και για την ανθεκτικότητα αυτών στην απόπτωση λόγω της μεταγραφής αντιαποπτωτικών γονιδίων (**Εικόνα 7**).



**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης του Btz (17)

Το πρωτεάσωμα είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ με δύο τρόπους. Στα φυσιολογικά κύτταρα ο παράγοντας NF-κΒ υφίσταται σαν ένα διμερές

των υπομονάδων p50 και RelA(p65), οι οποίες είναι δεσμευμένες με την παρεμποδιστική πρωτεΐνη IκB και διατηρεί τον παράγοντα σε ανενεργή μορφή μέσα στο κυτοσόλιο. Το πρωτεάσωμα καταλύει την παραγωγή της υπομονάδας p50 από την ανενεργή προμορφή του, p105, και καταστρέφει την πρωτεΐνη IκB. Ο ενεργοποιημένος πλέον παράγοντας NF-κB εισέρχεται τον πυρήνα και μεταγράφει πολλά γονίδια μεταξύ των οποίων είναι αυτά της επιβίωσης των κυττάρων και του πολλαπλασιασμού. Επομένως, με την αναστολή του πρωτεασώματος από το Btz οδηγούμαστε στη μη ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB, δηλαδή μειώνονται αντι-αποπτωτικοί παράγοντες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που βοηθούν στην προσκόλληση των κυττάρων στο μυελό των οστών και μείωση κυτταροκινών που προάγουν την ανάπτυξη των καρκινικών πλασμοκυττάρων.<sup>22</sup>

Ο μηχανισμός δράσης της καρφιλζομίμπης (γνωστό και ως PR-171) είναι παρόμοιος με αυτόν της Btz με τη διαφορά ότι αποτελεί ένα μη αναστρέψιμο αναστολέα.<sup>23</sup> Απόπτωση προκαλείται στα κύτταρα του μυελού των οστών και με το Ixz, πιθανώς με τους ανωτέρω μηχανισμούς δράσης.<sup>24</sup>

#### 1.4 Επαγόμενη καρδιοτοξικότητα από τον αναστολέα πρωτεασώματος Καρφιλζομίμπη

Η χρήση του μη αναστρέψιμου αναστολέα, καρφιλζομίμπη, έχει καθιερωθεί στην κλινική πράξη ιδίως για το υποτροπιάζον και ανθεκτικό μυέλωμα, αλλά τα καρδιαγγειακά προβλήματα που προκαλεί έχουν παρουσιασθεί εκτεταμένα σε πλήθος μελετών. Υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποδεικνύουν την καρδιοτοξικότητα της καρφιλζομίμπης.<sup>25-29</sup> Για παράδειγμα, σε μια μετα-ανάλυση τεσσάρων κλινικών μελετών φάσης II που συμπεριελάμβανε 526 ασθενείς, από τους οποίους είχαν αποκλειστεί οι ασθενείς κατά NYHA (New York Heart Association) κλάσης 3 και κλάσης 4, έδειξε ότι το 7% των ασθενών υπέστη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και παρατηρήθηκαν 8 θάνατοι καρδιολογικής αιτίας που πιθανόν να σχετίζονται με τη θεραπεία.<sup>30</sup> Επομένως, η περαιτέρω έρευνα και σύγκριση των μηχανισμών καρδιοτοξικότητας τους κρίνεται αναγκαία.

Σ' αυτήν την κατεύθυνση συνέβαλε η συγκριτική μελέτη ENDEAVOR, που αποτελεί μια ανοιχτή μελέτη κλινικής φάσης III και συγκρίνει τη συγχορήγηση Cfz-δεξαμεθαζόνης με τη συγχορήγηση Btz-δεξαμεθαζόνης σε ασθενείς με υποτροπιάζον και ανθεκτικό μυέλωμα. Οι ερευνητές εντόπισαν μεγαλύτερο ποσοστό καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών στους ασθενείς στην ομάδα της καρφιλζομίμπης. Το ποσοστό των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια βαθμού μεγαλύτερου ή ίσου του 3 ήταν 4,75% (22 ασθενείς στους 463) στην ομάδα της Cfz σε σχέση με το 1,75% (8 ασθενείς στους 456) στην ομάδα της Btz. Παρόλο που σημειώθηκαν έξι θάνατοι στην ομάδα του Btz και πέντε θάνατοι στην ομάδα του Cfz από καρδιαγγειακά αίτια, φαίνεται πως η καρδιοτοξικότητα του Cfz είναι μεγαλύτερη από αυτή του Btz. Η σύγκριση των δύο φαρμάκων για τις ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούν, φαίνονται στην **Εικόνα 8**.



	Carfilzomib group (n=463)				Bortezomib group (n=456)			
	Grade 1 or 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5	Grade 1 or 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Peripheral neuropathy*	77 (17%)	10 (2%)	0	0	198 (43%)	36 (8%)	1 (<1%)	0
Acute renal failure†	19 (4%)	15 (3%)	3 (<1%)	1 (<1%)	10 (2%)	11 (2%)	1 (<1%)	0
Cardiac failure‡	16 (3%)	17 (4%)	3 (<1%)	2 (<1%)	5 (1%)	5 (1%)	1 (<1%)	2 (<1%)
Pneumonia	9 (2%)	30 (6%)	1 (<1%)	1 (<1%)	12 (3%)	33 (7%)	1 (<1%)	2 (<1%)
Ischaemic heart disease§	4 (<1%)	5 (1%)	3 (<1%)	0	2 (<1%)	3 (<1%)	1 (<1%)	3 (<1%)
Pulmonary hypertension	3 (<1%)	3 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)	0	0

**Εικόνα 8:** Συγκριτικός πίνακας ανεπιθύμητων ενεργειών Cfz-Btz. Ως καρδιακή ανεπάρκεια αναφέρονται τα συμπτώματα με φθίνουσα σειρά εμφάνισης: καρδιακή ανεπάρκεια, μείωση κλάσματος εξώθησης, πνευμονικό οίδημα, οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, οξύ πνευμονικό οίδημα, οξεία ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας, χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιοπνευμονική ανεπάρκεια, ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας και ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας αποτυγία.<sup>29</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι πιθανόν οι ασθενείς που λαμβάνουν κι άλλους αντινεοπλασματικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του ΠΜ να φέρουν ήδη κάποια καρδιακή δυσλειτουργία καθώς και αυτοί οι παράγοντες προκαλούν κάποιου είδους καρδιοτοξικότητα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της χρήσης δοξορουβικίνης<sup>26,32</sup>. Παρόλα αυτά η περαιτέρω μελέτη και σύγκριση των μηχανισμών καρδιοτοξικότητας είναι επιτακτική.

### 1.5 Μηχανισμός καρδιοτοξικότητας καρφιλζομίμπης και φαρμακευτική παρέμβαση με καρδιοπροστατευτική δράση

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, διερευνήσαμε τον πιθανό μηχανισμό καρδιοτοξικότητας της καρφιλζομίμπης με τη χρήση διαφορετικών δοσολογικών σχημάτων σε μύες. Χρησιμοποιήσαμε δύο πρωτόκολλα, αυτό της χορήγησης της καρφιλζομίμπης για δύο συνεχόμενες ημέρες και της χορήγησης τεσσάρων δόσεων μέρα παρά μέρα, έτσι ώστε η συνολική δόση που έλαβαν τα πειραματόζωα (μύες) να αντιστοιχούσε σε αυτή που λαμβάνουν οι ασθενείς. Παρατηρήθηκε ότι η καρδιακή συσταλτικότητα των πειραματόζωων που τους χορηγήθηκε καρφιλζομίμπη ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας καταδεικνύουν ότι η καρδιοτοξικότητα της καρφιλζομίμπης είναι οξεία και αναστρέψιμη καθώς και ότι ο μηχανισμός τοξικότητας σχετίζεται με τη μειωμένη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMPKα κινάσης) και συνεπώς της μειωμένης αυτοφαγικής λειτουργίας στο μυοκάρδιο, λόγω επαγωγής της φωσφατάσης PP2A. Ακολούθως, ελέγχθηκε η μετορμίνη για την καρδιοπροστατευτική της δράση καθώς είναι γνωστός ενεργοποιητής της AMPKα. Η μετορμίνη χορηγήθηκε παράλληλα με τον αναστολέα πρωτεασώματος, καρφιλζομίμπη, και βρέθηκε ότι αποτρέπει την έκπτωση της καρδιακής λειτουργίας των πειραματόζωων, επαναφέρει τη

φωσφορυλίωση της AMPKα κινάσης και αποκαθιστά την αυτοφαγική λειτουργία στα καρδιομυοκύτταρα.<sup>33</sup>

## 1.6 Αλληλεπίδραση συστήματος Ουβικουιτίνης-Πρωτεασώματος με την Αυτοφαγία

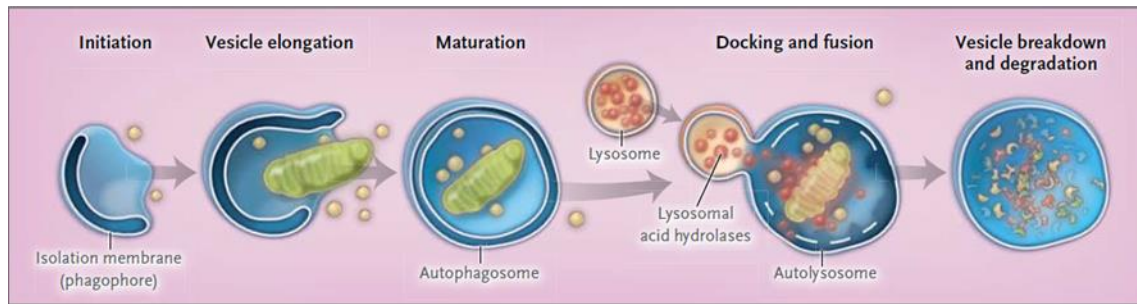
Το πρωτεάσωμα καθώς και η αυτοφαγία, που θα αναφερθεί εκτενώς παρακάτω, αποτελούν τα κύρια συστήματα αποικοδόμησης των κυτταρικών πρωτεϊνών. Οποιαδήποτε αλλαγή στη φυσιολογική τους λειτουργία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ακατάλληλων πρωτεϊνών δημιουργώντας δυσμενείς επιπτώσεις για τους ιστούς, την ονομαζόμενη πρωτεοτοξικότητα. Εκτεταμένη πρωτεοτοξικότητα έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση των κυττάρων ή ακόμα και τη θανάτωσή τους, συνεπάγοντας τη μη εύρυθμη λειτουργία των οργάνων όπως είναι η καρδιά. Έχει παρατηρηθεί ότι σε καρδιομυοπάθειες και στη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος δυσλειτουργεί. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι, με φαρμακολογική αναστολή του πρωτεασώματος πχ με τη βορτεζομίμπη, κυτταρικές σειρές καρδιομυοκυττάρων καθώς και διαγονιδιακά μοντέλα ζώων παρουσίασαν αυξημένη ενεργότητα της αυτοφαγίας, πιθανώς μετά τη συσσώρευση συσσωματωμένων ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών που δεν αποικοδομήθηκαν από το πρωτεάσωμα.<sup>34,35</sup>

## 1.7 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αποτελεί μια διαδικασία αυτό-αποικοδόμησης του κυττάρου κατά την οποία διπλοστοιβαδικά κυστίδια, τα αυτοφαγοσώματα, εσωκλείουν καταστραμμένες πρωτεΐνες, οργανίδια και μέρη του κυτοσολίου και συντήκονται με τα λυσοσώματα με σκοπό την αποικοδόμηση του περιεχομένου τους.<sup>36</sup> Τα επίπεδα της αυτοφαγίας μπορούν να αλλάξουν τάχιστα ανάλογα τα εξωτερικά ερεθίσματα που λαμβάνει το κύτταρο. Για παράδειγμα, σε θρεπτική στέρηση ή σε οξειδωτικό stress, η αυτοφαγία ενεργοποιείται με σκοπό την παροχή ενέργειας και την απομάκρυνση των περισσευόμενων πρωτεϊνών. Υπερέκφραση της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο των κυττάρων.<sup>37</sup>

Σε συνθήκες στρες, η αυτοφαγία αποτελεί έναν μηχανισμό επιβίωσης του κυττάρου κατά τον οποίο αποικοδομεί συστατικά του κυττάρου και επαναχρησιμοποιεί τις πρώτες ύλες εκεί που υπάρχει περισσότερη ανάγκη. Επίσης, κατέχει εξειδικευμένες λειτουργίες όπως είναι η μιτοφαγία, η αθροιστική αυτοφαγία, η λιποφαγία, η ξενοφαγία και συνεισφέρει στην καταστολή της φλεγμονής.<sup>38</sup>

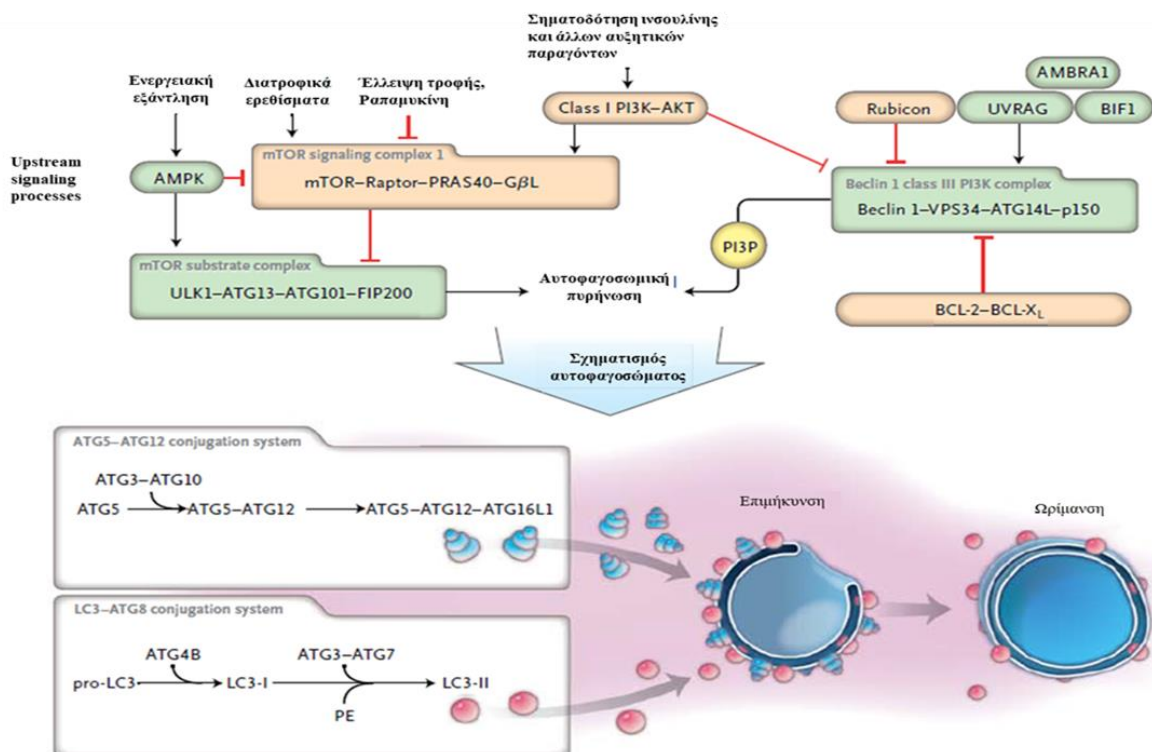
## 1.7.1 Φάσεις κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας



**Εικόνα 9:** Τα στάδια του αυτοφαγικού μονοπατιού.<sup>38</sup> Έναρξη, σχηματισμός αυτοφαγοσώματος, επιμήκυνση κυστιδίου, ωρίμανση, πρόσδεση και σύντηξη λυσοσώματος, αποικοδόμηση περιεχομένου και διάλυση του κυστιδίου.

**Έναρξη:** Στα θηλαστικά οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έναρξη της αυτοφαγίας είναι οι UNC-like κινάσες 1 και 2 (ULK1, ULK2), η FIP200, η πρωτεΐνη Atg13 καθώς και η πρωτεΐνη Atg101. Οι ULKs φωσφορυλιώνουν την Atg13 και τη FIP200 αλλά ταυτόχρονα, αυτοφωσφορυλιώνονται και έτσι διαμορφώνεται και επάγεται η αυτοφαγία. Οι ULKs, η FIP200 και η Atg13 σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλεγμα που εντοπίζεται στο φαγοφόρο, το οποίο ρυθμίζεται από τον mTOR, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω. Η Atg101 είναι μια πρωτεΐνη που σταθεροποιεί την Atg13.<sup>36</sup>

**Αναγνώριση «φορτίου» και εκλεκτικότητα:** Η εκλεκτική εγκόλπωση του «φορτίου» προς αποικοδόμηση, γίνεται μέσω της πρωτεΐνης p62/SQSTM1. Η p62 μέσω της περιοχής πρόσδεσης της ουμπικουιτίνης, προσδένεται με τη σεσημασμένη πρωτεΐνη ή οργανίδιο προς αποικοδόμηση και ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με την LC3 που βρίσκεται πάνω στο διπλοστοιβαδικό κυστιδίδιο που θα αποτελέσει το αυτοφαγόσωμα.<sup>36</sup>



**Εικόνα 10:** Μοριακά μονοπάτια κατά την έναρξη της αυτοφαγίας και το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος.<sup>38</sup>



**Σχηματισμός αυτοφαγосώματος:** Για να πραγματοποιηθεί η κύκλωση του αρχικού φαγοφόρου απαιτείται η συνδρομή ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που αποτελείται από την κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης κλάσης III (VPS34), την μυριστικοποιημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης p150, την πρωτεΐνη Atg14 και την πρωτεΐνη Beclin1. Όταν ενεργοποιείται το σύμπλεγμα αυτό, παράγεται 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ϊνοσιτόλη (PIP3), η οποία αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες Atg (ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο) στρατολογεί δύο συστήματα σύζευξης όμοια με αυτό της ουμπικουϊνίνης, το ATG5-ATG12 και το LC3-ATG8 όπως απεικονίζονται και στην εικόνα 10.<sup>36</sup>

**Επιμήκυνση κυστιδίου:** Η πρωτεΐνη Atg12 ενεργοποιείται από την Atg7 (E1-like), μεταφέρεται από την Atg10 (E2-like) και δένεται ομοιοπολικά με την Atg5. Στη συνέχεια, προσδένονται με την πρωτεΐνη Atg16, σχηματίζεται ένα τετραμερές και προσκολλάται στο φαγοφόρο.<sup>36</sup>

Στο δεύτερο σύστημα σύντηξης, η Atg8 (πρόδρομη μορφή LC3) αλληλεπιδρά με την Atg4 που δρα ως πρωτεάση και σχηματίζεται η κυτοσολική μορφή LC3-I. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται από την Atg7 μεταφέρεται στην Atg3 και προσδένεται με την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) σχηματίζοντας την LC3-II, μορφή που αποτελεί και δείκτη επαγωγής της αυτοφαγίας, και τοποθετείται εσωτερικά και εξωτερικά του αυτοφαγосώματος.<sup>38</sup>

**Σύντηξη κυστιδίου με λυσοσώματα:** Ύστερα από την επιμήκυνση και το σχηματισμό του αυτοφαγосώματος, η εξωτερική LC3-II αλληλεπιδρά με την Atg4, κόβει την PE και απελευθερώνεται ξανά στο κυτοσόλιο η μορφή LC3-I. Η σύντηξη πραγματοποιείται ύστερα από την επίδραση των ενζύμων LAMP-2 και GTPase Rab7. Μετά τη σύντηξη, η αποικοδόμηση του κυστιδίου και του εσωτερικού «φορτίου» εξαρτάται από τις υδρολάσες που απελευθερώνονται.<sup>36</sup>

### 1.7.2 Μοριακή ρύθμιση της αυτοφαγίας

Για να είναι δυνατή η έναρξη της αυτοφαγίας με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και στη συνέχεια να σχηματιστεί το αυτοφαγосωμα, η διαδικασία ρυθμίζεται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών.

- **Το σύμπλεγμα 1 του mTOR (mTORC1)**

Το πρώτο σύμπλεγμα είναι το σύμπλεγμα 1 του mTOR, το οποίο αποτελείται από 4 πρωτεΐνες, αυτές του mTOR, τη ρυθμιστική του πρωτεΐνη- Raptor, την πρωτεΐνη PRAS40 και την πρωτεΐνη GβL. Όταν ενεργοποιηθεί ο παράγοντας mTOR, τότε έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή έναρξης της αυτοφαγίας μέσω της απενεργοποίησης του παράγοντα ULK1. Το mTORC1 αναστέλλεται από την ραπαμυκίνη και έτσι επάγεται η αυτοφαγία από περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα όπως είναι τα θρεπτικά συστατικά.<sup>38</sup> Τα εξωκυτάρια αμινοξέα εισέρχονται στα θηλαστικά κύτταρα μέσω μεταφορέων όπως είναι οι SLC1A5 και SLC7A5 και επάγουν την φωσφορυλίωση

του mTORC1 πιθανόν μέσω της VPS34. Επομένως, προκύπτει ένας διττός ρόλος για την πρωτεΐνη VPS34 αφού από τη μία μεριά αναστέλλει την έναρξη της αυτοφαγίας και από την άλλη συμμετέχει στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Πιθανή εξήγηση αυτής της διττής φύσης είναι η παρουσία της σε διάφορους υποπληθυσμούς πρωτεϊνών που κάθε φορά θα δρα ανάλογα τις απαιτήσεις του κυττάρου.<sup>36</sup>

- **Το σύμπλεγμα υποστρώματος του mTOR**

Το δεύτερο σύμπλεγμα αποτελείται από τις πρωτεΐνες ULK1-ATG13-ATG101 και FIP200 με τις λειτουργίες που έχουν προαναφερθεί. Απενεργοποιείται από τον mTOR αλλά ενεργοποιείται από την AMPKα κινάση σε συνθήκες ενεργειακής έλλειψης του κυττάρου.<sup>38</sup>

- **Το σύμπλεγμα Beclin1-φωσφατιδυλο κινάση 3 κλάσης III (VPS34)**

Όπως έχει προαναφερθεί, το τρίτο σύμπλεγμα αποτελείται από τις εξής πρωτεΐνες: Beclin 1, VPS34, ATG14 και p150 οι οποίες συμμετέχουν στο σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος.<sup>38</sup>

- **GTP-άσες**

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι GTP-άσες επηρεάζουν την αυτοφαγία τόσο με το α μονομερές όσο και με το βγ διμερές. Η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Gα<sub>13</sub> (GAIP), έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την αυτοφαγική ακολουθία. Αυτό συμβαίνει ύστερα από τη φωσφορυλίωση της Ser<sup>151</sup>, το οποίο την ενεργοποιεί και επιταχύνει την υδρόλυση του GTP. Υπεύθυνες για αυτή την φωσφορυλίωση είναι οι MAP κινάσες ERK ½, οι οποίες επηρεάζονται και από τα αμινοξέα που κυκλοφορούν αλλάζοντας τη θέση φωσφορυλίωσης, απενεργοποιώντας έτσι την αυτοφαγία.<sup>39,40</sup>

### 1.7.3 Ενεργειακή παροχή κυττάρου και αυτοφαγία

Ένας από τους βασικότερους μοριακούς ρυθμιστές της αυτοφαγίας είναι η κινάση AMPK. Όταν το κύτταρο υφίσταται ενεργειακή στέρηση, τότε η ισορροπία μεταξύ AMP/ATP μεταβάλλεται με αύξηση των επιπέδων AMP. Έτσι ενεργοποιείται η κινάση LKB1 και ενεργοποιεί την AMPK. Η τελευταία με τη σειρά της ενεργοποιεί το σύμπλεγμα TSC1/2 και αναστέλλει την ενεργότητα του mTOR μέσω της Rheb. Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από τη φωσφορυλίωση που προκαλεί στον Raptor. Επιπρόσθετα, η AMPK ενεργοποιεί την p27 κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη, η οποία αποτρέπει το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση και επάγει την αυτοφαγία με σκοπό την αποικοδόμηση συστατικών με απώτερο σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Τέλος, η AMPK φωσφορυλιώνει απευθείας την ULK1 στις θέσεις S317, S467, S555, T574, S637, και S777, καθώς και την Beclin-1, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη της αυτοφαγίας.<sup>36,41</sup>

## 1.8 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο Πολλαπλό Μυέλωμα

Η αυτοφαγία στον καρκίνο έχει διττό ρόλο. Μπορεί στα αρχικά στάδια μιας κακοήθειας να την καταστρέφει, αλλά στη συνέχεια να την υποβοηθήσει διατηρώντας τις μεταβολικές λειτουργίες των κακοηθών κυττάρων στις έντονες συνθήκες που επικρατούν. Συγκεκριμένα, επειδή στο ΠΜ τα πλασματοκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, στο ενδοπλασματικό δίκτυο συσσωρεύεται μεγάλος αριθμός λάθος αναδιπλούμενων και λάθος παραγόμενων πρωτεϊνών, γεγονός που είναι τοξικό για τα πλασματοκύτταρα. Εκτός από την οδό αποικοδόμησης του πρωτεασώματος τέτοιων πρωτεϊνών, υφίσταται και η οδός αυτοφαγίας-λυσωσώματος που χρησιμοποιείται από τα καρκινικά πλασματοκύτταρα εξαιτίας των μεγάλων απαιτήσεών τους σε ενέργεια.<sup>37</sup>

## 1.9 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στο μυοκάρδιο

Η αυτοφαγία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα καρδιομυοκύτταρα, επειδή διατηρεί τη λειτουργία και τη βιωσιμότητά τους καθώς τους παρέχει ενεργειακή κάλυψη ανακυκλώνοντας πρωτεΐνες και οργανίδια που πλέον δεν είναι χρήσιμα στα κύτταρα. Η αποδιοργάνωση της οδού αποικοδόμησης αυτοφαγίας-λυσωσώματος στην καρδιά μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιδράσεις. Ταυτόχρονα σχετίζεται και με πολλές ασθένειες πχ την ασθένεια Danon και καρδιομυοπάθειες σχετιζόμενες με τη δεσμίνη.<sup>42</sup>

### 1.10 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt/eNOS και αναστολείς πρωτεασώματος

Η Akt αποτελεί μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από μια πληθώρα καρδιοπροστατευτικών παραγόντων και εμποδίζει τη λειτουργία προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθώς σηματοδοτεί την έναρξη περαιτέρω προστατευτικών μονοπατιών.<sup>43</sup> Όσον αφορά τους καθοδικούς στόχους της Akt με καρδιοπροστατευτική δράση, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η eNOS.<sup>44</sup> Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων πως η χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού των κυττάρων, σε μείωση της λειτουργίας τους, σε απόπτωση και σε μειωμένη παραγωγή eNOS/NO.<sup>45</sup> Η αναστολή εύρυθμης λειτουργίας της eNOS και η διαταραχή στην ομοιόσταση του NO οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και είναι συνήθη ευρήματα σε καρδιαγγειακές ασθένειες.

## 1.11 Η παρουσία συννοσηροτήτων στο Πολλαπλό Μυέλωμα

Στο δυτικό κόσμο ο μέσος όρος διάγνωσης των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα είναι γύρω στα 70 έτη. Το 37% βρίσκεται σε ηλικία μικρότερη των 65 ετών, το 26% είναι σε ηλικία 65 έως 74 ετών και 37% είναι μεγαλύτερο των 75 ετών. Πολλοί ασθενείς, πέρα από την προχωρημένη ηλικία, παρουσιάζουν ταυτόχρονα και κάποια άλλη συννοσηρότητα, γεγονός που δυσχεραίνει τη διαχείριση αυτών των ασθενών.<sup>46</sup> Υπάρχουν κλινικές μελέτες που έχουν αξιολογήσει την ταυτόχρονη παρουσία μια σειράς συννοσηροτήτων και το αποτέλεσμα που αυτές έχουν στο προσδόκιμο ζωής των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα με τις πιο σοβαρές να είναι η καρδιακή και η νεφρική βλάβη καθώς και βλάβη στη λειτουργία των πνευμόνων.<sup>47</sup> Πιο συγκεκριμένα λόγω της μεγάλης ηλικίας των ασθενών, είναι συχνό κάποιοι από τους ασθενείς να πάσχουν ήδη από κάποια πάθηση του καρδιαγγειακού συστήματος (πχ καρδιομυοπάθειες, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες κá).<sup>48</sup> Επιπλέον, σε άλλη κλινική μελέτη 325 ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα, οι οποίοι θα προχωρούσαν σε θεραπεία με αυτόλογη μεταμόσχευση, περίπου το 71% έπασχε ήδη από κάποιο παράγοντα κινδύνου για το καρδιαγγειακό με την αρτηριακή υπέρταση και το κάπνισμα να είναι οι δύο παράγοντες που διπλασίαζαν τις πιθανότητες για θάνατο των ασθενών.<sup>49</sup> Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι χρειάζεται προσοχή στη διαχείριση αυτών των ασθενών καθώς πολλές θεραπείες του πολλαπλού μυελώματος επιβαρύνουν το καρδιαγγειακό σύστημα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως για τους αναστολείς πρωτεασώματος.

## 1.12 Υπερλιπιδαιμία και Πολλαπλό Μυέλωμα

Το 49% της θνησιμότητας στην Ευρώπη οφείλεται σε παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος. Οι παράγοντες κινδύνου ποικίλουν και ταξινομούνται σε αμετάβλητους (ηλικία, φύλο και οικογενειακό ιστορικό) και σε μεταβλητούς (κάπνισμα, έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, αρτηριακή πίεση, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, παχυσαρκία και δυσλιπιδαιμία). Τα λιπίδια στο πλάσμα κυκλοφορούν υπό μορφή λιποπρωτεϊνών συζευγμένα με τις απολιποπρωτεΐνες. Η πλειοψηφία της ολικής χοληστερόλης είναι στη μορφή της LDL χοληστερόλης. Η διατάραξη του μεταβολισμού των λιπιδίων οδηγεί σε δυσλιπιδαιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην αθηροσκλήρωση και επακόλουθα σε μελλοντική καρδιαγγειακή νόσο.<sup>50</sup>

Σε σύγκριση ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα και υπερλιπιδαιμία με ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και φυσιολογικά λιπίδια, διαπιστώθηκε στους πρώτους μεγαλύτερο ποσοστό παραπρωτεΐνης IgA, ξανθώματα στο δέρμα και σύνδρομο υπερπηκτικότητας. Επιπλέον, οι παραπρωτεΐνες που βρίσκονται στο πλάσμα συνδέονται με λιποπρωτεΐνες, υποδοχείς (πχ LDL υποδοχείς) καθώς και με τις λιπάσες με αποτέλεσμα τη μη επαρκή κάθαρση των λιποπρωτεϊνών, προκαλώντας αυτοάνοση υπερχοληστερολαιμία.<sup>51</sup>

## 1.13 Εύρεση πειραματικού μοντέλου

Μια πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα είναι η εύρεση του κατάλληλου πειραματικού μοντέλου υπερλιπιδαιμίας, το οποίο θα μπορέσει να δώσει πληροφορίες για τις φαρμακολογικές παρεμβάσεις και τους μοριακούς μηχανισμούς της καρδιοπροστασίας οι οποίες να έχουν εφαρμογή στον άνθρωπο.<sup>52</sup>

Τα ζωικά πειραματικά μοντέλα που έχουν προταθεί για τη μελέτη της διατάραξης των λιπιδίων και συνεπακόλουθα της αθηροσκλήρωσης περιλαμβάνουν πολλά είδη ζώων όπως είναι οι μύες, οι επίμυες, οι κόνικλοι και διάφορα είδη χοίρων. Οι μύες και οι επίμυες ως τρωκτικά εάν και επιλέγονται πιο εύκολα ως πειραματόζωα γιατί έχουν μικρό κύκλο ζωής και πολλούς απογόνους, είναι ανθεκτικά στην ανάπτυξη και την εναπόθεση αθηρωματικών πλακών. Γι' αυτό το λόγο παρεμβαίνουμε μέσω της διατροφής τους καθώς και γονιδιακά, καθώς έχουν αναπτυχθεί διαγονιδιακά μοντέλα κατάλληλα για τη μελέτη της υπερλιπιδαιμίας και της αθηρωμάτωσης. Πιο συγκεκριμένα, για τους μύες είναι γνωστό ότι έχουν υψηλά επίπεδα HDL και χαμηλά επίπεδα LDL. Για να διαταραχθεί η ισορροπία των λιποπρωτεϊνών και να προκληθεί υπερχοληστερολαιμία και αθηρωμάτωση, είναι απαραίτητη η γονιδιακή παρέμβαση του πειραματόζωου.<sup>53</sup> Τα δύο κύρια μοντέλα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- **ApoE<sup>-/-</sup>**: Μύες που τους έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE) χρησιμοποιούνται συχνά για την εμφάνιση αθηρωματικών πλακών. Μάλιστα, όταν η διατροφή τους είναι δυτικού τύπου (πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά) τότε η αθηροσκλήρωση που παρατηρείται είναι παρόμοια με αυτή των ανθρώπων.<sup>54</sup>
- **LDLr<sup>-/-</sup>**: Μύες που φέρουν γενετική ανωμαλία στον υποδοχέα της LDL χοληστερόλης. Είναι ένα μοντέλο το οποίο δεν έχει ευρεία χρήση όταν μελετάται η καρδιοπροστασία καθώς επηρεάζεται το αποτέλεσμα τόσο από τη διατροφή των μυών όσο και από το χρόνο της διατροφής.<sup>53</sup>

### 1.13.1 Το πειραματικό μοντέλο μυών ApoE<sup>-/-</sup>

Η ομοίωση των λιπιδίων του ανθρώπου διαφέρουν με αυτή των μυών, γι' αυτό το λόγο είναι και απαραίτητη η γονιδιακή παρέμβαση στα πειραματόζωα. Στους ανθρώπους το μεγαλύτερο ποσοστό της χοληστερόλης βρίσκεται στη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και έτσι είναι επιρρεπής ως οργανισμός στη διακύμανση του λόγου HDL/LDL που αποτελεί και τον παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Αντίθετα στους μύες το μεγαλύτερο ποσοστό της χοληστερόλης μεταφέρεται μέσω της υψηλής πυκνότητας χοληστερόλης (HDL), ενώ παράλληλα παρουσιάζουν μικρή ποσότητα LDL χοληστερόλης και άλλων λιποπρωτεϊνών πχ VLDL. Ο λόγος HDL/LDL είναι μεγάλος και γι αυτό διατηρείται σε αυτά τα επίπεδα ακόμα και εάν φυσιολογικά ζώα αναφοράς τραφούν

με διατροφή δυτικού ρύπου, υψηλή σε λιπαρά. Με αυτόν τον τρόπο οι μύες εμφανίζουν όπως προαναφέρθηκε μια αντίσταση στη δημιουργία αθηροσκλήρωσης. Παρ' όλες αυτές τις διαφορές, η μεταφορά και ο μεταβολισμός των λιπιδίων παρουσιάζουν κάποια κοινά σημεία. Η απολιπορωτεΐνη E στους μύες είναι περίπου 70% ομόλογη με αυτή των ανθρώπων. Είναι ο κύριος προσδέτης για την αφαίρεση των υπολειμμάτων των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών ενδιάμεσης πυκνότητας από το συκώτι. Κύρια λειτουργία της είναι η σύνδεση αυτών των σωματιδίων με τον υποδοχέα της LDL. Η έλλειψη της απολιπορωτεΐνης E στους ανθρώπους είναι σπάνια. Αντίθετα στους μύες η έλλειψή της, έχει ως αποτέλεσμα τη καθυστερημένη απομάκρυνση των πλεοναζουσών λιποπρωτεϊνών και αναπόφευκτα την ανάπτυξη υπερχοληστερολαιμίας και τη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης. Το 1992 αναφέρθηκε η εύρεση του πειραματικού μοντέλου μύων ApoE<sup>-/-</sup> και αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο προκλινικό μοντέλο για τη αθηροσκλήρωση.<sup>55</sup>

Οι C57BL/6 μύες που λαμβάνουν φυσιολογική τροφή έχουν ολική χοληστερόλη στο πλάσμα (PC) γύρω στα 60mg/dl, τριγλυκερίδια (TG) 65mg/dl, λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης και πολύ χαμηλής πυκνότητας (IDL + VLDL) 20mg/dl, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) 10 mg/dl και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) 50 mg/dL. Οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες με φυσιολογική διατροφή παρουσιάζουν PC x 8 φορές, TG x 1,7 φορές, VLDL+IDL x 18 φορές και LDL x 14 φορές αύξηση, ενώ η HDL μειώνεται σε όλες τις ηλικίες, δηλαδή έχει προκληθεί δυσλιπιδαιμία. Όταν όμως ακολουθούν διατροφή δυτικού τύπου παρατηρούνται οι εξής διαφορές PC x 14 φορές, IDL+VLDL x 30 φορές αύξηση. Επιπλέον, ApoE<sup>-/-</sup> μύες ηλικίας 6 με 8 εβδομάδων παρουσιάζουν προσκόλληση ενδοθηλιακών κυττάρων με μονοκύτταρα και διάρρηξη του υποενδοθηλιακού υμένα. Στις 8 με 10 εβδομάδες παρατηρούνται βλάβες που εμπεριέχουν αφρώδη κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα ενώ στους τέσσερις με πέντε μήνες, δηλαδή αντίστοιχα με νεαρούς ενήλικες, παρατηρήθηκαν ινώδεις πλάκες και αλλοιώσεις τόσο στην αορτή όσο και στις καρωτίδες. Το 90% του αορτικού αυλού έχει φραχθεί σε μύες 70 εβδομάδων με φυσιολογική διατροφή, ενώ αυτό επιτυγχάνεται σε 32 εβδομάδες ζωής εάν έχουν ακολουθήσει διατροφή δυτικού τύπου. Η αθηρωμάτωση αυτή προκαλείται από την υπερλιπιδαιμία.<sup>54,56</sup> Συμπεραίνεται λοιπόν, πως ανάλογα τη διατροφή που θα ακολουθήσουν οι μύες θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι υπάρχει ένα ήπιο μοντέλο δυσλιπιδαιμίας, δηλαδή όσα ζώα ακολουθούν φυσιολογική διατροφή, και ένα δριμύτερο μοντέλο δυσλιπιδαιμίας-αθηρωμάτωσης, δηλαδή για τα ζώα που ακολουθούν διατροφή υψηλή σε λιπαρά, δηλαδή δυτικού τύπου.<sup>57,58</sup>

#### **1.13.1.1 Λειτουργία πρωτεασώματος των ApoE<sup>-/-</sup> μύων**

Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε μύες ApoE<sup>-/-</sup>, έχει παρατηρηθεί ότι χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος Βορτιζομίμη, αναστέλλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος ως προς τη θέση της χυμοθρυψίνης. Η αναστολή που προέκυψε ήταν δόσοεξαρτώμενη, ενώ τα αποτελέσματα αφορούν κύτταρα ήπατος. Χορήγηση



βορτεζομίμπης σε δόσεις μικρότερες των θεραπευτικών, δημιουργεί έναν φαινότυπο με επιρρεπή την αθηρωματική πλάκα.<sup>59</sup>

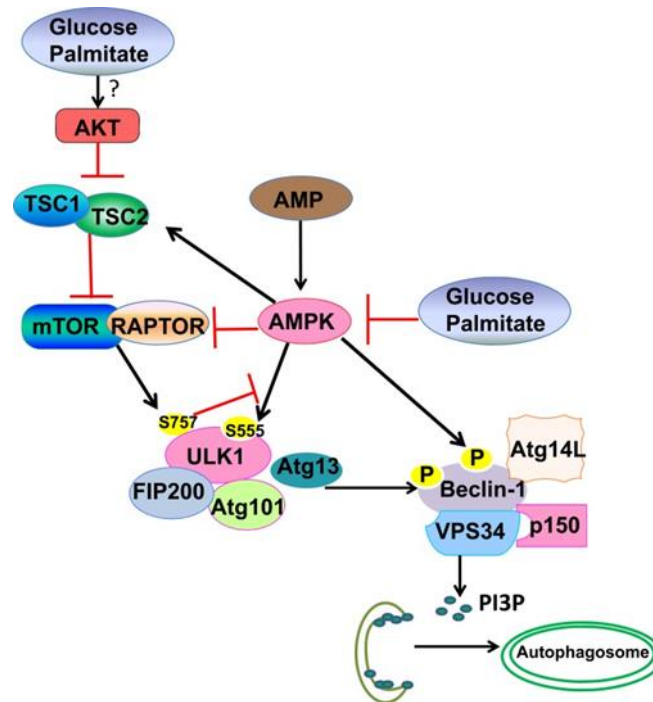
### **1.13.1.2 Χορήγηση Ατορβαστατίνης σε μύες ApoE<sup>-/-</sup>**

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν γίνει μελέτες σε μύες ApoE<sup>-/-</sup> για την επίδραση που θα έχει η χορήγηση κάποιου αναστολέα της αναγωγής 3-υδροξυ-3μεθυλογλουταρυλο συνενζύμου Α (HMG CoA), κοινώς στατίνες, τόσο στα λιπίδια όσο και στο σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών. Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στατίνες είναι η ατορβαστατίνη, για την οποία κλινικές μελέτες σε ανθρώπους υποστηρίζουν ότι η χρήση της ατορβαστατίνης σε δόσεις από 10 έως 80 mg μειώνουν την LDL χοληστερόλη από 37 έως και 51 %.<sup>60</sup> Η χορήγηση της ατορβαστατίνης σε μύες ApoE<sup>-/-</sup>, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της εναπόθεσης αθηρωματικών πλακών μέσω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωση της χοληστερόλης στο πλάσμα, όταν η διατροφή δυτικού τύπου ήταν περιορισμένη σε διάρκεια.<sup>61-63</sup>

### **1.14 Μεταβολικό σύνδρομο και Αυτοφαγία**

Σε μελέτη χορήγησης υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και λιπαρών οξέων σε ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (HAECs), η ενεργότητα του mTOR αυξήθηκε, η ενεργότητα της AMPK μειώθηκε όπως και η φωσφορυλίωση της ULK1, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη απόπτωση και φλεγμονή, διαδικασίες που υφίστανται στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Η χορήγηση ραπαμυκίνης (αναστολέα του mTOR) αύξησε τα επίπεδα της αυτοφαγίας, ενώ η χορήγηση αγωνιστών της AMPK δεν επανεκκίνησαν την αυτοφαγία. Οι ερευνητές πρότειναν ότι μόνο η AMPK επηρεάζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών. Παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 555 της ULK1 ήταν μειωμένη και γι' αυτό η αυτοφαγία ήταν λιγότερο ενεργοποιημένη. Επομένως, προτάθηκε ότι η AMPK δεν μπορεί να επάγει την αυτοφαγία κάτω από συνθήκες μεγάλης συγκέντρωσης γλυκόζης και λιπαρών οξέων (παλμιτικό οξύ στο συγκεκριμένο πείραμα) αλλά η λιμοκτονία διατηρεί αυτή την ικανότητά της.

Ενδιαφέρουσα είναι η εξήγηση της αποσύνδεσης της AMPK από την αυτοφαγία υπό αυτές τις συνθήκες. Ο mTOR φωσφορυλιώνει την ULK1 στη σερίνη 757 και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει την ενεργοποίησή της από την AMPK. Επίσης, επειδή ο mTOR ενεργοποιείται υπό αυξημένες διατροφικές συνθήκες, πιθανολογείται η μη δυνατή αλληλεπίδραση AMPK-ULK1. Όμως, στα πειράματα του Weikel δε βρέθηκε αυξημένη ενεργότητα του mTOR. Η θεραπευτική λύση που προτείνεται είναι η ταυτόχρονη χορήγηση ενός αγωνιστή της AMPK και έναν αναστολέα του mTOR.<sup>41</sup>



**Εικόνα 11:** Μηχανισμός διαταραχής της σηματοδότησης της AMPK κατά το μεταβολικό σύνδρομο<sup>40</sup>



## ΣΚΟΠΟΣ

Βασιζόμενοι στα ευρήματα της προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου μας<sup>33</sup> και λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μεταβάλλει τα φυσιολογικά μοριακά μονοπάτια που προσφέρουν καρδιοπροστασία καθώς και επηρεάζει τα θετικά αποτελέσματα φαρμακολογικών παρεμβάσεων<sup>64</sup>, θα επικεντρωθούμε στο κατά πόσο τα αποτελέσματα της προηγούμενης έρευνάς μας επηρεάζονται παρουσία υπερχοληστερολαιμίας. Επιπλέον, οι μέχρι στιγμής κλινικές μελέτες που μελετάνε τις συννοσηρότητες των νεοδιαγνωθέντων ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα δεν μελετούν την υπερλιπιδαιμία όσο άλλες συννοσηρότητες.<sup>47,65,66</sup>

Επομένως, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι <sup>(1)</sup> η διαπίστωση για τυχόν παρέμβαση της υπερλιπιδαιμίας και της αθηρωμάτωσης στον καρδιοτοξικό μηχανισμό μέσω της μειωμένης αυτοφαγίας και στον καρδιοπροστατευτικό μηχανισμό που προσφέρει η χορήγηση μετοφορμίνης, <sup>(2)</sup> η διερεύνηση της καρδιοπροστατευτικής δράσης της μετοφορμίνης σε συγχορήγηση με τον υπολιπιδαιμικό παράγοντα ατορβαστατίνη.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Φαρμακολογικοί παράγοντες

Η καρφιλζομίμη (Kyprolis® PD.SOL.INF 60MG/VIAL, Amgen) παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Τομέα Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η υδροχλωρική μετοφομίνη παραχωρήθηκε ευγενικά από τη φαρμακοβιομηχανία UNI-PHARMA, ενώ η ατορβαστατίνη (ως τριένυδρο ασβεστούχο άλας) παραχωρήθηκε ευγενικά από τη φαρμακοβιομηχανία VERISFIELD.

### 2.2 Επιλογή δόσεων

Η επιλογή δόσεων των παραγόντων Cfz (8mg/kg, ip) και Met (140mg/kg,po) αναφέρεται αναλυτικά στην προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου.<sup>33</sup> Οι μύες που ανήκαν στις ομάδες ελέγχου έλαβαν την αντίστοιχη ποσότητα φυσιολογικού ορού 0,9%, ανάλογα το βάρος τους, είτε ενδοπεριτοναϊκά είτε από την στόματος χορήγηση. Η επιλογή της δόσης έγινε με βάση τη βιβλιογραφία. Σε μελέτη όπου η δόση της ατορβαστατίνης ήταν 10mg/kg παρατηρήθηκε μείωση των λιπιδίων σε ApoE<sup>-/-</sup> μύες που είχαν διατροφή δυτικού τύπου για 10 εβδομάδες<sup>63</sup>. Σε άλλη μελέτη με ApoE<sup>-/-</sup> μύες η δόση ήταν 20mg/kg, δεν παρουσιάστηκε μείωση των λιπιδίων, λογικά γιατί η περίοδος με διατροφή ενισχυμένη με κορεσμένα λιπαρά ήταν μόνο 5 εβδομάδες, αλλά ήταν εμφανής η επίδραση της ατορβαστατίνης στη μείωση της εναπόθεσης των αθηρωματικών πλακών στα αγγεία των μυών.<sup>61</sup> Βασιζόμενοι στα ανωτέρω, αποφασίστηκε η δόση των 20 mg/kg, καθώς στα πειράματα που ακολούθησαν η διατροφή δυτικού τύπου ήταν για 14 εβδομάδες.

### 2.3 Ζωικό μοντέλο μυών

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ApoE<sup>-/-</sup> με γενετικό υπόβαθρο C57BL/6, ηλικίας 5 μηνών (20 εβδομάδων). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματόζωων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών με αριθμό πρωτοκόλλου 174163/10-05-2019. Οι μύες στεγάστηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες, με θερμοκρασία δωματίου (22±2°C), υγρασία (55±10°C) και στη συνηθισμένη περιοδική έκθεση στο φως ανά 12ωρο για διάστημα 12 ωρών. Τα κλουβιά των πειραματόζωων ήταν συνεχώς εφοδιασμένα με διαθέσιμη τροφή και νερό σε ελεύθερη πρόσβαση. Τα πειραματόζωα ήταν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους υπό την επίβλεψη εξειδικευμένου και επιστημονικού προσωπικού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και μύες C57BL/6 με σκοπό τον χαρακτηρισμό των ApoE<sup>-/-</sup>.

## 2.3.1 Μοντέλο Υπερλιπιδαιμίας

### 2.3.1.1 Οξύ Πρωτόκολλο 2 δόσεων

ΑpoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών ακολούθησαν φυσιολογική διατροφή και τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=3) και Cfz (n=3). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% (ip), Cfz (8 mg/kg, ip) ανά 24ωρο στις αντίστοιχες ομάδες για διάστημα 2 ημερών και έλαβαν συνολικά 2 δόσεις. Παράλληλα τοποθετήθηκαν και 5 μύες C57BL/6 ώστε να χαρακτηρισθεί το μοντέλο των ΑpoE<sup>-/-</sup>.

### 2.3.1.2 Υπο-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων

ΑpoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών ακολούθησαν φυσιολογική διατροφή και τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=4) και Cfz (n=4). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% (ip) και Cfz (8 mg/kg, ip) ανά 48ωρο, για διάστημα 6 ημερών και έλαβαν συνολικά 4 δόσεις. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και 5 μύες C57BL/6 ώστε να χαρακτηριστεί το μοντέλο των ΑpoE<sup>-/-</sup>.

## 2.3.2 Μοντέλο Αθηρωμάτωσης-Δριμύς φαινότυπος

### 2.3.2.1 Διατροφή δυτικού τύπου -High Fat Diet (HFD )

Η τροφή που χορηγήθηκε στους μύες για να έχουν δριμύ φαινότυπο υπερλιπιδαιμίας-αθηρωμάτωσης είναι η TD88137. Αποτελείται από χοληστερόλη 0,2%, λιπαρά 21% κατά βάρος από τα οποία >60% είναι μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, έχει μεγάλη περιεκτικότητα σουκρόζης, 34% κατά βάρος.<sup>67</sup>

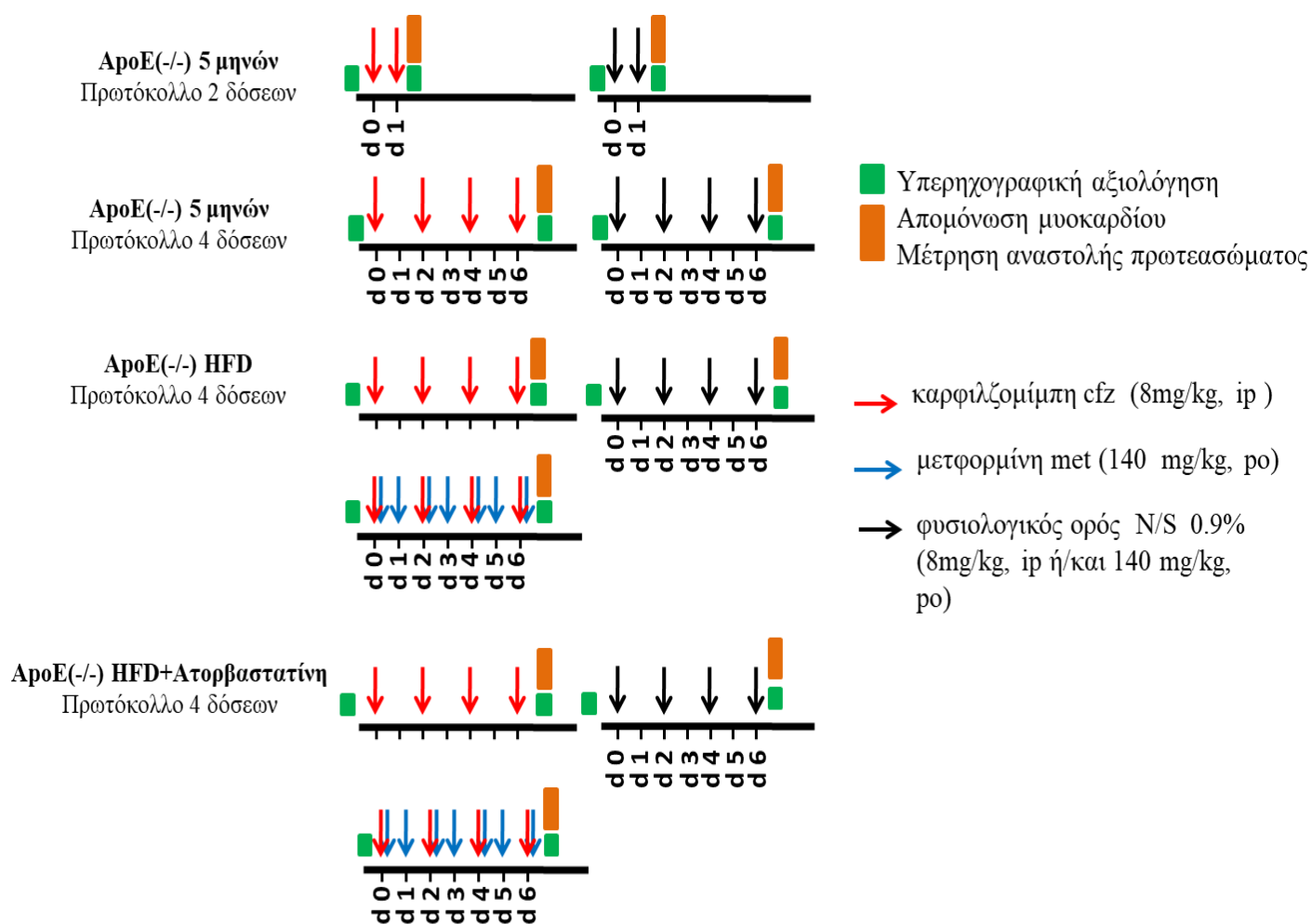
### 2.3.2.2 Υπο-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων, ΑpoE<sup>-/-</sup> HFD

Οι ΑpoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών ακολούθησαν διατροφή δυτικού τύπου για 14 εβδομάδες. Τη 13<sup>η</sup> εβδομάδα τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=6), Cfz (n=6) και Cfz+Met (n=6). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% (gavage και ip), Cfz (8 mg/kg, ip) ανά 48ωρο και Met (140 mg/kg, gavage) ανά 24ωρο στις αντίστοιχες ομάδες, για διάστημα 6 ημερών και έλαβαν συνολικά 4 δόσεις. Η χορήγηση της μετοφορμίνης προηγείται του Cfz κατά 30 λεπτά. Η διατροφή HFD ξεκίνησε την 6-8 εβδομάδα της ηλικίας τους και διήρκησε 14 εβδομάδες.

### 2.3.3 Φαρμακολογική παρέμβαση στο μοντέλο της αθηρωμάτωσης με δριμύ φαινότυπο-Ο ρόλος της ατορβαστατίνης

#### 2.3.3.1 Υπό-οξύ Πρωτόκολλο 4 δόσεων, ApoE<sup>-/-</sup> HFD+Ατορβαστατίνη

ApoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών ακολούθησαν διατροφή δυτικού τύπου για 14 εβδομάδες. Την 13<sup>η</sup> εβδομάδα τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=6), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% (gavage και ip), Cfz (8 mg/kg, ip) ανά 48ωρο και Met (140 mg/kg, gavage) ανά 24ωρο στις αντίστοιχες ομάδες, για διάστημα 6 ημερών και έλαβαν συνολικά 4 δόσεις. Η χορήγηση της μετοφορμίνης προηγείται του Cfz κατά 30 λεπτά. Η ατορβαστατίνη επιλέχθηκε στη δόση των 20 mg/kg και διαλύθηκε στο νερό που είχαν ελεύθερη πρόσβαση οι μύες με συνδιαλύτη το DMSO σε περιεκτικότητα 3%.<sup>68</sup> Τα νερά ανανεώνονταν ανά 3 με 4 ημέρες και προστίθετο εξαρχής καινούργια ποσότητα ατορβαστατίνης, ώστε να βεβαιωθούμε ότι δε θα υπάρξει κάποια αμφιβολία για τη σταθερότητα της ατορβαστατίνης. Η χορήγηση της ατορβαστατίνης έγινε για 10 εβδομάδες. Η διατροφή HFD ξεκίνησε την 6-8 εβδομάδα της ηλικίας τους και διήρκησε 14 εβδομάδες.

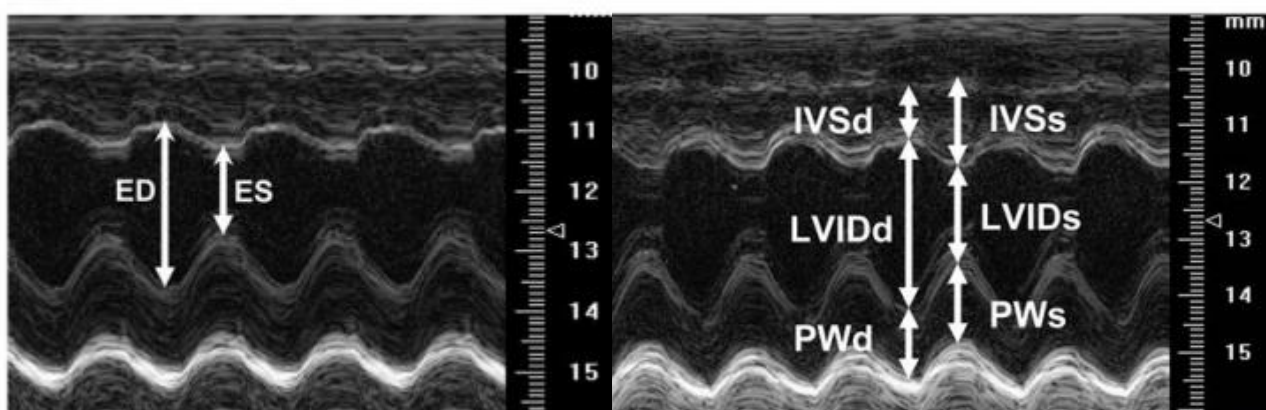


**Σχήμα 1:** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα των πειραματικών πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν.

## 2.4 Υπερηχοκαρδιογραφικές μετρήσεις

Την ημέρα 0 και την ημέρα 1 στο πρωτόκολλο των δύο δόσεων και την ημέρα 0 και την ημέρα 6 στα πρωτόκολλα των τεσσάρων δόσεων, οι μύες αναισθητοποιήθηκαν με ειδική μάσκα αναισθητοποίησης με 1,0 % ισοφλουράνιο και τοποθετήθηκαν με την κατάλληλη φορά σε θερμαινόμενη επιφάνεια, αφού είχε προηγηθεί η αφαίρεση του τριχώματος τοπικά στο θώρακα. Η υπερηχοκαρδιογραφική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος υπερήχων Vivid 7, GE Healthcare, USA με γραμμικό μεταλλάκτη 13-MHz. Μετρήθηκε ο καρδιακός ρυθμός και στη συνέχεια έγινε λήψη εικόνων τύπου M δύο διαστάσεων της αριστερής κοιλίας σε εγκάρσια απεικόνιση στο επίπεδο των θηλοειδών μυών.<sup>69</sup> Ο πρώτος υπέρηχος έγινε πριν την χορήγηση των φαρμάκων ενώ η τελευταία υπερηχογραφική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε, αφού είχαν πραγματοποιηθεί οι τελευταίες χορηγήσεις 30 λεπτά πριν. Η αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας έγινε με τον υπολογισμό επί τοις εκατό του κλάσματος βράχυνσης (%FS) όπου,

$$FS (\%) = 100 \times [LVIDd-LVIDs]/LVIDd]^{70}$$



**Εικόνα 12:** Χαρακτηριστική απεικόνιση για μετρήσεις υπερηχογραφήματος M-mode εγκάρσιας τομής στο επίπεδο των θηλοειδών μυών στην αριστερή κοιλία μύων. (ES=Τελοσυστολική διάμετρος, ED=Τελοδιαστολική διάμετρος, IVSd= Πάχος μεσοκοιλιακού διαφράγματος κατά τη διαστολή, IVSs=Πάχος μεσοκοιλιακού διαφράγματος κατά τη συστολή, LVIDd= Τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, LVIDs= Τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας PWd= Πάχος εμπρόσθιου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη διαστολή, PWs= Πάχος εμπρόσθιου τοιχώματος αριστερής κοιλίας κατά τη συστολή.<sup>69</sup>

Στα διαγονιδιακά πειραματόζωα ApoE<sup>-/-</sup> παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές του κλάσματος συστολικής βράχυνσης (FS%) στη γραμμική βάση. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από την βιολογική διακύμανση στην ανταπόκριση των πειραματόζωων στην διαταραχή της λιπιδικής τους ομοιόστασης.<sup>71</sup> Για το λόγο αυτό και για να παρακάμψουμε την βιολογική διακύμανση των τιμών του κλάσματος συστολικής βράχυνσης στη γραμμική βάση, στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε η μεταβολή του κλάσματος συστολικής βράχυνσης ( $\Delta$ FS%), η οποία ορίστηκε ως η διαφορά του FS% του τελικού σημείου των πειραμάτων (FS<sub>endpoint</sub>) μείον της τιμής του FS% της γραμμής βάσης (FS<sub>baseline</sub>).

## 2.5 Συλλογή ιστών

Οι μύες υποβλήθηκαν σε βαθιά αναισθησία (ketamine, 300 mg/kg ip), θανατώθηκαν ακαριαία και πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος, μέσω παρακέντησης του περικαρδίου με ένεση ινσουλίνης προγεμισμένη με διάλυμα ηπαρίνης αραιώσεως 1:6 όγκου 100  $\mu$ L, για τη μέτρηση της ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών, την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος και τη συλλογή αίματος και στη συνέχεια πλάσματος για τις βιοχημικές αναλύσεις. Δείγματα μυοκαρδιακού ιστού λήφθηκαν, με τομή τέτοια ώστε σε κάθε κομμάτι να περιέχει τμήμα της αριστερής κοιλίας, με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση των μοριακών μηχανισμών σηματοδότησης. Επίσης συλλέχθηκαν, οι αορτές, ο πρώτος λοβός του ήπατος, ο σπλήνας και οι νεφροί. Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorfs και συντηρήθηκαν μέσα σε υγρό άζωτο μέχρι τη μεταφορά τους στην κατάψυξη στους -80°C.

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Περιγραφή μεθόδου

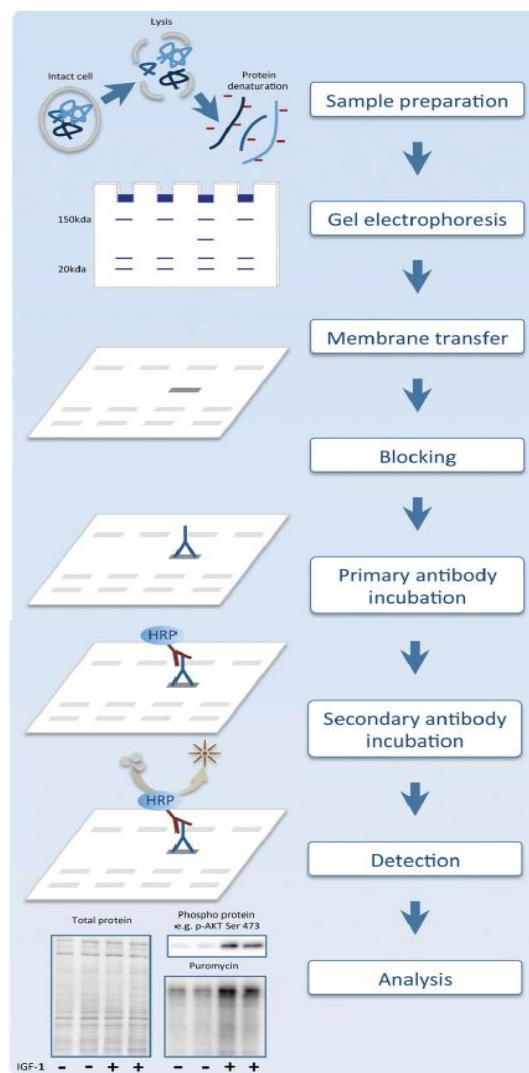
Η τεχνική Western Blot χρησιμοποιείται ευρέως ως μία αναλυτική τεχνική για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα από ένα δείγμα ενός ομογενοποιημένου ιστού ή ενός εκχυλίσματος. Με αυτήν την τεχνική το μείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται βάσει του μοριακού του βάρους μέσω ηλεκτροφόρησης σε ειδική γέλη. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της γέλης μεταφέρεται σε μια μεμβράνη που έχει την ικανότητα να προσδένεται με πρωτεΐνες (PVDF), δίνοντας μια μπάνα για κάθε μεμβράνη. Ακολουθεί η διαδικασία του Blocking και έπειτα η μεμβράνη επωάζεται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Τα αντισώματα έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών, οι οποίες χαρακτηρίζονται με τον όρο επίτοπο. Επειδή η αλληλουχία των αμινοξέων διαφοροποιείται σε διαφορετικές πρωτεΐνες, τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, εντός ομάδας πολλών. Η ποσότητα του αντισώματος που δε δεσμεύτηκε με την πρωτεΐνη, εκπλένεται και τα δεσμευμένα αντισώματα μπορούν να ανιχνευτούν με την ανάπτυξη φωτογραφικού φιλμ. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε θα αναφερθεί αναλυτικά αμέσως μετά.<sup>72,73</sup>

### 2.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Ο μυοκαρδιακός ιστός βαπτίζεται σε υγρό άζωτο για την αποφυγή της καταστροφής μέρους πρωτεϊνών από τις φωσφατάσες και τις πρωτεάσες του ιστού. Ένα τμήμα του μυοκαρδίου φέρεται σε ιγδίο πορσελάνης και διαβρέχεται ταυτόχρονα με υγρό άζωτο και με τη χρήση του υπέρου μετατρέπεται σε κόνι. Η κόνις αυτή διαβρέχεται με lysis buffer ακολουθώντας τον κανόνα ότι σε 50 mg ιστού καρδιάς αναλογούν σε 500  $\mu$ L.

Η σύσταση του lysis buffer είναι η εξής:

- 1% v/v Triton X: Μη ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας που καταστρέφει τις λιπιδικές με μεμβράνες και απελευθερώνει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες
- 20 mM TRIS HCl: Ρυθμιστικό διάλυμα με εύρος pH 7 έως 9,
- 150 mM NaCl: Καθορίζει και σταθεροποιεί την ιονική ισχύ του διαλύματος καθώς και ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του διαλύματος.



Εικόνα 12: Συνοπτική απεικόνιση της τεχνικής Western Blot (72)



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

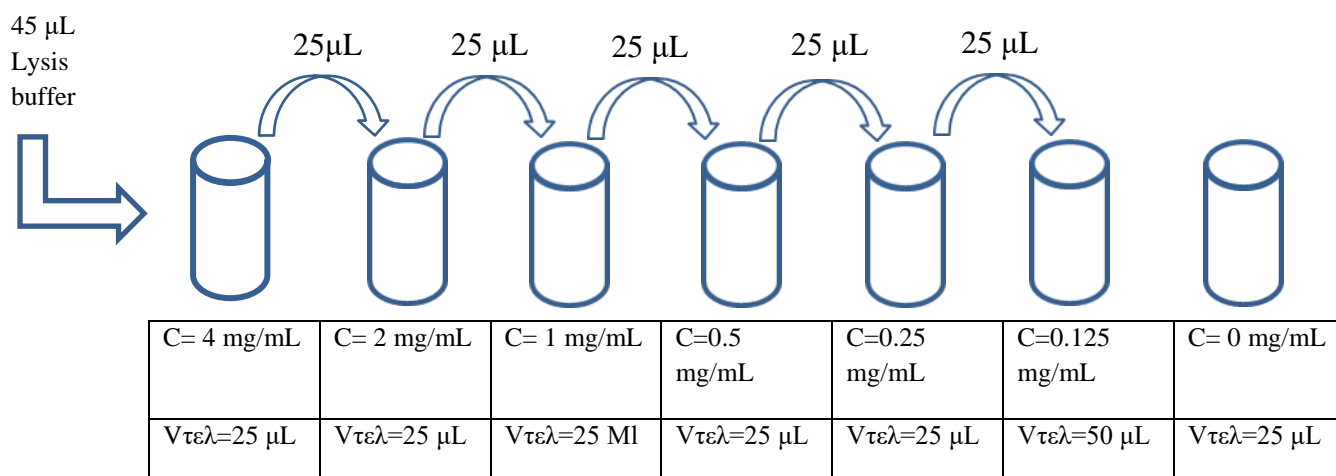
Ακολουθεί η ομογενοποίηση στην ειδική συσκευή μέσα σε πάγο για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Η εκχύλιση των συστατικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με υπερήχους για 3 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 11000 στροφές (rpm) στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο κατακρημνίζονται τα μη λυμένα ή αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά και λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα που είναι πυκνό διάλυμα ιστού και ονομάζεται lysate. Τα δείγματα τοποθετούνται στον υπερκαταψύκτη (-80°C).

### 2.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Τα δείγματα βγαίνουν από τον υπερκαταψύκτη και τοποθετούνται πάνω σε πάγο έως ότου αυτά να γίνουν ρευστά. Στη συνέχεια, γίνεται καμπύλη αναφοράς με πρωτεΐνη αναφοράς τη βόεια αλβουμίνη ορού (Bovine Serum Albumin-BSA) (συγκέντρωση συναρτήσεως απορρόφησης) με σκοπό τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν την προηγούμενη μέρα με τη μέθοδο Lowry.



Η BSA βρίσκεται στην κατάψυξη του εργαστηρίου (στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε stock των  $5\text{ }\mu\text{L}$  με συγκέντρωση  $40\text{ mg/ml}$ .



**Σχήμα 2:** Σχηματική απεικόνιση των αραιώσεων που απαιτούνται στη μέθοδο προσδιορισμού πρωτεΐνης Lowry

Στο πρώτο Eppendorf (stock) προστίθενται  $45\text{ }\mu\text{L}$  lysis buffer. Το διάλυμα που προκύπτει έχει όγκο  $50\text{ }\mu\text{L}$  με συγκέντρωση  $4\text{ mg/mL}$ . Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με λήψη  $25\text{ }\mu\text{L}$  από το πιο πυκνό δείγμα και αραιώθηκαν με  $25\text{ }\mu\text{L}$  lysis buffer. Έτσι δημιουργήθηκαν τα εξής δείγματα BSA με συγκεντρώσεις  $4\text{ mg/ml}$ ,  $2\text{ mg/ml}$ ,  $1\text{ mg/ml}$ ,  $0,5\text{ mg/ml}$ ,  $0,25\text{ mg/ml}$ ,  $0,125\text{ mg/ml}$ ,  $0\text{ mg/ml}$  (χωρίς BSA) που αποτέλεσαν την καμπύλη αναφοράς. Να σημειωθεί ότι ο τελικός όγκος του δείγματος με συγκέντρωση  $0,125\text{ mg/ml}$  είναι  $50\text{ }\mu\text{L}$  και όχι  $25\text{ }\mu\text{L}$  όπως όλα τα υπόλοιπα, επειδή δε μεταφέρονται στο τελευταίο δείγμα (blank) τα  $25\text{ }\mu\text{L}$  από το προηγούμενο δείγμα. Από αυτά τα δείγματα που παρασκευάστηκαν, λήφθηκαν  $5\text{ }\mu\text{L}$ , τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε κελιά μιας μικροπλάκας (plate). Κάτω από τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς προστέθηκαν  $5\text{ }\mu\text{L}$  από τα δείγματα αγνώστου συγκέντρωσης πρωτεΐνης που παρασκευάστηκαν την προηγούμενη μέρα (lysates). Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο A+S με αναλογία 50:1, δηλαδή  $20\text{ }\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου S ανά  $\text{mL}$  αντιδραστηρίου A. Το αντιδραστήριο A (Reagent A) είναι αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού (φωτοευαίσθητο) και το αντιδραστήριο S (Reagent S) είναι επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις. Σε κάθε κελί που έχει προστεθεί  $5\text{ }\mu\text{L}$  δείγματος, τοποθετούνται  $25\text{ }\mu\text{L}$  από το διάλυμα A+S. Επιπρόσθετα τοποθετούνται σε κάθε κελί  $200\text{ }\mu\text{L}$  από το αντιδραστήριο B (Reagent B), το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος, έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα  $750\text{ nm}$ , κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της BSA μέσω του προγράμματος Graphpad® και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των lysates.

Τα δείγματα της Western Blot παράγονται με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου εργασίας EXCELL®, που υποδεικνύει τις κατάλληλες ποσότητες που πρέπει να προστεθούν από τα Lysates, το Lysis Buffer, η σύσταση του οποίου αναφέρθηκε

προηγουμένως, και το Daves Buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0,004% bromophenol blue, 0.125 M Tris/HCl) σε κάθε δείγμα, ώστε όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν να έχουν συγκέντρωση πρωτεΐνης 50 µg/mL και τελικό όγκο 42 µL. Αφού πραγματοποιηθεί η προσθήκη των ανωτέρω συστατικών, τα δείγματα επωάζονται στους 100°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.

#### 2.6.4 Ηλεκτροφόρηση

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

Αρχικά, για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, παρασκευάζονται δύο ειδών γέλες ακρυλαμιδίου με διαφορετικό ρόλο η κάθε μια.

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

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

Τα gel παρασκευάζονται σε ειδικές γυάλινες πλάκες στο στατώ της Western, οι οποίες αφήνουν κενό 1,5 mm ανάμεσά τους. Οι πλάκες έχουν πλυθεί με απιονισμένο νερό (dd H<sub>2</sub>O). Προστίθεται απιονισμένο νερό ανάμεσα από τις πλάκες και αφήνεται για χρονικό διάστημα περί των 5 λεπτών με σκοπό την εξακρίβωση της στεγανότητας των δύο πλακών. Σε περίπτωση διαρροής οι πλάκες διαχωρίζονται η μία από την άλλη και επανατοποθετούνται στο στατώ έως ότου να μην υπάρχει διαρροή.

Σε δύο πλαστικά falcons παρασκευάζονται οι δύο γέλες ακρυλαμιδίου διαφορετικής σύστασης. Τα δύο αυτά gel διαφέρουν στη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου, αλλά και στην συγκέντρωση των συστατικών και το PH του buffer που χρησιμοποιείται. Η σύσταση των gel φαίνεται στους πίνακες 3 και 4.

**Πίνακας 3:** Σύσταση παρασκευής γελών *Running* και *Stacking*. Οι ποσότητες είναι υπολογισμένες για την παρασκευή 2 γελών.

	Running gel 7.5%	Running gel 10 %	Stacking gel 5%
30% Acrylamide	4 mL	5,33 mL	650 μL
Running Gel Buffer	4.16 mL	4.16 mL	
Stacking Gel Buffer			1.25 mL
dd H <sub>2</sub> O	7.68 mL	6.35 mL	3 mL
APS 10%	160 μL	160 μL	70 μL
TEMED	16 μL	16 μL	7 μL
Bromophenol blue			12 μL

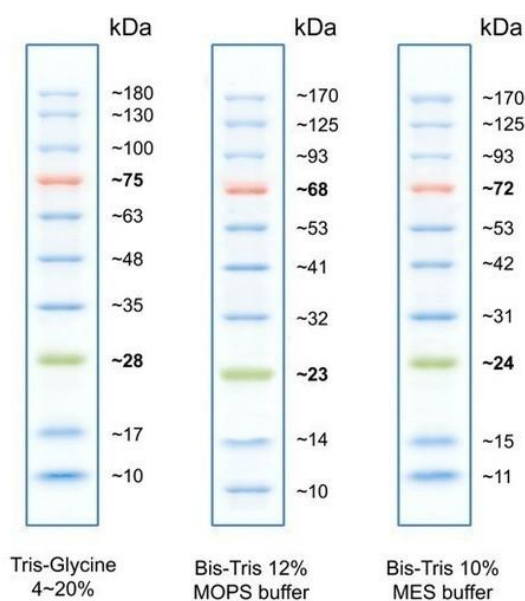
**Πίνακας 4:** Σύσταση των διαλυμάτων *Running Gel Buffer* και *Stacking Gel Buffer*

Running Gel Buffer	Stacking Gel Buffer
91 g TRIS	6 g TRIS
2 g SDS	0.4 G SDS
dd H <sub>2</sub> O	dd H <sub>2</sub> O
Παρασκευή: Τα 91 g TRIS διαλύονται σε ~400 mL H <sub>2</sub> O και μετريέται το pH στο 8,8. Συμπληρώνεται H <sub>2</sub> O έως τα 500 mL και προστίθενται 2 g SDS. Το μείγμα ανακινείται μέχρι να γίνει ομοιογενές.	Παρασκευή: Τα 6 g TRIS διαλύονται σε 40 mL H <sub>2</sub> O και μετريέται το pH στο 6,8. Συμπληρώνεται H <sub>2</sub> O έως τα 100 mL και προστίθενται τα 0,4 g SDS. Το μείγμα ανακινείται μέχρι να γίνει ομοιογενές.

Αφού προστεθούν στα *running gel* το TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) και το APS (Ammonium persulfate) 10% (διαλύουμε 0.1 g σε 1ml dd H<sub>2</sub>O), το μείγμα τοποθετείται άμεσα ανάμεσα από τις πλάκες μέχρι το επιθυμητό ύψος ,επειδή αυτοί αποτελούν τους παράγοντες πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δίνουν την τελική μορφή στη γέλη. Το APS παρέχει το όξινο περιβάλλον που απαιτείται για τον πολυμερισμό και το TEMED προσδίδει την αμινομάδα που χρειάζεται το ακρυλαμίδιο για να αρχίσει τον πολυμερισμό.

Ακολουθεί η προσθήκη dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα επάνω χείλος των πλακών ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σχηματιζόμενες φυσαλίδες και να υπάρχει υγρασία ώστε να μη στεγνώσει το gel εφόσον δημιουργηθεί. Επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της γέλης όταν παρατηρηθεί πήξη στην περίσσεια του μείγματος μέσα στο falcon. Αφού πραγματοποιηθεί η πήξη, η περίσσεια του νερού που προστέθηκε, που βρίσκεται πάνω από το running gel, απορρίπτεται. Αμέσως, κατασκευάζεται σε άλλο falcon το stacking gel και αφού προστεθούν στο μείγμα οι παράγοντες APS και TEMED περιχύνονται άμεσα πάνω από το running gel ανάμεσα στις πλάκες. Αφού πλέον οι πλάκες έχουν γεμίσει μέχρι το άνω χείλος, προστίθενται με προσοχή ειδικό πλαστικό εξάρτημα-χτενάκι για τη δημιουργία των κελιών εντός του stacking gel, στο οποίο θα φορτωθούν τα δείγματα. Το χτενάκι προστίθεται απότομα και με μια κίνηση για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων ανάμεσα στα κελιά. Τα gel που παρασκευάζονται πρέπει να είναι φρέσκα την ημέρα της ηλεκτροφόρησης ή να έχουν φυλαχτεί μέσα σε ddH<sub>2</sub>O στο ψυγείο για μία μέρα.

Τα δείγματα της Western Blot και ο marker μεταφέρονται από τους -80 °C σε πάγο την ημέρα που ξεκινά η ανάλυση. Όλα φυγοκεντρώνονται μέχρι τις 1000x g (spin down) με σκοπό τη συγκέντρωση όλου του όγκου του δείγματος στον πυθμένα του Eppendorf και όχι πιθανόν στα τοιχώματα. Ο marker αποτελεί ένα μείγμα πρωτεϊνών με συγκεκριμένα μοριακά βάρη. Κάθε πρωτεΐνη του marker έχει συγκεκριμένο χρώμα (μπλε, κόκκινο ή πράσινο) και αυτό καθιστά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται στα gel σαφή και κατανοητό καθώς δημιουργούνται ορατές μπάντες που συμβάλλουν στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που αναπτύσσονται στα δείγματα. Ο marker που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα Western Blot είναι ο Nippon Bluestar prestained protein marker (εικόνα 13) :



**Εικόνα 13:** Απεικόνιση του marker που χρησιμοποιείται στη Western Blot σε διάφορα Running Buffer. Στα πειράματα της εργασίας ως running buffer χρησιμοποιήθηκε Tris-Γλυκίνη. [https://www.nippongenetics.eu/bilder/products/protein-elektrophorese/prestained-protein-marker/blue-star0\\_500x5200\\_481x500.jpg](https://www.nippongenetics.eu/bilder/products/protein-elektrophorese/prestained-protein-marker/blue-star0_500x5200_481x500.jpg)

Οι πλάκες που περιέχουν τα gel απομακρύνονται από τα ειδικά στατώ και μεταφέρονται στην ειδική κασέτα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τον κατάλληλο προσανατολισμό. Ανάμεσα στα δύο ζεύγη πλακών τοποθετείται Running Buffer 1x, το οποίο παρασκευάζεται με αραιώση 100ml από το Running Buffer 10x (stock) σε 900ml dd H<sub>2</sub>O.

**Πίνακας 5: Σύσταση Running Buffer 10x**

Running Buffer	
Γλυκίνη	142 g
Tris	30.2 g
SDS	10 g
dd H <sub>2</sub> O	qs 1000 mL

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

Στο πρώτο κελί από τα αριστερά τοποθετείται ο marker όγκου 5 µL που αραιώνεται μέχρι τον όγκο που έχει κάθε δείγμα, πχ 42 µL, με διάλυμα Blank. Το Blank διάλυμα αποτελείται από Daves Buffer (7 µL) και Lysis Buffer (35 µL). Στα υπόλοιπα κελιά τοποθετούνται τα δείγματα ανά ομάδα, για παράδειγμα η ομάδα control, Btz και Cfz. Στο τελευταίο κελί στα δεξιά μπορεί να τοποθετηθεί ακόμα ένας marker, ο οποίος είναι αραιωμένος με Blank διάλυμα σε αναλογία 1:4. Για να είναι τα αποτελέσματα αξιοποιήσιμα ανάμεσά τους, πρέπει σε κάθε γέλη να φορτώνονται δείγματα από όλες τις ομάδες. Αφού ολοκληρωθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα κελιά, αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 80 Volt έως ότου διαχωριστεί καλά ο marker και οι έγχρωμες μπάντες να γίνουν διακριτές. Έπειτα, ανεβαίνει η τάση στα 120-130 Volt μέχρι να παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν με βάση τα μοριακά τους βάρη, που αντιστοιχούν στην αντίστοιχη έγχρωμη μπάντα όπως έχει προαναφερθεί. Η αναμονή στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5 ώρες ανάλογα την περιεκτικότητα της γέλης σε ακρυλαμίδιο.

### 2.6.5 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβρανικό υπόστρωμα- Transportation

Λίγο πριν το τέλος της ηλεκτροφόρησης μεμβράνες Polyvinylidene difluoride (PVDF) με πόρους 0,45 nm κόβονται στο μέγεθος των gel και επωάζονται σε μεθανόλη για 10 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθούν και να είναι σε θέση να δεσμεύσουν τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί και υπάρχουν στη γέλη. Ακολουθεί επώαση για άλλα 10 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς (Transportation (ή Transfer) Buffer). Παράλληλα αφαιρείται προσεκτικά η κασέτα από τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και οι δύο πλάκες που περιέχουν το gel διαχωρίζονται προσεκτικά με ειδική σπάτουλα. Η γυάλινη πλάκα φέρεται προς την πλευρά εκείνη που κολλάει η γέλη και το stacking gel αποκόπτεται με την ειδική σπάτουλα με βάση τη διαχωριστική γραμμή που έχει σχηματιστεί ανάμεσα στο running και stacking gel. Το running gel, που περιέχει τις ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες, επωάζεται σε transfer buffer, ίδιας σύστασης με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά, για 10 λεπτά με στόχο την εξισορρόπηση της διαφοράς pH και SDS μεταξύ running και transfer buffer.

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

**Πίνακας 6:** Σύσταση *transfer buffer* 1 L

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

Μετά την ολοκλήρωση του transportation, ελέγχεται αν έχει μεταφερθεί ο marker στη μεμβράνη. Αν αυτό δεν έχει συμβεί, πιθανότατα για κάποιο λόγο δεν έγινε το transportation γι' αυτό δεν πρέπει να μετακινηθεί το gel από τη μεμβράνη και να επαναλαμβάνεται το transportation. Εάν η διαδικασία έγινε επιτυχώς, ανοίγεται η κασέτα με τη μαύρη πλευρά προς τα πάνω, αφαιρείται το σφουγγάρι, τα δυο διηθητικά χαρτιά και εμφανίζεται η PVDF με τον πυκνό marker στα αριστερά και την πλευρά στην οποία έχει γίνει η μεταφορά. Η PVDF κόβεται περιμετρικά και στην άνω αριστερή γωνία ώστε να τοποθετείται πάντα το κόψιμο πάνω αριστερά για να δηλώνεται ποια είναι η πλευρά της μεμβράνης που έχει γίνει η μεταφορά.

### 2.6.6 Blocking

Το Blocking είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τη Western Blot καθώς εξυπηρετεί την ανάγκη αποκλεισμού των περιοχών πρόσδεσης της μεμβράνης που δεν έχουν πρωτεΐνες ώστε να μειωθεί η σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων εκεί και να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Με αυτόν τον τρόπο όταν προστίθεται το αντίσωμα προσδένεται μόνο με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Το διάλυμα Blocking έχει σύσταση 5% γάλα σε TBS Tween 1%. Το γάλα είναι αποβουτυρωμένο και βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Το διάλυμα TBS Tween παρασκευάζεται με ανάμιξη 100 mL TBS 10x με 900 mL dd H<sub>2</sub>O και 1 mL Tween 20.

**Πίνακας 7:** Σύσταση του TBS 10x Buffer (stock)

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



Η ποσότητα στην οποία εμβαπτίζεται κάθε μεμβράνη είναι περίπου 25 mL και επώάζεται για τουλάχιστον 1 ώρα. Όταν παρέλθει αυτό το χρονικό διάστημα, το διάλυμα Blocking απορρίπτεται και η PVDF εκπλένεται για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, η PVDF καλύπτεται με ζελατίνη και με τη βοήθεια χάρακα και νυστεριού κόβεται σε λωρίδες με οδηγό τις στοιβάδες του marker, μεταξύ των kDa όπου αναμένονται να ληφθούν οι προσδιοριζόμενες πρωτεΐνες.

### **2.6.7 Πρωτογενές Αντίσωμα**

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

### **2.6.8 Δευτερογενές Αντίσωμα**

Μετά από την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα οι μεμβράνες εκπλένονται για 5 λεπτά με TBS-Tween 1%. Ταυτόχρονα παρασκευάζεται το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (Secondary antibody). Σε διάλυμα Blocking (5% γάλα διαλυμένο σε TBS 1x 0.1% Tween) αραιώνεται το δευτερογενές αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:2000. Το δευτερογενές αντίσωμα που επιλέγεται εξαρτάται από την προέλευση του πρωτογενούς. Για παράδειγμα εάν το πρωτογενές έχει παρασκευαστεί σε κόνικλο, το δευτερογενές που θα χρησιμοποιηθεί θα είναι Anti-Rabbit. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε το δευτερογενές αντίσωμα να μην προορίζεται για το ίδιο ζώο από το οποίο προέρχονται τα αρχικά δείγματα διότι κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε σημαντική μείωση της εκλεκτικότητας δεδομένου ότι το αντίσωμα θα συνδεόταν και με τις IgG ανοσοσφαιρίνες του ζώου. Οι μεμβράνες επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αυτές εκπλένονται με TBS-Tween 1% 2 φορές για 10 λεπτά έκαστη ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων που δεν προσκολλήθηκε στη μεμβράνη.

### **2.6.9 Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο**

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

Μέσα στο σκοτεινό θάλαμο φυλάσσονται τα ειδικά φωτογραφικά φιλμ και τα αντιδραστήρια της εμφάνισης, δηλαδή το διάλυμα ανάπτυξης σήματος (detector



/developer) και το διάλυμα σταθεροποίησης (fixer). Με την βοήθεια, κόκκινου φωτός (IR) εντός του θαλάμου τα διαλύματα developer και fixer τοποθετούνται σε λεκάνες, αφού αραιωθούν πρώτα με νερό (σε 200 ml πυκνού διαλύματος detector ή fixer προστίθεται 800 ml νερού), ώστε να είναι δυνατή η επώαση των φωτογραφικών φιλμ. Κομμάτια φωτογραφικού φιλμ τοποθετούνται πάνω από τις μεμβράνες αρχικά για 40 δευτερόλεπτα ,που εκπέμπουν χημειοφωταύγεια ανάλογη της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε, και η συσκευή εμφάνισης κλείνει ερμητικά. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το φιλμ εμβαπτίζεται στο detector μέχρι την εμφάνιση σήματος. Εφόσον η εικόνα είναι ευκρινής, τότε το φιλμ εκπλένεται ελαφρώς σε νερό και εμβαπτίζεται στο 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, έως τη λήψη μία εικόνας με διακριτές μπάντες.

Μετά την εμφάνιση, οι μεμβράνες εκπλένονται με TBS-Tween 1 ‰ και μπορούν είτε να φυλαχθούν στους -20°C ώστε να επαναχρησιμοποιηθούν αν είναι απαραίτητο είτε να υποστούν τη διαδικασία του stripping.

#### **2.6.10 Διαδικασία αποδέσμευσης μεμβρανών από παλιά αντισώματα-Stripping**

Στην περίπτωση προσδιορισμού ολικής ή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ή μέτρησης κάποιας άλλης πρωτεΐνης παρόμοιου μοριακού βάρους με την προσδιοριζόμενη, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης των ίδιων μεμβρανών με τη διαδικασία του Stripping. Υπάρχουν δύο τύποι stripping.

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

Ύστερα το πέρας του χρονικού ορίου της επώασης σε οποιοδήποτε από τα δύο Stripping Buffer ακολουθούν πέντε εκπλύσεις των πέντε λεπτών η κάθε μία με TBS-Tween 1 ‰. Μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων ακολουθεί η διαδικασία του Blocking για μία ώρα και η διαδικασία της επώασης πρωτογενούς, δευτερογενούς αντισώματος και εμφάνιση στο σκοτεινό θάλαμο όπως έχει προαναφερθεί.

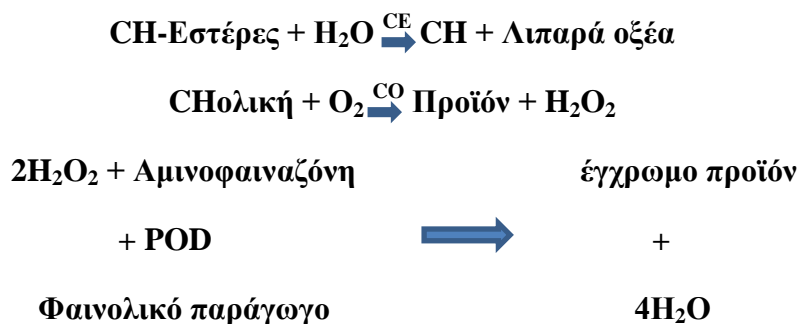
Να αναφερθεί ότι για κάθε σκαφίδιο χρησιμοποιούνται περίπου 20 mL Buffer. Η σύσταση των δύο Buffer είναι η εξής:

Stripping Buffer		Mild Stripping Buffer	
Tris	7.6 g	Glycine 25 mM	9 mL
SDS	20 g	SDS 10 %	1 mL
dd H <sub>2</sub> O	1000 mL	Tween	50 μL
Παρασκευή: Σε 800 mL dd H <sub>2</sub> O προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά, το pH μετριέται στο 6,8 και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 1000 mL. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το stock.		Παρασκευή: Απλή ανάμιξη των συστατικών. Το SDS 10% παρασκευάζεται τελευταία στιγμή και αυτό πραγματοποιείται με τη ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας SDS που διαλυτοποιείται στην γλυκίνη.	

**Πίνακας 8:** Σύσταση Stripping Buffer 1 L και Mild Stripping Buffer 10 mL.

## 2.7 Προσδιορισμός Ολικής Χοληστερόλης στο πλάσμα των πειραματόζωων

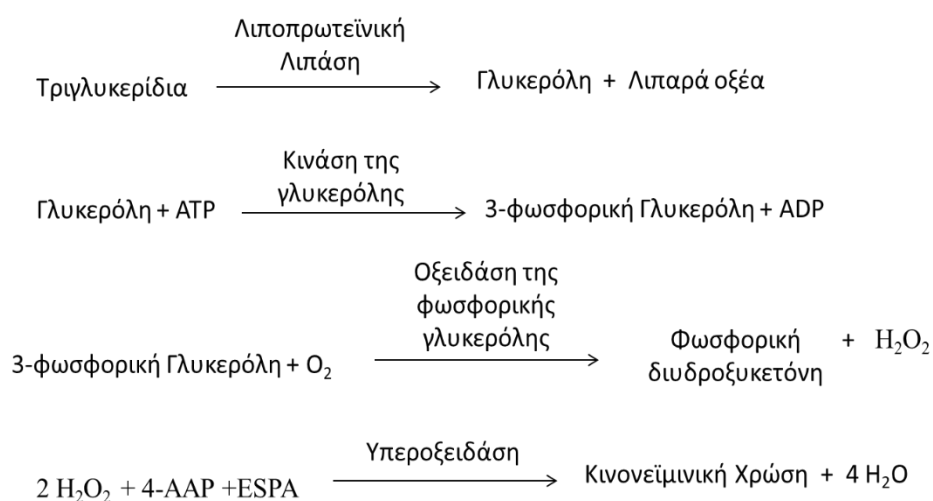
Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης στο αίμα (πλάσμα) πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια της Biosis.<sup>74</sup> Σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού, όταν παρίσταται το ένζυμο χοληστερολο-εστεράση (CE) η εστεροποιημένη χοληστερόλη του δείγματος υδρολύεται προς χοληστερόλη (CH) και η ολική CH παρουσία της χοληστερολο-οξειδάσης (CO) οξειδώνεται και παράγει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου αλληλεπιδρά με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη. Ο καταλύτης αυτής της αντίδρασης είναι η υπεροξειδάση (POD) και ύστερα από επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά, παράγεται έγχρωμο προϊόν ανοιχτού ιώδες χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο δείγμα.





## 2.9 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων στο πλάσμα των πειραματόζωων

Ο προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων στο αίμα (πλάσμα) πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια της Caymann.<sup>76</sup> Σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται από λιπάση και παράγεται γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη που απελευθερώνεται υπολογίζεται μέσω μιας ενζυματικής αντίδρασης. Η γλυκερόλη, η οποία είχε απελευθερωθεί ύστερα από την επίδραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, φωσφοριλιώνεται και παράγεται η 3-φωσφορική-γλυκερόλη σε μία αντίδραση η οποία καταλύεται από την κινάση της γλυκερόλης. Η 3-φωσφορική-γλυκερόλη οξειδώνεται από την οξειδάση της φωσφορικής γλυκερόλης και παράγεται μια φωσφορική διυδροξυκετόνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η υπεροξειδάση καταλύει την οξειδωαναγωγική συζευγμένη αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με την 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) και την N-αιθυλο-N-(3σουλφοπυρυλο)-m-ανισιδίνη (ESPA), παράγοντας μια λαμπρή ιώδης χρώση. Η απορρόφηση μετράται στα 530-550 nm.



**Σχήμα 3:** Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει το σχηματισμό καμπύλης αναφοράς από πρότυπο διάλυμα που παρέχεται στο κιτ. Τοποθέτηση της καμπύλης αναφοράς σε πλάκα 96 θέσεων καθώς και 10  $\mu\text{L}$  πλάσματος από τα δείγματα σε κάθε ένα από τα επόμενα κελιά. Προσθήκη σε όλα τα κελιά διαλύματος που περιέχει τα απαραίτητα ένζυμα. Η πλάκα καλύπτεται και ανακινείται προσεκτικά για λίγα δευτερόλεπτα. Επιάζεται η πλάκα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τελικώς μετριέται η απορρόφηση στα 540 nm. Τα αντιδραστήρια ήταν όλα σε θερμοκρασία δωματίου.

## 2.10 Προσδιορισμός της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) στο πλάσμα των πειραματόζωων

Ο υπολογισμός της LDL χοληστερόλης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Friedewald, ύστερα από τον υπολογισμό της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα, της HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.<sup>77</sup> Περιορισμός της μεθόδου είναι η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων, που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 400 mg/dl. Η εξίσωση του Friedewald ( $LDL = \text{Ολική Χοληστερόλη} - HDL - \text{Τριγλυκερίδια}/5$ ) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της λιποπρωτεΐνης και σε πειραματόζωα.<sup>78</sup>

## 2.11 Απομόνωση μονοπυρηνικών κυττάρων περιφερικού αίματος

Τα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral blood mononuclear cell-PBMCs) απομονώθηκαν με τη χρήση του Lymphosep [πυκνότητας 1.077 g/ml (Biosera)]. Το αίμα αραιώθηκε σε αναλογία 1:1 με PBS (phosphate-buffered saline). Το αραιωμένο αίμα επιστρώθηκε προσεκτικά πάνω από το μέσο διαχωρισμού (1/2 χ όγκος του δείγματος) και οι δύο φάσεις διατηρήθηκαν διαχωρισμένες πριν από τη φυγοκέντρωση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 400x g για 30 λεπτά στους 20°C. Τα PBMC συλλέχθηκαν μετά από αναρρόφηση των στοιβάδων πλάσματος και αιμοπεταλίων, εκκλύθηκαν με PBS και ήταν έτοιμα προς περαιτέρω επεξεργασία.<sup>79</sup>

## 2.12 Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των πεπτιδασών του πρωτεασώματος, δηλαδή των ενεργών κέντρων του καταλυτικού πυρήνα του πρωτεασώματος, ο απομονωμένος καρδιακός ιστός των μυών και τα απομονωμένα PBMCs υποβλήθηκαν σε κατάλληλη επεξεργασία σε πάγο σε τέτοιο ρυθμιστικό διάλυμα με σκοπό την ακέραιη απομόνωση των 26S πρωτεοσωμάτων. Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών καθορίστηκε με την τεχνική Bradford και τα υπερκείμενα υγρά χρησιμοποιήθηκαν αμέσως (μετά την προσθήκη των φθορογενών υποστρωμάτων) για τον προσδιορισμό της χυμοθρυψίνης- (CT-L). Ο εκπεμπόμενος φθορισμός καταγράφηκε με σύστημα VersaFluor Fluorometer System (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) σε μήκος κύματος διέγερσης 350 nm και εκπομπής 450 nm.<sup>79</sup>

## 2.13 Μέτρηση γλυκόζης στο πλάσμα των πειραματόζωων

Τα επίπεδα γλυκόζης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μετρήθηκαν από το πλάσμα των μυών με τη συσκευή μέτρησης γλυκόζης AccuChek Instant της Roche.

## 2.14 Στατιστική Ανάλυση

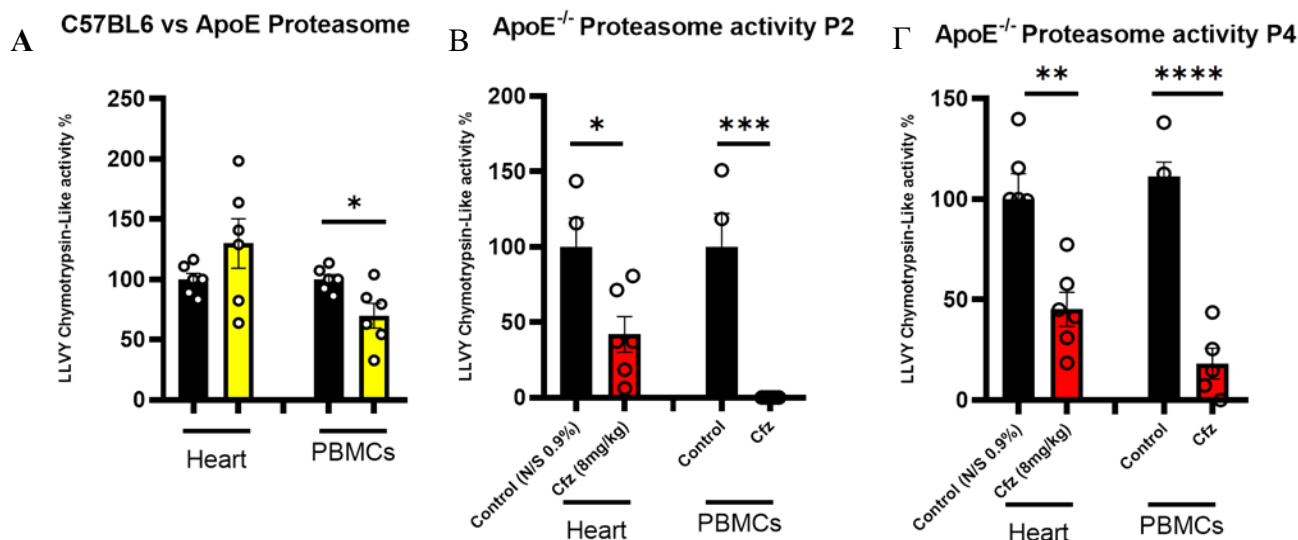
Όλες οι τιμές που θα παρουσιαστούν στο επόμενο κεφάλαιο εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (S.E.M). Κάθε μετρημένη τιμή της μεταβλητής  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η στατιστική σημαντικότητα ως \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Οι συνεχείς μεταβλητές μεταξύ δύο ομάδων συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Student's Test (T-Test), unpaired, two-tailed, ενώ οι συνεχείς μεταβλητές μεταξύ τριών ή περισσότερων ομάδων συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία One-way ANOVA και το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων (multiple comparison test) Tukey. Τέλος, για τη σύγκριση των τιμών βάρους και των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε σύγκριση των τιμών με πολλαπλά T-Test (multiple T-Test comparison) και τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Sidak και Tukey. Τέλος ελέγχθηκε ότι οι χρησιμοποιηθείσες τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism έκδοση 6 (Graph Pad Software, Inc.).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά ελέγξαμε εάν η λειτουργία του πρωτεασώματος διαταράσσεται στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενεργότητας της πεπτιδάσης που βρίσκεται στη β5 θέση του 20S πρωτεασώματος, τη θέση της χυμοθριψίνης.

#### 3.1 Η ενεργότητα του πρωτεασώματος των ApoE<sup>-/-</sup> μυών σε σύγκριση με μύες C57BL/6 δε μεταβάλλεται, ενώ η Cfz αναστέλλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στα πρωτόκολλα 2 και 4 δόσεων στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών.

Βάσει της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος στο μυοκαρδιακό ιστό και στα PBMCs, με τη μέθοδο που αναφέρθηκε, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στα περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος στα διαγονιδιακά πειραματόζωα (Σχήμα 4A). Στο πρωτόκολλο των δύο δόσεων παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στο μυοκάρδιο και στα PBMCs, ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και καρφιλζομίμπης (Σχήμα 4B). Στο πρωτόκολλο των τεσσάρων δόσεων η μείωση της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος είναι στατιστικά σημαντική στο μυοκάρδιο και στα PBMCs στους μύες που έλαβαν καρφιλζομίμπη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 4Γ)

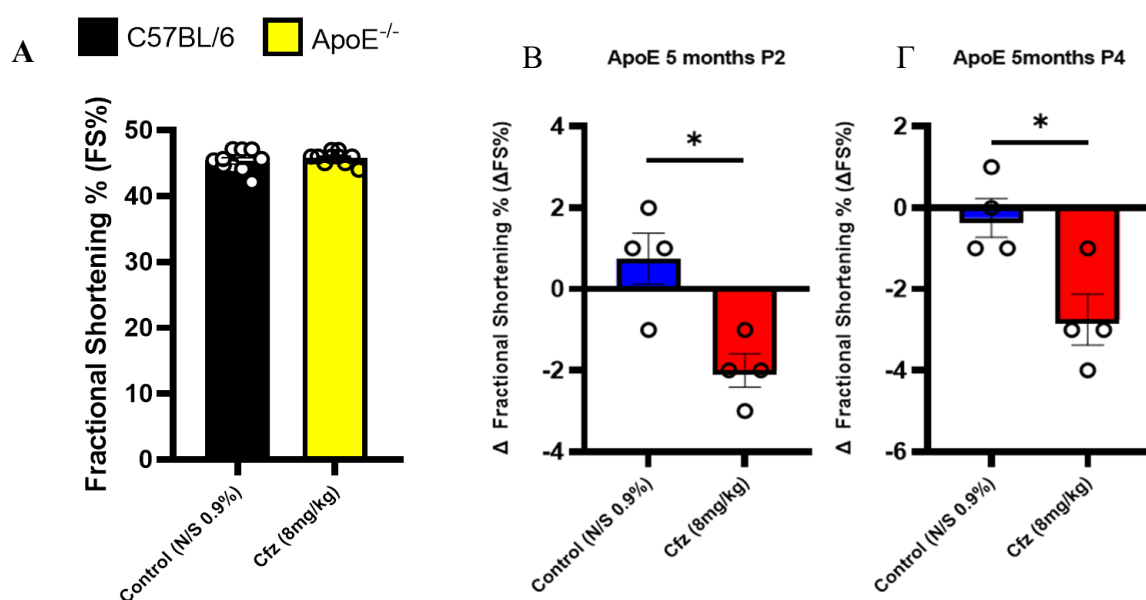


Σχήμα 4: Διαγράμματα ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος. (A) C57BL6 (n=6) VS ApoE (n=6), (B) Control (n=4) vs Cfz (n=6) πρωτόκολλο 2 δόσεων, (Γ) Control (n=6) vs Cfz(n=6) πρωτόκολλο 4 δόσεων (T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001)

Αφού επιβεβαιώθηκε η αναστολή του πρωτεασώματος, μελετήθηκε στη συνέχεια η καρδιακή λειτουργία των μυών.

### 3.2 Το FS% δε μεταβάλλεται μεταξύ των ApoE<sup>-/-</sup> και C57BL/6 μυών, ενώ η Cfz μειώνει το FS% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για τα πρωτόκολλα των 2 και των 4 δόσεων.

Σύμφωνα με την υπερηχογραφική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε, διαπιστώθηκε ότι οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες δεν παρουσιάζουν καρδιακή δυσλειτουργία σε σύγκριση με τους μύες C57BL/6 5 μηνών, καθώς το FS% δε μεταβάλλεται (Σχήμα 5A). Η καρφιλζομίμη μειώνει στατιστικώς σημαντικά το ΔFS% στα πρωτόκολλα των δύο και τεσσάρων δόσεων, P2 και P4 αντίστοιχα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 5B, Γ). Η μείωση αυτή δηλώνει βλάβη της καρδιακής συσταλτικότητας.



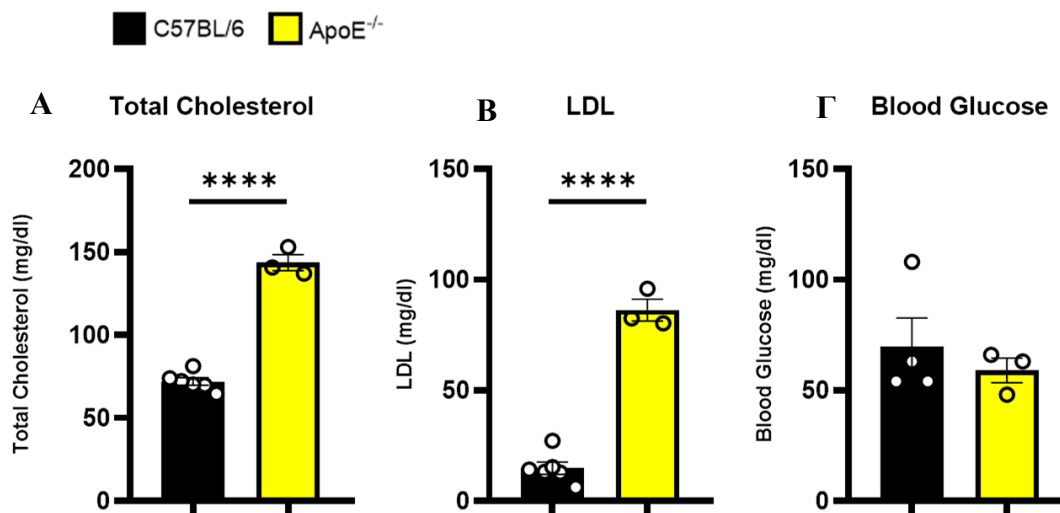
**Σχήμα 5:** Διαγραμματική απεικόνιση (A) FS% μεταξύ Control (n=10) και Cfz (n=10) ομάδων (B), (Γ) ΔFS% ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και καρφιλζομίμη στα πρωτόκολλα των δύο (Control n=4, Cfz n=4) και των τεσσάρων δόσεων (Control n=4, Cfz n=4), αντίστοιχα. (T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05)

Γνωρίζοντας ότι οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες, λόγω της έλλειψης της απολιποπρωτεΐνης E, έχουν διαταραγμένη την ομοιόσταση των λιπιδίων<sup>54</sup>, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια οι κατάλληλες βιοχημικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό των λιπιδίων τους στο πλάσμα.



### 3.3 Οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες έχουν αυξημένη την ολική και LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με φυσιολογικούς μύες C57BL/6, ενώ δε μεταβάλλονται τα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ αυτών των ομάδων.

Αρχικά, για τα λιπίδια στο πλάσμα παρατηρήθηκε ότι, οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες έχουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη την ολική και την LDL χοληστερόλη σε σχέση με τους C57BL/6 μύες. Επιπροσθέτως, η γλυκόζη των ApoE<sup>-/-</sup> μυών δε μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά. (Σχήμα 6 Α-Γ)



Σχήμα 6: Διαγράμματα (Α) ολικής χοληστερόλης (mg/dl), C57BL/6 (n=6) και ApoE<sup>-/-</sup> (n=6), (Β) LDL χοληστερόλης (mg/dl) C57BL/6 (n=6) και ApoE<sup>-/-</sup> (n=3) και (Γ) γλυκόζης αίματος C57BL/6 (n=) και ApoE<sup>-/-</sup> (n=3), (T test, unpaired, two-tailed; \*\*\*\*p<0.0001)

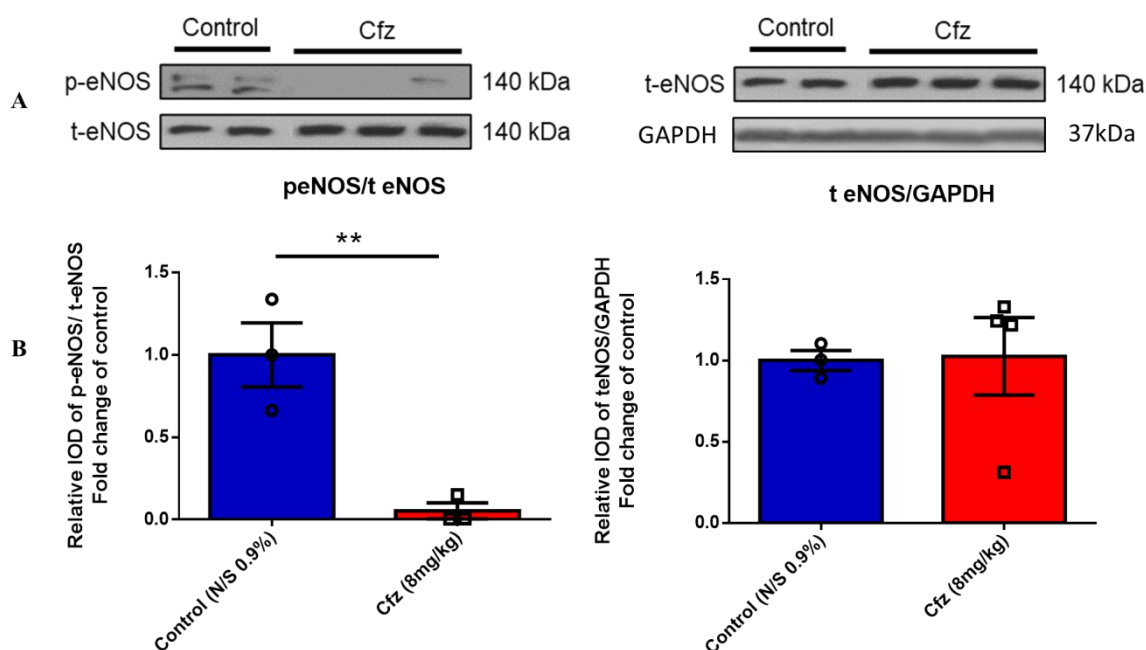
Έχοντας πλέον χαρακτηρίσει το μοντέλο των ApoE<sup>-/-</sup>, ερευνήθηκαν μοριακά μονοπάτια που μπορεί να εμπλέκονται στην επαγόμενη καρδιοτοξικότητα της καρφιλζομίμης.

### 3.4 Αποτελέσματα από τις Western Blot στο πρωτόκολλο 2 δόσεων Cfz στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών.

#### 3.4.1 Η Cfz μειώνει την φωσφορυλίωση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφραση της eNOS μεταξύ των ομάδων.

Βάσει της προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας, μελετήσαμε τις πρωτεΐνες που εμπλέκονταν στα μοριακά μονοπάτια της επαγόμενης καρδιοτοξικότητας από την καρφιλζομίμη.<sup>33</sup> Αρχικά, στην ομάδα της καρφιλζομίμης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της eNOS σε σχέση με την ομάδα

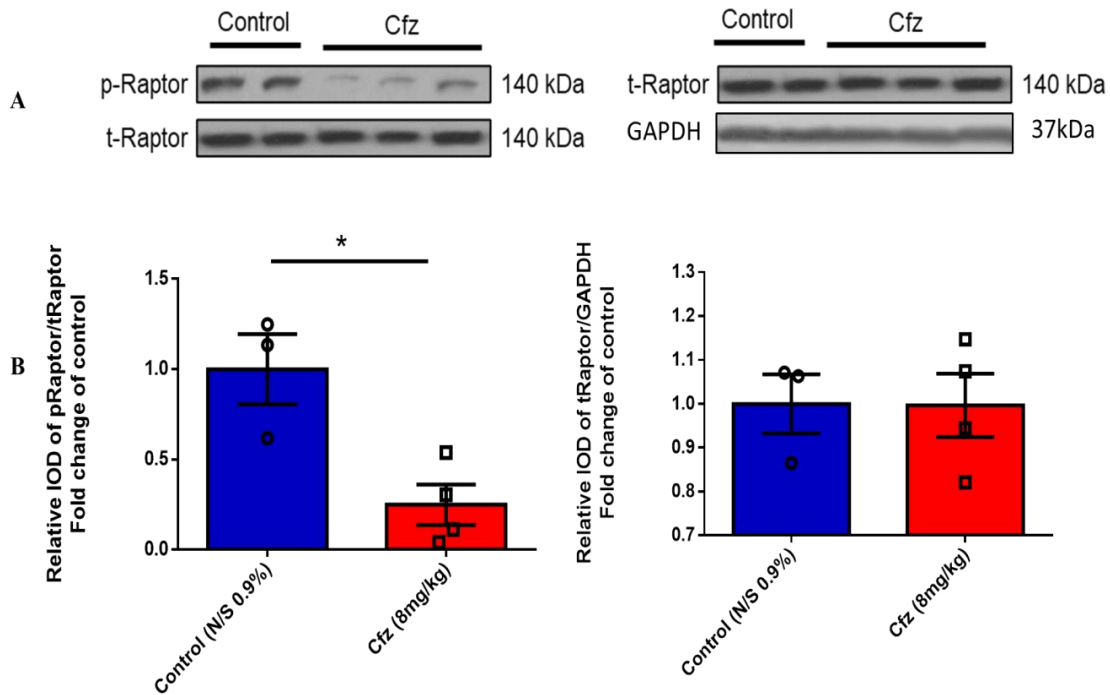
ελέγχου. Η ολική eNOS δεν μεταβλήθηκε στατιστικώς σημαντικά ως προς την έκφρασή της σε καμία πειραματική ομάδα. (Σχήμα 7)



**Σχήμα 7:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων *peNOS/teNOS*, *teNOS/GAPDH* εκφρασμένων ως *fold change of control*, Control (n=3) και Cfx (n=4). (T test, unpaired, two-tailed; \*\*p<0.01

### 3.4.2 Η Cfx μειώνει τη φωσφορυλίωση του Raptor σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή του.

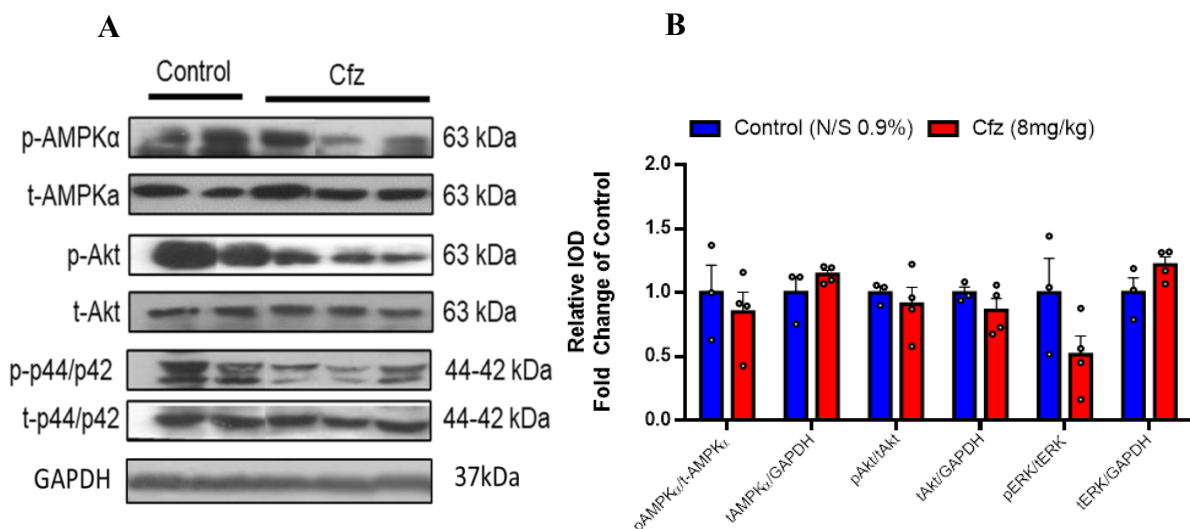
Στη συνέχεια μελετήθηκε το μονοπάτι της αυτοφαγίας, μέσω της πρωτεΐνης του Raptor. Στην ομάδα της καρφιλζομίμπης παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης του Raptor σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ολική έκφραση του Raptor δε μεταβάλλεται. (Σχήμα 8)



**Σχήμα 8:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων pRaptor/tRaptor, tRaptor/GAPDH εκφρασμένων ως fold change of control, Control (n=3) και Cfx (n=4). (T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05)

### 3.4.3 Η φωσφορυλίωση και η έκφραση των AMPKα, Akt και Erk 1/2, δεν μεταβάλλονται με τη χορήγηση καρφιλοζομίμης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Μετέπειτα ελέγχθηκε η AMPKα ως upstream του Raptor<sup>80</sup> καθώς και οι πρωτεΐνες Akt και Erk1/2 που σχετίζονται με την απόπτωση<sup>43,81</sup>. Στην ομάδα της καρφιλοζομίμης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη φωσφορυλίωση και στην έκφραση των AMPKα, Akt και Erk 1/2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 9)

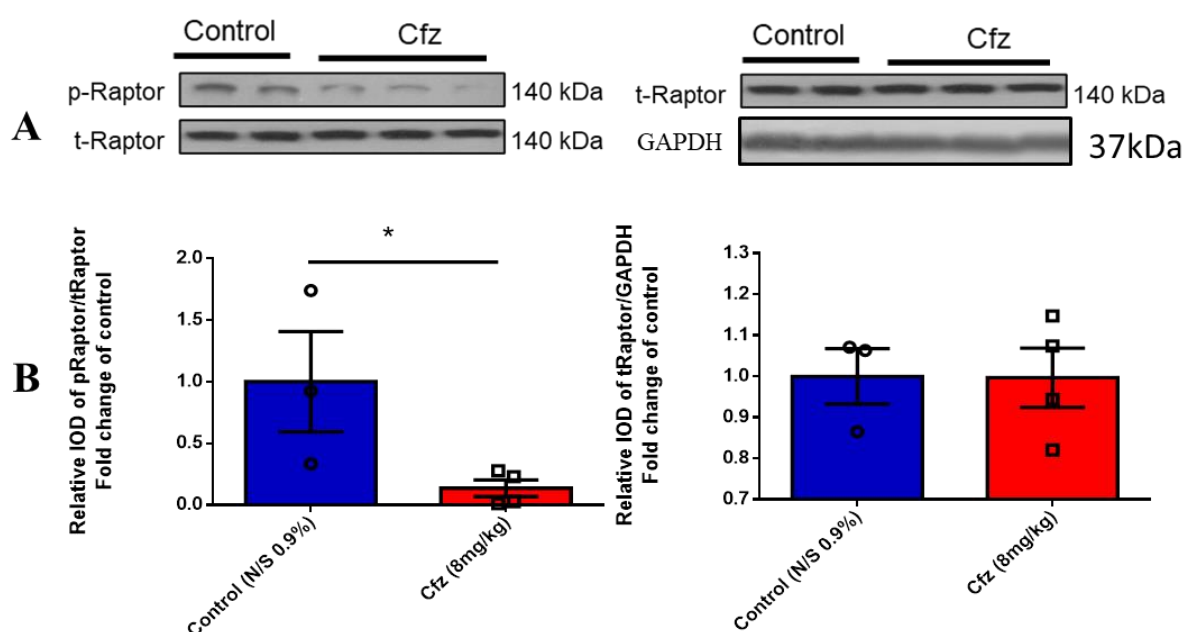


**Σχήμα 9:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων pAMPKα/tAMPKα, tAMPKα/GAPDH, pAkt/tAkt, tAkt/GAPDH, pERK/tERK, tERK/GAPDH εκφρασμένων ως fold change of control, Control (n=3) και Cfx (n=4). (Two way ANOVA, Bonferroni's και Tukey' test)

### 3.5 Αποτελέσματα Western Blot από το πρωτόκολλο των 4 δόσεων Cfz στους $\text{ApoE}^{-/-}$ μύες 5 μηνών.

#### 3.5.1 Η χορήγηση της Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση του Raptor σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή του.

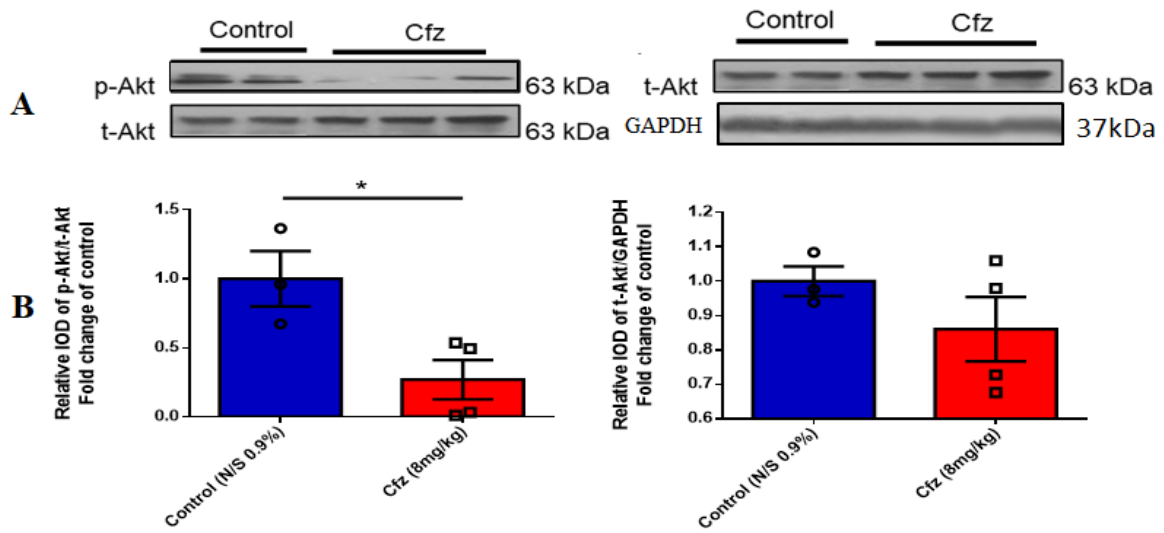
Στο πρωτόκολλο των 4 δόσεων, η καρφιλζομίμη μειώσε στατιστικώς σημαντικά τη φωσφορυλίωση του Raptor, ενώ δεν άλλαξε την έκφρασή του σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 10)



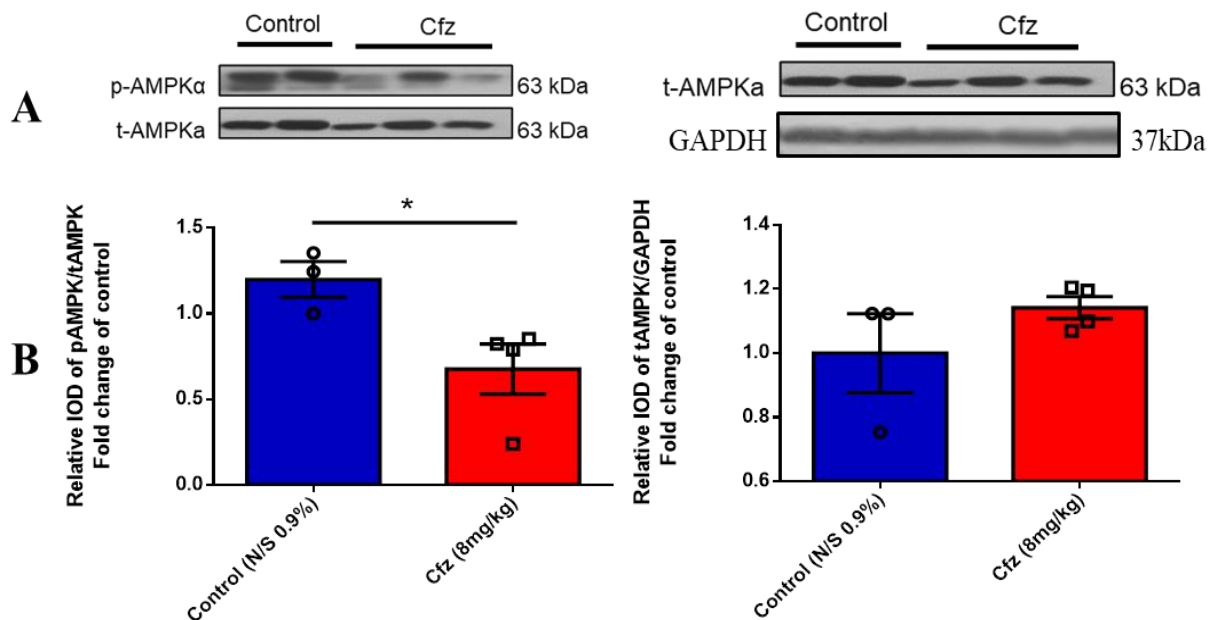
Σχήμα 10: (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων  $p\text{Raptor}/t\text{Raptor}$ ,  $t\text{Raptor}/\text{GAPDH}$  εκφρασμένων ως fold change of control, Control ( $n=3$ ) και Cfz ( $n=4$ ). (T test, unpaired, two-tailed;  $*p<0.05$ )

#### 3.5.2 Η Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση της Akt και της AMPKα, χωρίς να μεταβάλλεται η έκφρασή τους σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Ακολουθώντας τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο 2, μελετήθηκε η ρύθμιση των πρωτεϊνών Akt και AMPKα. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν έφερε αλλαγή στην έκφρασή της (Σχήμα 11). Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και για την AMPKα (Σχήμα 12).



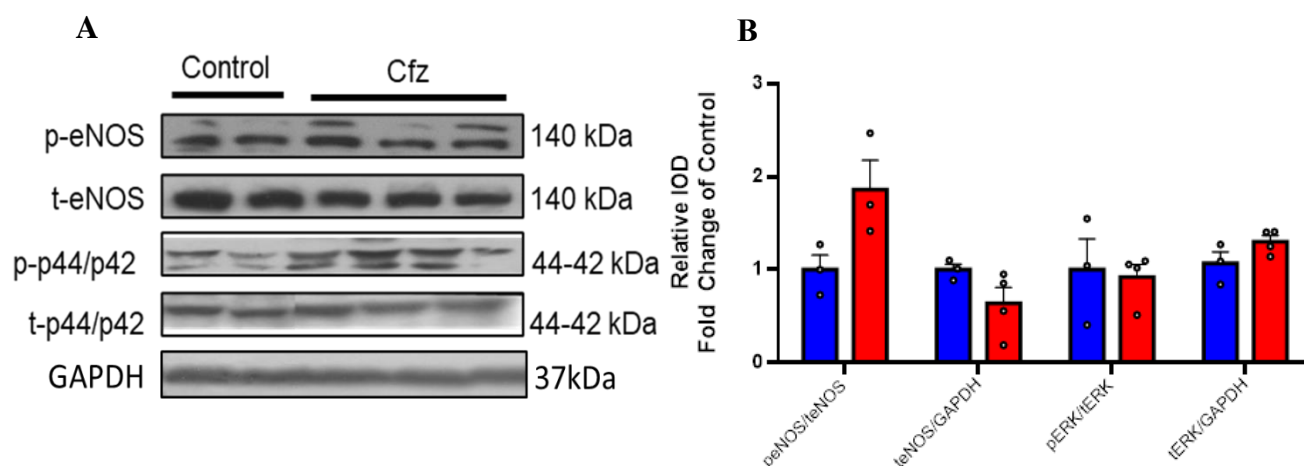
**Σχήμα 11:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων *p-Akt/tAkt*, *tAkt/GAPDH* εκφρασμένων ως *fold change of control*, Control ( $n=3$ ) και Cfx ( $n=4$ ). (T test, unpaired, two-tailed;  $*p<0.05$ )



**Σχήμα 12:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων *p-AMPKα/t-AMPKα*, *t-AMPKα/GAPDH* εκφρασμένων ως *fold change of control*, Control ( $n=3$ ) και Cfx ( $n=4$ ). (T test, unpaired, two-tailed;  $*p<0.05$ )

### 3.5.3 Η χορήγηση της Cfz δε μεταβάλλει τη φωσφορυλίωση και την έκφραση της eNOS και των Erk1/2 στο πρωτόκολλο των 4 δόσεων, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Επιπλέον, σε αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στη φωσφορυλίωση και την έκφραση των πρωτεϊνών eNOS και Erk1/2, ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και καρφυλιζομίμης. (Σχήμα 13)



**Σχήμα 13:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων p-eNOS/teNOS, teNOS/GAPDH εκφρασμένων ως fold change of control, Control (n=3) και Cfz (n=4). (Two way ANOVA, Bonferroni's και Tukey's test)

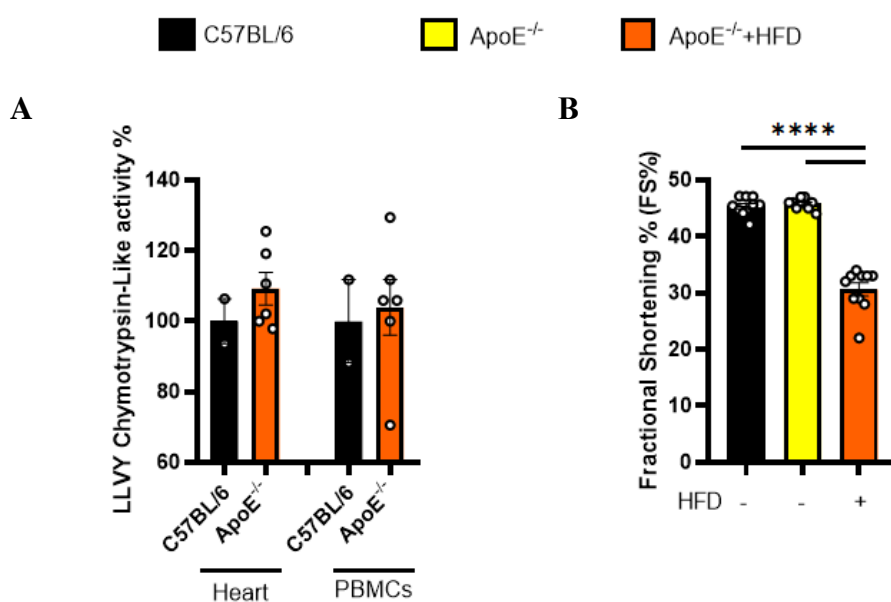
Επιβεβαιώσαμε λοιπόν ότι σε ένα μοντέλο ήπιας υπερλιπιδαιμίας η καρφυλιζομίμη επάγει καρδιοτοξικότητα τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 δόσεις σε συμφωνία με την προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας και με μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει τη διαταραχή του μονοπατιού της AMPKα.

Στη συνέχεια της εργασίας μας, μελετήσαμε έναν δριμύτερο φαινότυπο από τον προηγούμενο, αυτόν των ApoE<sup>-/-</sup> μυών που έλαβαν διατροφή υψηλή σε λιπαρά, καθώς γνωρίζουμε ότι αυτό το μοντέλο έχει εγκατεστημένο αθηρωματικό και υπερλιπιδαιμικό φαινότυπο στην ηλικία των 5 μηνών<sup>54</sup>. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να διερευνήσουμε εάν η δριμύτητα της υπερλιπιδαιμίας επηρεάζει αφ' ενός την καρδιοτοξικότητα της καρφυλιζομίμης και αφ' ετέρου την καρδιοπροστατευτική δράση της μετορμίνης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενεργότητας του πρωτεασώματος και της καρδιακής λειτουργίας.

### 3.6 Η ενεργότητα του πρωτεασώματος δε μεταβάλλεται μεταξύ των μυών ApoE<sup>-/-</sup> +HFD σε σύγκριση με μύες C57BL/6, ενώ η διατροφή δυτικού τύπου οδηγεί σε μείωση του FS% στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες.

Μελετώντας την ενεργότητα του πρωτεασώματος δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε στο μυοκάρδιο αλλά ούτε στα PBMCs μεταξύ των ApoE<sup>-/-</sup> μυών που έχουν λάβει 14 εβδομάδες διατροφή δυτικού τύπου και των μυών C57BL/6 (Σχήμα 14A). Επιπρόσθετα, όσον αφορά την καρδιακή συσταλτικότητα παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση του FS% μόνο στην ομάδα των ApoE<sup>-/-</sup> υπό διατροφή δυτικού τύπου σε σχέση με τις ομάδες C57BL/6 και ApoE<sup>-/-</sup> 5 μηνών, που έλαβαν φυσιολογική διατροφή (Σχήμα 14B). Συνεπώς, το συγκεκριμένο μοντέλο εκτός από δριμύτερο μοντέλο υπερλιπιδαιμίας-αθηρωμάτωσης εμφανίζει εγκατεστημένη καρδιομυοπάθεια, όπως δηλώνεται και στη βιβλιογραφία<sup>71</sup>.

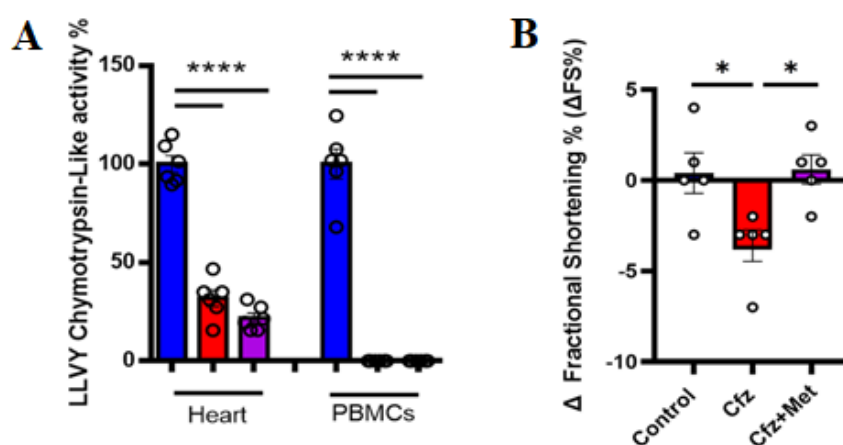


**Σχήμα 14:** (A) Δοκιμασία ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος στο μυοκάρδιο και στα PBMCs μεταξύ μυών C57BL/6 (n=2) και μυών ApoE<sup>-/-</sup> + HFD (n=6), (T test, unpaired, two-tailed). (B) Διάγραμμα του FS% μεταξύ των ομάδων C57BL/6 (n=10), ApoE<sup>-/-</sup> με φυσιολογική διατροφή (n=10) και ApoE<sup>-/-</sup> με διατροφή δυτικού τύπου HFD (n=10). One way ANOVA, Tukey'test, \*\*\*\*p<0.0001



### 3.6.1 Η χορήγηση της Cfz μειώνει το FS% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της συγχορήγησης με μετφορμίνη και παράλληλα μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος.

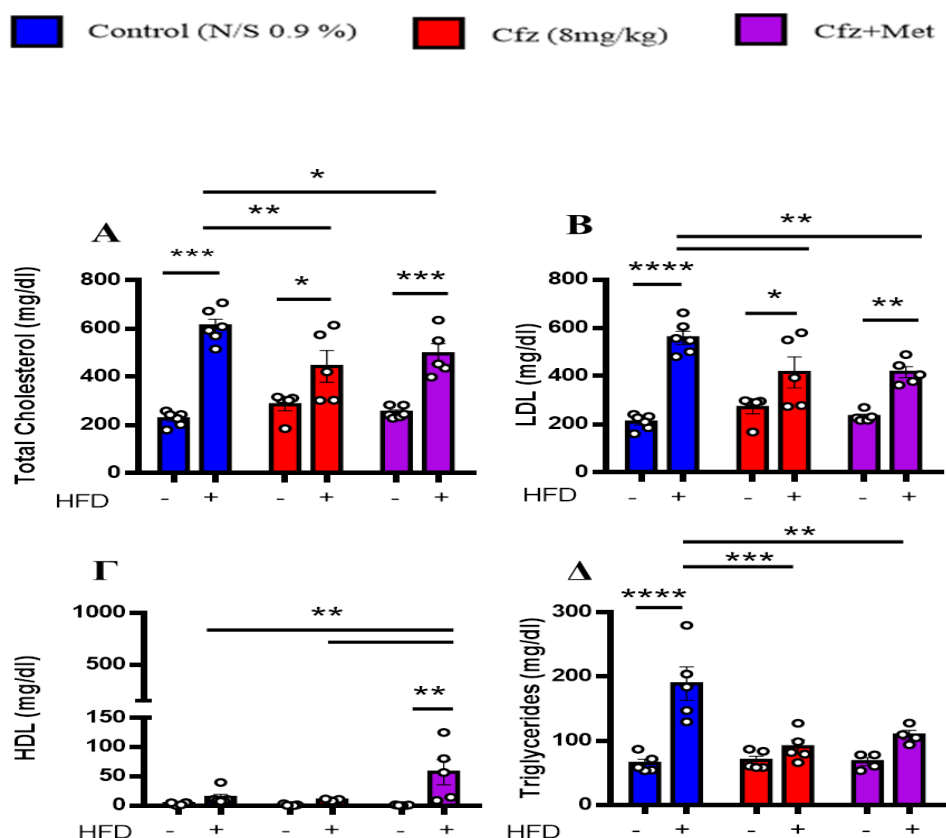
Στη συνέχεια και σε συμφωνία με τα πειράματα στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες 5 μηνών, μελετήσαμε τη λειτουργία του πρωτεασώματος στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες υπό διατροφή δυτικού τύπου κατόπιν χορήγησης καρφιλζομίμπης και μετφορμίνης. Η ενεργότητα του πρωτεασώματος βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένη για την ομάδα της καρφιλζομίμπης και για την ομάδα Cfz+Met τόσο για την καρδιά όσο και για τα PBMCs, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (**Σχήμα 15A**). Επιπλέον, η χορήγηση της καρφιλζομίμπης μειώνει στατιστικώς σημαντικά το ΔFS%, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και με την ομάδα Cfz+Met. Η συγχορήγηση με μετφορμίνη επαναφέρει τα επίπεδα του ΔFS% στα επίπεδα της ομάδα ελέγχου. (**Σχήμα 15B**).



**Σχήμα 15:** (A) Δοκιμασία ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος στο μυοκάρδιο και στα PBMCs για τις ομάδες των ApoE<sup>-/-</sup> που έλαβαν διατροφή δυτικού τύπου (Control (n=6), Cfz (n=6), Cfz+Met (n=6)), (B) Διάγραμμα ΔFS% ApoE<sup>-/-</sup> που έλαβαν διατροφή δυτικού τύπου (Control (n=5), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=5)), (One way ANOVA, Tukey's test, \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001).

**3.7 Η ομάδα Cfz και η ομάδα Cfz+Met μειώνουν την ολική και LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα η συγχορήγηση με μετφορμίνη αυξάνει την HDL χοληστερόλη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα Cfz.**

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των λιπιδίων του πλάσματος. Αρχικά συγκρίνοντας τα επίπεδα των λιπιδίων πριν και κατόπιν της λήψης διατροφής δυτικού τύπου, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής και LDL χοληστερόλης σε όλες τις ομάδες, ενώ μόνο στην ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση των τριγλυκεριδίων. Στην ομάδα συγχορήγησης με μετφορμίνη παρατηρήθηκε επιπλέον στατιστικά σημαντική αύξηση της HDL χοληστερόλης. Συγκρίνοντας τις ομάδες μεταξύ τους μετά τη λήψη της HFD, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής, της LDL χοληστερόλης καθώς και των τριγλυκεριδίων στην ομάδα της καρφιλιζομίμπης και της συγχορήγησης με μετφορμίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε αύξηση της HDL χοληστερόλης στην ομάδα της συγχορήγησης με μετφορμίνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και της καρφιλιζομίμπης. (Σχήμα 16)

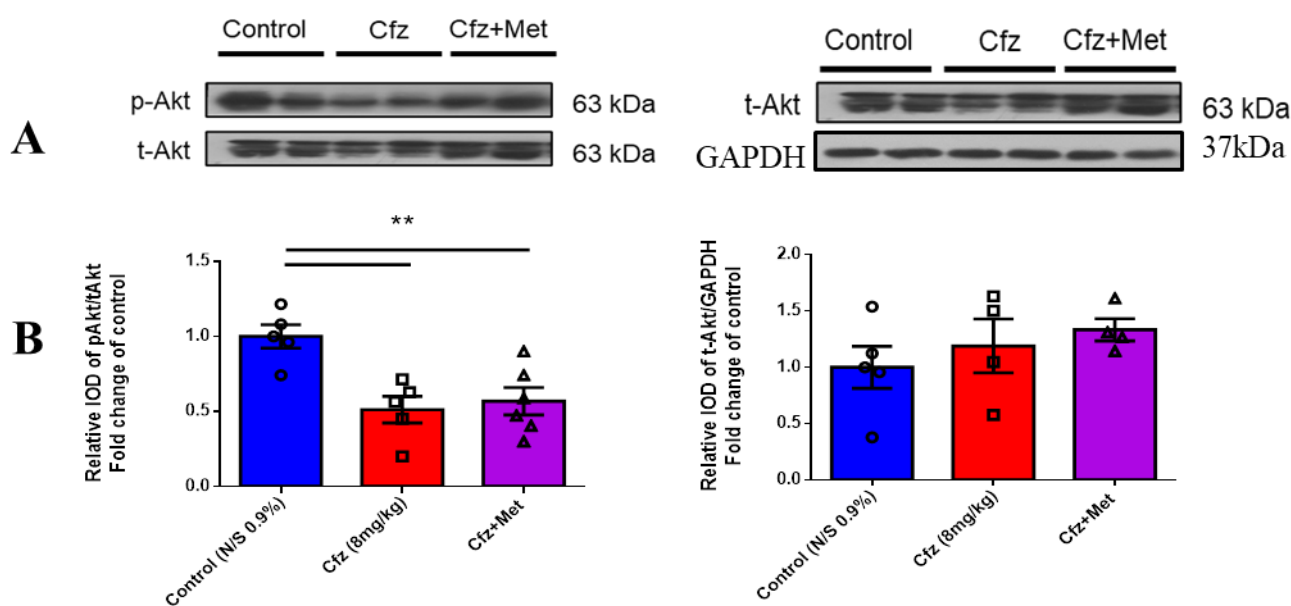


**Σχήμα 16:** Διαγράμματα που συγκρίνουν τις ομάδες Control (n=6), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5) στα  $ApoE^{-/-}$  που έλαβαν HFD, πριν και μετά τη λήψη της, ως προς την (A) ολική, (B) την LDL και (Γ) HDL χοληστερόλη καθώς και (Δ) των τριγλυκεριδίων (mg/dl). Two way ANOVA, Sidak's και Tukey's tests. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 3.8 Αποτελέσματα Western blot από τους μύες ApoE<sup>-/-</sup> που έλαβαν HFD

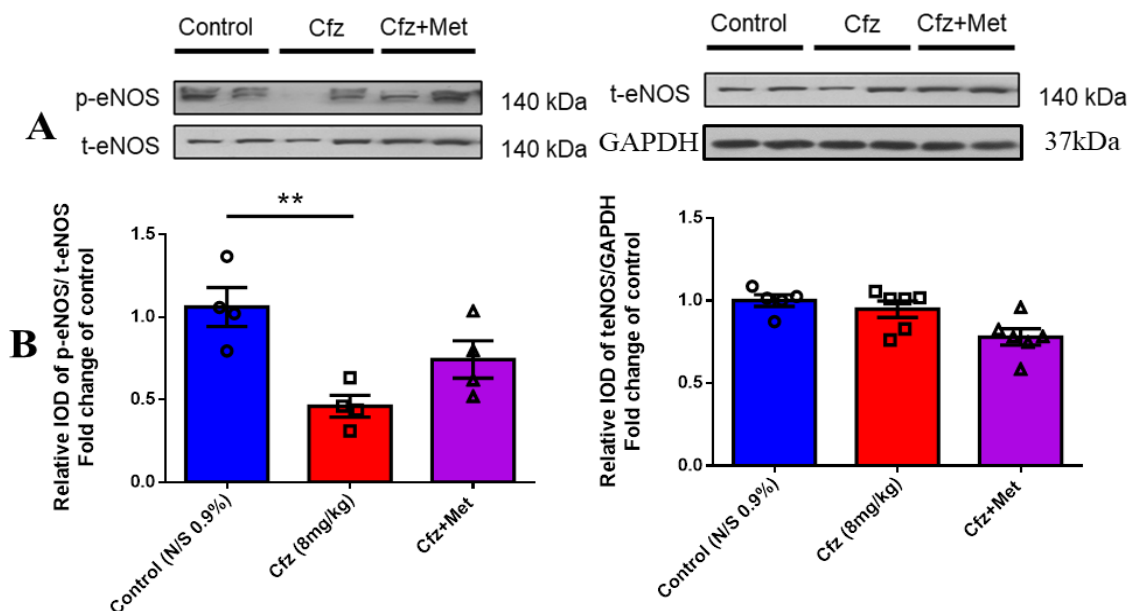
3.8.1 Η χορήγηση της Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση της Akt στις ομάδες Cfz και Cfz+Met σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μειώνει τη φωσφορυλίωση της eNOS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και δε μεταβάλλει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών.

Ξεκινώντας από τη διερεύνηση του καρδιοπροστατευτικού άξονα Akt/eNOS, βρήκαμε ότι στις ομάδες της καρφιλζομίμπης και της συγχορήγησης με μετφορμίνη παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση της Akt. (Σχήμα 17)



Σχήμα 17: (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων p-Akt/t-Akt (Control (n=5), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=6)) και t-Akt/GAPDH Akt (Control (n=5), Cfz (n=4) και Cfz+Met (n=4)) εκφρασμένων ως fold change of control, One way ANOVA, Tukey's test, \*\*p<0.01

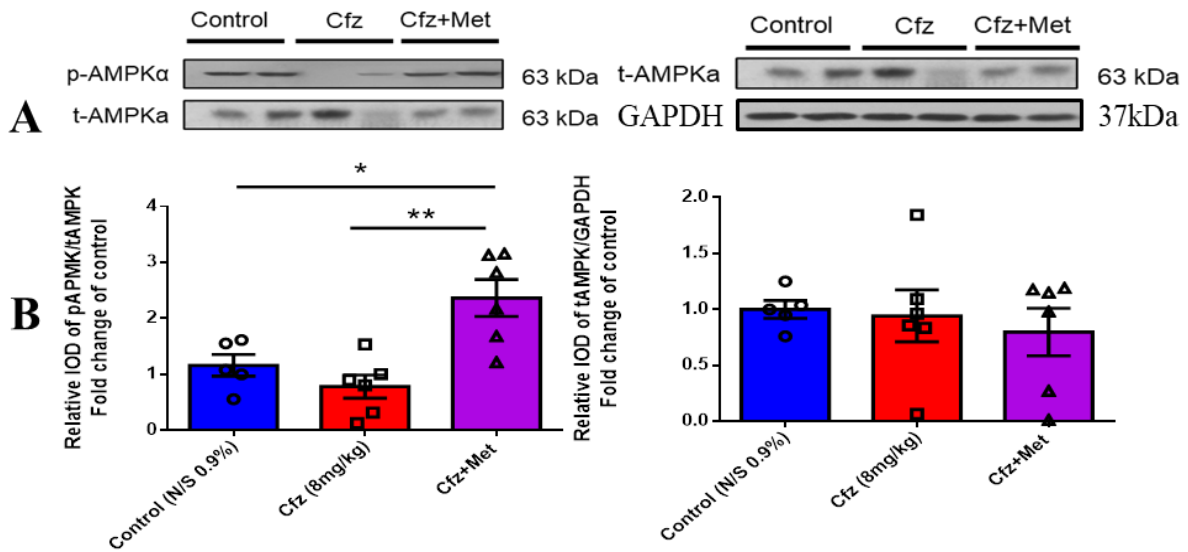
Όσον αφορά την eNOS, παρατηρείται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη η φωσφορυλίωσή της στην ομάδα της καρφιλζομίμπης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε καμία από τις τρεις ομάδες πειραματόζωων δεν παρουσιάστηκε αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης. (Σχήμα 18)



**Σχήμα 18:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων p-eNOS/t-eNOS (Control (n=4), Cfx (n=4) και Cfx+Met (n=4)) και t-eNOS/GAPDH (Control (n=5), Cfx (n=6) και Cfx+Met (n=6)) εκφρασμένων ως fold change of control. One way ANOVA, Tukey's test, \*\*p<0.01

**3.8.2 Η συγχορήγηση με μετοφορμίνη αυξάνει τη φωσφορυλίωση της AMPKα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της Cfx, ενώ δε μεταβάλλει την έκφρασή της.**

Γνωρίζοντας ότι η χορήγηση μετοφορμίνης βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία διαβητικών μυών λόγω επαγωγής της AMPKα<sup>82</sup> μελετήθηκε η AMPKα και διαπιστώθηκε ότι, στην ομάδα της συγχορήγησης με μετοφορμίνη αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά η φωσφορυλίωσή της σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της καρφιλζομίμπης. Η έκφραση της πρωτεΐνης δε μεταβλήθηκε σε καμία πειραματική ομάδα. (Σχήμα 19)

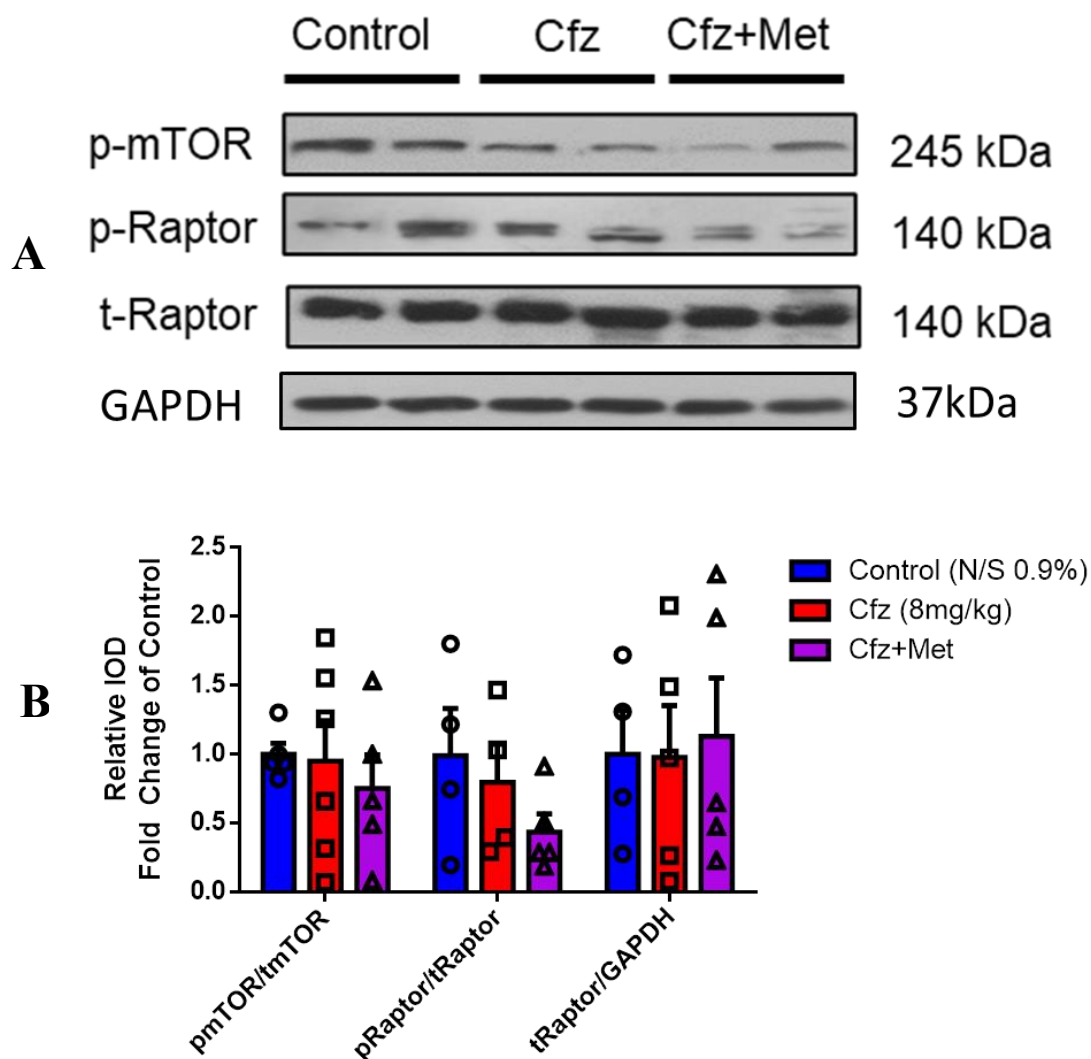


**Σχήμα 19:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων pAMPK $\alpha$ /tAMPK $\alpha$  (Control (n=5), Cfz (n=6) και Cfz+Met (n=6)) και tAMPK $\alpha$ /GAPDH (Control (n=5), Cfz (n=6) και Cfz+Met (n=6)) εκφρασμένων ως fold change of control, One way ANOVA, Tukey's test, \*p<0.05,\*\*p<0.01

Η AMPK $\alpha$  εκτός από την ενεργειακή ρύθμιση του κυττάρου, σχετίζεται και με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας.<sup>80</sup> Επομένως στη συνέχεια ερευνήσαμε τον κύριο άξονα mTOR/Raptor που ρυθμίζει την αυτοφαγία, καθώς έχουν κοινό καθοδικό στόχο για την έναρξη της αυτοφαγίας, το υπόστρωμα αλληλεπίδρασης με τον mTOR.<sup>38</sup>

### 3.8.3 Η φωσφορυλίωση και η έκφραση των πρωτεϊνών mTOR και Raptor δεν μεταβάλλονται σε καμία από τις ομάδες των πειραματόζωων.

Στη συνέχεια, παρατηρήσαμε ότι οι mTOR και Raptor δε μεταβλήθηκαν στατιστικώς σημαντικά ως προς τη φωσφορυλίωση και την έκφρασή τους, στις υπό έλεγχο πειραματικές ομάδες. (Σχήμα 20)

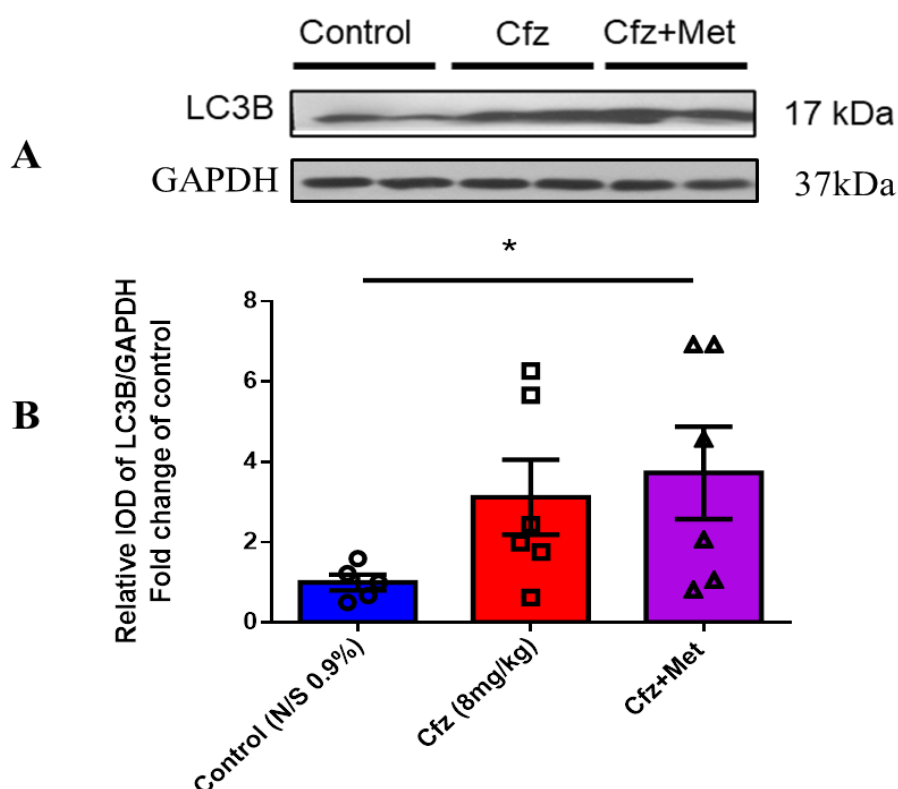


**Σχήμα 20:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων p-mTOR/tmTOR (Control (n=5), Cfz (n=6) και Cfz+Met (n=6)), pRaptor/tRaptor και tRaptor/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5)) εκφρασμένων ως fold change of control. One way ANOVA, Tukey's test για κάθε λόγο ξεχωριστά.

Στην αυτοφαγία η LC3B αποτελεί δείκτη σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων<sup>83</sup>, και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή της.

### 3.8.4 Η έκφραση της LC3B αυξάνεται στην ομάδα της συγχορήγησης Cfz με μετοφορμίνη σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και Cfz.

Κατά τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων της Western Blot παρατηρήθηκε ότι η LC3B αυξάνεται στατιστικά σημαντικά στην ομάδα της συγχορήγησης καρφιλζομίμπης με μετοφορμίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 21)



**Σχήμα 21:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γράφημα σχετικής πυκνομέτρησης του λόγου LC3B/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5)) εκφρασμένου ως fold change of control. One way ANOVA, Tukey's test, \* $p < 0.05$

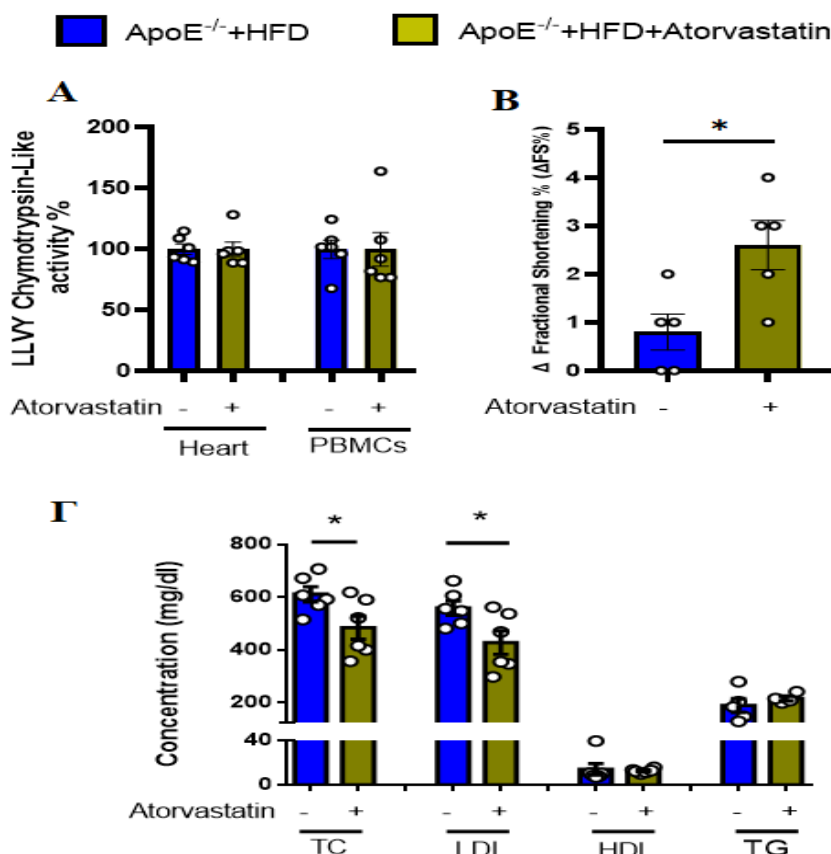
Τέλος, προκειμένου να αυξήσουμε τη μεταφραστική σημασία των πειραμάτων μας διερευνήσαμε την επίδραση των στατινών στον παρατηρούμενο φαινότυπο, καθώς η κατηγορία των φαρμάκων αυτών αποτελεί πρώτης γραμμής θεραπεία στη διαχείριση της υπερλιπιδαιμίας.<sup>84</sup> Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκε σε μύες ApoE<sup>-/-</sup> που λάμβαναν HFD, ατορβαστατίνη, ως το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υπολιπιδαιμικό φάρμακο αυτής της κατηγορίας.<sup>85</sup> Αρχικά, ελέγξαμε την ενεργότητα του πρωτεασώματος για να διαπιστωθεί εάν υφίσταται κάποιου είδους μεταβολή από τη χορήγηση της ατορβαστατίνης.



Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η καρδιακή λειτουργία των πειραματόζων με υπερηχογραφική αξιολόγηση και διενεργήθηκαν οι κατάλληλες τεχνικές για τον υπολογισμό των λιπιδίων.

### 3.9 Η χορήγηση ατορβαστατίνης αυξάνει το ΔFS%, δε μεταβάλλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος σε σύγκριση με μύες ApoE<sup>-/-</sup> που έλαβαν HFD χωρίς ατορβαστατίνη και μειώνει την ολική και LDL χοληστερόλη.

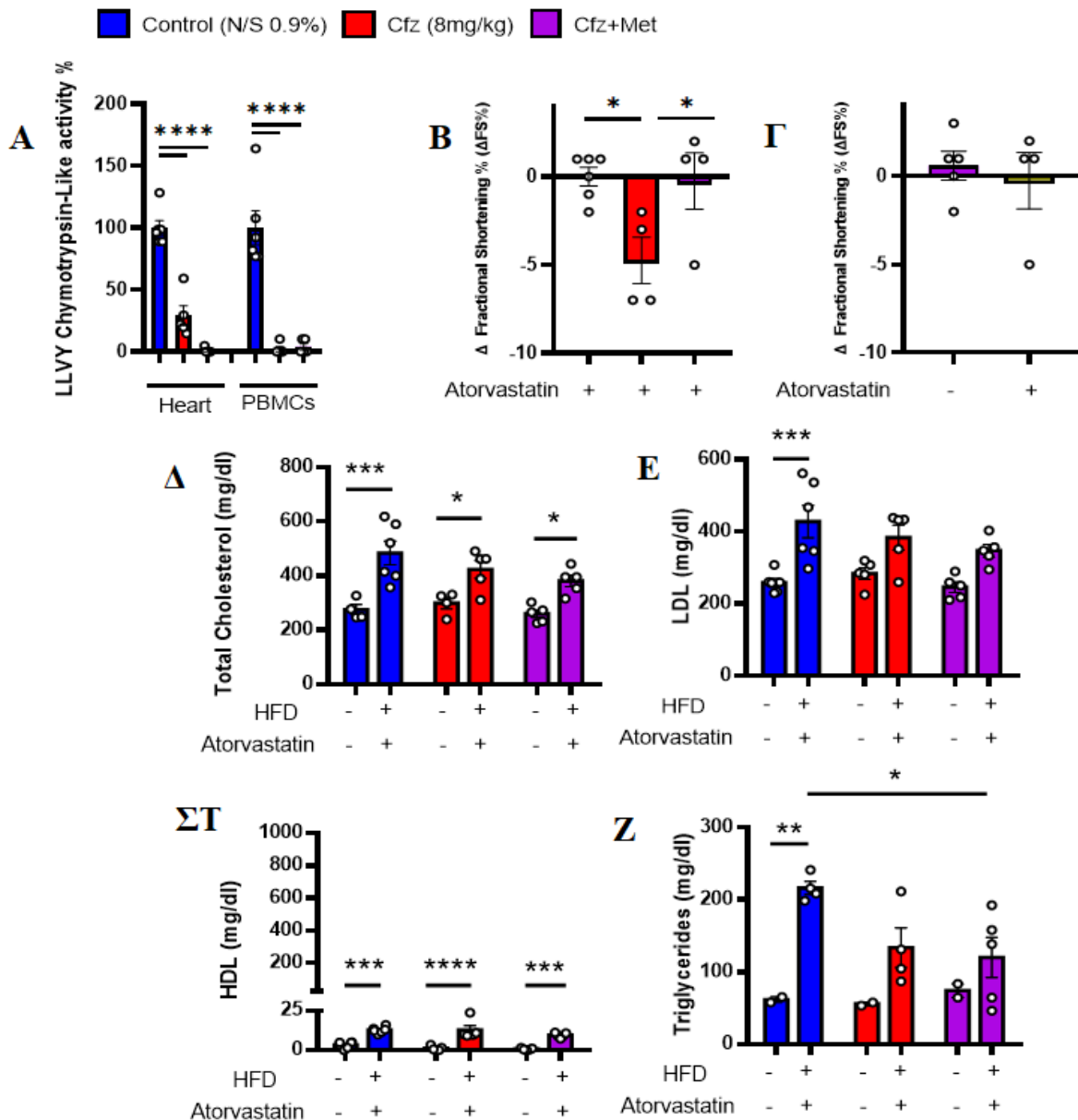
Μελετώντας την ενεργότητα του πρωτεασώματος, δεν παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντική διαφορά στους μύες ApoE<sup>-/-</sup> που έλαβαν HFD με ατορβαστατίνη σε σύγκριση με τους ApoE<sup>-/-</sup> μύες που έλαβαν HFD χωρίς ατορβαστατίνη (Σχήμα 22A). Όσον αφορά την καρδιακή λειτουργία των πειραματόζων, η ατορβαστατίνη αυξάνει στατιστικώς σημαντικά το ΔFS%, βελτιώνοντας την καρδιακή λειτουργία σε σχέση με τους μύες που δεν έλαβαν ατορβαστατίνη (Σχήμα 22B). Επιπλέον, από τις βιοχημικές αναλύσεις παρατηρήθηκε ότι η ολική χοληστερόλη και η LDL μειώνονται στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τους μύες ApoE<sup>-/-</sup> που δεν έλαβαν ατορβαστατίνη. (Σχήμα 22Γ)



**Σχήμα 22:** Γραφήματα της επίδρασης της ατορβαστατίνης (A) στην ενεργότητα του πρωτεασώματος (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=6), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD+Atorvastatin (n=6), στο μυοκάρδιο και στα PBMCs), (B) στο ΔFS% (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=5), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD+Atorvastatin (n=5)) και (Γ) στα λιπίδια ολική, LDL και HDL χοληστερόλη (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=6), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD +Atorvastatin (n=6)) καθώς και στα τριγλυκερίδια (mg/dl) (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=5), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD +Atorvastatin (n=4)). *T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05*

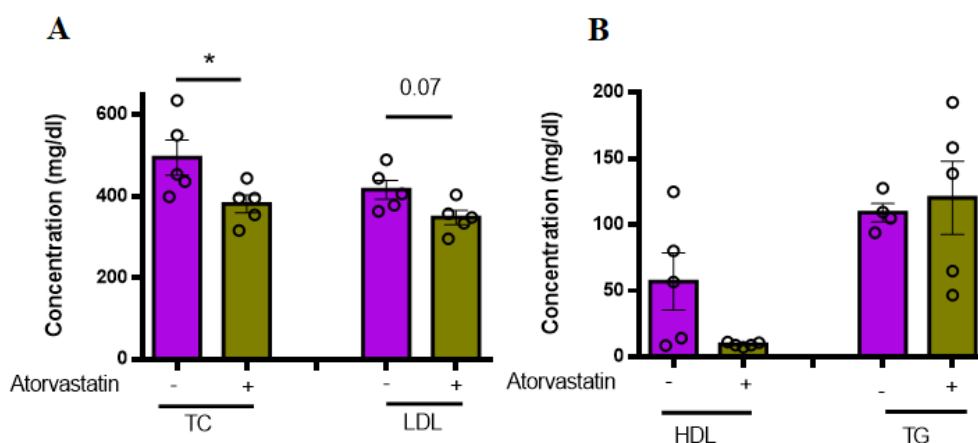
**3.10 Η χορήγηση της Cfz μειώνει το ΔFS% σε σύγκριση με τις ομάδες Control και Cfz+Met και μειώνει την ενεργότητα του πρωτεασώματος στις ομάδες Cfz και Cfz+Met σε σύγκριση με το Control. Η ολική χοληστερόλη και η HDL αυξήθηκαν σε όλες τις ομάδες, ενώ η LDL αυξήθηκε μόνο στην ομάδα του Control.**

Παρατηρήσαμε ότι στην ομάδα της καρφιλζομίμπης και της συγχορήγησης με μετοφορμίνη μειώνεται στατιστικώς σημαντικά η ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, δράση η οποία δεν επηρεάζεται από τη χορήγηση ατορβαστατίνης (**Σχήμα 23A**). Η καρφιλζομίμπη μειώνει στατιστικώς σημαντικά το ΔFS% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και με την ομάδα της συγχορήγησης με μετοφορμίνη, ενώ στην ομάδα της συγχορήγησης το ΔFS% παρατηρείται να είναι στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (**Σχήμα 23B**). Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά του ΔFS% μεταξύ των ομάδων της συγχορήγησης παρουσία ή απουσία ατορβαστατίνης (**Σχήμα 23Γ**). Όσον αφορά τα λιπίδια, η ομάδα ελέγχου έχει στατιστικώς σημαντικά αυξημένη ολική, LDL και HDL χοληστερόλη καθώς και συγκέντρωση τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τα δεδομένα της πριν την έναρξη HFD+ατορβαστατίνης. Η ομάδα της καρφιλζομίμπης έχει στατιστικώς σημαντικά αυξημένη ολική και HDL χοληστερόλη σε σχέση με τα δεδομένα της πριν την έναρξη HFD+ατορβαστατίνης. Η ομάδα συγχορήγησης με μετοφορμίνη παρουσιάζει αύξηση στην ολική, LDL και HDL χοληστερόλη σε σχέση δεδομένα της πριν την έναρξη HFD+ατορβαστατίνης, ενώ παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (**Σχήμα 23Δ-Z**)



**Σχήμα 23:** (A) Διάγραμμα της ενεργότητας του πρωτεασώματος στο στο μυοκάρδιο και τα PBMCs, (B) Διάγραμμα του ΔFS% των ομάδων χορηγήσεων Control, Cfz και Cfz+Met (Γ) Σύγκριση του ΔFS% της ομάδας της συγχορήγησης με μετφορμίνη με η χωρίς τη χορήγηση ατορβαστατίνης, (Δ), (E), (ΣΤ), (Z) Διαγράμματα για την ολική, LDL και HDL χοληστερόλη καθώς και για τα τριγλυκερίδια αντίστοιχα, πριν την έναρξη και μετά τη λήψη HFD+ατορβαστατίνης (mg/dl). Για το διάγραμμα (B) ισχύει: ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=6), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD+Atorvastatin (n=6). Για το διάγραμμα (Z) ισχύει: Control (n=4), Cfz (n=4) και Cfz+Met (n=5). Για τα υπόλοιπα διαγράμματα ισχύει: Control (n=6), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5). (A), (B): T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05. (Γ): One way Anova, t-test, \*\*\*\*p<0.0001. (Δ), (E), (ΣΤ), (Z): Two way Anova, Sidak's και Tukey's tests, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

Συγκρίνοντας τις ομάδες της συγχορήγησης με μετφορμίνη στα πειραματόζωα που έλαβαν HFD, διαπιστώθηκε ότι η ατορβαστατίνη μειώνει την ολική χοληστερόλη χωρίς να επηρεάζει την HDL και τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. (Σχήμα 24)



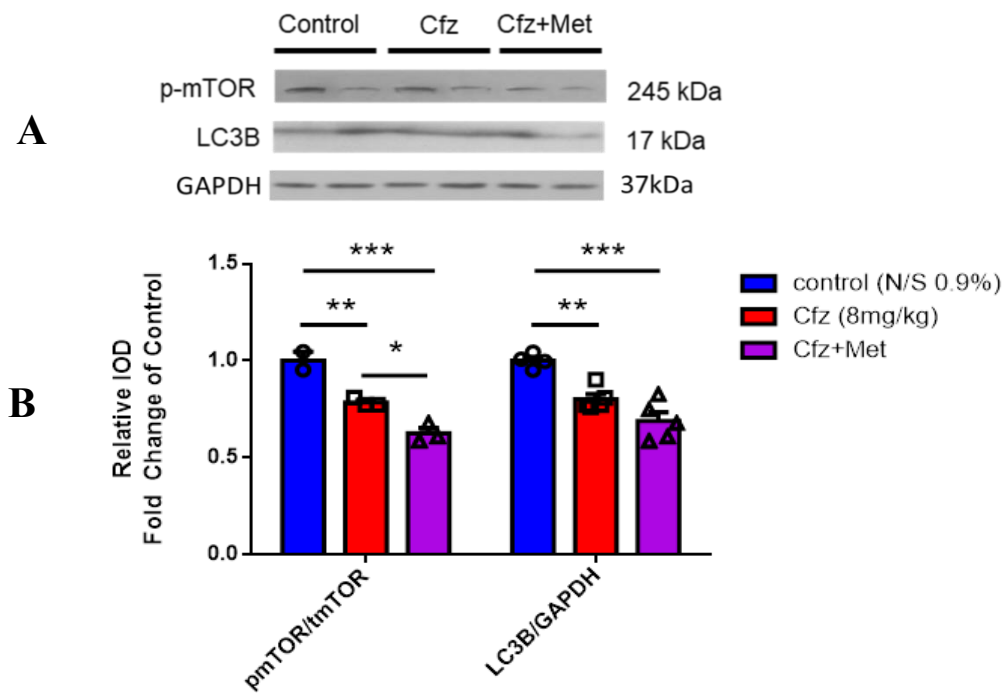
**Σχήμα 24:** Διαγράμματα (A) Ολικής και LDL χοληστερόλης και (B) HDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων της ομάδας της συγχορήγησης με μετφορμίνη στους μύες με HFD και την απουσία (Μωβ) ή την παρουσία (Πράσινο) ατορβαστατίνης (mg/dl) (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=5), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD+Atorvastatin (n=5)). T test, unpaired, two-tailed; \*p<0.05

Συνεπώς διαπιστώσαμε ότι η καρφιλζομίμη διατηρεί την ικανότητά της να αναστέλλει το πρωτεάσωμα στο μοντέλο της δριμείας υπερλιπιδαιμίας των ApoE<sup>-/-</sup> μυών υπό διατροφή δυτικού τύπου. Η μετφορμίνη στο ίδιο πρωτόκολλο διατηρεί την καρδιοπροστατευτική της δράση, ενώ η ατορβαστατίνη -παρότι ασκεί επαρκή αντι-υπερλιπιδαιμική δράση- δεν επιφέρει καρδιοπροστασία έναντι της καρδιοτοξικότητας που επάγεται από τη καρφιλζομίμη.

### 3.11 Western Blot αποτελέσματα στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες που έλαβαν ατορβαστατίνη και HFD

#### 3.11.1 Η φωσφορυλίωση του mTOR και η έκφραση της LC3B μειώνεται στις ομάδες Cfz και συγχορήγησης με μετφορμίνη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

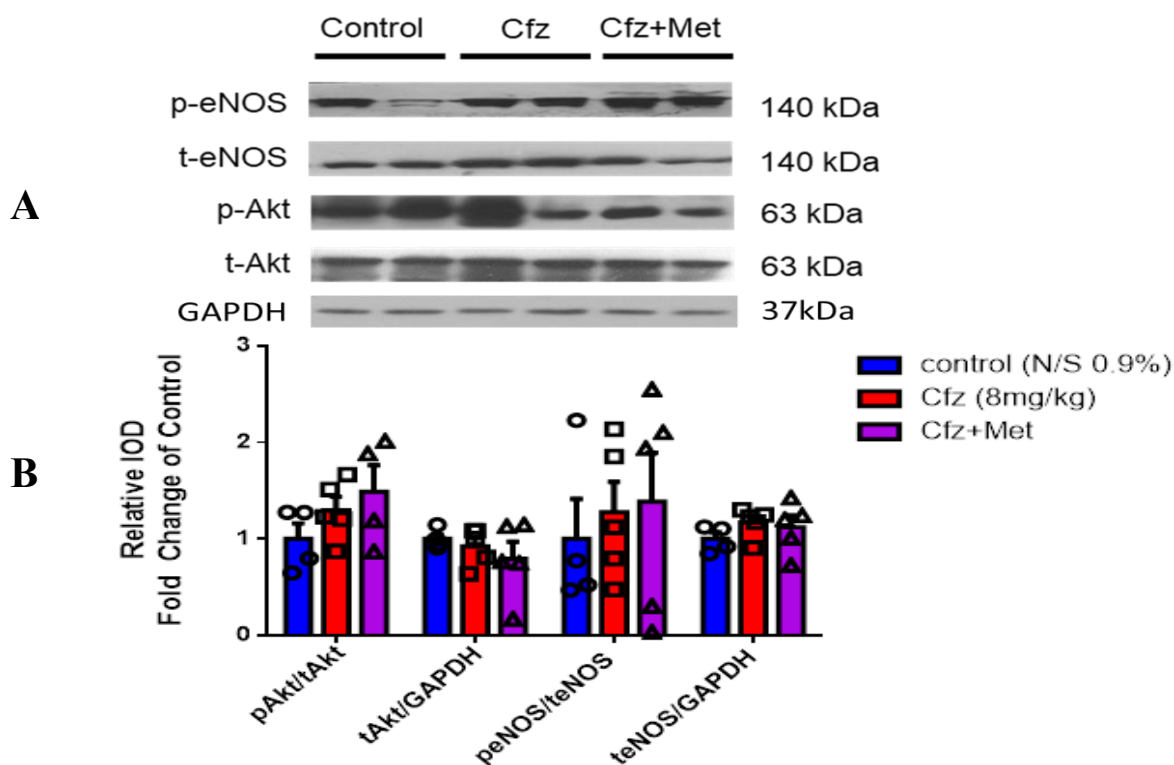
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot, διαπιστώθηκε ότι η συγχορήγηση με μετφορμίνη μειώνει στατιστικώς σημαντικά τη φωσφορυλίωση του mTOR σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της καρφιλζομίμης. Η καρφιλζομίμη μειώνει κι αυτή στατιστικώς σημαντικά τη φωσφορυλίωση του mTOR σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, η συγχορήγηση καρφιλζομίμης με μετφορμίνη, μειώνει στατιστικώς σημαντικά την έκφραση της LC3B σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 25)



**Σχήμα 25:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων *p*mTOR/*tm*TOR (Control ( $n=2$ ), Cfz ( $n=3$ ), Cfz+Met ( $n=3$ )) και LC3B/GAPDH ((Control ( $n=4$ ), Cfz ( $n=5$ ), Cfz+Met ( $n=5$ )) εκφρασμένων ως *fold change of control*. One way ANOVA, Tukey's test, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

### 3.11.2 Η έκφραση και η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt και eNOS δεν μεταβάλλονται στους μύες που έλαβαν HFD μαζί με ατορβαστατίνη.

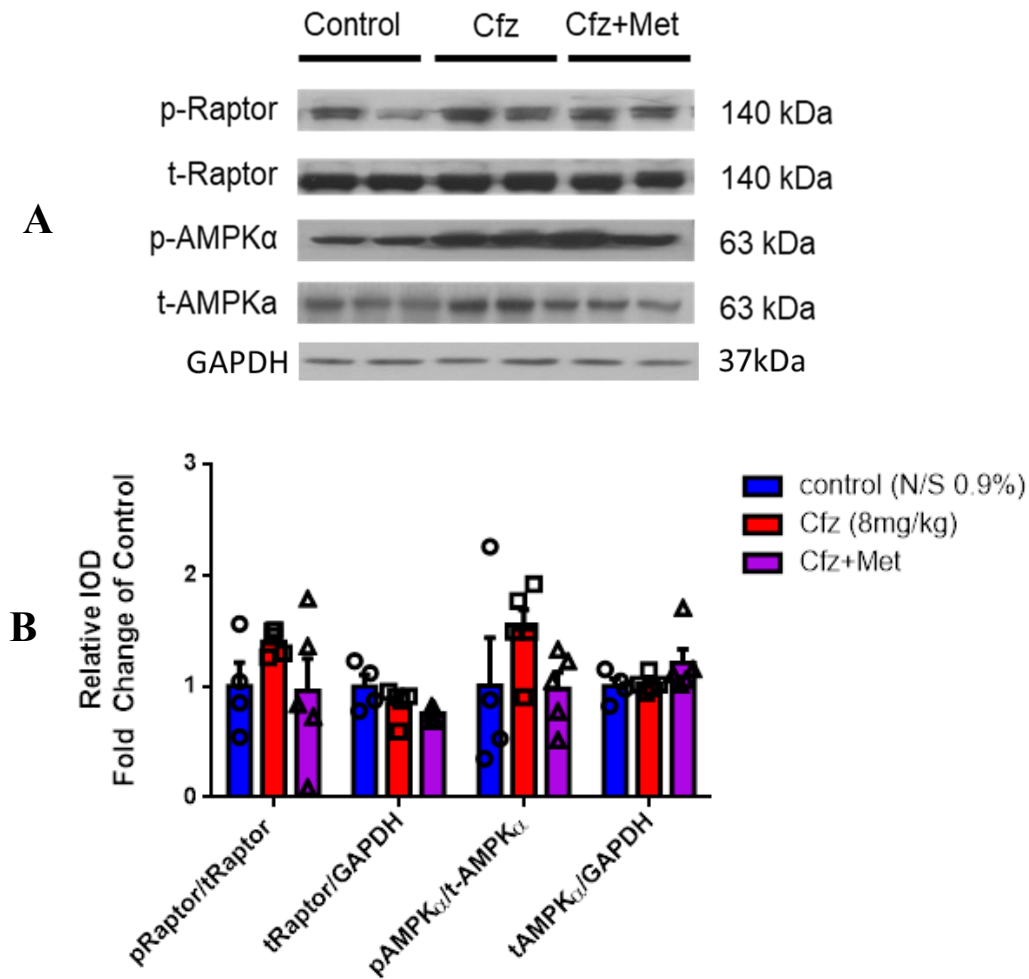
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η Akt και η eNOS δεν παρουσιάζουν κάποια μεταβολή στη φωσφορυλίωση και στην έκφρασή τους, σε καμία ομάδα πειραματόζωων. (Σχήμα 26)



**Σχήμα 26:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων pAkt/tAkt (Control (n=4), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=4)), tAkt/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=5)), και peNOS/teNOS, teNOS/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=5)) εκφρασμένων ως fold change of control. One way ANOVA, Tukey's test για κάθε λόγο ξεχωριστά

### 3.11.3 Η φωσφορυλίωση και η έκφραση της AMPKα και του Raptor δε μεταβάλλονται στους μύες που έλαβαν HFD μαζί με ατορβαστατίνη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σε καμία πειραματική ομάδα δεν μεταβλήθηκε η φωσφορυλίωση και η έκφραση των πρωτεϊνών Raptor και AMPKα. (Σχήμα 27)



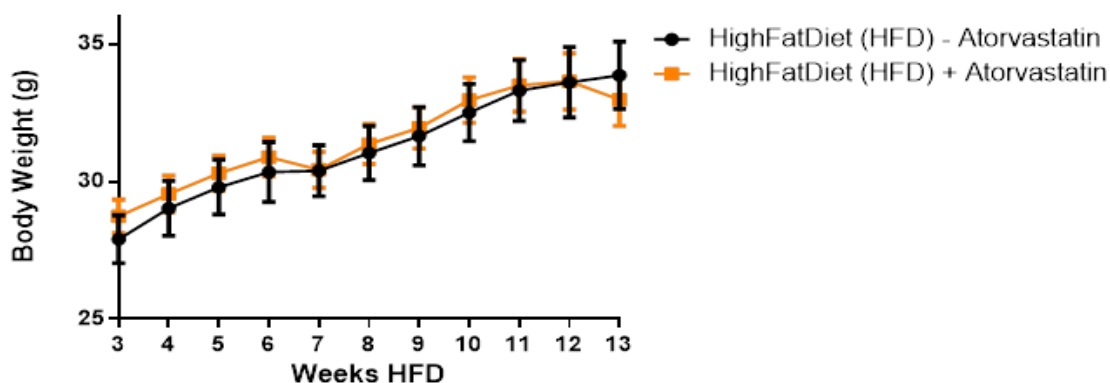
**Σχήμα 27:** (A) Αντιπροσωπευτικές Western Blot (B) Γραφήματα σχετικής πυκνομέτρησης των λόγων pRaptor/tRaptor, tRaptor/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=5)), pAMPK<sub>α</sub>/tAMPK<sub>α</sub> και tAMPK<sub>α</sub>/GAPDH (Control (n=4), Cfz (n=5), Cfz+Met (n=5)), εκφρασμένων ως fold change of control, One way ANOVA, Tukey's test για κάθε λόγο ξεχωριστό

Συνεπώς, διαπιστώσαμε ότι η χορήγηση καρφιλζομίμπης παρουσία ατορβαστατίνης δε μειώνει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Akt και eNOS στους ApoE<sup>-/-</sup> μύες υπό δυτικού τύπου διατροφή σε σύγκριση με τους μύες ApoE<sup>-/-</sup> HFD που δεν έλαβαν ατορβαστατίνη. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι ανεξάρτητα από την επαγωγή των μηχανισμών αυτών, η ατορβαστατίνη δεν επιφέρει προστασία έναντι της καρδιοτοξικότητας όπως φάνηκε από το FS% στην ομάδα της καρφιλζομίμπης. Αυτό υποδηλώνει ότι η μετορμίνη μπορεί να επάγει καρδιοπροστασία με μηχανισμό ανεξάρτητο της AMPKα, αλλά μέσω των μεταβολικών της επιδράσεων στο μυοκάρδιο.



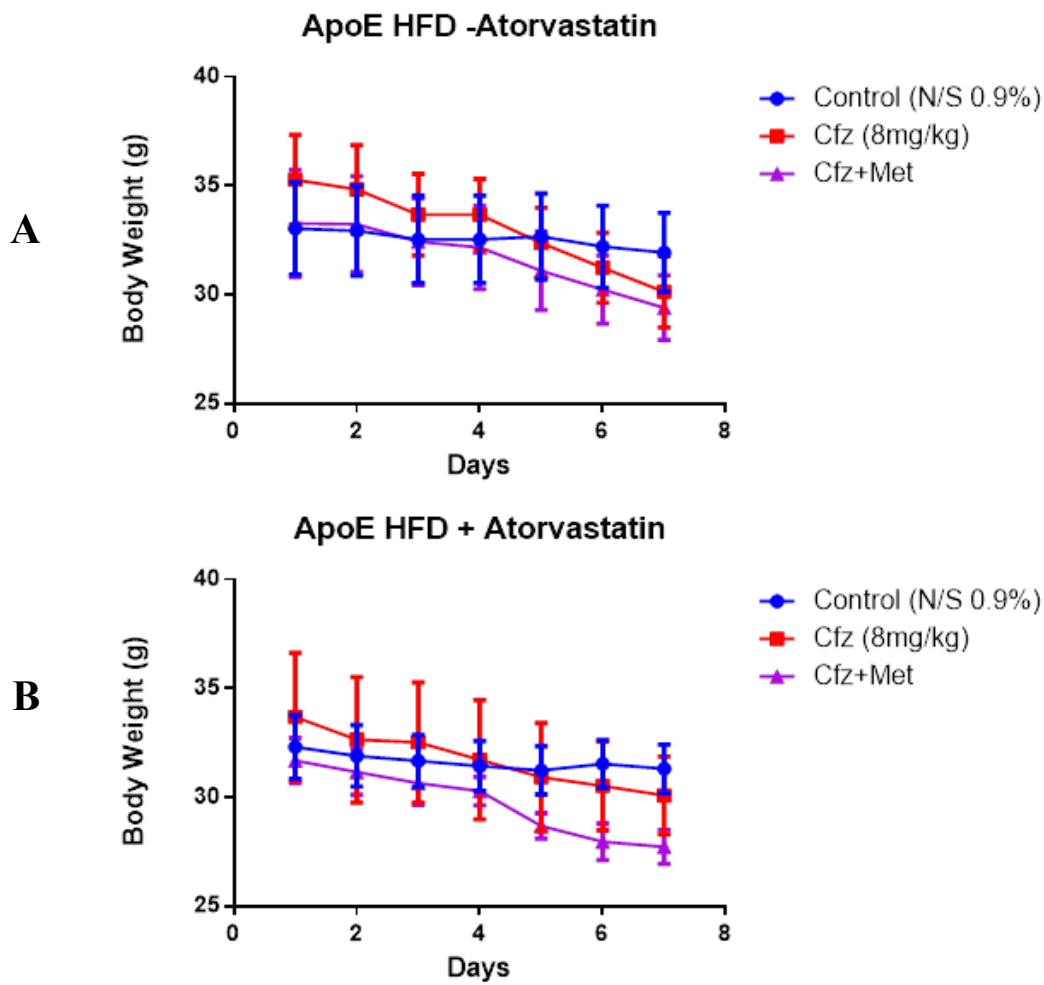
### 3.12 Το βάρος των ApoE<sup>-/-</sup> HFD δε μεταβάλλεται ανάλογα με την χορήγηση ή μη της ατορβαστατίνης

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε εβδομαδιαία καταγραφή των βαρών των μυών που λάμβαναν διατροφή πλούσια σε λιπαρά παρουσία ή μη της ατορβαστατίνης. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων όταν συγκρίθηκε η ομάδα των μυών που έλαβαν ατορβαστατίνη με την ομάδα των μυών που δεν έλαβαν. (Σχήμα 28)



**Σχήμα 28:** Η μεταβολή του βάρους των πειραματόζωων το διάστημα από την έναρξη ή μη χορήγησης ατορβαστατίνης μέχρι και την τελευταία εβδομάδα πριν τις χορηγήσεις. (ApoE<sup>-/-</sup>+HFD (n=18), ApoE<sup>-/-</sup>+HFD+Atorvastatin (n=16). Multiple t tests one per row.

Επιπλέον, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή του βάρους των πειραματόζωων κατά τη διάρκεια της εβδομάδας των χορηγήσεων ούτε στην ομάδα HFD-Ατορβαστατίνη αλλά ούτε στην ομάδα HFD+Ατορβαστατίνη. (Σχήμα 29)



**Σχήμα 29:** Η μεταβολή του βάρους των πειραματόζων την εβδομάδα των χορηγήσεων στις ομάδες HFD-Ατορβαστατίνη και HFD+Ατορβαστατίνη. (A) Control (n=6), Cfz (n=6) και Cfz+Met (n=6). (B) Control (n=6), Cfz (n=5) και Cfz+Met (n=5). Multiple t tests one per row.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πολλαπλό μυέλωμα είναι από τους πιο κοινούς αιματολογικούς καρκίνους. Η σημαντικότερη κατηγορία φαρμάκων για την αντιμετώπιση του πολλαπλού μυελώματος είναι οι αναστολείς πρωτεασώματος.<sup>86</sup> Στη μελέτη ENDEAVOR αναδείχτηκε η υπεροχή της καρφιλζομίμπης έναντι της βορτεζομίμπης στην αντιμετώπιση του ανθεκτικού και υποτροπιάζοντος μυελώματος. Ωστόσο, η καρφιλζομίμπη παρουσίασε περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα όπως είναι η υπέρταση και η καρδιακή ανεπάρκεια. Γι' αυτό, θεωρείται ο αναστολέας πρωτεασώματος με τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων.<sup>31</sup> Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, καθιερώθηκαν δύο πρωτόκολλα στα οποία προκαλείται οξεία καρδιοτοξικότητα από την καρφιλζομίμπη και βρέθηκε ότι στο μηχανισμό καρδιοτοξικότητας εμπλέκεται η μειωμένη φωσφορυλίωση της AMPKα λόγω αυξημένης ενεργότητας της φωσφατάσης PP2A. Επιπλέον, η χορήγηση της μετοφομίνης κατάφερε να επαναφέρει τα επίπεδα της AMPKα παρέχοντας καρδιοπροστασία.<sup>33</sup> Το πολλαπλό μυέλωμα είναι μία νόσος κυρίως της τρίτης ηλικίας, καθώς πάνω από το 50% των νέων ασθενών υπερβαίνει τα 75 έτη<sup>87</sup> και γι' αυτό πολλοί από τους ασθενείς έχουν ήδη κάποιον παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο.<sup>32</sup> Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το 49% των θανάτων στην Ευρώπη οφείλεται σε καρδιαγγειακά συμβάντα και ότι η υπερλιπιδαιμία είναι ένας παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων<sup>88</sup>, αναρωτηθήκαμε ποιος θα ήταν ο αντίκτυπος της σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη ελέγχθηκε το κατά πόσο αλλά και το πώς παρεμβαίνει η υπερλιπιδαιμία-αθηρωμάτωση στην καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από την καρφιλζομίμπη. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες ApoE<sup>-/-</sup>. Πρώτη φορά αναφέρεται βιβλιογραφικά σε αυτήν την εργασία ότι οι ApoE<sup>-/-</sup> μύες παρουσιάζουν μείωση στην ενεργότητα του πρωτεασώματος των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος σε σχέση με τους φυσιολογικούς μύες C57Bl/6.

Για να προκληθεί αθηρωμάτωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας, δηλαδή η διατάραξη της ομοιόστασης της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO).<sup>89</sup> Η ενδοθηλιακή λειτουργία των ApoE<sup>-/-</sup> μυών έχει χαρακτηριστεί ανάλογα την ηλικία, το φύλο και τη διατροφή. Αρσενικοί μύες με φυσιολογική διατροφή πρέπει να φτάσουν σε ηλικία 12-18 μηνών για να παρουσιάσουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Όταν όμως τους χορηγηθεί τροφή δυτικού τύπου, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία παρατηρείται ταχύτερα από την ηλικία των 20 εβδομάδων ζωής τους.<sup>54</sup> Στο πρωτόκολλο των δύο δόσεων των ApoE<sup>-/-</sup> πέντε μηνών η καρφιλζομίμπη μειώνει τη φωσφορυλίωση της eNOS, γεγονός που υποδηλώνει διαταραχή στη φυσιολογική παραγωγή του NO. Στο πρωτόκολλο των 4 δόσεων των μυών ApoE<sup>-/-</sup>, δεν παρατηρείται αλλαγή στη φωσφορυλίωση του ενζύμου. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά πως σε πειράματα που έγιναν σε χοίρους με χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος, βρέθηκε αυξημένη έκφραση της eNOS αλλά

μειωμένη διαθεσιμότητα του ελεύθερου NO.<sup>90</sup> Πιθανή εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι η αποσύζευξη του ενζύμου της eNOS, δηλαδή η απορύθμιση του ενζύμου, όπου παράλληλα με την παραγωγή NO παράγονται και ρίζες οξυγόνου, συμβάλλοντας στην πρόκληση οξειδωτικού στρες. Κατά το οξειδωτικό στρες το πλεονάζων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) δημιουργεί ρίζες οξυγόνου που αλληλεπιδρούν με το NO σχηματίζοντας το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ONOO<sup>-</sup>.<sup>91</sup> Παράλληλα, έχει γίνει αναφορά για μύες ApoE<sup>-/-</sup> οι οποίοι, ενώ είχαν αυξημένη έκφραση eNOS, η εμφάνιση αθηροσκλήρωσης εμφανίστηκε νωρίτερα<sup>92</sup>, υποδηλώνοντας την αποσύζευξη της eNOS και τη συμβολή του οξειδωτικού στρες στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών.<sup>93</sup> Εάν και στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση της eNOS, για να δικαιολογηθεί η επαναφορά της φωσφορυλίωσής της στο πρωτόκολλο των ApoE<sup>-/-</sup> των τεσσάρων δόσεων καρφιλζομίμπης, προτείνεται να ελεγχθεί η πιθανή αποσύζευξη της eNOS, μελετώντας το νιτροοξειδωτικό στρες, μέσω βιοδεικτών όπως η 3-νιτροτυροσίνη, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία.<sup>94</sup>

Όπως έχει προαναφερθεί, όταν παρεμποδίζεται το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, λόγω της επικείμενης τοξικότητας από τη συσσώρευση των πρωτεϊνών για αποικοδόμηση, αυξάνεται αντιρροπιστικά η λειτουργία της αυτοφαγίας.<sup>34,35</sup> Όπως διαπιστώθηκε και από την προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, οι χορηγήσεις της καρφιλζομίμπης είχαν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση του παράγοντα Raptor και επομένως την αναστολή της αυτοφαγίας από τον mTOR τόσο στο πρωτόκολλο των δύο όσο και των τεσσάρων δόσεων. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι ένας από τους ρυθμιστές του Raptor είναι η AMPKα η οποία τον φωσφορυλιώνει και έτσι αναστέλλεται ο mTOR και επάγεται η αυτοφαγία.<sup>80</sup> Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαμε και στην παρούσα μελέτη όπου στο πρωτόκολλο των δύο και των τεσσάρων δόσεων παρατηρήθηκε μείωση της φωσφορυλίωσης του Raptor, αλλά σε αυτό των τεσσάρων δόσεων παρατηρήθηκε και μείωση της φωσφορυλίωσης της AMPKα. Συνεπώς, τα πρωτόκολλα αυτά που αφορούν έναν ήπιο φαινότυπο υπερλιπιδαιμίας, φαίνεται να ακολουθούν τους μηχανισμούς καρδιοτοξικότητας, όπως αυτοί έχουν περιγραφεί στην προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας.<sup>33</sup> Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των ApoE<sup>-/-</sup> πέντε μηνών, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με το πρωτόκολλο των 4 δόσεων καθώς αυτό φαίνεται να έχει δριμύτερη επαγόμενη καρδιοτοξικότητα από την καρφιλζομίμπη.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση δριμύτερης υπερλιπιδαιμίας-αθηρωμάτωσης, σε σχέση με αυτή που παρουσιάζουν τα ApoE<sup>-/-</sup> πέντε μηνών, στο πρωτόκολλο των 4 δόσεων. Βιβλιογραφικά υπάρχουν αρκετά μοντέλα αθηροσκλήρωσης τα οποία σχετίζονται με την πρόσληψη ή μη ειδικής τροφής.<sup>53,58</sup> Εμείς χρησιμοποιήσαμε μύες ApoE<sup>-/-</sup> οι οποίοι έλαβαν διατροφή δυτικού τύπου πλούσια σε λιπαρά, ώστε να αποκτήσουν τον επιθυμητό δριμύτερο φαινότυπο. Αυτό το μοντέλο, έχει στην ηλικία των 5 μηνών εγκαθιδρυμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία καθώς και σχηματισμό αθηρωματικών πλακών σε αγγεία αντίστοιχα με αυτά που παρατηρούνται στον άνθρωπο.<sup>54</sup>

Η κινάση Akt έχει πολλές λειτουργίες στο μυοκάρδιο μερικές από τις οποίες είναι η αναστολή λειτουργίας προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η περαιτέρω ενεργοποίηση προστατευτικών μονοπατιών όπως αυτό της eNOS, που η δυσλειτουργία της όπως αναφέρθηκε είναι προάγγελος καρδιαγγειακών παθήσεων.<sup>43</sup> Είναι εμφανές ότι στο πρωτόκολλο των ApoE<sup>-/-</sup> με HFD είναι μειωμένη η φωσφορυλίωση τόσο της Akt όσο και της eNOS στην ομάδα της καρφιλζομίμπης, υποδηλώνοντας ότι η καρφιλζομίμπη παρουσία σοβαρής υπερλιπιδαιμίας αναστέλλει αυτόν τον καρδιοπροστατευτικό άξονα. Βρήκαμε ότι η μετορμίνη μπορεί να επαναφέρει την καρδιακή λειτουργία στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, αντισταθμίζοντας τη μυοκαρδιακή βλάβη που προκαλείται από τη χορήγηση της καρφιλζομίμπης και ότι αυξάνει τη φωσφορυλίωση της AMPKα. Παράλληλα αυξήθηκε και η έκφραση της LC3B, δείκτης της λειτουργίας της αυτοφαγίας.<sup>83</sup>

Όσον αφορά τη μεταβολή των λιπιδίων, γνωρίζουμε πως η HDL παρέχει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς μειώνει τη φλεγμονή και προσφέρει καλύτερη αιμάτωση στο μυοκάρδιο.<sup>95</sup> Αξίζει λοιπόν να αναφερθεί πως στην ομάδα της συγχορήγησης με μετορμίνη παρατηρήθηκε αύξηση της HDL.

Λαμβάνοντας τα ανωτέρω δεδομένα για το πρωτόκολλο των ApoE<sup>-/-</sup> μυών με HFD, συμπεραίνουμε ότι η μετορμίνη συνεχίζει να παρέχει καρδιοπροστατευτική δράση παράλληλα με την παρουσία υψηλών επιπέδων λιπιδίων στο αίμα. Όμως, θέλοντας να προσομοιάσουμε την κλινική πράξη ακόμα περισσότερο, αποφασίσαμε στο επόμενο πρωτόκολλο να χορηγήσουμε έναν υπολιπιδαιμικό παράγοντα, την ατορβαστατίνη, καθώς αποτελεί πρώτη γραμμή θεραπείας για ανθρώπους με διαταραχή στο μεταβολισμό των λιπιδίων.<sup>84</sup>

Η ατορβαστατίνη είναι γνωστό ότι επάγει *in vitro* την αυτοφαγία μέσω αύξησης φωσφορυλίωσης της AMPKα και επομένως την αναστολή του mTORC1<sup>96</sup>, ωστόσο έχουν αναφερθεί κι άλλοι μηχανισμοί όπως είναι το μεταβολικό μονοπάτι του μεβολονικού οξέος και ο άξονας PI3K/Akt.<sup>97</sup> Επίσης, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι η αύξηση του NO από τις στατίνες και συνεπώς η βελτιωμένη λειτουργία του ενδοθηλίου, σχετίζεται με την επαγωγή του σηματοδοτικού καταρράκτη PI3K/Akt/eNOS.<sup>98</sup> Σε συμφωνία με τα παραπάνω, στο πρωτόκολλο των μυών ApoE<sup>-/-</sup> HFD με ατορβαστατίνη, καμία από της πρωτεΐνες που αναλύθηκαν δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή στη φωσφορυλίωση ή την έκφρασή τους, με εξαίρεση τη φωσφορυλίωση του mTOR και την έκφραση της LC3B. Καθώς στο μοντέλο αυτό, η καρφιλζομίμπη προκαλεί μείωση του κλάσματος συστολικής βράχυνσης, παρά τη διατήρηση της φωσφορυλίωσης της AMPKα και των λοιπών καρδιοπροστατευτικών μηχανισμών, εικάζεται ότι η καρφιλζομίμπη μπορεί να επάγει την καρδιοτοξικότητά της με επιπλέον μηχανισμούς που δεν περιλαμβάνουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK. Γι' αυτό το λόγο, προτείνεται η περαιτέρω ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τη καρφιλζομίμπη όπως παραδείγματος χάριν η επίδραση του φαρμάκου επί της φωσφατάσης PP2A και των λοιπών καθοδικών στόχων αυτής.

Όσον αφορά την καρδιακή λειτουργία των πειραματόζωων, στο πρωτόκολλο αυτό παρατηρείται εξαρχής αυξημένο ΔFS% σε σύγκριση με τους μύες που έλαβαν HFD χωρίς ατορβαστατίνη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η μετορμίνη επαναφέρει την καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την καρφυλιζομίμη, αφού επαναφέρει τα επίπεδα του ΔFS% σε αντίστοιχα με αυτά της ομάδας ελέγχου. Η ατορβαστατίνη μείωσε την ολική και LDL χοληστερόλη και αύξησε την HDL χοληστερόλη σε σχέση με την ομάδα των μυών ApoE<sup>-/-</sup> HFD που δεν έλαβαν ατορβαστατίνη. Αυτό υποδηλώνει ότι η μετορμίνη διατηρεί την καρδιοπροστατευτική δράση της ανεξάρτητα από τα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα. Καθώς, όπως συζητήθηκε παραπάνω, ο άξονας της AMPKα, δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη καρδιοπροστασία στο συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο, οι επιπρόσθετες δράσεις της μετορμίνης (μεταβολή του κυτταρικού μεταβολισμού μέσω αναστολής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) μπορεί να είναι υπεύθυνες για την επαγωγή της καρδιοπροστασίας. Η υπόθεση αυτή έρχεται σε συμφωνία με σύγχρονα κλινικά δεδομένα που καταδεικνύουν ότι φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της στηθάγχης, όπως το παράδειγμα της τριμεταζιδίνης, επηρεάζουν τον καρδιακό μεταβολισμό και είναι ικανά να παρέχουν καρδιοπροστατευτικές δράσεις.<sup>99</sup>

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η καρφυλιζομίμη επάγει καρδιοτοξικότητα τόσο στο μοντέλο της ήπιας όσο και της δριμείας υπερλιπιδαιμίας, με τη μετορμίνη να επάγει καρδιοπροστασία ανεξάρτητα του λιπιδαιμικού προφίλ των πειραματόζωων και της χορήγησης ατορβαστατίνης. Η χορήγηση ατορβαστατίνης επαναφέρει την λιπιδική ομοίωση και επάγει την ενεργοποίηση των καρδιοπροστατευτικών μονοπατιών του καταρράκτη Akt-AMPK/eNOS, χωρίς ωστόσο να δρα προστατευτικά έναντι της καρδιοτοξικότητας της καρφυλιζομίμης. Φαίνεται λοιπόν ότι οι μεταβολικές δράσεις της μετορμίνης κατέχουν υψηλή σημασία στην επαγωγή της παρατηρούμενης καρδιοπροστασίας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την διερεύνηση του παραπάνω φαινοτύπου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A.Vander, M.D, M. T., M. D. *Φυσιολογία του Ανθρώπου*. (Π.Χ. Πασχαλίδης).
2. Kim E. Barrett. *Ganog's Ιατρική Φυσιολογία*. (Π.Χ. Πασχαλίδης).
3. Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma) Treatment. *National Cancer Institute* <https://www.cancer.gov/types/myeloma/patient/myeloma-treatment-pdq>.
4. Adams, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews* **29**, 3–9 (2003).
5. Naymagon, L. & Abdul-Hay, M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *Journal of Hematology & Oncology* **9**, (2016).
6. Palumbo, A. & Anderson, K. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **364**, 1046–1060 (2011).
7. Brigle, K. & Rogers, B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing* **33**, 225–236 (2017).
8. Rajkumar, S. V., Landgren, O. & Mateos, M.-V. Smoldering multiple myeloma. *Blood* **125**, 3069–3075 (2015).
9. Rajkumar, S. V. & Kumar, S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **91**, 101–119 (2016).
10. Moreau, P. *et al.* Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* **28**, iv52–iv61 (2017).
11. Rajkumar, S. V. *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* **15**, e538–e548 (2014).



12. Mina, R., Cerrato, C., Bernardini, A., Aghemo, E. & Palumbo, A. New pharmacotherapy options for multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **17**, 181–192 (2016).
13. Manasanch, E. E. & Orłowski, R. Z. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* **14**, 417–433 (2017).
14. McBride, A., Klaus, J. O. & Stockerl-Goldstein, K. Carfilzomib: A second-generation proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma. *American Journal of Health-System Pharmacy* **72**, 353–360 (2015).
15. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko & Lubert Stryer. *Βιοχημεία*.
16. Myung, J., Kim, K. B. & Crews, C. M. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* **21**, 245–273 (2001).
17. Schmidt, M. & Finley, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 13–25 (2014).
18. Masaki RI. Mechanism of action of bortezomib in multiple myeloma therapy. *International Journal of Myeloma* **6**, (2016).
19. Selvaraju, K. *et al.* Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors? *Drug Resistance Updates* **21–22**, 20–29 (2015).
20. Lü, S. & Wang, J. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res* **1**, 13 (2013).
21. Kim, K. B. & Crews, C. M. From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 600 (2013).
22. Paramore, A. & Frantz, S. Bortezomib. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 611–612 (2003).

23. Perel, G., Bliss, J. & Thomas, C. M. Carfilzomib (Kyprolis): A Novel Proteasome Inhibitor for Relapsed And/or Refractory Multiple Myeloma. *P T* **41**, 303–307 (2016).
24. Raedler, L. A. Ninlaro (Ixazomib): First Oral Proteasome Inhibitor Approved for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Am Health Drug Benefits* **9**, 102–105 (2016).
25. Mikhael, J. Management of Carfilzomib-Associated Cardiac Adverse Events. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **16**, 241–245 (2016).
26. Hasinoff, B. B., Patel, D. & Wu, X. Molecular Mechanisms of the Cardiotoxicity of the Proteasomal-Targeted Drugs Bortezomib and Carfilzomib. *Cardiovascular Toxicology* **17**, 237–250 (2017).
27. Andreu-Vieyra, C. & Berenson, J. R. Carfilzomib in multiple myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy* **14**, 1685–1699 (2014).
28. Tjionas, H. & Gupta, A. K. Heart failure secondary to carfilzomib-induced heart block in multiple myeloma patients. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* **23**, 152–156 (2017).
29. Danhof, S. *et al.* ‘Real-life’ experience of preapproval carfilzomib-based therapy in myeloma - analysis of cardiac toxicity and predisposing factors. *European Journal of Haematology* **97**, 25–32 (2016).
30. Siegel, D. *et al.* Integrated safety profile of single-agent carfilzomib: experience from 526 patients enrolled in 4 phase II clinical studies. *Haematologica* **98**, 1753–1761 (2013).
31. Dimopoulos, M. A. *et al.* Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma

- (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology* **17**, 27–38 (2016).
32. Plummer, C., Driessen, C., Szabo, Z. & Mateos, M.-V. Management of cardiovascular risk in patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J.* **9**, 26 (2019).
  33. Efentakis, P. *et al.* Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin. *Blood* **133**, 710–723 (2019).
  34. Zheng, Q., Su, H., Tian, Z. & Wang, X. Proteasome malfunction activates macroautophagy in the heart. *Am J Cardiovasc Dis* **1**, 214–226 (2011).
  35. Wang, C. & Wang, X. The interplay between autophagy and the ubiquitin–proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**, 188–194 (2015).
  36. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics* **43**, 67–93 (2009).
  37. Yun, Z. *et al.* Targeting autophagy in multiple myeloma. *Leukemia Research* **59**, 97–104 (2017).
  38. Choi, A. M. K., Ryter, S. W. & Levine, B. Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine* **368**, 651–662 (2013).
  39. Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D. & Codogno, P. Diversity of Signaling Controls of Macroautophagy in Mammalian Cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 431–441 (2002).
  40. Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J. & Codogno, P. Erk1/2-dependent Phosphorylation of Gα-interacting Protein Stimulates Its GTPase Accelerating


- Activity and Autophagy in Human Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 39090–39095 (2000).
41. Ding, W.-X. Uncoupling AMPK from autophagy: a foe that hinders the beneficial effects of metformin treatment on metabolic syndrome-associated atherosclerosis? Focus on ‘glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells’. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **308**, C246-248 (2015).
  42. Cao, D. J., Gillette, T. G. & Hill, J. A. Cardiomyocyte autophagy: Remodeling, repairing, and reconstructing the heart. *Current Science Inc* **11**, 406–411 (2009).
  43. Sussman, M. A. *et al.* Myocardial AKT: The Omnipresent Nexus. *Physiological Reviews* **91**, 1023–1070 (2011).
  44. Heusch, G. Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circulation Research* **116**, 674–699 (2015).
  45. Hu. Proteasome inhibitor MG132 suppresses number and function of endothelial progenitor cells: Involvement of nitric oxide synthase inhibition. *Int J Mol Med* **25**, (2010).
  46. Palumbo, A. *et al.* Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood* **118**, 4519–4529 (2011).
  47. Kleber, M. *et al.* Comorbidity as a prognostic variable in multiple myeloma: comparative evaluation of common comorbidity scores and use of a novel MM–comorbidity score. *Blood Cancer Journal* **1**, e35–e35 (2011).
  48. Kistler, K. D., Rajangam, K., Faich, G. & Lanes, S. Cardiac Event Rates in Patients with Newly Diagnosed and Relapsed Multiple Myeloma in US Clinical Practice. *Blood* **120**, 2916–2916 (2012).

49. Backs, D. *et al.* Prevalence of cardiovascular risk factors and diseases in patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Oncotarget* **10**, 3154–3165 (2019).
50. Francula-Zaninovic, S. & Nola, I. A. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *CCR* **14**, 153–163 (2018).
51. Ragbourne, S. C., Maghsoodi, N., Streetly, M. & Crook, M. A. The Association between Metabolic Syndrome and Multiple Myeloma. *Acta Haematol* 1–9 (2020) doi:10.1159/000505992.
52. Heusch, G. Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circ Res* **120**, 1477–1486 (2017).
53. Andreadou, I. *et al.* Hyperlipidaemia and cardioprotection: Animal models for translational studies. *Br J Pharmacol* bph.14931 (2020) doi:10.1111/bph.14931.
54. Meyrelles, S. S., Peotta, V. A., Pereira, T. M. & Vasquez, E. C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis* **10**, 211 (2011).
55. Lo Sasso, G. *et al.* The Apoe<sup>-/-</sup> mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med* **14**, 146 (2016).
56. Getz, G. S. & Reardon, C. A. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *J Lipid Res.* **57**, 758–766 (2016).
57. Plump, A. S. & Breslow, J. L. Apolipoprotein E and the Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 495–518 (1995).
58. Getz, G. S. & Reardon, C. A. Diet and Murine Atherosclerosis. *ATVB* **26**, 242–249 (2006).

59. Herck, J. L. *et al.* Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol* **105**, 39–50 (2010).
60. Adams, S. P., Tsang, M. & Wright, J. M. Lipid-lowering efficacy of atorvastatin. *Cochrane Database Syst Rev* CD008226 (2015)  
doi:10.1002/14651858.CD008226.pub3.
61. Tie, C. *et al.* Ezetimibe Attenuates Atherosclerosis Associated with Lipid Reduction and Inflammation Inhibition. *PLoS ONE* **10**, e0142430 (2015).
62. Bot, I., Jukema, J. W., Lankhuizen, I. M., van Berkel, T. J. C. & Biessen, E. A. L. Atorvastatin inhibits plaque development and adventitial neovascularization in ApoE deficient mice independent of plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* **214**, 295–300 (2011).
63. Guo, X., Wang, L., Xia, X., Wang, P. & Li, X. Effects of atorvastatin and/or probucol on recovery of atherosclerosis in high-fat-diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**, 1445–1453 (2019).
64. Andreadou, I. *et al.* Effect of hypercholesterolaemia on myocardial function, ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning: Hypercholesterolaemia and cardioprotection. *British Journal of Pharmacology* **174**, 1555–1569 (2017).
65. Gregersen, H. *et al.* The impact of comorbidity on mortality in multiple myeloma: a Danish nationwide population-based study. *Cancer Med* **6**, 1807–1816 (2017).
66. Ríos-Tamayo, R. *et al.* Early mortality in multiple myeloma: the time-dependent impact of comorbidity: A population-based study in 621 real-life patients: Early Mortality in MM. *Am. J. Hematol.* **91**, 700–704 (2016).
67. Διατροφή δυτικού τύπου TD.88137.

68. Wang, J. *et al.* Statins exert differential effects on angiotensin II-induced atherosclerosis, but no benefit for abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **217**, 90–96 (2011).
69. Varela, A. *et al.* The neuroprotective agent Rasagiline mesylate attenuates cardiac remodeling after experimental myocardial infarction: Rasagiline mesylate attenuates cardiac remodelling after myocardial infarction. *ESC Heart Failure* **4**, 331–340 (2017).
70. Gao, S., Ho, D., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Echocardiography in Mice. in *Current Protocols in Mouse Biology* (eds. Auwerx, J. *et al.*) mo100130 (John Wiley & Sons, Inc., 2011). doi:10.1002/9780470942390.mo100130.
71. Vasquez, E. C., Peotta, V. A., Gava, A. L., Pereira, T. M. & Meyrelles, S. S. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci* **19**, 22 (2012).
72. Bass, J. J. *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **27**, 4–25 (2017).
73. Yang, P.-C. & Mahmood, T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**, 429 (2012).
74. BIOSIS-ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ/PAP.
75. BIOSIS-HDL ΦΩΣΦΟΒΟΛΦΡΑΜΙΚΟΥ.
76. Caymann-Triglyceride Colorimetric Assay Kit.
77. Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* **18**, 499–502 (1972).



78. Demuner, B. L. *et al.* Effect of total splenectomy in the lipid profile in mice. *Acta Cir. Bras.* **30**, 306–312 (2015).
79. Tsakiri, E. N. *et al.* Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs . somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *The FASEB Journal* **27**, 2407–2420 (2013).
80. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* **30**, 214–226 (2008).
81. Mebratu, Y. & Tesfaigzi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* **8**, 1168–1175 (2009).
82. Xie, Z. *et al.* Improvement of Cardiac Functions by Chronic Metformin Treatment Is Associated With Enhanced Cardiac Autophagy in Diabetic OVE26 Mice. *Diabetes* **60**, 1770–1778 (2011).
83. Yoshii, S. R. & Mizushima, N. Monitoring and Measuring Autophagy. *IJMS* **18**, 1865 (2017).
84. Stone, N. J. *et al.* 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Journal of the American College of Cardiology* **63**, 2889–2934 (2014).
85. Adams, S. P., Tsang, M. & Wright, J. M. Atorvastatin for lowering lipids. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2015)  
doi:10.1002/14651858.CD008226.pub3.
86. Hungria, V. T. de M. *et al.* New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* **41**, 76–83 (2019).
87. Bird, S. A. & Boyd, K. Multiple myeloma: an overview of management. *Palliat Care* **13**, 117822421986823 (2019).

88. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition.
89. Davignon, J. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* **109**, III-27-III-32 (2004).
90. Herrmann, J. *et al.* Chronic Proteasome Inhibition Contributes to Coronary Atherosclerosis. *Circulation Research* **101**, 865–874 (2007).
91. Forstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829–837 (2012).
92. Ozaki, M. *et al.* Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **110**, 331–340 (2002).
93. Yang, X. *et al.* Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front. Physiol.* **8**, 600 (2017).
94. Stamatelopoulos, K. *et al.* Reactive Vasodilation Predicts Mortality in Primary Systemic Light-Chain Amyloidosis. *Circ Res* **125**, 744–758 (2019).
95. Nagao, M., Nakajima, H., Toh, R., Hirata, K. & Ishida, T. Cardioprotective Effects of High-Density Lipoprotein Beyond its Anti-Atherogenic Action. *J Atheroscler Thromb* **25**, 985–993 (2018).
96. Kurdi, A., De Meyer, G. R. Y. & Martinet, W. Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis: mTOR inhibition in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* **82**, 1267–1279 (2016).
97. Zhang, Q. *et al.* Autophagy Activation: A Novel Mechanism of Atorvastatin to Protect Mesenchymal Stem Cells from Hypoxia and Serum Deprivation via AMP-

Activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Stem Cells and Development* **21**, 1321–1332 (2012).

98. Gorabi, A. M. *et al.* Statin-Induced Nitric Oxide Signaling: Mechanisms and Therapeutic Implications. *JCM* **8**, 2051 (2019).
99. Rosano, G. M., Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy, Vitale, C. & Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy. Metabolic Modulation of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Cardiac Failure Review* **4**, 99 (2018).