

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL DE ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

MITROI ALINA MARIA



REZUMAT

**MODULAREA FARMACOLOGICĂ A FUNCȚIEI
MITOCONDRIALE LA NIVELUL CELULELOR SANGUINE**

Coordonator științific:

PROF. UNIV. DR. MUNTEAN MIRELA-DANINA

**Timișoara
2024**

CUPRINS

LISTA PUBLICAȚIILOR	VII
LISTA ABREVIERILOR.....	VIII
INDEXUL FIGURILOR.....	X
INDEXUL TABELELOR	XIII
MULȚUMIRI.....	XIV
INTRODUCERE.....	XV

PARTEA GENERALĂ - REVIEW AL LITERATURII

1. Disfuncția mitocondrială indusă medicamentos	1
1.1. Funcțiile și rolurile mitocondriilor - aspecte generale	1
1.2. Mecanismele disfuncției mitocondriale induse medicamentos	3
1.2.1. Creșterea stresului oxidativ	3
1.2.2. Deschiderea ireversibilă a porului de tranziție a permeabilității mitocondriale (MPTP).....	4
1.2.3. Inhibiția complexelor proteice ale lanțului transportor de electroni inclusiv inhibiția directă a ATP sintazei.....	5
1.2.4. Decuplarea transportului de electroni de la sinteza ATP	5
1.2.5. Inhibiția ciclului acidului citric	5
1.2.6. Inhibiția beta-oxidării acizilor grași	6
1.2.7. Alterarea ADN-ului mitocondrial	6
1.2.8. Alterarea dinamicii mitocondriale	7
1.3. Consecințele disfuncției mitocondriale induse medicamentos.....	8
1.4. Modele preclinice/experimentale ale principalelor medicamente cardiovasculare și analgezice care afectează mitocondriile	10
1.4.1. Simpaticomimetice.....	11
1.4.2. Antiaritmice.....	11
1.4.2.1. Clasa I (blocante ale canalelor de Na)	11
1.4.2.2. Clasa II (β-blocante)	12
1.4.2.3. Clasa III (blocante ale canalelor de K)	14
1.4.2.4. Clasa IV (blocante ale canalelor de Ca)	14
1.4.2.5. Altele	15
1.4.3. Blocanți ai sistemului renină-angiotensină-aldosteron.....	16
1.4.3.1. Inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei	16
1.4.3.2. Blocanți receptorilor de angiotensină	17
1.4.3.3. Inhibitor al neprilizinei și al receptorilor angiotensinei: Sacubitril/Valsartan.....	18
1.4.4. Blocanți ai canalelor de calciu - dihidropiridine.....	19
1.4.5. Agenți antrombotici	19
1.4.6. Anticoagulante orale	20
1.4.6.1. Derivați de cumarină	20
1.4.6.2. Anticoagulante orale directe.....	20
1.4.7. Diuretice	21
1.4.7.1. Diuretice de ansă.....	21
1.4.7.2. Antagoniști ai aldosteronului	22
1.4.8. Statine	22
1.4.9. Vasodilatatoare directe	23

1.4.10. Inhibitori ai cotransportatorului 2 de sodiu-glucoză.....	24
1.4.11. Agoniști ai receptorilor peptidei 1 asemănătoare glucagonului	25
1.4.12. Medicamente analgezice	26
2. Disfuncția mitocondrială la nivelul celulelor sanguine	27
2.1. Dis/funcția mitocondrială la nivelul trombocitelor și leucocitelor	27
2.1.1. Trombocite.....	27
2.1.2. Leucocite	28
2.2. Celulele sanguine ca biomarkeri ai disfuncției mitocondriale	29
3. Terapia țintită mitocondrială cu succinat permeabil celular	31
3.1. Protejarea “centralei” energetice mitocondriale utilizând compusi de tip succinat permeabil celular	31

PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE

1. 1. STUDIUL I – Contribuții privind evaluarea toxicității mitocondriale induse de amiodaronă la nivelul unor modele celulare distincte și strategii de tratament.....	35
1.1. Motivație și obiective	35
1.2. Material and metode.....	36
1.3. Rezultate.....	43
1.3.1. Amiodarona a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială dependentă de doză la nivelul trombocitelor umane.....	43
1.3.2. Metabolitul amiodaronei (DEA) a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială la nivelul trombocitelor umane	52
1.3.3. Amiodarona a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială și depleția ATP la nivelul PBMC intacte.....	57
1.3.4. Succinatul permeabil celular, NV118, a ameliorat disfuncția mitocondrială acută indusă de amiodaronă la nivelul trombocitelor umane.....	60
1.3.5. Succinatul permeabil celular, NV118, a ameliorat disfuncția mitocondrială acută indusă de amiodaronă la nivelul celulelor HepG2.....	63
1.4. Discuții privind toxicitatea amiodaronei asupra respirației mitocondriale în urma expunerii acute.....	68
2. STUDIU 2 – Contribuții privind evaluarea toxicității mitocondriale induse de acetaminofen (APAP) și ibuprofen la nivelul trombocitelor umane izolate din buffy coat	73
2.1. Motivație și obiective	73
2.2. Material și metode	73
2.3. Rezultate.....	76
2.3.1. APAP a indus alterarea respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor umane izolate din buffy coat	76
2.3.2. Ibuprofen a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială la nivelul trombocitelor umane izolate din buffy coat.....	83
2.4. Discuții privind efectele expunerii acute la APAP și ibuprofen asupra respirației mitocondriale	90

DISCUȚII GENERALE.....	97
-------------------------------	-----------

CONCLUZII	101
------------------------	------------

REFERINȚE	105
------------------------	------------

Cuvinte cheie: disfuncție mitocondrială, respirometrie de înaltă rezoluție, ATP, trombocite, celule mononucleare periferice, celule HepG2, amiodaronă, desetilamiodaronă, sotalol, succinat permeabil celular, acetaminofen (APAP), ibuprofen

I. CONTEXTUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate la nivel mondial. Se așteaptă ca prevalența aritmiilor să crească pe măsură ce populația îmbătrânește și sunt descoperiți factori de risc suplimentari pentru aritmii. Amiodarona, un medicament antiaritmie de clasa III (conform clasificării Vaughan-Williams), este unul dintre medicamentele prescrise frecvent, în principal datorită eficienței sale în tratamentul aritmiilor supraventriculare și ventriculare. Având un efect inotrop negativ redus și o incidență scăzută a efectelor proaritmice ventriculare, amiodarona reprezintă o terapie valoroasă pentru pacienții cu insuficiență cardiacă. Cu toate acestea, este bine cunoscut faptul că utilizarea amiodaronei poate duce la apariția de multiple reacții adverse. În absența contraindicațiilor, sotalolul, un beta-blocant non-cardioselectiv, aparținând de asemenea clasei III de medicamente antiaritmice, poate servi ca un potențial substitut al amiodaronei datorită profilului său de siguranță mai avantajos.

Deși mecanismele specifice care stau la baza toxicității induse de amiodaronă la om nu sunt complet elucidate, un număr tot mai mare de dovezi indică faptul că alterarea funcției mitocondriale împreună cu stresul oxidativ joacă un rol esențial.

Importanța disfuncției mitocondriale ca mecanism fiziopatologic primar în aproape toate patologiile cardiovasculare este în prezent unanim recunoscută, ceea ce face ca aceste organe să fie ținte viabile pentru noi strategii terapeutice; cu toate acestea, până în prezent nu există medicamente disponibile pentru utilizare clinică. Compușii de tip precursor de succinat permeabil celular au fost concepuți pentru a susține fosforilarea oxidativă în contextul toxicității induse de medicamente sau în diverse patologii caracterizate prin disfuncția complexului I al sistemului transportor de electroni (ETS) de la nivelul membranei mitocondriale interne. Permeabilitatea lor crescută la nivelul membranelor celulare, le permite să furnizeze succinatul, substratul complexului II, asigurând astfel reluarea/îmbunătățirea transportului de electroni alterat de către boală și/sau toxicitate medicamentoasă.

Acetaminofenul (N-acetil-p-aminofenol, APAP) și ibuprofenul sunt două dintre cele mai utilizate medicamente de tip OTC, fără prescripție medicală iar disfuncția mitocondrială recunoscută drept un mecanism fiziopatologic esențial în toxicitatea indusă de ambele medicamente. În literatura de specialitate, există multiple studii efectuate pe modele animale, dar un număr limitat de informații privind rolul mitocondriilor în toxicitatea APAP și ibuprofenului la om. În mod regretabil, pandemia COVID-19 a amplificat rata de automedicație, crescând astfel riscul potențial al toxicității mitocondriale în urma supradozajului și/sau a interacțiunilor medicamentoase. Acest aspect este relevant mai ales la populația vârstnică, ale cărei comorbidități fac imposibilă prevenirea utilizării simultane a mai multor medicamente cu potențial toxic mitocondrial, la care se asociază declinul funcției mitocondriale asociat vârstei.

Celulele sanguine izolate din sângele periferic au fost utilizate din ce în ce mai mult în activitatea de cercetare drept alternative ale biopsiilor tisulare în vederea evaluării bioenergeticii mitocondriale la om. În ultimul deceniu, mai ales trombocitele izolate au reprezentat o sursă de mitocondrii viabile pentru studiul disfuncției mitocondriale respiratorii în cadrul diferitelor patologii acute și cronice. Similar, toxicitatea mitocondrială indusă medicamentos a fost investigată la nivelul acestor celule prin evaluarea efectului dependent de doză asupra respirației mitocondriale și a modalităților de combatere a acesteia cu ajutorul compușilor mitocondriotropi.

Scopul studiului doctoral a constat în caracterizarea efectelor celor mai frecvent utilizate medicamente antiaritmice și antalgice (două din fiecare clasă), împreună cu investigarea efectelor

unui compus de tip succinat permeabil celular, NV118 (pus cu generozitate la dispoziție de către compania Abliva AB, prin intermediul Prof. Dr. Eskil Elmer de la Universitatea din Lund, Suedia) asupra funcției mitocondriale respiratorii la nivelul mai multor tipuri celulare.

Cercetările din cadrul studiului doctoral au fost efectuate în cadrul Centrului de Cercetare Translațională și Medicina Sistemelor al Facultății de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara și respectiv, al Centrului de Medicină Mitocondrială al Universității din Lund, Suedia în baza avizelor Comisiilor de Etică ale ambelor universități (precizate în cele 2 articole originale).

Obiectivele cercetării au fost următoarele:

1. Caracterizarea efectelor acute dependente de concentrație ale amiodaronei, metabolitul său, desetilamiodarona (DEA) și sotalol asupra respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor umane izolate.
2. Caracterizarea efectelor acute dependente de concentrație ale amiodaronei asupra respirației mitocondriale la nivelul celulelor mononucleare izolate din sângele periferic (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) și a celulelor HepG2, o linie de celule hepatice umane.
3. Evaluarea potențialului unui promedicament de succinat permeabil celular, NV118, de a atenua alterarea indusă medicamentos a respirației plachetare.
4. Caracterizarea efectelor acute, dependente de doză, ale APAP și ibuprofenului asupra respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate din stratul leucotrombocitar provenit de la donatori sănătoși.

II. REZULTATELE CERCETĂRII DOCTORALE incluse în partea specială a tezei:

1. Amiodarona (dar nu și Sotalolul) a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială dependentă de doză la nivelul trombocitelor umane

Efectele amiodaronei sau ale sotalolului asupra respirației mitocondriale au fost mai întâi evaluate în trombocite umane intacte expuse la concentrații crescânde (15-240 μM) ale acestor medicamente și comparate cu un volum echivalent de solvent (DMSO). Prin măsurarea consumului mitocondrial de oxigen, s-a demonstrat că amiodarona, dar nu și sotalolul, a indus o inhibiție semnificativă, dependentă de concentrație, a respirației mitocondriale atunci când a fost aplicată în cea mai mare concentrație (Fig. 1A). Pentru a identifica mecanismul care stă la baza disfuncției dependente de concentrație a lanțului respirator mitocondrial, provocată de medicamentele antiaritmice, respirația mitocondrială a fost analizată în continuare în trombocite permeabilizate cu digitonină în prezența a trei concentrații selectate (60, 120 și 240 μM) ale medicamentelor. Amiodarona a provocat o inhibiție progresivă semnificativă a capacității totale fosforilante (OXPHOS) începând cu cea mai mică concentrație testată (60 μM) (Fig. 1B), prin scăderea atât a OXPHOS dependentă de NADH (Fig. 1C), cât și a OXPHOS dependentă de succinat (figura 1D), aceasta din urmă prezentând o scădere mai pronunțată. Capacitatea ET sau respirația maximă necuplabilă, care este o măsură a capacității maxime de transport de electroni a lanțului respirator, a fost, de asemenea, redusă de către amiodaronă într-o manieră dependentă de concentrație, dar nu și de către sotalol (Fig. 1E).

Amiodarona a afectat, de asemenea, producția de ATP prin creșterea ușoară a respirației non-fosforilante, dovadă a decuplării procesului de fosforilare oxidativă (Fig. 1F). Este interesant

faptul că efectul de decuplare a atins un maxim la 60 μM și a dispărut odată cu creșterea concentrației medicamentului.

Pentru a valida (indirect) efectul negativ al amiodaronei asupra generării ATP, au fost calculate două rapoarte: eficiența capacității de fosforilare (Fig. 1G) și eficiența de cuplare a sistemului transportor de electroni (Fig. 1H). În timp ce ambele rapoarte au prezentat o scădere dependentă de concentrație de către amiodaronă, primul a prezentat o scădere semnificativă chiar și la cea mai mică concentrație testată (60 μM).

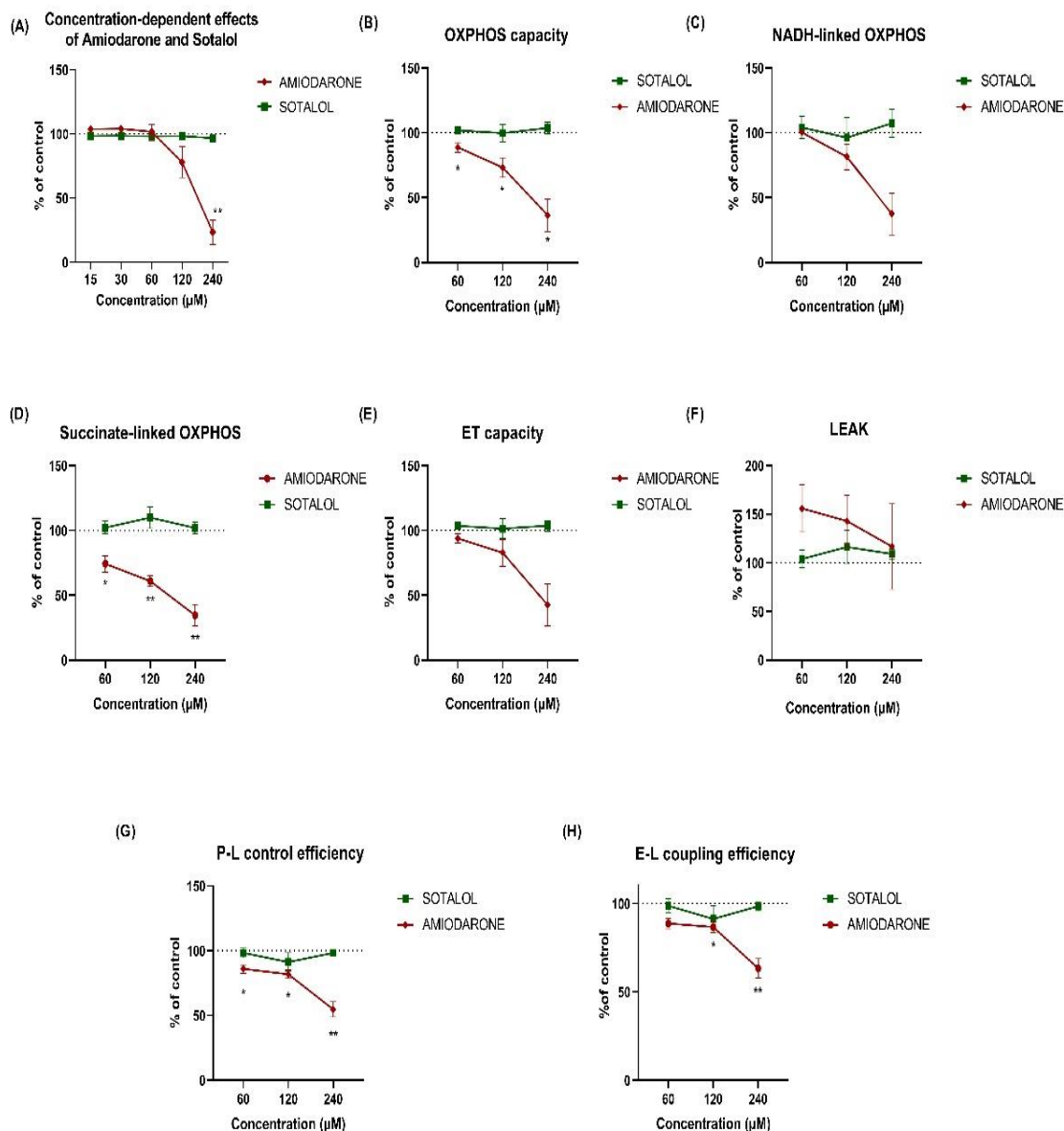


Figura 1. Efectele acute ale amiodaronei și ale sotalolului asupra respirației mitocondriale a trombocitelor umane izolate.

2. Metabolitul amiodaronei (DEA) a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială la nivelul trombocitelor umane izolate

Amiodarona are potențialul de a induce disfuncție mitocondrială atât direct, cât și indirect, prin acumularea metabolitului său, desetilamiodaronă (DEA). Pentru a investiga efectele DEA asupra consumului mitocondrial de oxigen, au fost analizați aceiași parametri de respirometrie de înaltă rezoluție ca și cei utilizați pentru amiodaronă.

Expunerea la cea mai mare doză de DEA (60 μM) a scăzut parametrii respirației mitocondriale, după cum urmează: capacitatea de fosforilare oxidativă (OXPHOS) totală la $31\% \pm 4,1$ din control (Fig. 2A), capacitatea de fosforilare oxidativă (OXPHOS) dependentă de NADH la $20\% \pm 5,6$ din control (Fig. 2B), capacitatea de fosforilare oxidativă (OXPHOS) dependentă de succinat la $41,3\% \pm 13,1$ din control (Fig. 2C), capacitatea ET la $36,1\% \pm 6,5$ din control (Fig. 2D), respirația non-fosforilantă (LEAK) la $62,2\% \pm 3,6$ din control (Fig. 2E), eficiența de cuplare a sistemului transportor de electroni la $53,9\% \pm 5,4$ (Fig. 2G). Eficiența capacității de fosforilare a fost semnificativ diminuată de către DEA (60 μM), la $37\% \pm 13,7$ din control (Fig. 2F).

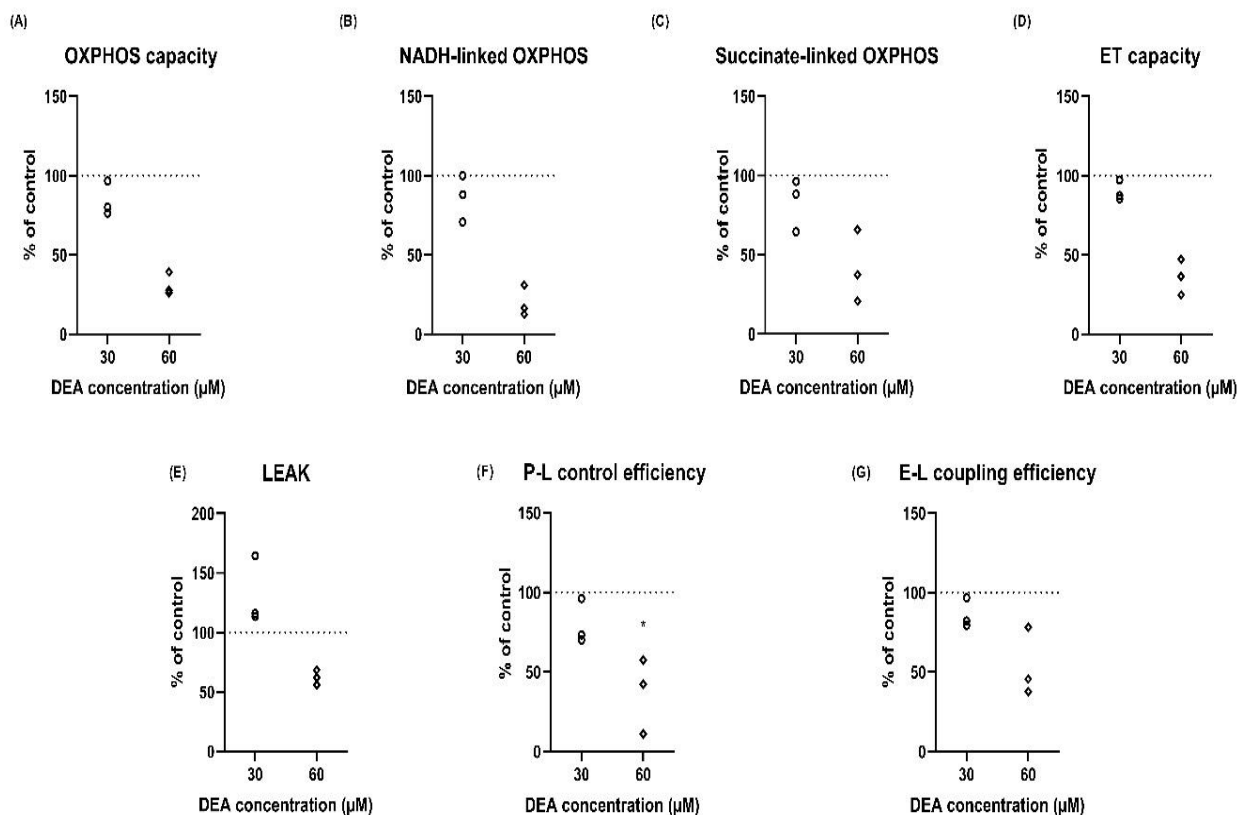


Figura 2. Efectele acute ale DEA asupra respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor umane izolate.

3. Amiodarona a determinat disfuncție mitocondrială respiratorie și depleția ATP la nivelul celulelor mononucleare periferice izolate

Pentru a verifica dacă efectele amiodaronei la nivelul trombocitar expuse amiodaronei pot fi confirmate la nivelul altor celule sanguine, active din punct de vedere metabolic, s-a efectuat o evaluarea respirației mitocondriale la nivelul celulelor mononucleare izolate din sângele periferic (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells). Deoarece amiodarona a indus efecte nefavorabile asupra capacității fosforilante totale și respectiv, asupra capacității fosforilante dependente de NADH, au fost investigate efectele amiodaronei și ale rotenonei (ultima, utilizată drept control pozitiv pentru inhibarea complexului I) asupra consumului mitocondrial de oxigen și al conținutului de ATP celular.

Incubarea PBMC izolate cu amiodaronă (100 μM) sau cu rotenonă (2 μM) a determinat scăderea, dependentă de timp, a consumului mitocondrial de oxigen (Fig. 3A) și a nivelului de ATP (Fig. 3B). La 25 de minute de expunere, amiodarona a redus semnificativ respirația mitocondrială la nivelul PBMC umane, dar acest efect nu a depășit scăderea cauzată de rotenonă ($p < 0,0001$). În schimb, scăderea conținutului de ATP provocată de amiodaronă a depășit-o pe cea indusă de rotenonă, sugerând o toxicitate suplimentară dincolo de toxicitatea mitocondrială ($p < 0,01$).

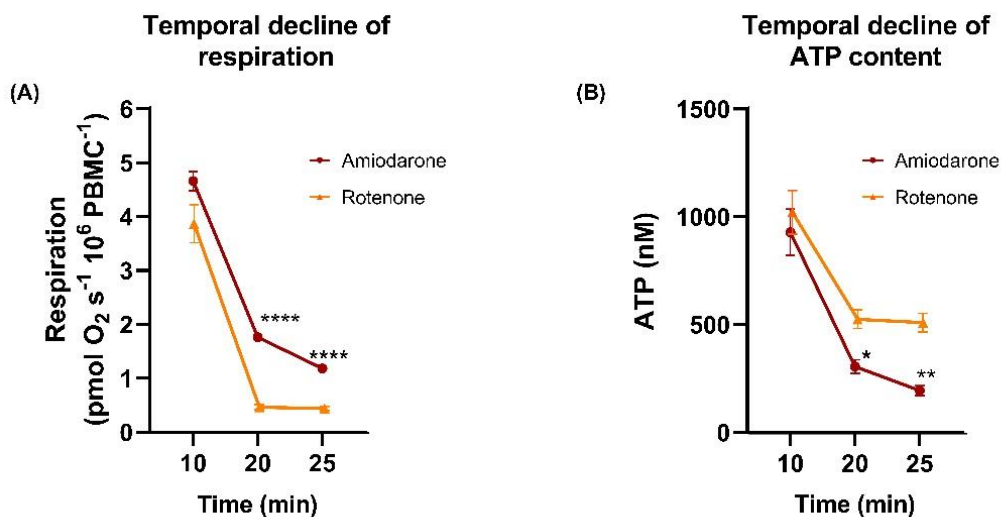


Figura 3. Efectele dependente de timp ale amiodaronei asupra respirației mitocondriale și a nivelului de ATP a celulelor mononucleare periferice.

Evaluarea respirației mitocondriale (Fig. 4A) și a conținutului de ATP (Fig. 4B) în prezența unor concentrații crescânde de amiodaronă (15-240 μM) a fost, de asemenea, efectuată la nivelul PBMC intacte. Amiodarona a indus o afectare semnificativă a respirației începând cu o concentrație de 60 μM ($p < 0,0001$), în timp ce scăderea conținutului de ATP a fost deja semnificativă la o concentrație de 30 μM ($p < 0,0001$).

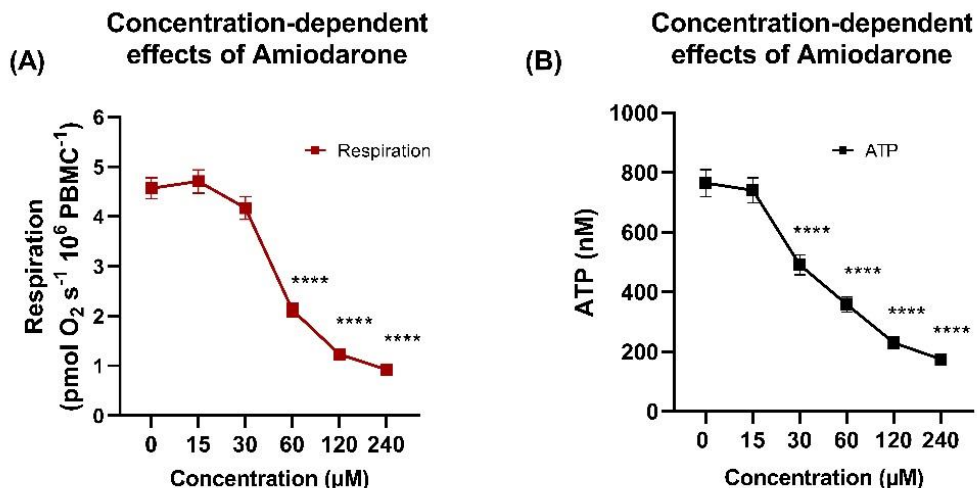


Figura 4. Efecte dependente de concentrație ale amiodaronei asupra respirației mitocondriale și a nivelului de ATP a celulelor mononucleare periferice.

4. Succinatul permeabil celular, NV118, a ameliorat disfuncția mitocondrială acută indusă de amiodaronă la nivelul trombocitelor umane

Deoarece amiodarona a determinat alterarea funcției mitocondriale prin reducerea respirației dependente atât de NADH, cât și de succinat (cu o toxicitate mai mare în cazul succinatlui), s-a evaluat măsura în care această dublă disfuncție respiratorie poate fi ameliorată de către NV118, succinatul permeabil celular la nivelul trombocitelor expuse acut la o concentrație toxică de amiodaronă de 120 μM. Ca o măsură suplimentară de control, consumul mitocondrial de oxigen a fost, de asemenea, evaluat la nivelul trombocitelor expuse doar la DMSO, solventul atât pentru amiodaronă, cât și pentru NV118.

Administrarea compusului NV118 trombocitelor tratate cu amiodaronă a determinat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a capacității sistemului transportor de electroni peste valoarea de control (Fig. 5A), precum și a respirației cuplate, o măsură a respirației generatoare de ATP, care au fost comparabile cu cele ale probelor de control incubate cu DMSO (Fig. 5B). Pentru a investiga dacă efectele benefice menționate mai sus pot fi explicate printr-o creștere a respirației dependente de succinat, consumul de oxigen a fost măsurat în continuare după administrarea de rotenonă, inhibitorul complexului I. Respirația dependentă de succinat a crescut semnificativ ($p < 0,01$) de la $0,5 \pm 0,1$ la nivelul trombocitelor expuse la amiodaronă, la $4,2 \pm 0,3$ la nivelul trombocitelor incubate cu NV118 (Fig. 5C).

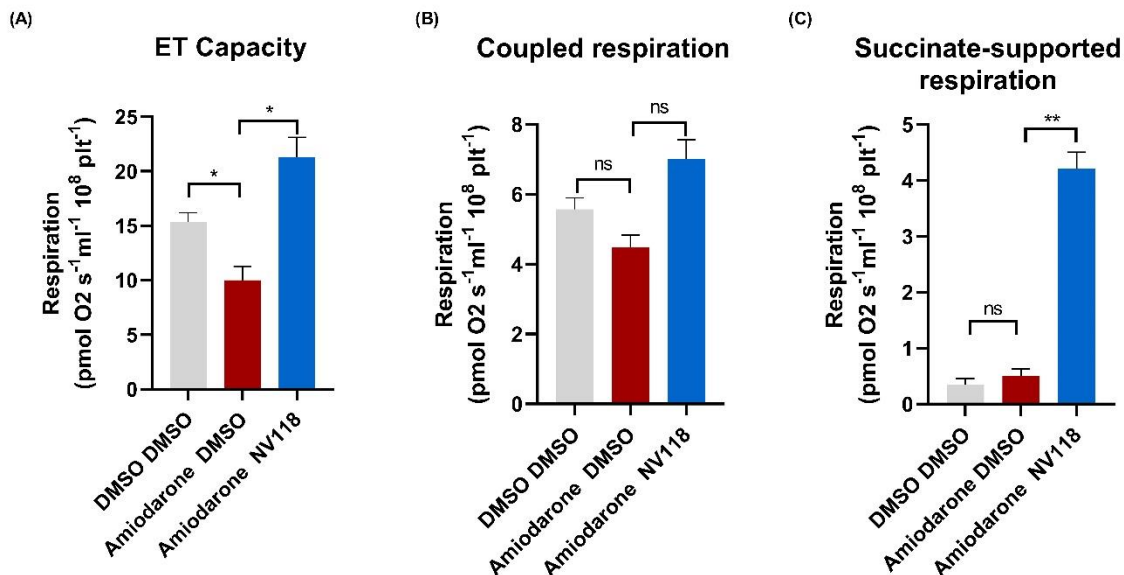


Figura 5. NV118 a ameliorat disfuncția mitocondrială respiratorie indusă de amiodaronă la nivelul trombocitelor umane intacte.

5. Succinatul permeabil celular, NV118, a ameliorat disfuncția mitocondrială acută indusă de amiodaronă la nivelul celulelor HepG2

Având în vedere efectul secundar binecunoscut de hepatotoxicitate al amiodaronei, efectele NV118 au fost investigate la nivelul respirației unei linii celulare umane de celule hepatice, HepG2.

La nivelul celulelor HepG2 intacte, amiodarona a determinat alterarea respirației mitocondriale de o manieră dependentă de concentrație, ca și în cazul celulelor sanguine (Fig. 6A). Similar cu rezultatele obținute la nivelul trombocitelor umane, NV118 a îmbunătățit capacitatea respiratorie (Fig. 6B) a celulelor HepG2 expuse la amiodaronă de la $70,6 \pm 5,2$ la $101 \pm 7,4$, prin creșterea respirației dependente de succinat (Fig. 6D) de la $2,4 \pm 1$ la $18 \pm 2,1$ ($p < 0,05$). Respirația cuplată (Fig. 6C) a fost, de asemenea, îmbunătățită în prezența NV118, cu un consum de oxigen care a crescut de la $15,6 \pm 1,4$ la $26,7 \pm 2,9$ ($p < 0,05$).

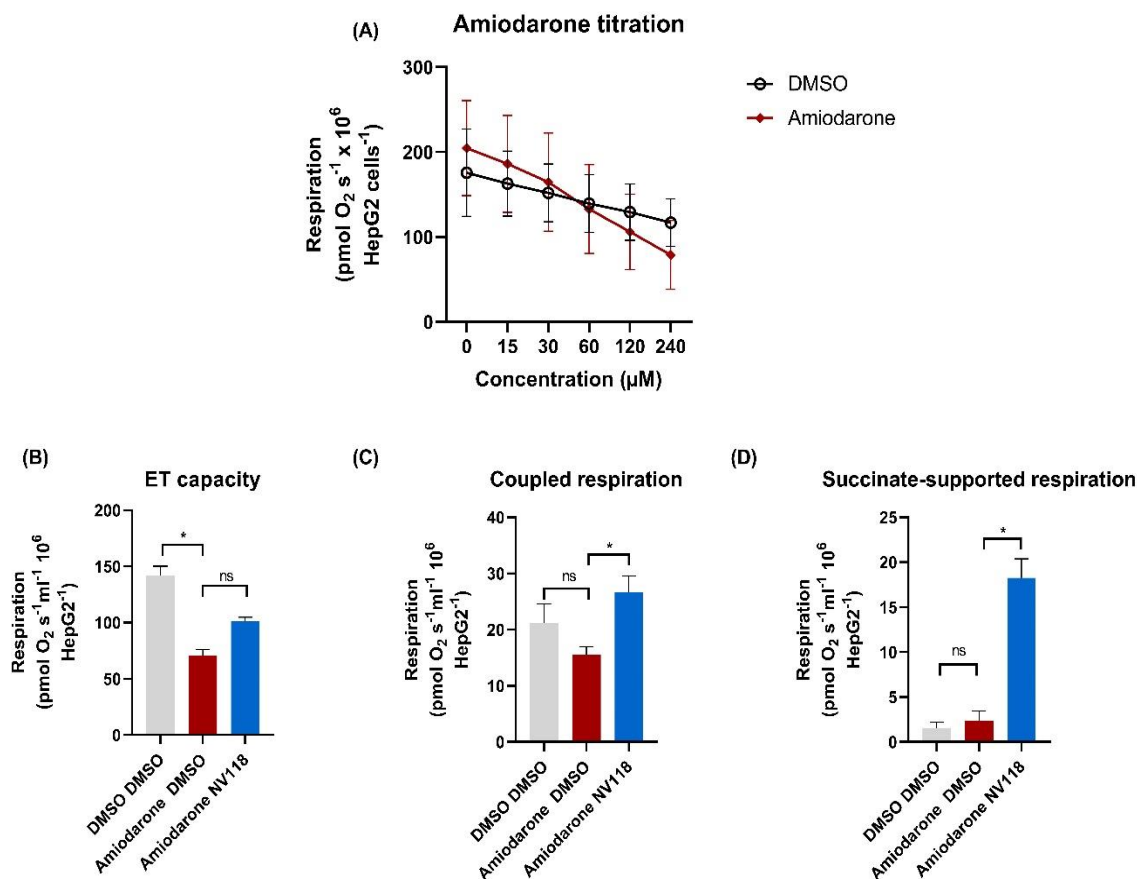


Figura 6. NV118 a ameliorat disfuncția mitocondrială respiratorie indusă de amiodaronă la nivelul celulelor HepG2.

6. Acetaminofenul (APAP) a indus alterarea respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor umane izolate din stratul leucotrombocitar provenit de la donatorii sănătoși

Efectul dependent de concentrație al APAP asupra respirației mitocondriale a fost inițial investigat la nivelul trombocitelor intacte (vs volumul echivalent de solvent, DMSO). APAP a inhibat semnificativ respirația mitocondrială începând de la 4 mM (Fig. 7A).

Pentru a înțelege mai bine mecanismele care determină disfuncția indusă de APAP la nivelul lanțului respirator, respirația mitocondrială a fost investigată la nivelul trombocitelor permeabilizate incubate timp de 10 minute cu cea mai mare concentrație de APAP testată anterior (10 mM). În prezența APAP, atât fosforilarea oxidativă (OXPHOS) dependentă de NADH (Fig. 7B), cât și fosforilarea oxidativă totală (Fig. 7C) au fost reduse semnificativ. Pe de altă parte, respirația non-fosforilantă (LEAK) (Fig. 7D) și cea maximă decuplată (indicatorul capacității maxime a sistemului transportor de electroni) au fost ușor reduse de către APAP, deși fără a atinge semnificația statistică (Fig. 7E). Respirația decuplată dependentă doar de succinat,

măsurată după adăugarea de rotenonă pentru a induce inhibarea complexului I, nu s-a modificat în prezența APAP (Fig. 7F).

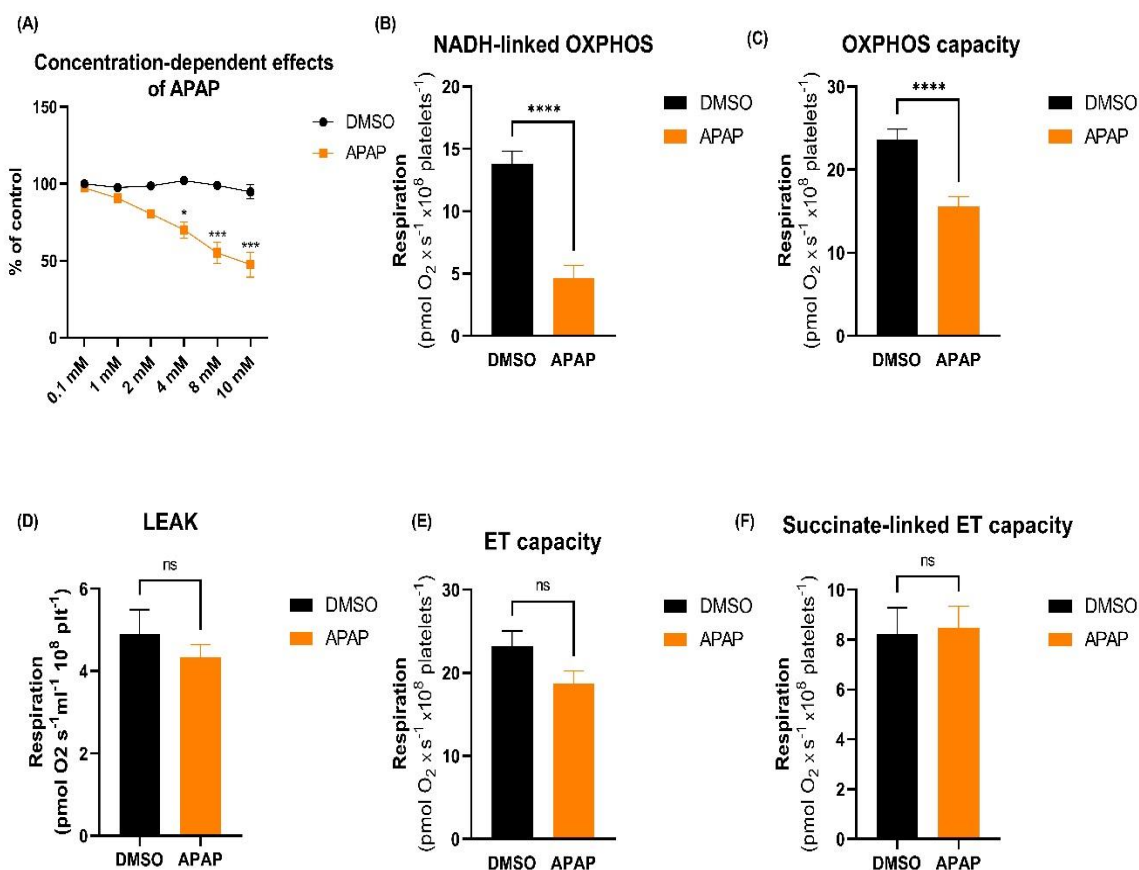


Figura 7. Efectele acute ale APAP asupra respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate din stratul leucotrombocitar.

7. Ibuprofenul a determinat disfuncție respiratorie mitocondrială la nivelul trombocitelor umane izolate din stratul leucotrombocitar provenit de la donatori sănătoși

Evaluarea consumului mitocondrial de oxigen la nivelul trombocitelor umane intacte izolate din stratul leucotrombocitar a fost realizată prin aplicarea treptată a unor concentrații crescânde de Ibuprofen, ajungând până la 3 mM. Ibuprofenul a determinat o scădere semnificativă și progresivă a consumului mitocondrial de oxigen, începând de la o concentrație de 1,5 mM ($p < 0,05$) și urmată de o inhibiție respiratorie severă atunci când a fost atinsă concentrația maximă ($p < 0,0001$) (Fig. 8A).

Pentru a localiza defectul determinat de Ibuprofen la nivelul lanțului respirator mitocondrial, consumul de oxigen a fost măsurat la nivelul trombocitelor permeabilizate cu digitonină și expuse la trei concentrații diferite de ibuprofen (1, 1,5 și 2 mM). Raționamentul pentru evaluarea a trei concentrații diferite de medicament (fără efect, cu efect dăunător moderat și

semnificativ, la nivelul trombocitelor intacte) s-a datorat faptului că, spre deosebire de APAP, nu existau informații în literatura de specialitate cu privire la efectele Ibuprofenului asupra respirației plachetare.

Ibuprofenul a indus scăderea dependentă de concentrație atât a fosforilării oxidative (OXPHOS) dependente de NADH (Fig. 8B), cât și a fosforilării oxidative totale (Fig. 8C), atingând semnificație statistică la concentrația de 2 mM față de control ($p < 0,05$). Respirația non-fosforilantă (LEAK) a crescut în urma expunerii la doze mici de Ibuprofen, creșterea maximă fiind observată la 1,5 mM (Fig. 8D). Capacitatea maximă a sistemului transportor de electroni a fost semnificativ redusă de fiecare dintre cele trei concentrații de ibuprofen analizate (Fig. 8E).

S-au calculat două rapoarte pentru a investiga (indirect) efectul ibuprofenului asupra producției de ATP: eficiența capacității de fosforilare (Fig. 8F) și eficiența de cuplare a sistemului transportor de electroni (Fig. 8G), ambele fiind semnificativ reduse în prezența ibuprofenului într-o manieră dependentă de concentrație.

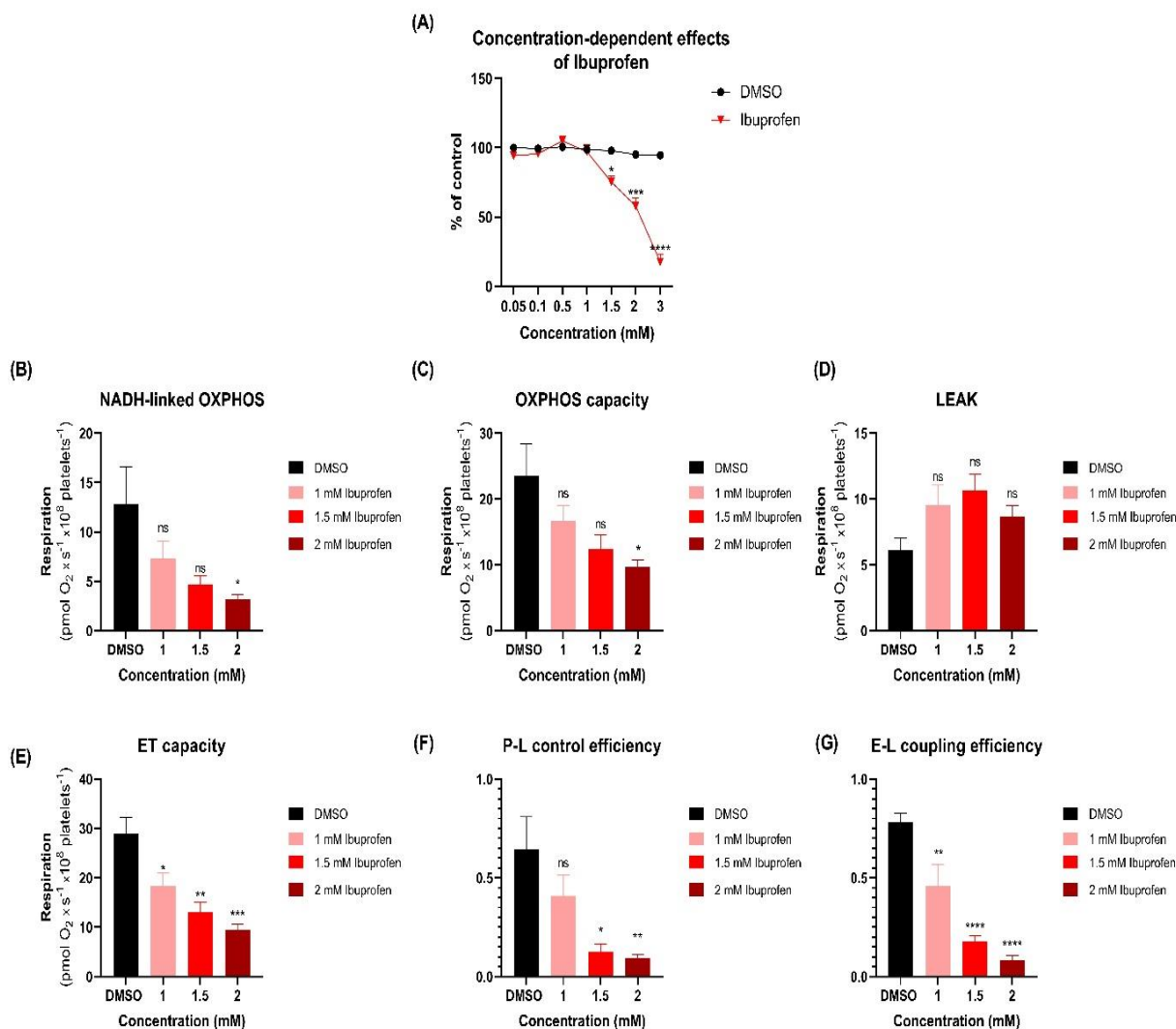


Figura 8. Efectele acute ale ibuprofenului asupra respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate din stratul leucotrombocitar.

IX. CONCLUZII

1. Amiodarona a determinat scăderea dependentă de concentrație a capacității totale de fosforilare oxidativă, la nivelul trombocitelor umane izolate, în principal prin diminuarea respirației dependente de succinat.

2. Amiodarona a redus producția de ATP la nivelul trombocitelor umane prin asocierea a două mecanisme distincte: inhibiția directă a transportului de electroni și decuplarea procesului de fosforilare oxidativă (creșterea respirației non-fosforilante).

3. Desetilamiodarona (DEA) a determinat scăderea dependentă de concentrație a respirației mitocondriale la nivel trombocitar, observație care indică faptul că amiodarona poate induce toxicitate mitocondrială atât direct, cât și indirect, prin acumularea metabolitului său.

4. Amiodarona a determinat inhibiția dependentă de timp a respirației mitocondriale și scăderea nivelului celular de ATP la nivelul celulelor mononucleare periferice izolate. Depleția de ATP a depășit-o pe cea indusă de rotenonă (inhibitor clasic al respirației mitocondriale), ceea ce indică faptul că efectele toxice ale medicamentului se extind dincolo de afectarea mitocondrială.

5. Efectul inhibitor exercitat de către amiodaronă asupra respirației mitocondriale s-a corelat într-o manieră dependentă de concentrație cu nivelurile reduse de ATP.

6. Sotalolul nu a afectat respirația mitocondrială la nivelul trombocitelor umane izolate.

7. Succinatul permeabil celular este un compus mitocondriotrop care poate reprezenta o abordare terapeutică eficientă în contracararea toxicității mitocondriale a amiodaronei, prin creșterea respirației cuplate, generatoare de ATP.

9. Trombocitele izolate din stratul leucotrombocitar provenit de la donatori sănătoși reprezintă o sursă de celule ușor accesibilă care poate fi utilizată curent în studiile de toxicitate mitocondrială indusă de către medicamente (aplicate izolat sau în combinație).

10. Atât acetaminofenul, cât și ibuprofenul au redus consumul mitocondrial de oxigen al trombocitelor izolate din stratul leucotrombocitar într-o manieră dependentă de concentrație, în principal prin inhibarea respirației dependente de NADH/complexul I al lanțului respirator; această observație justifică utilizarea compușilor de tip succinat permeabil în contracararea unei eventuale toxicități medicamentoase la nivel mitocondrial (prin susținerea respirației dependente de complexul II al lanțului respirator).

X. CONTRIBUȚII ORIGINALE

- Caracterizarea alterării dependente de doză a respirației mitocondriale induse de amiodaronă-, DEA- și sotalol la nivelul trombocitelor umane izolate.
- Caracterizarea disfuncției respiratorii mitocondriale induse de amiodaronă la nivelul PBMC și celulelor HepG2.
- Demonstrarea efectului inhibitor al amiodaronei asupra producției de ATP celular.
- Demonstrarea rolului benefic al unui compus succinat permeabil celular în atenuarea efectelor nocive ale amiodaronei asupra respirației mitocondriale atât la nivelul trombocitelor umane, cât și la nivelul celulelor HepG2.
- Caracterizarea disfuncției respiratorii mitocondriale induse de APAP și ibuprofen la nivelul trombocitelor umane izolate - în premieră națională - din buffy coat de la donatori de sânge, conform unei tehnici implementate în premieră în Laboratorul de Studii

Mitocondriale din cadrul Centrului de Cercetare Translațională și Medicină Sistemică unde am fost afiliată în timpul studiilor doctorale.

XI. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

- Caracteriza efectelor expunerii acute la amiodaronă asupra respirației mitocondriale în combinație cu alte medicamente cunoscute în literatură pentru posibilitatea de a induce disfuncția mitocondrială (statine, metformină) și care sunt frecvent prescrise în patologia cardiometabolică.
- Caracterizarea efectelor expunerii acute la amiodaronă asupra respirației mitocondriale în combinație cu cele mai frecvente analgezice de tip OTC.
- Evaluarea eficacității altor compuși de tip succinat permeabil celular care îmbunătățesc respirația mitocondrială în contextul toxicității combinate induse medicamentos și asociate diverselor patologii.

XII. PUBLICAȚII ȘTIINȚIFICE

1. **Bețiu AM**, Chamkha I, Gustafsson E, Meijer E, Avram VF, Åsander Frostner E, Ehinger JK, Petrescu L, Muntean DM, Elmér E. *Cell- Permeable Succinate Rescues Mitochondrial Respiration in Cellular Models of Amiodarone Toxicity*. **International Journal of Molecular Sciences** **2021**; 22(21):11786. **ISI Journal (FI – 6.208)**
2. **Bețiu AM**, Noveanu L, Hâncu IM, Lascu A, Petrescu L, Maack C, Elmér E, Muntean DM. *Mitochondrial Effects of Common Cardiovascular Medications: The Good, the Bad and the Mixed*. **International Journal of Molecular Sciences** **2022**; 23(21):13653. doi: 10.3390/ijms232113653. **ISI Journal (FI – 5.6)**
3. **Bețiu AM**, Lighezan R, Avram VF, Muntean DM, Elmér E, Danina M, Petrescu L. *Dose-Dependent Effects of Acetaminophen and Ibuprofen on Mitochondrial Respiration of Human Platelets*. **Mol Cell Bioch** **2023** Jul 24. doi: 10.1007/s11010-023-04814-z. **ISI Journal (FI – 4.3)**