

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul III Științe Funcționale**

ANECHITEI IONELA ANDREEA



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA ELUCIDAREA ROLULUI
ALBASTRULUI DE METILEN ÎN PROTECȚIA
CARDIOVASCULARĂ**

REZUMAT

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. DANINA M. MUNTEAN

**Timișoara
2018**

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Lista lucrărilor publicate	VII
Lista abrevierilor	VIII
Indexul figurilor	X
Indexul tabelelor	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE	XIV
PARTEA GENERALĂ	
1. Efectele pleiotrope ale albastrului de metilen: Scurt istoric al indicațiilor terapeutice	1
1.1. Rolul albastrului de metilen în protecția celulară	4
1.2. Efectele albastrului de metilen la nivel mitocondrial	6
1.3. Acțiunea hormetică a albastrului de metilen	11
1.4. Efectele albastrului de metilen în tratamentul bolilor neurodegenerative	12
1.4.1. Albastrul de metilen și boala Alzheimer	12
1.4.2. Albastrul de metilen și boala Parkinson	15
1.4.3. Albastrul de metilen și boala Huntington	16
1.4.4. Albastrul de metilen și ataxia Friedreich	17
1.5. Șocul vasoplegic	19
1.5.1. Definiție	19
1.5.2. Factorii de risc	19
1.5.3. Patogeneza șocului vasoplegic	20
1.5.4. Rolul albastrului de metilen în combaterea șocului vasoplegic	23
PARTEA SPECIALĂ	
STUDIUL 1: Evaluarea efectelor albastrului de metilen asupra bioenergeticii celulare la nivelul liniei celulare de cardiomioblasti H9C2	26
1.1. Introducere	26
1.2. Scopul	27
1.3. Material și metodă	27
1.3.1. Evaluarea efectului albastrului de metilen asupra parametrilor bioenergetici și metabolici	27
1.3.2. Reactivi	33
1.3.3. Analiza statistică	33
1.4. Rezultate	34
1.5. Discuții	36
1.6. Concluzii	38
STUDIUL 2: Evaluarea efectelor albastrului de metilen asupra respirației mitocondriale și a producției de SRO la nivelul cordului de șobolan diabetic	39
2.1. Introducere	39
2.2. Scopul	41
2.3. Material și metodă	41
2.3.1. Izolarea mitocondriilor cardiace	42
2.3.2. Studii de respirometrie de înaltă rezoluție	45
2.3.3. Evaluarea producției mitocondriale de H ₂ O ₂	52
2.3.4. Măsurarea capacității de retenție a calciului	53
2.3.5. Reactivi	56
2.3.6. Analiza statistică	56
2.4. Rezultate	56
2.4.1. Studii de respirometrie de înaltă rezoluție	56
2.4.2. Evaluarea producției mitocondriale de H ₂ O ₂	61
2.4.3. Măsurarea capacității de retenție a calciului	63
2.5. Discuții	64
2.6. Concluzii	67
STUDIUL 3: Albastrul de metilen atenuează disfuncția endotelială și reduce stresul oxidativ la nivelul aortelor de șobolan diabetic	68

3.1. Introducere	68
3.2. Scopul	69
3.3. Material și metodă	69
3.3.1. Inducerea diabetului zaharat	69
3.3.2. Studii experimentale în baia de organ	70
3.3.3. Evaluarea streului oxidativ prin metoda oxidării ferice a xilenolului (FOX)	76
3.3.4. Analiza statistică	77
3.4. Rezultate	77
3.4.1. Incubarea ex vivo cu albastrul de metilen reduce contractilitatea și ameliorază relaxarea inelelor aortice izolate de la șobolanii diabetici	77
3.4.2. Îmbunătățirea funcției vasculare după stimularea cu albastrul de metilen necesită un endoteliu intact	79
3.4.3. Albastrul de metilen a redus producția vasculară de SRO la nivelul inelenor aortice prelevate de la șobolanii diabetici	81
3.5. Discuții	83
3.6. Concluzii	85
CONCLUZII GENERALE	87
CONTRIBUȚII ORIGINALE	88
BIBLIOGRAFIE	89
ANEXE	I

I. INTRODUCERE

Disfuncția mitocondrială și stresul oxidativ asociat sunt unanim acceptate drept actual drept mecanismele fiziopatologice centrale ale majorității afecțiunilor cronice, astfel că modularea funcției mitocondriale a devenit o importantă țintă terapeutică în ultimii ani. În principal, agenții farmacologici capabili să îmbunătățească funcția mitocondrială respiratorie și/sau să reducă generarea speciilor reactive de oxigen (SRO) sunt actualmente sistematic investigați. Un astfel de agent terapeutic este albastrul de metilen (AM), un compus fenotiazinic triciclic aflat în uzul clinic de mai bine de un secol. Datorită potențialului său redox, AM prezintă proprietatea de a modula funcția bioenergetică mitocondrială cu ameliorarea disfuncției asociate și îmbunătățirea prognosticului maladiilor în care acesta a fost administrat.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Teza de doctorat și-a propus caracterizarea la nivel experimental a efectelor AM în contextul unei patologii asociate în mod clasic cu stres oxidativ la nivel cardiovascular, respectiv diabetul zaharat, în care disfuncția mitocondrială și endotelială constituie importante verigi patogenetice.

Obiectivele cercetării au constat în:

1. Caracterizarea efectelor AM asupra **profilului bioenergetic** la nivelul unei linii de celule cardiace de șobolan.
2. Evaluarea efectelor AM asupra **disfuncției mitocondriale cardiace** asociate unui model de diabet zaharat indus experimental.
3. Evaluarea efectelor AM asupra **disfuncției endoteliale** asociate unui model de diabet zaharat indus experimental.

Obiectivele au fost realizate în cadrul a **3 studii experimentale**.

- I. Primul studiu a constatat în evaluarea efectelor AM asupra respirației mitocondriale și a glicolizei la nivelul unei linii celulare de cardiomioblaști.
- II. Al doilea studiu a analizat efectele AM asupra funcției respiratorii, a producției de SRO și respectiv, a capacității de retenție calcică la nivelul mitocondriilor cardiace izolate de la șobolani diabetici (diabet zaharat tip I indus prin administrarea de streptozotocin).
- III. Al treilea studiu a constatat în caracterizarea efectelor AM asupra funcției endoteliale și a stresului oxidativ vascular la nivelul aortelor prelevate de la șobolani diabetici.

Metodologia cercetării a constatat în evaluarea *in vitro* a funcției mitocondriale prin respirometrie de înaltă rezoluție (oxigraful Oroboros-O2K) și analizorul de flux extracelular (Seahorse XF24e) și respectiv, a funcției endoteliale în baie de organ (miograful DMT).

II. PARTEA SPECIALĂ

1. EVALUAREA EFECTELOR ALBASTRULUI DE METILEN ASUPRA BIOENERGETICII CELULARE LA NIVELUL LINIEI CELULARE DE CARDIOMIOBLAȘTI H9C2

Scopul studiului a constatat în evaluarea efectelor acute ale AM asupra parametrilor bioenergetici și metabolici cu măsurarea ratei consumului de oxigen (RCO) ca indicator al respirației mitocondriale și respectiv, a ratei de acidifiere extracelulară (RAEC), ca indicator al glicolizei anaerobe la nivelul liniei de cardiomioblaști de șobolan H9c2 cu ajutorul analizorului de flux extracelular (Seahorse XF24e).

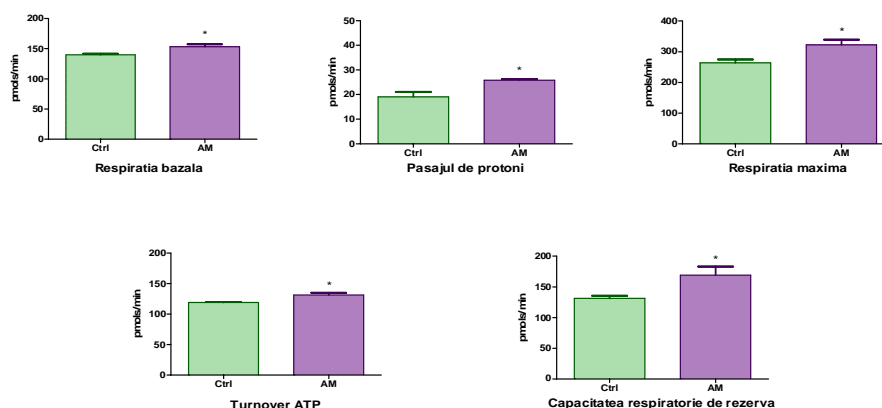


Figura 1. Efectele acute ale AM asupra parametrilor RCO.

(n = 6-8 / lot, * p < 0,05 față de celulele netratate).

După cum se observă în Fig. 1, tratarea acută a celulelor cu AM în concentrație de 0,1 μM a determinat o creștere semnificativă a respirației bazale, a pasajului de protoni, a turnoverului ATP, a respirației maxime și a capacității respiratorii de rezervă a cardiomioblaștilor H9c2 comparativ cu celulele netratate (Fig. 1).

În ceea ce privește efectul compusului asupra glicolizei anaerobe a demonstrat, la fel ca și în cazul RCO, o creștere semnificativă a RAEC față de lotul martor, în cazul celulelor tratate cu 0,1 μM AM. (Fig. 2).

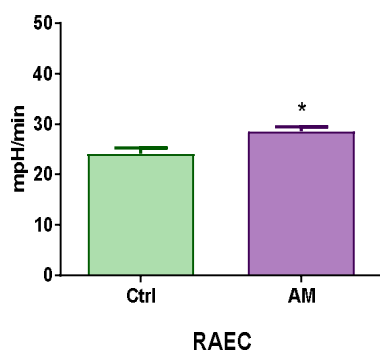


Figura 2. Efectele acute ale AM asupra RAEC.
(n = 6-8 / grup. * p < 0,05 față de celulele netratate).

Concluzie: Administrarea acută a albastrului de metilen (0,1 μM) la nivelul liniei de cardiomioblaști de șobolan H9c2, a indus o creștere a consumului de O_2 și a ratei de acidifiere extracelulară, indicând un efect stimulator global asupra bioenergeticii și respectiv, metabolismului celular.

2. EVALUAREA EFECTELOR ALBASTRULUI DE METILEN ASUPRA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE ȘI A PRODUCȚIEI DE SRO LA NIVELUL CORDULUI DE ȘOBOLAN DIABETIC

Obiectivul cercetării a fost de a evalua efectele administrării acute ale AM asupra respirației mitocondriale, producției de H_2O_2 și a retenției calcice la nivelul mitocondriilor cardiace izolate de la șobolani sănătoși și cu diabet zaharat indus experimental cu streptozotocin. În condițiile în care alterarea respirației mitocondriale și creșterea producției de SRO sunt principalele mecanisme patogenetice ce stau la baza progresiunii cardiomiopatiei diabetice spre insuficiența cardiacă, ipoteza de lucru a fost că AM ar putea îmbunătăți respirația mitocondrială simultan cu atenuarea stresului oxidativ în condițiile diabetului zaharat experimental.

Evaluarea funcției mitocondriale prin respirometrie de înaltă rezoluție. AM a determinat o îmbunătățire a funcției respiratorii independent de substrat, așa cum s-a demonstrat prin creșterea tuturor parametrilor respiratori (stadiul 2, FOS-OX, stadiul 4 și respirația maximă decuplată) atât la animalele nediabetice (Fig.3 A, B) cât și la cele diabetice (Fig.4 A, B). Într-

adevăr, stimularea respirației a fost observată atât pentru substratele complexului I cât și pentru cele ale complexului II, adică glutamat+malat (GM), respectiv succinat (+rotenonă, Suc-R).

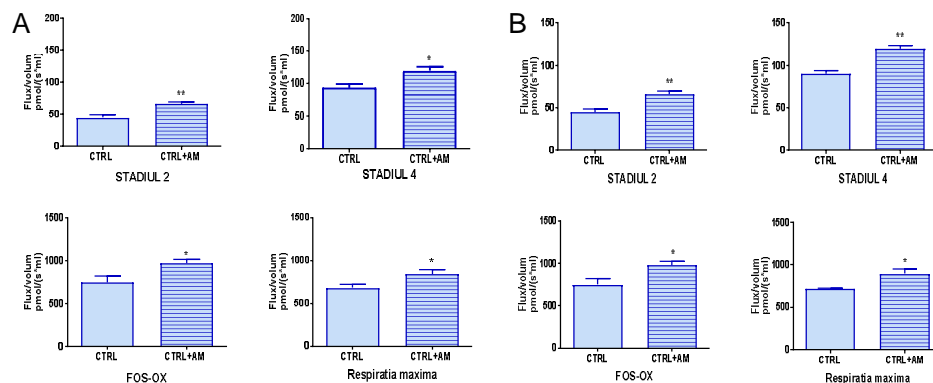


Figura 3. Datele de respirometrie de înaltă rezoluție în cazul respirației mitocondriale dependente de CI. (A) lotul CTRL; (B) Lotul DZ. Valorile constituie valori medii \pm S.E.M. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

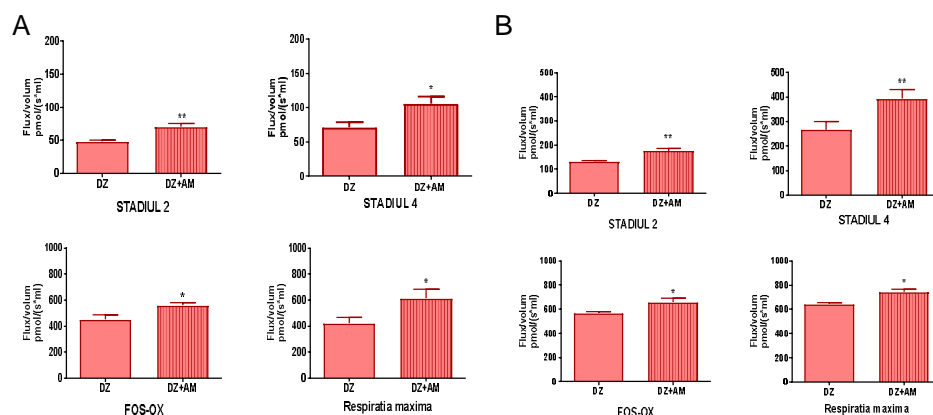


Figura 4. Datele de respirometrie de înaltă rezoluție în cazul respirației mitocondriale dependente de CII. (A) Lotul CTRL; (B) Lotul DZ. Valorile sunt prezentate ca medii \pm S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

AM a îmbunătățit atât respirația bazală (stadiul 2) cât și respirația stimulată de ADP (FOS-OX) în cazul substratelor CI și CII, servind cel mai probabil ca o sursă suplimentară de electroni pentru lanțul respirator. În conformitate cu comportamentul hormetic, este important de subliniat faptul că efectele benefice ale AM s-au obținut la doze foarte mici (0,1 μ M).

Evaluarea stresului oxidativ. Administrarea acută a AM (0,1 μ M) a determinat o creștere importantă a producției de H_2O_2 în cazul ambelor loturi (cu/fără diabet) atunci când mitocondriile au fost energizate cu substratele CI, glutamat+malat (GM) cu 210% la lotul diabetic și respectiv, cu 78% la lotul martor. Pe de altă parte, în condițiile utilizării succinatului (+rotenona, S-Rot)

ca substrat respirator al CII, s-a înregistrat o scădere semnificativă a producției de H_2O_2 cu 49% la lotul diabetic și respectiv, cu 53,8% la cel de control (Fig. 5 A, B).

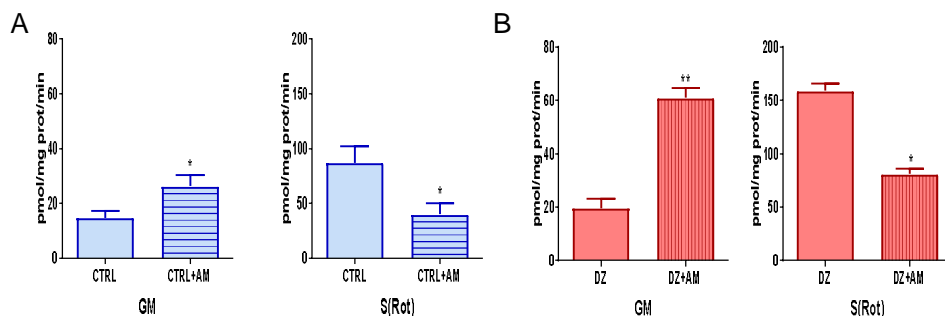


Figura 5. Evaluarea producției mitocondriale de H_2O_2 în cazul lotului CTRL (A) și DZ (B). Adățiile sunt următoarele: A stg, B stg: GM (5 mM glutamat + 5 mM malat) și A dr, B dr: S(Rot) (5 mM succinat + 0.5 μ M rotenonă). Valorile sunt prezentate ca medii \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Măsurarea capacității de retenție a calciului (CRC). O scădere semnificativă a CRC, a fost înregistrată la nivelul mitocondriilor diabetice vs. non-diabetice, indiferent de absența sau prezența ciclosporinei (CsA), inhibitorul clasic al porului de permeabilitate mitocondrială tranzitorie, indicând o sensibilitate crescută a inimilor diabetice la supraîncărcarea calcică, cu declanșarea precoce a fenomenului de permeabilitate mitocondrială tranzitorie (după cum era de așteptat). Cu toate acestea, coincubarea cu AM a mitocondriilor cardiace izolate de la ambele loturi (diabetic și nediabetic) nu a interferat cu capacitatea mitocondriilor de tamponare a calciului (Fig. 6).

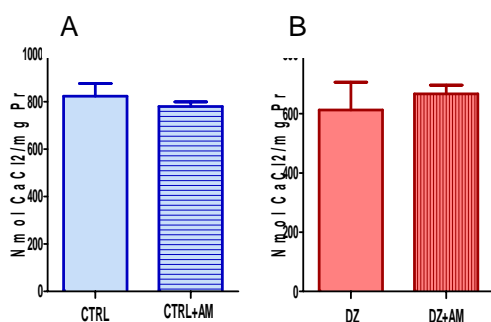


Figura 6. Evaluarea CRC la loturile martor (CTRL, A) și diabetic (DZ, B). Valorile reprezintă medii \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Concluzie: În concluzie, administrarea acută *in vitro* a albastrului de metilen în doze submicromolare a îmbunătățit respirația mitocondrială și a indus un efect dihotomic, dependent de substrat în ceea ce privește producția de SRO în cazul inimilor diabetice, observație ce necesită investigații ulterioare potrivit conceptului larg utilizat actual de "drug repurposing".

3. ALBASTRUL DE METILEN ATENUEAZĂ DISFUNCTIA ENDOTELIALĂ ȘI REDUCE STRESUL OXIDATIV LA NIVELUL AORTEI DE ȘOBOLAN DIABETIC

Scopul acestui studiu a fost de a investiga dacă AM contribuie la îmbunătățirea funcției vasculare și la ameliorarea stresului oxidativ la nivelul inelelor aortice izolate de la șobolani cu DZ indus experimental cu streptozotocin. Efectul acut al AM (0,1 μ M, incubare *ex vivo* 30 min) asupra reactivității vasculare în baie de organ (contracție indusă de fenilefrină, relaxare indusă de acetilcolină) și producția de H_2O_2 (evaluată prin testul FOX) au fost evaluate la nivelul preparatelor vasculare cu endoteliul intact și respectiv, după denudare.

Rezultatele experimentelor au evidențiat o reducere semnificativă a contractilității la fenilefrină după incubare cu AM la nivelul aortelor izolate de la șobolani diabetici comparativ cu lotul martor, în cazul inelelor vasculare cu endoteliu indemn (Fig. 7A). În continuare a fost evaluată relaxarea dependentă de endoteliu, la doze cumulative de acetilcolină, fiind obținută în prezența AM, o relaxare semnificativ crescută în cazul inelelor vasculare prelevate de la șobolani cu DZ (Fig. 7B). Dat fiind faptul că relaxarea vasculară este mediată via calea de semnalizare a oxidului nitric (NO), am ipotezat faptul că AM ar putea modula biodisponibilitatea NO. În acest scop, a fost cuantificată contractilitatea vasculară la adăugarea de L-NAME (10 μ M). Deoarece în prezența AM contractilitatea la L-NAME la nivelul aortelor diabetice a fost semnificativ redusă, putem specula o creștere a biodisponibilității NO (Fig. 7C).

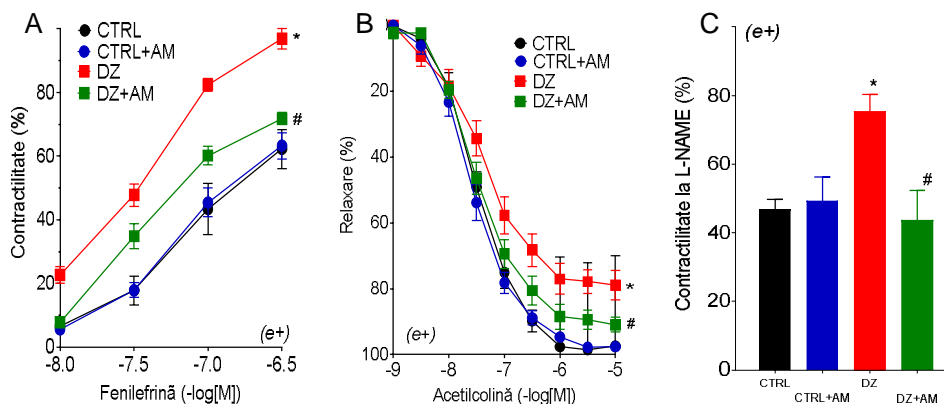


Figura 7. Evaluarea efectului AM asupra funcției vasomotorii pe aortele de șobolan cu endoteliu intact: (A) contracția indusă de fenilefrină; (B) relaxarea indusă de acetilcolină și (C) contracția la L-NAME (10 μ M) pe aorta izolată de la șobolani cu diabet zaharat (DZ) vs martor (CTL) în prezența vs. absența AM (0,1 μ M, incubare 30 min); n = 10, p < 0,05 DZ vs CTL. # p < 0,05 cu și fără AM.

În condițiile unei interacțiuni probabile între AM și calea de semnalizare dependentă de NO la nivel endotelial, am repetat experimentele utilizând inele aortice fără endoteliu (denudate cu soluție CHAPS). După cum se observă în

Fig. 8, prezența unui endoteliu intact este obligatorie pentru efectele favorabile ale AM asupra aortelor izolate de la șobolani diabetici.

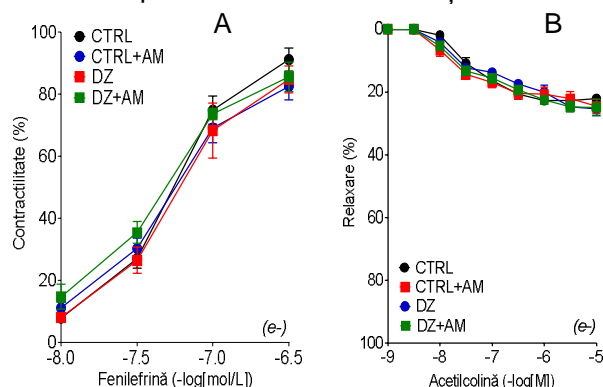


Figura 8. Evaluarea efectului AM asupra funcției vasomotorii la nivelul aortelor de șobolan cu endoteliu denudat: (A) contracția indusă de fenilefrină; (B) relaxarea indusă de acetilcolină la nivelul vaselor izolate de la șobolani diabetici (DZ) vs. martor (CTL), după denudarea endoteliului cu CHAPS, în prezența vs. absența AM (0,1 μ M, incubare 30 min), n = 10.

DZ reprezintă o condiție patologică care a fost sistematic asociată cu creșterea producției de SRO. Deoarece incubarea *ex vivo* cu AM a determinat îmbunătățirea semnificativă a funcției vasomotorii în cazul studiilor de reactivitate vasculară, am investigat în continuare dacă ameliorarea disfuncției endoteliale de către AM este asociată cu atenuarea stresului oxidativ. Producția de peroxid de hidrogen (H_2O_2) a fost măsurată cu ajutorul testului FOX. Incubarea timp de 30 de minute cu AM a redus semnificativ cantitatea de H_2O_2 în cazul inelelor diabetice, demonstrând reducerea de către AM a stresului oxidativ la nivel vascular (Fig. 9A). Important, în cazul inelelor aortice denudate efectul favorabil al AM asupra generării de H_2O_2 a fost abolit (Fig. 9B).

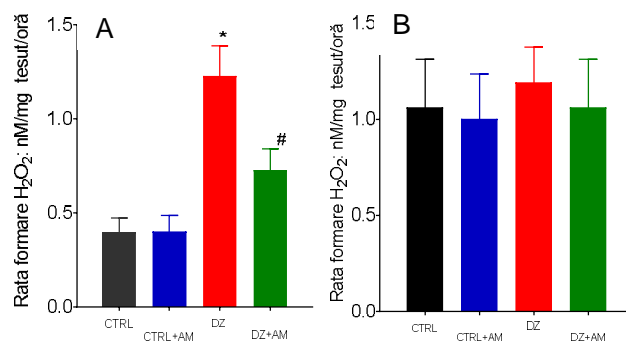


Figura 9. Evaluarea efectului AM asupra producției de SRO la nivel aortic. (A) testul FOX pentru măsurarea H_2O_2 pe inelele aortice cu endoteliu și (B) cu endoteliu denudat, izolate de la șobolani diabetici (DM) și de control (CTL) în prezența vs. absența AM (0,1 μ M), 30 min incubare, n = 10, *p < 0,05 DM față de CTL, #p < 0,05 cu și fără AM.

Concluzie: Diabetul experimental este asociat cu o creștere a producției de H_2O_2 la nivelul aortelor de șobolani via alterarea semnalizării mediate de NO cu disfuncție endotelială consecutivă. Administrarea acută *ex vivo* cu AM a fost urmată de îmbunătățirea reactivității vasculare și respectiv, atenuarea stresului oxidativ într-o manieră dependentă de endoteliu.

Evaluarea în viitor a efecte benefice potențiale ale AM în ameliorarea complicațiilor vasculare la pacienții diabetici constituie, în contextul acestor rezultate, o direcție de cercetare viabilă.

CONCLUZII GENERALE

În această teză s-a urmărit investigarea contribuției albastrului de metilen la protecția celulară la nivelul cardiomiocitelor și a endoteliului vascular și elucidarea, în parte, a mecanismelor sale de acțiune la nivel mitocondrial.

Concluziile generale ale tezei sunt după cum urmează:

1. AM exercită efect protector la nivel cardiomiocitar prin îmbunătățirea profilului bioenergetic și metabolic celular.
2. AM protejează funcția mitocondriilor cardiace prin stimularea parametrilor respirației mitocondriale și modularea producției de H_2O_2 atât în cazul șobolanilor sănătoși cât și a celor cu diabet zaharat indus experimental.
3. AM îmbunătățește funcția vasculară vasomotorie printr-un mecanism dependent de endoteliu.
4. AM ameliorează disfuncția endotelială și reduce stresul oxidativ vascular asociate diabetului zaharat experimental.

Cuvinte cheie: albastru de metilen, diabet zaharat, disfuncție mitocondrială, profil bioenergetic celular, stres oxidativ, disfuncție endotelială

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale ale prezentei teze de doctorat pot fi rezumate astfel:

1. Caracterizarea în premieră internațională a dublului efect modulator al AM asupra bioenergeticii și glicolizei anaerobe la nivel cardiomiocitar și respectiv, a stimulării funcției mitocondriale respiratorii la nivelul mitocondriilor cardiace izolate de la șobolani cu diabet zaharat experimental.
2. Descrierea în premieră internațională a efectului benefic al AM în ameliorarea disfuncției endoteliale și a stresului oxidativ asociate diabetului zaharat experimental.

LISTA ARTICOLELOR PUBLICATE

Teza de doctorat se bazează pe următoarele articole originale:

1. **Privistirescu, I.A.**, Sima, A., Duicu, O.M., Timar, R., Roșca, M.G., Sturza, A., Muntean, D.M. *Methylene blue alleviates endothelial dysfunction and reduces oxidative stress in aortas from diabetic rats.* **Can J Physiol. Pharmacol** 2018 Jun 12:1-5. doi: 10.1139/cjpp-2018-0119 (Revistă ISI, FI: 2.21)
2. Duicu, O.M., **Privistirescu, A.**, Wolf, A., Petruș, A., Dănilă, M.D., Rațiu, C.D., Muntean, D.M., Sturza, A. *Methylene blue improves mitochondrial respiration and decreases oxidative stress in a substrate-dependent manner in diabetic rat hearts.* **Can J Physiol Pharmacol** 2017; 95(11): 1376-1382. (*Equal contribution) Revistă ISI, FI: 2.21)
3. Duicu, O., Scurtu, I., Popescu, R., Sturza, A., Coricovac, D., Danila, M., **Privistirescu, A.**, Muntean, D. *Assessment of the effects of methylene blue on cellular bioenergetics in H9c2 cells.* **Rev Chim (Bucharest)** 2015; 66(4): 519-522. (Revistă ISI, FI: 0,956)