



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

### *Titolo progetto*

Strategie molecolari in mitocondri per limitare il danno cardiovascolare in un modello preclinico suino di DCD (donation after cardiac death): poro di transizione di permeabilità mitocondriale e  $F_1F_0$ -ATPasi come target biologici

### *Descrizione progetto*

Per contrastare le alterazioni cardiache (AC) indotte dai danni da ischemia calda (IC), cioè assenza di apporto ematico a temperatura corporea, nel cuore prelevato da individui dopo morte circolatoria (DCD), si propone di agire a livello molecolare sul meccanismo scatenante il poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP). L'apertura del mPTP permeabilizza il mitocondrio ad acqua e soluti e innesca la morte cellulare regolata, quindi provoca la morte dei cardiomiociti. È dimostrato che l'attività enzimatica della  $F_1F_0$ -ATPasi attivata dal catione  $Ca^{2+}$ , che può sostituire il cofattore naturale  $Mg^{2+}$  nei siti catalitici dell'enzima ad elevate concentrazioni di  $Ca^{2+}$  nella matrice mitocondriale, scatena il processo di apertura dell'mPTP. Fitocomposti o derivati triazolici/pirazolici a diversa struttura, tutte small molecules (SMs) a basso peso molecolare e che quindi possono più facilmente agire sulle proteine-bersaglio, possono essere impiegate come modulatori del mPTP sfruttando la loro capacità di legarsi alla  $F_1F_0$ -ATPasi, già dimostrata bersaglio cellulare in studi mirati a bloccare la formazione dell'mPTP. Il suino, modello animale già ampiamente utilizzato nella medicina traslazionale, soprattutto in campo cardiovascolare, per le strette analogie con l'uomo in termini anatomici, fisiologici, metabolici e genetici, fornirà i cuori DCD per lo studio mitocondriale. Il progetto intende chiarire i meccanismi biochimici-patologici prodromici alle disfunzioni mitocondriali nel cuore DCD che subisce IC e identificare entità molecolari in grado di fungere allo stesso tempo da biomarcatori e/o da agenti terapeutici nelle AC. Il progetto prevede tre distinti e complementari approcci sperimentali considerando studi *i) in-vitro* per bloccare con specifiche SMs l' $F_1F_0$ -ATPasi attivata dal  $Ca^{2+}$  e delucidarne il ruolo nell'indurre l'mPTP nelle disfunzioni mitocondriali responsabili delle AC nei cuori DCD con IC; *ii) ex-situ* per verificare l'impiego di esosomi derivati da cellule stromali mesenchimali nel settare l'utilizzo di nanovettori farmaceutici biologici per la teranostica in cuori DCD ripperfusi; *iii) ex-vivo* per valutare l'efficacia degli esosomi nel proteggere il cuore DCD ripperfuso validando l' $F_1F_0$ -ATPasi come potenziale target biologico nel meccanismo di formazione dell'mPTP.

- i)* Mediante studi farmacoforici si sfrutteranno specifiche SMs in grado di bloccare l'mPTP interagendo con l' $F_1F_0$ -ATPasi attivata dal  $Ca^{2+}$ . Analisi di cinetica enzimatica permetteranno di ottenere informazioni sul meccanismo di inibizione dell'attività letale dell'enzima legata all'induzione del mPTP. Tali dati, confrontati con i valori di "accoppiamento" della fosforilazione ossidativa, indice di valutazione della funzionalità mitocondriale, verificheranno la relazione fra: l' $F_1F_0$ -ATPasi  $Ca^{2+}$ -attivata, formazione dell'mPTP e bioenergetica mitocondriale, mettendo in luce l' $F_1F_0$ -ATPasi come un possibile target per regolare l'mPTP e i parametri mitocondriali come indici di valutazione della funzione cellulare;
- ii)* L'approccio traslazionale, che mira ad unire la ricerca biochimica di base all'ambito preclinico, prevede l'impiego di esosomi ottenuti da cellule stromali mesenchimali su cuori DCD espantati da suini. La modifica delle risposte cellulari, principalmente attribuita agli RNA Y (piccoli RNA

non codificanti) presenti negli esosomi potrà evidenziare un ruolo protettivo sul cuore durante la riperfusione preservandone la funzionalità;

iii) Dopo aver evidenziato il coinvolgimento dell' $F_1F_0$ -ATPasi  $Ca^{2+}$ -attivata nella formazione dell'mPTP, sui cuori DCD ripperfusi con gli esosomi, la valutazione dell'attività dell'mPTP tramite monitoraggio della capacità di ritenzione del calcio e del potenziale di membrana mitocondriale potrà contribuire a definire il ruolo dell'asse  $F_1F_0$ -ATPasi-mPTP nei danni da IC in cuori DCD.

L'integrazione dei dati ottenuti dai diversi approcci potrà fornire indicazioni utili per attenuare le problematiche legate ai trapianti DCD.

#### *Piano di Attività*

Per sviluppare la proposta progettuale verranno impiegati come animali modello i suini utilizzati per le sperimentazioni autorizzate a livello Ministeriale. L'animale verrà soppresso secondo protocollo umanitario con overdose di anestetici e il periodo di "no-touch" inizierà al momento dell'appiattimento dell'ECG. Dopo 20 minuti di *no-touch-period*, come da legge vigente in Italia, è possibile l'espianto di organi da donatori a cuore non battente. In questo intervallo di tempo l'organo è a temperatura corporea, ma è privato dell'apporto ematico. In questa fase, l'IC è la principale causa dei danni cellulari attribuibili ad eventi di morte cellulare regolata dovuti ad alterazioni mitocondriali. Per far chiarezza su questi eventi patologici, dal cuore DCD con IC verranno estratti i mitocondri. Sui mitocondri isolati verranno valutati i parametri bioenergetici e la funzionalità mitocondriale misurando l'accoppiamento della fosforilazione ossidativa. Verranno inoltre valutati la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), generate in condizioni di ischemia-riperfusione cellulare, e il rigonfiamento osmotico mitocondriale derivante dall'apertura dell'mPTP. Le informazioni che verranno ricavate dallo stato energetico/funzionale del mitocondrio saranno confrontate con l'attività enzimatica dell' $F_1F_0$ -ATPasi, componente chiave nell'evento di formazione dell'mPTP. Sull'enzima verranno testate specifiche small molecules (SMs) in grado di interagire con gli aminoacidi dei siti catalitici. Le analisi di cinetica di inibizione che consentiranno il calcolo dei valori delle costanti di inibizione e l'evidenziazione del tipo di inibizione forniranno indicazioni sulla propensione dell'enzima di indurre la formazione dell'mPTP in presenza delle diverse strutture di SMs oggetto di studio. Gli studi *in-vitro* avranno dunque l'obiettivo di identificare l'enzima  $F_1F_0$ -ATPasi come potenziale target molecolare scatenante nei cuori DCD la formazione dell'mPTP.

La validazione di un target molecolare in grado di eludere i danni da IC sarà avvalorata su cuori ripperfusi con e senza aggiunta di esosomi da cellule mesenchimali stromali. I cuori DCD ripperfusi con e senza esosomi verranno impiegati per estrarre i mitocondri. L'attività di apertura dell'mPTP sui differenti gruppi di mitocondri appena estratti verrà valutata andando a misurare la capacità di ritenzione del calcio (CRC), considerato come la capacità dei mitocondri di trattenere calcio nella matrice mitocondriale prima che l'mPTP si apra, e il potenziale di membrana del mitocondrio il quale viene immediatamente dissipato non appena si ha l'apertura dell'mPTP. Entrambi i metodi, eseguiti mediante l'ausilio di specifiche sonde fluorescenti, saranno successivamente confrontati con l'attività dell' $F_1F_0$ -ATPasi attivata da  $Ca^{2+}$  per verificare la correlazione funzionale, validare il ruolo di target molecolare e l'effetto protettivo verso le DM durante l'IC bloccando l'attività enzimatica.