

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

**Vytenis Keturakis**

**POLIMERINIŲ NANODALELIŲ  
SU KURKUMINU IR VITAMINU E,  
VAISTINĖS MELISOS NANOPŪSLELIŲ  
IR SARS-CoV-2 EPITOPO REIKŠMĖ  
HIPOKSIJA-REOKSIGENACIJA  
VEIKIAMŲ KARDIOMIOCITŲ  
BIOENERGETIKAI IR FUNKCIONALUMUI**

Daktaro disertacija  
Medicinos ir sveikatos mokslai,  
medicina (M 001)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Širdies centre.

### **Mokslinis vadovas**

prof. dr. Rimantas Benetis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

### **Konsultantės:**

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);  
dr. Aistė Jekabsone (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

### **Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:**

#### **Pirmininkė**

prof. dr. Olivija Dobilienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

#### **Nariai:**

prof. dr. Nijolė Savickienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003);  
prof. dr. Giedrius Davidavičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);  
prof. dr. Tomas Tamulevičius (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, fizika – N 002);  
prof. dr. Evaldas Girdauskas (Hamburgo universiteto širdies ir kraujagyslių centras, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija bus ginama viešajame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugpjūčio 24 d. 9.30 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Širdies centro Konferencijų salėje. Disertacijos gynimo vietos adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

**Vytenis Keturakis**

**THE SIGNIFICANCE OF POLYMERIC  
NANOPARTICLES LOADED WITH  
CURCUMIN AND VITAMIN E, LEMON  
BALM-DERIVED NANOVESICLES, AND  
THE SARS-CoV-2 EPITOPE FOR THE  
BIOENERGETICS AND FUNCTIONALITY  
OF CARDIOMYOCYTES SUBJECTED TO  
HYPOXIA–REOXYGENATION**

Doctoral Dissertation  
Medical and Health Sciences,  
Medicine (M 001)

Kaunas, 2026

The dissertation was prepared from 2021 to 2025 at the Heart Centre of the Faculty of Medicine, Lithuanian University of Health Sciences.

### **Scientific Supervisor**

Prof. Dr. Rimantas Benetis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

### **Consultants:**

Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Dr. Aistė Jekabsone (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

### **The dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:**

#### **Chairperson:**

Prof. Dr. Olivija Dobilienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

#### **Members:**

Prof. Dr. Nijolė Savickienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003);

Prof. Dr. Giedrius Davidavičius (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Tomas Tamulevičius (Kaunas University of Technology, Natural Sciences, Physics – N 002);

Prof. Dr. Evaldas Girdauskas (University Heart and Vascular Center Hamburg, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation will be defended at the public meeting of the Medical Research Council on August 24, 2026, at 9.30 a.m., in the Conference hall of the Heart Centre, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos.

Address: Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

# TURINYS

SUTRUMPINIMAI.....	8
ĮVADAS.....	10
Darbo naujumas.....	11
Darbo tikslas.....	11
Darbo uždaviniai.....	12
LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
Išeminės-reperfuzinės pažaidos mechanizmai ir reikšmė kardiomiocitams.....	13
Kardiomiocitų mitochondrijų funkcinės dinamikos ir hipoksijos-reoksigenacijos sąsajos.....	14
Išeminės-reperfuzinės pažaidos aktyvuoti kardiomiocitų žūties mechanizmai.....	15
SARS-CoV-2 viruso antigenų sukeliama miokardo pažaidos mechanizmai ir imunometabolinis stresas.....	16
UŽDEGIMINIŲ CITOKINŲ VAIDMUO KARDIOMIOCITŲ HIPOKSINĖS-REOKSIGENACINĖS IR VIRUSINĖS INFEKCIJOS PAŽAIDOS DYDŽIUI...	18
Naviko nekrozės faktorius- $\alpha$ : ankstyvasis uždegiminio atsako iniciatorius.....	19
Interleukinas-1 $\beta$ : uždegimo skatinimas.....	19
Interleukinas-6: sisteminis ir vietinis uždegimą skatinantis veiksnys.....	20
Monocitų chemoatrakcijos baltymas-1: monocitų pritraukimo signalas.....	20
Granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius: mieloidinių ląstelių aktyvatorius.....	20
Uždegiminis atsakas ir išeminė-reperfuzinė pažeida yra tarpusavyje susiję procesai.....	21
KARDIOPROTEKCINIŲ POVEIKIU PASIŽYMINTYS NATŪRALŪS ANTIOKSIDANTAI IR JŲ PRISTATYMO SISTEMOS.....	22
Kurkumino taikymas mitochondrijų funkcijos stabilizavimui.....	22
Kurkumino kardioprotekcinio poveikio ikiklinikinių tyrimų duomenys.....	22
Kurkumino klinikinio pritaikymo iššūkiai ir nanotransporto sistemų poreikis.....	23
Vitamino E vaidmuo mitochondrijų apsaugai išeminės-reperfuzinės pažaidos metu.....	23
Vitamino E taikymo ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose rezultatai bei jų apribojimai.....	23
Nanotransporto poreikis vartojant vitaminą E praktiškai.....	24
AUGALINĖS KILMĖS NANOPŪSLELIŲ PRITAIKYMAS ŠIRDIES LIGŲ TERAPIJAI.....	25
Kardiomiocitų išeminei-reperfuzinei pažeidai taikomi terapijos būdai.....	25
Užląstelinės nanopūslelės kaip perspektyvi terapinė platforma.....	25
Auginės kilmės nanopūslelių biologinė svarba ir pritaikymas.....	26
Augalų nanopūslelių kardioprotekciniai veikimo mechanizmai.....	26

Vaistinė melisa kaip perspektyvus kardioprotekcinį užląstelinių nanopūslelių šaltinis .....	27
Melisų nanopūslelių kardioprotekciniai mechanizmai .....	28
Iššūčiai ir perspektyvos pritaikant augalinės kilmės nanopūsleles terapijai .....	28
<b>VAISTŲ PERNEŠIMO NANOSISTEMŲ TAIKYMAS KARDIOLOGIJAI .....</b>	<b>30</b>
Pagrindiniai vaistų pernešimo nanosistemų principai .....	30
Nanodalelių klasifikacija ir biocheminės savybės .....	30
Polimerinės nanodalelės ir jų panaudojimas praktiškai .....	31
Nanodalelių klinikinio pritaikymo iššūčiai .....	31
<b>TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI .....</b>	<b>32</b>
Eksperimentinio tyrimo strategija ir pagrindimas .....	32
Polimerinių nanodalelių sintezė ir vaistinių medžiagų inkapsuliuavimas .....	33
Sintetinių nanodalelių fizikinių ir cheminių savybių vertinimas .....	34
Vaistinės melisos nanopūslelių išskyrimas ir sudėties analizė .....	36
Pirminių kardiomiocitų išskyrimas ir ląstelių kultūros grynumo patikrinimas .....	37
Eksperimentiniai <i>in vitro</i> kardiomiocitų pažaidos ir apsaugos modeliai .....	39
Nanodalelių internalizacijos analizė .....	41
Uždegiminių citokinų genų raiškos ir baltymų sekrecijos analizė .....	41
Ląstelių metabolinio aktyvumo ir kontraktinės funkcijos analizė .....	42
Mitochondrijų reaktyviųjų deguonies molekulių gamybos ir kvėpavimo parametrų vertinimas .....	44
Statistiniai metodai .....	46
<b>REZULTATAI .....</b>	<b>47</b>
Sintetinių polimerinių nanodalelių fizikinių ir cheminių savybių vertinimas .....	47
Vaistinės melisos nanopūslelių morfologinė ir biofizikinė charakteristika .....	50
Melisų nanopūslelių cheminės sudėties analizė .....	52
Kardiomiocitų kultūros charakterizavimas ir nanodalelių internalizacija .....	52
Kardiomiocitų hipoksinės-reoksigeneracinės pažaidos <i>in vitro</i> modelio įvertinimas .....	54
SARS-CoV-2 fragmento įtaka kardiomiocitų gyvybingumui, funkcinei ir imunometabolinei būklei .....	56
SARS-CoV-2 fragmento poveikis prieš uždegiminių citokinų sekrecijai kardiomiocituose .....	56
SARS-CoV-2 RBD fragmento efektas kardiomiocitų gyvybingumui ir kontraktiškumui .....	59
Ūminis SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikis kardiomiocitų bioenergijai .....	61
Nanodalelėse inkapsuliuoto kurkumino poveikis hipoksijos-reoksigeneracijos sukeliama kardiomiocitų metaboliniam aktyvumui ir funkcijai .....	62
Reaktyviųjų deguonies formų generacija mitochondrijose po hipoksijos-reoksigeneracijos pažaidos veikiant inkapsuliuotą kurkuminą .....	65
Mitochondrijų kvėpavimo funkcijos dinamika taikant inkapsuliuotą kurkuminą po hipoksijos-reoksigeneracijos pažaidos .....	67
Kardiomiocitų gyvybingumo ir kontraktiškumo pokyčiai po hipoksijos-reoksigeneracijos sąlygų taikant inkapsuliuotą vitaminą E .....	71
Reaktyviųjų deguonies formų susidarymo ištyrimas mitochondrijose po hipoksinės-reoksigeneracinės pažaidos paveikus inkapsuliuotą vitaminu E .....	74

Mitochondrijų kvėpavimo funkcijos pokyčiai po hipoksinės-reoksigenacinės pažeidimo skiriant inkapsuliuotą vitaminą E .....	75
Melisų nanopūslelių poveikis hipoksija-reoksigenacija paveiktų kardiomiocitų gyvybingumui ir kontrakcijai .....	79
Melisų nanopūslelių įtaka hipoksijos–reoksigenacijos paveiktų kardiomiocitų mitochondrijų kvėpavimo pokyčiams.....	82
Melisų nanopūslelių įtaka hipoksijos–reoksigenacijos paveiktų kardiomiocitų glikolizės intensyvumui .....	83
<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>85</b>
SARS-CoV-2 RBD fragmentas tiesiogiai pažeidžia kardiomiocitų bioenerziją ir sustiprina hipoksinę-reoksigenacinę pažeidimą.....	85
PLGA nanodalelių pranašumas prieš laisvas antioksidantų formas: tolygus vaistų atpalaidavimas .....	88
Inkapsuliuoti antioksidantai pasižymi geresniu kardioprotekcinio poveikiu kardiomiocitams po hipoksijos-reoksigenacijos pažeidimo.....	89
Vaistinės melisos nanopūslelių sukeltas metabolinis perprogramavimas – apsauginis mitochondrijų slopinimas ir glikolizės aktyvinimas .....	91
Tyrimo klinikinio ir praktinio pritaikymo perspektyvos .....	92
Tyrimo ribotumai ir ateities perspektyvos.....	93
<b>IŠVADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....</b>	<b>97</b>
<b>REZULTATŲ APIBENDRINIMAS .....</b>	<b>98</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>99</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>131</b>
<b>PUBLIKACIJOS.....</b>	<b>146</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>150</b>
<b>PRIEDAS .....</b>	<b>153</b>
<b>PADĖKA.....</b>	<b>156</b>

## SUTRUMPINIMAI

<b>AA</b>	–	antimicinas A
<b>AKF2</b>	–	angiotenziną konvertuojantis fermentas 2 (angl. ACE-2)
<b>ANOVA</b>	–	dispersinė analizė (angl. <i>Analysis of Variance</i> )
<b>ATP</b>	–	adenozintrifosfatas
<b>Bax</b>	–	proapoptotinis baltymas (angl. <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
<b>Bcl-2</b>	–	B-ląstelių limfomos 2 baltymas (antiapoptotinis)
<b>CCL2</b>	–	C-C motyvo chemokino ligandas 2 (taip pat žinomas kaip MCP-1)
<b>Cur</b>	–	kurkuminas
<b>Cxcl1</b>	–	C-X-C motyvo chemokino ligandas 1
<b>DAMP</b>	–	su pažeidimu susiję molekuliniai žymenys (angl. <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	–	dvigubai distiliuotas vanduo
<b>DNR</b>	–	deoksiribonukleorūgštis
<b>DŠS</b>	–	dinaminė šviesos sklaida (angl. <i>Dynamic Light Scattering, DLS</i> )
<b>DMSO</b>	–	dimetilsulfoksidas
<b>EDTA</b>	–	etilendiamintetraacto rūgštis
<b>EMA</b>	–	Europos vaistų agentūra
<b>ETC</b>	–	elektronų pernašos grandinė (angl. <i>Electron Transport Chain</i> )
<b>FCCP</b>	–	karbonilcianido 4-fenilhidrazonas
<b>FDA</b>	–	JAV Maisto ir vaistų administracija
<b>GM-CSF</b>	–	granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius
<b>H/R</b>	–	hipoksinė-reoksigenacinė pažeida ( <i>in vitro</i> )
<b>HO-1</b>	–	hemo oksigenazė-1
<b>IE</b>	–	inkapsuliuavimo efektyvumas
<b>I/R</b>	–	išeminė-reperfuzinė pažeida ( <i>in vivo</i> )
<b>IL</b>	–	interleukinas (pvz., IL-1 $\beta$ , IL-6)
<b>LC/MS-MS</b>	–	skysčių chromatografija ir masių spektrometrija
<b>MI</b>	–	miokardo infarktas
<b>miRNR</b>	–	mikroRNR
<b>MO</b>	–	vaistinė melisa (lot. <i>Melissa officinalis</i> )
<b>mPTP</b>	–	mitochondrijų pralaidumo poros (angl. <i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i> )
<b>mRNR</b>	–	informacinė (matricinė) RNR
<b>ND</b>	–	nanodalelės
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	–	branduolinis faktorius kapa B
<b>Nrf2</b>	–	su branduoliniu eritroidiniu faktoriumi 2 susijęs faktorius 2
<b>NTA</b>	–	nanodalelių sekimo analizė (angl. <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> )
<b>OCR</b>	–	deguonies suvartojimo greitis (angl. <i>Oxygen Consumption Rate</i> )
<b>NP</b>	–	nanopūslelės (angl. <i>Nanovesicles</i> )
<b>PBS</b>	–	fosfatinis buferinis tirpalas
<b>PDI</b>	–	polidispersiškumo indeksas
<b>PDNV</b>	–	augalinės kilmės nanopūslelės (angl. <i>Plant-Derived Nanovesicles</i> )
<b>PKC</b>	–	baltymų kinazė C
<b>PLGA</b>	–	poli-laktido-ko-glikolinė rūgštis
<b>PTVAA</b>	–	perkutaninė transliuminalinė vainikinių arterijų angioplastika
<b>RBD</b>	–	receptorių jungiantis domenas (angl. <i>Receptor Binding Domain</i> )

<b>RhB</b>	–	rodaminas B
<b>RNR</b>	–	ribonukleorūgštis
<b>ROS</b>	–	reaktyviosios deguonies molekulės (angl. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SD</b>	–	standartinis nuokrypis (angl. <i>standard deviation</i> )
<b>SEM</b>	–	skenuojanti elektroninė mikroskopija
<b>ŠKL</b>	–	širdies ir kraujagyslių ligos
<b>TMP</b>	–	tokoferolio sukelta peroksidacija (angl. <i>tocopherol-mediated peroxidation</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	–	naviko nekrozės faktorius alfa
<b>ŪMI</b>	–	ūminis miokardo infarktas
<b>URG</b>	–	užląstelinio rūgštėjimo greitis (angl. <i>extracellular acidification rate, ecar</i> )
<b>vit. E / <math>\alpha</math>TCP</b>	–	vitaminas E / $\alpha$ -tokoferolis

## ĮVADAS

Širdies ir kraujagyslių ligos (ŠKL) vis dar išlieka pagrindine sergamumo ir mirtingumo priežastimi visame pasaulyje, o ūminis miokardo infarktas (ŪMI) yra viena dažniausių šių ligų klinikinė išraiška [1]. Nors šiuolaikinė medicina padarė didelę pažangą atkuriant kraujotaką išemijos pažeistose širdies srityse (reperfuzija), vis dėlto šis procesas sukelia paradoksalių reiškinių – išeminę-reperfuzinę (I/R) pažeidimą [2]. Staigus deguonies sugražinimas į hipoksijos paveiktus audinius sukelia intensyvių reaktyviųjų deguonies formų (ROS) susidarymą, kalcio jonų ( $Ca^{2+}$ ) perkrovą ląstelėse, mitochondrijų disfunkciją bei uždegiminį atsaką, kurie lemia kardiomiocitų žūtį ir negrįžtamą širdies audinio pažeidimą [3].

Kardiomiocitų pažeidžiamumą gali padidinti ir papildomi egzogeniniai veiksniai, pavyzdžiui, sisteminio uždegimo metu išsiskiriantys mediatoriai ar virusinių infekcijų struktūriniai elementai. Nustatyta, kad SARS-CoV-2 spyglio baltymo receptorių rišantis domenai (RBD) tiesiogiai sąveikauja su kardiomiocitais per AKF2 receptorius ir sukelia imunometabolinį stresą, sustiprinantį bazinę I/R pažeidimą. Šis sinerginis poveikis didina mitochondrijų bioenergijos slopinimą bei prouždegiminių citokinų gamybą ir taip dar labiau apriboja ląstelių adaptacinius rezervus [4].

Vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių kardiomiocitų žūtį reoksigenacijos metu, yra mitochondrijų pralaidumo porų (mPTP) atsivėrimas ir oksidacinio streso sukeltas pažeidimas [5]. Todėl antioksidacinėmis bei priešuždegiminėmis savybėmis pasižymintys junginiai – kurkuminas [6] ir vitaminas E [7] – tiriami kaip potencialios kardioprotekcinės priemonės. Kurkuminas gali aktyvuoti Nrf2 signalinį kelią ir neutralizuoti laisvuosius radikalus [8], o vitaminas E yra svarbus membranų stabilizatorius, saugantis nuo lipidų peroksidacijos [9]. Vis dėlto klinikinis šių medžiagų pritaikymas yra ribotas dėl prasto tirpumo vandeningoje terpėje, mažo biologinio prieinamumo ir nespecifinio pasiskirstymo organizme [7, 10].

Siekiant įveikti šiuos farmakokinetinius apribojimus ir užtikrinti tikslių vaistų pristatymą, taikomi nanomedicinos sprendimai [11]. Polimerinės nanodalelės, pagamintos iš poli-laktido-ko-glikolinės rūgšties (PLGA), leidžia inkapsuluoti hidrofobinius junginius, apsaugoti juos nuo degradacijos ir užtikrinti kontroliuojamą atsipalaidavimą [12]. Didelį potencialą turi augalinės kilmės nanopūslelės (angl. *Plant-Derived Nanovesicles*, PDNV) [13]. Lyginant su tradiciniais ekstraktais, nanopūslelės pasižymi geresne skvarba į audinius, efektyviu patekimu į ląsteles bei minimaliu imunogenišku. Vaistinės melisos (*Melissa officinalis*) nanopūslelių (MO NP) poveikis grindžiamas jų biochemine sudėtimi: jose susitelkę polifenoliai

(pvz., rozmarino rūgštis) ir mažosios RNR leidžia moduluoti ląstelių procesus tarprūšiniu lygmeniu [14, 15].

Šiame darbe nagrinėtas kardiomiocitų pažeidimo ypatumų moduliavimas naudojant SARS-CoV-2 RBD fragmentą ir vertintas skirtingų nanotransporto sistemų efektyvumas siekiant apsaugoti ląsteles nuo H/R pažeidimo. Tyrimų metu lygintas kurkuminu arba vitaminu E pakrautų sintetinių PLGA nanodalelių ir natūralių MO NP citoprotekcinis poveikis kardiomiocitų gyvybingumui bei mitochondrijų funkcijai *in vitro* modelyje.

## Darbo naujumas

Šiame disertaciniame darbe kardiomiocitų apsaugos nuo hipoksinės-reoksigenacinės pažeidimo problema sprendžiama apjungiant modernias nanomedicina paremtas strategijas ir aktualius išorinius ląstelinio streso veiksnius. Darbo naujumą ir mokslinę vertę pagrindžia tai, kad darbe atskleidžiama, kaip viruso struktūriniai elementai sukelia papildomą imunometabolinį stresą ir paaštrina bazinę hipoksinę-reoksigenacinę pažeidimą.

Taip pat tyrimo metu inovatyviai sugretinamos dvi skirtingos kardioprotekcijos strategijos – tikslinio pristatymo sintetinės polimerinės nanodalelės ir natūralios augalinės kilmės nanopūslelės, tiesiogiai lyginant jų citoprotekcinį efektyvumą *in vitro* modelyje.

Parodytas efektyvus sintetinių nanodalelių pritaikymas hidrofobinių antioksidantų (kurkumino ir vitamino E) pernašai, išnaudojant nuo pH priklausomą atpalaidavimo mechanizmą, kuris leidžia vaistinėms medžiagoms veikti būtent rūgštinėje išemijos zonoje.

Atskleistas unikalus vaistinės melisos nanopūslelių veikimo mechanizmas kardiomiocituose. Nustatyta, kad šios nanopūslelės geba sužadinti metabolinį perprogramavimą – laikiną ląstelių perėjimą nuo oksidacinio fosforilavimo prie glikolizės, kas reikšmingai sumažina oksidacinę pažeidimą kritiniu reoksigenacijos momentu. Šis atradimas atveria naujas perspektyvas organų apsaugai transplantologijos bei kardioplegijos srityse.

## Darbo tikslas

Nustatyti kardiomiocitų funkcinės būklės pokyčius modeliuojamos hipoksijos-reoksigenacijos bei SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikio sąlygomis ir įvertinti polimerinių nanodalelių su kurkuminu ir vitaminu E bei vaistinės melisos nanopūslelių sukeltą kardioprotekcinį efektyvumą esant hipoksijos-reoksigenacijos pažeidimams.

## Darbo uždaviniai

1. Ištirti hipoksijos-reoksigenacijos sukiamus funkcinės būklės bei imunometabolinių parametrų pokyčius kultivuojamuose kardiomiocituose ir įvertinti egzogeninio stresoriaus SARS-CoV-2 RBD dalies įtaką šių pokyčių dydžiui.
2. Įvertinti nanodalelių su kurkuminu ir vitaminu E bei vaistinės melisos nanopūslelių įtaką hipoksijos-reoksigenacijos sąlygojamam kultivuojamų kardiomiocitų gyvybingumo ir kontraktiškumo slopinimui.
3. Nustatyti nanodalelių su kurkuminu ir vitaminu E bei vaistinės melisos nanopūslelių įtaką hipoksijos-reoksigenacijos sukiamos kultivuojamų kardiomiocitų mitochondrijų funkcijų pažaidos dydžiui.

Darbe buvo nagrinėtas dviejų skirtingų strategijų pritaikymas kardiomiocitų apsaugai nuo išeminės-reperfuzinės pažaidos.

Sintetinių PLGA nanodalelių panaudojimas leido efektyviai stabilizuoti ir transportuoti hidrofobinius antioksidantus (kurkuminą ir vitaminą E) ir užtikrinti jų nuo pH priklausomą atpalaidavimą rūgštinėje išemijos zonoje. Tai sumažino sisteminio toksiškumo riziką ir padidino terapinį efektyvumą.

Darbe nustatyta, kad vaistinės melisos nanopūslelės gali pakeisti kardiomiocitų energijos balansą sužadindamos metabolinį perprogramavimą – laikiną perėjimą nuo oksidacinio fosforilavimo prie glikolizės. Šis poveikis vertintinas kaip perspektyvus kardioprotekcijos principas, leidžiantis sumažinti oksidacinę pažaidą kritiniu reoksigenacijos momentu. Gauti rezultatai pagrindžia tolesnių tyrimų tikslingumą ir šių nanopūslelių taikymą miokardo apsaugai transplantologijos ar kardioplegijos srityse.

# LITERATŪROS APŽVALGA

## Išeminės-reperfuzinės pažaidos mechanizmai ir reikšmė kardiomiocitams

Žmogaus fiziologinėse funkcijose deguonis atlieka svarbų vaidmenį. Oksigenacijos metu deguonis pasyviai difunduoja iš alveolių į plaučių kapiliarą, ten prisijungia prie eritrocituose esančio hemoglobino arba ištirpsta kraujo plazmoje. Prie hemoglobino prijungtas ar plazmoje ištirpęs deguonis arterinio kraujo keliais pasiekia audinius ir jų ląsteles, kur pagrindinė ląstelėms gyvybiškai svarbi varomoji jėga yra aerobinis metabolizmas. Audinių ląstelėms trūkstant deguonies, išsivysto hipoksija, o sumažėjus jo koncentracijai kraujyje – hipoksemija [1]. Trūkstant deguonies, ląstelės ir jų formuojami audiniai – atitinkamai ir organai – negali tinkamai atlikti savo funkcijų. Pavyzdžiui, anaerobinis metabolizmas širdies raumenyje vaidina svarbų vaidmenį išsaugodamas miokardą tik išemijos ar hipoksijos metu [16]; kitu atveju pagrindinė kardiomiocito varomoji jėga, reikalinga ATP produkcijai, yra pagrįsta aerobinėmis sąlygomis.

Hipoksijos atsiradimą ląstelėse gali sąlygoti hipoksemija, sutrikusi audinių oksigenacija ar sutrikęs deguonies pasisavinimas [17]. Vis dėlto deguonies sugražinimas į ląstelę deguonies prisotintu krauju gali sukelti paradoksalią išeitį – reoksigencija audiniams gali sąlygoti didesnę pažaidą nei prieš tai įvykusi išemija. Tokiu būdu atsiradę ląstelių sužalojimai vadinami išemine-reperfuzine (I/R) pažaida [2]. Reperfuzijos pažaidai būdinga miokardo, kraujagyslių endotelio ar elektrofiziologinė disfunkcija, sukelta mikrokraujagyslinės obstrukcijos, miokardo edemos, miokardo hiperkontraktacijos, deguonies laisvųjų radikalų poveikio, ląstelių apoptozės ir kitų mechanizmų [18].

Vykstant ilgalaikiai išemijai, vyrauja anaerobinis metabolizmas. Dėl to pradeda kauptis pieno rūgštis ir vystosi acidozė, mažėja viduląstelinis ATP kiekis (inaktyvuojama  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazė). Dėl sumažėjusio  $\text{Ca}^{2+}$  jonų ištekėjimo iš ląstelės bei prastesnės šių jonų reabsorbcijos endoplazminiame tinkle ląstelės viduje vystosi  $\text{Ca}^{2+}$  jonų perteklius. Šiuos pokyčius lydi mitochondrijų pralaidumo perėjimo (MPT) porų atidarymas ir galutinis I/R efektorius, sukeliantis mitochondrijų membranos potencialo išsisklaidymą ir dar labiau pabloginantis ATP gamybą [19].

Ūmaus miokardo infarkto metu ląstelių hipoksija ir reoksigencija yra du pagrindiniai žalojantys veiksniai, lemiantys miokardo išeminę pažaidą. Dabartinis ūminio miokardo infarkto gydymo standartas yra savalaikis kraujotakos atkūrimas išeminėje širdies srityje [20]. Nors ankstyva reperfuzija – taikant perkutaninę koronarinę intervenciją – neabejotinai pagerina pacientų

būklę, tačiau miokardo pažeidimą didinančių ilgalaikių komplikacijų kol kas neišvengiama [21]. Būtent MPT – nespecifinių vidinės mitochondrijų membranos kanalų – atsivėrimas per pirmas poišeminės reperfuzijos minutes ir yra esminis apoptozinės bei nekrozinės ląstelių žūties veiksnys, galintis reikšmingai nulemti I/R pažeidimo dydį [3].

### **Kardiomiocitų mitochondrijų funkcinės dinamikos ir hipoksijos-reoksigenacijos sąsajos**

Širdies veikla labiausiai priklauso nuo mitochondrijų metabolizmo [22]. Jis padeda kardiomiocitą aprūpinti energija, reikalinga atlikti kontraktilinei miocito funkcijai [23]. Mitochondrijos yra labai dinamiškos, ATP produkuojančios organelės, sudarančios susijungusį tinklą, kuris kinta vykstant mitochondrijų susiliejiimo bei dalijimosi procesams ir palaiko normalią mitochondrijų funkciją [24]. Šie ciklai turi įtakos ląstelių proliferacijai, apoptozei, mitochondrijų DNR vientisumui ir mitochondrijų kalcio kiekio reguliavimui [25]. Pastebėta, jog miokardo išemija sukelia mitochondrijų funkcijų sutrikimus dėl susiliejiimo ir skilimo procesų disbalanso [24]. Reaguodamos į išemiją, mitochondrijos HL-1 ląstelėse susiskaido. Šis procesas priklauso nuo mitochondrijų susiliejiimo baltymo, t. y. su dinaminu susijusio baltymo Drp1 [26]. Išeminė-reperfuzinė pažeidimo aktyvuoja Drp1 baltymus, sukeldami mitochondrijų morfologinius pokyčius, padidėjusią reaktyviųjų deguonies molekulių (ROS) gamybą ir  $Ca^{2+}$  jonų perteklių [25].

ROS gaminimas yra normalaus ląstelinio metabolizmo rezultatas; dėl antioksidantų poveikio yra išlaikoma pusiausvyra [27]. Vis dėlto ROS gali vykti ir I/R metu [28]. Vykstant išemijai, dėl endogeninių ROS antioksidantų sumažėjimo miokardo ląstelėse iš likutinio deguonies yra gaminamos ROS. Dėl staigaus deguonies kiekio padidėjimo reoksigenacijos metu taip pat padidėja ROS gamyba, aktyvinama lipidų peroksidacija, baltymų karbonilinimas, DNR oksidacija ir kiti ląstelės struktūras žalojantys oksidaciniai mechanizmai [29]. Galimi ROS šaltiniai širdyje po išemijos pažeidimo siejami su ksantino oksidaze, NADPH oksidaze, mitochondrijomis ir NO sintaze; tai ir yra pagrindiniai oksidacinio streso veiksniai reperfuzijos metu [30–34].

Mitochondrijos laikomos pagrindiniu intrakardinio ROS šaltiniu [35], nes nemitochondrinė ROS šaltinių veikla suaktyvėja tik po pirminio mitochondrijų ROS pliūpsnio. Tai siejama su teorija, jog nemitochondriniai ROS prisideda prie antrinio audinių pažeidimo ir vėlesnio uždegimo [36]. Išemijos sukeltos hipoksijos paveiktų ląstelių mitochondrijose žymiai padidėja sukcinato kiekis, nes sukcinatas nėra toliau verčiamas į sukcinil-kofermentą A. Po reperfuzijos sukcinato dehidrogenazė greitai oksiduoja sukcinatą ir taip jį paverčia potencialia elektronų saugykla, kuri, toliau vykstant reperfuzijai,

gali būti panaudota ROS gamybai [37]. Viršijus antioksidacines gynybines galimybes, ji lemia ląstelinę pažaidą [38].

Vykstant ūminei miokardo išemijai, aerobinis metabolizmas dėl mitochondrijų pažeidimo pakeičiamas anaerobiniu metabolizmu, vykstančiu ląstelės citozolyje [39]. Vyraujant anaerobiniam metabolizmui, ląstelėje kaupiasi laktatas ir vandenilio jonai; dėl to ląstelės pH sumažėja. Įprastam ląstelės pH atkurti  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  jonų keitiklis iš ląstelės pašalina  $\text{H}^+$  jonų perteklių, o į ląstelę plūsta didelis  $\text{Na}^+$  jonų kiekis. Dėl intraląstelinio ATP trūkumo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-azės aktyvumas sumažėja ir  $\text{Na}^+$  jonų ištekėjimas susilpnėja. Didėjant  $\text{Na}^+$  jonų koncentracijai kardiomiocite,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  keitiklis, galintis veikti tiesioginiu ir atvirkštiniu mechanizmais, pradeda veikti atvirkštiniu būdu. Dėl to viduląstelinio kalcio jonų kiekis smarkiai padidėja [40].  $\text{Ca}^{2+}$  jonų kiekis gali likti padidėjęs vykstant ir reperfuzijai, o kartu su pakitusiu viduląstelinio kalcio apdorojimu gali padidėti aritmijų, miokardo kontraktinės disfunkcijos ir hiperkontraktijos atsiradimo tikimybė [41].

Vis dėlto vienas svarbiausių miokardo ląstelių pažaidos mechanizmų išemijos fone, siejamas su  $\text{Ca}^{2+}$  jonų homeostazės sutrikimu, yra mitochondrijų pralaidumo porų (mPTP) atvėrimas. Oksidacinis stresas, antagonizuoja adenino nukleotidų prisijungimą prie ANT ir padidina mPTP jautrumą  $\text{Ca}^{2+}$  jonams [5]. Po kraujotakos atkūrimo mitochondrijos vėl gali sintezuoti ATP ir leidžia  $\text{Ca}^{2+}$  jonams kauptis mitochondrijose, o tai lemia kalcio perteklių. Be to, greitai gaminamos ROS, nes kvėpavimo grandinė vėl yra veikiamą deguonies. Dėl ilgai trunkančio mPTP kanalų atidarymo išnyksta mitochondrijų membranos potencialas ir prasideda apoptozė arba nekrozė [5].

### **Išeminės-reperfuzinės pažaidos aktyvuoti kardiomiocitų žūties mechanizmai**

Kardiomiocitų žūtis yra esminis ŠKL patogenezės veiksnys, nes mažėjantis funkcinis ląstelių kiekis nulemia negrįžtamą miokardo remodeliavimąsi bei širdies nepakankamumą [42]. Svarbu pažymėti, kad dauguma ląstelių mirties mechanizmų prasideda būtent nuo mitochondrijų pažaidos. H/R sąlygomis mitochondrijos iš energijos gamintojų tampa pagrindiniais ląstelės pažaidos generatoriais, o jų bioenergijos kolapsas tampa kritiniu likimą nulemiančiu veiksniu [43].

Vienas pagrindinių žūties tipų yra apoptozė, kuri veikia išoriniu keliu ir vidiniu keliu [44]. Būtent vidinis apoptozės kelias yra tiesiogiai inicijuojamas mitochondrijų lygmeniu: dėl oksidacinio streso padidėjęs mitochondrijų vidinės membranos pralaidumas sąlygoja proapoptozinių baltymų, pvz., citochromo c, patekimą į citozolį. Čia suformuota apoptosoma aktyvuoja kaspazių kaskadą, vedančią į galutinę ląstelės degradaciją [45, 46]. Nors išorinis

kelias prasideda mirties receptorių aktyvavimu, tačiau jis dažnai persipina su mitochondriniais procesais, lemiančiais balansą tarp ląstelės išgyvenimo ir žūties [44, 47–57].

Mitochondrijų vaidmuo yra svarbiausias reguliuojamos nekrozės – nekroptozės – procese. Šis mechanizmas, valdomas RIPK1, RIPK3 ir MLKL baltymų, sukelia membranų vientisumo praradimą ir uždegimą skatinančių DAMP molekulių išsiskyrimą [58–66]. Kritinis nekroptozės momentas siejamas su mitochondrijų pralaidumo porų (mPTP) atidarymu [67–73]. mPTP atsivėrimas reoksigenacijos metu yra laikomas galutiniu mitochondrijų disfunkcijos tašku; po to negrįžtamai išsekvojamas ATP, o ląstelė burksta ir žūsta [61–64, 74, 75]. Nors autofagija įprastai padeda išlaikyti homeostazę skaidydama pažeistus baltymus, tačiau I/R sukelta gili mitochondrijų pažeidimai gali šį procesą paversti destruktiviu (autoze) ir dar labiau paspartinti kardiomiocitų nykimą [76–83].

### **SARS-CoV-2 viruso antigenų sukeltos miokardo pažeidimo mechanizmai ir imunometabolinis stresas**

SARS-CoV-2 virusas pasižymi stipriu poveikiu kardiovaskulinei sistemai, o miokardo pažeidimas yra viena pagrindinių sunkios ligos eigos bei mirtinumo priežasčių [84, 85]. Nustatyta, kad pacientams, sergantiems gretutinėmis ŠKL, virusinė infekcija tampa kritiniu dekompensojančiu veiksniu, pasireiškiančiu aritmijomis, miokarditu ir ūminiu širdies nepakankamumu [85, 86].

Pagrindinis viruso patekimo į ląstelę kelias susijęs su angiotenziną konvertuojančiu fermentu 2 (AKF2). Nors AKF2 daugiausia plaučių alveolių sienelėse, tačiau jo kiekis kardiomiocituose yra pakankamas, kad širdies raumens ląstelės taptų tiesioginiu infekcijos taikiniu [87, 88]. Infekcijos procesas prasideda, kai transmembraninė proteazė – serinas 2 (TMPRSS2) – suskaldo viruso spyglio baltymą ir atidengia receptorių rišantį domeną (RBD). Šis domenas jungiasi prie AKF2 ir inicijuoja viruso fragmentų patekimą į kardiomiocito vidų, kur virusinė RNR ir baltymai lokalizuojasi mitochondrijose [87, 89].

Molekuliniu lygmeniu pažeidimas vystosi per kompleksinę endotelio disfunkciją ir vazokonstrikciją, sukeliančią antrinę audinių išemiją [87]. Esant deguonies trūkumui, ląstelėse aktyvuojamas anaerobinis metabolizmas. Dėl to mažėja ATP sintezė, vystosi acidozė ir sutrinka jonų siurblių veikla, lemianti ląstelių brinkimą. Reoksigenacijos fazėje generuojamas ROS perteklius inicijuoja „citokinų audrą“, kurioje dalyvauja IL-6, TNF- $\alpha$  ir GM-CSF [87, 90].

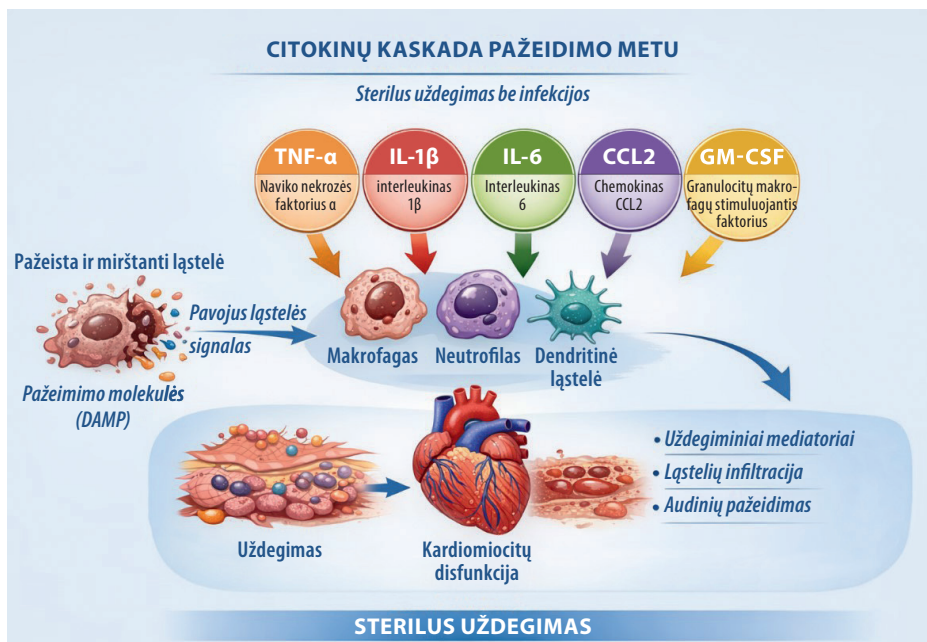
Nustatyta, kad ir nesant pilnos viruso replikacijos, vien tik RBD sąveika su kardiomiocitais gali sukelti ūminį širdies funkcijos nepakankamumą, pasireiškiantį sistolinės ir diastolinės trukmės prailgėjimu bei kontraktinės funkcijos sumažėjimu [91, 92].

Mitochondrijų pažeidimas šiame procese užima svarbiausią vietą. Virusiniai stresoriai trikdo mitochondrijų elektronų pernašos grandinės veiklą provokuodami Warburgo efektui būdingą metabolinį perjungimą link glikolizės, tačiau to kardiomiocitams energetiškai nepakanka [87, 89]. Pacientams, kuriems jau pažeista mitochondrijų funkcija, virusinis stresas sukelia dar sunkesnes pasekmes, nes mitochondrijų DNR yra mažiau apsaugota nuo ROS poveikio [86, 93]. Hipoksinės sąlygos, kylančios dėl respiracinio nepakankamumo, dar labiau stiprina tiesioginį toksinį viruso dalių poveikį miokardui [92, 94].

# UŽDEGINIŲ CITOKINŲ VAIDMUO KARDIOMIOCITŲ HIPOKSIDINĖS-REOKSIDINACINĖS IR VIRUSINĖS INFEKCIJOS PAŽAIDOS DYDŽIUI

Su I/R susijusį „sterilų uždegimą“, vykstantį nesant akivaizdžių bakterinių ar virusinių patogenų, sukelia pavojaus signalai – su pažeidimu susiję molekuliniai žymenys (DAMP), išsiskiriantys iš pažeistų arba mirštančių kardiomiocitų [95]. Šis imuninis atsakas formuojasi per dinamišką citokinų kaskadą. Ląstelių žūties nulemtas DAMP išsiskyrimas veikia kaip pirminis trigeris, aktyvuojantis penkis esminius mediatorius: naviko nekrozės faktorių  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukiną 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukiną 6 (IL-6), chemokiną CCL2 bei granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių (GM-CSF) [96].

Šie prouždegiminiai signalai suveikia kaip galingi chemoatraktantai, skatinantys greitą imuninių ląstelių – makrofagų, neutrofilų bei dendritų – migraciją ir infiltraciją į pažeistą širdies audinį. Aktyvuotos imuninės ląstelės pradeda išskirti antrinius uždegiminius mediatorius bei ROS ir taip suformuoja ydingą uždegimo ciklą. Galutinė šios ląstelinės infiltracijos ir audinių pažeidimo pasekmė yra gili kardiomiocitų disfunkcija, pasireiškianti kontraktiliniu nepakankamumu ir negrįžtamam miokardo remodeliavimui. Toliau detalai aptariamas kiekvieno iš šių kaskados elementų specifinis vaidmuo.



*1 pav. Sterilus uždegimo ir citokinų kaskados mechanizmas miokardo pažaidos metu*

Pažeistos ir mirštančios ląstelės į tarpląstelinę erdvę išskiria su pažeidimu susijusius molekulinis žymes (DAMP), kurie veikia kaip pavojaus signalai. Tai indukuoja pagrindinių prouždegiminių mediatorių – naviko nekrozės faktoriaus  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukinų (IL-1 $\beta$ , IL-6), chemokino CCL2 bei granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GM-CSF) – kaskadą. Šie mediatoriai aktyvuoja ir pritraukia imunines ląsteles (makrofagus, neutrofilus, dendritus) į pažeistos židinį. Sukelta uždegiminių ląstelių infiltracija ir antrinių mediatorių išsiskyrimas gilina audinių pažeidimą ir lemia ūminę kardiomiocitų disfunkciją.

### **Naviko nekrozės faktorius- $\alpha$ : ankstyvasis uždegiminio atsako iniciatorius**

TNF- $\alpha$  yra pagrindinis uždegimo iniciatorius, kurio kiekis reperfuzuo-tame miokarde sparčiai didėja [97]. Jį išskiria oksidacinio streso paveikti makrofagai [98]. Žalingas TNF- $\alpha$  poveikis pasireiškia mitochondrijų elektronų pernašos grandinės (EPG) slopinimu tarp II ir III kompleksų [102]. Dėl to mažėja membranos potencialas ir ATP sintezė, tačiau labai padidėja reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamyba [99, 101, 103].

ROS perteklius pažeidžia mitochondrijų DNR (mtDNR) ir dar labiau sutrikdo EPG kompleksų veiklą [104]. Taip susiformuoja ydingas grįžtamasis ryšys: oksidacinis stresas skatina TNF- $\alpha$  sekreciją, o TNF- $\alpha$  toliau didina ROS kiekį bei ląstelių pažeidimus [99, 105, 109]. Šis ciklas lemia miokardo persitvarkymą ir progresuojantį širdies nepakankamumą [100, 106]. Antioksidantų vartojimas, TNF- $\alpha$  slopinimas ar tiesioginis ROS kiekio mažinimas efektyviai nutraukia šią pažeidų grandinę ir yra laikomi perspektyviomis kardioprotekcinėmis strategijomis [99, 100, 107, 108].

### **Interleukinas-1 $\beta$ : uždegimo skatinimas**

IL-1 $\beta$  sintezė yra reguliuojama dviejų pakopų procesu [110]. Jo neaktyvus pirmtakas pradedamas gaminti reaguojant į pradinius uždegimo signalus (pvz., TNF- $\alpha$  veikiant per NF- $\kappa$ B stimuliaciją) [111]. Antrą aktyvacijos signalą atlieka DAMP molekulės, skatinančios NLRP3 tipo uždegimo formavimąsi [112]. Aktyvuotuose uždegimuose esanti kaspazė-1 suskaldo pro-IL-1 $\beta$  į aktyvų citokiną IL-1 $\beta$  [110].

Išsiskyręs IL-1 $\beta$  stipriai skatina neutrofilų pritraukimą ir aktyvavimą (degranuliaciją) [113]. Jis padidina adhezijos molekulių ekspresiją kraujagyslių endotelio ląstelėse ir palengvina leukocitų transmigraciją į audinį [114]. Be to, IL-1 $\beta$  stimuliuoja kitų citokinų (IL-6, CCL2) gamybą [110] ir

sukuria teigiamą grįžtamąjį ryšį, prisidedantį prie kardiomiocitų apoptozės ir nepageidaujamos audinių remodeliacijos [115, 116].

### **Interleukinas-6: sisteminis ir vietinis uždegimą skatinantis veiksnys**

IL-6 yra plataus poveikio citokinas. Esant ūminei širdies I/R pažeidimo fazei, jis veikia kaip uždegimą skatinantis tarpininkas [117]. Jo kiekis žymiai padidėja ir kraujyje, ir vietiniame miokardo audinyje po I/R pažeidimo [117]; jį produkuoja infiltruojančios imuninės ląstelės ir kardiomiocitai [118]. IL-6 reikšmingai prisideda prie sisteminio ūminės fazės atsako po miokardo pažeidimo [115].

Lokaliam jis aktyvuoja JAK/STAT kelią ląstelėse [118]. Nors STAT3 aktyvacija kartais gali turėti apsauginį poveikį [119], tačiau esant ilgalaikiam ūminiam uždegimui, ji skatina tolesnę uždegiminių genų ekspresiją ir gali prisidėti prie širdies fibrozės bei hipertrofijos [120].

### **Monocitų chemoatrakcijos baltymas-1: monocitų pritraukimo signalas**

CCL2 atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį pritraukdamas monocitus į pažeistą miokardą [121]. Po I/R pažeidimo CCL2 raiška greitai padidėja, nes ją išskiria pažeistos ląstelės ir kardiomiocitai [122]. Šie pritraukti monocitai ekstravazuojasi per aktyvuotą endotelį [114] ir diferencijuojasi į makrofagus [121].

Nors makrofagai būtini audinio gijimo etapams [121], tačiau pradinė banga dažnai įgyja uždegimą skatinantį (M1) fenotipą [124]. M1 makrofagai išskiria proteolizinius fermentus [125], ROS [126] bei citokinus (TNF- $\alpha$  ir IL-1 $\beta$ ) ir taip palaiko uždegimo ciklą [95].

### **Granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius: mieloidinių ląstelių aktyvatorius**

GM-CSF sukelia reikšmingą uždegimą skatinantį poveikį I/R pažeidimo metu veikdamas neutrofilus ir monocitus/makrofagus [127, 128]. Po miokardo I/R pažeidimo gali padidėti GM-CSF kiekis, kurį išskiria T ląstelių pogrupiai [129]. Tai skatina imuninių ląstelių išgyvenimą ir funkcinės aktyvacijos būseną (pradinį stimuliavimą) [127].

Pailgindamas neutrofilų ir makrofagų gyvenimo trukmę, GM-CSF veiksmingai stiprina imuninių ląstelių gebėjimą sukelti didesnę žalą [129]. Aktyvuoti neutrofilai išskiria ROS, o makrofagai prisideda prie ilgalaikio

uždegimo ir audinių degradacijos [98]. GM-CSF neutralizavimas sumažina infarkto dydį, uždegiminių ląstelių infiltraciją ir mažina I/R pažeidimą [94].

### **Uždegiminis atsakas ir išeminė-reperfuzinė pažeida yra tarpusavyje susiję procesai**

Širdies I/R pažeidos sukeltas uždegiminis atsakas yra dinamiškas procesas. Citokinai TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 ir GM-CSF veikia neizoliuotai, bet sudaro tarpusavio tinklą, stiprinantį vienas kito gamybą ir poveikį [130].

Ši sudėtinga citokinų sąveika sukelia uždegiminę kaskadą, kuri tiesiogiai pažeidžia kardiomiocitus, aktyvuoja užprogramuotos ląstelių žūties kelius ir skatina intensyvų ROS generavimą [94, 131]. Virusiniai stresoriai (SARS-CoV-2 RBD) veikia kaip papildomi katalizatoriai: potencijuoja IL-6 bei TNF- $\alpha$  sekreciją ir mitochondrijų bioenergijos nepakankamumo progresą [4].

# KARDIOPROTEKCINIŲ POVEIKIŲ PASIŪYMINŲ NATŪRALŲS ANTIOKSIDANTAI IR JŲ PRISTATYMO SISTEMOS

## Kurkumino taikymas mitochondrijų funkcijos stabilizavimui

Kurkuminas – pagrindinis ciberžolės polifenolis, turintis ryškų pleiotropinį poveikį [132]. Mokslinėje literatūroje plačiai aprašomos jo savybės, taikomos metabolinio sindromo bei ŠKL terapijai [133–139]. Kardiologijai aktualus kurkumino gebėjimas moduluoti oksidacinį stresą ir mažinti lipidų peroksidaciją [140, 141]. Jo efektyvumą prieš I/R pažeidimą nulemia unikali cheminė struktūra [142]. Per elektronų perdavimo mechanizmus kurkuminas neutralizuoja radikalus [143–145] ir geba cheluoti prooksidantinius metalų jonus užkirsdamas kelią Fentono reakcijai [146–151].

Esminis kurkumino poveikis kardiomiocitų išgyvenamumui siejamas su mitochondrijų apsauga. Aktyvuodamas Nrf2 signalinį kelią [152], kurkuminas sutrikdo Keap1-Nrf2 kompleksą, skatina Nrf2 translokaciją į branduolį ir detoksikacijos fermentų transkripciją [153–164]. HO-1 indukcija laikoma pagrindiniu mechanizmu, apsaugančiu mitochondrijas nuo mPTP atsivėrimo bei bioenergijos kolapso [165–174].

## Kurkumino kardioprotekcinio poveikio ikiklinikinių tyrimų duomenys

*In vitro* modeliuose kurkumino vartojimas padidino gyvybingumą ir sumažino apoptozę [175–184]. Mitochondrijų lygmeniu pastebėtas išsaugotas membranos potencialas [185–191]. *In vivo* tyrimai su gyvūnais patvirtino, kad kurkuminas reikšmingai mažina infarkto dydį bei slopina nepageidaujamą kairiojo skilvelio remodeliavimąsi [192–205]. Širdies audinio analizė parodė sustiprintą endogeninę antioksidacinę apsaugą [206–218].

Nepaisant teigiamų rezultatų, laisvo kurkumino biologinis prieinamumas yra labai mažas [219–223]. Siekiant įveikti šiuos barjerus, kurkuminas inkapsuliuojamas į PLGA nanodaleles [224–229]. Tas užtikrina pH jautrų atpalaidavimą acidozės apimtoje miokardo zonoje [230].

## **Kurkumino klinikinio pritaikymo iššūkiai ir nanotransporto sistemų poreikis**

Nepaisant teigiamų rezultatų, laisvo kurkumino biologinis prieinamumas yra labai mažas dėl prasto tirpumo ir intensyvaus pirmojo prasiskverbimo metabolizmo (gliukuronizacijos) [219–223]. Siekiant įveikti šiuos barjerus, kurkuminas inkapsuliuojamas į transporto nanosistemas, t. y. į PLGA nanodaleles [224–229]. Inkapsuliacija į PLGA ne tik apsaugo polifenolį nuo degradacijos, bet ir užtikrina pH jautrų atpalaidavimą acidozės apimtoje miokardo zonoje [230].

## **Vitamins E vaidmuo mitochondrijų apsaugai išeminės-reperfuzinės pažaidos metu**

Vitamins E apima aštuonias riebaluose tirpių junginių izoformas, iš kurių biologiškai aktyviausias žmogaus organizme yra  $\alpha$ -tokoferolis ( $\alpha$ -T) [231–233]. Pagrindinė vitamino E funkcija – lipidų peroksidacijos reakcijos nutraukimas biologinėse membranose [234, 235].

Vitamins E veikia lokalizuodamasis kardiomiocitų sarkolemoje ir mitochondrijų membranose; ten jis neutralizuoja peroksilo radikalus ir paverčia juos stabiliais hidroperoksidaais [234–238]. Vitamins E regeneracijai būtinas glutationas [236, 237]. Be tiesioginio antioksidacinio vaidmens, vitamino E moduliuoja signalizaciją: slopina PKC aktyvumą, veikia MAPK kaskadas bei NF- $\kappa$ B kelią ir taip mažina uždegiminių citokinų bei adhezijos molekulių raišką [239–246].

Mitochondrijų membranų apsauga yra kritinė I/R metu, nes leidžia palaikyti protonų gradientą ir ATP sintezę [247, 248]. Vitamins E slopina mPTP atsivėrimą mažindamas oksidacinį stresą ir netiesiogiai riboja mitochondrijų  $Ca^{2+}$  perkrovą per geresnę siurblių funkciją [249–255].

## **Vitamins E taikymo ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose rezultatai bei jų apribojimai**

*In vitro* ir *ex vivo* modeliai patvirtino, kad vitamino E mažina MI dydį bei reperfuzijos sukeltas aritmijas [256–262]. *In vivo* tyrimai pademonstravo ir kardioprotekciją [263–270]. Tačiau klinikinės studijos buvo nuviliančios arba parodė padidėjusį mirtingumą vartojant dideles jo dozes [271–276]. Šis „transliacinis atotrūkis“ aiškinamas tuo, kad klinikose tirtas lėtinis vartojimas profilaktikai, o ne ūminė intervencija I/R metu [248, 277, 278].

## **Nanotransporto poreikis vartojant vitaminą E praktiškai**

Klinikinis efektyvumas gali būti pasiektas užtikrinant greitą vitamino E patekimą į kardiomiocitų mitochondrijas [279–282]. Laisva forma didelėmis dozėmis gali sukelti tokoferolio sąlygotą peroksidaciją [277, 283]. Todėl PLGA nanodalelių vartojimas yra būtinas: jis apsaugo vitaminą E nuo prooksidacinio poveikio ir užtikrina selektyvų atpalaidavimą rūgštinėje išemijos zonoje (pH 5,5) [284, 285].

# AUGALINĖS KILMĖS NANOPŪSLELIŲ PRITAIKYMAS ŠIRDIES LIGŲ TERAPIJAI

## Kardiomiocitų išeminei-reperfuzinei pažeidai taikomi terapijos būdai

Nepaisant pažangos gydant ŪMI, miokardo I/R pažeidai išlieka pagrindiniu iššūkiu, nes specifinių priemonių jai suvaldyti klinikinėje praktikoje vis dar trūksta [286–290]. Mechaninės strategijos, pvz., postkondicionavimas, dažnai neduoda laukiamų rezultatų dėl „transliacinio atotrūkio“, kurį sukelia pacientų gretutinės patologijos ir vartojami medikamentai [291].

Atsižvelgiant į tai, kad mitochondrijų bioenergijos stabilizavimas yra kardiomiocitų išsaugojimo pagrindas, naujausi tyrimai siejami su farmakologine mitochondrijų apsauga. Nagrinėjami EDTA chelatų tirpalai, galintys moduluoti mPTP kanalų veiklą ir viduląstelinio  $Ca^{2+}$  balansą [288], bei IL-1 citokinų inhibitoriai, mažinantys uždegiminį atsaką į kardiomiocitų žūtį [292].

Viena perspektyviausių kryptių šiame kontekste yra regeneracinės medicinos sprendimai, ypač kardioprotekcinės nanopūslelės. Jos geba transportuoti miRNR ir baltymus, kurie tiesiogiai veikia kardiomiocitų mitochondrijas, apsaugo jas nuo oksidacinio streso, padeda išvengti mPTP atsivėrimo ir taip sumažina negrįžtamą miokardo pažeidimą [293–295].

## Užląstelinės nanopūslelės kaip perspektyvi terapinė platforma

Remiantis Tarptautinės užląstelininių nanopūslelių draugijos (angl. *International Society for Extracellular Vesicles*, ISEV) patvirtintomis MISEV2023 gairėmis, visos ląstelių natūraliai išskiriamos pūslelės, apribotos lipidiniu dvigubu sluoksniu ir neturinčios funkcinio branduolio, įvardijamos bendru užląstelininių nanopūslelių (angl. *extracellular vesicles*, EVs) terminu. Atsižvelgiant į tai, kad pūslių biogeneze yra sudėtingas ir ląstelės fiziologinę būklę atspindintis procesas, gairėse rekomenduojama jas klasifikuoti pagal fizines charakteristikas: mažosios (< 200 nm) ir vidutinės/didelės (> 200 nm) nanopūslelės [295, 296].

Šios pūslelės, literatūroje dažnai vadinamos „egzosomomis“, aptinkamos visuose biologiniuose skysčiuose. Jų molekulinį krovinį – baltymus, lipidus ir nukleorūgštis (mRNR, miRNR, DNR fragmentus) – lemia motininės ląstelės tipas ir jos funkcinė būklė [295, 297]. Žinduolių ląstelių išskiriamos nanopūslelės atlieka svarbų vaidmenį tarpląstelinėje komunikacijoje ir yra plačiai tyrinėjamos esant I/R pažeidimams. Čia kamieninėmis ląstelėmis (MSC,

CPC) grįsta vezikulių terapija demonstruoja antiapoptozinius ir proangiogeninius efektus ir moduliuoja miokardo energijos balansą [293–295, 298, 299]. Vis dėlto terapinis žmogaus ar gyvūnų kilmės pūslelių pritaikymas susiduria su sudėtingais standartizavimo, išskyrimo ir masinės gamybos iššūkiais.

### **Augalinės kilmės nanopūslelių biologinė svarba ir pritaikymas**

Įdomu tai, kad užląstelinių nanopūslelių egzistavimas ir komunikacinis vaidmuo neapsiriboja vien gyvūnų karalyste. Pastarojo dešimtmečio tyrimai atskleidė, kad augalų ląstelės taip pat gamina ir išskiria užląstelines nanopūsleles, struktūriškai ir funkciškai analogiškas žinduolių vezikulėms. Šios struktūros, dažnai vadinamos augalinės kilmės nanodalelėmis (angl. *Plant-Derived Nanovesicles*, PDNV) arba į egzosomas panašiomis pūslelėmis (angl. *Plant Exosome-like Vesicles*, PELV), pasižymi tipišku egzosomų dydžiu ir yra pripildytos bioaktyvių augalinių molekulių: lipidų, sacharidų, fenolinių junginių bei nukleorūgščių [300, 301]. Skirtingai nei gyvūninės kilmės vezikulės, augalinės nanopūslelės pasižymi išskirtiniu stabilumu rūgščioje terpėje, yra absorbuojamos žarnyne ir per sisteminę kraujotaką gali pasiekti įvairius žinduolių audinius. Visa tai jas daro perspektyvia terapine sistema [302].

### **Augalų nanopūslelių kardioprotekciniai veikimo mechanizmai**

Augalinės kilmės nanopūslelių galimybė sumažinti širdies I/R pažeidimą kyla dėl jų unikalios sudėties ir gebėjimo sąveikauti su žinduolių ląstelėmis. Bioaktyvios medžiagos, esančios nanopūslelės viduje, gali trukdyti daugeliui I/R pažeidimo kaskados etapų.

Vienas pagrindinių apsaugos mechanizmų yra nanopūslelių antioksidacinės savybės. Daugelis augalų natūraliai turi stiprių antioksidacinių junginių – polifenolių (pvz., kurkumino ciberžolėje, gingerolio imbire, resveratrolio vynuogėse, rozmarino rūgšties melisose) ir vitaminų [303, 304]. Tyrimai rodo, kad augalinės kilmės nanopūslelės gali veikti kaip antioksidantų nešikliai ir padidinti jų stabilumą bei įsisavinimą ląstelėse [301]. Pavyzdžiui, imbiero nanopūslelės gali apsaugoti nuo audinių pažeidimo padidindamos endogeninių antioksidantų fermentų (pvz., hemo oksigenazės-1 (HO-1)) kiekį ir sumažindamos lipidų peroksidaciją [301]. Be tiesioginio antioksidacinio poveikio, augalinės kilmės nanopūslelės taip pat gali turėti specifinių baltymų arba miRNR, kurie moduliuoja endogeninius antioksidantų kelius (pvz., Nrf2 signalinę kaskadą) ir taip sustiprina vidinę ląstelių apsaugą nuo ROS veikimo reperfuzijos metu [302, 305].

Uždegimas yra dar vienas svarbus veiksnys esant širdies I/R pažeidimui. Įrodyta, kad augalų nanopūslelės (pvz., imbiero ar vynuogių) veikia prieš-uždegimiškai moduluodamos makrofagų poliarizaciją link M2 fenotipo ir sumažindamos TNF- $\alpha$  ir IL-6 gamybą [293, 305, 306]. Šį poveikį gali sąlygoti specifiniai lipidai, baltymai arba miRNR, mažinantys uždegiminės kaskados aktyvaciją (slopina NF- $\kappa$ B išraišką) [302]. Miokardo I/R pažaidos metu tokie priešuždegiminiai veiksmai gali žymiai sumažinti neutrofilų infiltraciją ir sukurti palankesnę aplinką kardiomiocitams išgyventi [307].

Kardiomiocitų apsauga nuo apoptozinės žūties yra itin svarbi siekiant sumažinti infarkto dydį. Sušvelnindamos oksidacinį stresą ir kalcio perteklių, augalų nanopūslelės netiesiogiai užkerta kelią mPTP atidaryti. Be to, jos gali tiesiogiai sąveikauti su mitochondrijų komponentais arba atnešti miRNR, kurios sumažina proapoptozinių baltymų (Bax, Bak) gamybą, padidina anti-apoptozinių baltymų (Bcl-2) išraišką ar slopina kaspazių aktyvaciją [302, 308, 309].

Vienas įdomiausių augalų nanopūslelių funkcijos aspektų yra jų vaidmuo, padedantis reguliuoti genų ekspresiją žinduolių ląstelėse miRNR pagalba. Pačios miRNR yra mažos nekoduojančios RNR, kurios jungiasi prie tikslinių mRNR 3' netransliuojamo regiono. Tyrimai įrodo, kad augalų miRNR (pvz., miR159) gali prisijungti prie žinduolių mRNR, jas slopinti ir taip pademonstruoti tarprūšinės genų reguliacijos fenomeną, susijusį su medžiagų apykaita, uždegimo moduliacija ir imuniniu atsaku [300, 302, 310].

### **Vaistinė melisa kaip perspektyvus kardioprotekcinis užląstelių nanopūslelių šaltinis**

Vaistinė melisa (lot. *Melissa Officinalis*), priklausanti mėtų (lot. *Lamiaceae*) šeimai, jau kelis šimtmečius tradiciškai vartojama dėl raminamųjų, antivirusinių ir atmintį gerinančių savybių [311, 312]. Moksliniai tyrimai atskleidė, kad melisa turi ryškų antioksidacinį ir priešuždegiminį poveikį. Tą lemia augale esantys fenolio junginiai; rozmarino rūgštis yra gausiausia melisos sudedamoji dalis [312, 313]. Kiti dariniai – kofeinas, chlorogeno rūgštis, flavonoidai ir triterpenai – taip pat prisideda prie augalo bioaktyvumo ir pasižymi kardioprotekcinėmis savybėmis [313, 314]. Vandenyje tirpūs ir su lipidais susiję junginiai yra pagrindiniai komponentai, randami augalinės kilmės nanopūslelėse.

## **Melisų nanopūslelių kardioprotekciniai mechanizmai**

Melisoje gausu rozmarino rūgšties ir flavonoidų [312, 313]. Rozmarino rūgštis efektyviai suriša laisvuosius radikalus ir cheluoja prooksidacinius metalo jonus [313]. Augalinės NP taip pat gali pernešti miRNR; jos didina ląstelės endogeninę antioksidacinę apsaugą ir sustiprina kardiomiocitų atsparumą oksidaciniam stresui [314]. Junginiai, esantys melisoje, gali slopinti uždegimo mediatorius ir citokinų gamybą per signalinius kelius – pvz., NF- $\kappa$ B [311, 312]. Patekusios į ląsteles, NP galėtų slopinti uždegiminę reakciją kaip tai daro nanopūslelės, išgautos iš kitų augalų, pavyzdžiui, imbiero [315].

Be to, NP gali tiesiogiai pristatyti antiapoptozines molekules arba miRNR, kurios paveiktų proapoptozinius genus kardiomiocituose ir stabilizuotų mitochondrijų funkciją [315, 316]. Internalizuotos kardiomiocituose šios molekulės gali dalyvauti tarprūšinėje genų raiškos moduliacijoje ir tiesiogiai jungtis prie žinduolių mRNR taikinių [317, 318]. Tikėtina, kad augalinių miRNR įtaka gali būti vienas veiksnių, lemiančių kardiomiocitų metabolinį perprogramavimą, t. y. selektyvus tam tikrų mitochondrijų baltymų kodavimo slopinimas gali priversti ląstelę laikinai pereiti prie glikolitinės energijos gamybos.

Rozmarino rūgštis turi apsauginį poveikį nuo I/R sukeltų pažeidimų kituose organuose, pavyzdžiui, smegenyse ar inkstuose [312, 313]. Sėkmingai kardioprotekcijai panaudotos NP iš kitų augalų, pavyzdžiui, imbiero [315] arba vynuogių [319], suteikia tvirtą pagrindą mūsų pasirinktai strategijai.

## **Iššūkiai ir perspektyvos pritaikant augalinės kilmės nanopūsleles terapijai**

Nors duomenų apie augalų nanopūslelių kardioprotekcinį poveikį po I/R pažeidimo daugėja, tačiau pritaikant juos klinikinėje praktikoje susiduriama su iššūkiais. Išskyrimo ir apibūdinimo metodų standartizavimas yra esminis, nes nanopūslelių išeiga, grynumas ir sudėtis labai priklauso nuo augalo šaltinio, augimo sąlygų, brandos ir išskyrimo protokolo [302, 308]. Norint užtikrinti atkartojamumą, reikalinga išsami nanodalelės sandaros analizė (proteomika, lipidomika, transkriptomika) ir tikslių molekulinį taikinių kardiomiocituose nustatymas.

Labai svarbu suprasti, kaip augalų nanopūsleles specifiškai pasisavina kardiomiocitai: per receptorius, endocitozę ar membranų susiliejimą [302, 308]. Biologinio prieinamumo klausimas, ypač vartojant per burną, išlieka svarbi sritis, reikalaujanti griežtų farmakokinetikos tyrimų [300, 301, 308]. Nors manoma, kad nanopūslelės, išgautos iš valgomųjų augalų, yra saugios, visgi būtina įvertinti galimą imunogeniškumą esant didelėms koncentracijoms [302]. Išsprendus standartizavimo ir terapinės gamybos mastelio keitimo iššūkius [308], augalinės nanopūslelės turi didžiulį potencialą tapti naujos kartos strategija kardiomiocitų apsaugai nuo I/R pažeidimo.

# VAISTŲ PERNEŠIMO NANOSISTEMŲ TAIKYMAS KARDIOLOGIJAI

## Pagrindiniai vaistų pernešimo nanosistemų principai

Vaistų pernešimo sistemos yra sukurtos vaistams pristatyti į konkrečias tikslines organizmo vietas ir suteikia daug privalumų bei platesnę terapinio gydymo spektrą lyginant su įprastomis formomis [320]. Kontroluojamas vaistų pernešimas (KVP) naudojant nanodaleles, leidžia užtikrinti tikslinį veikliosios medžiagos pristatymą į pažeistą audinį palaikant terapinę koncentraciją ir kartu mažinant sisteminę šalutinį poveikį [284, 321]. Šiuolaikinėje kardiologijoje ši strategija yra esminė sprendžiant „terapinio lango“ problemą ir siekiant, kad sisteminės dozės nepasiektų toksiškumo ribos [322].

Nanonešikliai leidžia išnaudoti padidėjusį mikrokraujagyslių pralaidumą infarkto metu ir užtikrinti pasyvią vaisto akumuliaciją būtent pažaidos srityje [323]. Be to, nanotechnologiniai sprendimai kritiškai pagerina molekulių internalizaciją į kardiomiocitus ir yra būtina sąlyga norint apsaugoti ląsteles nuo reoksigenacijos sukkelto negrįžtamo pažeidimo [323].

Pagerindamos biologinį prieinamumą, ND gali sumažinti gydymo išlaidas ir toksiškumo riziką [324]. Žinoma, kad didesnės nei 1000 nm makrodalelės linkusios kauptis kepenyse ir blužnyje, o mažesnės nei 8 nm pašalinamos per inkstus. Tačiau 10–300 nm dydžio ND dažnai kaupiasi organuose, kuriuose yra didelis makrofagų tankis [325].

## Nanodalelių klasifikacija ir biocheminės savybės

Pagrindinės nanodalelių klasės skirstomos į neorganines, lipidines ir polimerines. Neorganinės nanodalelės – pavyzdžiui, aukso (AuND) ar geležies oksido sistemos – leidžia jas efektyviai taikyti diagnostikai bei fototerminiai terapijai [326–330]. Visgi klinikinį šių dalelių pritaikymą širdies ligoms gydyti riboja polinkis kauptis organuose bei galimas ilgalaikis toksiškumas, ypač naudojant sunkiųjų metalų junginius [331].

Lipidų pagrindu sukurtos sistemos, taip pat ir liposomos, vertinamos dėl gero biosuderinamumo ir gebėjimo transportuoti ir hidrofiličius, ir lipofiličius vaistus [332, 333]. Liposomos gali apsaugoti veikliąsias medžiagas nuo metabolinės degradacijos [334, 335]. Tačiau kardiomiocitai laisvas liposomas pasisavina prastai, o modifikacijos (pvz., PEG) gali sukelti nepageidaujamą imuninį atsaką [322, 336].

## Polimerinės nanodalelės ir jų panaudojimas praktiškai

Siekiant išvengti imuninės sistemos poveikio, buvo sukurtos sintetinės polimerinės medžiagos, pvz., PLGA [337, 338]. Pagal struktūrą jos skirstomos į polimersomas, micles ir dendrimerus [339]. PLGA yra plačiausiai naudojama biologiškai skaidoma vaistų pernešimo sistema, patvirtinta FDA ir EMA, skirta kontroliuojamam vaistų tiekimui į ląsteles [340]. Į ląstelę patekusi PLGA skyla į pieno rūgštį ir glikolio rūgštį, kurios metabolizuojamos per Krebso ciklą į CO<sub>2</sub>, seriną ir piruvatą [341]. Šis procesas padaro PLGA saugiu vaistų tiekimo pasirinkimu su minimaliu sisteminiu toksiškumu [337, 342].

PLGA nanodaleles galima pritaikyti keičiant dydį, krūvį ir aplinkos pH [343]. Vienas iš paplitusių metodų hidrofobiniams junginiams (pavyzdžiui, kurkuminui) inkapsuliuoti yra emulsifikacijos metodas, suteikiantis norimas savybes [341, 343]. Pagrindinis PLGA skaidymosi greitis yra moduluojamas aplinkos pH – rūgštinėje terpėje vyksta autokatalitinis efektas, paspartinantis polimerinės matricos skaidymąsi [340, 341]. Tokia pH priklausoma kinetika leidžia kurti sistemas, užtikrinančias pagreitintą vaisto atpalaidavimą patologinės acidozės sąlygomis [268]. Inkapsuliacija apsaugo polifenolius nuo degradacijos vandeninėje terpėje iki patekimo į ląstelę [343].

PLGA plačiai tiriama vėžiui ir neurodegeneraciniams sutrikimams gydyti, diagnostikai ir vaizdinimui [342]. Tyrimai parodė, kad kurkumino inkapsuliuojimas PLGA pagerina tirpumą ir absorbciją ląstelėse lyginant su laisvu kurkuminu [345]. Tas lėmė didesnę stabilumą ir geresnę vaistų pasisavinimą bei sulaikymą ląstelėse [346].

## Nanodalelių klinikinio pritaikymo iššūkiai

Tokių nanodalelių kaip PLGA naudojimas kelia iššūkių nanomedicinai. Konkrečių gairių trūkumas gali trukdyti šių vaistų transportavimo sistemų patvirtinimo procesui, nes sterilizavimo metodai turi nepakenkti nanodalelių stabilumui. Tinkamas problemų sprendimas būtinas siekiant pagerinti PLGA preparatų klinikinį pritaikymą ir potencialą [347]. Apibendrinant galima teigti, jog nepaisant daug žadančių rezultatų *in vitro*, naudingos nanoterapijos kiekis išlieka mažas dėl transliacijos atotrūkio tarp gyvūnų modelių ir žmonių tyrimų [348, 349], o ypač dėl nepakankamo supratimo, kaip skirtumai veikia nanoterapijos dalelių veikimą *in vivo* [350].

# TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

## Ekspirimentinio tyrimo strategija ir pagrindimas

Ekspirimentinė strategija buvo suformuota siekiant ištirti kardiomiocitų pažaidos mechanizmus ir įvertinti nanotechnologinių priemonių efektyvumą juos neutralizuojant.

Tyrimams buvo naudoti pirminiai neonatalinių žiurkių kardiomiocitai, nes ši ląstelių kultūra – priešingai nei imortalizuotos ląstelių linijos (pvz., H9c2) – išlaiko natūralų kontraktiškumą, bioenerginės savybes bei ląstelių signalizacijos kelius, būdingus *in vivo* būsenai [349, 350]. Be to, pirminiai kardiomiocitai pasižymi stabilia AKF-2 receptorių raiška, kuri būtina tiriant tiesioginį SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikį miokardui [92, 351]. Siekiant imituoti su infekcija susijusį miokardo pažeidimo foną, tyrimams buvo pasirinktas rekombinantinis SARS-CoV-2 spyglio baltymo receptorius rišantis domenas (RBD), o ne gyvas virusas. Toks metodologinis pasirinkimas leidžia izoliuotai tirti tiesioginį receptorių (AKF-2) medijuojamą ląstelių pažeidimą ir imunometabolinį stresą atmetant aktyvios virusinės replikacijos bei tiesioginės ląstelių lizės sukeltus kintamuosius [352]. Literatūros duomenys rodo, kad vien tik RBD fragmento sąveika su AKF-2 receptoriais yra pakankama sukelti jų internalizaciją, vietinės renino-angiotenzino sistemos disbalansą [353], NADPH oksidazės aktyvavimą bei po to sekantį oksidacinį stresą ir mitochondrijų disfunkciją [354]. Tai leido standartizuotai atkurti „sterilaus uždegimo“ ir energijos išsekimo foną [355] bei sukurti jungtinio pažeidimo modelį, kuriame galima tiksliai įvertinti, kaip virusinis stresorius dekompensoja kardiomiocitų atsparumą vėliau prasidedančiai hipoksinei-reoksiginacinei pažaidai.

Remiantis literatūros analize bei preliminariais laboratorijos tyrimais, pasirinktas 24 val. hipoksijos (2 proc. O<sub>2</sub>) ir 24 val. reoksiginacijos modelis. Literatūroje nurodoma, kad tokia trukmė yra optimali sukelti patikimą mitochondrijų bioenergijos nepakankamumą ir kartu išlaikant pakankamą ląstelių gyvybingumą, leidžiantį vertinti terapinių medžiagų citoprotekcinį potencialą [356, 357]. Ląstelių apdorojimas nanodalelėmis ir nanopūslelėmis pradėtas likus 24 val. iki hipoksijos fazės pradžios. Toks išankstinis poveikimas pasirinktas siekiant užtikrinti pakankamą medžiagų internalizaciją bei aktyvuoti viduląstelinis adaptacinius kelius dar iki pagrindinio oksidacinio streso pradžios [140, 344].

## *Gydymo sistemų pagrindimas*

Pasirinkta naudoti biologiškai skaidų PLGA polimerą, nes jo esterinių ryšių hidrolizė yra paspartinama rūgštinėje terpėje [340]. Tai leidžia imituoti išeminę acidozę (pH 5,5) ir užtikrinti selektyvų vaisto atpalaidavimą pažeidimo zonoje ir kartu neutralizuoti laisvųjų antioksidantų galimą prooksidacinį toksiškumą esant didelėms dozėms [260, 268].

Vaistinės melisos nanopūslelės pasirinktos kaip inovatyvi biomimetinė platforma. Literatūros duomenys rodo, kad augalinės kilmės nanopūslelės geba vykdyti tarpūšinę genų raiškos moduliaciją, galinčią pakeisti ląstelės energijos profilį ir padidinti jos atsparumą hipoksijai [316, 319].

## **Polimerinių nanodalelių sintezė ir vaistinių medžiagų inkapsuliuojimas**

Poli-laktido-ko-glikolinė rūgštis (PLGA, 50:50, MM 100 000–125 000 g/mol) (Corbion, Nyderlandai). Acetonas (molekulinė masė 58,08 g/mol) ir Tween80 tirpalo nanodalelių sintezei (pH 5–7 (1,07 g/ml, H<sub>2</sub>O, 20 °C)) buvo įsigyti iš „Merck“ kompanijos, Vokietija. Kurkuminas (Cur, molekulinė masė (MM) 368,38 g/mol),  $\alpha$ - tokoferolis (vitaminas E) ( $\alpha$ TCP, MM 430,71 g/mol  $\geq$  96 proc.), acto rūgštis (99,8–100,5 proc.), poli (vinilo alkoholis) (PVA, MW: 31 000–50 000 g/mol, 98–99 proc. hidrolizuota), PLGA-Rodaminas B (RhB) (L:G 50:50, Mn: 10 000–30 000) („Sigma-Aldrich“ kompanija, Vokietija). Dializės membrana („Spectra/Por 6“ bandomasis rinkinys, MWCO: 2 kDa) ir fosfatinio buferinio tirpalo (PBS) tabletės buvo įsigytos atitinkamai iš „Spectrum Labs“, JAV, ir „MP Biomedicals“, JAV.

Polimerinių dalelių sintezė buvo vykdoma Acibadem universitete Turkijoje. Siekiant susintetinti PLGA nanodaleles (PLGA ND), PLGA (25 mg, 0,20–0,25  $\mu$ mol) buvo ištirpinta 1 ml acetono. Taip pat į 4 ml 1,5 proc. (m/t) PVA (polivinilrūgšties) tirpalo, paruošto dvigubai distiliuotame (dd) H<sub>2</sub>O, 100 aps./min. greičiu, buvo įpilta 10  $\mu$ l Tween80 tirpalo ir maišoma, kol visiškai ištirpo. Taip paruoštas PLGA tirpalas buvo lašinamas mažais lašeliais į PVA tirpalą insulino švirkštu tuo pat metu maišant 1 500 aps./min. greičiu. Sulašinus visą PLGA tirpalą, paruoštas naujas tirpalas buvo tris kartus centrifuguojamas šaltame dvigubai distiliuotame (dd) H<sub>2</sub>O 10 min. 10 000 aps./min. greičiu, kad būtų pašalintos visos priemaišos. Surinkus susidariusias mėgintuvėlių dugne nuosėdas, jos buvo resuspenduojamos 10 ml ddH<sub>2</sub>O.

Paskutiniame etape gautas ND tirpalas buvo centrifuguojamas 6 000 aps./min. greičiu, kol buvo pašalintos priemaišos ir pasiektas norimas nano-

dalelių dydis. Panašus metodas buvo taikomas ir vaistais pakrautų nanodalelių – kurkuminu pakrautų (PLGA-Cur) ir  $\alpha$ TCP pakrautų nanodalelių (PLGA-vit. E) bei Rodaminu B pakrautų nanodalelių (PLGA-RhB) – sintezei. Pagrindinis skirtumas gaminant buvo vaistų molekulių arba fluorescencinių dažų ištirpinimas acetone kartu su PLGA polimeru iš pat pradžių. Gaminant PLGA-Cur, kurkuminas (2,5 mg, 6,79  $\mu$ mol) ir PLGA (25 mg, 0,20–0,25  $\mu$ mol) buvo ištirpinti 1 ml acetono. Panašiai Rodaminas B (2,5 mg, 0,083–0,250  $\mu$ mol) ir PLGA (25 mg, 0,20–0,25  $\mu$ mol) buvo ištirpinti 1 ml acetono RhB-PLGA ND sintezei. Kaip  $\alpha$ TCP (2,5 mg, 5,8  $\mu$ mol) ir PLGA (25 mg, 0,20–0,25  $\mu$ mol) buvo ištirpinti 1 ml acetono  $\alpha$ TCP-PLGA ND sintezei. Vėlesni centrifugavimo etapai buvo atlikti taip pat, kaip aprašyta tuščių PLGA nanodalelių gamybos metu. Visos pagamintos nanodalelės buvo laikomos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

### Sintetinių nanodalelių fizikinių ir cheminių savybių vertinimas

**Dinaminės šviesos sklaidos (DŠS) analizė.** ND hidrodinaminiai skersmenys ir polidispersiškumo indeksai (PDI (angl. *Poly Dispersity Index*)) buvo išmatuoti DŠS prietaisu („Wyatt Technologies DynaproNanostar“, JAV) praskiedus ND 10 kartų ddH<sub>2</sub>O tirpale kambario temperatūroje (KT (25  $^{\circ}\text{C}$ )). Tam buvo paruošta 100  $\mu$ l ND tirpalo į DLS kiuvetę ir atlikta 10 matavimo ciklų, kurių kiekvieno laikas buvo 5 sekundės. Šie matavimai buvo pakartoti tris kartus kiekvienam mėginiui.

**Zeta potencialo analizė.** ND buvo praskiestos 10 kartų jų pradinio tūrio naudojant 0,001 M NaCl tirpalą siekiant išanalizuoti jų paviršiaus krūvį. Mėginiai buvo dedami į specialias zeta potencialo kiuvetes, o matavimai atlikti naudojant „Zetasizer Nano ZS“ (Malvern, JK) KT ir atliekant 10 matavimo ciklų. Procesas buvo pakartotas tris kartus, o vidurkis buvo apskaičiuotas siekiant nustatyti ND paviršiaus krūviui.

**Morfologinė analizė.** ND morfologija buvo analizuojama naudojant skenuojančiąją elektroninę mikroskopiją (SEM (angl. *Scanning Electron Microscopy*)) („Thermo Fischer Scientific“, „Quattro ESEM“, JAV). ND tirpalai buvo lašinami ant metalinių juostelių su anglies juoste ir paliekami džiūti beveik 2 dienas. Vėliau jie buvo padengti auksu vakuume, o analizė atlikta esant 20 kV įtampai ir 3,5 lazerio taško dydžiui.

**Stabilumo analizė.** Buvo tirtas ND stabilumas siekiant nustatyti, kiek laiko jos išlaiko savo struktūrą stabilią esant skirtingoms aplinkos sąlygoms. Šiuo tikslu ND buvo inkubuojamos 1 M pH 7,4 PBS tirpale skirtingose temperatūrose (KT ir 37  $^{\circ}\text{C}$ ). Po tam tikro inkubacijos laiko (pradžioje ir vėliau po 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48, 72, 96, 193, 267 val. ir

ilgiau) ND hidrodinaminis skersmuo buvo matuojamas DŠS metodu atliekant tris pakartojimus kiekvienam laiko taškui.

**Bendro vaisto kiekio nustatymas.** Bendras ND inkapsuliuotas vaisto kiekis buvo nustatytas praskiedžiant ND tirpalą su acetonu santykiu 1:1 ir analizuojamos naudojant LC/MS-MS (skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (angl. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) prietaisą. Analizė atlikta C18 kolonėlėje; praskiestas su acetonu ND tirpalas buvo sumašomas su kitu tirpikliu – ddH<sub>2</sub>O ir acetonitrilo mišiniu (1:1) ir paleidžiamas 0,5 ml/min. greičiu. Kurkumino daugialypės reakcijos stebėjimo (angl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) metu buvo koncentruojamasi į molekuliųjų jonų smaile ties 365,2 g/mol teigiamo skenavimo srityje; tiriant αTCP (vitaminą E) MRM metodu, buvo susikoncentruota ties molekuliųjų jonų smaile 431,4 g/mol. Iš pradžių kurkuminas ir αTCP buvo paruošti esant skirtingoms koncentracijoms, o šių vaistų molekulėms buvo sukurtos kalibravimo kreivės naudojant MRM metodus, specialiai parengtus abiem vaistų molekulėms (S1 ir S2 pav.). Remiantis šiomis kalibravimo kreivėmis, ND viduje inkapsuliuotų kurkumino ir αTCP kiekis buvo apskaičiuotas μg/ml, o vaistų inkapsuliuavimo efektyvumas (IE) buvo nustatytas procentais naudojant 1 lygtį.

$$\text{Vaisto IE proc.} = \left( \frac{\text{Inkapsuliuoto vaisto kiekis}}{\text{Visas vaisto kiekis}} \right) \times 100 \quad (1 \text{ lygtis})$$

**Veikliųjų medžiagų atpalaidavimo kinetikos tyrimas pH-jautriose nanotransporto sistemose.** Vienas pagrindinių tyrimo uždavinių buvo sukurti ir išbandyti pH jautrias nanotransporto sistemas, kurios užtikrintų selektyvų veikliųjų medžiagų atpalaidavimą acidozės paveiktoje aplinkoje. Šiam tikslui pasiekti buvo tiriama kurkumino ir vitamino E atpalaidavimo kinetika iš PLGA nanodalelių dviejose modelinėse terpėse: 1 mM fosfatiname buferiniame tirpale (PBS, pH 7,4), imituojančiame fiziologines sąlygas, ir acetato buferiniame tirpale (pH 5,5), imituojančiame lokalią miokardo acidozę bei uždegiminę aplinką.

Atpalaidavimo profilių nustatymui buvo naudotas dializės metodas: paruoštų nanodalelių mėginiai buvo patalpinti į dializės maišelius (molekulinės masės atskyrimo riba – 2 kDa) ir panardinti į 40 ml akceptorinio tirpalo. Eksperimentas vykdytas orbitiniame kratytuve (200 aps./min.) užtikrinant pastovią 37 °C temperatūrą. Siekiant tiksliai įvertinti vaisto išsiskyrimo greitį, akceptorinio tirpalo mėginiai buvo renkami nustatytais laiko intervalais: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48, 72, 96 valandas. Veikliųjų medžiagų koncentracija surinktuose mėginiuose analizuota naudojant skysčių chromatografijos ir masės spektrometrijos (LC/MS-MS) sistemą.

**Fluorescencinio spektrofotometro analizė.** RhB yra fluorescencinis dažiklis, kurio maksimalus sužadavimo bangos ilgis yra 553 nm, o maksimalus emisijos bangos ilgis – 627 nm. Siekiant nustatyti ND randamo dažiklio kiekį, buvo naudojamas komercinis RhB konjuguotas PLGA polimeras („Sigma-Aldrich“ kompanija, Vokietija) (S3 pav.) ir buvo sudaryta kalibravimo kreivė ties 553 nm bangos ilgiu. Taikant šią kreivę ir naudojant fluorescencinę spektrofotometriją, buvo nustatyta RhB molekulių, randamų PLGA-RhB ND, koncentracija.

### **Vaistinės melisos nanopūslelių išskyrimas ir sudėties analizė**

Augalinės kilmės ND išskirti buvo naudojamos džiovintos (ne aukštesnėje kaip 40 °C temperatūroje) antžeminės vaistinės *melisos* (lot. *Melissa Officinalis*) (MO) (Alfred Galke GmbH, Vokietija) dalys. Izoliacija atlikta pagal gamintojo protokolą naudojant „ExoPLANT Lo Nanovesicle Isolation Kit“ (UAB „Exolitus“, Lietuva). Gauta žaliava buvo susmulkinta grūstuvėje skysto azoto atmosferoje, sumaišyta su stabilizuojančiu reagentu B ir reagentu A. Suspensija 1 valandą maišyta kratytuvu 10 aps./min. greičiu. Tada mėginys 1 valandą centrifuguotas 3000 × g greičiu, kad greitai būtų pašalintos neištirpusios augalo dalys; suspensija filtruota per 0,22 μm porų dydžio švirkšto filtrą ir sumaišyta su reagentu C santykiu 1:1. Gautas tirpalas inkubuojamas 16 valandų 4–8 °C temperatūroje. Inkubacinis mėginys buvo centrifuguojamas 3000 × g greičiu 1 valandą, po to supernatantas buvo pašalintas, o gautos ND buvo resuspenduotos PBS tirpale.

Baltymų kiekybiniam nustatymui buvo naudojamas Bradfordo metodas. Trumpai: MO ND buvo sumaišytos su 0,1 proc. Tritono tirpalu santykiu 9:1 ir inkubuojamos 15–30 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos tirpalas buvo sumaišytas su Bradfordo reagentu santykiu 9:1, o absorbcija buvo matuojama esant 595 nm bangos ilgiui naudojant kontrolinį PBS, sumaišytą su Bradfordo reagentu („Sigma Aldrich“, Hamburgas, Vokietija). Koncentracija apskaičiuojama pagal kalibravimo kreivės lygtį, kuri sudaroma matuojant žinomas galvijų serumo albumino koncentracijas. Pagal gautus rezultatus vėliau buvo paruoštos kelios koncentracijos tolesniems bandymams – 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 μg/ml. Nanopūslelių hidrodinaminiam skersmeniui ir koncentracijai nustatyti buvo taikyta nanosekimo analizė (angl. *NanoTracking Analysis*, NTA) naudojant „Nanosight NS300“ (Malvern, Pensilvanija, JAV) prietaisą, skaičiuojantį dalelių skaičių ir įvertinantį jų dydį tekančiame skysčio sraute. Prieš matuojant mėginį, prietaiso kapiliaras ir matavimo celė buvo užpildyti PBS tirpalu. MO NP suspensija buvo praskiesta, kol ekrane vienu metu matėsi ne daugiau kaip 100 ir ne mažiau nei 10 dalelių. Prieš matavimą nanodalelių preparatas buvo kelias minutes resuspenduojamas 27G insulino

švirksčiu, kad NP nesuliptų. NP preparatas 20–50 kartų praskiedžiamas PBS ir matuojamas naudojant vienkartinę kiuvetę.

MO NP sudėties analizei buvo naudojama „Waters Acquity H“ klasės UPLC sistema („Waters Co, MA, JAV“) su „Waters Acquity“ fotodiodų matricos (PDA) detektoriumi („Waters Co, MA, JAV“). Analizei naudota kolonėlė: „Waters XTerra MS C18“ 4,6 × 100 mm, 3,5 μm. Sorbento (Waters Co, MA, JAV) dalelių dydis. MO nanodalelės buvo analizuojamos dėl 4 veiklių medžiagų: kofeino rūgšties, rozmarino rūgšties, p-kumaro rūgšties ir chlorogeno rūgšties. Veikliosios medžiagos buvo išskirtos iš liofilizuoto nanopūslelių preparato jį ištirpinant metanolyje ir sonifikuojant 15 min.

### **Pirminių kardiomiocitų išskyrimas ir ląstelių kultūros grynumo patikrinimas**

Visos procedūros buvo atliktos vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų priežiūros, laikymo ir naudojimo įstatymais. Gyvūnai buvo auginami ir prižiūrimi Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos vivariume laikantis ARRIVE gairių. Pirminių kardiomiocitų kultūros išskyrimui buvo pasirinktos Wistar veislės 4–5 dienų žiurkiukų širdys siekiant gauti eksperimentiniam darbui tinkamą pirminę kultūrą. Wistar tai yra albinosų žiurkių veislė. Žiurkės – pelinių (lot. *Muridae*) šeimos graužikų gentis. Patelės lytiškai subręsta per 8, o patinėliai per 10 savaičių. Poruojami nuo 3 mėnesių. Veislei tinka iki 1 metų amžiaus; gyvena 1,5–3 metus. Laikas nuo apvaisinimo iki vaisiaus atvedimo trunka 21–23 dienas. Vados dydis nuo 8 iki 18 jauniklių. Jaunikliai nujunkomi 3 savaičių amžiaus.

Gyvūnai buvo perkami iš LSMU Veterinarijos akademijos vivariumo ir pervežti į laboratoriją specialioje gyvūnų transportavimo dėžutėje. Paruošus operacinį lauką, buvo atliekama greita dekapitacija nukerpant galvas žirkėmis ir stengiantis nesužaloti gyvūnėlio galūnių (procedūrą atliko laboratorijos darbuotojas, turintis leidimą dirbti su gyvūnais). Dekapituotų žiurkiukų kūnai buvo gausiai apipurškiami 70 proc. etanoliu ir perkeliama į ant ledo laikomą Petri lėkštelę sterilioje aplinkoje laminarinio srauto spintoje (MSC-Advantage 1.8, Thermo Scientific, JAV).

Vėliau darbas vyko sterilioje aplinkoje naudojant autoklavuotus instrumentus. Krūtinės ląstos vietoje, naudojant aštrų chirurginį pincetą, buvo nulupama oda nuo krūtinės ląstos srities. Naudojant sterilias chirurgines žirkles, išilgai krūtinkaulio, labiau į kairę krūtinkaulio pusę, buvo perkerpama ir atvežiama krūtinės ląsta. Lenktu pincetu buvo išimama širdis ir perkeliama į naują ant ledo laikomą Petri lėkštelę, kurioje širdis nuplaunama su šaltu (+4 C°) Pierce Hanks subalansuotu druskos tirpalu (HSDT, angl. *Hanks Balanced*

*Salt Solution*, HBSS), GIBCO®, Life Technologies Limited, Inchinnan, JK) be  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Mg}^{2+}$ .

Naudojant chirurginį pincetą ir skalpelį, buvo pašalinamas širdį dengiantis jungiamasis audinys – perikardas ir kraujagyslių liekanos, atidalijami ir pašalinami prieširdžiai. Skalpelium širdys perpjaunamos skersai ir išilgai, išplaunami skilveliuose likę kraujo krešuliai. Miokardo gabaliukai buvo perkelti į naują Petri lėkštelę.

Naujoje lėkštelėje chirurginėmis žirkėmis širdis sukarpoma į smulkius audinio gabaliukus (< 1 mm dydžio) iš kurių, naudojant lenktą pincetą ir HBSS be  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Mg}^{2+}$  tirpalą, mechaniškai pašalinamos ir išplaunamos pasukutinės kraujo liekanos. Nuplauti širdies gabaliukai perkelti į mėgintuvėlį, kuriame yra resuspenduojami 3 ml HSDT be  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Mg}^{2+}$ . Mėgintuvėlis su resuspenduotais širdies gabaliukais centrifuguojamas 100 rpm (angl. *rates per minute*/apsukos per minutę)) × g 3 min. (Heraeus Multifuge X3 FR, Thermo Scientific, JAV).

Susidaręs supernatantas pašalinamas, o nuosėdos resuspenduojamos 4,5 ml tripsino – EDTA (2,5 proc.) (GIBCO®, Life Technologies Limited, Inchinnan, JK) ir 0,5 ml papaino (10 veikimo vienetų vienai širdėlei) (Sigma-Aldrich, Vokietija) tirpale (5 širdelėms iš viso bendras tūris apie 5 ml tirpalo). Gautas tirpalas su miokardo gabaliukais inkubuojamas +4 °C šaldytuve per naktį.

Kitą dieną po inkubacijos gauta ląstelių suspensija resuspenduojama su trimis skirtingo skersmens Pastero pipetėmis (Sigma-Aldrich, Vokietija). Gautas homogenatas centrifuguojamas 700 rpm × g 5 min. (Heraeus Multifuge X3 FR, Thermo Scientific, JAV). Po centrifugavimo susidaręs supernatantas nupilamas, o nuosėdos resuspenduojamos 5 ml DMEM-GlutaMAX (GIBCO®, Life Technologies Limited, Inchinnan, JK) ląstelių auginimo terpėje, kurioje papildomai įpilta 10 proc. filtruoto veršelio serumo (GIBCO®, Life Technologies Limited, Inchinnan, JK) ir penicilino-streptomicino tirpalo (10,000 VV/ml) (Sigma-Aldrich, Vokietija).

Per 40 μm porų skersmens sietelį, įstatytą į naują mėgintuvėlį, buvo filtruojama gauta ląstelių suspensija. Mikromėgintuvėlyje 20 μl gauto filtrato santykiu 1:1 sumaišomas su tripano mėlynuoju (Sigma-Aldrich, Vokietija). Paėmus 20 μl gauto tirpalo ir naudojant hemocitometrą bei šviesinį mikroskopą, apskaičiuojamas ląstelių skaičius turimoje 5 ml ląstelių suspensijoje pagal proporciją. Gauta kultūra buvo pakankamai homogeniška – auginant ląstelių kultūrą nustatytas didelis kardiomiocitų kiekis bendroje ląstelių suspensijoje – iki 84 proc. (S5 pav.).

Ląstelių kultūros grynumas buvo patikrintas šia procedūra. Į stiklinę kamerinę plokštelę („Lab-Tek II“, „Thermo Fisher Scientific“, JAV) pasėta

$2 \times 10^5$  ląstelių. Po inkubacijos ir kultivavimo iki 60–90 proc. susiliejimo visa terpė buvo pašalinta, o ląstelių kultūra 30 minučių fiksuota 4 proc. paraformaldehidu („Sigma-Aldrich“, JK), o po to praplauta fosfatinu buferiniu tirpalu (PBS). Po fiksacijos ląstelių kultūra 3 minutes pralaidi 0,4 proc. Triton X-100 („Thermo Fisher Scientific“, Kembridžas, JK), o po to du kartus praplauta PBS. Kardiomiocitų vizualizavimui naudojome širdies troponino T antikūną, anti-h/m/r, Vio® R667, REAfinity™ (Miltenyi Biotec, JAV), o po to naudojome imunofluorescencinį dažymą širdies troponinui T (cTnT) (praskiedimas 1:100; „Miltenyi Biotec“, JAV). Pirmiausia panaudojome širdies troponino T antikūną, anti-h/m/r, Vio® R 667, REAfinity™ (pseudoraudonos spalvos), kuris buvo praskiestas su PBS santykiu 1:100. Ląstelių kultūra buvo inkubuojama su antikūnu 10 minučių tamsoje kambario temperatūroje ir vėliau du kartus plaunama su PBS. Tada uždėjome imunofluorescencinį dažą širdies troponinui T praskiestą santykiu 1:100 naudojant PBS. Inkubuojamas 10 minučių tamsoje kambario temperatūroje ir du kartus plaunamas PBS. Galiausiai branduoliai buvo nudažyti Hoechst dažais („Thermo Fisher Scientific“, Kembridžas, JK). Imunofluorescenciniam dažui vizualizuoti naudojome raudonąjį lazerį, kurio sužadavimo bangos ilgio maksimumas buvo ties 640 nm, emisijos maksimumas buvo aptiktas apie 668 nm. Fluorescenciniai vaizdai buvo užfiksuoti naudojant „Zeiss Axio Observer Z1“ vaizdavimo sistemą („Zeiss“, White Plains, NY, JAV) ir vėliau analizuoti naudojant „ImageJ“ programinę įrangą (Nacionaliniai sveikatos institutai, Bethesda, MD, JAV). Kiekvienas matavimas buvo atliktas trimis egzemplioriais, kiekviename pakartojime padarant bent dešimt vaizdų. Kultūros ląstelės buvo suskaičiuotos kiekviename vaizde, o kiekviena ląstelių frakcija buvo išreikšta procentais.

### **Ekspimentiniai *in vitro* kardiomiocitų pažaidos ir apsaugos modeliai**

Mūsų tyrime buvo imituojamas fiziologinės H/R pažaidos modelis sukiant H/R ir ląstelių kultūroje naudojant „Baker Ruskin“ hipoksijos kamerą (Baker, JAV). Kruopščiai kontroliavome eksperimentines sąlygas nustatydami 37,0 °C temperatūrą (36,0 °C–37,0 °C diapazone), 70 proc. drėgmę (su apibrėžtu 64–76 proc. diapazonu), 2,0 proc. deguonies (O<sub>2</sub>) kiekį (nuo 1,0 proc. iki 3,0 proc.) ir 5,0 proc. anglies dioksido (CO<sub>2</sub>) kiekį (su priimtiniu 4–6 proc. diapazonu). Didžiąją dalį dujų mišinio hipoksijos darbo stotyje sudarė azoto dujos, sudarančios 93 proc. visų aplinkos dujų mišinio. Siekdami užtikrinti kokybę, kultūros terpę darbo stotyje paruošėme dieną prieš eksperimentą.

Eksperimento dieną pakeitėme terpę ląstelių kultūros lėkštelėse naudodami hipoksinę terpę H/R ląstelių grupei. Viena plokštelė buvo inkubuojama 48 valandas normoksinėmis sąlygomis, vadinamomis normoksijos grupe (N grupe). Tuo pačiu metu kita grupė buvo 24 valandas veikiamą hipoksijos, o po to 24 valandas reoksigenacijos normoksinėmis sąlygomis ir mūsų tyrime jie buvo priskirti išemijos/reoksigenacijos grupei (H/R grupė). Šis metodas leido mums efektyviai sukelti hipoksiją ir vėlesnę reoksigenaciją – modelinį H/R pažeidimą ląstelių kultūroje. Atlikę ląstelių gyvybingumo testą, įvertino me kelias tiriamų medžiagų grupes mūsų ląstelių kultūroje.

Siekiant įvertinti sintetinių nanodalelių ir natūralių nanopūslelių kardioprotekcinį efektyvumą, pirminė kardiomiocitų kultūra buvo suskirstyta į tiriamąsias ir kontrolines grupes. Visais atvejais ląstelių apdorojimas (paveikimas) tiriamomis medžiagomis buvo pradedamas likus 24 val. iki hipoksijos etapo pradžios, o nustatytas poveikis išlaikomas viso H/R ciklo metu (hipoksijos ir reoksigenacijos etapais). Mūsų darbe tiriamosios grupės buvo: PLGA-Cur ND: kurkuminu pakrautos PLGA nanodalelės (10 µg/ml darbinė koncentracija pagal veikliąją medžiagą) ir PLGA-vit. E ND: vitaminu E pakrautos PLGA nanodalelės (10 µg/ml darbinė koncentracija pagal veikliąją medžiagą). MO NP: vaistinės melisos nanopūslelės (pasirinkta 8 µg/ml koncentracija) pagal pūslelių baltymą remiantis preliminariais gyvybingumo atrankos tyrimais, aprašytais rezultatų skyriuje. Kontrolinės grupės. Laisvų medžiagų kontrolė: kardiomiocitai, veikiami DMSO ištirpintu kurkuminu arba vitaminu E (5 µg/ml koncentracija). Ši grupė naudota nanonešiklių efektyvumui palyginti su laisva vaisto forma. Tirpiklio kontrolė (0,1 % DMSO): naudota siekiant įvertinti tirpiklio, kuriame ruošiami laisvų medžiagų motininiai tirpalai, poveikį ląstelių bioenergijai ir gyvybingumui. Nešiklio kontrolė (tuščios PLGA ND): kardiomiocitai, veikiami vaistu nepakrautomis PLGA nanodalelėmis. Tuščių nanodalelių kiekis (masė) buvo tiksliai suvienodintas su polimero kiekiu, naudotu gaminant PLGA-Cur ir PLGA-vit. E preparatus. H/R kontrolė: negydytos ląstelės, paveiktos tik hipoksijos-reoksigenacijos ciklu.

Visų eksperimentų gauti duomenys lyginti su Normoksijos ir H/R kontrole (ląstelės, augintos standartinėmis sąlygomis be jokių papildomų intervencijų).

Pirmame tyrimo etape, siekiant imituoti imunometabolinį stresą, pirminės kardiomiocitų kultūros buvo veikiamos rekombinantiniu SARS-CoV-2 spyglio baltymo RBD epitopu (fragmentas 370–394; Sigma-Aldrich, Sent Luisas, MO, JAV). Remiantis preliminariais dozės-atsako tyrimais (pav.), poveikiui pasirinkta 100 ng/ml darbinė koncentracija. Ląstelės su RBD fragmentu buvo inkubuojamos 24 valandas prieš pradedant hipoksijos etapą, o šis poveikis išlaikomas per visą eksperimentą.

Ląstelės su RBD fragmentu buvo inkubuojamos 24 valandas normoksijos sąlygomis, o vėliau perkeltos į hipoksijos kamerą. Eksperimentinis H/R modelis (hipoksijos ir reoksigenacijos etapai, dujų mišinio sudėtis bei terpių keitimo tvarka) buvo realizuojamas laikantis detaliai aprašytų metodinių nurodymų. Tyrimo metu kardiomiocitai buvo suskirstyti į keturias eksperimentines grupes: Kontrolė (K) – ląstelės, augintos normoksijos sąlygomis; Spike (S): normoksijos sąlygomis augintos ląstelės, paveiktos 100 ng/ml RBD fragmentu. H/R Kontrolė: hipoksijos ir reoksigenacijos paveiktos ląstelės. H/R Spike: hipoksijos ir reoksigenacijos paveiktos ląstelės, papildomai stimuliuotos RBD fragmentu.

Pasibaigus reoksigenacijos etapui, visose grupėse buvo vertinamas ląstelių metabolinis aktyvumas, kontraktilinė funkcija, uždegiminių citokinių raiška bei mitochondrijų bioenergetikos parametrai naudojant Seahorse XFp analizatorių (*Agilent Technologies*, Santa Klara, CA, JAV).

### **Nanodalelių internalizacijos analizė**

15 × 10<sup>3</sup> ląstelės buvo dedamos į 35 mm konfokalines Petri lėkštes stikliniu dugnu („Nunc“, „Thermo Fischer Scientific“, JAV) ir kultivuojamos standartinėmis sąlygomis, kad ląstelės galėtų prisitvirtinti. Po inkubacijos ir kultivavimo iki 60–90 proc. susilieji mo ląstelių kultūrą apdorojome paruoštomis PLGA nanodalelėmis su 500 μl rodamino B, kurio koncentracija buvo: 100 μg/ml, inkubuojamos 24 valandas, o tada neinternalizuotos ND buvo pašalintos plaunant ląsteles PBS tirpalu. Branduoliai buvo nudažyti „Hoechst“ dažais („ThermoFisher Scientific“, Kembridžas, JK). ND pasisavinimo fluorescenciniai vaizdai buvo užfiksuoti naudojant „Zeiss Axio Observer Z1“ vaizdavimo sistemą, kurios sužadavimo maksimumas (emisijos maks.) buvo ties 545 nm ir emisijos maksimumas (emisijos maks.) – ties 566 nm („Zeiss“, Oberkochenas, Vokietija), o vėliau analizuoti naudojant „ImageJ“ programą.

### **Uždegiminių citokinių genų raiškos ir baltymų sekrecijos analizė**

Ląstelės buvo sėjamos į 12 šulinėlių lėkštes (2 × 10<sup>5</sup> ląstelių šulinėlyje) ir kultivuojamos iki 70–80 proc. susilieji mo. Eksperimentinis hipoksijos-reoksigenacijos (H-R) ciklas bei kardiomiocitų apdorojimas tiriamosiomis medžiagomis buvo atliekami laikantis standartinio protokolo, detaliai aprašyto Metodikoje. Po inkubacijos visos RNR ekstrahavimo procedūra buvo atlikta naudojant PureLink RNR mini rinkinį (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva) pagal gamintojo vadovą, o vienos grandinės cDNR buvo susintetinta naudojant High-Capacity cDNA Reverse Transcription rinkinį (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva). Interleukino 6 (*IL-6*), C-X-C motyvo chemokino

ligando 1 (*Cxcl1*), interleukino 1 beta (*IL-1 $\beta$* ), naviko nekrozės faktoriaus (*TNF*), branduolio faktoriaus kappa B faktoriaus 1 (*NF-kB1*) genų raiškos pokyčiams įvertinti buvo atlikta realiojo laiko kiekybinė PGR naudojant Power SYBR žaliają chemiją (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva). Glicerinaldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) genas buvo naudojamas kaip endogeninė kontrolė. Santykinės genų ekspresijos pokyčiai buvo normalizuoti naudojant nepaveiktas ląsteles ir jų vertės pateikiamos kaip kartotiniai pokyčiai.

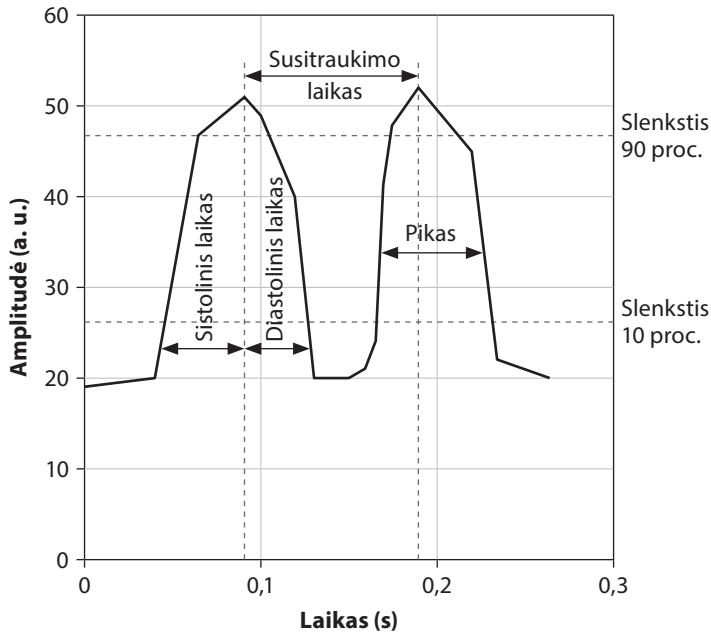
Uždegiminių žymenų gamyba buvo vertinta surinkus ląstelių kultūrų supernatantus. Citokinai IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius (GM-CSF) ir monocitų chemoatraktorius baltymas-1 (CCL2) buvo kiekybiškai įvertinti naudojant „Rat Custom ProcartaPlex Mix&Match 5-Plex Kit“ („Thermo Fisher Scientific“, Vilnius, Lietuva), o IL8 buvo kiekybiškai įvertintas naudojant „Rat ELISA Kit“ („Abnova Ltd.“, Kembridžas, JK). Visos procedūros buvo atliktos pagal gamintojų pateiktus protokolus. Atliekant daugybinį imunologinį tyrimą, ląstelių kultūrų supernatantai buvo inkubuojami su specifiniais antikūnais, prijungtais prie skirtingų mikrogranulių, tada šie kompleksai buvo žymimi antrais antikūnais su skirtingais fluorescenciniais zondais, o atsiradę fluorescencijos signalai buvo matuojami naudojant „Luminex® 100/200 xMAP“ prietaisą („Luminex Corporation“, Ostinas, Teksasas, JAV). Rezultatai buvo analizuojami naudojant „ProcartaPlex Analyst 1.0“ programinę įrangą („Affymetrix“, Santa Klara, Kalifornija, JAV). ELISA plokštelės optinis tankis esant 450 nm bangos ilgiui buvo matuojamas daugiamodžiu plokštelių skaitytuvu „Infinite 200 Pro M Nano Plex“ (Tecan, Männedorf, Šveicarija).

### **Ląstelių metabolinio aktyvumo ir kontraktilinės funkcijos analizė**

Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas naudojant „PrestoBlue™“ ląstelių gyvybingumo reagentą („Invitrogen™“, „Life Technologies Limited“, JK). Tai membranai pralaidus, netoksiškas ir rezurino pagrindu pagamintas tirpalas, dėl kurio gyvos ląstelės redukuoja nefluorescencinį rezuriną į labai fluorescencinį rezorufiną. Konversijos greitis yra tiesiogiai susijęs su ląstelių gyvybingumu; dėl to jis gali būti naudojamas kaip ląstelių sveikatos rodiklis siekiant tiksliai kiekybiškai įvertinti ląstelių gyvybingumą. Eksperimentas buvo atliktas pagal gamintojo protokolą. Pirmiausia ląstelės buvo pasėtos į dvi 96 šulinėlių plokšteles, kurių tankis buvo  $8 \times 10^4$  ląstelių /šulinėlį. Plokštelės buvo suskirstytos į atskiras eksperimentines grupes pagal apdorojimo terpę, įskaitant kontrolinę be jokių medžiagų poveikio, ir atskirai kontrolės su DMSO 0,1 proc. tirpalu ir tuščiom PLGA ND. Eksperimentinėse grupėse buvo įvairių medžiagų – DMSO+Cur 5  $\mu$ g/ml, DMSO+Cur 10  $\mu$ g/ml,

PLGA-Cur ND 5  $\mu\text{g/ml}$ , PLGA-Cur ND 10  $\mu\text{g/ml}$ , PLGA-vit. E ND 5  $\mu\text{g/ml}$ , PLGA-vit. E ND 10  $\mu\text{g/ml}$ , SARS-CoV-2 RBD, Melisų NP 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20  $\mu\text{g/ml}$ . Viena plokštelė buvo laikoma normoksijos sąlygomis, kita perkelta į 24 val. hipoksiją, po kurios sekė 24 val. reoksigenacija (tyrime vadinama reoksigenacijos grupe). Terpė šulinėliuose buvo pakeista po hipoksijos ir po 24 val. normoksijos. Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas praėjus 48 val. po ląstelių pasėjimo. Į kiekvieną 96 šulinėlių plokštelės šulinėlį buvo įpilta 10  $\mu\text{l}$  „PrestoBlue™“ reagento su 90  $\mu\text{l}$  ląstelių kultūros terpės. Tada plokštelė 30 min. buvo laikoma tamsoje 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos terpė buvo surinkta ir perkelta į nepermatomą juodą plokštelę fluorescencijos vertinimui daugiamodžiu plokštelių skaitytuvu „Infinite 200 Pro M Nano Plex“ (Tecan, Šveicarija) esant 560 nm (maksimalus sužadanimas) ir 590 nm (maksimalus emisijos) bangos ilgiams.

Norėdami įvertinti kardiomiocitų funkcionalumą, analizavome jų susitraukimo parametrus. Pirminės ląstelių kultūros buvo laikomos 5–7 dienas iki buvo pastebėti pirmieji susitraukimai. Kultūros 24 valandas buvo veikiamos atrinktomis skirtingų medžiagų koncentracijomis. Prieš vertinimą ląstelės buvo stimuliuojamos 0,1 mM adrenalino tirpalu (Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa, Lenkija) augimo terpėje 10 minučių 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos pirminės kardiomiocitų kultūros buvo tiriamos naudojant „Leica DMI1“ šviesos mikroskopą („Leica“, Vokietija) su 40 kartų didinimu siekiant užfiksuoti individualius kardiomiocitus. Susitraukimų vaizdo įrašai buvo įrašyti naudojant „Leica“ kamerų sistemą. Įrašyti vaizdo įrašai buvo analizuojami naudojant „MYOCYTER“ įskiepi „ImageJ“ programinei įrangai (1.52a versija), kaip aprašė Grune ir kt. [358]. Ląstelės, kuriose vyko susitraukimai, buvo pažymėtos, o jų amplitudės pokyčiai laikui bėgant buvo pavaizduoti grafike (2 pav.). Panašus kardiomiocitų funkcionalumo vertinimo metodas buvo naudojamas ankstesniame autoriaus tyrime [4].



**2 pav.** Miocitų skaitinių rezultatų grafikas

Amplitudė buvo dirbtinai padalyta slenksčiais ties 10, 20, 50 ir 90 proc., kiekvienam atpažintam susitraukimui. Jos rodo skirtumą tarp vietinių minimumų ir sekančių maksimumų. Atstumas tarp dviejų sekančių maksimumų lemia susitraukimo laiką. Siekdami išvengti per didelių nukrypimų, pasirinkome susitraukimo laiką vertinti nuo 10 proc. iki 90 proc. amplitudės slenksčio (tiek sistolinės, tiek diastolinės). Be to, programa leidžia matuoti maksimalias amplitudes ir susitraukimų dažnį. Apibendrinti grafiniai vaizdai buvo sukurti naudojant „GraphPad Prism 9.0.0“ („Dotmatics“, JAV).

### **Mitochondrijų reaktyviųjų deguonies molekulių gamybos ir kvėpavimo parametrų vertinimas**

Ląstelės buvo pasėtos į 24 šulinėlių plokšteles po  $15 \times 10^4$  ląstelių šulinėlyje. Po apdorojimo ir H/R ciklo ląstelės – ir kontrolinės, ir apdorotos DMSO+Cur 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tada su tuščiom PLGA ND, PLGA-Cur 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – buvo nudažytos 2  $\mu\text{M}$  koncentracijos dažais „MitoSox Red“ („Thermo Fisher Scientific“, Kembridžas, JK), kurie buvo laikomi 30 min. Vėliau skalaujami HBSS tirpale 37 °C temperatūroje 2 kartus ir po to vaizduojama „Olympus“ fluorescenciniu mikroskopu APX100 („Olympus“, Šveicarija). Antimicinas A (50  $\mu\text{M}$ ) buvo naudojamas 30 min. prieš ląstelių dažymą kaip teigiama kontrolė. Ląstelių fluorescencijos intensyvumas buvo matuojamas naudojant

„Olympus cellSens“ programinę įrangą ir pasirenkant ląstelių ploto segmentaciją iš fono funkcijos. Kiekvienas matavimas buvo atliktas tris kartus kiekvienam pakartojimui padarant bent 10 vaizdų, kurie vėliau buvo analizuojami naudojant „ImageJ“ programinę įrangą (Nacionaliniai sveikatos institutai, Bethesda, MD, JAV).

Kardiomiocitų mitochondrijų kvėpavimo parametrai buvo vertinami realiu laiku naudojant „Seahorse XFp“ analizatorių ir komercinį rinkinį „Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit“ („Agilent Technologies“, JAV). Ląstelės buvo sėjamos į specializuotas plokšteles ( $5 \times 10^4$  ląst./šulinėlyje) ir kultivuojamos 4–5 dienas iki 60–90 proc. susiliejiimo. Prieš tyrimą ląstelės 24 valandas buvo apdorojamos tiriamosiomis medžiagomis (PLGA-Cur, PLGA-vit. E, MO NP) bei atitinkamomis kontrolėmis laikantis aprašyto H/R protokolo. Mitochondrijų funkcijai charakterizuoti buvo atliekamas „Mito Stress Test“ protokolas, per kurį į šulinėlius nuosekliai įterpiami trys kvėpavimo grandinės modulatoriai. Galutinės šių medžiagų koncentracijos šulinėlyje siekė: 1,5  $\mu\text{M}$  oligomicino, 2  $\mu\text{M}$  FCCP, 0,5  $\mu\text{M}$  antimicino A ir 0,5  $\mu\text{M}$  rotenono. Šiais modulatoriais buvo diferencijuotas deguonies suvartojimo greitis (DSG, angl. *oxygen consumption rate*, OCR) pagal specifinius bioenergijos parametrus. Pirmiausia buvo suleidžiamas oligomicinas – blokuodamas ATP sintazę, jis leido įvertinti mitochondrinę ATP produkciją bei nustatyti protonų nuotėkį per vidinę membraną. Toliau buvo leidžiamas FCCP, ši medžiaga išsklaidė mitochondrijų membranos potencialą ir leido nustatyti maksimalų mitochondrijų kvėpavimo pajėgumą bei įvertinti ląstelės energijos rezervą stresui įveikti (laisvąjį kvėpavimo pajėgumą). Galiausiai buvo panaudotas Antimicinas A ir rotenonas – šios medžiagos visiškai nuslopino I ir III kvėpavimo grandinės kompleksų veiklą ir leido įvertinti su mitochondrijomis nesusijusią (nemitochondrinę) deguonies suvartojimo frakciją.

Gautos DSG vertės buvo normalizuotos pagal bendrą ląstelių baltymų kiekį, nustatytą Bradfordo metodu. Šis procesas apėmė ląstelių baltymų reakciją su Bradfordo reagentu („Sigma-Aldrich“, Hamburgas, Vokietija) ir vėlesnį optinio tankio matavimą 595 nm bangos ilgiu daugiamodžiu plokštelių skaitytuvu „Infinite 200 Pro M Nano Plex“ („Tecan“, Männedorfas, Šveicarija).

Individualių tyrimų ataskaitos sugeneruotos naudojant „Wave 2.6.1“ programinę įrangą („Agilent Technologies“, Santa Klara, CA, JAV). Galutiniam duomenų apdorojimui, statistinei analizei ir grafiniam vaizdavimui naudota „GraphPad Prism 9.0.0“ („Dotmatics“, Bostonas, MA, JAV) programa.

## Statistiniai metodai

Kiekybiniai rezultatai pateikiami kaip 3–6 pakartojimų vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis. Statistinė duomenų analizė atlikta taikant dvifaktoriinį Stjudento t-testą, ANOVA arba neparametrinį Mann-Whitney U testą. Skirumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ . Duomenys apdoroti ir statistinė analizė apdorota naudojant „GraphPad Prism 9.0.0“ („Dotmatics“, Bostonas, Masačusetsas, JAV), „Excel 2021“ ir „Agilent Seahorse Analytics“ programinę įrangą.

# REZULTATAI

## Sintetinių polimerinių nanodalelių fizikinių ir cheminių savybių vertinimas

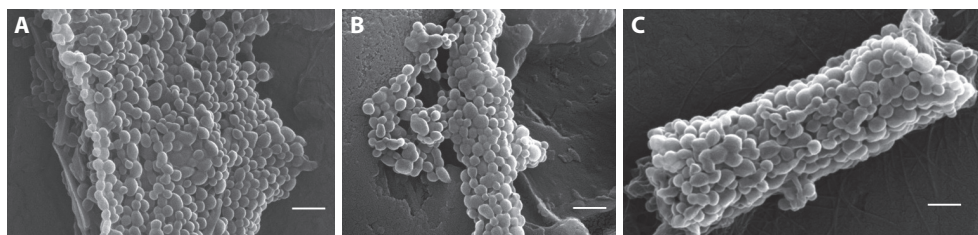
Šiam darbui Turkijos Acibadem universitete buvo pagamintos tuščios ir vaistais pakrautos PLGA ND. Nanodalelių dydis buvo pakankamai pastovus ir svyravo nuo 204,2 iki 231,4 nm. Visų nanodalelių polidispersiškumo indekso (PDI) vertės buvo mažesnės nei 0,188. Tai rodo gerą dalelių vienalytiškumą (monodispersiškumą), būtiną siekiant užtikrinti jų stabilią cirkuliaciją kraujotakoje. Tuščių ir vaistais pakrautų ND paviršiaus krūviai buvo neigiami: tarp  $-6,50 (\pm 0,239)$  ir  $-12,4 (\pm 0,31)$  mV. Taip pat nustatyta, kad PLGA-RhB ND paviršiaus krūvis buvo neigiamas. PLGA-Cur ND ir PLGA-vit. E ND vaisto IE (Inkapsuliacijos Efektyvumas) buvo atitinkamai 51,2 proc. ir 78,1 proc. Galiausiai buvo išmatuota RhB koncentracija nanodalelėse, patvirtinanti, kad PLGA-RhB ND yra pakankamai RhB vizualizavimui (1 lentelė).

### 1 lentelė. ND charakterizavimo rezultatai

ND	Dalelių dydis (nm)	PDI	Paviršiaus krūvis (mV)	Bendra vaisto koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vaistų IE (proc.)	RhB koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )
PLGA	$219,5 \pm 12,3$	0,186	$-7,11 \pm 1,79$	–	–	–
PLGA-Cur	$231,4 \pm 11,2$	0,176	$-12,4 \pm 0,31$	128,0	$51,2 \pm 2,31$	–
PLGA-vit. E	$223,7 \pm 10,2$	0,174	$-9,94 \pm 2,23$	156,6	$67,8 \pm 3,68$	–
PLGA-RhB	$291,0 \pm 10,2$	0,188	$-24,3 \pm 1,12$	–	–	682,8

Lentelėje nurodyti sintetinių ND parametrai. Dydis nanometrais, PDI (polidispersiškumo indeksas), paviršiaus krūvis (mV), išmatuota pakrauto į ND vaisto koncentracija, IE – pakrovimo efektyvumas.

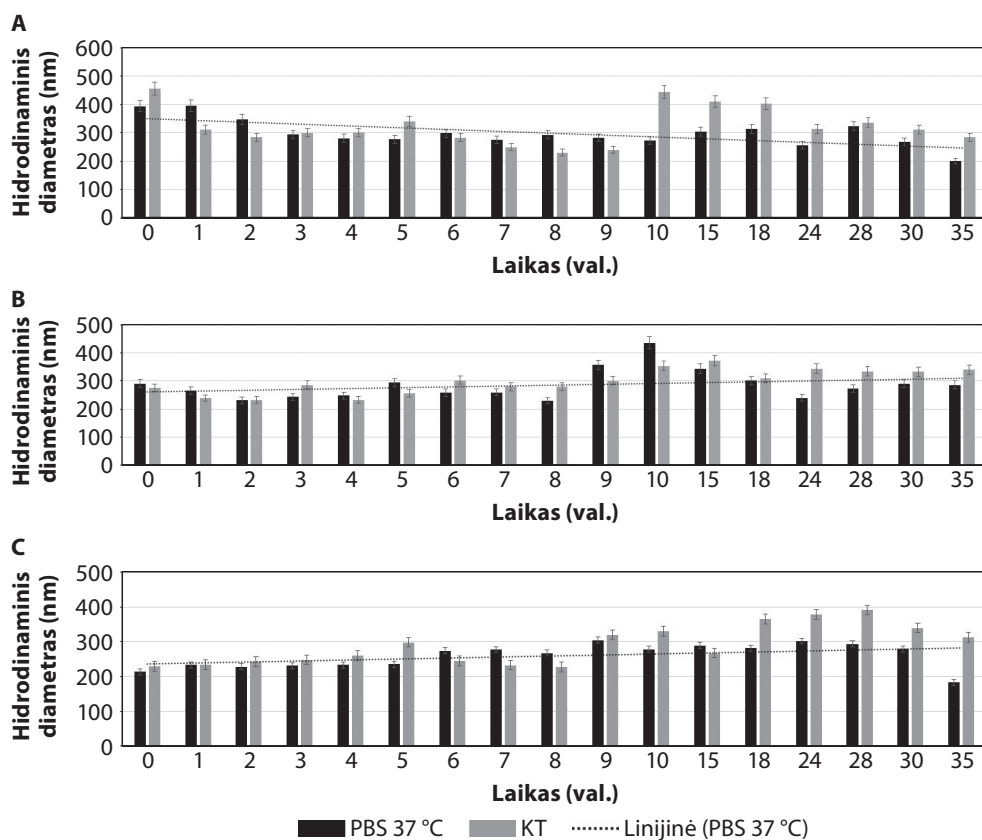
Susintetintų ND paviršiaus morfologija buvo analizuojama naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM) – visos ND pasižymėjo lygia ir apvalia struktūra (3 pav.).



**3 pav.** Pagamintų ND morfologinė analizė naudojant SEM

(A) tuščios PLGA nanodalelės; (B) PLGA nanodalelės, pakrautos kurkuminu; (C) PLGA nanodalelės, pakrautos vitaminu E. Mastelis – 400 nm.

ND stabilumas pavaizduotas (4 pav.).

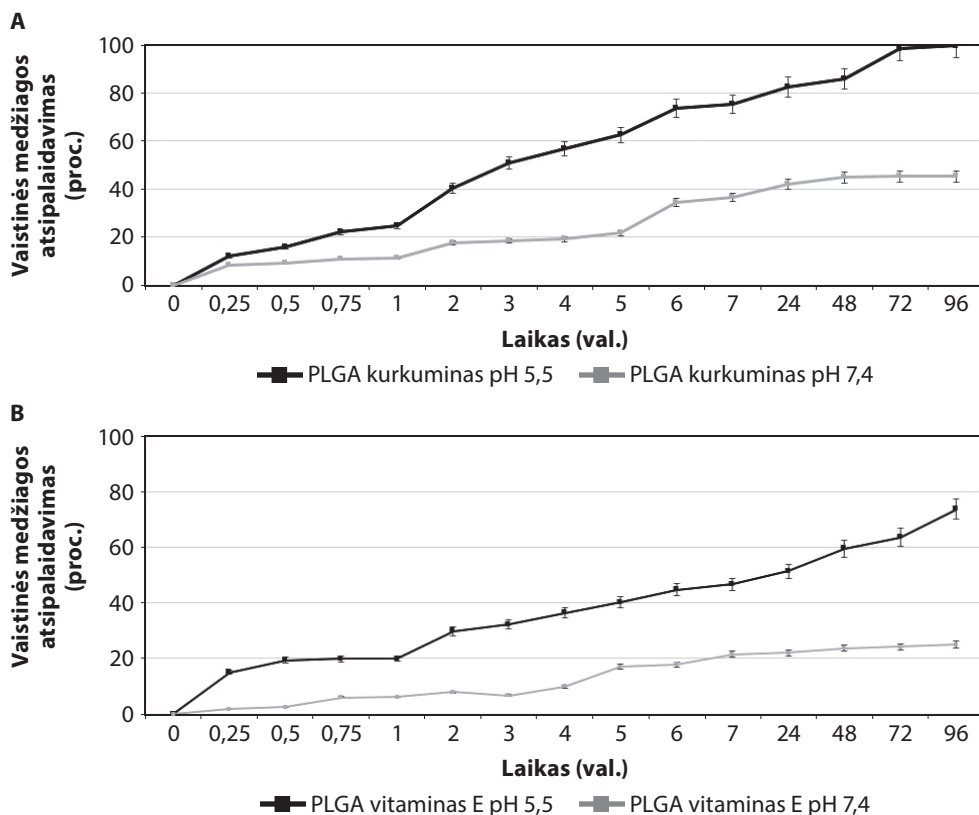


**4 pav.** Nanodalelių stabilumo analizė

(A) Tuščios PLGA nanodalelės; (B) PLGA nanodalelės, pakrautos kurkuminu; (C) PLGA nanodalelės, pakrautos vitaminu E (n = 3).

Statistinė duomenų analizė visais atvejais parodė statistiškai nereikšmingus skirtumus ( $p > 0,05$ ); tai patvirtino didelį susintetintų nanodalelių stabilumą tyrimo laikotarpiu. Per pirmas inkubacijos minutes visoms ND buvo nustatyti tam tikri dydžio svyravimai dėl momentinio PBS tirpalo poveikio. Be to, buvo pasiekta, kad ND užpildymas hidrofobinėmis vaistinėmis molekulėmis, kurkuminu arba  $\alpha$ TCP padidino jų stabilumą, nes hidrofilineje aplinkoje ND struktūra tapo tvirtesnė lyginant su tuščiomis ND.

Kurkumino išsiskyrimo iš PLGA-Cur ND ir vitamino E išsiskyrimo iš PLGA-vit. E ND greičiai buvo analizuojami ir pH 7,4 PBS, ir pH 5,5 acetato buferiniame tirpale. Mėginiai buvo renkami iš išsiskyrimo terpės nustatytais laiko intervalais, o vaisto išsiskyrimo (proc.) ir laiko (val.) grafikai buvo sudaryti nuo 0 iki 110 val. naudojant matavimus, gautus LC/MS-MS prietaisu (5 pav.). Po 110 valandų inkubacijos beveik 100 proc. kurkumino buvo išsiskyre iš PLGA-Cur ND, kai pH buvo 5,5, bet pH esant 7,4, tik apie 45 proc. vaisto buvo išsiskyre iš ND apvalkalo. Be to, iš vitaminu E pripildytų ND beveik 75 proc. vaisto buvo išsiskyre iš PLGA-vit. E ND, kai pH buvo 5,5, o tik apie 25 proc. buvo išsiskyre esant pH 7,4 po 110 valandų inkubacijos. Gauti vaistų atpalaidavimo profiliai rodo, kad vaistų atpalaidavimas iš nanodalelių buvo greitesnis esant rūgštinei aplinkai, kurios pH buvo 5,5 lyginant su normaliomis sąlygomis, kai pH buvo 7,4.



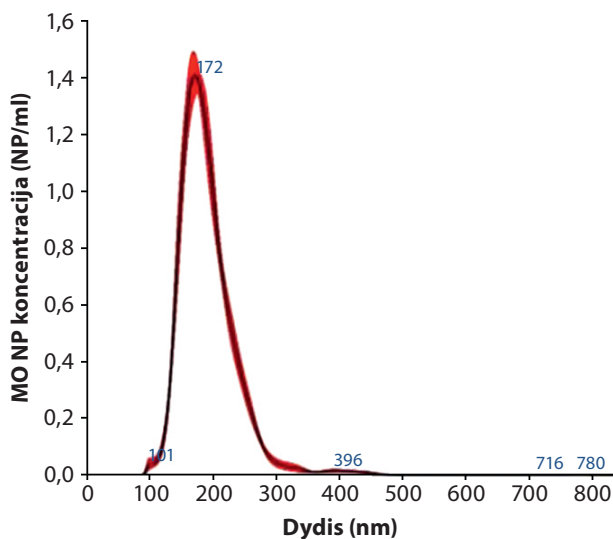
**5 pav.** ND išsiskyrimo profiliai po inkubacijos pH 7,4 PBS ir pH 5,5 acetato buferiniame tirpale tam tikrais laikotarpiais 0–110 val. intervale.

(A) PLGA-Cur ND; (B) PLGA-vit. E ND (n = 3).

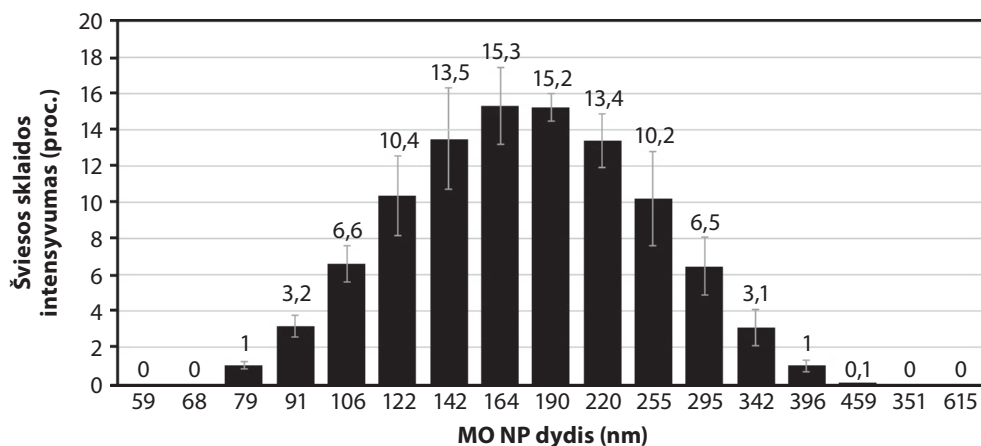
### Vaistinės melisos nanopūslelių morfologinė ir biofizikinė charakteristika

MO NP fizikinių savybių analizė parodė, kad preparatas pasižymi nanopūslelėms būdingais parametrais. NTA analizės metu nustatytas dominuojantis nanopūslelių hidrodinaminis skersmuo (moda) siekė 172 nm, o bendras vidurkis – 191,3 nm (6, 7 pav.).

Siekiant užtikrinti tikslų medžiagos dozavimą ląstelių kultūroje, buvo nustatyta bendra MO NP preparato baltymų koncentracija. Eksperimentų metu ląstelių apdorojimui naudota 8 μg/ml MO NP koncentracija (skaičiuojant pagal bendrą pūslelių baltymą); tas atitinka maždaug  $2,77 \times 10^{10}$  ( $\pm 3,25 \times 10^8$ ) dalelių/ml. Toks dvigubas charakterizavimas (pagal masę ir skaičių) leido mokliškai pagrįsti pastebimą dozės ir atsako ryšį bei palyginti gautus rezultatus su kitomis nanotransporto sistemomis.



**6 pav.** Nanosekimo analize nustatytas melisų nanopūslelių dydžio pasiskirstymas mėginyje ( $n = 3$ )



**7 pav.** Dinaminio šviesos išsklaidymo analize nustatytas melisų nanopūslelių dydis ( $n = 3$ )

Skaičiai viršuje – nanopūslelių skaičius  $\times 10^{10}$ .

**2 lentelė.** Melisų nanopūslelių charakteristika

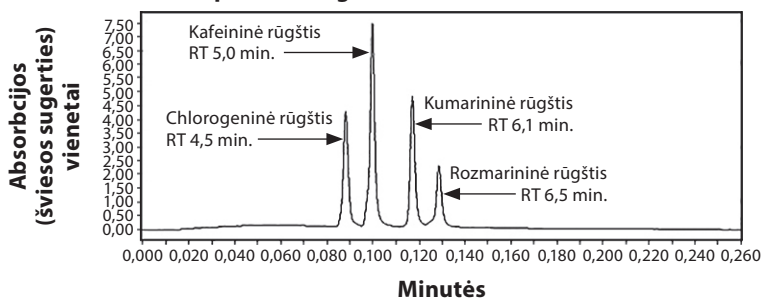
Parametras	Rezultatas
NP baltymo kiekis	372,28 ± 47,26 µg/ml
NP dydis, NTA	191,3 ± 0,6 nm

Baltymo kiekis nustatytas Bradford metodu. Nanopūslelių dydis vertintas panaudojant NTA – nanodalelių sekimo analize.

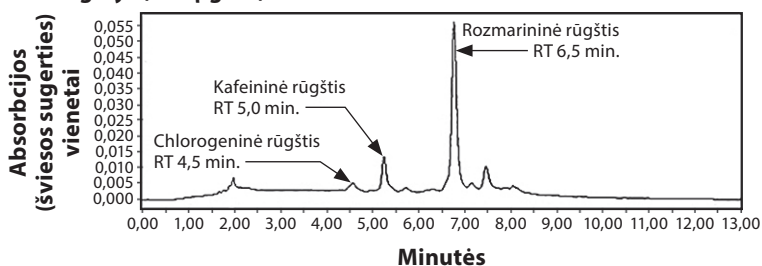
## Melių nanopūslelių cheminės sudėties analizė

Standartiniai veikliųjų medžiagų tirpalai parodė, kad sulaikymo trukmė (ST) kofeino rūgščiai – 5,0 min., chlorogeninei rūgščiai – 4,5 min., p-kumaro rūgščiai – 6,1 min., rozmarino rūgščiai (RR) – 6,5 min. (8 pav. A). MO NP preparate buvo kokybiškai nustatyti pikai, atitinkantys chlorogeninės, kofeino bei rozmarino rūgščių sulaikymo laikus (8 pav. B). RR bei kofeino rūgštys taip pat buvo kiekybiškai įvertintos mėginyje, o chlorogeninės rūgšties kiekis preparatuose buvo mažesnis negu kiekybinio nustatymo riba ( $< 3 \mu\text{g/ml}$ ). Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad iš MO išskirtose nanopūslelėse yra  $248,8 \pm 35 \mu\text{g}$  RR bei  $12,2 \pm 6 \mu\text{g}$  kofeino rūgšties viename mg MO NP mėginio baltymo. Taip pat buvo aptikti chlorogeninės rūgšties pėdsakai.

**A** Standartiniai tirpalai (0,1 mg/ml)



**B** Mėginys (200  $\mu\text{g/ml}$ )



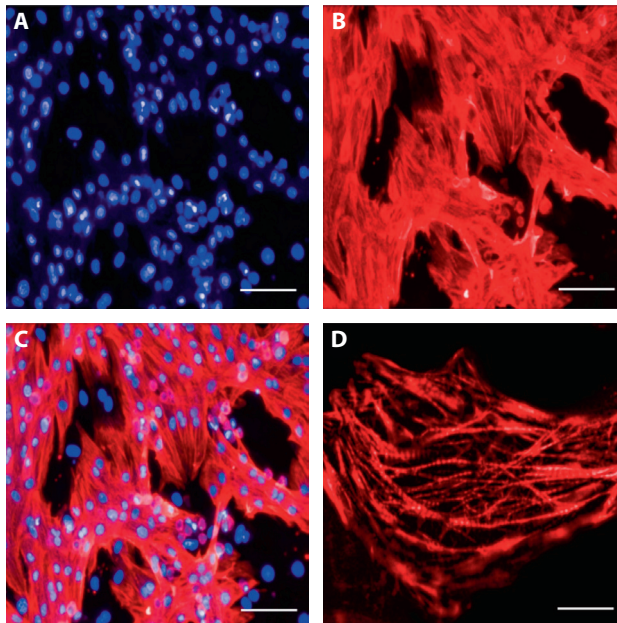
**8 pav. Chromatogramos**

(A) Standartiniai tirpalai (0,1 mg/ml); (B) MO NP mėginys (200  $\mu\text{g/ml}$ ).

## Kardiomiocitų kultūros charakterizavimas ir nanodalelių internalizacija

Norint sėkmingai vaistą perduoti, reikia, kad ND galėtų patekti į ląstelės vidų. Siekdami įvertinti PLGA ND patekimą į pirminės kardiomiocitų kultūros ląsteles, kaip pavyzdį naudojome komerciškai prieinamas PLGA ND, kurios kovalentiškai konjuguotos su Rodaminu B (PLGA-RhB). Kalibravimo

kreivė (S3 pav.). Plataus lauko fluorescencinės mikroskopijos metu gauti vaizdai patvirtino, kad po 24 valandų inkubacijos laikotarpio ši fluorescencinė medžiaga pateko į ląsteles, daugiausia citoplazmoje ir perinukleariniuose regionuose (S4 pav.). Šie duomenys leido įvertinti galimą PLGA polimero pasisavinimo pajėgumą naudojant PLGA-Cur ND arba PLGA-vit. E ND. Po to patvirtinome savo ląstelių modelį. Imunofluorescencinė analizė patvirtino, kad pirminės kardiomiocitų kultūros dominuojančios ląstelės buvo kardiomiocitai ( $84,3 \pm 5,2$  proc.) (S5 pav.), pasižymintys kardiomiocitams būdingomis dryžuotomis sarkomerinėmis struktūromis, patvirtinančiomis kultūros tinkamumą mūsų ląsteliniam modeliui (9 pav.).



**9 pav.** Pirminės kardiomiocitų kultūros patvirtinimas ir ląstelių nuotraukos, padarytos su plataus lauko fluorescenciniu mikroskopu

(A) Ląstelių branduoliai, nudažyti Hoechst dažais (mėlyna spalva); (B) ląstelės, nudažytos širdies troponinu T (cTnT, raudona spalva); (C) sujungtos nuotraukos, patvirtinančios didelį kardiomiocitų kiekį kultūroje; (D) padidintas vaizdas, kuriame matyti kardiomiocitams būdingos dryžuotos sarkomerinės struktūros. Mastelio juostos: 100  $\mu$ m (A–C); 20  $\mu$ m (D).

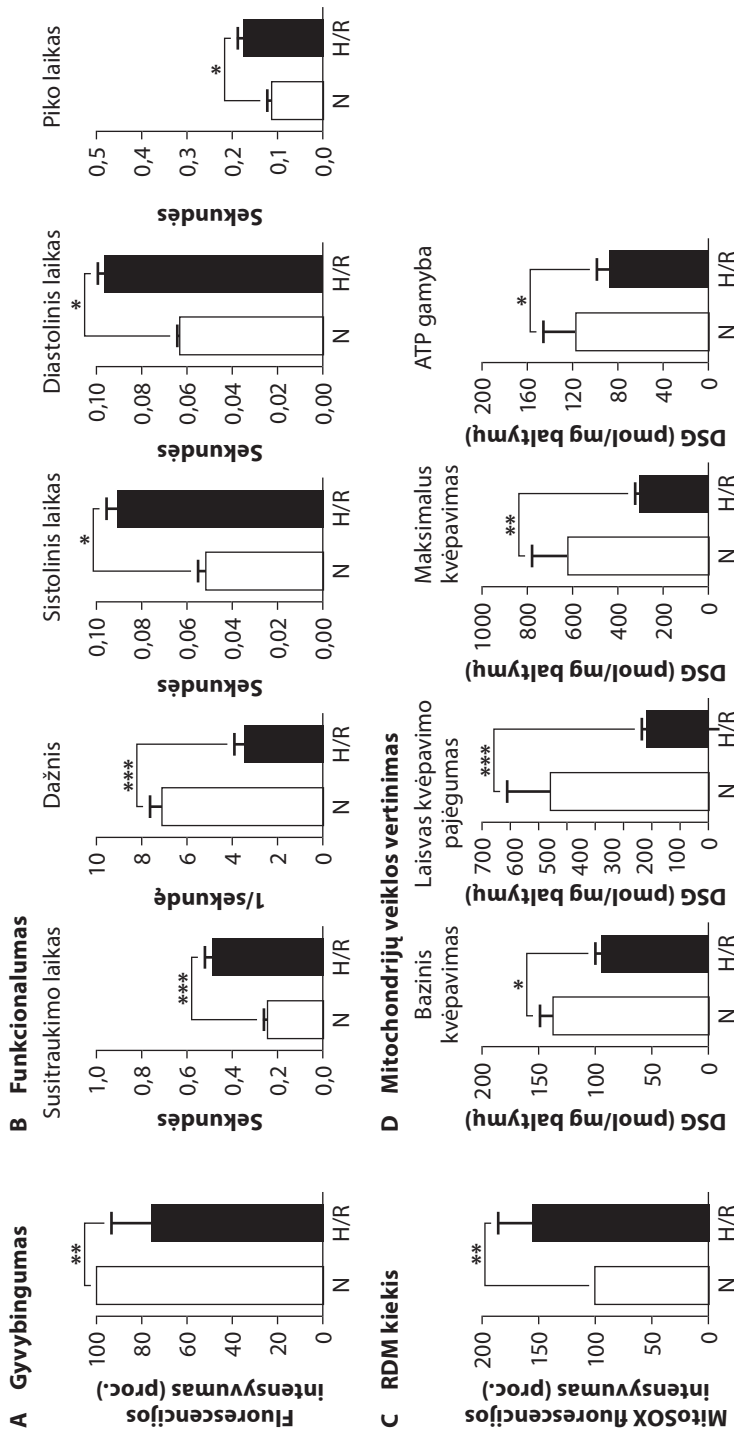
## Kardiomiocitų hipoksinės-reoksigenacinės pažaidos *in vitro* modelio įvertinimas

Prieš pradėdant vertinti apsauginių nanotransporto sistemų poveikį, buvo atlikta *in vitro* H/R modelio validacija. Šio etapo tikslas – nustatyti, ar parinktos eksperimentinės sąlygos sukelia kardiomiocitams būdingą funkcinę ir bioenerginę pažaidą, kuri taptų baziniu atskaitos tašku tolesniems tyrimams.

Gauti duomenys patvirtino, kad modeliuojama H/R pažaida sukelia žymų kardiomiocitų funkcinį nepakankamumą. Nustatytas plakimo dažnio sumažėjimas ir sistolės bei diastolės trukmės prailgėjimas (10 pav. B) rodo sutrikusią kalcio jonų ( $Ca^{2+}$ ) homeostazę bei kontraktilinių skaidulų jautrumo sumažėjimą; tas tiesiogiai koreliuoja su ūminiu ląstelių kontraktiliniu nepakankamumu. Šie funkciniai nuokrypiai sutapo su reikšmingu ląstelių metabolinio aktyvumo sumažėjimu (10 pav. A).

Siekiant įvertinti kardiomiocitų bioenerginį stabilumą, buvo atlikta mitochondrijų kvėpavimo analizė realiu laiku. Nustatyta, kad H/R pažaida sukelia sisteminį mitochondrijų funkcijos slopinimą visuose matavimo etapuose (10 pav. D).

Statistiškai reikšmingai sumažėjęs bazinis kvėpavimas rodo sumenkusį kardiomiocitų gebėjimą užtikrinti energijos poreikį net ir ramybės būsenoje. Dar ryškesnis nuosmukis pastebėtas vertinant maksimalų kvėpavimą (po FCCP priedo), rodantį didžiausią įmanomą mitochondrijų deguonies suvartojimo pajėgumą esant metaboliniam stresui. Rezultatai atskleidė, kad H/R grupėje kardiomiocitų laisvasis kvėpavimo pajėgumas (angl. *spare respiratory capacity*) yra beveik visiškai išekvotas. Tai kritinis rodiklis, rodantis, kad ląstelės nebeturi energijos rezervo prisitaikyti prie padidėjusio krūvio ar tolesnio oksidacinio arba imunometabolinio streso.



**10 pav.** *In vitro* hipoksinio-reoksigenacinio pažeidimo modelio įvertinimas

Palyginti su normoksija (N), H/R reikšmingai (A) sumažino ląstelių metabolinį aktyvumą, (B) sutrikdė susitraukimo greitį ir dažnį, (C) padidino mitochondrijų ROS kiekį ir (D) slopino mitochondrijų kvėpavimą. Duomenys pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  SD (n = 3). Statistinis reikšmingumas nustatytas pagal Student t testą. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

## **SARS-CoV-2 fragmento įtaka kardiomiocitų gyvybingumui, funkinei ir imunometabolinei būklei**

Nustačius bazinį H/R pažaidos mastą, kitame etape siekta įvertinti kardiomiocitų jautrumą H/R veikiant kartu su SARS-CoV-2 RBD fragmentu. Nustatyta, kad RBD fragmentų pažaida padidėja H/R sąlygomis. Nors normoksijoje taip pat pastebėtas RBD poveikis, bet H/R fone jis sukėlė didesnę mitochondrijų kvėpavimo slopinimą bei padidino prouždegiminių citokinų sekreciją.

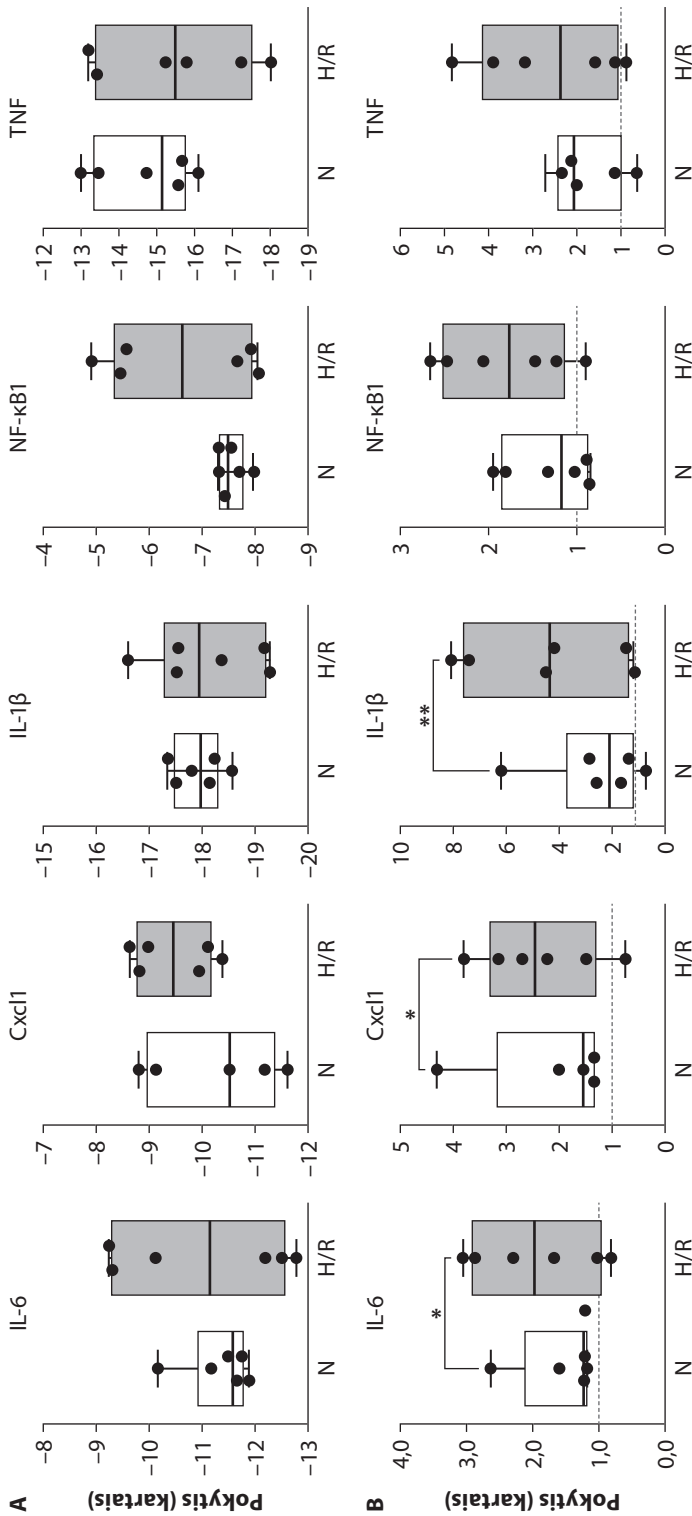
Tyrimai parodė, kad kardiomiocitų mitochondrijos yra kritinis taikynys, kurį pažeidžia H/R ir RBD sukeltas stresas. Tai pagrindžia tolesnių tyrimų kryptį – kurti nanodalelėmis ir nanopūslelėmis praturtintas terapines priemones, orientuotas ne tik į bendrą antioksidacinę apsaugą, bet ir į specifinį mitochondrijų bioenergijos stabilumo užtikrinimą.

## **SARS-CoV-2 fragmento poveikis priešuždegiminių citokinų sekrecijai kardiomiocituose**

Siekiant nustatyti, ar kardiomiocitai tiesiogiai dalyvauja sukuriant „citokinų audrai“ būdingą aplinką, buvo įvertinta prouždegiminių mediatorių genų raiška ir jų sekrecija ir tarpląstelinė terpė.

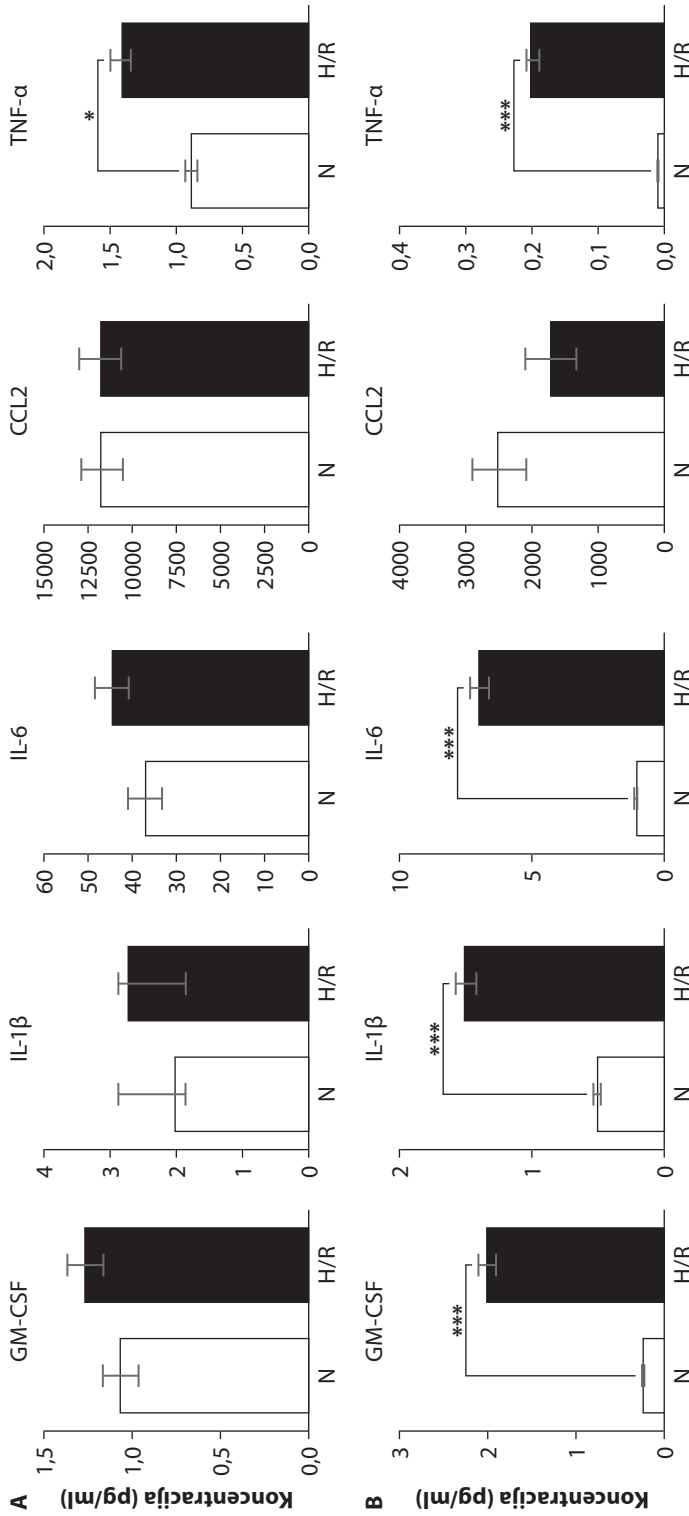
Pirmiausia nustatyta, kad H/R pažaida nesukelė statistiškai patikimo uždegiminių genų aktyvavimo: IL-6, Cxcl1, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B1 ir TNFmRNR kiekiai išliko artimi baziniam normoksijos lygiui (11 pav. A). Tai rodo, kad mūsų H/R modelis savaime nesuformuoja ryškaus uždegiminio fenotipo kardiomiocitų kultūroje.

Tačiau situacija iš esmės pasikeitė ląsteles papildomai stimuliuojant SARS-CoV-2 RBD fragmentu. Derinant virusinį stresą su H/R pažaida, buvo nustatytas patikimas uždegiminio atsako sustiprinimas (11 pav. B). Lyginant su atitinkama normoksijos grupe, H/R sąlygomis nustatytas statistiškai reikšmingas IL-6 (2,5 karto,  $p < 0,05$ ), Cxcl1 (2,6 karto,  $p < 0,05$ ) ir IL-1 $\beta$  (daugiau nei 4 kartus,  $p < 0,01$ ) mRNR kiekio padidėjimas. Nors NF- $\kappa$ B1 ir TNF raiškos pokyčiai nepasiekė statistinio reikšmingumo ribos, visgi pastebėta jų didėjimo tendencija. Šie duomenys patvirtina jungtinį H/R ir RBD poveikį, sukeltą uždegiminį atsaką kardiomiocituose.



**11 pav. Uždegiminių mediatorių mRNA raiškos pokyčiai pirminėje kardiomiocitų kultūroje**

(A) Lyginamoji analizė tarp normoksijos (N) ir hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) grupių be papildomų stresorių. Statistiškai reikšmingų raiškos pokyčių nenustatyta ( $p > 0,05$ ); (B) mRNA raiškos pokyčiai derinant H/R pažeidimą su pirminiu ląstelių paveikimu SARS-CoV-2 RBD fragmentu. Rezultatai pateikiami kaip santykinis pokytis (kartais) lyginant su atitinkama normoksijos grupe (normoksijos lygmuo pažymėtas punktyrine linija). Duomenys pateikiami kaip mediana su kvartiliais ( $n = 6$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su normoksija: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Mann-Whitney U test).



**12 pav. Prouždegiminių citokinų koncentracijos pokyčiai kardiomiocitų kultūros terpėje.**

Rezultatai gauti Luminex daugiakomponentės analizės metodu. **(A)** Kardiomiocitų sekrecija normoksijos (N) ir hipoksijos-reoksigenacijos (H-R) sąlygomis be papildomo stimuliavimo; **(B)** kardiomiocitų sekrecija normoksijos (N) ir H-R sąlygomis po pirminio ląstelių paveikimo SARS-CoV-2 RBD fragmentu. Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su atitinkama normoksijos grupe: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 (Stjudent t-testas).

Tyrimo duomenys parodė, kad H/R pažeidžia nesukelė ryškaus uždegimo mediatorių išsiskyrimo (12 pav. A). Nors buvo nustatytas statistiškai reikšmingas TNF- $\alpha$  koncentracijos padidėjimas (nuo 0,9 iki 1,4 pg/ml,  $p < 0,05$ ), tačiau kitų tirtų citokinų (GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2) kiekiai terpėje išliko stabilūs ir mažai skyrėsi nuo normoksijos lygio.

Situacija pasikeitė ląsteles papildomai stimuliuojant SARS-CoV-2 RBD fragmentu (12 pav. B). Paveikus ląsteles H/R pažeidžia, RBD fragmentas išprovokavo stiprią kardiomiocitų reakciją – buvo nustatyti žymūs GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6 ir TNF- $\alpha$  koncentracijų padidėjimai (visais atvejais  $p < 0,001$ ). Ypač ryškus poslinkis pastebėtas vertinant GM-CSF ir IL-6 kiekius, kurie H/R paveiktose ląstelėse padidėjo po kelis kartus lyginant su atitinkama normoksijos grupe. Šie duomenys patvirtina, kad virusinis stresorius ne tik aktyvuoja uždegiminių genų transkripciją, bet ir sukelia jų koduojamų funkcinių baltymų gamybą bei išskyrimą ir taip suformuoja lokalią uždegiminę mikroaplinką.

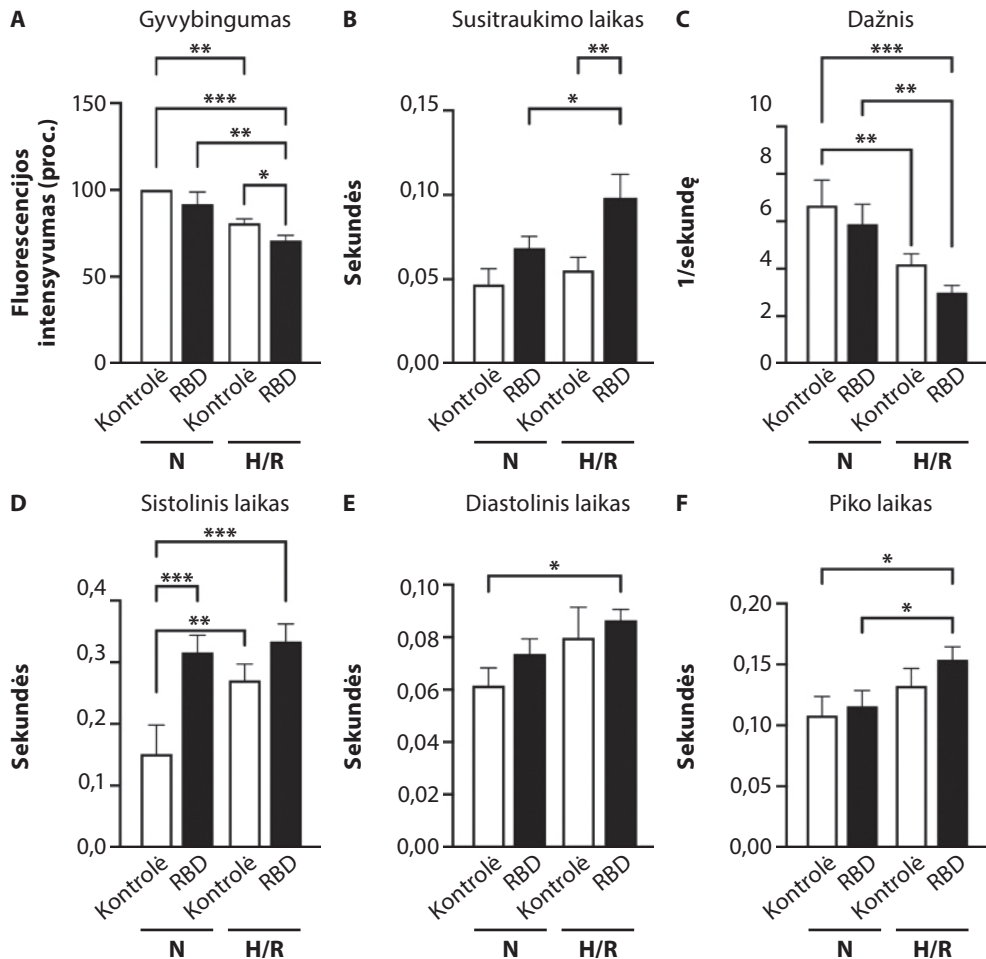
### **SARS-CoV-2 RBD fragmento efektas kardiomiocitų gyvybingumui ir kontraktiliškumui**

Siekiant nustatyti, kaip kompleksinis (virusinis ir metabolinis) stresas modifikuoja kardiomiocitų funkcinį pajėgumą, buvo vertinamas ląstelių gyvybingumas bei mechaninio susitraukimo parametrai.

Gyvybingumo tyrimas (13 pav. A) parodė jungtinį RBD fragmento ir H/R pažeidimo poveikį. Nustatyta, kad izoliuotas H/R poveikis kardiomiocitų gyvybingumą sumažino iki 80 proc. ( $p < 0,01$ ), tačiau H/R derinys su RBD fragmentu sukėlė dar didesnę nuosmukį – iki 70 proc. lyginant su normoksijos kontrole ( $p < 0,001$ ). Tai patvirtina, kad virusinis stresorius kritiškai dekompensoja ląstelių atsparumą hipoksinei pažeidai.

Kontraktilinės funkcijos vertinimas (13 pav. B–F) atskleidė ūminį kardiomiocitų mechaninį nepakankamumą. H/R sąlygomis RBD fragmentas statistiškai reikšmingai sulėtino ląstelių plakimo dažnį (13 pav. C) ir prailgino bendrą susitraukimo trukmę ( $p < 0,01$ , 13 pav. B).

Svarbiausi pokyčiai buvo užfiksuoti vertinant sistolės (13 pav. D) ir diastolės (13 pav. E) trukmes. RBD poveikis H/R fone lėmė patikimą sistolinės fazės prailgėjimą. Tačiau prailgėjusi diastolės trukmė ( $p < 0,05$ , 13 pav. E) bei piko laikas ( $p < 0,05$ , 13 pav. F) rodo galimai sutrikusią kalcio jonų ( $Ca^{2+}$ ) reabsorbciją į sarkoplazminį tinklą. Šie funkciniai nuokrypiai patvirtina, kad virusinis stresas sukelia kompleksinę kardiomiocitų disfunkciją, klinikinėje praktikoje pasireiškiančią mažėjančiu miokardo kontraktoliniu pajėgumu.



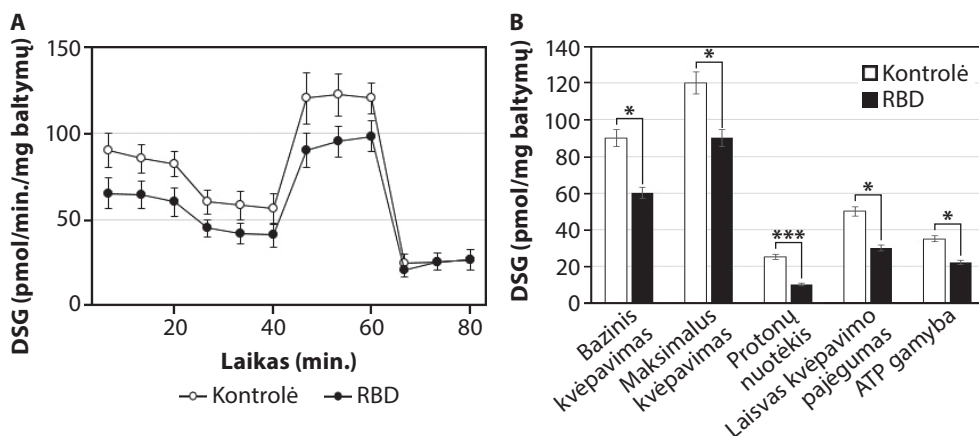
**13 pav.** SARS-CoV-2 RBD fragmento ir hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) įtaka kardiomiocitų gyvybingumui bei kontraktilinei funkcijai

(A) Ląstelių gyvybingumas (PrestoBlue testas) lyginant su normoksijos kontrole (100 proc.); (B–F) kardiomiocitų kontraktiniai rodikliai: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – Kontrolė, juodi stulpeliai – ląstelės, paveiktos 100 ng/ml RBD fragmentu. N – normoksija, H/R – hipoksija-reoksigenacija. Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (ANOVA su LSD *post-hoc* testu).

## Ūminis SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikis kardiomiocitų bioenergijai

Siekiant identifikuoti pirminius ląstelinės pažaidos mechanizmus, buvo vertinamas ūminis (3 val.) SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikis kardiomiocitų bioenerginiam funkcionalumui normoksijos sąlygomis. Šiuo tyrimo etapu siekta izoliuoti tiesioginį virusinio epitopo poveikį mitochondrijoms eliminuojant papildomą hipoksijos sukiamą stresą.

Seahorse Mito Stress testo duomenys parodė, kad trumpalaikis veikimas RBD fragmentu sukelia sisteminių mitochondrijų funkcijos slopinimą (14 pav. A). Lyginant su negydyta kontrole, RBD grupėje nustatytas statistiškai reikšmingai sumažėjęs bazinio kvėpavimas, lemiantis maždaug 30 proc. mažesnę mitochondrinę ATP produkciją ( $p < 0,05$ , 14 pav. B). Tai rodo, kad virusinis stresorius sutrikdo ląstelės energijos homeostazę dar nesant deguonies stygiaus.



**14 pav.** Ūminis (3 val.) SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikis kardiomiocitų bioenergetikai normoksijos sąlygomis

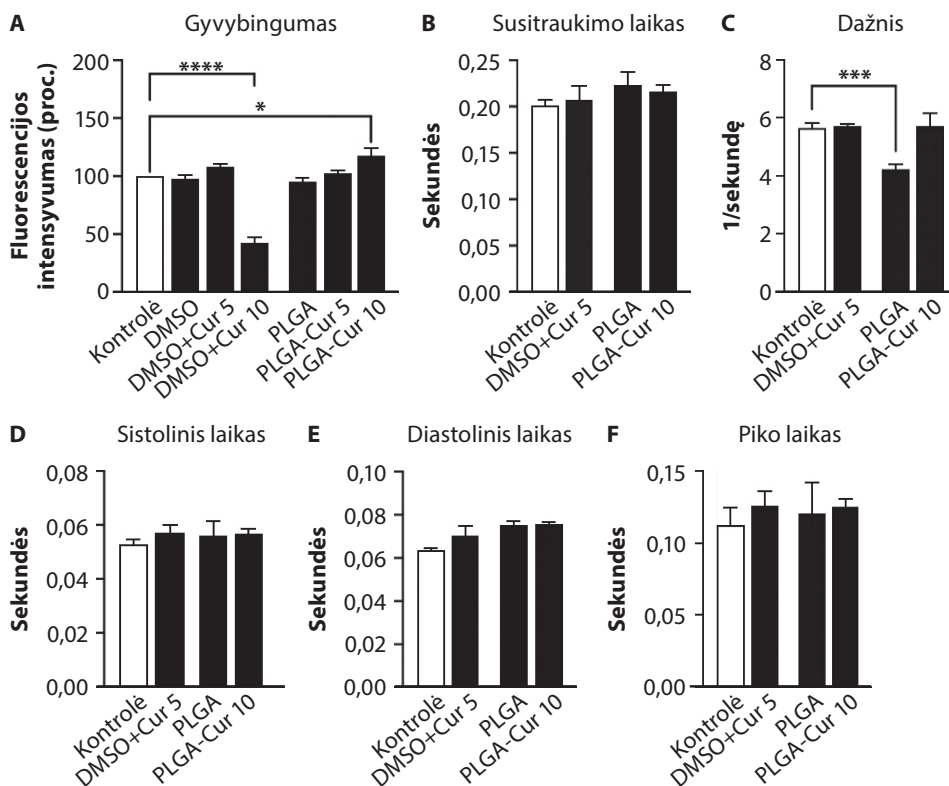
(A) Mitochondrijų deguonies suvartojimo greičio kreivė realiu laiku, gauta naudojant Seahorse XFp analizatorių. Parodomas kardiomiocitų atsakas į nuoseklų moduliatorių (oligomicino, FCCP bei antimicino A/rotenono) įterpimą. (B) Apskaičiuoti bioenerginiai parametrai: bazinis kvėpavimas (ramybės energija), maksimalus kvėpavimas (pajėgumas stresui), protonų nuotekis (membranos laidumas), laisvas kvėpavimo pajėgumas (energijos rezervas) ir ATP gamyba. Balti stulpeliai – negydyta Kontrolė, juodi – ląstelės, paveiktos 100 ng/ml RBD fragmentu. Duomenys normalizuoti pagal ląstelių baltymų kiekį (pmol/min./mg baltymų). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrole: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  (Stjudento t-testas).

Ypač ryškus nuosmukis nustatytas vertinant maksimalų mitochondrijų kvėpavimo pajėgumą ir laisvąjį kvėpavimo pajėgumą ( $p < 0,05$ ). Laisvasis pajėgumas, rodantis mitochondrijų gebėjimą adaptuotis prie padidėjusio energijos poreikio, RBD grupėje sumažėjo beveik du kartus. Be to, buvo nustatytas itin ryškus protonų nuotekio sumažėjimas ( $p < 0,001$ ), tiesiogiai indikuojantis bendrą elektronų pernašos grandinės aktyvumo sulėtėjimą ir mitochondrijų membranos funkcinio vientisumo praradimą. Šie rezultatai patvirtina, kad kardiomiocitai, veikiami RBD, praranda bioenerginę lankstumą, todėl tampa kritiškai pažeidžiami bet kokiems papildomiems patologiniams stimulams.

### **Nanodalelėse inkapsuliuoto kurkumino poveikis hipoksijos-reoksigenacijos sukeliama kardiomiocitų metaboliniam aktyvumui ir funkcijai**

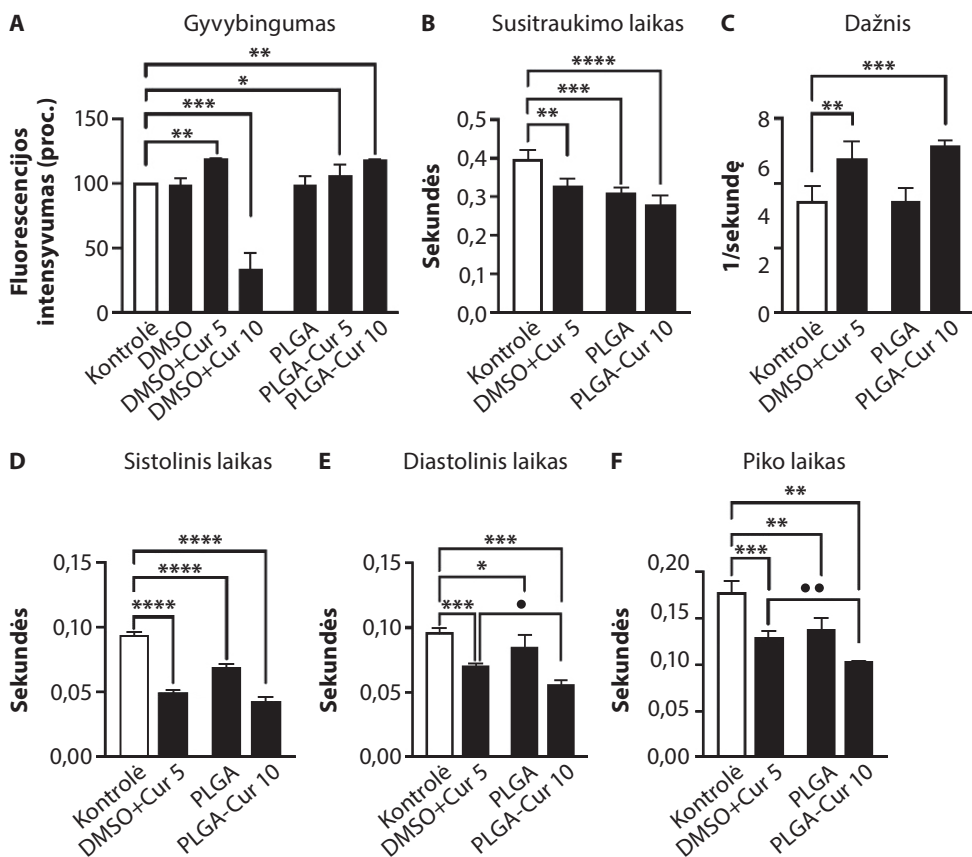
Šiame tyrime vertinome kardiomiocitų kultūros gyvybingumą, funkciją ir mitochondrijų kvėpavimą normoksijos ir H/R sąlygomis paveikus skirtingų koncentracijų PLGA-Cur bei DMSO+Cur medžiagomis.

Įvertinome kardiomiocitų gyvybingumą skirtingose grupėse normoksijos sąlygomis (15 pav. A) siekdami patikrinti naudojamų medžiagų ir junginių saugumą ir įrodyti, kad jie netoksiški kardiomiocitų kultūrai. Kontrolinės grupės gyvybingumas buvo laikomas 100 proc. Kontrolinė DMSO 0,1 proc. tirpiklio grupė neparodė reikšmingo neigiamo šio junginio poveikio normoksijos sąlygomis, kaip ir grupė, paveikta tuščiomis PLGA ND ( $p > 0,05$ ). Grupė, paveikta 5  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos DMSO+Cur, parodė panašų gyvybingumą lyginant su normoksijos kontroline grupe ( $p > 0,05$ ), tačiau grupė, gydyta 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos DMSO+Cur, parodė reikšmingai sumažėjusį gyvybingumą ( $p < 0,001$ ); tai rodo neigiamą šios medžiagos poveikį naudojant dideles dozes normoksijos sąlygomis.



**15 pav.** Sintetinių nanodalelių ir laisvų medžiagų poveikis kardiomiocitų gyvybingumui bei kontraktilinei funkcijai normoksijos sąlygomis

(A) Ląstelių metabolinis aktyvumas (PrestoBlue testas), išreikštas fluorescencijos intensyvumo procentais lyginant su negydyta kontrole; (B–F) kardiomiocitų kontraktiliniai parametrai: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – negydyta Kontrolė, juodi stulpeliai – tiriamieji preparatai (laisvas kurkuminas DMSO tirpale bei į PLGA nanodaleles inkapsuliuotas kurkuminas). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrole: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA su LSD *post-hoc* testu).



**16 pav.** Į PLGA nanodaleles inkapsuliuoto kurkumino (PLGA-Cur) apsauginis poveikis kardiomiocitų gyvybingumui ir kontraktilinei funkcijai hipoksijos-reoksigenacijos (H-R) sąlygomis

(A) Ląstelių metabolinis aktyvumas (PrestoBlue testas); (B–F) kardiomiocitų kontraktiniai rodikliai: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – negydyta H-R kontrolė, juodi stulpeliai – tiriamieji preparatai (laisvas kurkuminas bei nanodalelės). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrole: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001. Juodi apskritimai (●) rodo statistiškai patikimą skirtumą lyginant PLGA-Cur su atitinkama laisvos medžiagos (DMSO+Cur) grupe.

Lyginant su H/R kontroline grupe, kontrolinė DMSO grupė neparodė statistiškai reikšmingo gyvybingumo skirtumo (p > 0,05, 16 pav. A). Paveikus su 5 µg/ml koncentracijos DMSO+Cur, buvo gautas statistiškai reikšmingas gyvybingumo padidėjimas – 20 proc. lyginant su H/R kontroline grupe (p < 0,01); tai rodo apsauginį poveikį nuo H/R sukeltos ląstelių pažaidos. Paveikus kardiomiocitų kultūrą PLGA-Cur, kurio koncentracija buvo

10 µg/ml, taip pat pavyko išlaikyti didesnę gyvybingumą – iki 20 proc., o skirtumas lyginant su H/R kontroline grupe, taip pat buvo reikšmingas ( $p < 0,01$ ). Kaip ir normoksijos grupėje poveikis 10 µg/ml koncentracijos kurkuminu lėmė žymų gyvybingumo sumažėjimą – daugiau nei du kartus ( $p < 0,001$ ) – ir vėl įrodė neigiamą laisvo kurkumino boliusinės dozės poveikį net ir esant H/R pažaidai. Panaudojus tuščias PLGA ND, nebuvo statistiškai reikšmingo gyvybingumo išsaugojimo kardiomiocitų kultūroje, o PLGA-Cur 5 µg/ml turėjo statistiškai reikšmingą ( $p < 0,05$ ), bet mažesnę teigiamą poveikį nei PLGA-Cur 10 µg/ml kardiomiocitų gyvybingumui. Gydytas PLGA kurkuminu 10 µg/ml padidino gyvybingumą lyginant su H/R kontroline grupe. Skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,001$ ) ir rodantis apsauginį poveikį nuo H/R sukeltos ląstelių mirties. Nagrinėdami šiuos rezultatus tolesniuose eksperimentuose, ląstelių kultūroms paveikti naudojome DMSO+Cur 5 µg/ml ir PLGA-Cur 10 µg/ml koncentracijų dozes, kurios suveikė efektyviausiai. Eksperimentuose naudotų tuščių PLGA ND kiekis buvo apskaičiuotas, kad atitiktų PLGA svorį, naudotą kurkuminui kapsuliuoti.

Vertinant kardiomiocitų susitraukimų laiką ir dažnį, PLGA-Cur grupėje buvo pastebėti didžiausi pokyčiai (16 pav. B, C), kai susitraukimų laikas buvo žymiai trumpesnis ( $p < 0,0001$ ) ir dažnis didesnis ( $p < 0,001$ ) lyginant su H/R kontroline grupe. Panašiai ir DMSO+Cur grupėje: H/R sąlygomis buvo pastebėtas reikšmingas susitraukimų laiko sumažėjimas ( $p < 0,01$ ) ir dažnio padidėjimas ( $p < 0,01$ ) lyginant su kontroline grupe. Naudojant šias medžiagas normoksijos sąlygomis, žalingo poveikio nebuvo ( $p > 0,05$ ).

Tuščių PLGA ND medžiagų poveikis H/R sąlygomis nulėmė reikšmingai trumpesnę susitraukimo laiką ( $p < 0,001$ ), t. y. rodė greitesnę susitraukimą šioje grupėje, tačiau normoksijos grupėje dažnis reikšmingai sumažėjo ( $p < 0,001$ ) (16 pav. C). H/R sąlygomis statistiškai reikšmingo dažnio pokyčio nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

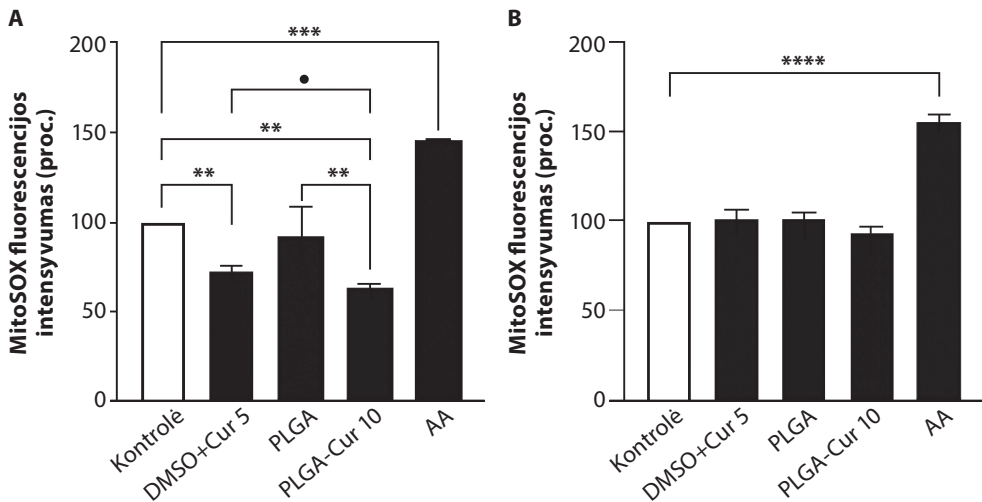
Vertinant piko laiko, sistolės ir diastolės parametrus, visose grupėse H/R sąlygomis nustatyti reikšmingi skirtumai lyginant su kontroline grupe. PLGA-Cur grupė reikšmingai skyrėsi ne tik nuo H/R kontrolinės grupės, bet ir nuo DMSO-Cur grupės (pažymėta ●) diastolės ir piko laikuose ( $p < 0,05$ ) ir ( $p < 0,01$ ). PLGA-Cur rezultatai buvo artimiausi normoksijos kontrolinės grupės rezultatams lyginant su visų kitų gydymo grupių (16 pav. D–F).

### **Reaktyviųjų deguonies formų generacija mitochondrijose po hipoksijos–reoksidacijos pažaidos veikiant inkapsuliuotu kurkuminu**

Vertinant mitochondrijų ROS gamybos intensyvumą, metodo jautrumui ir patikimumui patvirtinti buvo naudota teigiama kontrolė – III kvėpavimo grandinės kompleksas inhibitorius AA. Kaip ir tikėtasi, AA sukėlė ryškų

(50 proc.) mitochondrijų ROS produkcijos padidėjimą ( $p < 0,001$ ) lyginant su kontroline grupe ir taip patvirtino MitoSOX matavimo sistemos gebėjimą fiksuoti aukštą oksidacinio streso lygį. Siekiant įsitikinti nešiklio bioinertiškumu, buvo tirtas tuščių PLGA nanodalelių poveikis, kuris statistiškai reikšmingų ROS generavimo pokyčių nesukėlė ( $p > 0,05$ ). H/R sąlygomis (17 pav. A) ir DMSO+Cur, ir PLGA-Cur patikimai sumažino mitochondrijų ROS produkciją ( $p < 0,01$ ) lyginant su nepaveiktomis H/R grupės ląstelėmis. Svarbu pabrėžti, kad PLGA-Cur nanonešiklių grupėje nustatytas statistiškai reikšmingai stipresnis apsauginis efektas nei naudojant laisvos formos kurkuminą ( $p < 0,05$ ). Tai pagrindžia nanotechnologinio sprendimo pranašumą, t. y. inkapsuliacija į PLGA ne tik apsaugo antioksidantą, bet ir užtikrina efektyvesnį jo funkcinį poveikį mitochondrijų lygmeniu.

Normoksijos sąlygomis (17 pav. B) medžiagų grupės, įskaitant tuščias PLGA ND, DMSO+Cur ir PLGA-Cur, neparodė reikšmingų ROS pokyčių lyginant su kontroline grupe. Statistinė analizė parodė reikšmingą fluorescencijos intensyvumo padidėjimą AA grupėje lyginant su kontroline grupe ( $p < 0,001$ ). Tai rodo, kad šios medžiagos reikšmingai nepakeitė mitochondrijų ROS gamybos normoksinėmis sąlygomis.



**17 pav.** PLGA-Cur ir DMSO-Cur poveikis kardiomiocitų kultūros ROS gamybai po H/R pažaidos (A) ir normoksijos sąlygomis (B)

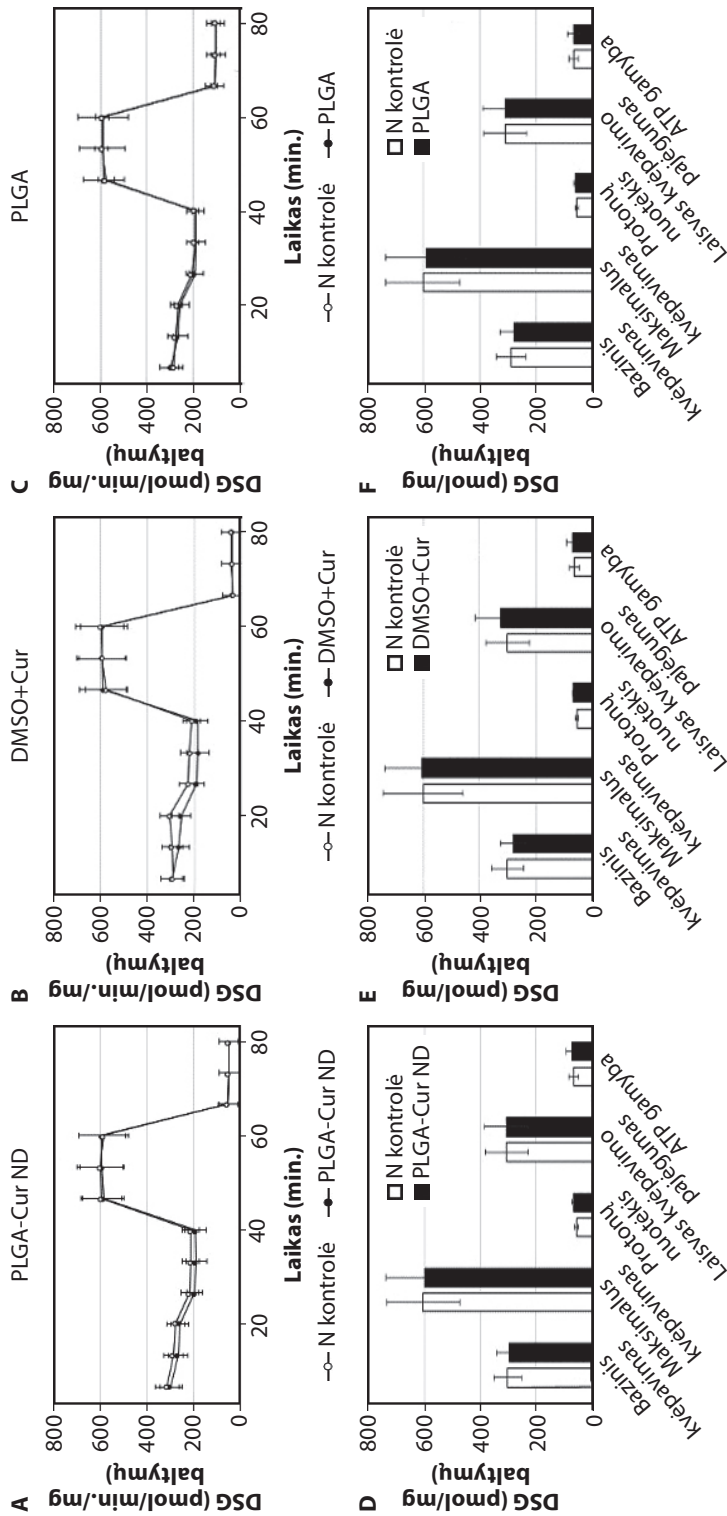
Žvaigždutės rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp gydymo grupių ir normoksijos kontrolinės grupės, nustatytus naudojant ANOVA testą: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ir \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ● $p < 0,05$  rodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp DMSO+Cur ir PLGA-Cur grupių lyginant ROS kiekius. AA – teigiama kontrolė, PLGA – nešiklio kontrolė.

## Mitochondrijų kvėpavimo funkcijos dinamika taikant inkapsuliuotą kurkuminą po hipoksijos–reoksigencijos pažaidos

Siekiant įsitikinti sukurtų nanotransporto sistemų bioinertiškumu bei saugumu, buvo atlikta išsami kardiomiocitų mitochondrijų bioenergijos analizė normoksijos sąlygomis. Vertinti trys esminiai komponentai: kurkuminu pakrautos nanodalelės (PLGA-Cur ND), laisvas kurkuminas (DMSO+Cur) ir vaistu nepakrautas polimerinis nešiklis (PLGA).

Seahorse Mito Stress testo duomenys parodė, kad kardiomiocitų DSG profiliai visose tirtose grupėse išliko stabilūs ir tapatūs kontrolinei grupei (18 pav. A–C). Detali bioenergetinių parametrų analizė (18 pav. D–F) patvirtino, kad nei nanodalelės, nei laisvas kurkuminas (5 µg/ml) nekeičia esminių mitochondrijų funkcijų: bazinis kvėpavimas (atspindintis ramybės energijos poreikį) ir ATP gamyba išliko nepakitę lyginant su negydyta kontrole ( $p > 0,05$ ).

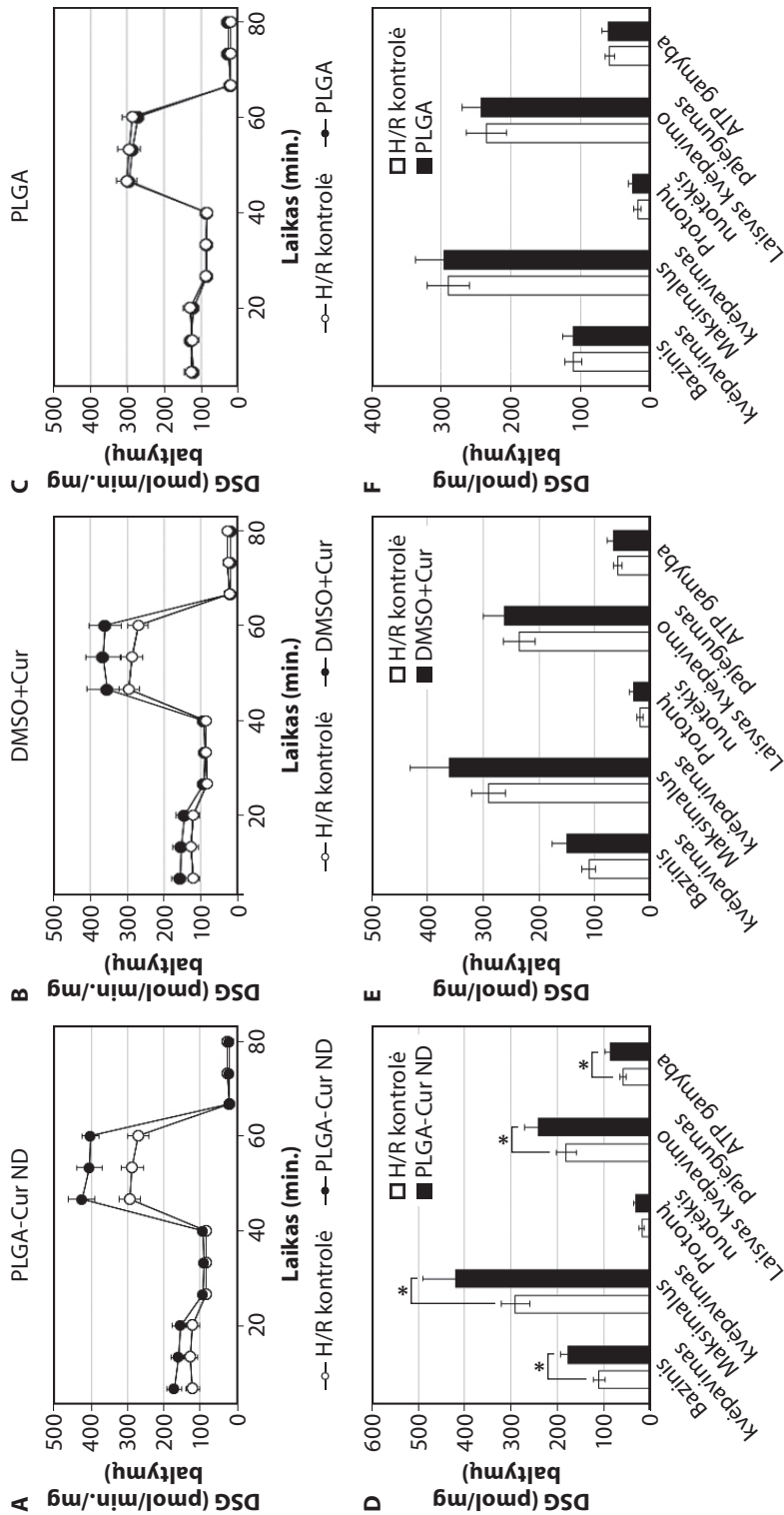
Taip pat nustatyta, kad preparatai nedaro įtakos maksimaliam mitochondrijų kvėpavimo pajėgumui bei laisvajam kvėpavimo pajėgumui (angl. *spare respiratory capacity*). Tai įrodo, kad nanodalelės fiziologinėmis sąlygomis nesumažina kardiomiocitų energijos rezervo ir netrikdo elektronų pernašos grandinės vientisumo. Statistiškai patikimų protonų nuotekio pokyčių nebuvo užfiksuota; tas papildomai pagrindžia nešiklių saugumą mitochondrijų membranų stabilumui.



**18 pav. Sintetinių nanonešiklių ir laisvų medžiagų poveikis kardiomiocitų mitochondrijų bioenergijai normoksinijos sąlygomis**

(A–C) Kardiomiocitų deguonies suvartojimo greičio (DSG) kinetinės kreivės realiu laiku vertinant atitinkamai PLGA-Cur ND, DMSO+Cur (laisvo kurkumino) ir PLGA (tuščio nešiklio) poveikį; (D–F) susumuoti pagrindiniai bioenerginiai parametrai: bazinis kvėpavimas, maksimalus kvėpavimo pajėgumas, protonų nuotekis, laisvasis kvėpavimo pajėgumas ir su kvėpavimu susieta ATP gamyba. Balti stulpeliai/apskritimai – negydyta Kontrolė, juodi – tiriamosios grupės. Duomenys normalizuoti pagal ląstelių baltymų kiekį (pmol/min/mg baltymų) ir pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta (p > 0,05, Stjudento t-testas).

Mitochondrijų kvėpavimo analizė Seahorse XFp metodu atskleidė, kad PLGA-Cur nanodalelės pasižymi stipriu kardioprotekcinio poveikiu H/R sąlygomis. Pirminiai modelio validacijos tyrimai patvirtino, kad modeliuojama hipoksija-reoksigenacija sukelia žymų kardiomiocitų bioenergijos sutrikimą: nustatytas statistiškai patikimas bazinio ir maksimalaus kvėpavimo bei ATP gamybos nuosmukis lyginant su Kontrole ( $p < 0,05$ , 10 pav. D). PLGA-Cur ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) panaudojimas H/R paveiktose ląstelėse užtikrino geriausią mitochondrijų funkcijos atkūrimą. Lyginant su negydyta H/R grupe, PLGA-Cur grupėje nustatytas statistiškai reikšmingas bazinio ir maksimalaus kvėpavimo padidėjimas bei pagerėjęs laisvasis kvėpavimo pajėgumas ir ATP gamyba ( $p < 0,05$ , 19 pav. A, D). Vertinant kontrolinių grupių poveikį, nustatyta, kad laisvas kurkuminas (DMSO+Cur,  $5 \mu\text{g/ml}$ ) turėjo tik teigiamą tendenciją gerinti mitochondrijų bioenergiją, tačiau statistiškai patikimo skirtumo nepasiekė ( $p > 0,05$ ). Tai rodo, kad inkapsuliacija į PLGA nešiklį padidina kurkumino terapinį efektyvumą mitochondrijų lygmeniu. Tačiau tuščios nanodalelės (PLGA) jokios įtakos mitochondrijų kvėpavimui neturėjo nei normoksijos, nei H/R sąlygomis ( $p > 0,05$ ). Tas patvirtina nešiklio bioinertiškumą ir įrodo, kad nustatytas apsauginis efektas yra nulemtas būtent atpalaiduojamos veikliosios medžiagos.



**19 pav. Mitochondrijų kvėpavimas paveikus H/R sąlygomis**

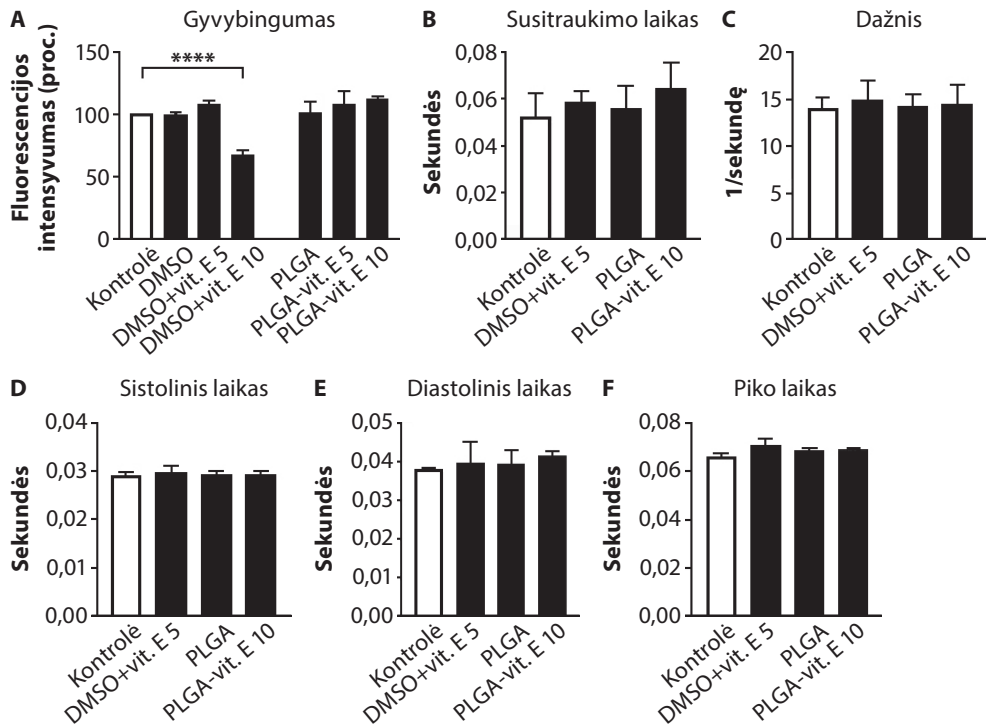
(A) PLGA-Cur grupės kvėpavimo kreivė H/R sąlygomis; (B) DMSO-Cur H/R grupės kvėpavimo kreivė; (C) PLGA grupės mitochondrijų kvėpavimo kreivė H/R sąlygomis; (D) nurodyti statistškai reikšmingi kvėpavimo parametrai skirtumai PLGA-Cur grupėje: padidėjęs bazinis kvėpavimas, laisvas kvėpavimo pajėgumas, padidėjusi ATP gamyba ir pagerėjęs maksimalus kvėpavimas, \* $p < 0,05$ . (E–F) statistškai reikšmingų pakitimų nerasta ( $p > 0,05$ ). Vertės pateiktos kaip vidurkis  $\pm$  SD (proc.).

## **Kardiomiocitų gyvybingumo ir kontraktiliškumo pokyčiai po hipoksijos-reoksigenacijos sąlygų taikant inkapsuliuotą vitaminą E**

Šiame eksperimente įvertinome kardiomiocitų gyvybingumą ir funkciją naudodami įvairias vitamino E koncentracijas normoksijos ir H/R sąlygomis (20 pav., 21 pav.). Tai atlikome siekdami patikrinti naudojamų junginių saugumą ir galimą toksišką poveikį kardiomiocitams. Kontrolinės grupės gyvybingumas buvo laikomas 100 proc. etalonu (20 pav. A). Kontrolinė DMSO grupė vėl neparodė reikšmingo neigiamo šio junginio poveikio normoksinėmis sąlygomis, kaip ir poveikis tuščiomis PLGA ND ( $p > 0,05$ ). Grupės, paveiktos DMSO+vit. E 5  $\mu\text{g/ml}$ , PLGA-Cur 5 ir 10  $\mu\text{g/ml}$ , neparodė geresnio gyvybingumo lyginant su normoksijos kontroline grupe ( $p > 0,05$ ), tačiau grupė, paveikta DMSO+vit. E 10  $\mu\text{g/ml}$ , parodė daug mažesnę gyvybingumą ( $p < 0,001$ ). Tas rodo neigiamą šio gydymo poveikį didesnėmis dozėmis ir normoksijos, ir H/R sąlygomis – rezultatai panašūs kaip ir kurkumino grupėje.

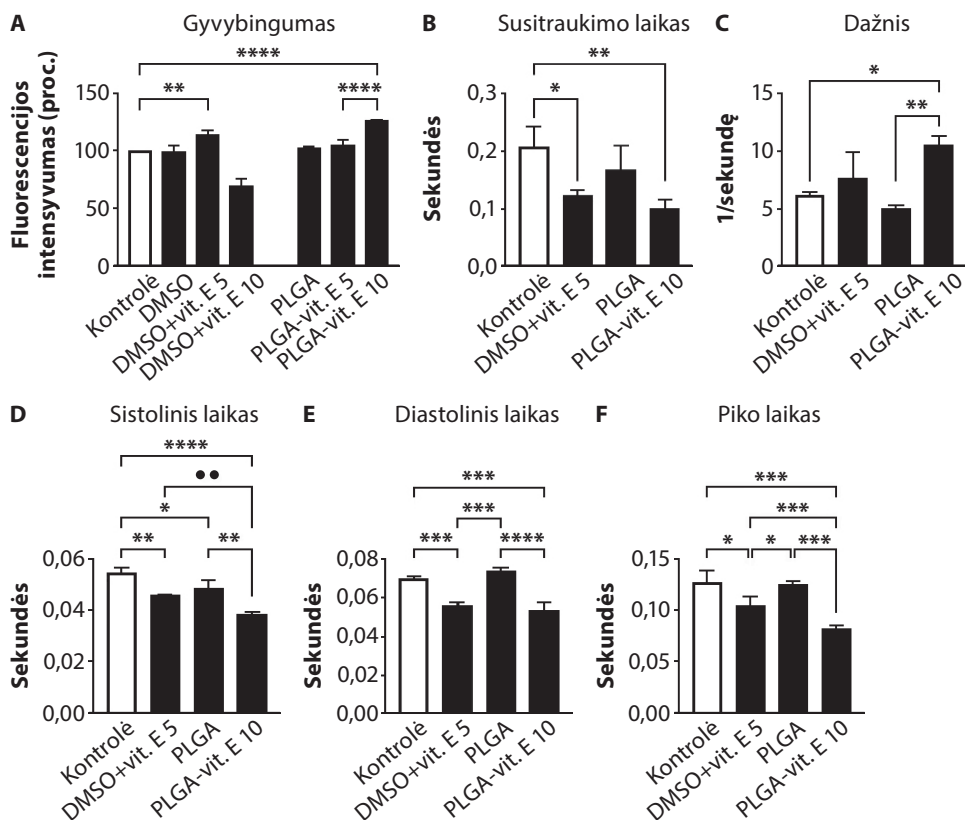
Tyrimo metu nustatyta, kad PLGA-vit. E efektyviai apsaugo kardiomiocitus nuo H/R sukeltos pažaidos. Nustatytas ryškus nuo dozės priklausomas poveikis: naudojant 5  $\mu\text{g/ml}$  PLGA-vit. E koncentraciją, ląstelių gyvybingumas padidėjo 13 proc., o padidinus dozę iki 10  $\mu\text{g/ml}$  – išgyvenamumas padidėjo 26 proc. ( $p < 0,001$ ) lyginant su negydyta H/R kontrolės grupe (21 pav. A). Lyginant laisvos formos ir ND esančio vitamino E poveikį, išryškėjo esminis pranašumas. Nustatyta, kad DMSO+Cur 10  $\mu\text{g/ml}$  dozė kardiomiocitams yra stipriai citotoksiška ir reikšmingai sumažina jų gyvybingumą ( $p < 0,001$ ). Tačiau tokia pati dozė, inkapsuliuota į PLGA nešiklį, ne tik nesukėlė neigiamo poveikio, bet užtikrino geriausią apsauginį efektą visoje tyrimo grupėje. Tai rodo, kad polimerinis nešiklis leidžia saugiai naudoti didesnes terapines antioksidantų dozes ir taip apsaugo ląsteles nuo neigiamo staigaus boliusinio poveikio.

Kontroliniai bandymai patvirtino, kad nei tirpiklis (0,1 proc. DMSO), nei tuščios PLGA nanodalelės statistiškai reikšmingos įtakos kardiomiocitų gyvybingumui neturėjo ( $p > 0,05$ ).



**20 pav.** Sintetinių nanodalelių ir laisvų medžiagų poveikis kardiomiocitų gyvybingumui bei kontraktilinei funkcijai normoksijos sąlygomis

(A) Ląstelių metabolinis aktyvumas (PrestoBlue testas), išreikštas fluorescencijos intensyvumo procentais lyginant su negydyta kontrolė; (B–F) kardiomiocitų kontraktiliniai parametrai: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – negydyta Kontrolė, juodi stulpeliai – tiriami preparatai (laisvas vitaminas E DMSO tirpale bei į PLGA nanodaleles inkapsuliuotas vitaminas E). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolė: \*\*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA su LSD *post-hoc* testu).



**21 pav.** Į PLGA nanodaleles inkapsuliuoto vitamino E (PLGA-vit. E) apsauginis poveikis kardiomiocitų gyvybingumui ir kontraktilinei funkcijai paveikus ląsteles hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) sąlygomis

(A) Ląstelių metabolinis aktyvumas (PrestoBlue testas); (B–F) kardiomiocitų kontraktiliniai parametrai: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – negydyta H/R kontrolė, juodi stulpeliai – tiriami preparatai (laisvos medžiagos ir nanodalelės). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolė: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001. Juodi apskritimai (●) nurodo statistiškai patikimą skirtumą lyginant PLGA-vit. E su atitinkama laisvos medžiagos (DMSO+vit. E) grupe.

Atsižvelgdami į šiuos rezultatus, tolesniuose eksperimentuose ląstelių kultūroms paveikti naudojome DMSO+vit. E 5 μg/ml ir PLGA- vit. E 10 μg/ml dozes. Eksperimentuose naudoto PLGA kiekis buvo apskaičiuotas taikant proporcinę formulę, kad atitiktų tikslų PLGA svorį, panaudotą vitaminui E inkapsuliuoti.

Tiriant kardiomiocitų susitraukimo laiką ir dažnį, H/R sąlygomis PLGA-vit. E grupėje buvo ryškiausi pokyčiai (21 pav. B–F), o susitraukimo laikas

buvo beveik du kartus trumpesnis lyginant su kontroline grupe (nuo 0,2 s iki 0,1 s) (21 pav. B) ( $p < 0,01$ ) ir reikšmingai didesnis ( $p < 0,05$ ) lyginant su I/R kontroline grupe (21 pav. C). DMSO+vit. E grupėje H/R sąlygomis taip pat buvo nustatytas reikšmingas susitraukimų laiko sutrumpėjimas ( $p < 0,05$ ), tačiau reikšmingo dažnio pokyčio ( $p > 0,05$ ) nebuvo. Abiejose grupėse normoksijos sąlygomis žalingo poveikio nebuvo nustatyta ( $p > 0,05$ ). PLGA H/R grupėje lyginant su kontroline grupe buvo panašus plakimo laikas ( $p > 0,05$ ) ir dažnis ( $p > 0,05$ ). Normoksijos sąlygomis statistiškai reikšmingų pokyčių nenustatyta (20 pav. B–F).

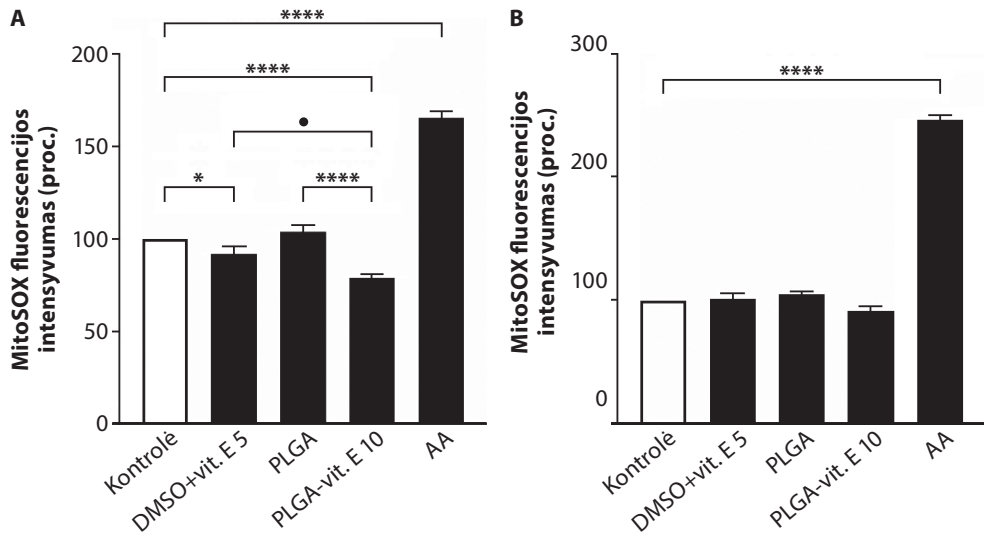
Lyginant susitraukimo piko trukmę, sistolės ir diastolės parametrus esant H/R sąlygoms, daugelyje medžiagų grupių buvo pastebėti reikšmingi skirtumai lyginant su kontroline grupe. PLGA-vit. E grupė reikšmingai skyrėsi ne tik nuo H/R kontrolinės grupės, bet ir jos rezultatai buvo artimiausi normoksijos kontrolinės grupės rezultatams tarp visų kitų gydymo grupių (21 pav. B–F). PLGA-vit. E poveikis geriausiai sumažino sistolės ( $p < 0,0001$ ), diastolės ( $p < 0,001$ ) ir piko laikus ( $p < 0,001$ ). Taip pat PLGA-vit. E poveikis kontrakcijų laikui buvo geresnis nei DMSO+vit. E grupės ir sistolės ( $p < 0,01$ ), ir piko metu ( $p < 0,05$ ).

### **Reaktyviųjų deguonies formų susidarymo ištyrimas mitochondrijose po hipoksinės-reoksigenacinės pažaidos paveikus inkapsuliuotu vitaminu E**

Vertinant mitochondrijų ROS produkciją, ląstelių fluorescencijos intensyvumo rezultatai buvo normalizuoti pagal kontrolinę (normoksijos) grupę, kurios vidurkis priimtas kaip bazinis lygmuo (100 proc.) (22 pav.). Toks skaičiavimo metodas buvo pasirinktas siekiant vizualizuoti santykinę ROS generavimo padidėjimą sukeltos pažaidos metu bei įvertinti antioksidacinio poveikio efektyvumą.

Metodo jautrumui ir matavimo sistemos dinaminiam diapazonui patvirtinti naudota teigiama kontrolė AA. Blokuodamas mitochondrijų kvėpavimo grandinės III kompleksą, AA indukuoja intensyvių superoksido anijonų išsiskyrimą. Paveikus H/R sąlygomis, AA grupėje pastebėtas 70 proc. didesnis ROS lygis nei kontrolinėje grupėje ( $p < 0,0001$ ); tai patvirtina, kad naudota matavimo metodika yra jautri mitochondrijų bioenergijos pokyčiams (22 pav. A). H/R pažaidos fone ir laisvas, ir į nanodaleles inkapsuliuotas vitaminas E reikšmingai slopino ROS gamybą, tačiau PLGA-vit. E grupėje apsauginis efektas buvo statistiškai patikimesnis ( $p < 0,0001$ ). Lyginant šias dvi gydymo grupes tarpusavyje, buvo nustatytas esminis PLGA-vit. E pranašumas ( $p < 0,05$ ), rodantis, kad ND užtikrina efektyvesnę antioksidanto skvarbą arba didesnę jo stabilumą mitochondrijų lygmeniu. Normoksijos

sąlygomis tirtos medžiagos (PLGA-vit. E, DMSO+vit. E bei tuščios ND) bazinės ROS produkcijos nekeitė; tas pagrindžia jų saugumą vartojant fiziologinėmis sąlygomis (22 pav. B).

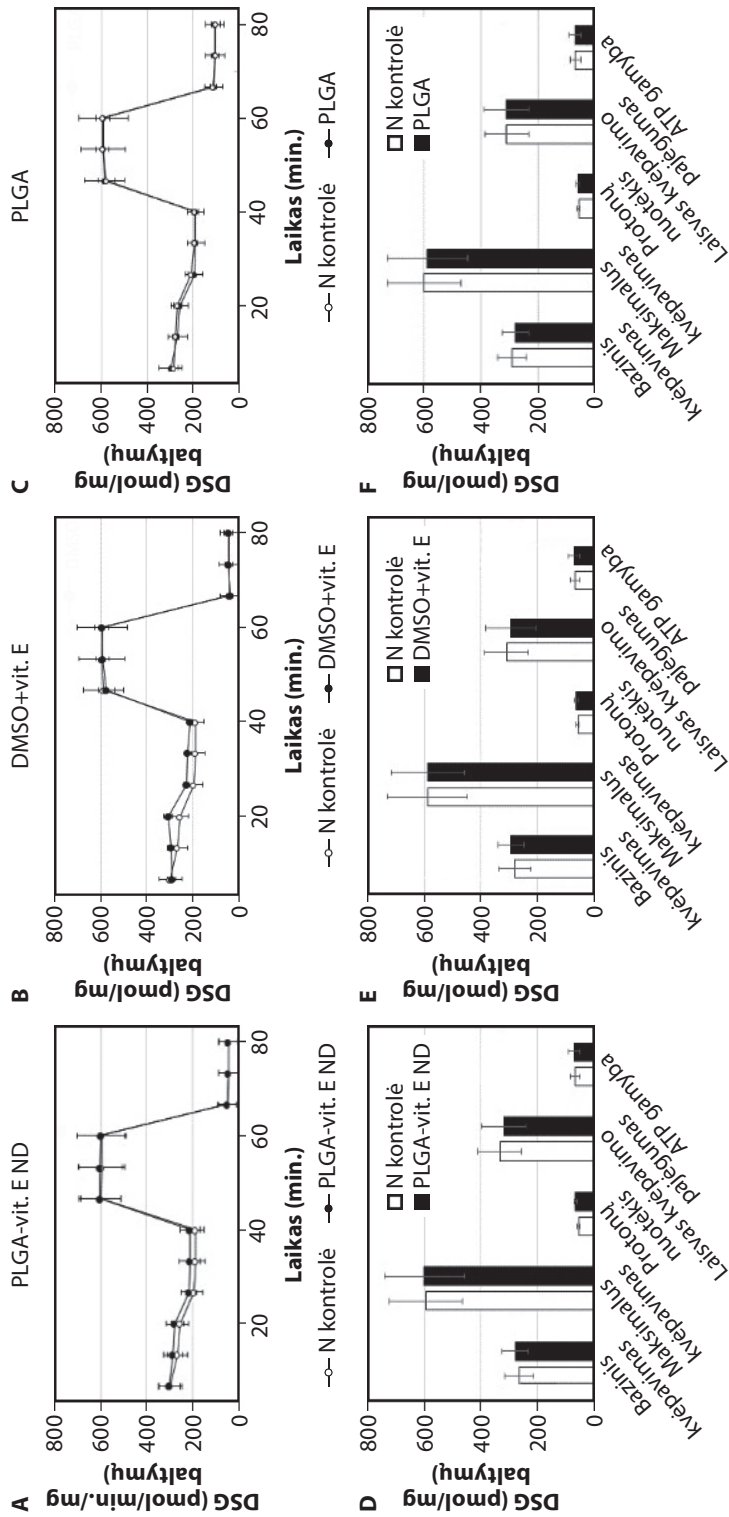


**22 pav.** Į polimerines nanodaleles inkapsuliuoto vitamino E poveikis kardiomiocitų mitochondrijų reaktyviųjų deguonies molekulių (ROS) produkcijai

(A) Hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) sąlygomis; (B) normoksijos sąlygomis. Mitochondrijų ROS lygis vertintas matuojant MitoSOX zondo fluorescencijos intensyvumą. Rezultatai normalizuoti pagal atitinkamos būklės negydytą kontrolinę grupę (100 proc.). Antimicinas A (AA) naudotas kaip teigiama metodo kontrolė matavimo sistemos jautrumui patvirtinti. PLGA stulpelis atspindi vaistu nepakrautų nanodalelių (nešiklio kontrolės) poveikį. Duomenys pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrole: \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Juodas apskritimas (●) nurodo statistiškai patikimą skirtumą ( $p < 0,05$ ) lyginant PLGA-vit. E 10 poveikį su laisvo vitamino E (DMSO+vit. E 5) grupe.

### Mitochondrijų kvėpavimo funkcijos pokyčiai po hipoksinės-reoksigenacinės pažaidos skiriant inkapsuliuotą vitaminą E

Siekiant įvertinti PLGA-vit. E nanotransporto sistemos saugumą, buvo atlikta kardiomiocitų mitochondrijų bioenerginė analizė normoksijos sąlygomis. Vertintas į nanodaleles inkapsuliuoto vitamino E (PLGA-vit. E ND), laisvos formos vitamino E (DMSO+vit. E) bei tuščio nešiklio (PLGA) poveikis.



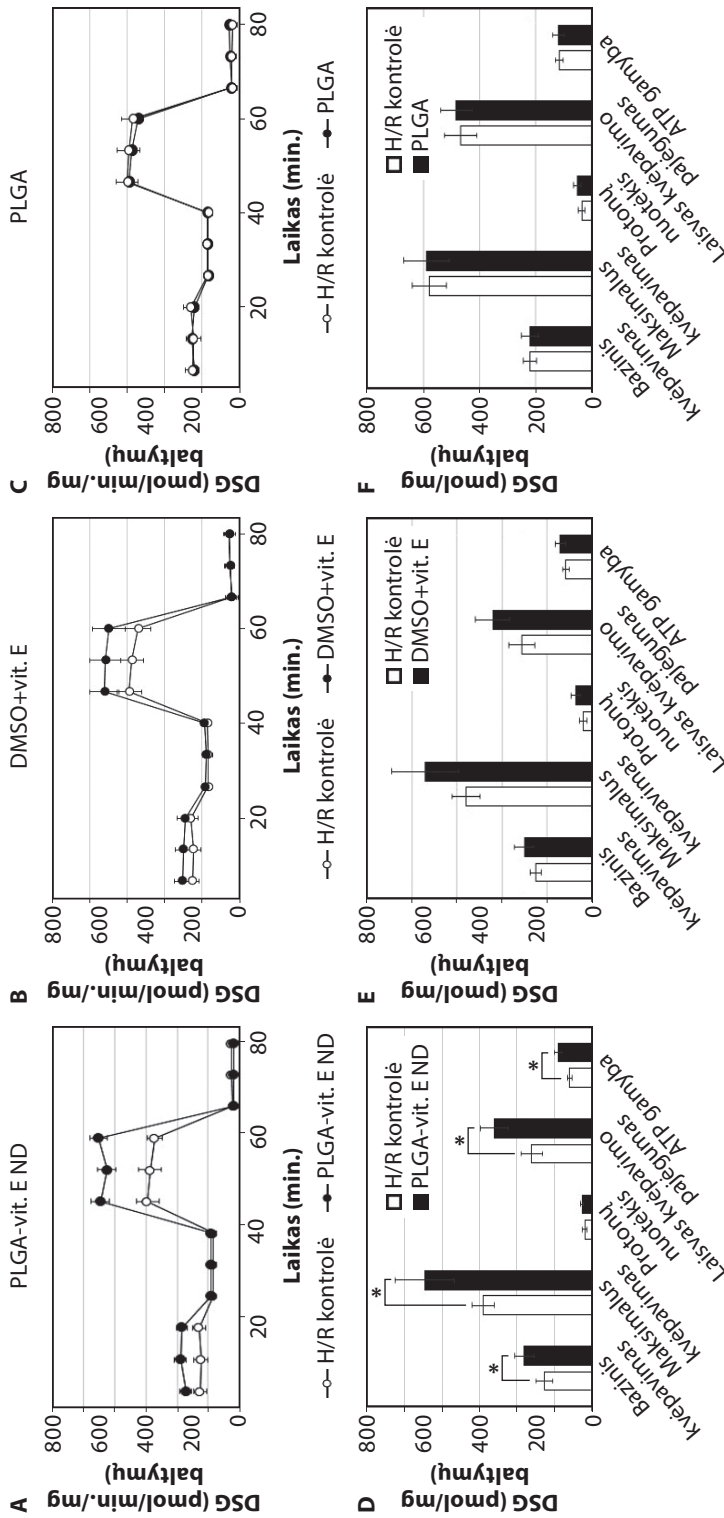
**23 pav. Į polimerines nanodaleles inkapsuluoto vitamino E ir kontrolinių medžiagų poveikis kardiomiocitų mitochondrijų bioenergijai normoksinijos sąlygomis**

(A–C) Kardiomiocitų deguonies suvartojimo greičio (DSG) kinetinės kreivės realiu laiku vertinant atitinkamai PLGA-vit. E ND, DMSO+vit. E (laisvo vitamino E) ir PLGA (tuščio nešiklio) poveikį; (D–F) susumuoti pagrindiniai bioenerginiai parametrai: bazinis kvėpavimas, maksimalus kvėpavimo pajėgumas, protonų nuotekis, laisvasis kvėpavimo pajėgumas ir su kvėpavimu susieta ATP gamyba. Balti stulpeliai/apskritimai – negydyta Kontrolė, juodi – tiriamosios grupės. Duomenys normalizuoti pagal ląstelių baltymų kiekį (pmol/min./mg baltymų) ir pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta (p > 0,05, Stjudento t-testas).

Tyrimo duomenys parodė, kad visose grupėse mitochondrijų kvėpavimo kreivės beveik identišškai sutapo su kontrolinės grupės DSG profiliu (23 pav. A–C). Detali bioenerginė parametru analizė (23 pav. D–F) patvirtino visišką tiriamų medžiagų saugumą ląstelių energiniam vientisumui: nustatytas bazinis kvėpavimas ir su juo susijusi ATP produkcija išliko nepakitę lyginant su negydyta kontrole ( $p > 0,05$ ). Tai rodo, kad pasirinktos koncentracijos (10  $\mu\text{g/ml}$ ) medžiagos nesukelia mitochondrijų funkcijų pokyčių.

Svarbu pabrėžti, kad nešikliai ir antioksidantas nedarė neigiamos įtakos kardiomiocitų maksimaliam kvėpavimo pajėgumui bei laisvajam kvėpavimo pajėgumui ( $p > 0,05$ ). Kadangi laisvasis pajėgumas atspindi ląstelės energijos rezervą stresui įveikti, tai jo stabilumas įrodo, kad nanodalelės normoksijos sąlygomis nesumažina ląstelių adaptacinio potencialo. Taip pat neužfiksuota protonų nuotekio pokyčių; tas patvirtina mitochondrijų vidinės membranos funkcinį stabilumą.

Apdorojimas DMSO+vit. E turėjo teigiamą tendenciją gerinant mitochondrijų kvėpavimą, tačiau statistiškai reikšmingos mitochondrijų funkcijos apsaugos neužtikrino ( $p > 0,05$ ). Vis dėlto naudojant PLGA-vit. E nanodaleles, buvo pasiekti geriausi bioenerginio stabilumo rodikliai: bazinis ir maksimalus kvėpavimas padidėjo apie 30 proc. lyginant su negydyta H/R grupe ( $p < 0,05$ ) (24 pav. A, D). Padidėjusi ATP gamyba PLGA-vit. E grupėje patvirtina, kad nanodalelėse esantis antioksidantas efektyviau apsaugo mitochondrijų elektronų pernašos grandinę nuo oksidacinio pažeidimo ir palaiko ląstelės energinį vientisumą. Pažymėtina, kad tuščias PLGA nešiklis įtakos mitochondrijų kvėpavimui neturėjo – tai patvirtino jo bioinertiškumą.

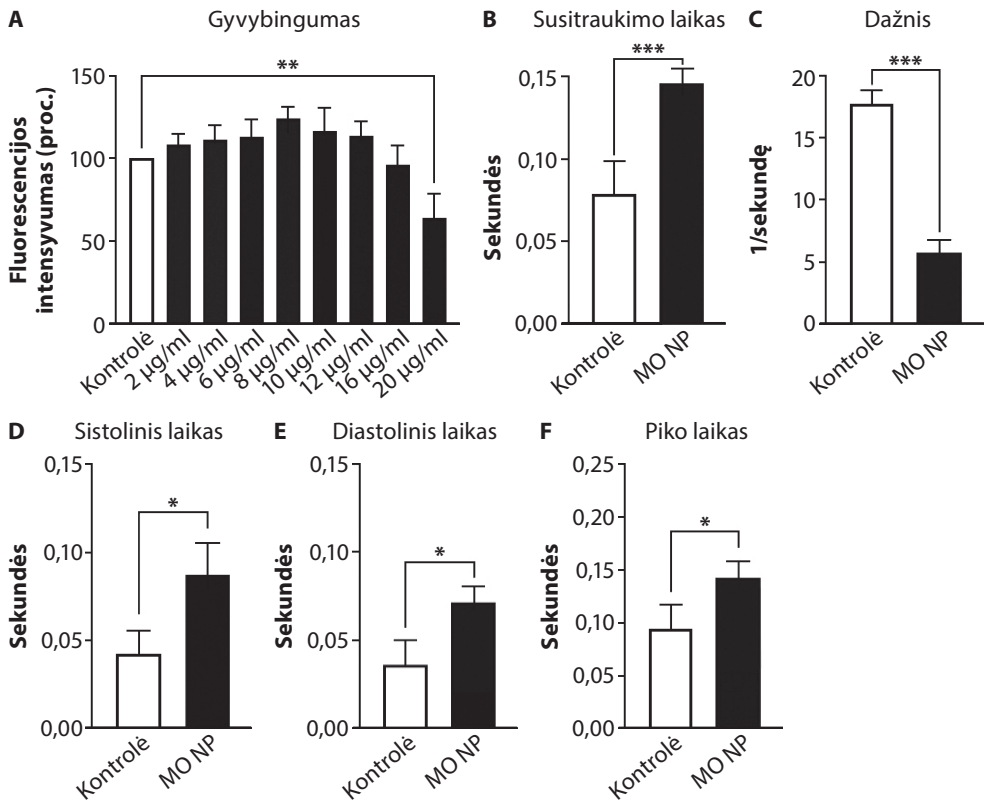


**24 pav. Mitochondrijų kvėpavimas paveikus H/R sąlygomis**

(A) Mitochondrijų kvėpavimo kreivė PLGA-vit. E grupėje H/R sąlygomis. Mitochondrijų kvėpavimo kreivės H/R sąlygomis DMSO+vit. E ir PLGA grupėse pateiktos atitinkamai (B) ir (C) paveiksluose. PLGA-vit. E grupėje nustatyti statistškai reikšmingi bazinio bei maksimalaus kvėpavimo, atsarginio (laisvojo) kvėpavimo pajėgumo ir ATP gamybos pokyčiai lyginant su kontroline grupe (D). Tačiau DMSO+vit. E (E) ir tuščių PLGA nanodalelių (F) grupėse statistškai reikšmingų kvėpavimo parametrų skirtumų nepastebėta. Duomenys normalizuoti pagal ląstelių baltymų kiekį (pmol/min./mg baltymų) ir pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta ( $p > 0,05$ , Stjudento t-testas).

## Melisu nanopūslelių poveikis hipoksija-reoksigenacija paveiktų kardiomiocitų gyvybingumui ir kontrakcijai

Analogiškai tyrimams su PLGA-Cur ir PLGA-vit. E ND toliau vertinome MO NP poveikį kardiomiocitų gyvybingumui normoksijos sąlygomis. Taip pat siekėme nustatyti, ar MO preparatas padeda išsaugoti ląstelių gyvybingumą po sukeltos H/R pažeidimo. Eksperimento metu normoksijos sąlygomis auginamos ir H/R sąlygomis paveiktos ląstelės buvo veikiamos aštuonių skirtingų koncentracijų mėginiais: 2, 4, 8, 6, 10, 12, 16, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .



**25 pav.** Vaistinės melisos nanopūslelių (MO NP) dozės-atsako tyrimas ir poveikis kardiomiocitų funkcijai normoksijos sąlygomis

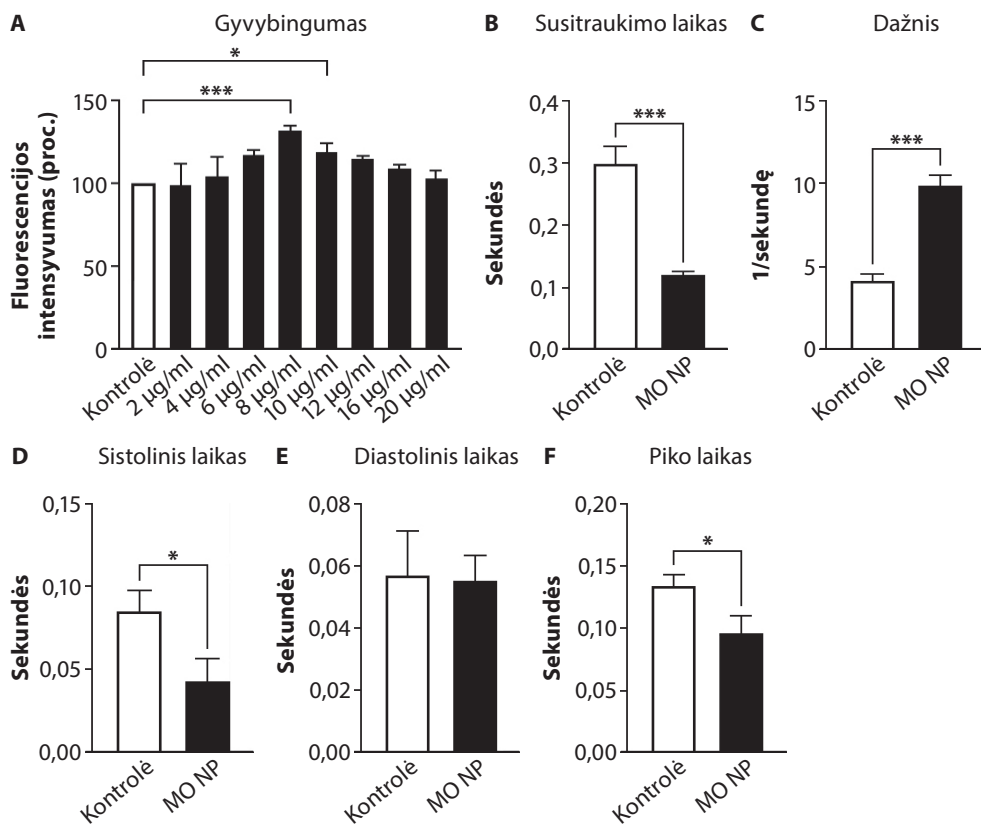
(A) Kardiomiocitų gyvybingumo (PrestoBlue testas) priklausomybė nuo MO NP koncentracijos (2–20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pagal nanopūslelių baltumą). Rezultatai normalizuoti pagal kontrolę (100 proc.). (B–F) Kardiomiocitų kontraktiniai rodikliai veikiant parinkta optimalia 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MO NP koncentracija: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – Kontrolė, juodi stulpeliai – ląstelės, apdorotos MO NP. Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su kontrolė: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (ANOVA su LSD *post-hoc* testu).

Eksperimentas normoksijos sąlygomis ir paveikus MO NP, parodė, jog ląstelių metabolinis aktyvumas padidėjo beveik 20 proc. ir 15 proc. esant atitinkamai 8 ir 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos nanopūslelėms. Mažesnės dozės statistiškai reikšmingo poveikio neturėjo, tačiau 20  $\mu\text{g/ml}$  koncentracija sukėlė reikšmingą neigiamą pokytį – dėl toksinio poveikio ląstelių metabolinis aktyvumas sumažėjo iki 60 proc. (25 pav. A).

Paveikus kardiomiocitus MO NP, pakito jų kontraktiliškumas: susitraukimo laikas padidėjo dvigubai ( $p < 0,001$ ), o dažnis beveik 3 kartus ( $p < 0,001$ ) (25 pav. B, C). Tai įvyko prailgėjus ir sistolei, ir diastolei; tas lėmė ir bendro piko laiko prailgėjimą (25 pav. D–F).

26 pav. A matyti, jog MO NP turėjo reikšmingą poveikį ląstelių kultūrai lyginant su kontroline grupe. Reikšmingą poveikį ląstelių metaboliniam aktyvumui turėjo paveikimas 8 ir 10  $\mu\text{g/ml}$  MO NP koncentracijomis; tas padidino metabolinį aktyvumą 30 proc. ir 18 proc., atitinkamai ( $p < 0,001$ ) ir ( $p < 0,05$ ). Ir 8  $\mu\text{g/ml}$ , ir 10  $\mu\text{g/ml}$  MO NP koncentracijų panaudojimas pagerino H/R pažeistų kardiomiocitų metabolinį aktyvumą. Atlikus šį etapą, buvo atrinkta koncentracija, kuri veikė geriausiai ir pagal rezultatus tolesniems tyrimams buvo pasirinkta 8  $\mu\text{g/ml}$  MO NP koncentracija.

H/R pažaidos paveiktoje kardiomiocitų kultūroje MO NP sukėlė ryškius kontraktinės funkcijos pokyčius. Lyginant su negydyta H/R kontrolės grupe, MO NP sutrumpino bendrą ląstelių susitraukimo trukmę beveik tris kartus (nuo 0,3 s iki 0,1 s,  $p < 0,001$ ) (26 pav. B) ir padvigubino susitraukimų dažnį – nuo 5 iki 10 k./s ( $p < 0,001$ ) (26 pav. C). Taip pat buvo nustatytas statistiškai patikimas sistolės trukmės bei piko laiko sutrumpėjimas ( $p < 0,05$ ) (26 pav. D, F). Šie funkciniai pokyčiai rodo, kad MO NP aktyvuoja kardiomiocitų kontraktilinį atsaką po patirtos H/R pažaidos.

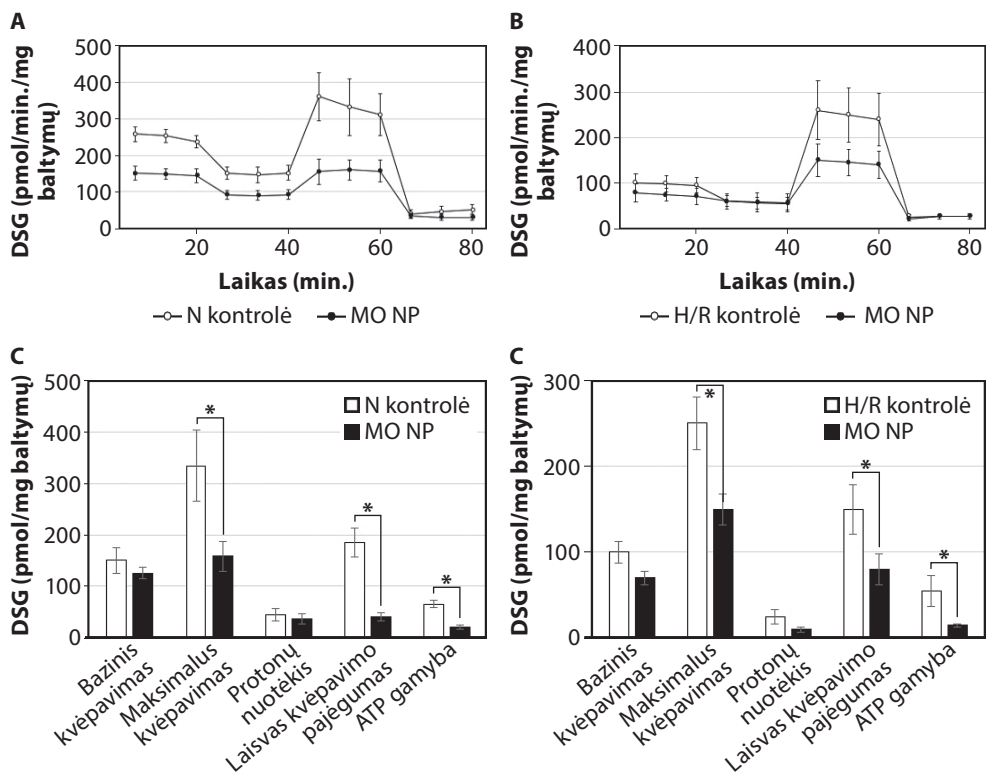


**26 pav.** Vaistinės melisos nanopūslelių (MO NP) poveikis kardiomiocitų gyvybingumui ir kontraktilinei funkcijai hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) sąlygomis

(A) Kardiomiocitų metabolinis aktyvumas (PrestoBlue testas) veikiant skirtingoms MO NP koncentracijoms (2–20 µg/ml pagal pūslelių baltymą) H/R sąlygomis. Rezultatai normalizuoti pagal negydytą H/R kontrolę (100 proc.). (B–F) Kardiomiocitų kontraktiliniai rodikliai po H/R pažaidos veikiant optimalia 8 µg/ml MO NP koncentracija: bendras susitraukimo laikas (B), susitraukimų dažnis (C), sistolės trukmė (D), diastolės trukmė (E) ir piko laikas (F). Balti stulpeliai – negydyta H/R kontrolė, juodi stulpeliai – ląstelės, apdorotos MO NP. Rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis (n = 3). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su negydyta H/R kontrolė: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (Stjudento t-testas).

## Melisų nanopūslelių įtaka hipoksijos–reoksigenacijos paveiktų kardiomiocitų mitochondrijų kvėpavimo pokyčiams

Normoksijos sąlygomis (27 pav. C), lyginant su negydyta kontrole, MO NP grupėje nustatytas statistiškai reikšmingas maksimalaus kvėpavimo ( $p < 0,05$ ) ir su kvėpavimu susietos ATP gamybos ( $p < 0,05$ ) sumažėjimas. Ypač ryškiai sumenko laisvasis kvėpavimo pajėgumas (angl. *spare respiratory capacity*); tas rodo, kad nanopūslelės apriboja mitochondrijų energijos rezervą jau fiziologinėmis sąlygomis.



### 27 pav. Vaistinės melisos nanopūslelių poveikis mitochondrijų bioenergijai

Pateikiamas kardiomiocitų deguonies suvartojimo greitis (DSG) matuotas Seahorse XFP analizatoriumi. (A–B) Mitochondrijų kvėpavimo kreivės realiu laiku atitinkamai normoksijos ir hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) sąlygomis; (C–D) susumuoti bioenerginiai parametrai (bazinis ir maksimalus kvėpavimas, protonų nuotėkis, laisvasis kvėpavimo pajėgumas bei ATP gamyba). Balti stulpeliai – negydyta kontrolinė grupė, juodi stulpeliai – ląstelės, apdorotos 8  $\mu\text{g/ml}$  MO NP. Visi duomenys normalizuoti pagal bendrą ląstelių baltymų kiekį (Bradfordo metodas). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Žvaigždutė (\*) nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą lyginant MO NP grupę su tos pačios būklės kontroline grupe ( $p < 0,05$ , Stjudento t-testas). Duomenys pateikti kaip vidurkis  $\pm$  SD (proc.).

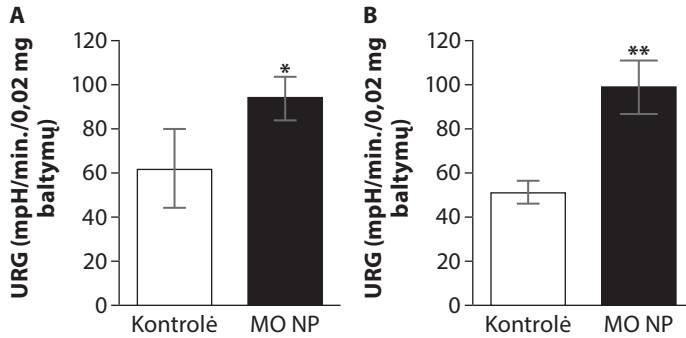
H/R sąlygomis (27 pav. D) nustatytas analogiškas dėsniumas. MO NP grupėje, lyginant su H/R kontroline grupe, maksimalus kvėpavimas buvo reikšmingai mažesnis ( $p < 0,05$ ). Taip pat nustatytas patikimas laisvojo kvėpavimo pajėgumo ir su kvėpavimu susietos ATP gamybos nuosmukis ( $p < 0,05$ ). Bazinis kvėpavimas ir protonų nuotekis abiem atvejais turėjo mažėjimo tendenciją, tačiau statistškai patikimo skirtumo nepasiekė ( $p > 0,05$ ). Šie duomenys patvirtina, kad MO NP selektyviai slopina aktyviausią mitochondrijų veiklos fazę.

Svarbu pažymėti, kad šis efektas nebuvo lydimas ląstelių žūties (ką patvirtino gyvybingumo testai) ir rodo, kad MO NP indukuoja kontroliuojamą bioenergijos poslinkį.

### **Melisų nanopūslelių įtaka hipoksijos-reoksidacijos paveiktų kardiomiocitų glikolizės intensyvumui**

Siekiant nustatyti, kaip ląstelės kompensuoja energijos poreikį esant MO NP nuslopintam mitochondrijų kvėpavimui, buvo įvertintas užląstelinio rūgštėjimo greitis (URG). 28 pav. pateikiami URG matavimo rezultatai. Nustatyta, kad normoksijos sąlygomis MO NP statistškai reikšmingai padidina URG ( $p < 0,05$ ) lyginant su kontroline grupe maksimalaus kvėpavimo metu. Tai rodo, kad ląstelėse suintensyvėja glikolizė – energijos gamybos būdas, kuriam nereikalingas deguonis.

Nustatyta, kad padidėjęs rūgštėjimas (intensyvesnė glikolizė) buvo gero- kai didesnis ir paveikus H/R sąlygomis MO NP paveiktoje grupėje, o ypač maksimalaus kvėpavimo fazėje ( $p < 0,01$ ). Šie rezultatai kartu su mitochondrijų kvėpavimo duomenimis patvirtina, kad MO NP sukelia metabolinį perjungimą, t. y. mažina priklausomybę nuo oksidacinio fosforilimo ir kompensuoja tai suintensyvinta glikolize.



**28 pav.** *Vaistinės melisos nanopūslelių (MO NP) įtaka kardiomiocitų glikolizės intensyvumui*

Pateikiamas užląstelinio rūgštėjimo greitis (URG), matuotas Seahorse XFp analizatoriumi. **(A)** Glikolizės intensyvumas normoksijos sąlygomis; **(B)** glikolizės intensyvumas hipoksijos-reoksigenacijos (H/R) sąlygomis. Balti stulpeliai – negydyta Kontrolė, juodi stulpeliai – ląstelės, apdorotos 8  $\mu\text{g/ml}$  MO NP. Duomenys normalizuoti pagal ląstelių baltymų kiekį (mpH/min./0,02 mg baltymo). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis ( $n = 3$ ). Statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant su atitinkama kontrole: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Stjudento t-testas).

## DISKUSIJA

Šios disertacijos tikslas buvo įvertinti ir palyginti dviejų skirtingų strategijų efektyvumą apsaugant kardiomiocitus nuo H/R sukeltos pažaidos. Pirmoji strategija rėmėsi tiksliniu klasikinių antioksidantų (kurkumino ir vitamino E) pristatymu į kardiomiocitus naudojant sintetines polimerines pH jautrias nanodaleles. Antroji strategija tyrė natūralių vaistinės melisos (lot. *Melissa officinalis*) nanopūslelių kardioprotekcinį poveikį. Gauti rezultatai ne tik patvirtino PLGA nanodalelėse inkapsuliuotų kurkumino ir vitamino E pranašumą prieš laisvas šių vaistinių medžiagų formas tiesiogiai apsaugant mitochondrijų bioenergiją, bet ir atskleidė alternatyvų melisų nanopūslelių veikimo mechanizmą, pagrįstą kardiomiocitų metaboliniu perprogramavimu iš oksidacinio fosforilinimo į glikolizę. Siekiant objektyviai ir tiksliai išmatuoti šių skirtingų nanotransporto sistemų sukeltą apsauginį efektą, visų pirma reikėjo sukurti, standartizuoti ir patvirtinti patikimą ląstelių kultūros pažaidos modelį.

### **SARS-CoV-2 RBD fragmentas tiesiogiai pažeidžia kardiomiocitų bioenergiją ir sustiprina hipoksinę-reoksigenacinę pažaidą**

Prieš vertinant terapinį nanotransporto sistemų ir nanopūslelių poveikį, šiame darbe buvo įdiegtas ir validuotas *in vitro* H/R modelis naudojant pirmines neonatalinių žiurkių kardiomiocitų kultūras. Literatūroje nurodoma, kad pirminės kultūros, skirtingai nei linijinės ląstelės (pvz., H9c2), išlaiko autentišką kontraktilinį aparatą ir oksidacinio fosforilinimo mechanizmus, todėl geriausiai atspindi *in vivo* miokardo atsaką į išemiją [350, 351, 353]. Mūsų gauti rezultatai atitiko klasikinę ląstelinės pažaidos eigą: nustatytas kardiomiocitų sumažėjęs gyvybingumas, mitochondrijų disfunkcija (reikšmingai sumažėjusi ATP produkcija bei išnykęs laisvasis kvėpavimo pajėgumas) ir padidėjusi ROS gamyba. Nustatytas kardiomiocitų susitraukimų dažnio ir greičio sumažėjimas tiesiogiai atspindi po H/R atsirandančių ūminį kontraktilinį nepakankamumą, klinikinėje praktikoje žinomą kaip miokardo „prieššalimas“ [354].

Svarbu pažymėti, kad mūsų tyrime taikytas H/R modelis pasižymėjo dideliu jautrumu papildomiems išoriniams stresoriams. Pasaulinė COVID-19 pandemija atskleidė, kad virusinės kvėpavimo takų infekcijos kritiškai pablogina ŠKL sergančių pacientų prognozę ir neretai sukelia ūminį miokardo pažeidimą [88–90]. Nors pirminis COVID-19 taikynys yra plaučiai, tačiau, esant sunkiai ligos eigai, dėl viremijos ir audinių barjerų pažeidimo kraujotakoje atsiranda cirkuliuojančių viruso dalelių bei atsiskyrusių jų paviršiaus

baltymų, kurie tiesiogiai pasiekia širdies raumenį [91, 92]. Siekdami iširti šio reiškinio ląstelinius mechanizmus ir eliminuoti sisteminių veiksnių (pvz., sisteminės hipoksijos ar imuniteto ląstelių infiltracijos) įtaką, pirmame tyrimo etape (Keturakis ir kt.) sukūrėme specifinio molekulinio streso modelį – kardiomiocitus paveikėme SARS-CoV-2 spyglio baltymo RBD [4].

Toks pasirinkimas leido izoliuotai įvertinti pačią pirminę patologinę grandį – tiesioginį viruso RBD epitopo kontaktą su kardiomiocitų paviršiuje esančiais AKF2 receptoriais atmetant viruso replikacijos ląstelėje kintamuosius [91, 93]. Gauti rezultatai vienareikšmiškai parodė, kad net ir neturėdamas galimybės replikuotis, vien tik cirkuliuojantį viruso fragmentą imituojantis RBD epitopas veikia kaip stiprus pažaidos katalizatorius [4]. Nustatyta, kad RBD fragmentas reikšmingai sustiprina H/R sukliamą imunometabolinę pažaidą [4]. Nors normoksijos sąlygomis RBD poveikis ląstelių gyvybingumui buvo minimalus, tačiau H/R fone jis sukėlė didesnę ląstelių metabolinio aktyvumo nuosmukį ir kontraktilinės funkcijos paralyžių [4].

Šis kombinuotas efektas išryškėjo vertinant kardiomiocitų imuninio atsako aktyvumą. Mūsų duomenys parodė, kad izoliuota H/R pažaida pati savaime nesukelia žymaus uždegimo mediatorių generavimo. Tačiau situacija iš esmės pasikeičia kardiomiocitus iš anksto paveikiant RBD fragmentu. Tai lėmė drastišką uždegiminių genų (IL-6, Cxcl1, IL-1 $\beta$ ) mRNA raiškos padidėjimą ir masinę prouždegiminių citokinų sekreciją į tarpląstelinę terpę. Ypač reikšmingas buvo GM-CSF ir IL-6 koncentracijos padidėjimas.

Gauti duomenys parodė, kad SARS-CoV-2 RBD fragmentas ne tik tiesiogiai slopina kardiomiocitų metabolinį aktyvumą, bet ir indukuoja stiprų prouždegiminį atsaką. Luminex analizės rezultatai patvirtino, kad kardiomiocitai, paveikti RBD fragmento ir H/R sąlygų, reikšmingai padidina IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF ir TNF- $\alpha$  sekreciją [4]. Tai rodo, kad paveikti šio specifinio virusinio epitopo kardiomiocitai aktyviai dalyvauja formuojant lokalią uždegiminę mikroaplinką išskirdami chemotaktinius faktorius, pritraukiančius mieloidinės kilmės ląsteles [98, 119].

Šių prouždegiminių mediatorių transkripcija ir sekrecija yra didelių ATP sąnaudų reikalaujantis procesas. *Seahorse* analizė atskleidė, kad H/R ir RBD paveiktoje grupėje oksidacinis fosforilinimas yra stipriai slopinamas, o su kvėpavimu susieta ATP gamyba reikšmingai sumažėjusi [4]. Papildomas metabolinis krūvis, tenkantis citokinų sintezei H/R fone, dar labiau padidina viduląstelinį ATP deficitą. Nors šiame tyrime mPTP porų atsivėrimas ir kalcio jonų homeostazė nebuvo tiesiogiai vertinami, tačiau buvo nustatytas ūminis kardiomiocitų kontraktilinis nepakankamumas (sumažėjęs susitraukimų dažnis, prailgėjusi sistolė ir diastolė) atspindi žymų bioenergijos trūkumą. Sumažėjusi ATP produkcija tiesiogiai apriboja nuo energijos priklausomų jonų siurblių (pvz., Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazės ir sarkoplazminio tinklo Ca<sup>2+</sup>-ATPazės)

veiklą, kuri kritiškai svarbi normaliam kardiomiocitų elektromechaniniam ryšiui ir susitraukimo funkcijai palaikyti [40, 41].

Šiame darbe buvo nustatytas ūminis (3 val. poveikio) mitochondrijų kvėpavimo sumažėjimas normoksijos sąlygomis. Tradiciškai miokardo pažeidimas COVID-19 infekcijos metu siejama su antriniais veiksniais (sisteminė hipoksija dėl plaučių pažeidimo ar sisteminiu uždegimu).

Mūsų rezultatai atskleidė ūminį SARS-CoV-2 RBD fragmento poveikį kardiomiocitų bioenergijai. *Seahorse* analizė parodė, kad jau po 3 valandų inkubacijos su RBD epitopu normoksijos sąlygomis, dar neprasidėjus hipoksijai, reikšmingai sumažėjo ląstelių bazinis DSG bei su kvėpavimu susieta ATP gamyba [4]. Nors šiame tyrime tiesioginė RBD sąveika su kardiomiocitų AKF2 receptoriais ir jų molekulinė dinamika nebuvo tiesiogiai vertinta, tačiau nustatyti funkciniai pokyčiai leidžia daryti prielaidą apie receptorių nulemtą patologinę kaskadą. Remiantis literatūros duomenimis, RBD prisijungimas prie AKF2 sukelia šių receptorių internalizaciją ir degradaciją. Dėl to ląstelės aplinkoje kaupiasi angiotenzinas II ir per AT1 receptorių aktyvuoja NADPH oksidazę bei sukelia pirminį oksidacinį stresą [97, 360]. Mūsų užfiksuotas greitas ir reikšmingas maksimalaus kvėpavimo bei laisvojo kvėpavimo pajėgumo praradimas po ūmaus RBD poveikio [4] atitinka šį teorinį modelį ir parodo, kad ankstyvasis oksidacinis stresas galimai pažeidžia mitochondrijų elektronų pernašos grandinės kompleksus dar iki išeminio streso pradžios.

Nustatytas ankstyvas mitochondrijų pažeidžiamumas ir greitas energijos rezervo išsekvojimas tapo esminiu argumentu antrame tyrimo etape taikyti tikslines nanotransporto sistemas. Matydami, kad virusinis stresorius drastiškai sumažina kardiomiocitų adaptacinį potencialą prieš artėjančią hipoksiją, iškėlėme prielaidą, jog sėkminga ląstelių apsauga, esant H/R, įmanoma tik greitai ir tikslingai stabilizuojant mitochondrijų membranas. Kadangi laisvos formos antioksidantų didelės dozės gali sukelti papildomą toksiškumą ir nepasižymi specifiniu tropizmu pažeidžiamoms zonoms, dėl to pH jautrių polimerinių nanodalelių bei augalinių nanopūslelių panaudojimas buvo pasirinktas kaip strategija, leidžianti saugiai ir be citotoksiškumo pristatyti apsaugines molekules bei atkurti ląstelių bioenergijos balansą kritiniu pažeidimo momentu.

## **PLGA nanodalelių pranašumas prieš laisvas antioksidantų formas: tolygus vaistų atpalaidavimas**

Siekiant įveikti tradicinių antioksidantų farmakokinetinius apribojimus, šiame darbe buvo panaudotos polimerinės PLGA nanodalelės. PLGA kopolimeras buvo pasirinktas dėl dviejų esminių priežasčių: jo patvirtinto saugumo profilio (FDA ir EMA leidimai parenteriniam vartojimui) bei unikalių degradacijos savybių.

Sintezės metu parinkti technologiniai parametrai (PVA koncentracija, maišymo greitis) leido gauti stabilias monodispersines nanodaleles, kurių fizikinės ir cheminės savybės yra suderinamos su kardiomiocitų internalizacijos reikalavimais. Nustatytas 200–230 nm hidrodinaminis skersmuo bei neigiamas paviršiaus krūvis (nuo  $-6,5$  iki  $-12,4$  mV) [4] laikomi tinkamais ląsteliniam pasisavinimui per klitrino medijuojamą endocitozę bei makropinocitozę [338, 343]. Nors šiame tyrime skirtingų matmenų nanodalelių įtaka pasisavinimo efektyvumui nebuvo lyginama, vis dėlto gautos dalelės visiškai atitiko literatūroje aprašytą dydžio diapazoną, užtikrinantį stabilią koloidinę sistemą ir pakankamą internalizaciją į ląsteles; tą patvirtino ir mūsų atlikti vaizdinimo eksperimentai su PLGA-RhB konjugatais [4]. Mažas polidispersiškumo indeksas ( $PDI < 0,188$ ) papildomai pagrindžia sintezės protokolo stabilumą ir suspensijos vienalytiškumą, būtiną siekiant išvengti nanodalelių agregacijos *in vitro* eksperimentų metu. Gauti nanonešiklių parametrai leido užtikrinti reprodukuojamą antioksidantų pernašą į kardiomiocitus nekuriant papildomų metodologinių kintamųjų dėl dalelių matmenų heterogeniškumo.

Vienas svarbiausių šio tyrimo inovacinių sumanymų buvo išnaudoti išemijos/acidozės sukeliama pH pokytį kaip išorinį triggerį selektyviam vaistų atpalaidavimui. Išemijos metu miokarde dominuojantis anaerobinis metabolizmas lemia intensyvią laktato gamybą. Dėl to tarpląstelinės ir viduląstelinės terpės pH nukrenta nuo 7,4 iki 6,0–5,5. PLGA yra žinomas kaip biologiškai skaidus polimeras, tačiau jo esterinių ryšių hidrolizės greitis tiesiogiai priklauso nuo aplinkos rūgštingumo. Rūgštinėje terpėje padidėjusi protonų ( $H^+$ ) koncentracija sukelia autokatalitinį efektą, ypač paspartinantį polimerinės medžiagos skilimą [309].

Mūsų atlikti *in vitro* atpalaidavimo kinetikos tyrimai patvirtino šią hipotezę: esant pH 5,5 (imituojant išeminę acidozę), inkapsuluotas kurkuminas ir vitaminas E išsiskyrė 2–3 kartus sparčiau ir didesniais kiekiais nei esant fiziologiniam pH (7,4). Tai reiškia, kad sukurtos nanodalelės veikia kaip išmanioji mikroaplinkos moduluojama transporto sistema. Galima teigti, kad sisteminėje kraujotakoje tokios dalelės turėtų išlikti stabilios ir apsaugoti hidrofobinį krovinį nuo priešlaikinės degradacijos bei nesukelti sisteminio

poveikio sveikiems audiniams. Maksimali terapinė koncentracija būtų pasiekama tiksliai toje zonoje, kurioje pH yra sumažėjęs, t. y. pažeistame miokarde. Be to, patekusi į ląstelę per endocitozę, nanodalelė atsiduria endosomoje/lizosomoje, kur pH taip pat yra rūgštus (~5,0). Tai lemia greitą polimero degradaciją ir efektyvų veikliosios medžiagos atpalaidavimą į citozolį, iš kur ji gali pasiekti mitochondrijas [343].

### **Inkapsuliuoti antioksidantai pasižymi geresniu kardioprotekcinium poveikiu kardiomiocitams po hipoksijos-reoksigenacijos pažeidimo**

Tradiciškai antioksidantai laikomi saugiomis, ląsteles saugančiomis molekulėmis. Tačiau mūsų rezultatai atskleidė siaurą jų terapinį langą: laisvi kurkuminas ir vitaminas E didesnėmis dozėmis (10 µg/ml) pasižymėjo ryškiu citotoksiškumu kardiomiocitams net normoksijos sąlygomis ir smarkiai sumažino ląstelių gyvybingumą.

Šis reiškinys turi biocheminį paaiškinimą. Laisvas vitaminas E ( $\alpha$ -tokoferolis), veikdamas kaip antioksidantas ir neutralizuodamas lipidų peroksilo radikalą, pats virsta tokoferoksilo radikalų. Fiziologinėmis sąlygomis šis radikalą atgal į aktyvią formą redukuoja ląstelės viduje esantis vitaminas C (askorbatas) arba glutationas. Tačiau kai į ląstelę staiga patenka didelė laisvo vitamino E dozė (boliusas), ląstelės endogeninių ko-antioksidantų nepakanka jam regeneruoti. Tada pasireiškia vadinamoji „tokoferolio sukeltos peroksidacijos“ (angl. *Tocopherol-Mediated Peroxidation*, TMP) reakcija: pats tokoferoksilo radikalas pradeda atakuoti polinesočiąsias riebalų rūgštis plazminėje membranoje veikdamas kaip prooksidantas ir sukeldamas ląstelės žūtį [277, 359]. Tai galimai paaiškina, kodėl daugelis didelės apimties klinikinių tyrimų (pvz., CHAOS, GISSI) [272, 273], kai pacientams buvo skiriamos didelės laisvo vitamino E dozės, nesukėlė laukto kardioprotekcinio efekto ar net padidino mirtingumą. Laisvo vitamino E didelės koncentracijos pažeidžia ląstelės membranas ir sukelia toksinį šoką.

Būtent čia ir praverčia nanodalelių inkapsuliuojimas. Kai tos pačios (10 µg/ml) koncentracijos kurkuminas ir vitaminas E buvo inkapsuliuoti į PLGA nanodaleles, buvo pastebėtas ne tik visiškai išnykęs toksiškumas, bet ir stipriausias kardioprotekcinis poveikis H/R sąlygomis – ląstelių gyvybingumas reikšmingai padidėjo, susitraukimų parametrai normalizavosi, o ROS lygis sumažėjo. Nanonešiklis, laipsniškai ir kontroliuojamai atpalaiduodamas antioksidantą ląstelės viduje, neleidžia susidaryti staigiam antioksidanto koncentracijos pikui.

Vertinant specifinį šių medžiagų poveikį, kurkuminas literatūroje dažniausiai minimas kaip sisteminis priešuždegiminis agentas (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$

slopiklis). Kadangi mūsų naudotame ląsteliniame *in vitro* modelyje cirkuliuojančių imuninių ląstelių (kurios būtų pagrindinis citokinų šaltinis) nebuvo, todėl PLGA-Cur sukeltas efektas įrodė tiesioginį kurkumino poveikį kardiomiocitams. *Seahorse* analizė patvirtino, kad PLGA-Cur reikšmingai pagerino mitochondrijų funkciją – padidino bazinį ir maksimalų kvėpavimą.

Mūsų tyrime gauti *Seahorse* analizės rezultatai parodė, kad PLGA-Cur po H/R pažeidos reikšmingai išsaugojo mitochondrijų bazinį ir maksimalų kvėpavimą bei su ATP gamyba susijusį deguonies suvartojimą, o MitoSOX duomenys patvirtino sumažėjusią ROS gamybą. Nors šiame darbe tiesioginiai molekuliniai kurkumino taikiniai (pvz., baltymų raiška ar lipidų peroksidacijos laipsnis) nebuvo vertinami, visgi mūsų stebimas funkcinis bioenergijos išsaugojimas koreliuoja su kitų tyrėjų aprašytais kardioprotekciniais mechanizmais. Pavyzdžiui, Ashrafizadeh ir kt. (2020) bei Wu ir kt. (2020) *in vitro* modeliuose įrodė, kad kurkuminas aktyvuoja Nrf2/HO-1 ašį padidindamas ląstelės endogeninį antioksidacinį pajėgumą ir atsparumą oksidaciniam stresui [8, 164]. Tikėtina, kad mūsų modelyje nustatytas ROS sumažėjimas ir gyvybingumo padidėjimas yra nulemtas panašių viduląstelių adaptacinių procesų. Kadangi H/R sukeltas mPTP porų atsivėrimas klasiškai lemia visišką mitochondrijų membranos potencialo išnykimą ir oksidacinio fosforilinimo sustabdymą [5], todėl mūsų užfiksuotas ATP gamybos parametrų atsistatymas PLGA-Cur grupėje netiesiogiai rodo, jog kritinis slenkstis mPTP atsivėrimui nebuvo pasiektas. Norint galutinai patvirtinti šiuos specifinius apsaugos mechanizmus (Nrf2 aktyvaciją ir mPTP slopinimą) nanodalelių fone, būtini tolesni tiksliniai molekuliniai tyrimai.

Mūsų tyrime PLGA-vit. E nanodalelės pademonstravo stipriausią kardioprotekcinį efektą: buvo nustatytas ne tik didžiausias kardiomiocitų gyvybingumas po H/R pažeidos, bet ir reikšmingas mitochondrijų bioenergijos atsistatymas. *Seahorse* analizė parodė, kad PLGA-vit. E grupėje su ATP gamyba susietas deguonies suvartojimo greitis (DSG) ir laisvasis kvėpavimo pajėgumas buvo vidutiniškai 30 proc. didesni lyginant su negydyta H/R grupe [4].

Šis bioenergijos stabilumas yra tiesiogiai susijęs su specifiniu vitamino E lokalizavimusi mitochondrijų vidinėje membranoje (MVM). MVM pasižymi unikaliumi sudėtimi, kurioje gausu kardiolipino – fosfolipido, būtino elektronų pernašos grandinės superkompleksams formuotis ir stabilizuoti [247, 248]. Reoksigencijos fazėje susidarantis didesnis ROS kiekis sukelia grandinės lipidų peroksidacijos reakcijas, kurioms kardiolipinas yra itin jautrus dėl savo polinesočiųjų riebalų rūgščių liekanų. Kardiolipino oksidacija sukelia elektronų pernašos grandinės superkompleksų destabilizaciją. Dėl to sutrinka efektyvus elektronų perdavimas tarp I, III ir IV kompleksų, didėja elektronų nuotekis bei generuojamas papildomas ROS kiekis [249].

Tikėtina, kad dėl PLGA-vit. E nanotransporto sistemos užtikrinta ir kontroliuojama vitamino E koncentracija efektyviai nutraukia peroksidacijos kaskadą būtent MVM lygmenyje. Neutralizuodamas lipidų peroksilo radikalus, vitaminas E apsaugo kardiolipino molekulinį vientisumą ir taip išsaugo elektronų pernašos grandinės superkompleksų struktūrinę integraciją. Tai tiesiogiai paaiškina mūsų užfiksuotą 30 proc. didesnę laisvąjį kvėpavimo pajėgumą: struktūriškai stabilizuoti EPG kompleksai leidžia mitochondrijoms išlaikyti didesnę funkcinę rezervą ir efektyviau reaguoti į metabolinį stresą (FCCP stimuliaciją) [4]. Be to, mitochondrijų vidinės membranos vientisumo išsaugojimas užkerta kelią nespecifiniam protonų nuotekiui atgal į mitochondrijų matricą ir leidžia palaikyti optimalų elektrocheminį gradientą ( $\Delta\psi_m$ ) bei užtikrina maksimalų ATP sintazės (V komplekso) našumą. Vadinasi, PLGA-vit. E poveikis kardiomiocitų išgyvenamumui nulemtas ne tik bendros antioksidacinės apsaugos, bet ir specifinio mitochondrijų stabilizavimo.

### **Vaistinės melisos nanopūslelių sukeltas metabolinis perprogramavimas – apsauginis mitochondrijų slopinimas ir glikolizės aktyvinimas**

Antra šio tyrimo dalis buvo skirta natūralių vaistinės melisos nanopūslelių poveikio analizei. Skirtingai nei sintetinės PLGA nanodalelės, veikiančios kaip tikslinio poveikio nešikliai skirti konkrečiai veikliajai medžiagai, MO NP pasižymi kompleksine sudėtimi. Mūsų atlikta UPLC analizė patvirtino, kad šiose pūslelėse yra sukonzentruoti polifenoliniai junginiai, pvz., rozmarino ir kofeino rūgštys (8 pav.). Nors pradinė hipotezė rėmėsi prielaida, kad MO NP veiks kaip tiesioginiai antioksidantų nešikliai (analogiškai PLGA sistemoms), tačiau gauti bioenerginiai rodikliai atskleidė kitokį kardiomiocitų atsako profilį.

Eksperimentų duomenys parodė, kad MO NP moduliuoja kardiomiocitų energijos metabolizmą ne tik per oksidacinio streso slopinimą, bet ir per tiesioginį poveikį bioenerginiams parametrams. *Seahorse* analizė atskleidė, kad ir normoksijos, ir H/R sąlygomis MO NP reikšmingai sumažina mitochondrijų DSG, maksimalų kvėpavimą bei su kvėpavimu susietą ATP gamybą [4]. Kartu buvo užfiksuotas neigiamas chronotropinis efektas – kardiomiocitų susitraukimų dažnio sumažėjimas. Nepaisant šio sisteminio bioenergijos slopinimo, ląstelių gyvybingumas po H/R pažaidos MO NP grupėje buvo maždaug 30 proc. didesnis nei kontrolinėje grupėje [4].

Šis dėsningumas (sumažėjęs mitochondrijų kvėpavimas esant didesniam išgyvenamumui) buvo detalčiau paaiškintas vertinant URG. Statistiškai reikš-

mingas URG padidėjimas MO NP grupėje rodo suaktyvėjusią laktato produkciją; tas indikuoja kardiomiocitų energijos profilio poslinkį link anaerobinės glikolizės. Toks metabolinis perprogramavimas (*metabolic reprogramming*) primena embrioniniam miokardui būdingą energinę adaptaciją arba vėžinėse ląstelėse vykstantį Varburgo efektą, kai energijos gamyba perorientuojama į glikolizę net ir esant pakankamai deguonies sklaidai [39].

H/R pažaidos kontekste šis metabolinis perėjimas vertintinas kaip apsauginė strategija. Žinoma, kad intensyvios reoksigenacijos momentu pažeista mitochondrijų elektronų pernašos grandinė (ypač I ir III kompleksai) nesugeba efektyviai perduoti elektronų, todėl jie tiesiogiai redukuoja molekulinį deguonį generuodami masinį ROS kiekį [37]. MO NP sukeltas DSG sumažėjimas rodo apribotą elektronų srautą per mitochondrijas. Tai leidžia daryti prielaidą, kad mitochondrijų aktyvumo sumažinimas prieš reoksigenaciją prevenciškai apriboja ROS pliūpsnio tikimybę; tą patvirtino ir mūsų atlikti matavimai *MitoSOX* zondų [4]. Tuo metu suaktyvinta glikolizė užtikrina minimalų ATP kiekį, būtina jonų homeostazei ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazei) palaikyti ir taip išvengti negrįžtamos ląstelių pažaidos [39].

Mechanizmas, kuriuo MO NP sukelia šį perprogramavimą, galimai yra kompleksinis. Nustatyta didelė rozmarino rūgšties koncentracija pūslelėse gali tiesiogiai moduluoti mitochondrijų fermentų veiklą. Tačiau remiantis naujausia literatūra, galima kelti hipotezę dėl tarparalystinės genų raiškos reguliacijos, medijuojamos augalinių miRNR. Augalinės miRNR (pvz., miR156, miR168) pasižymi 2'-O-metiliniu, apsaugančiu jas nuo degradacijos žinduolių ląstelėse [318]. Nors šiame tyrime miRNR poveikis nebuvo tiesiogiai matuojamas, tačiau literatūroje aprašytas jų gebėjimas slopinti mTOR kelią ar mitochondrijų biogenezės genus sutampa su mūsų pastebėtu bioenerginio fenotipu [310, 317]. Todėl galima daryti pagrįstą prielaidą, kad MO NP veikia ne tik kaip polifenolių šaltinis, bet ir kaip bioaktyvi sistema, laikinai pakeičianti kardiomiocitų energijos režimą saugesniu glikolitinium modeliu.

## **Tyrimo klinikinio ir praktinio pritaikymo perspektyvos**

Šios disertacijos rezultatai atveria naujas, klinikinei praktikai ypač aktualias perspektyvas sprendžiant miokardo reperfuzinės pažaidos problemą. Nors PTVAA yra ŪMI gydymo „auksinis standartas“, vis dėlto dar neturime vaisto, kuris efektyviai užkirstų kelią ląstelių pažeidimui reperfuzijos momentu. Mūsų tyrimas siūlo dvi labai aiškias kryptis.

PLGA yra vienas iš nedaugelio nanopolimerų, jau turinčių FDA ir EMA patvirtinimą vartoti žmonėms, todėl kelias į klinikinius tyrimus atviras. Praktiškai šios nanodalelės galėtų būti suleidžiamos intrakoronariškai (tiesiai

į vainikinę arteriją) per kateterį PTVAA procedūros metu likus kelioms minutėms iki stento išplėtimo ir kraujotakos atkūrimo. Dėl PLGA pH jautrumo nanodalelės kraujotakoje išliktų stabilios, tačiau atsidūrusios išemijos pažeistose zonoje, kur audinių pH yra stipriai sumažėjęs dėl laktato sankaupos, imtų greitai skaidytis [341]. Tai užtikrintų masinį antioksidanto atpalaidavimą būtent toje vietoje ir tuo laiku, kai susidaro ROS pliūpsnis, ir taip užkirstų kelią mitochondrijų membranų peroksidacijai [342]. Be to, šios nanodalelės galėtų būti įmaišomos į kardiopleginius tirpalus atliekant atviras širdies operacijas (aortos vainikinių jungčių suformavimą), kur miokardas taip pat patiria kontroliuojamą išemiją ir reperfuziją.

Vaistinės melisos nanopūslelių pademonstruotas gebėjimas sukelti ląstelių oksidacinio fosforilinimo slopinimą ir perėjimą prie glikolizės yra perspektyvus transplantologijai. Viena didžiausių širdies persodinimo problemų yra saugus donoro organo išlaikymas transportavimo metu. Pridėjus MO NP į organų konservavimo tirpalus, donoro širdies metabolinis greitis galėtų būti laikinai sumažintas ir apsaugotų audinius nuo išemijos-reperfuzijos smūgio tausojant ATP rezervus ir slopinant oksidacinį stresą transplantacijos metu.

Kadangi augalinės kilmės nanopūslelės pasižymi stabilumu rūgštinėje skrandžio terpėje bei atsparumu virškinimo fermentų poveikiui [112, 114, 117], jos gali sėkmingai pasiekti žarnyną ir būti pasisavinamos per žarnyno epitelio ląsteles [113, 120]. Atsižvelgiant į tai, kad daugelis augalų nanopūslelių yra išskiriamos iš valgomųjų augalų ir pasižymi minimaliu imunogeniškumu bei geru biosuderinamumu, todėl vertinamos kaip saugi platforma terapinių molekulių peroraliam pristatymui [114, 120]. Ateityje šios nanopūslelės galėtų būti tiriamos kaip peroraliniai papildai ar funkcinis maistas lėtinei miokardo apsaugai siekiant per ilgalaikę tarparalystinę genų raiškos moduliaciją padidinti kardiomiocitų atsparumą oksidaciniam stresui bei išeminei pažaidai [112, 317].

## **Tyrimo ribotumai ir ateities perspektyvos**

Nors šiame darbe gauti originalūs ir inovatyvūs rezultatai reikšmingai praplečia supratimą apie nanomedicinos pritaikymą kardiologijai, visgi būtina atsižvelgti į tyrimo ribotumus, kurie nurodo kelius tolesniems moksliniams ieškojimams.

Pagrindinis tyrimo objektas buvo išskirti pirminiai žiurkės kardiomiocitai *in vitro* modelyje. Nors šis modelis leidžia tirti molekulinis, mitochondrinis ir bioenerginis mechanizmus, vis dėlto jis negali visiškai atspindėti sudėtingos viso organizmo *in vivo* sistemos. Mūsų modelyje nebuvo vertinamas sisteminis imuniteto (cirkuliuojančių makrofagų, T-limfocitų,

neutrofilų infiltracijos) indėlis į H/R pažeidimą, neurohormoninės sistemos įtaka bei hemodinaminiai kraujospūdžio pakitimai. Klinikinėje praktikoje reperfuzinės pažeidimos apimtis stipriai priklauso nuo uždegiminių ląstelių, atkeliaujančių su atsikuriančia kraujotaka sukeliama antrinio pažeidimo. Nors nustatėme, kad kardiomiocitai patys išskiria chemotaktinius citokinus (GM-CSF, IL-6), tačiau tikra šio reiškinio patologinė prasmė galėtų būti patvirtinta tik atlikus tyrimus su bendra kultūra kartu su imuninėmis ląstelėmis arba taikant *in vivo* miokardo infarkto (LAD arterijos perrišimo) modelius gyvūnams ir vertinant infarkto zonos dydį (TTC dažymu) bei širdies funkcinio pajėgumo pakitimus echokardiografijos metodu.

Nors šiame darbe užfiksavome specifinę kardiomiocitų metabolinio profilio poslinkį link glikolitinės energijos gamybos veikiant MO NP, tačiau tikslus šio reiškinio molekulinis mechanizmas reikalauja tolesnių detalių tyrimų. Prielaida, kad šis perprogramavimas gali būti tarparalystinės genų raiškos reguliacijos rezultatas, daroma remiantis mūsų nustatytu bioenergijos fenotipu (DSG slopinimu ir URG didėjimu) bei publikuotais duomenimis apie augalinių nanopūslelių miRNR stabilumą ir jų gebėjimą tiesiogiai taikytis į žinduolių metabolinius kelius [112, 317, 318].

Siekiant šią hipotezę pagrįsti empiriškai, ateities tyrimuose būtina atlikti MO NP RNR-sekvenavimą (angl. RNA-seq) tiksliai identifikuojant esamas miRNR sekas ir pritaikyti proteominę bei transkriptominę kardiomiocitų analizę. Tai leistų nustatyti, ar pastebėtas mitochondrijų funkcijos slopinimas yra susijęs su specifinių genų, koduojančių elektronų pernašos grandinės kompleksus ar pagrindinius metabolinius reguliatorius (pvz., mTOR, AMPK signalinius kelius ar PGC-1 $\alpha$  ekspresiją), nutildymu. Be to, tyrimo išplėtimas naudojant žmogaus indukuotų pluriopotencinių kamieninių ląstelių kilmės kardiomiocitus (hiPSC-CMs), suteiktų esminių žinių apie šių mechanizmų relevantiškumą žmogaus organizmo biologijai ir padėtų pagrindą klinikiniam MO NP taikymui. Nepaisant minėtų ribotumų, atliktas darbas pagrindžia inovatyvių nanotransporto sistemų perspektyvas gerinti kardiomiocitų atsparumą stresui ir suformuoja pagrindą tolesniam jų taikymui praktinėje medicinoje.

## IŠVADOS

1. *In vitro* H/R modelis, kartu veikiant SARS-CoV-2 RBD fragmentui (100 ng/ml), sukėlė bioenergetinį nepakankamumą kardiomiocitų kultūroje: ląstelių gyvybingumo sumažėjimą iki 70 proc. (papildomas 10 proc. nuosmukis lyginant su izoliuota H/R pažaida), mitochondrinės ATP gamybos normoksijos sąlygomis sumažėjimą 30 proc., bei laisvojo kvėpavimo pajėgumo sumažėjimą 50 proc. Taip pat sutrikdė kontraktilinę funkciją: susitraukimų dažnis sumažėjo iki 3 k./s (lyginant su 4,2 k./s izoliuoto H/R atveju ir 6,6 k./s normoksijoje), sistolės trukmė prailgėjo iki 0,33 s (izoliuoto H/R atveju – 0,27 s, normoksijoje – 0,15 s), o diastolės trukmė pailgėjo iki 0,085 s (izoliuoto H/R atveju – 0,08 s, normoksijoje – 0,06 s).

Be to, SARS-CoV-2 RBD fragmentas veikė kaip uždegimą sukeliantis stresorius: H/R sąlygomis jis padidino IL-6 genų raišką 2,5 karto, Cxcl1 – 2,6 karto, o IL-1 $\beta$  – daugiau nei 4 kartus. Baltymų sekrecijos lygmenyje tai išprovokavo statistiškai patikimą ( $p < 0,001$ ) citokininų gamybos šuolį: GM-CSF koncentracija išaugo nuo 0,25 iki 2,0 pg/ml, IL-1 $\beta$  – nuo 0,5 iki 1,5 pg/ml, IL-6 – nuo 1,0 iki 7,0 pg/ml, o TNF- $\alpha$  – nuo 0,01 iki 0,2 pg/ml (palyginimui, izoliuoto H/R atveju bazinė TNF- $\alpha$  koncentracija padidėjo tik nuo 0,9 iki 1,4 pg/ml).

2. PLGA nešiklis leido į ląstelių vidų saugiai pernešti 10  $\mu$ g/ml antioksidantų koncentraciją, kuri laisvoje formoje (ištirpinta DMSO) buvo citotoksiška: laisvas vitaminas E kardiomiocitų metabolinį aktyvumą normoksijos sąlygomis sumažino 32 proc. (gyvybingumas nukrito iki 68 proc.). Dėl pH priklausomo skilimo, antioksidantai rūgštinėje aplinkoje (pH 5,5) buvo atpalaiduojami 2,5 karto sparčiau nei esant pH 7,4 (per 110 val. išsiskyrė 100 proc. kurkumino ir 75 proc. vitamino E). Toks laipsniškas atpalaidavimas H/R sąlygomis PLGA-vit. E grupėje gyvybingumą padidino 26 proc., susitraukimo laiką sutrumpino nuo 0,2 s į 0,1 s ir padidino susitraukimų dažnį iki 14 k./s.

Priešingai, vaistinės melisos nanopūslelės (8  $\mu$ g/ml dozė) normoksijos sąlygomis slopino gyvybingumą bei kontrakcijas: susitraukimo laiką prailgino 2 kartus, o dažnį suretino 3 kartus (nuo 18 iki 6 k./s). Tačiau po H/R pažeidimo ši dozė gyvybingumą padidino 30 proc., sutrumpino bendrą susitraukimo trukmę 2,5 karto (nuo 0,3 s iki 0,12 s) ir padidino susitraukimų dažnį 2,5 karto (nuo 4 iki 10 k./s).

3. PLGA nanodalelės (užpildytos kurkuminu ir vitaminu E) stabilizavo mitochondrijų kvėpavimo funkciją H/R sąlygomis. PLGA-vit. E grupėje bazinis kvėpavimas padidėjo nuo 125 iki 185 pmol/min./mg baltymo, maksimalus kvėpavimas išaugo nuo 290 iki 450 pmol/min./mg, laisvasis kvėpavimo pajėgumas pakilo nuo 165 iki 265 pmol/min./mg, o su kvėpavimu susijusi ATP gamyba padidėjo nuo 60 iki 90 pmol/min./mg. Tuo tarpu vaistinės melisos nanopūslelės (esant 8  $\mu$ g/ml dozei) H/R sąlygomis statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) slopino maksimalų mitochondrijų kvėpavimą (sumažino nuo 250 iki 150 pmol/min./mg baltymo) bei su juo susietą ATP gamybą (nuo 55 iki 15 pmol/min./mg baltymo), kas apribojo ROS gamybą. Tuo pat metu aktyvėjo glikolizė: užląstelinio rūgštėjimo greitis (URG) padidėjo 2 kartus – nuo 50 iki 100 mpH/min./0,02 mg baltymo ( $p < 0,01$ ).

## PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Remiantis atlikto tyrimo rezultatais, teikiamos šios rekomendacijos:

1. Siekiant apsaugoti miokardą nuo reoksigenacijos sukulto oksidacinio streso, rekomenduojama lipofilinius antioksidantus (vitaminą E, kurkuminą) vartoti inkapsuliuotus į polimerinius nešiklius (pvz., PLGA). Tai leidžia kardiomiocituose saugiai pasiekti iki 10  $\mu\text{g/ml}$  terapinę koncentraciją, kuri, šio tyrimo duomenimis, būdama laisvos formos, sukelia stiprų citotoksinį poveikį (> 40 proc. sumažėjusį ląstelių metabolinį aktyvumą).
2. Kuriant vaistų pristatymo sistemas kardiologijai, tikslinga naudoti pH jautrius polimerus, kurių degradacija paspartėja esant pH 5,5. Tai leidžia užtikrinti selektyvų antioksidantų atpalaidavimą būtent išemijos/hipoksijos pažeistose zonose – kur vystosi metabolinė acidozė – ir taip minimizuoti sisteminį poveikį fiziologinio pH (7,4) audiniams.
3. Vertinant kardiomiocitų apsaugos strategijas, rekomenduojama tirti MO NP kaip priemonę, sukeliančią laikiną kardiomiocitų bioenergijos slopinimą. Šis metodas gali būti taikomas kaip prevencinė priemonė, leidžianti sumažinti deguonies poreikį ir mitochondrijų ROS produkciją kritiniu reoksigenacijos momentu.
4. Remiantis nustatytu MO NP poveikiu kardiomiocitų bioenergetikai (oksidacinio fosforilavimo slopinimu ir neigiamu chronotropiniu efektu), siūloma tirti šių nanopūslelių integraciją į kardiopleginius bei organų konservavimo tirpalus transplantologijoje. Tai galėtų padėti apsaugoti donorinį miokardą nuo energijos išsekimo ir oksidacinės pažeidimo transportavimo bei operacijos metu.
5. Eksperimentiniuose ir ikiklinikiniuose tyrimuose su MO NP būtina griežtai kontroliuoti dozavimą ir neviršyti 20  $\mu\text{g/ml}$  (skaičiuojant pagal pūslelių baltymą) koncentracijos, nes didesnės dozės pasižymi citotoksiškumu ir negrįžtamai sutrikdo bazinį kardiomiocitų metabolinį aktyvumą.
6. Planuojant ikiklinikinius tyrimus *in vivo*, rekomenduojama prioritetą teikti PLGA-vit. E nanodalelių intrakoronariniam skyrimui (pvz., prieš atkuriant kraujotaką vainikinėje arterijoje). Mūsų tyrime būtent šis derinys pademonstravo didžiausią potencialą stabilizuojant kardiomiocitų bioenergiją (ATP gamybą ir laisvąjį kvėpavimo pajėgumą) po hipoksijos-reoksigenacijos pažeidimo.

## REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Charakteristika	PLGA-Cur	PLGA-vit. E	MO NP
Medžiaga	Hidrofobinis polifenolis iš ciberžolės	Hidrofobinis vitaminas (antioksidantas)	Natūralios augalinės kilmės vezikulės su polifenoliais (rozmarino r. ir kt.) bei miRNR
Nešiklio tipas	Sintetinis kopolimeras (PLGA)	Sintetinis kopolimeras (PLGA)	Nėra (pati nanopūslelė yra natūralus lipidinis nešiklis)
Optimali koncentracija	10 µg/ml (PLGA formoje)	10 µg/ml (PLGA formoje)	8 µg/ml (pagal pūslelių baltymą)
Poveikis gyvybingumui (H/R)	Reikšmingai padidino (~20 proc.), efektyviau nei laisva forma	Didžiausias efektas (~26 proc. padidėjimas), visiškai neutralizuotas laisvos formos toksiškumas	Reikšmingai padidino (~30 proc.), tačiau pasižymi siauru terapiniu langu
Poveikis mitochondrijų kvėpavimui	Padidino bazinį ir maksimalų kvėpavimą, atkūrė bioenergijos funkciją	Stipriausiai atkūrė ATP gamybą ir laisvąjį kvėpavimo pajėgumą	Sumažino O <sub>2</sub> suvartojimą (DSG), bet kompensaciškai suaktyvino glikolizę (padidėjo URG)
Poveikis ROS gamybai	Reikšmingai sumažino	Efektyviausiai neutralizavo ROS produkciją (lipidų peroksidacijos prevencija)	Sumažino (dėl tikslingo oksidacinio fosforilavimo slopinimo)
Funkcinis poveikis (kontrakcijos)	Atkūrė susitraukimo parametrus	Stipriai pagerino, reikšmingai sutrumpino sistolės ir diastolės trukmę	Neigiamas chronotropinis efektas – stipriai sulėtino susitraukimų dažnį
Sąsajos su literatūra	Atitinka [216, 344] tyrimus (inkapsuliacija į polimerus reikšmingai didina efektyvumą)	Papildo ir praplečia [317] tyrimus įrodant nanonešiklio būtinybę toksiniam pikui (TMP) išvengti	Apsauginis mechanizmas pagrįstas metaboliiniu perprogramavimu, panašiu į Varburgo efektą
Pagrindinis veikimo mechanizmas	Antioksidacinis, mitochondrijų membranos potencialo palaikymas	Membranų stabilizavimas, tiesioginė lipidų peroksidacijos prevencija	Mitochondrijų kvėpavimo slopinimas ir perėjimas prie glikolizės
Galimas klinikinis potencialas	Tikslinė terapija esant dideliame oksidaciniam stresui	Ūminė reperfuzijos terapija mitochondrijų membranų apsaugai (pvz., PTVAA metu)	Organų apsauga per metabolinį perprogramavimą (deguonies poreikio sumažinimą)

# SUMMARY

## ABBREVIATIONS

<b>ACE2</b>	–	angiotensin-converting enzyme 2
<b>AMI</b>	–	acute myocardial infarction
<b>ANOVA</b>	–	analysis of variance
<b>ARRIVE</b>	–	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experiments
<b>ATP</b>	–	adenosine triphosphate
<b>cTnT</b>	–	cardiac troponin T
<b>Cur</b>	–	curcumin
<b>CVD</b>	–	cardiovascular diseases
<b>DLS</b>	–	dynamic light scattering
<b>DMEM</b>	–	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	–	dimethyl sulfoxide
<b>ECAR</b>	–	extracellular acidification rate (indicates glycolysis)
<b>EE</b>	–	encapsulation efficiency
<b>FCCP</b>	–	carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine
<b>GM-CSF</b>	–	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>H/R</b>	–	hypoxia-reoxygenation
<b>IL</b>	–	interleukin (e.g., IL-1 $\beta$ , IL-6)
<b>I/R</b>	–	ischaemia-reperfusion
<b>LC/MS-MS</b>	–	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
<b>miRNA</b>	–	microRNA
<b>MO NV</b>	–	<i>Melissa officinalis</i> (latin) nanovesicles
<b>mPTP</b>	–	mitochondrial permeability transition pore
<b>mRNA</b>	–	messenger ribonucleic acid
<b>MWCO</b>	–	molecular weight cut-off
<b>N</b>	–	normoxia
<b>ND</b>	–	nanoparticles (typically referring to synthetic PLGA)
<b>NTA</b>	–	nanoparticle tracking analysis
<b>OCR</b>	–	oxygen consumption rate (indicates mitochondrial respiration)
<b>PDI</b>	–	polydispersity index
<b>PDNV</b>	–	plant-derived nanovesicles
<b>PLGA</b>	–	poly(lactic-co-glycolic acid)
<b>RBD</b>	–	receptor-binding domain (of the SARS-CoV-2 spike protein)
<b>ROS</b>	–	reactive oxygen species
<b>SARS-CoV-2</b>	–	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
<b>SEM</b>	–	scanning electron microscopy
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	–	tumor necrosis factor-alpha
<b>vit. E</b>	–	vitamin E (alpha-tocopherol)

## INTRODUCTION

### Relevance of the research

Preventing tissue damage during blood flow restoration after a myocardial infarction is still a major clinical challenge. Cardiovascular diseases (CVD) are the primary cause of global mortality [1], with acute myocardial infarction (AMI) representing the most severe form. The standard treatment for AMI is rapid reperfusion. While necessary, this process triggers ischemia-reperfusion (I/R) injury [2]. At the cellular level, I/R is simulated as hypoxia-reoxygenation (H/R). This stress causes a massive release of reactive oxygen species (ROS), intracellular calcium overload, and the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), leading to irreversible cardiomyocyte death [3, 5].

Our study results suggest that cardiomyocyte injury is further exacerbated by external factors, including systemic inflammatory signals and viral components. In this study, we used an *in vitro* model, where the SARS-CoV-2 spike protein RBD interacted with ACE2 on cardiomyocytes, contributing to impaired mitochondrial bioenergetics and increased secretion of pro-inflammatory cytokines. This engagement appears to intensify the baseline ischemia/reperfusion injury, highlighting the role of immunometabolic stress in amplifying cellular dysfunction [4].

Antioxidants like curcumin [6] and vitamin E [7] have the theoretical potential to reduce this damage. Curcumin activates the Nrf2 pathway to neutralize free radicals [8], while vitamin E protects membranes against lipid peroxidation [9]. However, their clinical application is heavily limited by poor water solubility, low bioavailability, and non-specific tissue distribution [7, 10].

Targeted administration systems are required to bypass these pharmacokinetic limits [11]. Synthetic poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles are able to encapsulate hydrophobic drugs, preventing their degradation and providing controlled release [12]. Alternatively, plant-derived nanovesicles (PDNVs) offer another effective platform [13]. Compared to standard plant extracts, these nanovesicles penetrate tissues better, enter cells more easily, and provoke less immune response. *Melissa officinalis* nanovesicles (MO NVs) are particularly relevant due to their high content of polyphenols (e.g., rosmarinic acid) and small RNAs, which can regulate mammalian cellular processes across kingdoms [14, 15].

## Scientific novelty of the work

1. The study describes a “double-hit” in vitro model combining H/R stress with viral exposure (SARS-CoV-2 RBD fragment). This approach stresses mitochondrial bioenergetics as a primary target in multifactorial cardiomyocyte injury [4].
2. We utilized a pH-sensitive PLGA nanoparticle system (developed at Acibadem University, Turkey) designed to release therapeutic agents rapidly in acidic environments (pH 5.5), which are typical of ischemic tissues [341, 342]. This design decreases the cytotoxicity usually associated with high doses of free antioxidants [359].
3. The research uncovers the specific mechanism by which *Melissa officinalis* nanovesicles provide cardioprotection. MO NVs trigger metabolic reprogramming, shifting cellular energy production from oxidative phosphorylation to glycolysis to limit ROS-induced damage [4, 39].
4. Results suggest that plant extracellular vesicles (EVs) act as epigenetic modulators of mammalian mitochondria during stress via cross-kingdom regulatory pathways [318, 319].

## The aim of the study

This study attempts to evaluate changes in cardiomyocyte functional states under replicated hypoxia-reoxygenation and SARS-CoV-2 RBD exposure, and to determine the cardioprotective efficacy of curcumin- and vitamin E-loaded PLGA nanoparticles versus natural *Melissa officinalis* nanovesicles.

## Objectives of the study

1. To evaluate the impact of the SARS-CoV-2 RBD fragment on the magnitude of hypoxia-reoxygenation injury in cultured cardiomyocytes.
2. To assess how curcumin- and vitamin E-loaded nanoparticles and *Melissa officinalis* nanovesicles affect cell viability and contractility during H/R stress.
3. To determine the extent to which these synthetic and natural nanocarriers preserve mitochondrial function following H/R injury.

## MATERIALS AND METHODS

### Primary cardiomyocyte isolation and cultivation

The main experimental model in this study was a primary culture of cardiomyocytes obtained from 4–6-day-old neonatal Wistar rat pups. All procedures were carried out in strict compliance with the Republic of Lithuania Law on the Care, Keeping, and Use of Animals and followed ARRIVE guidelines.

Neonatal rats were euthanized using the decapitation method and dissected using sterile instruments. After that the hearts were quickly removed and immediately placed in cold, calcium- and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO®, UK). The ventricles were dissected, finely minced into fragments smaller than 1 mm<sup>3</sup>, and subjected to enzymatic digestion overnight at 4 °C in a solution of 2.5% trypsin-EDTA supplemented with papain (10 U per heart; Sigma-Aldrich, Germany).

Following incubation, the tissue was mechanically homogenized using Pasteur pipettes of decreasing diameters. The resulting cell suspension was centrifuged twice at 700 g for 5 minutes. Cells were resuspended in a high-glucose DMEM medium (GlutaMAX™, GIBCO®) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. The suspension was passed through a 40 µm cell strainer to guarantee homogeneity and seeded onto gelatin-coated (0.1%) culture dishes.

The purity of the isolated culture was assessed using immunofluorescence staining. Cardiomyocytes were identified by staining for cardiac Troponin T (cTnT) using Alexa Fluor™ 568 Phalloidin. Morphological assessment and cell counting via ImageJ software confirmed that the culture consisted of 84.3 ± 5.2% cardiomyocytes, with the remaining population comprising fibroblasts and endothelial cells. Only cultures meeting this threshold were used for subsequent bioenergetic assays.

### Synthesis and loading of synthetic PLGA nanoparticles

All nanoparticle systems used in this study were developed and made by Acibadem university in Turkey. Synthetic nanocarriers were developed using poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA, 50:50, MM 100 000–125 000 g/mol; Corbion, Netherlands). The synthesis was carried out using the oil-in-water (o/w) emulsion-solvent evaporation technique. PLGA (25 mg) was dissolved in 1 mL of acetone. For drug-loaded particles, 2.5 mg of either curcumin (Cur) or alpha-tocopherol (vit. E) was added to this phase. The organic phase was added dropwise to 4 mL of a 1.5% (w/v) aqueous solution of polyvinyl alcohol (PVA) containing 10 µL of Tween80, while stirring at 1500 rpm.

Acetone was evaporated during continuous stirring for 24 hours. The resulting nanoparticles were purified by three cycles of centrifugation at 10 000 g for 10 minutes at 4 °C. To secure exact comparisons, “empty” PLGA nanoparticles were synthesized using the same polymer mass as used for the drug-loaded groups. Main reagents used are mentioned in Table 1.

**Table 1.** Key reagents and manufacturers

Material / Reagent	Source / Manufacturer	Location
PLGA (50:50, MM 100–125 kDa)	Corbion	Netherlands
Curcumin (Cur)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol, $\geq 96\%$ )	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
SARS-CoV-2 Spike protein RBD (370–394)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
DMEM with GlutaMAX™	Gibco, Life Technologies	Paisley, UK
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Life Technologies	Paisley, UK
Trypsin-EDTA (2.5%)	Gibco, Life Technologies	Paisley, UK
HBSS (without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )	Gibco, Life Technologies	Paisley, UK
ExoPLANT Lo Nanovesicle Isolation Kit	Exolitus	Kaunas, Lithuania
MitoSOX Red Superoxide Indicator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Vilnius, Lithuania
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	Vilnius, Lithuania

### Isolation of natural *Melissa officinalis* nanovesicles

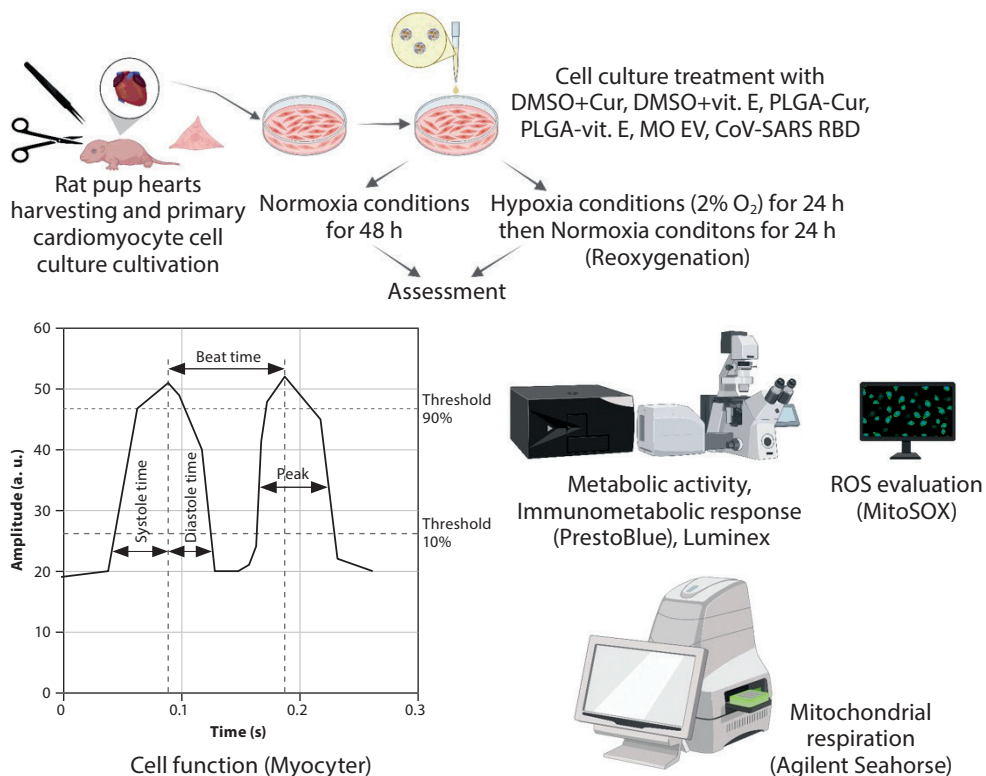
Nanovesicles were prepared from *Melissa officinalis* leaves, and then using differential centrifugation together with a commercial isolation kit. The dried leaves were ground in liquid nitrogen to maintain molecular integrity, and the ExoPLANT Lo Nanovesicle Isolation Kit (Exolitus, Lithuania) was used following the manufacturer’s instructions. The resulting suspension was passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter to remove large debris and aggregates, followed by a maturation incubation (16 h at 4 °C). The final MO EV preparation was resuspended in PBS and stored at  $-20$  °C.

## Analytical characterization of nanocarriers

The concentration (nanovesicles/mL) and size distribution of MO NVs were determined using a NanoSight NS300 (Malvern, USA) after diluting samples 20–50 times in PBS to achieve optimal detection levels. Dynamic Light Scattering (DLS) was used to measure the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of synthetic PLGA nanoparticles with a Wyatt Technologies Dynapro Nanostar. The zeta potential and surface charge of the nanovesicles were measured in a 0.001 M NaCl solution using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). The morphology of the samples was examined by scanning electron microscopy (SEM) after coating with a thin layer of gold, and images were captured at 20 kV using a Quattro ESEM (Thermo Fisher Scientific). Encapsulation efficiency (IE%) and loading capacity were determined via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Agilent system in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. Main reagents used are mentioned in Table 1.

## Experimental design

In order to analyze a myocardial injury, we used in vitro H/R model that we established using a specialized hypoxia chamber (Baker Ruskinn, USA). In selected groups, cardiomyocytes were pretreated with 100 ng/mL of the SARS-CoV-2 spike protein RBD fragment (epitope 370–394; Sigma-Aldrich) for 24 hours. Cells were then subjected to hypoxia (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>) at 37 °C for 24 hours. To achieve rapid oxygen deprivation, the culture medium was replaced with pre-equilibrated hypoxic medium. Following the hypoxia period, the medium was replaced with standard normoxic medium, and the cells were returned to a 21% O<sub>2</sub> incubator for an additional 24 hours. Treatments – PLGA-curcumin (10 µg/mL), PLGA-vitamin E (10 µg/mL), or *Melissa officinalis* extracellular vesicles (8 µg/mL) – were applied 24 hours before hypoxia and maintained throughout the H/R cycle.



**Fig. 1. Comprehensive Experimental Design and Workflow**

The study utilized primary cardiomyocyte cultures isolated from neonatal rat hearts. The experimental framework involved a “double-hit” injury model, where cells were subjected to either standard Normoxia (48 h) or simulated Hypoxia-Reoxygenation (H/R; 24 h hypoxia at 2% O<sub>2</sub> followed by 24 h reoxygenation). Experimental groups were pre-treated with free pharmacological agents (curcumin, vitamin E), synthetic pH-responsive nanocarriers (PLGA-Cur, PLGA-vit. E), and natural *Melissa officinalis* nanovesicles (MO EV), alongside the SARS-CoV-2 RBD epitope for stress modulation. Post-treatment assessments included: 1) Functional analysis of contractility using the Myocyter plugin; 2) Metabolic activity and immunometabolic profiling (PrestoBlue, Luminex); 3) Mitochondrial ROS quantification via MitoSOX; and 4) Real-time bioenergetic assessment of mitochondrial respiration using the Agilent Seahorse XFp Analyser.

### Real-time bioenergetic analysis

Mitochondrial respiration was assessed using the Seahorse XFp Cell Mito Stress Test. This method permits dynamic measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR). Main reagents used are mentioned in Table 1. Standard injections used in our test:

- Oligomycin (1.5 μM): Inhibits ATP synthase, allowing the calculation of ATP-linked respiration.

- FCCP (2.0  $\mu$ M): An uncoupling agent used to reach maximal respiratory capacity and calculate the spare respiratory capacity.
- Antimycin A / Rotenone (0.5  $\mu$ M): Inhibitors of complexes I and III, used to determine non-mitochondrial oxygen consumption.

All Seahorse data were normalized to the total cellular protein content in each well, determined by the Bradford assay using a Tecan Infinite 200 Pro M Nano Plex reader at 595 nm.

### Contractility and molecular assays

We filmed cardiomyocyte contractility using a light microscope (Leica DMi1). Then the videos were processed using the Myocyter plugin (ImageJ software) to extract beating frequency, amplitude, and the durations of the systolic and diastolic phases. Adrenaline (0.1 mM) was used as a functional stimulant.

For the gene expression (qRT-PCR) test, total RNA was extracted using the PureLink RNA mini kit, and cDNA was synthesized. Real-time PCR was performed using Power SYBR Green to evaluate the expression of inflammatory markers (IL-6, CXCL1, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B1). Primers showed in Table 2. Pro-inflammatory cytokine concentrations (IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL2) in the cell culture medium were quantified using a Luminex 100/200 xMAP multiplex system.

**Table 2.** Primers used for quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Gene symbol	Gene name	Biological function
<i>IL-6</i>	Interleukin 6	Pro-inflammatory cytokine, acute phase response
<i>CCL1</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1	Neutrophil chemoattractant (rat IL-8 analog)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Interleukin 1 beta	Potent pro-inflammatory mediator, inflammasome marker
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor alpha	Primary inflammatory response initiator
<i>NF-<math>\kappa</math>B1</i>	Nuclear factor kappa B subunit 1	Master transcription factor for immune response
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Endogenous control (housekeeping gene)

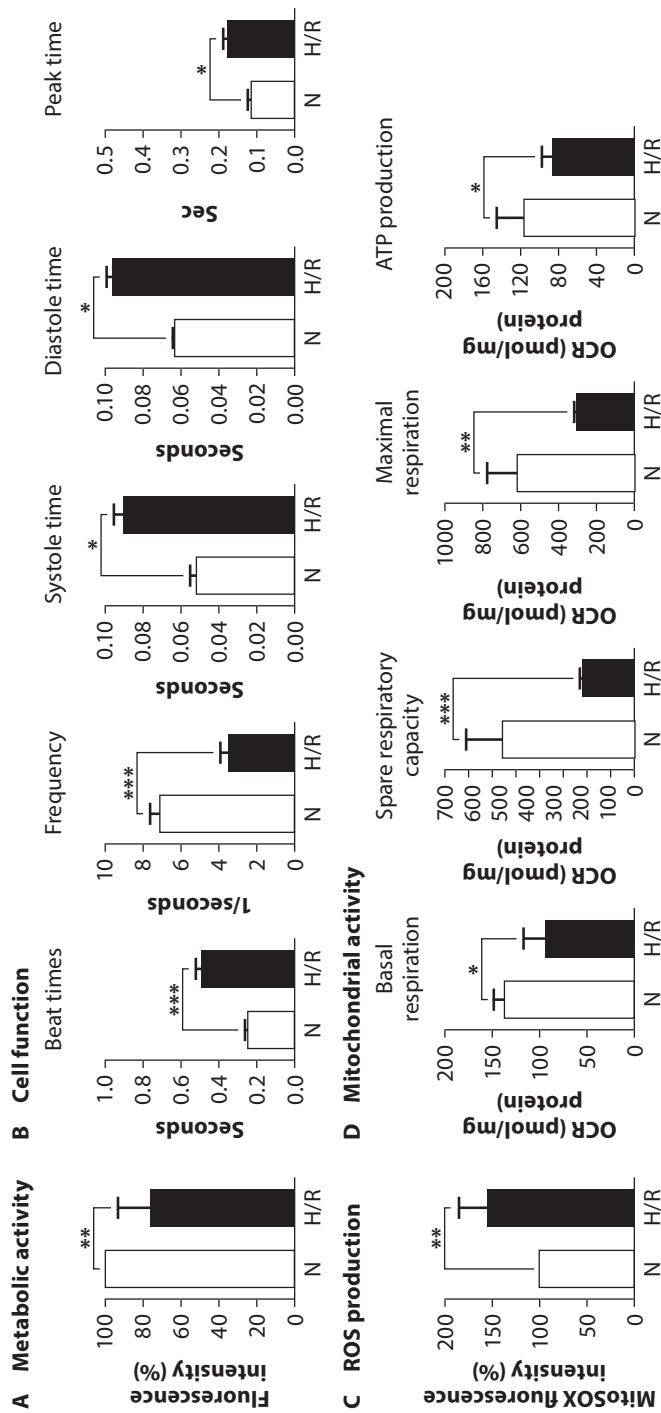
## RESULTS

### Validation of the *in vitro* hypoxia-reoxygenation model

Before testing the efficacy of the nanotherapeutic interventions, the *in vitro* H/R model was validated. Although myocardial injury during infarction is a multifactorial process, at the cellular level the transition from oxygen deprivation to sudden reoxygenation is the main contributor to damage.

Our analysis demonstrated that the H/R protocol we implemented (24 h hypoxia at 2% O<sub>2</sub> followed by 24 h reoxygenation) statistically significantly reduced cardiomyocyte viability, with metabolic activity decreasing about 17% when compared to normoxic controls ( $p < 0.01$ ). This decrease of viable cells was accompanied by contractile impairment, resembling an “acute heart failure” phenotype *in vitro*. Analysis of cardiomyocyte contraction videos using the Myocyter plugin showed decreased beating frequency and reduced contraction amplitude. In addition, both systolic and diastolic duration times were extended, that might be explained by impaired intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) handling and the contractile machinery power loss due to energy depletion.

Mitochondrial respiration analysis using the Seahorse XFp Analyser provided a mechanistically deeper understanding of this injury. H/R insult resulted in a systemic suppression of the oxygen consumption rate (OCR) across all measured parameters (Fig. 2). A statistically significant reduction in basal respiration indicated a weakened ability of cardiomyocytes to maintain essential homeostasis even at rest. The most critical finding, however, was the near-complete depletion of the spare respiratory capacity (the difference between maximal and basal respiration). This loss of bioenergetics flexibility means that the cells have no energetic reserves left to adapt to further metabolic stress or to manage the oxidative burst during reoxygenation. The concurrent increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, as measured by MitoSOX Red, confirmed that the damaged electron transport chain becomes a primary source of oxidative stress rather than energy production.



**Fig. 2. Validation of the *in vitro* hypoxia-reoxygenation (H/R) model in primary rat cardiomyocytes**

The figure illustrates the multi-parametric assessment of cardiomyocyte injury following 24 h of hypoxia (2% O<sub>2</sub>) and 24 h of reoxygenation compared to normoxic (N) controls. **(A)** Metabolic activity as determined by the PrestoBlue assay, showing a significant decline in the H/R group. **(B)** Functional/contractile parameters analyzed via the Myocyter plugin, demonstrating “contractile stunting” characterized by increased beat times, reduced frequency, and prolonged systolic and diastolic durations. **(C)** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, quantified by MitoSOX Red fluorescence intensity, indicating a marked increase in oxidative stress post-reoxygenation. **(D)** Bioenergetic profiling using the Seahorse XFp Mito Stress Test. H/R insult resulted in a systemic suppression of mitochondrial respiration, evidenced by significantly reduced basal respiration, total loss of spare respiratory capacity, diminished maximal respiration, and decreased ATP-linked oxygen consumption (OCR). All OCR data were normalized to total cellular protein content (pmol/min/mg protein). Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 (Student’s t-test).

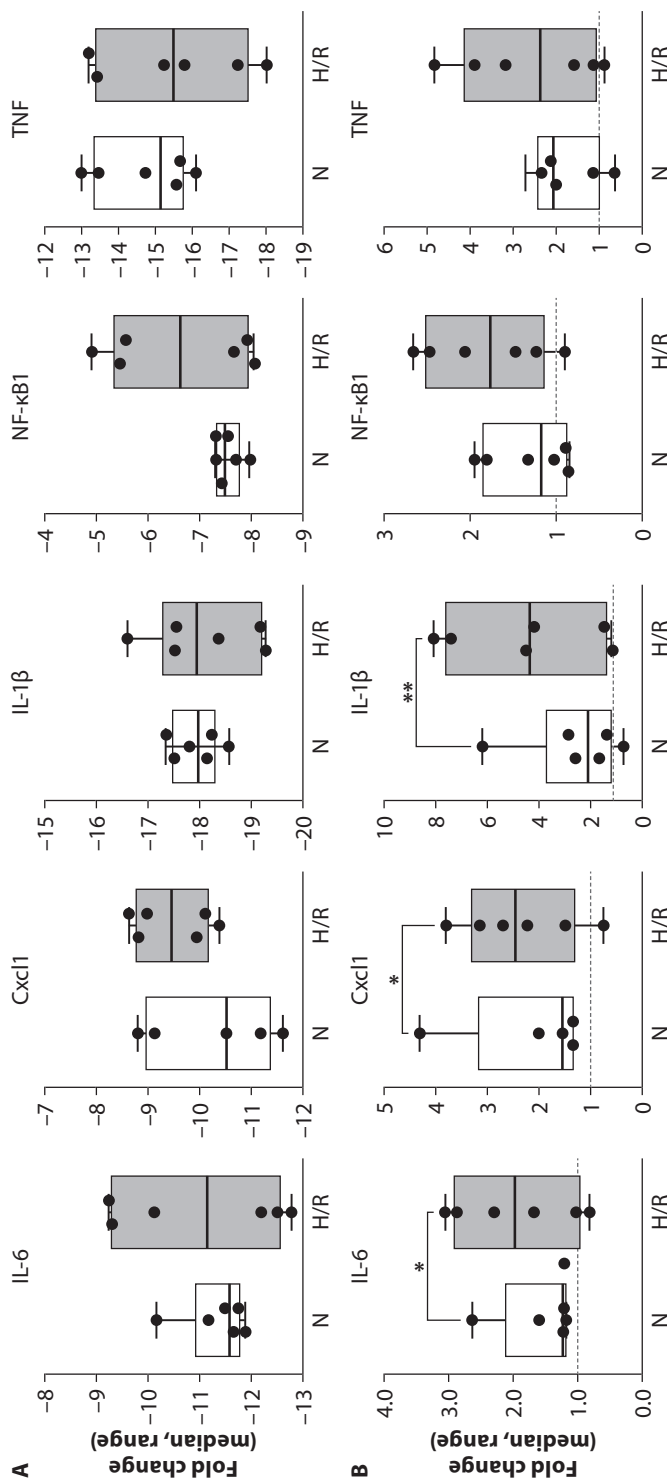
## **The potentiating effect of SARS-CoV-2 RBD epitope on myocardial injury**

The second part of Phase I investigated how the presence of a specific viral stressor – the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD) – modifies the baseline H-R injury. This “double-hit” model was designed to simulate the clinical complexity of COVID-19-related cardiac complications.

Data showed that while a 100 ng/mL dose of the RBD fragment had no significant cytotoxic effect under normoxic conditions, it acted as a potent catalyst for damage during H-R. The combined effect of RBD and H/R resulted in a 33% reduction in metabolic activity – nearly double the injury seen with H/R alone ( $p < 0.001$ ). This synergy suggests that the virus fragment lowers the cellular resistance threshold to metabolic stress.

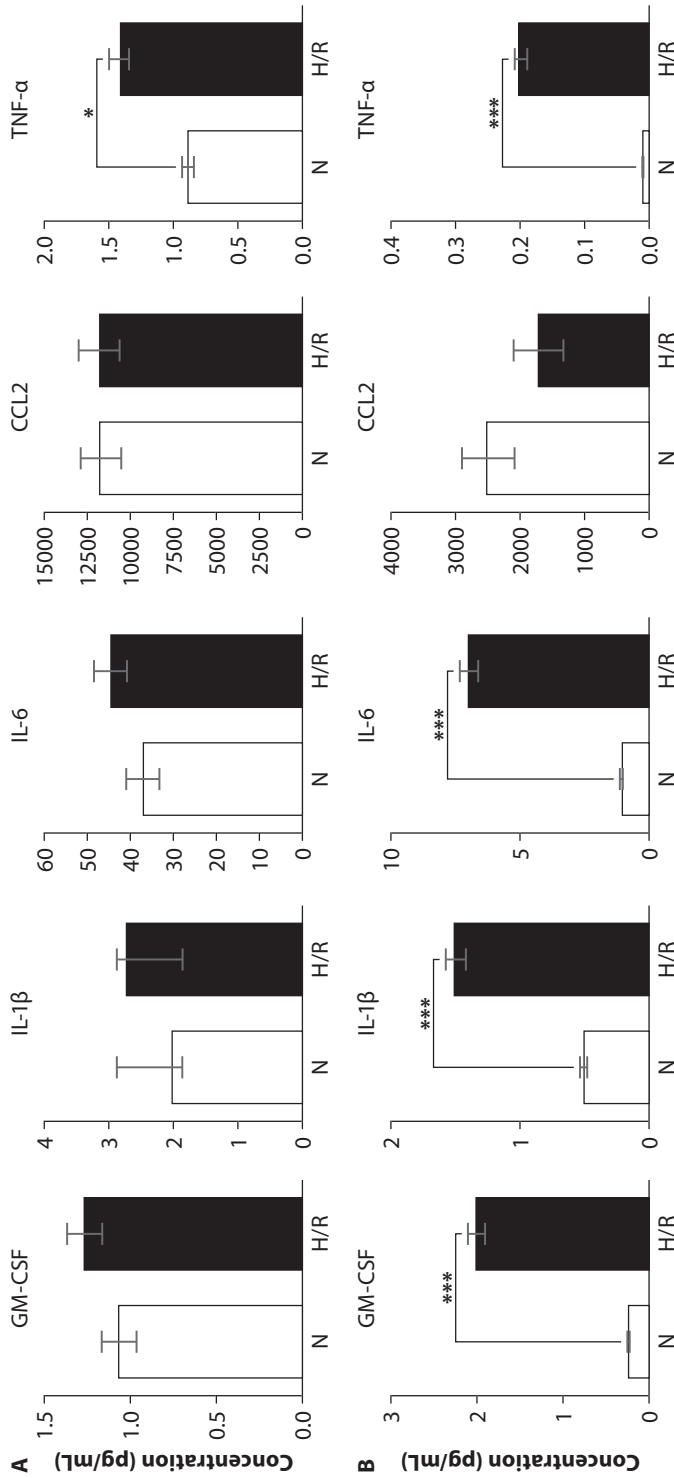
We needed to assess whether cardiomyocytes actively contribute to the inflammatory status. Molecular analysis showed an increased upregulation of pro-inflammatory genes, including IL-6, Cxcl1, and IL-1 $\beta$  (Fig. 3). Especially, IL-1 $\beta$  expression increased more than four-fold in the RBD-H/R group, consistent with activation of the NLRP3 inflammasome pathway.

Functional validation via Luminex multiplex assay (Fig. 4) confirmed a massive surge in the secretion of the GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) protein ( $p < 0.001$ ). GM-CSF is a critical recruiter of myeloid cells; thus, its production by cardiomyocytes provides a mechanistic explanation for the extensive myocardial inflammatory infiltration observed in COVID-19 patients. Interestingly, despite high mRNA levels, the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  remained relatively low. We hypothesize that the acute bioenergetic collapse induced by the virus (described below) leaves the cells with insufficient ATP to support the energy-demanding process of protein translation and active transport (secretion).



**Fig. 3. Pro-inflammatory gene expression changes in primary rat cardiomyocytes under hypoxia-reoxygenation and viral stress**

The figure illustrates the mRNA fold change of key inflammatory markers (IL-6, Cxcl1, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B1, and TNF) analyzed via qRT-PCR. (A) mRNA expression levels under standard Normoxia (N) and Hypoxia-Reoxygenation (H/R) conditions without exogenous stressors. No statistically significant activation of the inflammatory genes was observed in the H-R group alone. (B) mRNA expression changes when H/R injury is combined with SARS-CoV-2 spike protein RBD fragment priming (100 ng/mL). The results demonstrate a significant potentiation of the inflammatory response, particularly for IL-6, Cxcl1, and IL-1 $\beta$ , following the H/R insult. Dotted lines represent the baseline expression level (1.0) of untreated normoxic cells. Data are presented as median with range (n = 6). Statistical significance relative to the respective normoxia group: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Mann-Whitney U test).

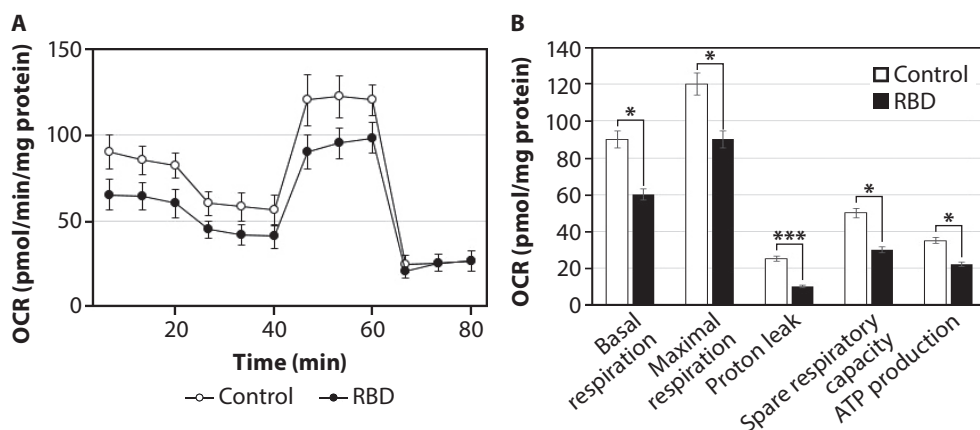


**Fig. 4. Secretion of pro-inflammatory cytokines by primary cardiomyocytes**

Cytokine concentrations in the cell culture medium were determined via Luminex multiplex assay. **(A)** Protein production under standard Normoxia (N) and Hypoxia-Reoxygenation (H-R) conditions without additional stimulation. Isolated H/R insult resulted in a minimal inflammatory response, with only TNF- $\alpha$  showing a slight significant increase. **(B)** Protein production following priming with the SARS-CoV-2 spike protein RBD fragment. Viral exposure significantly potentiated the secretory response of the cardiomyocytes, leading to massive surges in GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  concentrations specifically under H-R conditions. The data demonstrate that while H/R alone is a weak inducer of inflammation, the presence of the viral epitope acts as a potent catalyst for a “cytokine storm” at the cellular level. Results are expressed in pg/mL and presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance relative to the corresponding normoxia group: \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 (Student’s t-test).

## Acute bioenergetic collapse after impact of SARS-Cov-2 RBD fragment in primary rat cardiomyocytes

To isolate the direct toxic effect of the virus on mitochondria, an acute 3-hour exposure study was conducted under normoxic conditions (Fig. 5). The results were definitive: the RBD fragment caused a 30% reduction in mitochondrial ATP production and a severe depletion of the spare respiratory capacity ( $p < 0.05$ ). This “bioenergetic quenching” occurs well before any signs of cell death, identifying mitochondrial failure as the primary, upstream event in viral-associated cardiac insufficiency.



**Fig. 5.** Acute (3 h) effect of SARS-CoV-2 RBD fragment on mitochondrial bioenergetics in primary rat cardiomyocytes under normoxic conditions

Mitochondrial functional capacity was assessed using the Seahorse XFp protocol. **(A)** Real-time kinetic traces of the oxygen consumption rate (OCR) illustrating the cellular response to sequential injections of mitochondrial modulators (oligomycin, FCCP, and antimycin A/rotenone). **(B)** Quantification of key bioenergetic parameters: basal respiration, maximal respiration, proton leak, spare respiratory capacity, and ATP production. White circles/bars represent the untreated Control group; black circles/bars represent cells treated with 100 ng/mL SARS-CoV-2 RBD fragment. Data show that acute viral exposure leads to a systemic suppression of mitochondrial function, characterized by a significant (~30%) reduction in ATP-linked respiration and a nearly 50% depletion of the spare respiratory capacity. All OCR values were normalized to total cellular protein content (pmol/min/mg protein) and are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Statistical significance relative to the control: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Student's t-test).

This Phase I analysis demonstrated our rationale for the second half of the dissertation: because the primary injury is centered on mitochondrial bioenergetic collapse and subsequent oxidative stress, the development of targeted nanocarriers (PLGA and MO EV) must be specifically oriented

toward stabilizing mitochondrial function during this acute “vulnerability window”.

### Nanocarrier characterization and pH-sensitivity evaluation

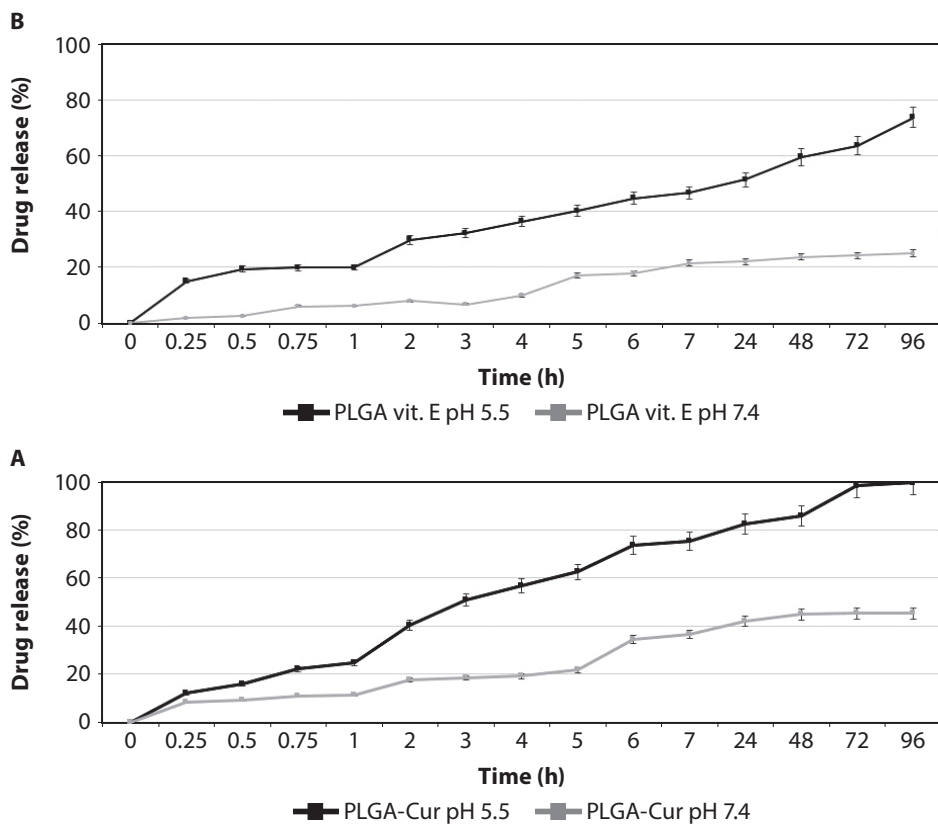
The synthesized PLGA nanoparticles (NDs) had an optimal hydrodynamic diameter of 204–231 nm with a low polydispersity index (PDI < 0.188), indicating a highly monodisperse and stable population. Curcumin and vitamin E were successfully encapsulated with efficiencies (IE%) of 51.2% and 78.1%, respectively (Table 3).

**Table 3.** Physicochemical characterization and drug loading parameters of synthetic PLGA nanocarriers

NPs	Particle size (nm)	PDI	Surface charge (mV)	Total drug concentration (µg/ml)	Drug EE (%)	RhB concentration (µg/mL)
PLGA	219.5 ± 12.3	0.186	-7.11 ± 1.79	–	–	–
PLGA-Cur	231.4 ± 11.2	0.176	-12.4 ± 0.31	128.0	51.2 ± 2.31	–
PLGA-vit. E	223.7 ± 10.2	0.174	-9.94 ± 2.23	156.6	67.8 ± 3.68	–
PLGA-RhB	291.0 ± 10.2	0.188	-24.3 ± 1.12	–	–	682.8

The table summarizes the key physical and chemical properties of empty (PLGA), drug-loaded (PLGA-Cur, PLGA-vit. E), and fluorescently labeled (PLGA-RhB) nanoparticles. Particle size (nm) represents the average hydrodynamic diameter measured by DLS; PDI denotes the polydispersity index, indicating the uniformity of the particle size distribution; Surface charge (mV) refers to the Zeta potential of the particles in 0.001 M NaCl. Total drug concentration and Drug EE (%) (encapsulation efficiency) were quantified using LC-MS/MS (for curcumin and vitamin E) or fluorescence spectroscopy (for Rhodamine B). Data are presented as mean ± SD (n = 3).

We validated the pH-responsive release profile of nanoparticles. In ischaemic tissues, anaerobic metabolism leads to local acidosis, dropping the pH to approximately 6. Our kinetic studies confirmed that both curcumin and Vitamin E were released 2–3 times faster at pH 5.5–6 compared to the physiological pH 7.4 (Fig. 6 A, B). The release of a drug is driven by autocatalytic hydrolysis of PLGA ester bonds under acidic conditions. This allows the antioxidant to remain encapsulated during systemic circulation, yet ensures rapid release once it reaches the acidic environment of the injured myocardium or the endo-lysosomal compartments after cellular uptake.



**Fig. 6.** pH-responsive *in vitro* drug release kinetics of PLGA nanocarriers

The graphs illustrate the cumulative release profiles of (A) vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) and (B) Curcumin from synthesized PLGA nanoparticles over a 96-hour period. To simulate different physiological environments, two media were utilized: acetate buffer (pH 5.5), representing the local metabolic acidosis typical of ischaemic/hypoxic myocardium, and phosphate-buffered saline (pH 7.4), representing standard physiological conditions. Data show that both vitamin E and curcumin exhibit a distinct pH-dependent release behavior, with release rates being 2–3 times higher under acidic conditions compared to physiological pH. Specifically, in the pH 5.5 environment, curcumin reached near-complete release (~100%), and vitamin E reached ~75% release, whereas at pH 7.4, release remained sequestered at approximately 45% and 25%, respectively. This accelerated release in acidic media is attributed to the autocatalytic hydrolysis of PLGA ester bonds, validating the system as a “smart” nanotransport platform capable of targeted drug delivery to injured cardiac tissues. Results are quantified via LC-MS/MS and presented as mean  $\pm$  SD (n = 3).

## **PLGA nanocarriers help to neutralize cytotoxicity and restore viability**

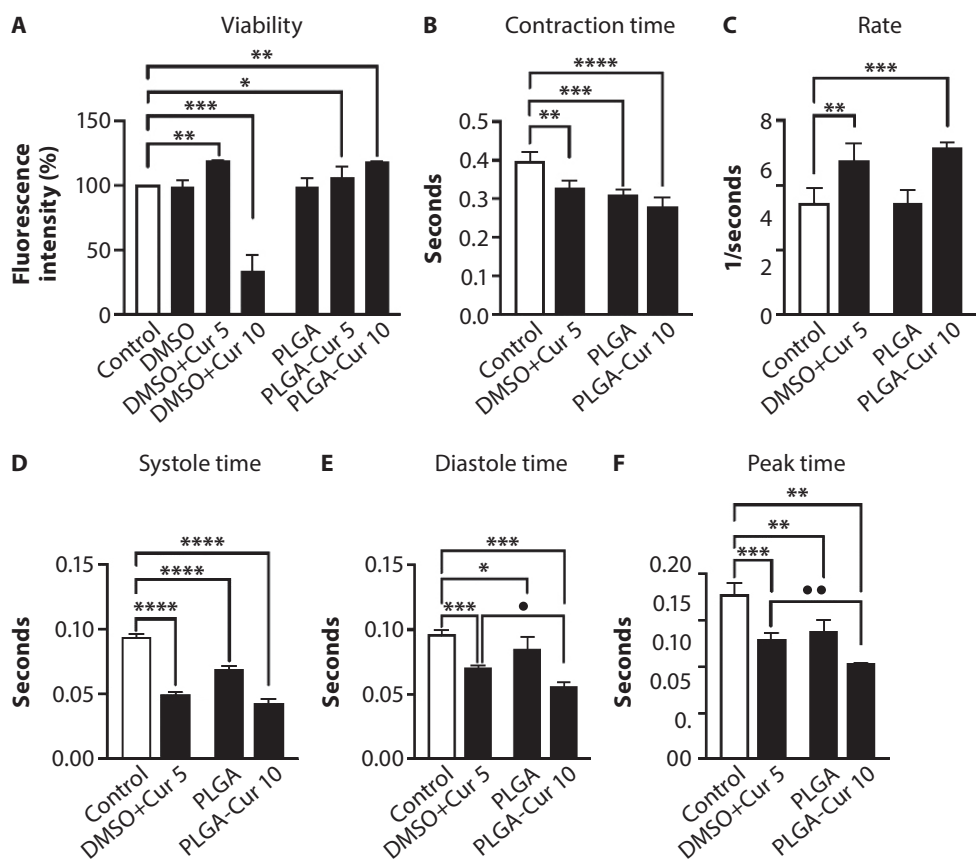
A critical finding of this phase was the ability of PLGA nanocarriers to bypass the inherent cytotoxicity of free lipophilic antioxidants. Under normoxic conditions, a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dose of free Vitamin E or curcumin caused a 40–50% reduction in cardiomyocyte viability. However, when delivered via PLGA NDs, these same concentrations were completely non-toxic, effectively expanding the therapeutic window of these compounds.

Under H/R conditions, PLGA-VitE (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) demonstrated the most potent protective effect, increasing post-insult metabolic activity by 26% compared to the untreated H/R control. In comparison, free vitamin E at lower, non-toxic doses (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) provided only a 13% increase in survival. This confirms that nanotechnological encapsulation allows for the safe administration of higher, more effective therapeutic doses.

### **Restore contractile and bioenergetic function**

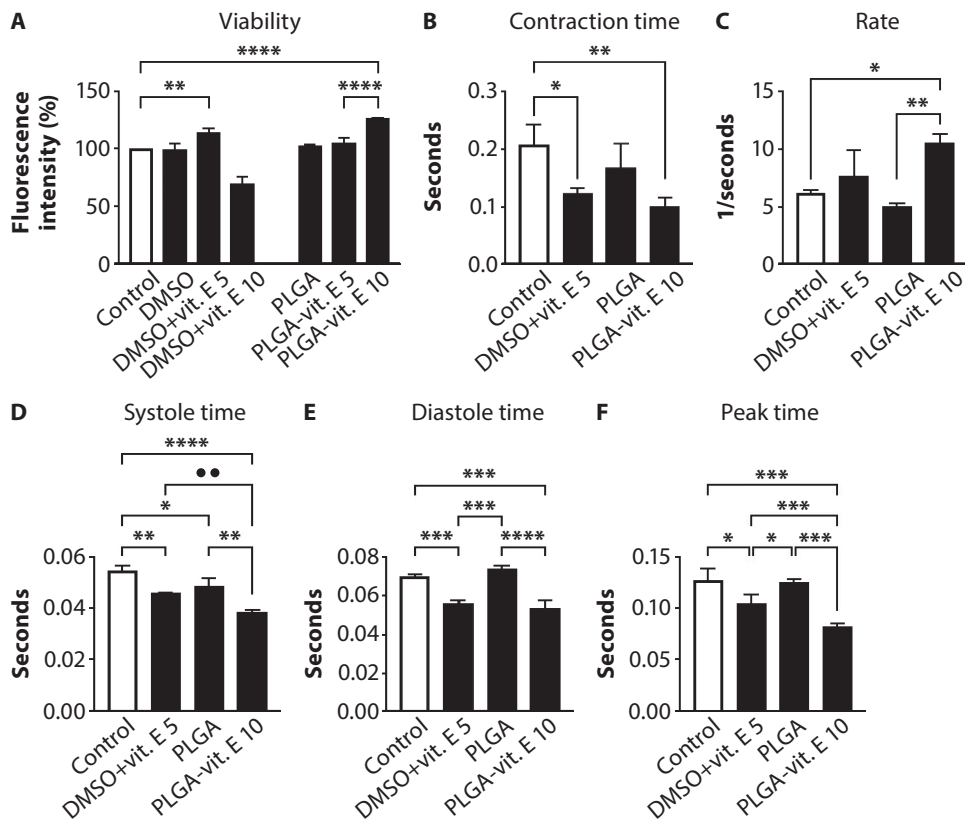
The restoration of viability was directly correlated with improved mechanical and mitochondrial performance. H/R-induced damage usually leads to “contractile stunning”, but treatment with PLGA-Cur and PLGA-vit. E significantly impacted systolic and diastolic duration time and restored the beating frequency to levels near those of the normoxic control. The reduction in diastolic duration is particularly noteworthy as it indicates more efficient  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption into the sarcoplasmic reticulum, a process that is highly ATP-dependent (Fig. 7, 8).

Mitochondrial bioenergetic profiling (Seahorse XFp) confirmed that PLGA-loaded antioxidants successfully “rescued” the electron transport chain. We checked both basal and maximal respiration increase by approximately 30% using PLGA-vit. E ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11, 12). Furthermore, a significant reduction in mitochondrial ROS (superoxide) production was verified via MitoSOX assay (Fig. 9, 10). These results suggest that the synthetic nanocarriers act as direct mitochondrial stabilizers, preventing the bioenergetic collapse that otherwise leads to programmed cell death.



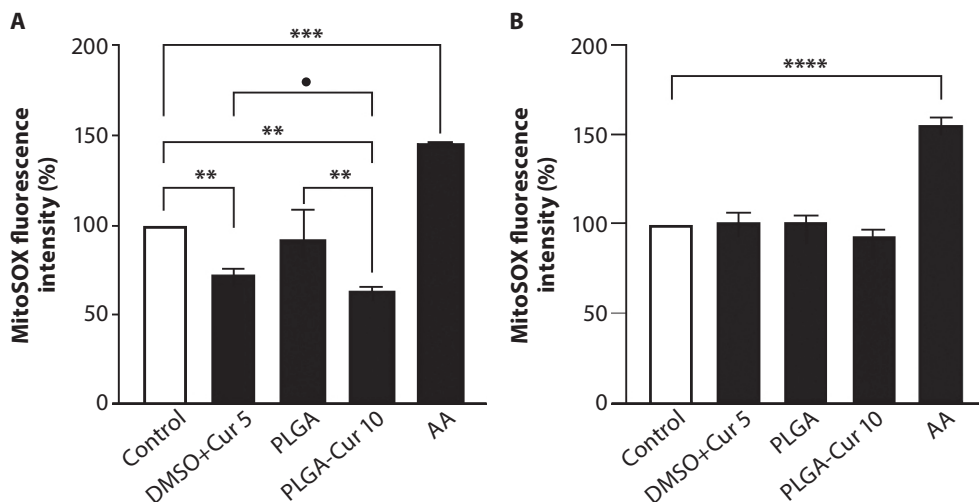
**Fig. 7.** Protective effect of PLGA-Curcumin nanoparticles on cardiomyocyte viability and contractility following H/R injury

The panels illustrate the rescue potential of encapsulated curcumin compared to its free form after 24 h hypoxia and 24 h reoxygenation. **(A)** Metabolic activity (PrestoBlue) showing that while H-R significantly reduces viability, PLGA-Cur 10 NDs provide a significant recovery. Notably, free curcumin at the same dose (DMSO+Cur 10) exacerbates the injury due to synergistic toxicity. **(B–F)** Restoration of contractile parameters. H-R insult induces mechanical failure (“stunning”), characterized by prolonged contraction times and reduced frequency. Treatment with PLGA-Cur 10 significantly shortens the systolic **(D)** and diastolic **(E)** durations, effectively restoring the beating rate **(C)** toward normoxic levels. The black circles (●) indicate a statistically significant improvement of the nanoparticle group over the free drug group. Data are mean ± SD (n = 3). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 (ANOVA with LSD post-hoc test).



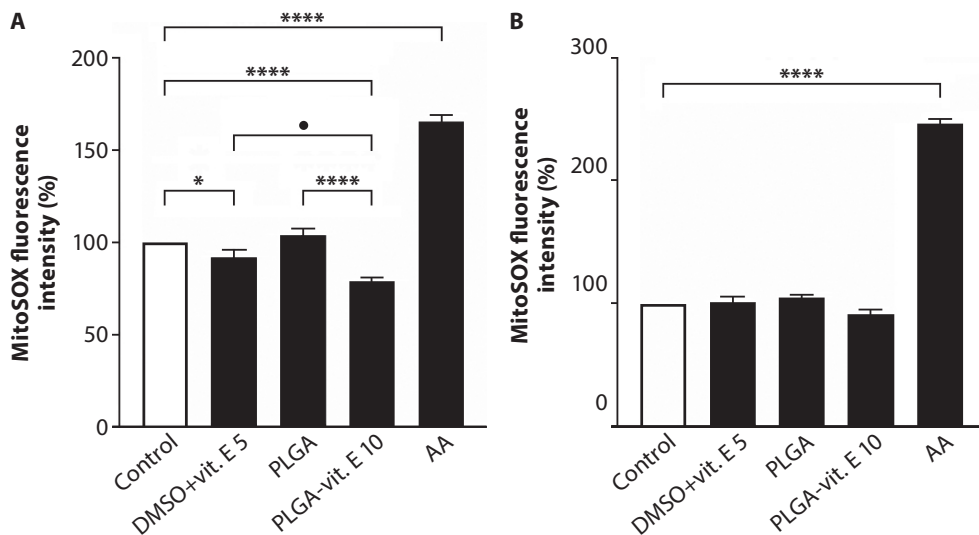
**Fig. 8.** Protective effect of PLGA-Vitamin E nanoparticles on cardiomyocyte viability and contractility following H/R injury

Assessment of the nanotherapeutic efficacy of Vitamin E in the H/R injury model. **(A)** Viability results demonstrate that PLGA-vit. E 10 NDs provide the most robust protection, increasing metabolic activity by approximately 26% compared to the untreated H/R Control. The high dose of free vitamin E (DMSO+vit. E 10) acts as a pro-oxidant under H/R stress, significantly decreasing cell survival. **(B–F)** Functional recovery metrics. PLGA-vit. E 10 treatment results in the most efficient mechanical performance, evidenced by a significant increase in beating frequency **(C)** and a marked reduction in peak time **(F)**. The shortening of the diastolic phase **(E)** suggests improved  $\text{Ca}^{2+}$  re-uptake, facilitated by the bioenergetic stabilization provided by the nanocarriers. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance relative to H-R control is indicated by asterisks; relative to the free drug group by black dots (●).



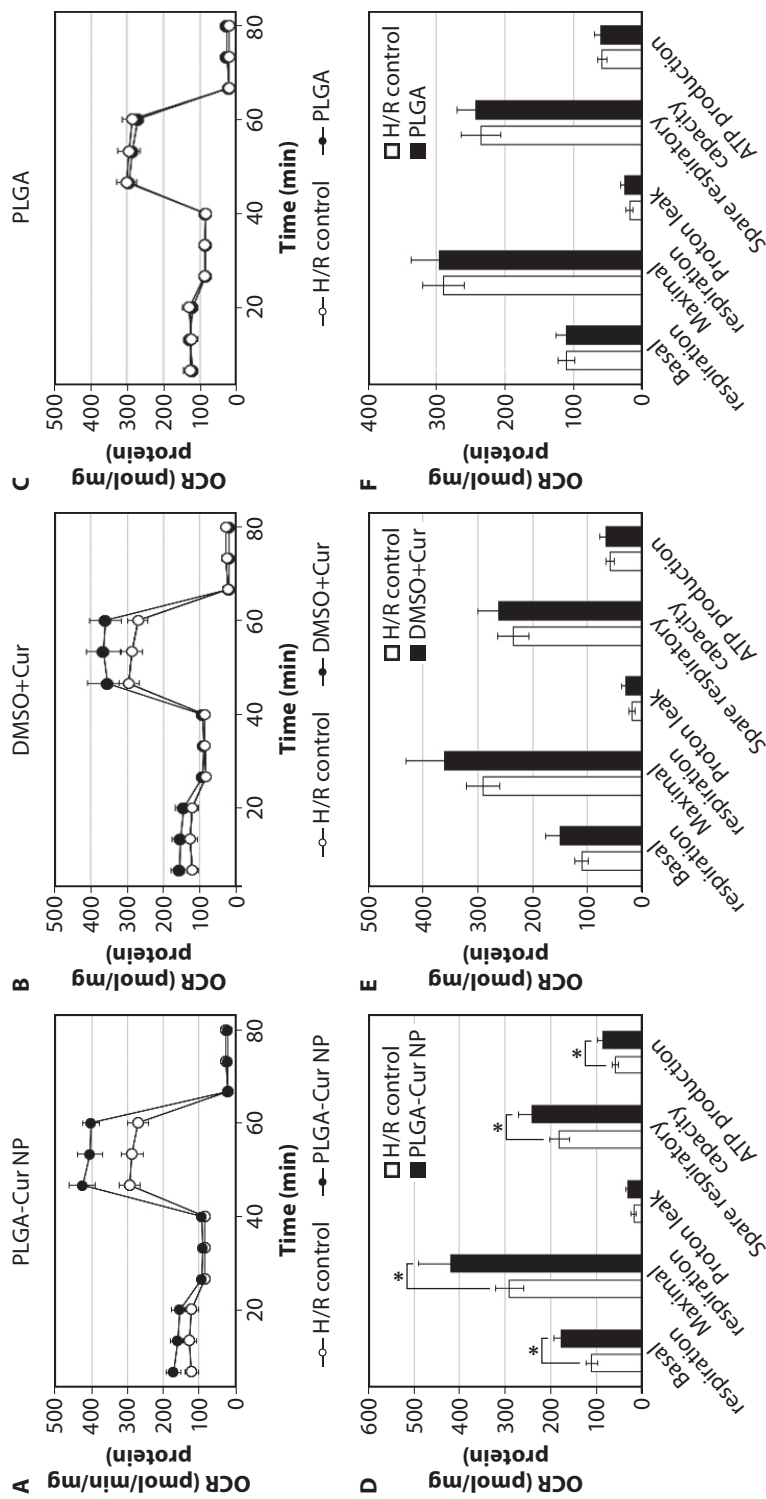
**Fig. 9.** Impact of PLGA-Cur NDs on mitochondrial ROS production. Mitochondrial superoxide production quantified by MitoSOX Red fluorescence

(A) Under hypoxia-reoxygenation (H/R) conditions; (B) under normoxic conditions. Anti-mycin A (AA) serves as a positive control for ROS induction. PLGA-Cur 10 NDs show superior antioxidant capacity compared to free curcumin (DMSO+Cur 5), significantly reducing mitochondrial oxidative stress post-reoxygenation. The black dot (●) indicates a significant difference between the nanoparticle group and the free drug group. Data are normalized to control (100%) and presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance: \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



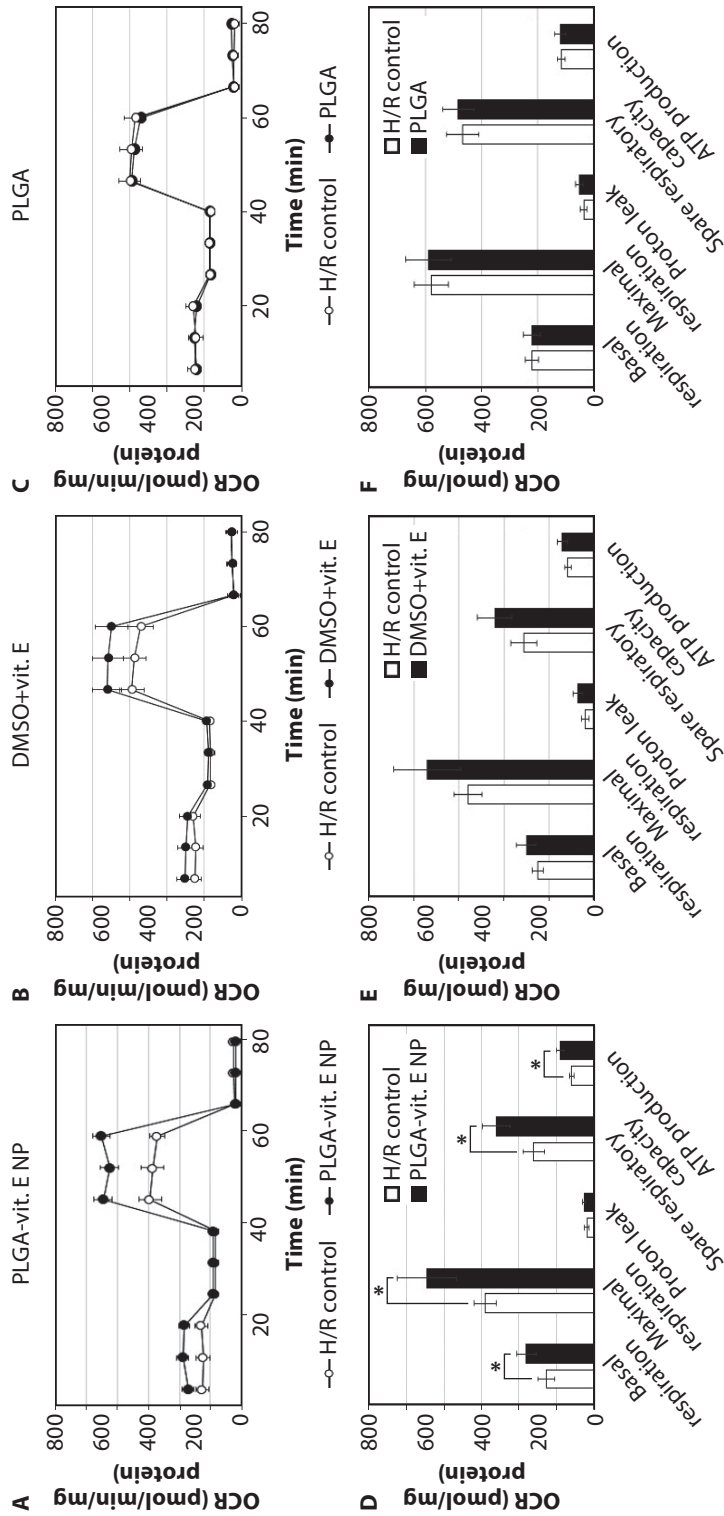
**Fig. 10.** Impact of PLGA-vit. E NDs on mitochondrial ROS production

Quantification of mitochondrial ROS levels using MitoSOX Red indicator. (A) In the H/R injury model; (B) in normoxia. PLGA-vit. E 10 NDs effectively neutralize the reoxygenation-induced ROS burst, outperforming the free antioxidant form. Empty PLGA nanocarriers demonstrate bioinertia, showing no significant increase in ROS levels. AA indicates the dynamic range of the measurement system. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance: \* p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001. The black dot (●) highlights the statistical advantage of nanotechnological delivery over free drug administration.



**Fig. 11. Restoration of mitochondrial respiration by PLGA-Cur NDs post H/R injury**

Real-time bioenergetic assessment using Seahorse XFp. (A-C) Kinetic OCR traces representing the effects of PLGA-Cur ND, DMSO+Cur, and empty PLGA NDs, respectively; (D-F) summarized bioenergetic parameters (basal and maximal respiration, ATP production, spare capacity). Data demonstrate that only PLGA-Cur ND treatment significantly restores mitochondrial respiratory parameters and ATP-linked oxygen consumption after H/R insult ( $p < 0.05$ ), while free curcumin shows only a non-significant trend. Data are normalized to protein content (pmol/min/mg protein) and presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

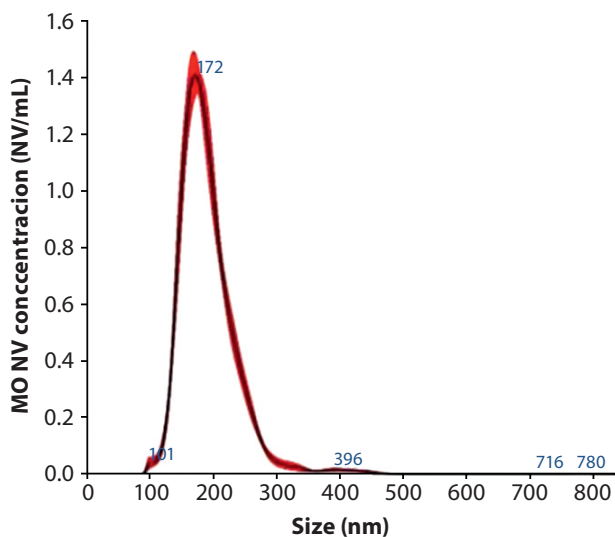


**Fig. 12. Restoration of mitochondrial respiration by PLGA-vit. E NDs post H/R injury**

Mitochondrial respiratory profiles evaluated via Seahorse Mito Stress Test. **(A–C)** Oxygen consumption rate (OCR) traces for PLGA-vit. E ND, DMSO+vit. E, and empty PLGA carriers; **(D–F)** quantitative analysis of bioenergetic metrics. PLGA-vit. E NDs provided the most robust protection, significantly enhancing maximal respiration and spare respiratory capacity compared to the untreated H/R control. This confirms that the synthetic nanocarrier system stabilizes the electron transport chain during the critical reoxygenation phase. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Statistical significance: \* p < 0.05 (Student's t-test).

## Biochemical and physical profiling of *Melissa* plant nanovesicles

The final stage of the research explored a fundamentally different cardio-protective strategy: the use of natural plant-derived nanovesicles (PDNVs) isolated from *Melissa officinalis* (MO NVs). Unlike the synthetic PLGA system, which acts primarily as a targeted delivery vehicle for exogenous antioxidants, MO NVs were investigated as bioactive information carriers capable of direct metabolic modulation.



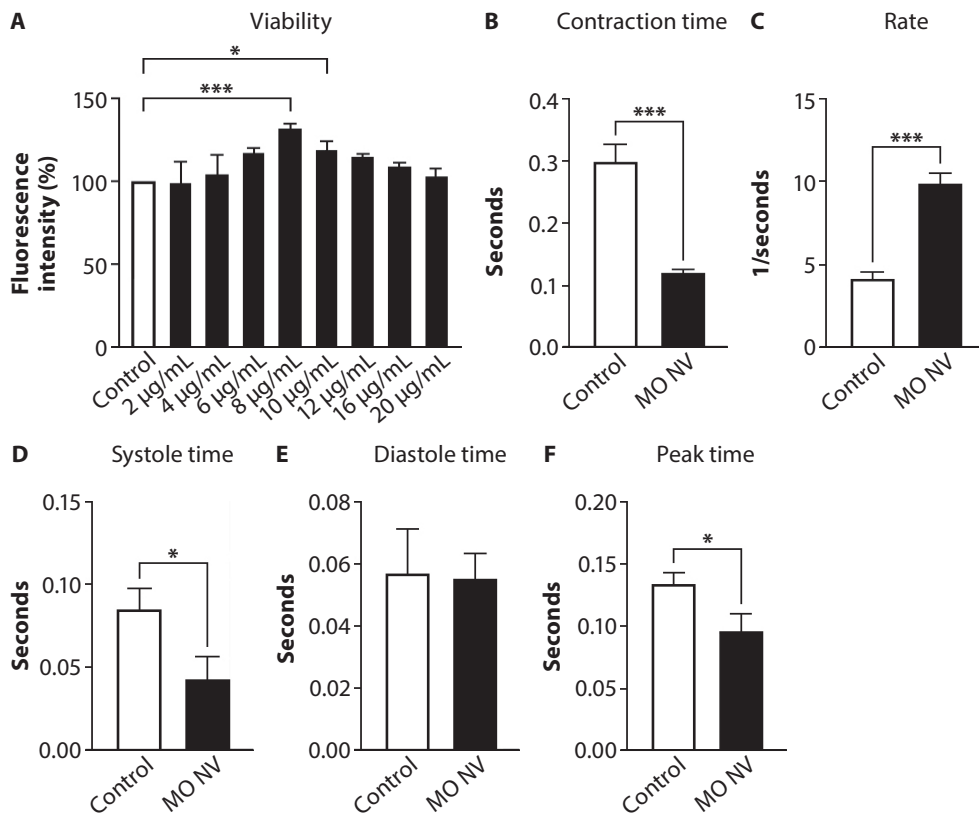
**Fig. 13.** Size distribution and concentration of *Melissa officinalis* nanovesicles (MO NV)

The profile illustrates the physicochemical characterization of natural nanovesicles isolated from *Melissa officinalis*, determined via NTA using the NanoSight NS300. The mode hydrodynamic diameter of the vesicles was found to be 172 nm, with the majority of the population distributed between 146 and 244 nm. This profile confirms the successful isolation of a stable, polydisperse population consistent with the “small extracellular vesicles” (sEVs) category as defined by the MISEV2023 guidelines. The peak intensity represents a particle concentration of approximately  $3.47 \times 10^{12}$  particles/mL. The red shading indicates the standard error of the mean ( $n = 3$ ). This size range is considered optimal for efficient cellular internalization by primary cardiomyocytes through endocytic pathways.

Isolation of MO NVs yielded a stable, polydisperse population of vesicles. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) showed that most vesicles had a hydrodynamic diameter of 172 nm, with an average size of  $191.3 \pm 0.6$  nm (Fig. 13). The particle concentration reached  $3.47 \times 10^{12}$  particles/mL and corresponded to a total protein concentration of  $372.28 \pm 47.26$   $\mu\text{g/mL}$ , as measured by the Bradford assay. UPLC analysis showed that MO nanovesicles contain considerable amounts of polyphenols, mainly rosmarinic acid ( $248.8 \pm 35$   $\mu\text{g/mg}$  protein) and caffeic acid. These compounds are likely responsible for the antioxidant activity of the vesicles, remaining protected within the lipid bilayer.

### **Dose-response and safety assessment of *Melissa Officinalis* nanovesicles**

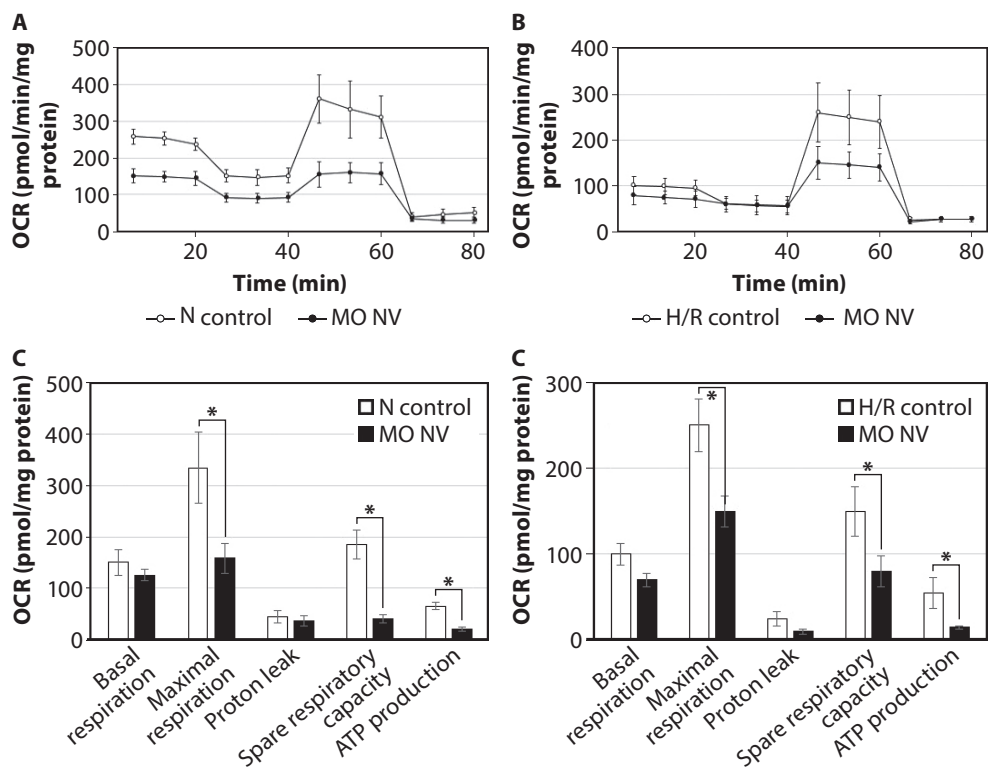
Under normoxic conditions, MO nanovesicles were well tolerated (Fig. 14). Concentrations up to 12  $\mu\text{g/mL}$  (based on total vesicle protein) had no negative effect on viability and were accompanied by a slight increase in metabolic activity. At 20  $\mu\text{g/mL}$ , however, viability decreased significantly ( $p < 0.01$ ), indicating that this level is close to the upper safe limit. Interestingly, even at safe doses (8  $\mu\text{g/mL}$ ), MO NVs induced a significant negative chronotropic effect in normoxic conditions, nearly tripling the beat time and reducing the contraction frequency from 18 to 6 beats/sec. But there was a significant beneficial impact when cell culture was affected by H/R injury. This was the first indicator that MO NVs do not merely “support” the cell but actively modify its physiological state.



**Fig. 14.** *Cardioprotective efficacy of Melissa officinalis nanovesicles (MO NV) in the hypoxia-reoxygenation (H-R) model*

The figure illustrates the dose-dependent effect and functional recovery of primary cardiomyocytes following H-R injury. **(A)** Evaluation of cell metabolic activity (PrestoBlue assay) across a range of MO NV concentrations (2–20 µg/mL, based on total vesicle protein content). Results are normalized to the untreated H-R Control (100%). The data indicate a significant enhancement in viability at the 8 µg/ml concentration, while a cytotoxic effect is observed at 20 µg/mL. **(B–F)** Assessment of cardiomyocyte contractile performance after H-R insult using the optimal 8 µg/mL MO NV concentration. Functional parameters include: **(B)** total contraction duration, **(C)** beating frequency (rate), **(D)** systolic duration, **(E)** diastolic duration, and **(F)** peak time. The results demonstrate that MO NV treatment effectively mitigates H-R induced contractile failure by significantly increasing the beating frequency **(C)** and shortening the overall contraction time **(B)**, primarily through the reduction of the systolic phase **(D)** and peak time **(F)**. Data are presented as mean ± SD (n = 3). Statistical significance relative to the H/R Control: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 (Student's t-test).

## Melissa Officinalis nanovesicles induced metabolic hibernation



**Fig. 15.** Effect of *Melissa officinalis* nanovesicles (MO NV) on cardiomyocyte mitochondrial bioenergetics

Real-time evaluation of the mitochondrial Oxygen Consumption Rate (OCR) was performed using the Seahorse XFp Analyser. (A–B) Represent the real-time kinetic OCR traces illustrating the cellular response to sequential injections of mitochondrial modulators under normoxic (N) and hypoxia-reoxygenation (H/R) conditions, respectively. (C–D) Show the quantified core bioenergetic parameters derived from the kinetic data: basal respiration, maximal respiration, proton leak, spare respiratory capacity, and ATP production. White circles/bars denote the untreated Control groups (N control or H/R control); black circles/bars represent cardiomyocytes treated with 8  $\mu\text{g/mL}$  of MO NVs. All OCR values were normalized to the total cellular protein content and are expressed as pmol/min/mg protein. Data are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). An asterisk (\*) indicates a statistically significant difference compared to the respective untreated control group (\* $p < 0.05$ , Student's t-test). The results demonstrate that MO EVs significantly suppress maximal mitochondrial respiration and ATP production under both physiological and H/R stress conditions, inducing a state of metabolic reprogramming.

One of the key observations in this study was the metabolic shift associated with MO nanovesicles during H/R injury (Fig. 15). Real-time bioenergetic analysis using the Seahorse XFp system showed that MO NVs reduced

mitochondrial oxygen consumption, affecting both basal and maximal respiration, while at the same time increasing the extracellular acidification rate (ECAR), indicating enhanced glycolytic activity.

This shift suggests a change in cellular energy metabolism under stress conditions. A large part of the damage during H/R occurs at the moment of reoxygenation, when mitochondrial activity quickly resumes and ROS production rises. By dampening oxidative phosphorylation and shifting energy production toward glycolysis, MO NVs seem to reduce this mitochondrial overactivation. Such modulation may help reduce oxidative stress and support cell survival, as reflected by higher viability compared to the H/R control group (up to ~30%).

## DISCUSSION

An *in vitro* H/R model based on primary cardiomyocytes was used to evaluate the effects of the tested nanotherapeutic approaches. The findings suggest that the SARS-CoV-2 RBD fragment may act as an additional stress factor in the setting of ischemia–reperfusion injury. Even in the absence of viral replication, short-term exposure to the RBD epitope was associated with impaired mitochondrial function, as reflected by reduced basal respiration and spare respiratory capacity [4]. This effect may be related to ACE2-mediated pathways and increased oxidative stress, although the exact mechanisms require further clarification [97, 360].

Our study findings show that targeted strategies can help cardiomyocytes deal with the stress of H/R injury. PLGA nanoparticles loaded with curcumin or vitamin E supported mitochondrial function, improving both basal and maximal respiration and helping maintain ATP levels. These nanoparticles stabilize mitochondria, and that might reduce the energy deficit that adds to cellular stress and inflammation. On the contrary, MO nanovesicles shift cardiomyocyte metabolism toward glycolysis, lowering mitochondrial oxygen use during the reoxygenation phase. This temporary reduction in mitochondrial activity appears to limit the surge of reactive oxygen species and the subsequent inflammatory response.

Together, these approaches provide complementary benefits. PLGA nanoparticles primarily restore mitochondrial energy balance and prevent the cytotoxic effects of free antioxidants, whereas MO nanovesicles adjust cellular metabolism to reduce oxidative stress. Using both strategies together – supporting energy where it is required while slowing metabolism during high-risk periods – may offer an effective way to protect cardiomyocytes from H/R-induced injury.

In H/R injury, preserving mitochondrial function is very important to the protection of cardiomyocytes. Excessive mitochondrial activity during reoxygenation can trigger a surge of reactive oxygen species, worsening cellular damage. With the ability to control this activity and oxidative stress, cardiomyocytes are able to maintain ATP production, support contractile function, and survive the reperfusion phase. This approach shows the importance of strategies that stabilize mitochondrial bioenergetics as a main component of cardioprotection. These observations support further exploration of approaches that modulate cardiomyocyte bioenergetics to reduce cellular injury during ischemia–reperfusion.

To address the limited bioavailability and narrow therapeutic window of conventional antioxidants, pH-sensitive PLGA nanoparticles were used. High concentrations of free curcumin and vitamin E (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were strongly cytotoxic to cardiomyocytes, likely because of pro-oxidant effects such as tocopherol-mediated lipid peroxidation [277, 359]. Encapsulation within PLGA reduced this cytotoxicity and allowed for controlled, targeted release in response to ischemic acidosis (pH 5.5) [309, 343]. Among the formulations tested, PLGA-encapsulated vitamin E showed the best protective effect, enhancing ATP-linked respiration and spare respiratory capacity [4]. This benefit is likely due to preservation of cardiolipin integrity in the inner mitochondrial membrane and stabilization of electron transport chain super-complexes [247, 248].

A different protective mechanism was observed with MO NVs. Rather than acting solely as carriers of antioxidants, MO NVs promoted a shift in cardiomyocyte metabolism toward anaerobic glycolysis. Bioenergetic measurements showed a reduction in mitochondrial oxygen consumption followed by an increase in extracellular acidification, which demonstrates enhanced lactate production [4, 39]. This shift in metabolism is likely to reduce electron flow through mitochondrial complexes, thus limiting the surge of reactive oxygen species during reoxygenation [4, 37]. The protective effect appears to result from a combination of vesicle-contained polyphenols, such as rosmarinic acid, and stable plant miRNAs that transiently influence cardiomyocyte metabolism [310, 317, 318]. Overall, these results indicate that MO nanovesicles provide cytoprotection mainly through modulation of cellular metabolism rather than direct antioxidant activity.

## Synthetic vs. natural strategies

The research provided a unique opportunity to compare two distinct nanotechnological paradigms for myocardial protection.

1. Synthetic PLGA NDs (The “Firefighter” Strategy): this approach relies on the targeted delivery of potent antioxidants (vit. E, Cur) to neutralize the ROS burst after it occurs. The pH-responsive nature of the PLGA polymer ensures that the antioxidants are released precisely when local acidosis (pH 5.5) is detected, thus maximizing efficacy while minimizing systemic toxicity.
2. Natural MO NVs (The “Preventative” strategy): this strategy moves beyond simple antioxidant delivery. By inducing a fundamental shift in cellular energy metabolism (metabolic reprogramming), MO NVs prevent the formation of ROS at the source. By slowing down the cellular “engine” (mitochondria) and heart rate, the vesicles ensure that the cardiomyocyte consumes less oxygen and remains in a protected, quiescent state during the insult.

The integration of these two strategies offers a comprehensive toolkit for future clinical cardiology, potentially applicable in different stages of myocardial infarction management, organ transplantation, and cardioplegic protection.

## CONCLUSIONS

1. The *in vitro* hypoxia/reoxygenation (H/R) model, combined with exposure to the SARS-CoV-2 RBD fragment (100 ng/mL), induced bioenergetic failure in cardiomyocyte cultures. This included a decrease in cell viability to 70% (an additional 10% decline compared to isolated H/R injury), a 30% reduction in mitochondrial ATP production under normoxic conditions, and a 50% decrease in spare respiratory capacity. Furthermore, it impaired contractile function: the contraction rate decreased to 3 contractions/s (compared to 4.2 contractions/s in isolated H/R and 6.6 contractions/s in normoxia), systolic duration was prolonged to 0.33 s (0.27 s in isolated H/R, 0.15 s in normoxia), and diastolic duration was extended to 0.085 s (0.08 s in isolated H/R, 0.06 s in normoxia). Additionally, the SARS-CoV-2 RBD fragment acted as a pro-inflammatory stressor: under H/R conditions, it upregulated IL-6 gene expression by 2.5-fold, Cxcl1 by 2.6-fold, and IL-1 $\beta$  by more than 4-fold. At the protein secretion level, this elicited a statistically significant ( $p < 0.001$ ) surge in cytokine production: GM-CSF levels increased from 0.25 to

2.0 pg/mL, IL-1 $\beta$  from 0.5 to 1.5 pg/mL, IL-6 from 1.0 to 7.0 pg/mL, and TNF- $\alpha$  from 0.01 to 0.2 pg/mL (for comparison, in the isolated H/R model, TNF- $\alpha$  levels increased only from 0.9 to 1.4 pg/mL).

2. The PLGA carrier enabled the safe intracellular delivery of antioxidants at a concentration of 10  $\mu$ g/mL, which was otherwise cytotoxic in its free form (dissolved in DMSO): free vitamin E reduced the metabolic activity of cardiomyocytes under normoxic conditions by 32% (viability decreased to 68%). Due to pH-dependent degradation, the release of antioxidants in an acidic environment (pH 5.5) was 2.5 times faster than at pH 7.4 (100% of curcumin and 75% of vitamin E were released over 110 hours). Under H/R conditions, this sustained release in the PLGA-vit. E group improved cell viability by 26%, shortened the contraction duration from 0.2 s to 0.1 s, and increased the contraction frequency to 14 contractions/s.

Conversely, under normoxic conditions, *Melissa officinalis* nanovesicles (at a dose of 8  $\mu$ g/mL) suppressed cell viability and contractile function: they prolonged the contraction duration 2-fold and reduced the contraction frequency 3-fold (from 18 to 6 contractions/s). However, following H/R injury, this same dose increased cell viability by 30%, shortened the overall contraction duration by 2.5-fold (from 0.3 s to 0.12 s), and increased the contraction rate by 2.5-fold (from 4 to 10 contractions/s).

3. PLGA nanoparticles (loaded with curcumin and vitamin E) stabilized mitochondrial respiratory function under H/R conditions. In the PLGA-vit. E group, basal respiration increased from 125 to 185 pmol/min/mg protein, maximal respiration rose from 290 to 450 pmol/min/mg, spare respiratory capacity elevated from 165 to 265 pmol/min/mg, and ATP-linked respiration increased from 60 to 90 pmol/min/mg.

Meanwhile, under H/R conditions, *Melissa officinalis* nanovesicles (at a dose of 8  $\mu$ g/mL) statistically significantly ( $p < 0.05$ ) suppressed maximal mitochondrial respiration (decreasing it from 250 to 150 pmol/min/mg protein) and its associated ATP production (from 55 to 15 pmol/min/mg protein), thereby limiting reactive oxygen species (ROS) generation. Concurrently, glycolysis was upregulated: the extracellular acidification rate (ECAR) increased 2-fold – from 50 to 100 mpH/min/0.02 mg protein ( $p < 0.01$ ).

## PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. To protect the myocardium from oxidative stress during reoxygenation, lipophilic antioxidants such as vitamin E and curcumin should be delivered via polymeric carriers like PLGA. This approach safely achieves therapeutic concentrations of up to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in cardiomyocytes, which would otherwise be cytotoxic ( $> 40\%$  reduction in metabolic activity) in free form.
2. In designing drug delivery systems for ischemic tissue, it is important to use pH-sensitive polymers that break down faster under acidic conditions (around pH 5.5). This approach helps release antioxidants mainly where they are needed, reducing effects on healthy tissue at normal physiological pH.
3. Nanovesicles from *Melissa officinalis* (MO) can temporarily slow down cardiomyocyte energy use. Administering them before reoxygenation helps protect the cells during reperfusion by lowering oxygen demand and limiting the production of mitochondrial ROS.
4. Because of their negative chronotropic effects and ability to inhibit oxidative phosphorylation, these nanovesicles show potential as additives for cardioplegic and organ-preservation solutions. In heart transplantation, this approach could protect the donor myocardium from energy depletion and oxidative damage during transport and surgery.
5. However, dosing must be strictly controlled. Preclinical data indicates that MO nanovesicle protein concentrations above 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  irreversibly impair baseline cardiomyocyte metabolism.
6. For future *in vivo* studies, priority should be given to intracoronary administration of PLGA-encapsulated vitamin E nanoparticles before reperfusion, for instance during coronary artery restoration. In our experiments, this combination showed the greatest potential to stabilize ATP production and spare respiratory capacity following hypoxia-reoxygenation injury.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. UpToDate. Oxygen delivery and consumption. [peržiūrėta 2022-08-14].
2. Hashmi S, Al-Salam S. Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):8786.
3. UpToDate. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemic conditioning: Pathogenesis. [peržiūrėta 2022-08-14].
4. Keturakis V, Narauskaitė D, Balion Z, ir kt. The effect of SARS-CoV-2 spike protein RBD-epitope on immunometabolic state and functional performance of cultured primary cardiomyocytes subjected to hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23):16554.
5. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – A target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):372–85.
6. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014;19(12):20091-112.
7. Jiang Q. Vitamin E: metabolism, analysis and chemistry. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:76-90.
8. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, ir kt. Curcumin activates the Nrf2 pathway and induces cellular protection against oxidative injury. *Curr Mol Med*. 2020;20(2):116-33.
9. Niki E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J Intern Med*. 2015;30(5):571-9.
10. Sharifi-Rad J, Rayess YE, ir kt. Turmeric and its major compound curcumin on health: bioactive effects and safety profiles. *Front Pharmacol*. 2020;11:1021.
11. Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ε-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm*. 2005;293:261–70.
12. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as a biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377–97.
13. Zhang M, Viennois E, ir kt. Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against arthritis. *Biomaterials*. 2016;86:76-88.
14. Shakeri A, Sahebkar A, ir kt. Melissa officinalis L. – a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2016;188:204-28.
15. Miraj S, Rafieian-Kopaei M, ir kt. Melissa officinalis L: a review study with an antioxidant prospective. *J Evid Based Complement Altern Med*. 2017;22(3):385-94.
16. Das DK, Engelman RM, ir kt. Aerobic vs anaerobic metabolism during ischemia in heart muscle. *Ann Chir Gynaecol*. 1987;76(1):68-76.
17. Macintyre NR. Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician. *Respir Care*. 2014;59(10):1590-1596.
18. UpToDate. Reperfusion injury of the heart. [peržiūrėta 2022-08-14].
19. Sanada S, Komuro I, ir kt. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning and translational aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1723-41.
20. Kulek AR, Anzell A, ir kt. Mitochondrial Quality Control: Role in Cardiac Models of Lethal Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*. 2020;9(1):214.
21. Caccioppo A, Franchin L, ir kt. Ischemia Reperfusion Injury: Mechanisms of Damage/Protection and Novel Strategies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5024.
22. Chistiakov DA, Shkurat TP, ir kt. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2018;50(2):121-127.

23. Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *J Bioenerg Biomembr.* 2009;41(2):99–106.
24. Manechote C, Palee S, ir kt. Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 2017;21(11):2643.
25. Sharp WW, Fang YH, ir kt. Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial I/R. *FASEB J.* 2014;28(1):316-26.
26. Ong SB, Subrayan S, ir kt. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2010;121:2012-22.
27. Fariás JG, Molina VM, ir kt. Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions. *Nutrients.* 2017;9(9):966.
28. Penna C, Femminò S, ir kt. Mitochondria: The Ticking Bomb for Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants.* 2022;11(2):345.
29. Rodrigo R. Prevention of postoperative atrial fibrillation: novel strategy based on antioxidant modulation. *Front Physiol.* 2012;3:93.
30. Chambers DE, Parks DA, ir kt. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17:145-52.
31. Brandes RP, Weissmann N, ir kt. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):687–706.
32. Paradies G, Petrosillo G, ir kt. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic Rat Heart. *Circ Res.* 2004;94(1):53–9.
33. Perkins KA, Pershad S, ir kt. The effects of modulating eNOS activity and coupling in ischemia/reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385:27-38.
34. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524–51.
35. Kevin LG, Novalija E, ir kt. Reactive oxygen species is mediators of cardiac injury and protection. *Anesth Analg.* 2005;101:1275–87.
36. Chouchani ET, Pell VR, ir kt. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during I/R. *Cell Metab.* 2016;23(2):254-63.
37. Murphy MP. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(5):1219-1226.
38. Judge S, Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C1983-92.
39. Karwi QG, Ussher JR. Perturbations in myocardial energy metabolism in ischemic heart disease. *Heart Metab.* 2020;81:11-16.
40. Chen S, Li S. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit.* 2012;18:RA161-5.
41. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta.* 2020;1866(7).
42. Marunouchi T, Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(8):1094-7.
43. Xu T, Ding W, ir kt. Molecular mechanism and therapy application of necrosis during myocardial injury. *J Cell Mol Med.* 2018;22:2547.
44. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol.* 2021;81(4):1133-1143.
45. Safa AR, Day TW, ir kt. Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11:334-49.
46. Shawgo ME, Shelton SN, ir kt. Caspase-mediated Bak Activation and Cytochrome c Release. *J Biol Chem.* 2008;283:35532.

47. Wilson TR, Vince JE, ir kt. Death receptor signalling - new tricks from old dogs. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:4267-4286.
48. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:558–63.
49. Yang JK. Death effector domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis.* 2015;20(2):235-9.
50. Hughes MA, Csomos RA. The Two Faces of c-FLIP. *Trends Cancer.* 2017;3(1):40-52.
51. Parrish AB, Freel CD, ir kt. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6).
52. Zhang D, Lin J, ir kt. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(4):243.
53. Pasparakis M. TNFR1 signalling: the molecular machinery of life and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(3):a022204.
54. Iwai K, Fujita H, ir kt. Linear ubiquitination: a novel regulator of NF- $\kappa$ B and programmed cell death. *EMBO Rep.* 2014;15:755-64.
55. D'Arcy MS. Cell death: a new classification and therapeutic implications. *FEBS J.* 2021;288:3736-3748.
56. Füllsack S, Rosenthal A, ir kt. Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):122.
57. Ranjan K, Pathak C. FADD regulates NF- $\kappa$ B activation and promotes ubiquitination of cFLIPL. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–16.
58. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation.* 2018;15:199.
59. Chen J, Kos R, ir kt. Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis. *Cells.* 2019;8(12):1486.
60. Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* 2015;282(1):19–31.
61. Khalid N, Azimpouran M. Necrosis. *The Lancet.* 2022;80(2046):547–8.
62. Galluzzi L, Vitale I, ir kt. Molecular mechanisms of cell death: recommendations 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
63. Murao A, Aziz M, ir kt. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis.* 2021;26(3-4):152-162.
64. Manik M, Rakesh, ir kt. Role of toll-like receptors in cytokine storm induced by SARS-CoV-2. 2021.
65. Zhang Q, Zhu Z, ir kt. Assessment of Necroptosis-Related Genes in B-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2022;12:2871.
66. Gong Y, Fan Z, ir kt. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer.* 2019;18(1).
67. Newton K, Dugger DL, ir kt. Activity of protein kinase RIPK3 determines necroptosis or apoptosis. *Science.* 2014;343:1357–60.
68. O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, ir kt. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol.* 2011;13:1437–42.
69. Pop C, Oberst A, ir kt. FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of caspase 8 cleavage. *Biochem J.* 2011;433:447–57.
70. Wegner KW, Saleh D, ir kt. Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(3):202.
71. Wang H, Sun L, ir kt. MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol Cell.* 2014;54:133–46.

72. Guo X, Chen Y, ir kt. Necroptosis in heart disease: molecular mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;169:74-83.
73. Remijsen Q, Goossens V, ir kt. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis. *Cell Death Dis.* 2014;5(1):e1004.
74. Alam MR, Baetz D, ir kt. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:80-9.
75. Grootjans S, vanden Berghe T, ir kt. Initiation and execution mechanisms of necroptosis. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1184-95.
76. Zhang T, Zhang Y, ir kt. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia-induced necroptosis. *Nat Med.* 2016;22(2):175-82.
77. Koval OM, Guan X, ir kt. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:4996-5000.
78. Maltsev VA, Kyle JW, ir kt. Molecular identity of the late sodium current in adult dog cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295.
79. Heijman J, Dobrev D, ir kt. CaMKII-dependent regulation of cardiac ion channels. *Europace.* 2017;19(suppl\_4):iv47-iv57.
80. Sciarretta S, Forte M, ir kt. New insights into the role of mTOR signaling in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2018;122(3):489.
81. Cătană CS, Atanasov AG, ir kt. Natural products with anti-aging potential. *Biotechnol Adv.* 2018;36(6):1649-56.
82. Dong Z, Chu G, ir kt. Djhs90s are crucial regulators during planarian regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;498:723-8.
83. Zhang X, Evans TD, ir kt. Classical and alternative roles for autophagy in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2018;29(3):203.
84. Feng Y, He D, ir kt. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2013;24(1):24-41.
85. Przygodzka E, Monaco CF, ir kt. Protein Kinase A and AMPK signaling in Autophagy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:3185.
86. Wu X, Iroegbu CD, ir kt. Cell Death and Exosomes Regulation After Myocardial Infarction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1504.
87. Nah J, Zhai P, ir kt. Upregulation of Rubicon promotes autosis during myocardial I/R injury. *J Clin Invest.* 2020;130:2978-91.
88. Clerkin KJ, Fried JA, ir kt. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2020;141(20):1648-1655.
89. Shi S, Qin M, ir kt. Association of Cardiac Injury with Mortality in Patients with COVID-19. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802-810.
90. Zhang J, Xu J, ir kt. Ischemic heart disease and outcomes in patients with COVID-19. *Heart.* 2020;106:1570-1574.
91. Ashraf UM, Abokor AA, ir kt. SARS-CoV-2, Mitohormesis, and Autophagy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:665839.
92. Oudit GY, Kassiri Z, ir kt. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(7):618-25.
93. Singh KK, Chaubey G, ir kt. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;319:C688-C693.
94. Pius-Sadowska E, Machaliński K, ir kt. The role of CCL2 and other cytokines in COVID-19. *Cells.* 2021;10(10):2730.
95. Siddiq A, Khan N, ir kt. Myocardial Infarction and COVID-19: A Review. *Cureus.* 2022;14(5):e25112.
96. He L, Ding Y, ir kt. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-infected cells. *J Pathol.* 2006;210:288-97.

97. Eirin A, Lerman LO. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in COVID-19. *Front Med.* 2022;9:938367.
98. Kielbowski K, Skórka P, ir kt. The Role of Alarmins in the Pathogenesis of Myocardial Infarction. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;46:8995-9015.
99. Algoet M, Janssens S, ir kt. Myocardial ischemia-reperfusion injury and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 2023;33(6):357-366.
100. Befekadu R, Grenegård M, ir kt. Levels of soluble TNF receptors and survival after STEMI. *Sci Rep.* 2022;12(1):14762.
101. Rolski F, Błyszczuk P. Complexity of TNF- $\alpha$  Signaling in Heart Disease. *J Clin Med.* 2020;9(10):3267.
102. Suematsu N, Tsutsui H, ir kt. Oxidative stress mediates TNF-alpha-induced mtDNR damage. *Circulation.* 2003;107:1418-23.
103. Lazaropoulos MP, Elrod JW. Mitochondria in Pathological Cardiac Remodeling. *Curr Opin Physiol.* 2022;25:100489.
104. Li X, Zhang F, ir kt. Interplay of TNF- $\alpha$  and oxidative stress in coronary chronic total occlusion. *Cytokine.* 2020;125:154836.
105. Kastl L, Sauer SW, ir kt. TNF- $\alpha$  mediates mitochondrial uncoupling in liver cells. *FEBS Lett.* 2014;588(1):175-83.
106. Jack BU, Dias S, ir kt. Comparative Effects of TNF-Alpha and Palmitate on Mitochondrial Dysfunction. *Cell Biochem Biophys.* 2025;83:905-918.
107. Song J, Xiao L, ir kt. Effects of reactive oxygen species on reproductive aging. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1347286.
108. Sulicka-Grodzicka J, Szczepaniak P, ir kt. Systemic inflammation and ROS generation in CVD. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1230051.
109. Nosalski R, Siedlinski M, ir kt. Interplay between oxidative stress and inflammation in CVD. *Front Cardiovasc Med.* 2024;11:1385809.
110. Sharifi-Rad J, Rayess YE, ir kt. Curcumin on health: bioactive effects and safety. *Front Pharmacol.* 2020;11:1021.
111. Leamy AW, Shukla P, ir kt. Curcumin activates and desensitizes TRPA1. *Neurosci Lett.* 2011;503:157-62.
112. Morgan MJ, Liu ZG. Reactive oxygen species in TNFalpha-induced signaling and cell death. *Mol Cells.* 2010;30(1):1-12.
113. Hiram R. Cardiac cytokine therapy? Relevance of targeting inflammatory mediators. *Int J Cardiol.* 2021;37:100918.
114. Bhatt D, Ghosh S. Regulation of the NF- $\kappa$ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front Immunol.* 2014;5:71.
115. Amores-Iniesta J, Barberà-Cremades M, ir kt. Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep.* 2017;21:3414-3426.
116. Dahdah A, Johnson J, ir kt. Neutrophil Migratory Patterns: Implications for CVD. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:795784.
117. Filippi MD. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol.* 2016;129:25-53.
118. Held C, White HD, ir kt. Inflammatory Biomarkers and Outcomes in Stable CAD. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(10):e005077.
119. Wang J, Seo MJ, ir kt. Effect of CCR2 inhibitor-loaded lipid micelles after MI. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:6441-6451.
120. Groot HE, Al Ali L, ir kt. Plasma interleukin 6 levels and cardiac function after STEMI. *Clin Res Cardiol.* 2019;108:612-621.

121. Jiang H, Yang J, ir kt. JAK/STAT3 signaling in cardiac fibrosis: a therapeutic target. *Front Pharmacol*. 2024;15:1336102.
122. Kleinbongard P. Perspective: mitochondrial STAT3 in cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2023;118(1):32.
123. Liu J, Wang F, Luo F. The Role of JAK/STAT Pathway in Fibrotic Diseases. *Biomolecules*. 2023;13(1):119.
124. Duncan SE, Gao S, ir kt. Macrophage Activities in Myocardial Infarction. *Cardiol Res Pract*. 2020;2020:4375127.
125. Kanuri B, Sreejit G, ir kt. Macrophage heterogeneity in myocardial infarction. *iScience*. 2024;27(7):110274.
126. Meschiari CA, Jung M, ir kt. Macrophage overexpression of MMP-9 and cardiac wound healing. *Am J Physiol*. 2018;314:H224-H235.
127. Palmieri EM, McGinity C, ir kt. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism. *Metabolites*. 2020;10(11):429.
128. Kumar A, Taghi Khani A, ir kt. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2022;13:901277.
129. Azizi G, Rasouli J, Naziri H, Gonzalez MV, Garifallou J, Zhang GX, ir kt. GM-CSF production by immune cells in steady state and autoimmune neuroinflammation mapped using fate reporting mice. *Front Immunol*. 2025;16:1617074.
130. Chen S, Saeed AFUH, ir kt. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):207.
131. Bhol NK, Bhanjadeo MM, ir kt. The interplay between cytokines and antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 2024;178:117177.
132. Yu L, Chen J, ir kt. Correlation between inflammatory response and no-reflow after PCI. *Am J Transl Res*. 2024;16:5168-5181.
133. Zdrojewicz Z, Szyca M, ir kt. Kurkuma – nie tylko przyprawa. *Pol Merkur Lekarski*. 2017;42(252):227-30.
134. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons from trials. *AAPS J*. 2013;15:195-218.
135. Aggarwal BB, Deb L, ir kt. Curcumin vs tetrahydrocurcumin for molecular targets. *Molecules*. 2015;20(1):185-205.
136. Hassanalilou T, Ghavamzadeh S, ir kt. Curcumin and gastric cancer review. *J Gastrointest Cancer*. 2019;50:185-92.
137. Wan Mohd Tajuddin WNB, Lajis NH, ir kt. Curcumin's therapeutic effects in lung cancer. *Nutrients*. 2019;11:2989.
138. Howells LM, Iwuji COO, ir kt. Curcumin combined with FOLFOX is safe. *J Nutr*. 2019;149:1133-9.
139. Bateni Z, Rahimi HR, ir kt. Effects of nano-curcumin on glycemic control and lipids. *Phytother Res*. 2021;35:3945-53.
140. Cox FF, Misiou A, ir kt. Protective effects of curcumin in CVD. *Cells*. 2022;11(3):342.
141. Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants*. 2020;9(9):852.
142. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin. *Molecules*. 2014;19(12):20091-112.
143. Correa P, Carvalho L, ir kt. Effectiveness of Insulin Analogs in Diabetes. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2017;39:681-694.
144. Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49(1):105-7.
145. Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact*. 2008;174:27-37.

146. Lucas M, Freitas M, ir kt. Scavenging effect of curcumin and piperine. *Chem Pap*. 2021;75:5269-77.
147. Baum L, Ng A. Curcumin interaction with copper and iron in Alzheimer's models. *J Alzheimers Dis*. 2004;6:367-77.
148. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS protection efficiency of curcumin. *PLoS One*. 2011;6(10):e26012.
149. Cooper JS, Phuyal P, ir kt. Oxygen Toxicity. *StatPearls*. 2025.
150. Emam MA, Farouk SM, ir kt. Curcumin and cinnamon mitigates lead-induced damage. *Front Pharmacol*. 2023;13:1072760.
151. Valko M, Rhodes CJ, ir kt. Free radicals, metals and antioxidants in cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160:1-40.
152. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, ir kt. Curcumin activates the Nrf2 pathway. *Curr Mol Med*. 2020;20(2):116-33.
153. Scapagnini G, Vasto S, ir kt. Modulation of Nrf2 pathway by polyphenols. *Mol Neurobiol*. 2011;44:192-201.
154. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29:1727-45.
155. Baird L, Yamamoto M. Molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Mol Cell Biol*. 2020;40:e00099-20.
156. Shin JW, Chun KS, ir kt. Curcumin induces Nrf2 stabilization through Keap1 modification. *Biochem Pharmacol*. 2020;173:113820.
157. Saha S, Buttari B, ir kt. Overview of Nrf2 signaling pathway in inflammation. *Molecules*. 2020;25:5474.
158. Nguyen T, Nioi P, ir kt. Nrf2-ARE signaling pathway and activation by stress. *J Biol Chem*. 2009;284:13291-5.
159. McMahon M, Campbell KH, ir kt. HDAC inhibitors increase NRF2-signaling. *PLoS One*. 2014;9(11):e114055.
160. Derochette S, Franck T, ir kt. Curcumin and resveratrol on NADPH oxidase. *Chem Biol Interact*. 2013;206:188-95.
161. Pardo R, Garcés M, ir kt. Curcumin induces apoptosis in neuroblastoma via NFkappaB inhibition. *Int J Mol Med*. 2006;18:829-34.
162. Sies H, Jones CFA. Reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23:399-415.
163. Riera-Borrull M, Cavia-Saiz M, ir kt. The Nrf2-Keap1 Axis in Atherosclerosis. *Antioxidants*. 2019;8:472.
164. Wu T, Li X, ir kt. The NRF2-Heme Oxygenase-1 Axis in Heart Failure. *Antioxid Redox Signal*. 2020;32:206-224.
165. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*. 2008;60:79-127.
166. Nakai A, Araki M, ir kt. Heme Oxygenase-1-Derived Carbon Monoxide as a Modulator. *Neuroscience*. 2017;362:10-20.
167. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide from basic science to clinic. *Physiol Rev*. 2006;86:583-650.
168. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29:1727-1745.
169. Gasmí A, Nasreen A, ir kt. Update on Glutathione's Biosynthesis and Functions. *Curr Med Chem*. 2023;30:3631-3654.
170. Minich DM, Brown BI. A Review of Dietary Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients*. 2019;11(9):2073.

171. Iskander K, Jaiswal AK. NQO1 in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2020;32:1221-1246.
172. Prigge JR, Mahadev A, ir kt. The Many Faces of Mammalian Thioredoxin Reductases. *Antioxid Redox Signal.* 2020;32:1153-1180.
173. Ali A, Al-Amin ZM, ir kt. Curcumin attenuates paracetamol-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2021;141:111923.
174. Fan C, Liu X, ir kt. Curcumin improves myocardial bioenergy after sepsis. *Exp Mol Med.* 2021;53(7):1160-1171.
175. Fu W, Yu W, ir kt. Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2022;12:299-314.
176. Mokni M, Hamlaoui-Guesmi S, ir kt. Cardioprotective effect of curcumin against chronic ethanol. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59:1383-8.
177. Tida S, Thatte U, ir kt. Curcumin-Loaded Niosomes Ameliorate AMI in Rats. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:4357-4367.
178. Ha SK, Moon E, ir kt. Curcumin enhances the antitumor activity of TRAIL. *J Urol.* 2005;174:751-6.
179. Liu R, Zhang HB, ir kt. Curcumin alleviates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22:7178-7186.
180. Guo Y, Wang Y, ir kt. Curcumin protects the heart from isoproterenol-induced injury. *Mol Med Rep.* 2012;6:1154-8.
181. Hemshekhar M, Santhosh MS, ir kt. Emerging roles of Nrf2 in neurological disorders. *Arch Biochem Biophys.* 2012;527:76-88.
182. Singh S, Singh PP, ir kt. Stimulation of T-cell immune response by curcumin. *Vaccine.* 2008;26:119-27.
183. Han S, Zheng Y, ir kt. Curcumin promotes apoptosis of HUVECs. *Int J Mol Med.* 2009;24:223-8.
184. Yu W, Zha W, ir kt. Curcumin protects against gastric ulcer in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:1298-305.
185. Myan T, Ramprasath S. Curcumin Ameliorates Striatal Toxicity. *Neurosci Lett.* 2017;655:102-108.
186. Lin CM, Lin YL, ir kt. Curcumin inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Phytother Res.* 2010;24:S63-S68.
187. Miriyala S, Panchatcharam M, ir kt. The notorious PGC-1 $\alpha$ . *Am J Physiol.* 2011;301:H1707-8.
188. Xiao D, Huang W, ir kt. Curcumin induces apoptosis of human multiple myeloma cells. *Mol Med Rep.* 2011;4:945-50.
189. Ahmad A, Sarkar SH, ir kt. SNEDDS for oral delivery of Z-guggulsterone. *J Drug Target.* 2012;20:900.
190. Zhang Y, Du X, ir kt. Curcumin inhibits LPS-induced inflammatory response in macrophages. *Cytokine.* 2021;144:155577.
191. Hu S, Xu Y, ir kt. Curcumin inhibits proliferation of human glioblastoma cells. *Oncol Rep.* 2013;29:517-23.
192. Guimaraes M, Travarty P, ir kt. Curcumin modulates signaling of LPS-induced inflammation. *Phytother Res.* 2017;31:1727-1736.
193. Li X, Wang X, ir kt. Curcumin ameliorates cardiac hypertrophy through JAK/STAT. *Food Funct.* 2012;3:986-93.
194. Das L, Vinayak M. Long term effect of curcumin on p53 and antioxidant enzymes. *PLoS One.* 2010;5(11):e15017.

195. Penna C, Femminò S, ir kt. Thirty Years of Ischemic Preconditioning. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:893321.
196. Wongcharoen W, Phrommintikul A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol*. 2009;133:145-51.
197. Morimoto T, Sunagawa Y, ir kt. Dietary curcumin inhibits p300 HAT and prevents heart failure. *J Clin Invest*. 2008;118:868-78.
198. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(1):7-22.
199. Venturini G, Colasanti M, ir kt. Curcumin inhibits T cell clonal expansion. *J Neuroimmunol*. 2010;229:137-45.
200. Agarwal R, Goel SK, ir kt. Detoxification effects of curcumin in rats exposed to mercury. *J Appl Toxicol*. 2010;30:457-68.
201. Foryst-Ludwig A, Hartge M, ir kt. Adiponectin and the heart. *Herz*. 2011;36:184-90.
202. Dai X, Yin T, ir kt. Curcumin inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells. *Am J Med Sci*. 2012;344:465-70.
203. Mascareno E, El-Shafey AF, ir kt. Curcumin inhibits the complement system. *Mol Immunol*. 2013;54(1):97-105.
204. Wang G, Zhang BT, ir kt. The protective effect of curcumin on myocardial I/R in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63:359-66.
205. Pan Y, Wang Y, ir kt. Curcumin ameliorates cognitive deficits in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(1):47-53.
206. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*. 2013;62:810-7.
207. Kumar S, Chigurupati S, ir kt. Protective effect of curcumin against isoproterenol cardiotoxicity. *Indian J Pharm Sci*. 2015;77:710-8.
208. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:351982.
209. Kaewjirasuwan S, Suthisisang C, ir kt. Curcumin inhibits P-glycoprotein in Caco-2 cells. *Phytother Res*. 2011;25:852-7.
210. Zou P, Liu X, ir kt. Curcumin protects against cardiac hypertrophy in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62:471-8.
211. Gargouri B, Mansour R, ir kt. Cardioprotective potential of curcumin against isoproterenol. *Mol Cell Biochem*. 2017;429:151-60.
212. Hao Y, Wu B, ir kt. Cardioprotective Efficacy of Naringenin Against Heart Failure. *J Myoc Infarct*. 2019;2(1):1-7.
213. Cao Y, Wang Y, ir kt. Curcumin inhibits angiotensin II-induced inflammation. *Food Funct*. 2012;3:1145-51.
214. Jiang S, Han J, ir kt. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacol Res*. 2017;119:373-83.
215. Yang Y, Wang J, ir kt. Curcumin induces apoptosis of lung cancer A549 cells. *Oncol Lett*. 2008;1(4):681-6.
216. El-Azab MF, El-Sawalhi MM, ir kt. The effect of curcumin on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Med Sci Monit*. 2011;17:BR191-8.
217. Lao CD, Ruffin MT 4th, ir kt. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:10.
218. Goel A, Kunnumakkara AB, ir kt. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:787-809.
219. Anand P, Kunnumakkara AB, ir kt. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*. 2007;4(6):807-18.

220. Stohs SJ, Chen O, ir kt. A Review of the Efficacy and Safety of Tetrahydrocurcumin. *Phytother Res.* 2020;34:30-39.
221. Sharma RA, Euden SA, ir kt. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6847-54.
222. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin: review of clinical research. *Altern Med Rev.* 2009;14(2):141-53.
223. Dei Cas M, Ghidoni R. Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health. *Nutrients.* 2019;11(9):2147.
224. Han J, Wang P, ir kt. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive nanoparticle. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:6831–6842.
225. Bisht S, Feldmann G, ir kt. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”). *J Nanobiotechnology.* 2007;5:3.
226. Cuomo J, Appendino G, ir kt. Comparative absorption of curcuminoid lecithin formulation. *J Nat Prod.* 2011;74:664-9.
227. Sasaki H, Sunagawa Y, ir kt. Innovative preparation of curcumin for oral bioavailability. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:660-5.
228. Marchetti S, Mazzanti R, ir kt. Clinical development of curcumin: a lesson to be learned? *Mol Nutr Food Res.* 2014;58:981-9.
229. Radhakrishnan K, Mashhadi Z, ir kt. Curcumin in targeting the signaling pathways against MI. *Curr Pharm Des.* 2016;22:4667-78.
230. da S Feltrin F, Agner T, ir kt. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2022;300:102582.
231. Jiang Q. Vitamin E: metabolism, analysis and chemistry. *Free Radic Biol Med.* 2014;72:76-90.
232. Sen CK, Khanna S, ir kt. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci.* 2006;78:2088-98.
233. Jordão KSLU, Assumpção D, ir kt. Vitamin E intake and food sources in adolescents. *Rev Paul Pediatr.* 2020;39:e2019295.
234. Niki E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J Intern Med.* 2015; 30(5):571-9.
235. Ayala A, Muñoz MF, ir kt. Redox signaling in cellular stress and aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
236. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1000-13.
237. Jomova K, Raptova R, ir kt. Reactive oxygen species, toxicity, and antioxidants. *Arch Toxicol.* 2023;97:2499-2574.
238. Su LJ, Zhang JH, ir kt. ROS-induced lipid peroxidation in apoptosis and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5080843.
239. Ungurianu A, Zanzfirescu A, ir kt. Vitamin E beyond its antioxidant role. *Antioxidants.* 2021;10(5):634.
240. Zingg JM. Vitamin E: regulatory role on signal transduction. *IUBMB Life.* 2019;71(4):456-78.
241. Cook-Mills JM. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate PKC  $\alpha$  and Inflammation. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4(1):137.
242. Chiricosta L, Gugliandolo A, ir kt. Transcriptomic analysis of MAPK signaling and vitamin E. *Nutrients.* 2019;11(5):1081.
243. Kumar M, Deshmukh P, ir kt. Vitamin E supplementation and cardiovascular health. *Cureus.* 2023;15(11):e48142.

244. Zhao H, Gong J, ir kt. Vitamin E relieves COPD by inhibiting p-STAT3 translocation. *Lab Invest.* 2022;102(3):272-80.
245. Glauert HP. Vitamin E and NF-kappaB activation: a review. *Vitam Horm.* 2007;76:135-53.
246. Asbaghi O, Sadeghian M, ir kt. Effect of vitamin E on inflammatory biomarkers: meta-analysis. *Sci Rep.* 2020;10(1):17234.
247. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial dysregulation in the ischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26:517-46.
248. Kilicarslan U, Fuwad A, ir kt. Evaluation of the protective role of vitamin E against lipid oxidation. *Antioxidants.* 2024;13(9):1135.
249. Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition pore: a new target? *Biochem Soc Trans.* 2006;34:232-7.
250. Napolitano G, Fasciolo G, ir kt. Vitamin E supplementation and mitochondria. *Nutrients.* 2019;11(12):2900.
251. Piper HM, Meuter K, ir kt. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:S644-8.
252. Bou Ghanem EN, Clark S, ir kt. The  $\alpha$ -tocopherol form of vitamin E and pulmonary neutrophil recruitment. *J Immunol.* 2015;194:1090-9.
253. Shafiee Mehr M, Haeri SMJ, ir kt. Vitamin E improves oxidative stress in glyphosate-induced mice. *Drug Chem Toxicol.* 2024.
254. Xiang Q, Yi X, ir kt. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Trends Endocrinol Metab.* 2024;35(3):219-34.
255. Dixon SJ, Lemberg KM, ir kt. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149:1060-72.
256. Yamagata K, Tagami M, ir kt. Neuronal vulnerability and prevention with vitamin E. *Neuroscience.* 2010;170:1-7.
257. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac I/R injury. *Physiol Rev.* 2008;88:581-609.
258. Ghallab A. In vitro test systems and their limitations. *EXCLI J.* 2013;12:1024-6.
259. Rodrigo R, Libuy M, ir kt. Molecular basis of cardioprotective effect of vitamins in MI. *Biomed Res Int.* 2013;2013:437613.
260. Ziegler M, Wallert M, ir kt. Cardiovascular protection by vitamin E: treatment strategy? *Antioxidants.* 2020;9(10):935.
261. Wallert M, Ziegler M, ir kt.  $\alpha$ -Tocopherol preserves cardiac function in I/R injury. *Redox Biol.* 2019;26:101292.
262. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: caught in the act. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(4):558-63.
263. Saeidnia S, Manayi A, ir kt. From in vitro experiments to in vivo studies; pros and cons. *Curr Drug Discov Technol.* 2015;12:218-24.
264. Saleh NK, Saleh HA. Protective effects of vitamin E against myocardial I/R injury. *Saudi Med J.* 2010;31(2):142-7.
265. Tripathi S, Sharma A, ir kt. Deltamethrin leads to oxidative stress and apoptosis in heart. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278:55-64.
266. da Cunha Germano BC, de Moraes LCC, ir kt. Vitamin E in experimental neurodegenerative models. *Int J Mol Sci.* 2023;24:11191.
267. Schwenke DC, Rudel LL, ir kt.  $\alpha$ -Tocopherol protects against diet-induced atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2002;43:1927-38.
268. Ramanathan N, Tan E, ir kt. Tocotrienol is a cardioprotective agent against ageing CVD. *Nutr Metab (Lond).* 2018;15:6.

269. Soufizadeh P, Mansouri V, ir kt. Review of animal models in gene therapy studies. *Lab Anim Res.* 2024;40(1):17.
270. Rodrigo R, Hasson D, ir kt. Effectiveness of vitamins C and E in reducing infarct size. *Trials.* 2014;15:192.
271. Chae CU, Albert CM, ir kt. Vitamin E supplementation and heart failure in women. *Circ Heart Fail.* 2012;5(2):176-82.
272. Stephens NG, Parsons A, ir kt. Randomised controlled trial of vitamin E (CHAOS). *Lancet.* 1996;347:781-6.
273. GISSI-Prevenzione trial. Dietary supplementation with n-3 PUFA and vitamin E after MI. *Lancet.* 1999;354:447-55.
274. Sesso HD, Buring JE, ir kt. Vitamins E and C in the prevention of CVD: Physicians' Health Study II. *JAMA.* 2008;300:2123-33.
275. Lee IM, Cook NR, ir kt. Vitamin E in primary prevention of CVD: Women's Health Study. *JAMA.* 2005;294(1):56-65.
276. Wright ME, Lawson KA, ir kt. Serum concentrations of vitamin E and mortality. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:1200-1207.
277. Pearson P, Lewis SA, ir kt. The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements. *BioDrugs.* 2006;20(5):271-3.
278. Bland AR, Payne FM, ir kt. Cardioprotective actions of statins in targeting mitochondria. *Pharmacol Res.* 2022;175:105986.
279. Valls N, Gormaz JG, ir kt. Amelioration of ventricular impairment following MI. *Redox Rep.* 2016;21(2):75-83.
280. Lassnigg A, Punz A, ir kt. Intravenous vitamin E in cardiac surgery on oxidative stress. *Br J Anaesth.* 2003;90(2):148-54.
281. Homayun B, Lin X, ir kt. Challenges and progress in oral drug delivery systems. *Pharmaceutics.* 2019;11(3):129.
282. Orellana-Urzúa S, Briones-Valdivieso C, ir kt. Natural antioxidants in counteracting reperfusion injury. *Antioxidants.* 2023;12(9):1760.
283. Kaye AD, Thomassen AS, ir kt. Vitamin E: emerging clinical role and adverse risks. *Cureus.* 2025;17(2):e78679.
284. Afzal O, Altamimi ASA, ir kt. Nanoparticles in drug delivery: history to applications. *Nanomaterials.* 2022;12(24):4494.
285. Kashkooli FM, Soltani M, ir kt. Controlled anti-cancer drug release through advanced nanosystems. *J Control Release.* 2020;327:316-49.
286. Skripkaitis M, Našlėnė Ž. Prevencinėmis priemonėmis išvengiama mirtingumas Lietuvos ir savivaldybių lygiu bei šių mirčių įtaka vidutinei tikėtinai gyvenimo trukmei 2019–2023 m. Visuomenės sveikata. 2024;3(106):73–84. doi:10.47458/V.S.2024.3(106)-7.
287. World Health Organization. WHO mortality database [Interneto svetainė]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cituota 2024 gegužės 5]. Available from: WHO Mortality Database
288. Han D, Kang SH, ir kt. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by chelating agent. *Sci Rep.* 2022;12:2050.
289. Ferdinandy P, Schulz R, ir kt. Interaction of cardiovascular risk factors with I/R injury. *Pharmacol Rev.* 2007;59(4):418–58.
290. Man C, Gong D, ir kt. Meta-analysis of remote ischemic conditioning in AMI. *Sci Rep.* 2017.
291. Engstrøm T, Kelbæk H, ir kt. Effect of ischemic postconditioning on clinical outcomes (DANAMI-3). *JAMA Cardiol.* 2017;2(5):490-7.

292. Buckley LF, Abbate A. Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. *Eur Heart J*. 2018;39:2063–9.
293. Røsand Ø, Høydal MA. Cardiac Exosomes in Ischemic Heart Disease—A Narrative Review. *Diagnostics*. 2021;11(2).
294. Santulli G, Paloczi J, ir kt. Cardiomyocyte-Derived Exosomes: Biological Functions. 2019.
295. Thankam FG, Agrawal DK. Infarct Zone: a Novel Platform for Exosome Trade in Regeneration. *J Cardiovasc Transl Res*. 2020;13:686–701.
296. Welsh JA, Goberdhan DCI, ir kt. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2023 (MISEV2023). *J Extracell Vesicles*. 2024;13(2):e12404.
297. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575–81.
298. Chen L, Wang Y, ir kt. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431:566–71.
299. Feng Y, Huang W, ir kt. Ischemic preconditioning potentiates protective effect of stem cells through miR-22. *PLoS One*. 2014;9(2).
300. Zhang M, Viennois E, ir kt. Plant derived edible nanoparticles for arthritis. *Biomaterials*. 2016;86:76-88.
301. Zhuang X, Deng ZB, ir kt. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:28713.
302. Dad HA, Gu TW, ir kt. Plant-derived exosome-like nanoparticles: a concise review. *Front Plant Sci*. 2021;12:715208.
303. Martin A, Prior R, ir kt. Effect of fruits and vegetables rich in vitamin E and C. *J Gerontol A*. 2000;55:B144-51.
304. Bhagavathula N, Warner RL, ir kt. Combination of curcumin and ginger for wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009;17(3):360-6.
305. Ju S, Mu J, ir kt. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells. *Mol Ther*. 2013;21(7):1345-57.
306. Man F, Meng C, ir kt. Ginger-derived nanoparticles protect against postoperative ileus. *Front Pharmacol*. 2022;13:850488.
307. Ma Y. Role of neutrophils in cardiac injury and repair following myocardial infarction. *Cells*. 2021;10(7):1676.
308. Nemati M, Singh B, ir kt. Plant-derived extracellular vesicles: a novel therapeutic approach. *Mol Biol Rep*. 2022;49:9971-86.
309. Raimondo S, Naselli F, ir kt. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 2015;6:19514-27.
310. Chin AR, Fong MY, ir kt. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Res*. 2016;26(2):217-28.
311. Shakeri A, Sahebkar A, ir kt. *Melissa officinalis* L. – traditional uses and phytochemistry. *J Ethnopharmacol*. 2016;188:204-28.
312. Miraj S, Rafieian-Kopaei M, ir kt. *Melissa officinalis* L: an antioxidant prospective review. *J Evid Based Complement Altern Med*. 2017;22(3):385-94.
313. Nadeem M, Muhammad Imran M, ir kt. Antioxidant potential of rosmarinic acid. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2019;9(9):361-7.
314. Woith E, Fuhrmann G, ir kt. Extracellular vesicles—connecting kingdoms. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5695.
315. Wang B, Wang X, ir kt. Ginger-derived nanoparticles protect against myocardial I/R injury. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):274.

316. Chen Q, Deng Z, ir kt. Edible plant-derived exosome-like nanoparticles as therapeutic agents. *Nanomedicine*. 2021;16(5):421–435.
317. Zhang L, Hou D, Chen X, ir kt. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1. *Cell Res*. 2012;22(1):107-26.
318. Zhang L, Chen T, Yin Y, ir kt. Dietary plant miRNAs as implicit signposts of 2'-O-methylation. *Sci Rep*. 2016;6:31712.
319. Toth I, Hughes GJ, ir kt. The neuroprotective effect of rosmarinic acid. *Curr Neuroparmacol*. 2020;18(12):1246-60.
320. Mu J, Zhuang X, ir kt. Interspecies communication through edible plant exosome-like nanoparticles. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(7):1561-73.
321. Su Y, Zhang B, ir kt. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery. *Drug Deliv*. 2021;28(1):1397–1418.
322. Laracuente ML, Marina HY, ir kt. Zero-order drug delivery: state of the art. *J Control Release*. 2020;327:834–56.
323. Bowey K, Tanguay JF, ir kt. Liposome technology for cardiovascular disease treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(2):249–65.
324. Suarez S, Almutairi A, ir kt. Micro- and nanoparticles for treating CVD. *Biomater Sci*. 2015;3(4):564–80.
325. Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified PCL nanoparticles for tamoxifen delivery. *Int J Pharm*. 2005;293:261–70.
326. Weissleder R, Nahrendorf M, ir kt. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nat Mater*. 2014;13(2):125–38.
327. Yang W, Liang H, ir kt. Gold nanoparticle-based photothermal therapy for cancer. *Sustain Mater Technol*. 2019;22:e00109.
328. Wang J, Potocny AM, ir kt. Gold Nanoshell-Lined Tetrapyrrole Compounds. *ACS Omega*. 2020;2(926–40).
329. Bobo D, Robinson KJ, ir kt. Nanoparticle-Based Drugs: Review of FDA-Approved Materials. *Pharm Res*. 2016;33(10):2373–87.
330. Arias LS, Pessan JP, ir kt. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2):46.
331. Huang KW, Hsu FF, ir kt. Highly efficient and tumor-selective nanoparticles. *Sci Adv*. 2020;6(16):eaax5032.
332. Manshian BB, Jiménez J, ir kt. Personalized medicine and monitoring by quantum dot-toxicity. *Biomaterials*. 2017;127:1–12.
333. Levchenko TS, Hartner WC, ir kt. Liposomes in diagnosis and treatment of CV disorders. *Methodist Deakey Cardiovasc J*. 2012;8(1):36–41.
334. Sarfraz M, Afzal A, ir kt. Dual-Drug-Loaded Nano-Sized Liposomal Formulation. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):151.
335. Samimi S, Maghsoudnia N, ir kt. Lipid-based nanoparticles for drug delivery systems. *Characterization and Biological Nanosystems*. Elsevier; 2019. p. 47–76.
336. Sercombe L, Veerati T, ir kt. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. 2015;6:286.
337. Fonseca-Santos B, Gremião MPD, ir kt. Nanotechnology-based systems for Alzheimer's. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:4981–5003.
338. Kumari A, Yadav SK, ir kt. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery. *Colloids Surf B*. 2010;75(1):1–18.
339. Park JH, Dehaini D, ir kt. Biomimetic nanoparticle technology for CVD detection. *Nanoscale Horiz*. 2020;5(1):25–42.

340. Mitchell MJ, Billingsley MM, ir kt. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(2):101–24.
341. Makadia HK, Siegel SJ. PLGA as a biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377–97.
342. Rezvantab S, Drude NI, ir kt. PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:1260.
343. Danhier F, Ansorena E, ir kt. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161:505–22.
344. Nair KL, Thulasidasan AKT, ir kt. Purely aqueous PLGA formulations of curcumin. *Int J Pharm.* 2012;425:44–52.
345. Yallapu MM, Gupta BK, ir kt. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2010;351:19–29.
346. Agrahari V, Agrahari V. Facilitating clinical translation of nanomedicine: challenges. *Drug Discov Today.* 2018;23(5):974–91.
347. Mitragotri S, Lammers T, ir kt. Drug delivery research for the future: nano horizons. *J Control Release.* 2017;246:183–4.
348. Wechsler ME, Vela Ramirez JE, ir kt. Nanoparticle-Mediated Drug Delivery for Alzheimer's. *Ind Eng Chem Res.* 2019;58:15079–87.
349. Hua S, de Matos MBC, Metselaar JM, Storm G. Current Trends and Challenges in the Clinical Translation of Nanoparticulate Nanomedicines. *Front Pharmacol.* 2018;9:790.
350. Hescheler J, Meyer R, Plant S, ir kt. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res.* 1991;69(6):1476–1486.
351. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new target for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2004;6(6):436–442.
352. Suzuki YJ, Gychka SG. SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Cell Signaling in Human Host Cells: Implications for Possible Consequences of COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel).* 2021;9(1):36.
353. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, ir kt. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. *Circ Res.* 2020;126(10):1456–1474.
354. Lei Y, Zhang J, Schiavon CR, ir kt. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ Res.* 2021;128(9):1323–1326.
355. Shirato K, Kizaki T. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory peptides via TLR4 signaling in murine macrophage-like cells. *Heliyon.* 2021;7(2):e06187.
356. Chaudhari U, Nemade H, Gaspar JA, ir kt. A 24h hypoxia/reoxygenation model in primary rat cardiomyocytes for the study of ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep.* 2017;7(1):17536.
357. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79(2):609–634.
358. Grune T, Ott C, Häseli S, ir kt. The “MYOCYTER” – convert cellular and cardiac contractions into numbers with ImageJ. *Sci Rep.* 2019;9(1):15112.

## PUBLIKACIJOS

### Straipsniai disertacijos tema

1. **Keturakis, V.**, Narauskaitė, D., Balion, Z., Gečys, D., Kulkovienė, G., Kairytė, M., Žukauskaitė, I., Benetis, R., Stankevičius, E., Jekabsone, A. The Effect of SARS-CoV-2 Spike Protein RBD-Epitope on Immunometabolic State and Functional Performance of Cultured Primary Cardiomyocytes Subjected to Hypoxia and Reoxygenation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023;24(23): 16554. <https://doi.org/10.3390/ijms242316554> [S1] [M.kr.: N010, M001] [IF: 4.9, AIF: 5.664, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)]
2. **Keturakis, V.**, Gok, O., Narauskaitė, D., Balion, Z., Kairytė, M., Žukauskaitė, I., Kulakauskienė, D., Gol, D., Pilnikovaitė, E., Benetis, R., Stankevičius, E., Lesauskaitė, V., Benyamin, D., Jekabsone, A. pHResponsive PLGA Nanoparticles Enable Sustained Curcumin Release and Preserve Mitochondrial Bioenergetics in Cardiomyocytes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2026;118:108075. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2026.108075> [S1] [M.kr.: N010, M001] [IF: 4.9, AIF: 4.264, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)]

### Kiti straipsniai

1. Aitaliyev, S., Rumbinaitė, E., Jurėnas, M., Čeponienė, I., **Keturakis, V.**, Nekrošius, R., Orazymbetov, Y., Benetis, R., Pangonytė, D. Histologically Validated Myocardial Fibrosis in Relation to Left Ventricular Geometry and Its Function in Aortic Stenosis. *Medicina*, 2024;60(4):667. <https://doi.org/10.3390/medicina60040667> [S1] [M.kr.: M001] [IF: 2.4, AIF: 3.037, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)]
2. Kuprytė, M., Lesauskaitė, V., **Keturakis, V.**, Bunevičienė, V., Utkienė, L., Jusienė, L., Pangonytė, D. Remodeling of Cardiomyocytes: Study of Morphological Cellular Changes Preceding Symptomatic Ischemic Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023;24(19): 14557. <https://doi.org/10.3390/ijms241914557> [S1] [M.kr.: M001] [IF: 4.9, AIF: 5.664, kvartilis: Q1 (2023. InCites JCR SCIE)]

## Patentai, užregistruoti EPO

Balion, Zbigniev (aut., išrad.); Žukauskaitė, Ineta (aut., išrad.); **Keturakis, Vytenis** (aut., išrad.); Jekabsonė, Aistė (aut., išrad.); Benetis, Rimantas (aut., išrad.). Vaistinės melisos augalinės kilmės nanopūslelių kompozicijos ir jų naudojimas = *Melissa officinalis* plant-derived nanovesicle compositions and uses thereof: patentinės paraiškos publikacija Nr. EP 4 578 456 A1; paraiškos Nr. 23220796.9; Int. Cl. A61K 36/53, A61K 9/50, A61P 9/10; paraiškos padavimo data 2023-12-29; paraiškos paskelbimo data 2025-07-02, Biuletenis, Nr. 2025/27 Miunchenas: Europos patentų tarnyba 2025. <https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.2/publication-dates/202502/patents/EP4578456NWA1/document.pdf>

## Vadovėliai, mokomosios knygos ar metodinės priemonės

Siudikas, A., Budrikis, A., Jakuška, P., Giedraitis, S., **Keturakis, V.**, Venckus, V., Nekrošius, R., Karčiauskas, D. Šiuolaikinė chirurginė vainikinių arterijų revaskulizacijos praktika: metodinė mokomoji knyga studentams, rezidentams, gydytojams. Kaunas: LSMU Akademinė leidyba, 2024. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/246635> [K2b] [M.kr.: M001]

## Pranešimai, skaityti konferencijose

Susiję su disertacija

1. **Keturakis, V.**, Jekabsonė, A., Lesauskaitė, V., Žukauskaitė, I., Kairytė, M., Balion, Z., Pilnikovaitė, E., Gök, Özgül, Göl, D., Benetis, R. Effect of Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles on Ischaemia-Reperfusion (I. Medicina : Abstracts of the International Scientific Conferences on Medicine & Public Health Research Week 2023 (RW2023) : March 29-31, 2023, Riga, Latvia, 59(Suppl. 2), 17-17. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/118761> [T1e] [M.kr.: M001]
2. **Keturakis, V.**, Göl, D., Žukauskaitė, I., Kairytė, M., Balion, Z., Pilnikovaitė, E., Lesauskaitė, V., Gök, Özgül, Jekabsonė, A., Benetis, R. The effect of vitamin E-loaded polymeric nanoparticles on ischaemia – reperfusion (I/R) injury in primary rat cardiomyocyte culture. International Health Sciences Conference for All (IHSC for All) “Precision Medicine” : Abstract Book 2024 : [March 25–26, 2024, Kaunas] Edited by Ignas Lapeikis, Livija Petrokaitė, 430-431. <https://smd.lt/uploads/publications/IHSCforAll2024.pdf> [T1e] M.kr.: M001, N010]

## Kiti pranešimai

1. Baronaitė, E., Kulakauskienė, D., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Stankevičius, E., Jekabsone, A. The Impact of Breast Adenocarcinoma – Derived Extracellular Vesicles on the Cardiovascular System. International Health Sciences Conference IHSC : Abstract Book 2025 : [March 13–14, 2025, Kaunas] Edited by Karina Zerr, 210-211. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/250712> [T1e] [M.kr.: M001]
2. Baronaitė, E., Kulakauskienė, D., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Stankevičius, E., Jekabsone, A. Breast adenocarcinoma-derived extracellular vesicles are associated with changes in the metabolic and bioenergetic functions of cardiovascular system cells. Open Readings 2025 : The 68<sup>th</sup> International Conference for Students of Physics and Natural Sciences : Book of Abstracts 2025 Editors: Rimantas Naina Et Al., 107-107. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/252698> [T2] [M.kr.: M003, N011]
3. Kulakauskienė, D., Kriaučiūnaitė, K., Genčauskytė, G., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Tamulaitienė, G., Sasnauskas, G., Stankevičius, E., Jekabsone, A. Size-dependent effects of glioblastoma-derived extracellular vesicles on the cardiovascular system. Glia : XVII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Marseille, 8–11 July 2025, 73(Suppl. 1), 1343-1344. <https://doi.org/doi.org/10.1002/glia.70038> [T1a] [M.kr.: N010, N004] [IF: 5.1, AIF: 3.959, kvartilis: Q1 (2024. InCites JCR SCIE)]
4. Kulakauskienė, D., Kriaučiūnaitė, K., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Stankevičius, E., Jekabsone, A. Understanding the Role of Glioblastoma-Derived Extracellular Vesicles in Cardiovascular Cell Responses. Health for All 2025 “Healthy Beginnings, Hopeful futures” : Abstract Book : April 4<sup>th</sup>, 2025, 24-25. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/251420> [T1e] [M.kr.: N010]
5. Naraukaitė, D., **Keturakis, V.**, Zveaghin, E., Žumbakis, N., Jekabsone, A. Virus primed airway epithelial cells extracellular vesicles alter primary rat cardiomyocyte function and metabolism. 2<sup>nd</sup> World Congress on Targeting EVs 2025 : October 15–16, 2025, Valencia, Spain : Abstracts Book, 48-48. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/256597> [T2] [M.kr.: N010]

6. Genčauskytė, G., Kulakauskienė, D., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Stankevičius, E., Jekabsone, A. Glioblastoma-Derived Extracellular Vesicles Alter the Metabolic Functions of Vascular Endothelium Cells and Cardiomyocytes. 16<sup>th</sup> International Conference of the Lithuanian Neuroscience Association : 29<sup>th</sup> November 2024, Vilnius, Lithuania, 38-38. <https://hdl.handle.net/20.500.12512/248265> [T1e] [M.kr.:M003, N010]
7. Kulakauskienė, D., Genčauskytė, G., **Keturakis, V.**, Balion, Z., Tamulaitienė, G., Sasnauskas, G., Stankevičius, E., Jekabsone, A. The investigation of glioblastoma-derived extracellular vesicles effect on cells in the cardiovascular system. 1st World Congress on Targeting Extracellular Vesicles “Mitochondria and Microbiota: Crucial Impact” : October 17-18, 2024, Malta & Online : Book of Abstracts (1–, p. 43-43). World Mitochondria Society. <https://doi.org/10.60738/e67q-cv52> [T2] [M.kr.:M003, N010]

## CURRICULUM VITAE

**Name, Surname:** Vytenis Keturakis  
**Address:** Hospital of Lithuanian University of Health Sciences  
Kauno klinikos;  
Lithuanian University of Health Sciences,  
Institute of Cardiology, Preclinical Research  
Laboratory for Medicinal Products  
**E-mail:** vytenis.keturakis@kaunoklinikos.lt  
vytenis.keturakis@lsmu.lt

ORCID: 0000-0001-5649-5717

Web of Science ResearcherID: CXO-0235-2022

H-index: 3

Number of publications: 9

Number of citations (WoS): 25

### Education

2010–2016 Master's degree in Medicine, qualification of Medical Doctor, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Medicine  
2015–2016 Internship at Republican Vilnius University Hospital  
2016–2021 Residency in Cardiac Surgery, Lithuanian University of Health Sciences  
2021–present Doctoral studies in Medical and Health Sciences (Medicine), Lithuanian University of Health Sciences

### Professional experience

2021–present Cardiac Surgeon, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery  
2023–present Junior Researcher, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Laboratory of Preclinical Drug Research

## Scientific and research activities

Research focuses on cardiovascular pathophysiology, particularly cellular and molecular mechanisms of cardiac injury. Experimental work includes primary cardiomyocyte culture, ischemia–reperfusion models, and investigation of extracellular vesicle-mediated effects on cardiovascular cells. Methods include cell isolation, viability assays, and bioenergetic analysis.

## Participation in Scientific Projects

Participant (Junior Researcher): “Management technology for COVID-19-induced cardiovascular mitochondrial dysfunction (cTECH)”.

## Scientific publications

*Publications forming the basis of the doctoral dissertation (first-author publications)*

1. Keturakis V, Gok O, Puzinovė D, Balion Z, Kairytė M, Žukauskaitė I, et al. pH-responsive PLGA nanoparticles enable sustained curcumin release and preserve mitochondrial bioenergetics in cardiomyocytes. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2026;118:108075.
2. Keturakis V, Narauskaitė D, Balion Z, Gečys D, Kulkovienė G, Kairytė M, et al. The effect of SARS-CoV-2 spike protein RBD-epitope on immunometabolic state and functional performance of cultured primary cardiomyocytes subjected to hypoxia and reoxygenation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23):16554. doi: 10.3390/ijms242316554.

*Other publications*

1. Aitaliyev S, Rumbinaitė E, Jurenas M, Čeponienė I, Keturakis V, et al. Histologically validated myocardial fibrosis in relation to left ventricular geometry and its function in aortic stenosis. *Medicina (Kaunas).* 2024;60(4):667. doi: 10.3390/medicina60040667.
2. Kuprytė M, Lesauskaitė V, Keturakis V, et al. Remodeling of cardiomyocytes: study of morphological cellular changes preceding symptomatic ischemic heart failure. *Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14557. doi: 10.3390/ijms241914557.
3. Aitaliyev S, Rumbinaitė E, Mėlinytė-Ankudavičė K, Keturakis V, et al. Early outcomes of patient–prosthesis mismatch following aortic valve replacement. *Perfusion.* 2022;37(7):692–699. doi: 10.1177/02676591211023286.

### **Participation in scientific conferences**

- |              |   |
|--------------|---|
| 2025         | European Meeting on Glial Cells in Health and Disease; International Health Sciences Conference; Health for All; Open Readings. |
| 2024         | World Congress on Targeting Extracellular Vesicles; Lithuanian Neuroscience Association Conference.                             |
| 2015–present | Participation in national and international conferences in cardiology and cardiac surgery.                                      |

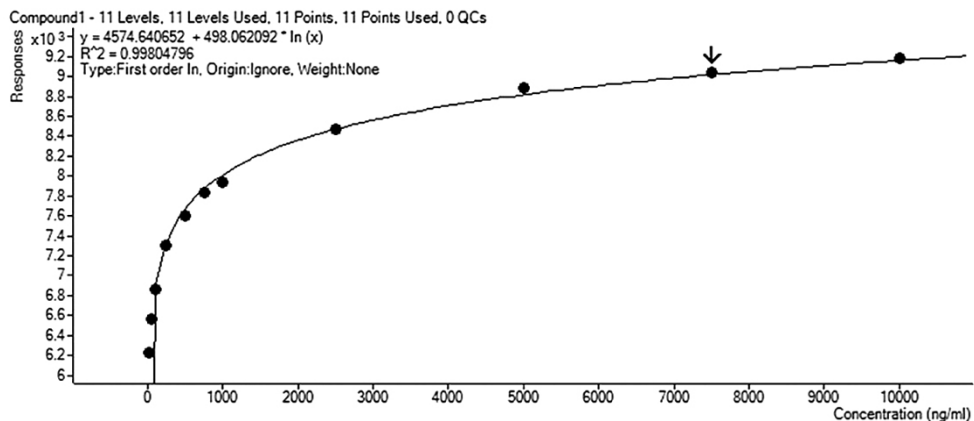
### **Professional development**

- |      |  |
|------|--|
| 2021 | Cardiovascular anastomosis skills training |
| 2019 | Salzburg Cardiac Surgery Seminar, Austria  |
| 2018 | Salzburg Cardiac Surgery Seminar, Austria  |

### **Additional information**

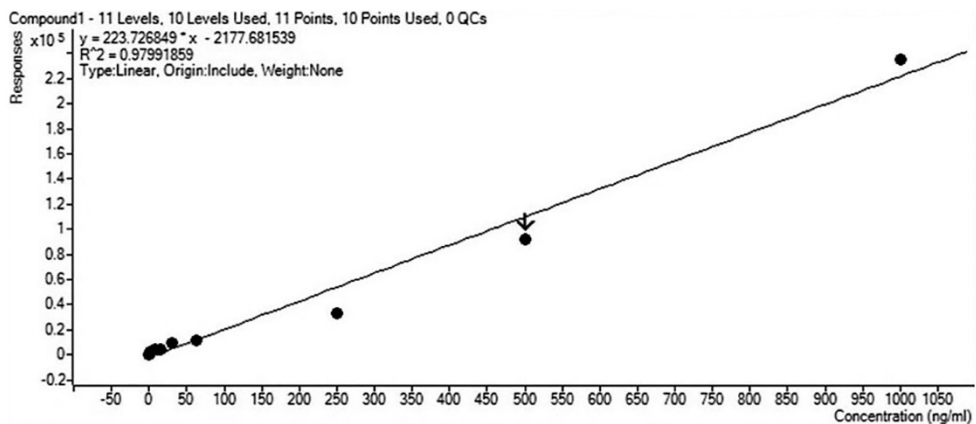
The doctoral dissertation is based on two first-author publications focusing on nanoparticle-based cardioprotection and SARS-CoV-2-related cardiomyocyte dysfunction. Both publications are in peer-reviewed international journals indexed in Web of Science databases.

## PRIEDAS



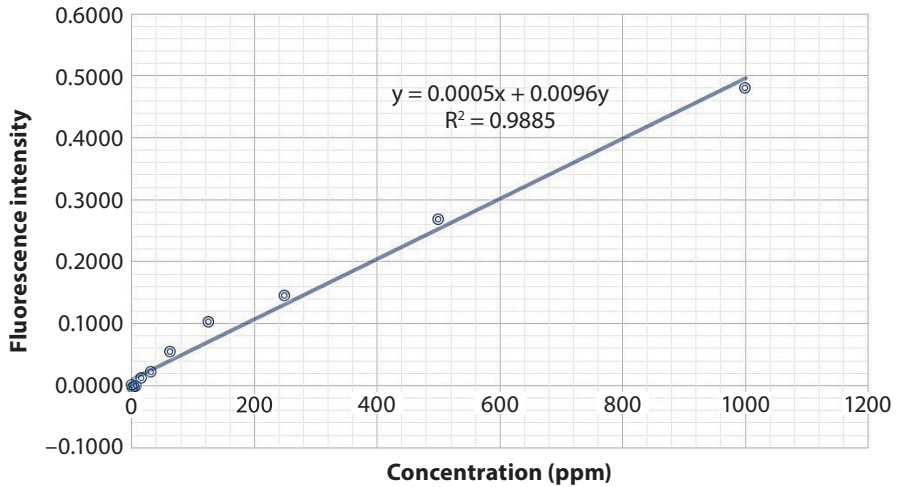
*S1 pav. Kurkumino kalibravimo kreivė  
nustatyta LC-MS/MS metodu*

Grafike pavaizduotas prietaiso atsako priklausomumas nuo kurkumino koncentracijos (0–10 000 ng/ml). Naudotas pirmo laipsnio logaritminis priartinimas, užtikrinantis aukštą koreliacijos koeficientą ( $R^2 = 0,998$ ). Rodyklė nurodo vieną iš standartinių matavimo taškų.



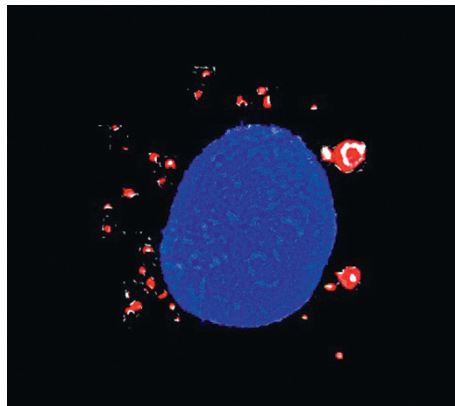
*S2 pav. Vitamino E ( $\alpha$ -tokoferolio) kalibravimo kreivė  
nustatyta LC-MS/MS metodu*

Pavaizduota tiesinė priklausomybė tarp prietaiso atsako ir vitamino E koncentracijos (0–1000 ng/ml). Nustatytas aukštas duomenų patikimumas ( $R^2 = 0,9799$ ). Kreivė naudota tiksliam vitamino E kiekiui nanodalelėse ir jo atpalaidavimo kinetikai apskaičiuoti.



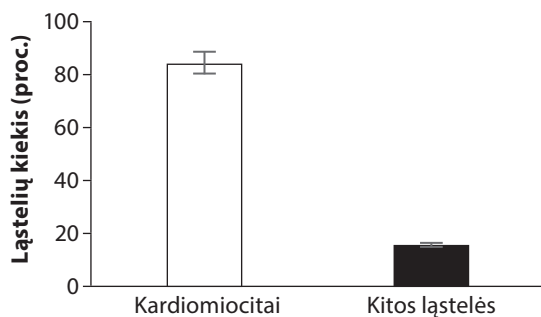
**S3 pav.** Rodamino B (RhB) kalibravimo kreivė

Tiesinė fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo RhB koncentracijos (ppm). Lygtis  $y = 0,0005x + 0,0096y$  ir determinacijos koeficientas  $R^2 = 0,9885$  naudoti kiekybiniam RhB konjugato vertinimui nanodalelėse.



**S4 pav.** PLGA-RhB nanodalelių internalizacija kardiomiocituose

Fluorescencinės mikroskopijos vaizdas po 24 valandų inkubacijos. Mėlyna spalva (Hoechst 33342) žymi ląstelės branduolį, raudona spalva – su Rodaminu B konjuguotas PLGA nanodaleles. Matoma ryški nanodalelių akumuliacija citoplazmoje bei perinukleariniame regione.



***S5 pav. Pirminės kardiomiocitų kultūros sudėtis***

Histograma atspindi santykinį ląstelių pasiskirstymą išskirtoje kultūroje pagal Troponino T (cTnT) žymens raišką. Kardiomiocitai sudaro  $84,3 \pm 5,2$  proc. visos populiacijos, likusią dalį sudaro kitos ląstelės (fibroblastai bei endotelio ląstelės).

## PADĖKA

Pirmiausia nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui prof. habil. dr. Rimantui Benečiui už neįkainojamą pagalbą, nuolatinį palaikymą ir vertingas įžvalgas per visą doktorantūros laikotarpį.

Taip pat reiškiu nuoširdžią padėką savo konsultantams: dr. Aistei Jekabsoniui bei prof. habil. dr. Vaivai Lesauskaitei už profesionalias konsultacijas, mokslines diskusijas, vertingus patarimus ir kantrybę planuojant bei vykdamas tyrimus.

Dėkoju Turkijos mokslininkei assoc. prof. Ozgul Gok-Ozatay už bendradarbiavimą ir vertingas įžvalgas.

Esu dėkingas savo laboratorijos kolegoms – dr. Zbigneviui Balion, Deimantei Puzinovei, Inetai Žukauskaitei, Deimantei Kulakauskienei – už bendradarbiavimą, pagalbą ir draugišką atmosferą darbo metu.

Dėkoju studentams, kurie prisijungė ir padėjo – ypač Mildai Kairytei, taip pat Ernestai Pilnikovai, Daniel Benyamin, Ernui Zveaghin.

Nuoširdžiai dėkoju Vaistinių medžiagų ikiklinikinių tyrimų laboratorijos vadovui prof. Edgarui Stankevičiui už suteiktas galimybes vykdyti mokslinius tyrimus ir palaikymą.

Esu dėkingas Širdies chirurgijos skyriaus kolegoms už palaikymą, supratimą ir pagalbą kasdienėje profesinėje veikloje.

Didžiausią padėką skiriu savo šeimai – už begalinį palaikymą, kantrybę ir tikėjimą manimi. Ypač dėkoju savo mylimai žmonai Silvijai už meilę, supratimą ir įkvėpimą einant šiuo keliu.