

**A MITOKONDRIÁLIS MINŐSGKONTROLL MODULÁLÁSÁNAK SZEREPE
MAGASVÉRNYOMÁS-INDUKÁLTA SZÍVELÉGTELENSÉGBEN**

Ph.D. Tézis



Szerző: Horváth Orsolya

Programvezető: Prof. Tóth Kálmán, M.D., D.Sc.

Projektvezetők: Prof. Halmosi Róbert M.D., D.Sc.

Deres László Ph.D.

1.sz. Belgyógyászati Klinika

Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar

Magyarország

2021

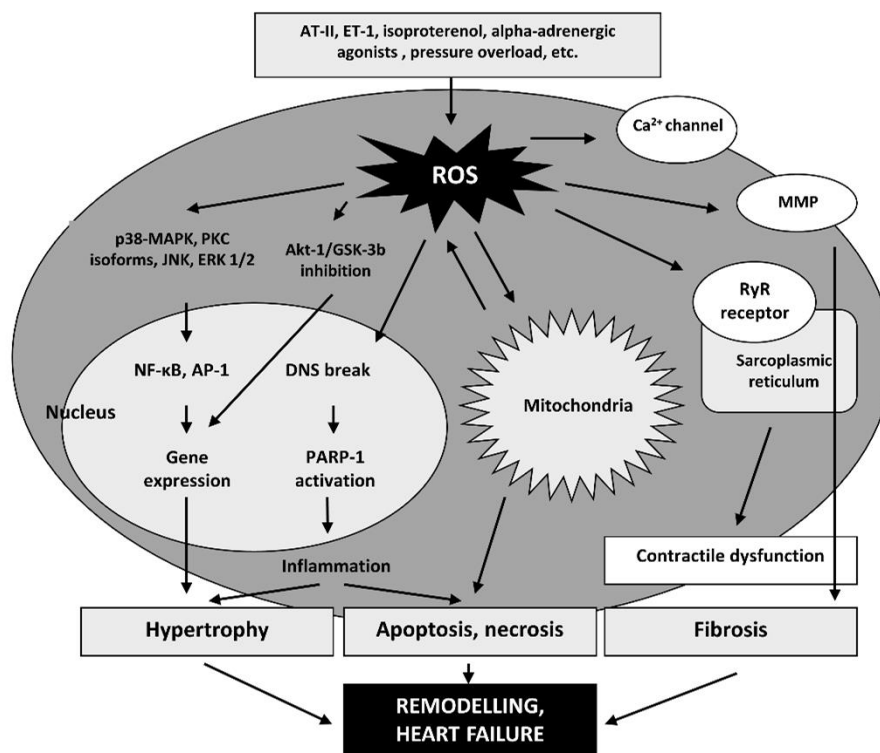
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADP	adenozin-difoszfát
Akt	protein kináz B
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
ANOVA	varianciaanalízis
ATP	adenozin -trifoszfát
BGP-15	O- [3-piperidino-2-hidroxi-1-propil] -nikotinsav-amidoxim-dihidroklorid
BNP	agyi nátriuretikus peptid
COX1	citokróm c oxidáz 1. alegység
COX3	citokróm c oxidáz 3. alegység
CREB	cAMP válasz kötő fehérje
DRP1	dynamin-related protein-1
DUSP	kettős specificitású (dual specificity) foszfatáz
E	korai diasztolés töltés mitralis csúcssebessége
E'	korai diasztolés mitralis billentyű sebesség
ECM	extracelluláris mátrix
EF	ejekciós frakció
ERK1/2	extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
ETC	mitokondriális légzési lánc
Fis1	mitokondriális hasadási fehérje 1
GSK-3β	glikogén szintáz kináz-3 béta
H₂O₂	hidrogén -peroxid
HF	heart failure (szívelégtelenség)
IFM	interfibrilláris mitokondriumok
IMM	belső mitokondriális membrán
JNK	c-jun N-terminális kináz
LV	bal kamra
LVEDV	bal kamrai végdiasztolés térfogat
LVEF	bal kamrai ejekciós frakció
LVESV	bal kamra végső szisztolés térfogat
LVIDd	bal kamra végső diasztolés diaméter
LVIDs	bal kamra vég-szisztolés diaméter
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz

Mfn1/2	mitofuzin 1 és 2
MKP-1	MAPK foszfatáz-1
NADH	nikotinamid -adenin -dinukleotid
NRCM	primer neonatális patkány kardiomiocita
OMM	külső mitokondriális membrán
OPA1	optikus atrófia fehérje-1
PARP-1	poli (ADP-ribóz) polimeráz-1
PGC-1α	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor- γ koaktivátor-1 α
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PW	bal kamra poszterior fal vastagság
ROS	reaktív oxigén szabad gyökök
SHR	Spontán hipertenzív patkány
TGF-β	transzformáló növekedési faktor
TNF-α	tumor nekrosis faktor- α
VDAC	feszültségfüggő anion csatorna
WKY	Wistar-Kyoto patkány

1. BEVEZETÉS

A szívelégtelenség (HF) egy összetett klinikai szindróma, amelyben a funkcionálisan vagy szerkezetileg sérült szív az egyre több terápiás lehetőség ellenére sem képes fenntartani a megfelelő funkciót, továbbá növekszik a szívelégtelenséghez kapcsolódó kórházi kezelések száma és halálozás is, ezáltal komoly terhet róva az egészségügyi rendszerre és a gazdaságra. A hipertónia a legfontosabb kockázati tényező, amely kóros terhelési körülményeket eredményez. A vérnyomás tartós emelkedése miokardiális átalakulást indukál, amelyet intersticiális fibrózis és kardiomiocita hipertrófia jellemez. Ezeket a sejtváltozásokat elősegíti az oxidatív stressz és a különböző intracelluláris jelátviteli utak aktiválása. Számos tanulmány kimutatta, hogy a sejtek energiaellátásáért felelős mitokondriumok is károsodnak a magas vérnyomás okozta kardiális remodellingben valamint szívelégtelenségben. Ezen sérülések hátterében a reaktív oxigén szabad gyökök (ROS) által kiváltott mitokondriális DNS -károsodások találhatók, és maguk a mitokondriumok válnak az endogén ROS -termelés fő forrásává. Ezen patofiziológiai tényezők hosszú távú jelenléte végül szívelégtelenséghez vezethet (1. ábra).



1. ábra Az oxidatív stressz szerepe a szívizom remodellációjában szívelégtelenség esetén

A szívelégtelenség kezelése a számos terápiás lehetőség ellenére kihívásnak tűnik napjainkban is. A fő cél a kezelés során az életminőség és a funkcionális kapacitás javítása, valamint a kórházi felvétel megelőzése és a halálozás csökkentése. A terápiás lehetőségek fő csoportját a béta-blokkolók, az angiotenzin-konvertáló enzim inhibitorok és a mineralokortikoid receptor antagonisták képviselik.

E megközelítések ellenére a szívelégtelenség prognózisa továbbra is rossz, és a diasztolés szívelégtelenség kezelésére még nincs bizonyítottan előnyös lehetőségünk. Ezért az új terápiás célpontok megtalálása és új vegyületek fejlesztése rendkívül fontos a szívelégtelenség kimenetelének jövőbeni javítása érdekében.

1.1 Az intracelluláris jelátviteli utak szerepe az oxidatív sejtkárosodás folyamatában és a kardiovaszkuláris remodellingben

Az oxidatív stressz során a szabad gyökök termelése fokozódik, miközben az endogén antioxidáns rendszer nem képes megfelelően védekezni ellenük. Úgy tűnik, hogy a ROS döntő szerepet játszik a kóros magasvérnyomás szívelégtelenségbe történő progressziójában a különböző transzkripciós faktorok és jelátviteli utak aktiválásával. A szívelégtelenséget különböző szívbetegségek, például magas vérnyomás, kardiomiopátiák és szívbillentyű betegségek végső közös állapotának tekinthetjük.

A kardiális remodellinget molekuláris, sejtes és intersticiális változások jellemzik, amelyek klinikailag a méret, a tömeg (hipertrofia és sorvadás), a geometria (a szívfall vastagsága), a fibrózis és funkció változásaként nyilvánulnak meg a szív sérülése után. A szív átalakítása két nagy csoportra osztható, a fiziológiai és a patológiai remodellingre. A fiziológiai remodelling adaptív hipertrofiával jellemezhető, és nem jár szívfibrózissal. Az adaptív hipertrofia során a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) és a protein-kináz B (Akt) aktiválása figyelhető meg. Az Akt-1 a prosurvival jelátviteli faktorokhoz tartozik, és elősegítheti a fiziológiai hipertrofiát, ugyanakkor gátolja a patológiás hipertrofiát, amelyet főként a szív kollagén felhalmozódása jellemez. A glikogén-szintáz-kináz-3 béta (GSK-3 β) az Akt-1 downstream célpontja, és az Akt-1 a GSK-3 β foszforilációja révén krónikus stressz során elősegítheti a szívműködés túlélését szívelégtelenségben. Az Akt-1 és a GSK-3 β fokozott foszforilációja miatti citoprotektív hatást, a mitokondriumok szerkezetére és működésére gyakorolt védő hatásuk közvetíti. Ezenkívül az ERK1/2 is aktiválódik, amely a hipertrofiás növekedésért felelős. Mivel az ERK1/2 tagja a prosurvival jelátviteli faktoroknak, aktiválása előnyös a sérült szívműködésben.

A magas vérnyomás rendellenes terhelési körülményeket eredményez, ezáltal pedig a bal kamra hipertrofiájának kialakulásához és végül szívelégtelenséghez vezethet, ezen folyamatok összefüggésben állnak a TNF- α és az angiotenzin II termelődésével. A PKC és MAPK család tagjai, mint például az ERK1/2, a JNK és a p38 MAPK mind részt vesznek a kardiális remodellingben. Köztudott, hogy a MAPK jelátviteli út fontos szerepet játszik a magas vérnyomás okozta kardiális remodelling és szívelégtelenség patogenezisében. A MAPK közül főként a p38 és a JNK a miokardiális fibrózis fő szabályozói. A MAP-kinázok aktivitását a DUSP vagy MKP foszfatázok szabályozzák, amelyek képesek defoszforilálni a MAPK-kat, és így módon gátolni azok aktivitását. A szívműködés hipertrofia helyett a fokozott sejtpusztulás és az intersticiális kollagén felhalmozódása válik egyre dominánsabbá. A szívelégtelenséget az I. típusú kollagén fokozott lerakódása jellemzi. A kamrai átalakulást a kardiomiocita hipertrofia és a miokardiális kollagén kiterjedt lerakódása határozza meg. A TGF β /Smad jelátviteli út szintén meghatározó szerepet játszik a kardiális fibrózis szabályozásában. A TGF- β /Smad

jelátvitel aktiválása elősegíti a miofibroblaszt képződést és az ECM termelést, ami a szív fibrotikus átépüléséhez vezet.

A szívelégtelenségben elengedhetetlen a megfelelő vérellátás biztosítása, amely követi a bal kamra hipertrofiájának növekedését. Ha az angiogenezis üteme nem megfelelő, akkor a szívben lévő tápanyagok valamint oxigén kínálata és kereslete közötti egyensúly felborulása miatt a szívelégtelenségbe történő tranzícióra kerül sor.

1.2 A mitokondriumok szerepe a kardiális remodellingben és a szívelégtelenségben

A mitokondriumok elsődleges feladata az oxidatív foszforiláció során az ATP előállítás ADP-ből, de fontos szerepük van az ionhomeosztázisban, számos metabolikus útvonalban, a programozott sejthalálban valamint a ROS termelésben. Az oxidatív foszforiláció a belső mitokondriális membránban megy végbe, ahol a mitokondriális elektronszállító lánc (ETC) lokalizálódik. Az ETC 4 komplexből áll, és ezek a komplexek felelősek a mitokondriális légzésért és az ATP generációért, ezért nélkülözhetetlenek a megfelelő mitokondriális és sejtműködéshez. A légzési lánc I-III. komplexe kiemelkedő fontosságú a ROS termelés szempontjából, ezért a mitokondriumok az endogén ROS-termelés fő forrásává válhatnak. A mitokondriumok jelentős mennyiségű ROS-t tudnak előállítani különböző kóros körülmények között, beleértve a hipoxiát, a mitokondriális hiperpolarizációt és a légzési komplexek gátlását.

A mitokondriumok saját genommal rendelkeznek, (mitokondriális DNS), amely a mitokondriális mátrixban elhelyezkedő, kettős szálú kör alakú molekula. Az oxidatív stressz során többek között a mitokondriális DNS sérül, ami elégtelen ATP -képződéshez, a mitokondriális funkció romlásához és végül sejthalálhoz vezet.

A mitokondriumok dinamikusan változó organellek, amelyek folyamatosan fúziós és fissions folyamatokon mennek keresztül – ezt mitokondriális dinamikának nevezik -, amelyek szabályozzák a mitokondriumok hosszát, alakját, méretét és számát. A mitokondriális fúzió során két mitokondrium összeolvad, ezzel szemben egy mitokondrium két mitokondriumra való hasadását mitokondriális fissionak nevezik. A mitokondriális fúziót a MFN1 és MFN2, valamint az OPA1 fehérjék közvetítik. Ezek a fehérjék szabályozzák a külső (OMM) és a belső mitokondriális membrán (IMM) fúzióját.

A mitokondriális fissionot a DRP1 fehérje szabályozza, mely általában a citoszolban lokalizálódik, és a külső mitokondriális membránhoz transzlokálódik, majd az ott elhelyezkedő receptorokhoz horganyzódik. A DRP1 gyűrűs szerkezetet képez a mitokondriumok körül, ami a membrán szűkületét eredményezi. Ezt követően a GTP hidrolízise fokozza a membrán szűkületét, és ezáltal meghatározza a mitokondriális hasadás lehetséges jövőbeli helyét. A DRP1-et számos poszttranszlációs módosítás szabályozza, ezek közé tartozik a foszforiláció, ubiquitináció, sumoiláció és nitroziláció. A DRP1 fehérjének két fő foszforilációs helyét azonosították, amelyek a funkciójának modulálásához vezetnek. A DRP1^{Ser616} foszforilációja aktiválja a DRP1 transzlokációját a mitokondrium külső membránjához és

ezáltal a későbbi mitokondriális fragmentációt indukálja. A PKA által szabályozott DRP1^{Ser637} foszforiláció szupresszálja a DRP1 transzlokációját a mitokondriumokhoz, ezáltal gátolja annak aktivitását.

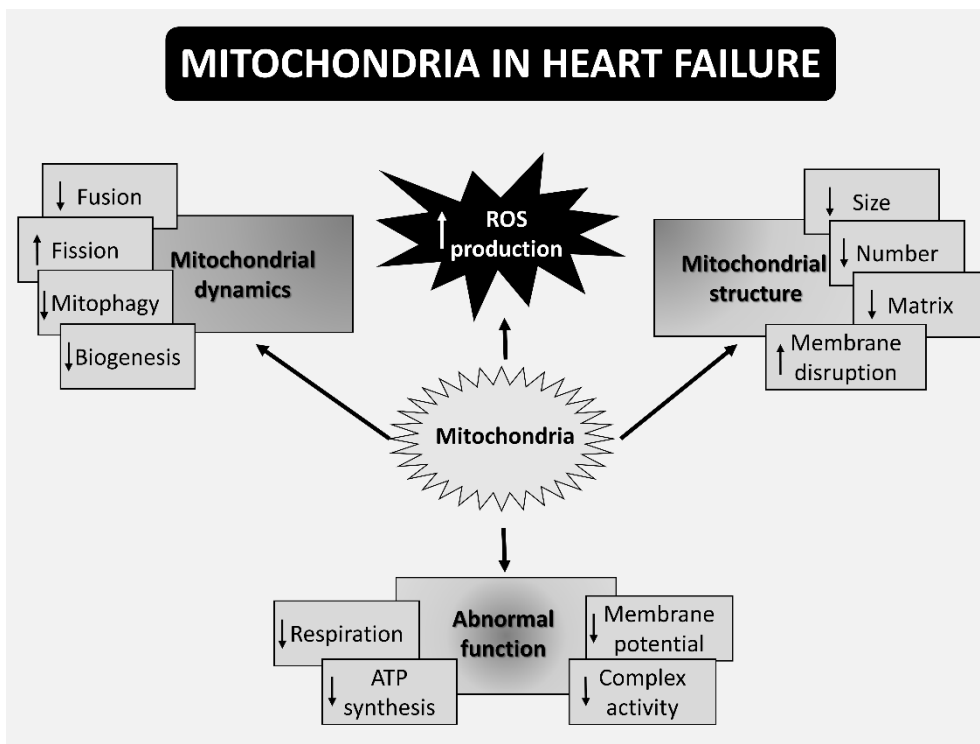
A mitokondriális dinamika mellett a mitokondriális minőségkontroll másik nagyon fontos része a mitokondriális biogenezis. A mitokondriális biogenezis egyrészt a már meglévő mitokondriumok növekedését és elosztását értjük, amelyhez társul a mitokondriumok számának, méretének és tömegének fokozott növekedése is. A legfontosabb szabályozó faktor, amely szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben, a PGC-1 α . A PGC-1 α szabályozása szintén többféle módon valósulhat meg.

A mitokondriális hálózat alapvető szerepet játszik az energia metabolizmusban és ezáltal a megfelelő szív működés fenntartásában. A mitokondriális ultrastruktúra, dinamika és működés rendellenességei összességében az energiaellátás zavarához végső soron pedig a szívelégtelenség kialakulásához vezetnek (2. ábra).

A fúziós és fissionális folyamatok közötti egyensúly felborulása a mitokondriális funkció károsodásához vezet. A fúziós folyamatok csökkenése rendellenes kriszta szerkezet kialakulásával, mitokondriális fragmentációval és fokozott apoptózissal jár, míg a fokozott fissionáció a mitokondriális hálózat fragmentálódását eredményezi. A mitokondriális ultrastruktúra és dinamika változásai mellett a mitokondriális funkció változása, mint például a csökkent ATP termelés és a megnövekedett ROS termelés, szintén megfigyelhető a szívelégtelenség progressziójában.

Szívelégtelenségben a hasadási folyamatok kerülnek túlsúlyba, fragmentált mitokondriális hálózatot eredményezve, amely nem tudja ellátni azon funkcióját, hogy energiát biztosítson a sejtnek, ezáltal végül sejthalált indukálva. A fissionális folyamatok egyik kapcsolódó jelensége a megnövekedett ROS termelés. Ezen ismeretek felvetették annak a lehetőségét, hogy a mitokondriumok új terápiás célpontok lehetnek a szívelégtelenség kezelésében.

Ezáltal a mitokondriális minőségkontroll farmakológiai modulációja jótékony hatással lehet a celluláris stresszre, ily módon új terápiás megközelítés lehet a különböző szívbetegségekben, amelyeket az oxidatív stressz okozta mitokondriális károsodás jellemez. Ennek következtében került figyelmünk középpontjába a BGP-15 molekula, amely különböző citoprotektív hatásai mellett elősegíti a mitokondriális fúziót is.



2. ábra A mitokondriumok szerepe a szívelégtelenség progressiójában

1.3 BGP-15

A BGP-15 ($C_{14}H_{22}N_4O_2 \cdot 2HCl$; O- [3-piperidino-2-hidroxi-1-propil] -nikotinsav-amidoxim-dihidroklorid) egy nikotinos amidoxim-származék. A BGP-15 ischaemia-reperfúziós károsodás során véd az oxidatív stressz ellen, képes csökkenteni a mitokondriális ROS termelést és gátolni a PARP-1 enzimet. A BGP-15 a szívelégtelenség transzgenikus egérmódeljében is megakadályozza a pitvarfibrillációt. Ezenkívül diabéteszes kardiomiopátia modellben jótékony hatása van a diasztolés diszfunkcióra. Szabó és mtsai. kimutatták, hogy a BGP-15 kezelés megvédi a tüdő szerkezetét a pulmonális artériás hipertónia modelljében. Ennél is fontosabb, hogy ez volt az első cikk, amely leírta, hogy a BGP-15 elősegíti a mitokondriális fúziót az Opa1 fehérje aktiválása révén. Ezen ígéretes eredmények ellenére specifikus intracelluláris célpontja még mindig ismeretlen, és a pontos hatásmechanizmus nem tisztázott.

Munkánk célja magas vérnyomás okozta szívelégtelenségben a BGP-15 kezelés hatásának vizsgálata volt. Elsősorban olyan tényezőkre összpontosítottunk, amelyek szabályozzák a remodelling folyamatait, a miokardiális fibrózist és a kapcsolódó jelátviteli utak mintázatát. Ezenkívül célunk volt, hogy tovább karakterizáljuk a BGP-15 mitokondriális hatásait krónikus magas vérnyomás okozta szívelégtelenség állatmodelljében és „in vitro” primer neonatális patkány kardiomiocita (NRCM) sejtek alkalmazásával. Tanulmányoztuk a BGP-15 hatását a mitokondriális minőségkontroll folyamataira, különös tekintettel a fúziós és fissionális folyamatokra, a mitokondriális biogenezisre, valamint a mitokondriális funkcióra.

2. CÉLKITŰZÉSEINK

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a BGP-15 hatásait krónikus magas vérnyomás indukálta szívelégtelenség modellben és „in vitro” primer neonatál patkány kardiomiocita sejt kultúra (NRCM) alkalmazásával.

1. Célunk az volt, hogy tanulmányozzuk a BGP-15 hatását a szív szerkezetére és működésére.
2. Vizsgáltuk a BGP-15 kardiális remodellingben és a szívelégtelenség kialakulásában fontos szerepet játszó jelátviteli utakra gyakorolt hatását.
3. Célunk volt meghatározni a BGP-15 kezelés hatását a miokardiális fibrotikus folyamatokra.
4. Vizsgáltuk továbbá a BGP-15 hatását a mitokondriális fúziós és físsiós folyamatokra, valamint a mitokondriális biogenezisre.
5. Megpróbáltuk tisztázni a BGP-15 szerepét a mitokondriális funkcióra stresszhelyzetekben.

3. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

3.1 Állatmodell

A kísérletekben 15 hónapos hím Wistar Kyoto (WKY) és spontán hipertóniás patkányokat (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) használtunk. A kísérlet során ketrecenként egy vagy két állatot tartottak standardizált körülmények között, 12 órás sötét-fény ciklusban, szilárd aljú polipropilén ketrecekben és kereskedelmi forgalomban lévő patkány tápot és vizet kaptak ad libitum. A kísérlet elején 7 SHR-t termináltunk, mint kiindulási csoportot (SHR-Baseline). Az SHR-eket véletlenszerűen két csoportra osztottuk: SHR-B és SHR-C. Az SHR-B csoportot BGP-15-tel, vízben oldva (25 mg/ttkg/nap, $n = 7$) kezeltünk, míg az SHR-C csoport csak placebót ($n = 7$, SHR-C) kapott per os 18 hétig. A BGP-15 az N-Gene Inc. (New York, NY, USA) ajándéka volt. Az ivóvízbe adott BGP-15 adagolása a napi folyadékfogyasztás mennyiségére vonatkozó előzetes adatainkon alapult. WKY patkányokat használtunk koregyezettett normotenzív kontrollként ($n = 7$). Nem invazív vérnyomásmérést végeztünk minden állaton három alkalommal a kezelési időszak 0., 9. és 18. hetében. A vérnyomás mérését a korábban leírt, nem invazív fark-mandzsetta módszerrel végeztük. A 18 hetes időszak elején és végén echokardiográfiás méréseket végeztünk. A 18 hét végén az állatokat termináltuk és vért vettünk, hogy meghatározzuk a BNP koncentrációját, majd eltávolítottuk a szíveket. A pitvarok és a nagy erek eltávolítása után megmértük a kamrák súlyát. A szíveket a szövettani vizsgálatokhoz 10% formalinnal fixáltuk, vagy fagyasztottuk a Western blot mérésekhez. A fibrotikus területek kiterjedésének kimutatása érdekében a szövettani mintákat Picrosirius vörös színnel festettük és I. típusú kollagén immunhisztokémiát is készítettünk. A TGF β , Smad2 és 3, Akt-1, GSK-3 β és MAPK jelátviteli molekulák foszforilációs állapotát Western-blottal határoztuk meg. Kutatásunkban a következő jelöléseket használtuk az alkalmazott kezelés szerint: WKY: koregyezettett normotenzív Wistar-Kyoto patkányok, SHR-Baseline: 15 hónapos, spontán hipertóniás patkányok a kezelési időszak előtt, SHR-C: 19- hónapos, spontán hipertóniás patkányok a 18 hetes placebo-kezelés után, SHR-B: 19 hónapos, spontán hipertóniás patkányok a 18 hetes BGP-15 kezelési időszak után.

3.2 Primer neonatál patkány kardiomiocita (NRCM) sejtenyészet

A szívizomsejteket a Pierce™ Primary Cardiomyocyte Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA #88281) segítségével izoláltuk 1-3 napos neonatál WKY patkányokból. A sejteket normál tenyésztési körülmények között, (37 ° C -on, 95% levegő és 5% CO₂) tenyésztettük. A médiumot 2-3 naponta cseréltük.

A kísérletek napján a sejteket egyszer mostuk PBS-el és friss médiumot adtunk hozzá, majd 150 μ M H₂O₂-vel kezeltük 50 μ M BGP-15 jelenlétében vagy a nélkül fél órán keresztül. A következő csoportokat hoztuk létre az alkalmazott kezelés szerint: Kontrollcsoport: sejtek minden kezelés nélkül,

BGP-15 csoport: 50 μM BGP-15, fél órán keresztül, H_2O_2 csoport: 150 μM H_2O_2 fél órán keresztül, H_2O_2 + BGP-15 csoport: 150 μM H_2O_2 és 50 μM BGP-15 fél órán keresztül. A mitokondriális fragmentáció vizsgálatát fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A mtDNS károsodásának számszerűsítését real-time PCR-rel ellenőriztük. A mitokondriális membránpotenciált JC-1 vizsgálattal mértük. Agilent Seahorse Extracellular Flux (XFp) Analyzer (Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA)) segítségével határoztuk meg a NRCM sejtek mitokondriális energiametabolizmusát és működését. A citrát szintáz aktivitását a Sigma Aldrich (MAK193) kit segítségével mértük, a gyártó utasításait követve.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A BGP-15 javította a bal kamra működését, mérsékelte a bal kamra hipertrófiáját és csökkentette a szívelégtelenség okozta plazma BNP szint emelkedést

1. táblázat. A BGP-15 kezelés hatása az echokardiográfias paraméterekre

	WKY (n=7)	SHR-Baseline (n=7)	SHR-C (n=7)	SHR-B (n=7)
	Átlag ± SEM	Átlag ± SEM	Átlag ± SEM	Átlag ± SEM
Septum	1.93±0.03	2.29±0.07**	2.32 ± 0.07**	2.09 ± 0.08*.§
PW	1.90±0.04	2.06±0.06*	1.97 ± 0.08*	1.81 ± 0.07§
LVIDd (mm)	7.61±0.14	7.75±0.15	8.55 ± 0.23**.,##	8.31 ± 0.18**
LVIDs (mm)	4.54±0.13	4.60±0.21	5.87 ± 0.31**.,##	5.19 ± 0.32§
LVEDV (µl)	310.25±12.85	323.07±14.59	402.40 ± 24.76**.,##	377.19 ± 17.37**
LVESV (µl)	96.01±6.85	101.51±12.27	175.52 ± 22.46**.,##	137.23 ± 16.46**.,§
LV tömeg (mg)	1029.81±43.84	1384.42±40.69**	1587.38±106.36**.,#	1321.44 ± 75.58*.,§
EF%	70.48±1.12	69.59±2.41	57.21 ± 3.02**.,##	64.30 ± 2.88*.,§
E/E'	30.45±2.00	30.32±2.98	40.41± 2.94**.,##	25.71 ± 3.03§§
BNP (pg/ml)	302.76±13.76	325.19±10.89	755.14±33.34*.,#	352.04±22.50§

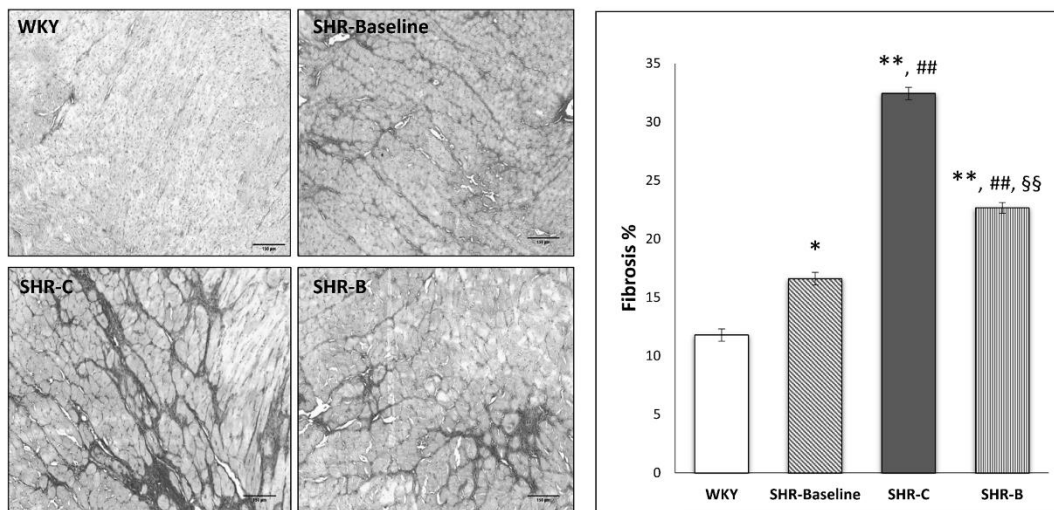
Septum: a septum vastagsága, PW: a hátsó fal vastagsága, LVIDd: bal kamra (LV) vég-diasztolés belső átmérője, LVIDs: LV vég-szisztolés belső átmérő, LVEDV: LV vég-diasztolés térfogat, LVESV: LV vég-szisztolés térfogat, LV tömeg: a bal kamra számított tömege, EF: ejekciós frakció, E: a korai diasztolés töltés mitrális csúcssebessége, E': korai diasztolés mitralis gyűrűs sebesség, BNP: B típusú natriuretikus peptid. WKY: koregyeztetett normotenzív Wistar-Kyoto patkányok, n = 7; SHR-baseline: 15 hónapos, spontán hipertóniás patkányok, n = 7; SHR-C: 19 hónapos, spontán hipertóniás patkányok placebo-t kaptak 18 hétig, n = 7; SHR-B: 19 hónapos, spontán hipertóniás patkányok 18 héten át kaptak BGP-15-öt, n = 7. *p <0,05 vs. WKY, ** p <0,01 vs. WKY, #p <0,05 vs. SHR-Baseline, ## p <0,01 SHR-Baseline, §p <0,05 vs. SHR-C, §§p < 0,01 vs. SHR-C.

4.2 A BGP-15 kezelés megakadályozta az intersticiális kollagén lerakódását

A patkányok szívének bal kamrájának szövettani festését Picosirius vörös festéssel (3. ábra) és kollagén I immunhisztokémiával végeztük, amelyeket a fibrózis mértékének ellenőrzésére használtunk. Kis mennyiségű intersticiális kollagén volt látható a WKY csoportban a Picosirius vörös festéssel (3. ábra). A fibrózis mértéke szignifikánsan magasabb volt az SHR csoportokban a WKY csoporthoz képest (p <0,05 SHR-Baseline vs. WKY; p <0,01, SHR-C és SHR-B vs. WKY). A krónikus magas vérnyomás indukálta szívelégtelenség tovább fokozta a kollagén lerakódását az SHR-C csoportban (p <0,01 vs. SHR-baseline). A BGP-15 kezelés azonban szignifikánsan csökkentette az intersticiális fibrózis mennyiségét az SHR-B csoportban a nem kezelt hipertóniás állatokhoz képest (p <0,01, SHR-B vs. SHR-C) (WKY: 11,78 ± 1,00%; SHR-baseline: 16,59 ± 1,03%; SHR-C: 32,42 ± 1,52%; SHR-B: 22,64 ± 1,09%).

Hasonló megfigyelések tehetők az I. típusú kollagén immunhisztokémia esetében is. Kis mennyiségű intersticiális kollagént figyeltünk meg a WKY csoportban (WKY: $9,15 \pm 0,54\%$; SHR-baseline: $15,45 \pm 0,69\%$; SHR-C: $31,24 \pm 0,77\%$; SHR-B: $19,92 \pm 0,72\%$). Azonban a hipertóniás csoportok esetében a kezdeti érték is magasabb volt, mint a WKY csoportban ($p < 0,01$ vs. SHR-Baseline). Ez az emelkedés a kezelési időszak végére kifejezettebbé vált ($p < 0,01$ SHR-C vs. WKY, SHR-Baseline csoportok). A BGP-15 kezelésnek köszönhetően az intersticiális kollagén lerakódás szignifikánsan csökkent az SHR-B csoportban az SHR-C csoporthoz képest ($p < 0,01$). Megállapítható, hogy a BGP-15 kezelés szignifikánsan csökkentette az intersticiális fibrózis mértékét a szívizomban.

A szív bal kamrájából Picosirius vörössel festett szövettani metszeteket használtunk a sejtmérők vizsgálatára is. A kardiomiociták átmérője szignifikánsan megnőtt az SHR csoportokban a WKY csoporthoz képest (WKY: $16,02 \pm 0,64 \mu\text{m}$; SHR-alapvonal: $22,76 \pm 0,70 \mu\text{m}$; SHR-C: $33,86 \pm 1,82 \mu\text{m}$; SHR-B: $28,57 \pm 0,57 \mu\text{m}$). Ez a különbség az SHR-C esetében volt a legszembetűnőbb ($p < 0,01$ SHR-C vs. WKY). A BGP-15 kezelés szignifikánsan alacsonyabb sejtmérőt eredményezett az SHR-B csoportban az SHR-C csoporthoz képest ($p < 0,01$; SHR-B vs. SHR-C).



3. ábra A BGP-15 kezelés hatása az intersticiális fibrózis mértékére, az I. típusú kollagén lerakódására és a kardiomiociták sejtméretjére. Reprezentatív szövettani metszetek Picosirius vörös festéssel ($n = 7$). Scale bar: $150 \mu\text{m}$, nagyítás: 10-szeres. A metszetek denzitometriai értékelése látható a grafikonon. * $p < 0,05$ vs. WKY, ** $p < 0,01$ vs. WKY, ## $p < 0,01$ vs. SHR-Baseline, §§ $p < 0,01$ vs. SHR-C. WKY: koregyezettett normotenzív Wistar-Kyoto patkányok; SHR-baseline: 15 hónapos, spontán hipertóniás patkányok; SHR-C: 19 hónapos, spontán hipertóniás patkányok, placebo-t kaptak 18 hétig; SHR-B: A 19 hónapos, spontán hipertóniás patkányok 18 hétig kaptak BGP-15-öt

4.3 A BGP-15 kezelés kedvezően befolyásolta a TGF- β /SMAD jelátviteli utat az SHR állatokban

A TGF- β szintje minden hipertóniás csoportban szignifikánsan megemelkedett a WKY csoporthoz képest ($p < 0,05$ SHR-B vs. WKY, $p < 0,01$ SHR-baseline, SHR-C vs. WKY). Az SHR-C csoport

esetében a kezelési időszak végére további növekedési tendenciát lehetett látni az alapértékekhez (NS) képest. A BGP-15 kezelés azonban a TGF- β szint jelentős csökkenését okozta a kezeletlen SHR állatokhoz képest ($p < 0,01$ SHR-B vs. SHR-C), ráadásul ebben a csoportban a TGF- β szint még alacsonyabb volt, mint az SHR-Baseline csoportban ($p < 0,05$, SHR-B vs. SHR-Baseline). A Smad2 foszforiláció esetében enyhe növekedést figyeltünk meg az SHR-Baseline csoportban a WKY csoporthoz képest, azonban ez az emelkedés nem volt szignifikáns. A Smad2^{Ser465/467} foszforilációja szignifikánsan emelkedett az SHR-C állatokban a WKY és a kiindulási csoportokhoz képest ($p < 0,05$). A BGP-15 kezelés a Smad2^{Ser465/467} foszforilációs szintjének szignifikáns csökkenését eredményezte a kezelt csoportban ($p < 0,01$ SHR-B vs. SHR-C). A csoportok között nem volt szignifikáns különbség a Smad3^{Ser423/425} foszforilációjában.

4.4 A BGP-15 kedvezően befolyásolta az Akt-1^{Ser473} és a GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációját

Az Akt-1^{Ser473} foszforiláció mérsékelt volt mind a WKY, mind az SHR-Baseline csoportban. Az SHR-C csoportban az Akt-1^{Ser473} foszforilációja kismértékben, de szignifikánsan emelkedett ($p < 0,01$ SHR-C vs. WKY és SHR-Baseline csoportok). A BGP-15 kezelés azonban szignifikánsan megnövelte az Akt-1^{Ser473} foszforilációját az SHR-B állatokban ($p < 0,01$ SHR-B vs. SHR-C csoport).

A GSK-3 β ^{Ser9} foszforilációs szintje alacsony volt a WKY csoportban, hasonlóan az Akt-1^{Ser473} foszforilációhoz. Az SHR-Baseline és az SHR-C csoportokban azonban enyhe, de nem szignifikáns növekedés volt látható. A GSK-3 β ^{Ser9} legmagasabb foszforilációját az SHR-B csoportban mértük. Ez az emelkedés szignifikáns volt más SHR csoportokhoz képest ($p < 0,05$ SHR-B vs. SHR-C, $p < 0,01$, SHR-B vs. SHR-Baseline csoport).

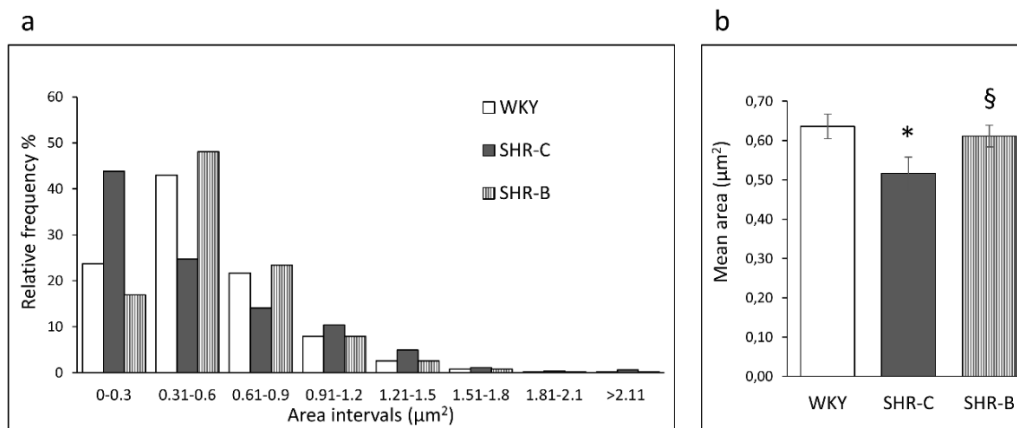
4.5 A BGP-15 csökkentette a MAPKs aktivitását

Az MKP-1 fehérje szintje alacsony volt a WKY és az SHR-Baseline csoportokban, azonban jelentős emelkedést figyeltünk meg az SHR-C csoportban ($p < 0,01$ SHR-C vs. WKY, valamint SHR-Baseline). Az MKP-1 fehérje mennyisége tovább nőtt az SHR-B csoportban a BGP-15 kezelés hatására ($p < 0,01$ SHR-B vs. SHR-C). Az Erk1/2^{Thr202/Tyr204} foszforiláció kevésbé volt kifejezett az SHR-C csoportban a WKY csoporthoz és az SHR-Baseline-hoz képest ($p < 0,05$ SHR-C vs. WKY). A BGP-15 kezelés azonban szignifikáns emelkedést okozott az Erk1/2^{Thr202/Tyr204} foszforilációjában az SHR-C csoporthoz képest ($p < 0,01$ SHR-B vs. SHR-C). A p38-MAPK^{Thr180/Tyr182} és a JNK^{Thr183/Tyr185} foszforiláció szintje alacsony volt a WKY és az SHR-Baseline csoportokban. A p38-MAPK^{Thr180/Tyr182} és a JNK^{Thr183/Tyr185} legmagasabb foszforilációs szintje az SHR-C állatokban volt látható ($p < 0,01$ SHR-C vs. WKY és SHR-Baseline). A BGP-15 kezelés csökkentette a p38-MAPK^{Thr180/Tyr182} és a JNK^{Thr183/Tyr185} foszforilációját is, ez a csökkenés szignifikáns volt a JNK^{Thr183/Tyr185} esetében az SHR-C csoporthoz képest ($p < 0,01$).

4.6 A BGP-15 javította a mitokondriális ultrastruktúrát SHR állatokban

Tanulmányoztuk az interfibrilláris mitokondriumok (IFM) morfológiáját a myocardium hosszanti metszetein. Az SHR-C állatok mitokondriumai morfológiailag heterogénebbek, eltérőek a WKY állatok normál mitokondriumaitól, (n = 5 minden csoportból, 3-5 blokk minden állatból). A nem kezelt hipertóniás állatokban (SHR-C) a mitokondriumok lazán helyezkedtek el a kontraktilis elemek között. Az SHR-C csoportban a mitokondriumok krisztaszerkezete sérült és megnagyobbodott intrakrisztális terek voltak megfigyelhetőek, alakjuk megnyúlt. Az SHR-B csoportban a mitokondriális ultrastruktúra hasonló volt a WKY állatokhoz. A kezelt SHR állatokban (SHR-B) normális, nagy és kevésbé megnyúlt mitokondriumokat láttunk, szorosan csomagolt krisztákkal és elektron-denz mátrixszal.

Az IFM területét elektronmikroszkópos felvételeken értékeltük (~ 500 mitokondriumot/csoport). A mitokondriális területek relatív gyakoriságát tetszőleges 0,3 μm^2 intervallumokban vizsgáltuk (4. ábra).



4. ábra: Az interfibrilláris mitokondriumok szívelégtelenség okozta fragmentációja a szívizomban. a) A mitokondriális területek relatív gyakorisága minden tetszőleges területintervallumban. (b) Területértékek az adott csoportokban (~ 500 mitokondrium/csoport). WKY: koregyeztetett normotenzív Wistar-Kyoto patkányok, SHR-C: nem kezelt spontán hipertóniás patkányok, SHR-B: spontán hipertóniás patkányok, akik BGP-15-öt kapnak 18 héten keresztül. Az adatokat átlag \pm SEM -ként fejezzük ki. * $p < 0,05$ vs WKY, § $p < 0,05$ vs SHR-C).

4.7 A BGP-15 kezelés növelte a mitokondriális fúziós fehérjék expressziós szintjét és csökkentette a fissziós fehérjék expressziós szintjét az SHR állatokban

A mitokondriális fúziós fehérjék vonatkozásában Western -blot analízissel határoztuk meg az OPA1, MFN1 és MFN2 szintjét a szívizomban. Megfigyeltük, hogy az OPA1 szintje mérsékelten csökkent az SHR-C csoportban a WKY csoporthoz képest ($p < 0,05$ SHR-C vs. WKY). A BGP-15 kezelés azonban az OPA1 szint szignifikáns emelkedését okozta az SHR-B csoportban ($p < 0,01$ SHR-B vs. WKY, $p < 0,05$ SHR-B vs. SHR-C). Az MFN1 fehérje szintje a vizsgálat végére szignifikánsan megnőtt a hipertóniás állatokban a kiindulási szinthez képest ($p < 0,05$ SHR-C és SHR-B vs. SHR-Baseline), Az MFN2 fehérje szintje mérsékelten alacsonyabb volt az SHR-C csoportban, mint a WKY csoportban (p

<0,05) és hasonló változások figyelhetők meg az OPA1 esetében. Az SHR-B csoportban ezek a paraméterek szignifikánsan növekedtek a BGP-15 kezelés miatt a többi csoporthoz képest (p <0,01 SHR-B vs WKY, SHR-C).

Az Fis1 és DRP1 fessziós fehérjék szintjét mind a totál, mind a frakcionált Western blot mintában meghatároztuk. A Fis1 szintje emelkedett az SHR-C csoportban a WKY csoporthoz képest (p <0,05, SHR-C vs. WKY). Ez az emelkedés azonban szignifikánsan mérséklődött a BGP-15 kezelés miatt (p <0,05 SHR-B vs. SHR-C). A DRP1 esetében a totál szint szignifikánsan csökkent a BGP-15 kezelés miatt a többi csoportokhoz képest (p <0,01 SHR-B vs. WKY, SHR-C). Megmértük a DRP1 foszforilációs szintjét a Ser616 és Ser637 aminosavaknál is. A DRP1^{Ser616} és a DRP1^{Ser637} foszforilációja mérsékelt volt a WKY csoportban. Az SHR-C csoportban azonban a DRP1^{Ser616} foszforilációja szignifikánsan magasabb volt (p <0,01 vs. WKY és SHR-Baseline). A BGP-15 kezelés viszont csökkentette a DRP1^{Ser616} foszforilációját SHR-B csoportban (p <0,01 vs. SHR-C csoport). A DRP1^{Ser637} foszforilációs szintjét tekintve szignifikáns növekedést figyeltünk meg az SHR-C csoportban (p <0,01 vs WKY, SHR-Baseline). A BGP-15 kezelés tovább növelte a DRP1^{Ser637} foszforilációját SHR-B állatokban (p <0,01 SHR-B vs. SHR-C).

A DRP1 intracelluláris eloszlását is meghatároztuk. Megfigyeltük, hogy a DRP1 felhalmozódott az SHR-C állatok mitokondriális frakcióiban a normotenzív állatokhoz képest (p <0,01, SHR-C vs. WKY). A BGP-15 kezelés a DRP1 szignifikánsan csökkent transzlokációját eredményezte a mitokondriumokba (p <0,01 vs SHR-C), ezáltal magasabb koncentrációban megőrizve a citoszolikus frakcióban.

4.8 A BGP-15 kezelés fokozta a mitokondriális biogenezist SHR állatokban

A PGC-1 α szint tekintetében nem volt szignifikáns különbség a WKY, az SHR-Baseline és az SHR-C csoportok között. A BGP-15 kezelés azonban szignifikáns növekedést okozott a PGC-1 α mennyiségében a nem kezelt hipertóniás állatokhoz képest (p <0,01, SHR-B vs. SHR-Baseline és SHR-C csoport). Az AMPK^{Thr172} foszforiláció esetében az SHR-C csoportban szignifikáns növekedést figyeltünk meg az SHR-Baseline csoporthoz képest (p <0,01 SHR-C vs. SHR-Baseline). A BGP-15 kezelés jelentősen csökkentette az AMPK^{Thr172} foszforilációját az SHR-C csoporthoz képest (p <0,01 SHR-B vs. SHR-C). A CREB^{Ser133} foszforilációja mérsékelt volt a WKY csoportban, hasonlóan az AMPK^{Thr172} tapasztalhoz. A CREB^{Ser133} foszforilációs szintje szignifikánsan megnőtt az SHR-C csoportban a baseline és a normotenzív állatokhoz képest (p <0,01 SHR-C vs. WKY). A BGP-15 kezelés további növekedést okozott a CREB^{Ser133} foszforilációjában a nem kezelt SHR állatokhoz képest (p <0,05 SHR-B vs. SHR-C csoport; p <0,01 SHR-B vs. SHR-Baseline). A legmagasabb VDAC fehérje szintet a WKY csoportban figyeltük meg. Ez a szint szignifikánsan alacsonyabb volt a hipertóniás csoportokban (p <0,01 WKY vs. SHR-Baseline, SHR-C és SHR-B). A kezelési időszak végére a VDAC magasabb lett a baseline értékhez képest (p <0,01, SHR-C vs. SHR-Baseline). További szignifikáns növekedést észleltünk az SHR-B csoportban (p <0,05 SHR-B vs. SHR-C).

4.9 A BGP-15 kezelés hatása az NRCM sejtek mitokondriális morfológiájára

A mitokondriális hálózat változásainak vizsgálatához a MitoTracker Red CMXRos festési módszert használtunk. A BGP-15 önmagában nem volt hatással a mitokondriális hálózat összetettségére. Fonals mitokondriális hálózatot figyeltünk meg a Kontroll csoportban, a H₂O₂ kezelés azonban jelentős sérülést okozott a mitokondriális hálózatban. A H₂O₂ által indukált fissions folyamatok eredményeként a mitokondriális hálózat degradálódása volt megfigyelhető, ami mitokondriális fragmentációhoz vezetett. A BGP-15 kezelés megakadályozta az oxidatív stressz indukálta mitokondriális fragmentációt és megőrizte a mitokondriális hálózat normál fonalas szerkezetét.

4.10 A BGP-15 kezelés növelte a fúziós fehérjék expressziós szintjét és csökkentette a fissions fehérjék szintjét az NRCM sejtekben

Meghatároztuk az OPA1, MFN1 és MFN2 fehérjék szintjét az NRCM sejtek totál Western blot mintájában. A BGP-15 kezelés önmagában nem volt hatással ezeknek a paramétereknek a mennyiségére a nem stresszelt sejtekben a Kontroll csoporthoz képest. A H₂O₂ kezelés az MFN1 és az MFN2 fehérjék szintjének enyhe csökkenését és az OPA1 szintjének enyhe emelkedését okozta, de ezek a változások nem voltak szignifikánsak. A BGP-15 kezelés azonban szignifikáns növekedést okozott az OPA1, MFN1 és MFN2 fehérjék mennyiségében a H₂O₂ stresszelt sejtekben a kezeletlen H₂O₂ csoporthoz képest ($p < 0,05$ H₂O₂-BGP15 vs H₂O₂).

Meghatároztuk a Fis1 és a DRP1 fehérjék szintjét totál és frakcionált Western blot mintákban. A BGP-15 kezelés kövekeztében nem találtunk szignifikáns eltérést a Kontroll csoporthoz képest. Az Fis1 szintje jelentősen emelkedett a H₂O₂ csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,01$ H₂O₂ vs. Kontroll). A BGP-15 kezelés tompította ezt a változást ($p < 0,05$ H₂O₂-BGP15 vs. H₂O₂ csoport). A fissions mediátor DRP1 fehérje totál szintje szignifikánsan emelkedett a H₂O₂ csoportban az oxidatív stressz miatt ($p < 0,05$ H₂O₂ vs. Kontroll csoport). Azonban a Kontrollhoz hasonló értéket lehetett látni a kezelt csoportban a H₂O₂ csoporthoz képest ($p < 0,05$ H₂O₂-BGP15 vs. H₂O₂ csoport). A DRP1 foszforilációját Ser616 és Ser637 helyeken vizsgáltuk. Mindkét DRP1 foszfo-forma foszforilációja mérsékelte volt a Kontroll csoportban. A DRP1^{Ser616} foszforilációja jelentősen megnőtt a H₂O₂ csoportban ($p < 0,05$ H₂O₂ vs. Kontroll csoport). A BGP-15 kezelés azonban csökkentette a DRP1^{Ser616} foszforilációját a stresszelt sejtekhez képest ($p < 0,05$ H₂O₂-BGP-15 vs. H₂O₂ csoport). A DRP1^{Ser637} foszforilációs szintjét mérve szignifikáns csökkenést lehetett megfigyelni a H₂O₂ csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,01$ H₂O₂ vs. kontroll csoport). A BGP-15 kezelés szignifikánsan fokozta a DRP1^{Ser637} foszforilációját ($p < 0,01$ H₂O₂-BGP15 vs. H₂O₂ csoport).

Végül megvizsgáltuk a DRP1 fehérje intracelluláris eloszlását. A DRP1 szignifikánsan nagyobb része volt megtalálható a mitokondriális frakciójában a H₂O₂ csoport sejtjei esetében, mint a BGP-15 kezelt csoportban. A DRP1 fehérje citoszolból a mitokondriumokhoz történő transzlokációja csökkent a BGP-

15 kezelés hatására, ezáltal magasabb DRP1 szintet eredményezve a citoszolikus frakcióban és alacsonyabb koncentrációt a mitokondriális frakcióban ($p < 0,01$ vs. H_2O_2 csoport).

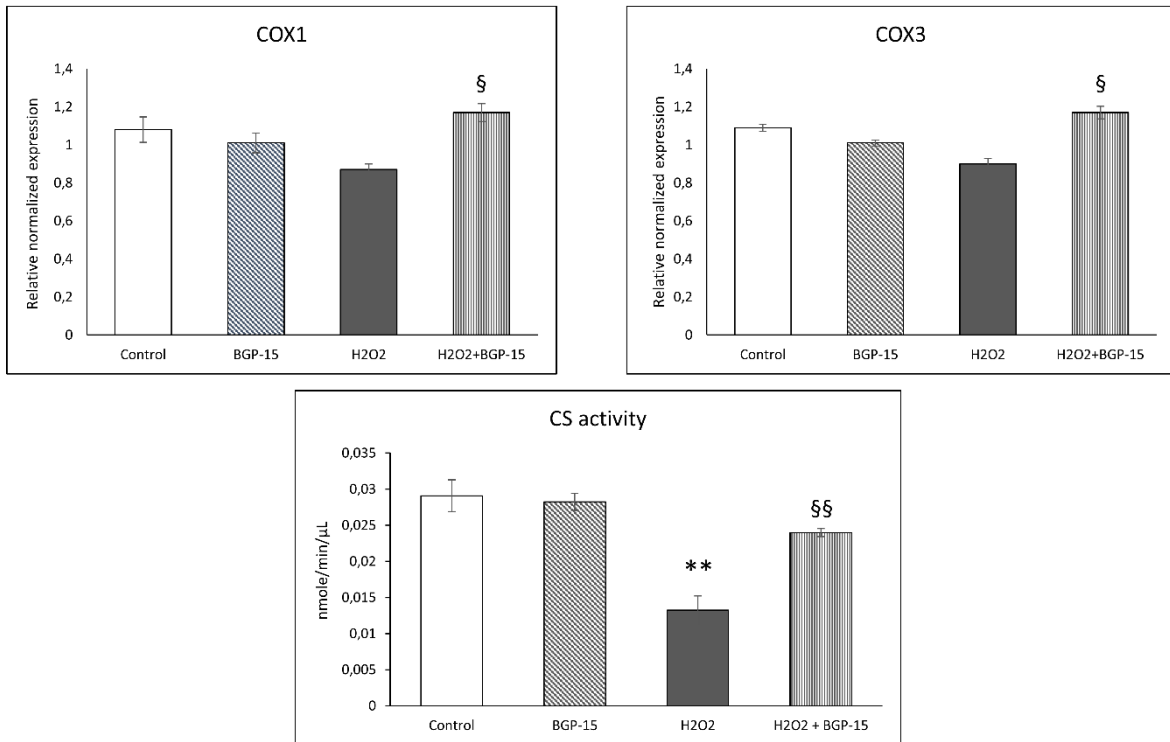
4.11 A BGP-15 kedvezően befolyásolta a mitokondriális biogenezis szabályozását az NRCM sejtekben

Meghatároztuk a PGC-1 α , a CREB és a VDAC szintjét az NRCM Western-blot mintában. A BGP-15 kezelés nem volt hatással ezekre a fehérjékre a nem stresszelt sejtekben a Kontroll csoporthoz képest. A PGC-1 α szint emelkedett a H_2O_2 csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,01$ vs. Kontroll). Ez az emelkedés azonban sokkal markánsabb volt a kezelt csoportban ($p < 0,01$ H_2O_2 -BGP15 vs. Kontroll és H_2O_2 csoportok). A CREB^{Ser133} foszforilációs szintje alacsony volt a Kontroll csoportban, azonban szintje jelentős növekedést mutatott a H_2O_2 csoportban ($p < 0,01$ H_2O_2 vs. Kontroll). A BGP-15 kezelés tovább növelte a CREB^{Ser133} foszforilációt ($p < 0,01$, H_2O_2 -BGP15 vs H_2O_2 csoport). A VDAC szintje kissé csökkent a H_2O_2 csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$ H_2O_2 vs. Kontroll). Azonban a BGP-15 kezelt csoportban szignifikánsan megemelkedett ($p < 0,01$ H_2O_2 -BGP-15 vs H_2O_2 csoport).

Továbbá megvizsgáltuk a mitokondriális DNS tartalmat a nukleáris DNS hez képest. A relatív mitokondriális DNS-tartalmat „valós idejű” PCR-rel határoztuk meg, COXI és COXIII primereket használva, nukleáris kódolású β -aktin génre normalizálva. A BGP-15 kezelés növelte a COXI és COXIII gének relatív expressziós szintjét a H_2O_2 csoporthoz képest ($p < 0,05$ H_2O_2 -BGP-15 vs. H_2O_2 csoport; 5.ábra).

A mitokondriális biogenezis tanulmányozására egy széles körben elterjedt módszert használtunk a citrát szintáz aktivitásának mérésével. A citrát szintáz aktivitása csökkent a hidrogén-peroxiddal stresszelt csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p < 0,01$ H_2O_2 vs. Kontroll). A citrát szintáz aktivitása jelentősen növekedett a kezelés hatására ($p < 0,01$ H_2O_2 -BGP-15 vs. H_2O_2 csoport).

Végül megmértük a NADH-ubiquinone oxidoreduktáz NDUFs1 alegységének és az Ubiquinol Cytochrome c Reductase fehérje UQCRC1 alegységének szintjét annak érdekében, hogy alátámasszuk a BGP-15 mitokondriális biogenezisre gyakorolt hatásával kapcsolatos megállapításainkat. Az NDUFs1 expressziós szintje jelentősen csökkent a H_2O_2 csoportban ($p < 0,01$ H_2O_2 vs. Kontroll). Hasonló eredményt kaptunk az UQCRC1 esetében is ($p < 0,05$ H_2O_2 vs. Kontroll). A BGP-15 kezelés azonban nemcsak ezen csökkenés ellen védett, hanem jelentősen növelte is az NDUFs1 és az UQCRC1 fehérjék mennyiségét ($p < 0,01$ H_2O_2 -BGP-15 vs. H_2O_2 csoport).



5. ábra A BGP-15 kezelés hatása a relatív DNS-tartalomra és a citrát-szintáz aktivitásra. Az elektron transzportlánc IV komplex (COXI és COXIII) relatív expressziós szintjét mutatjuk be. A citrát szintáz aktivitásának összehasonlítása NRCM sejtekben. Kontrollcsoport: kezelés nélküli sejtek, BGP-15 csoport: 50 μM BGP-15 0,5 órán keresztül, H₂O₂ csoport: 150 μM H₂O₂-t 0,5 órán át, H₂O₂+BGP-15 csoport: 150 μM H₂O₂ és 50 μM BGP-15 0,5 órán át. Az értékek átlag ± SEM (n = 4). ** p < 0,01 vs. kontroll, §§p < 0,01 vs. H₂O₂ csoport.

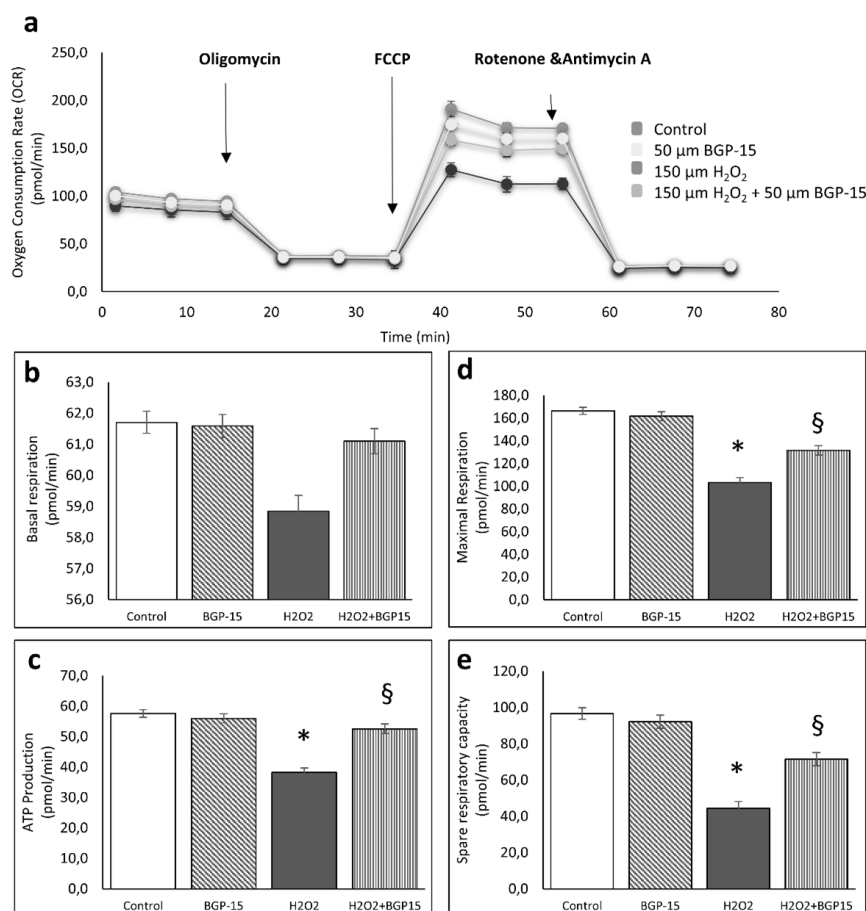
4.12 A BGP-15 kezelés megőrizte a mitokondriális genomintegritást a ROS által okozott károsodásokkal szemben

A H₂O₂ által kiváltott oxidatív károsodás mtDNS-re gyakorolt hatásának vizsgálatára „real-time” long-range polimeráz láncreakciót (LRPCR) használtunk. A BGP-15 kezelés önmagában nem mutatott szignifikáns eltérést a Kontroll csoporthoz képest. A H₂O₂ jelentős károsodást okozott az mtDNS -ben (p < 0,05 H₂O₂ vs. Kontroll), a teljes mitokondriális genom amplifikációs rátája jelentősen csökkent. Ezt a kedvezőtlen károsodást szignifikánsan csökkentette a BGP-15 kezelés (p < 0,01 H₂O₂-BGP15 vs. H₂O₂).

4.13 A BGP-15 kezelés hatása a mitokondriális membránpotenciálra (ΔΨ), valamint a mitokondriális oxigénfogyasztásra és az energiametabolizmusra NRCM sejtekben oxidatív stressz során

A BGP-15 mitokondriális membránpotenciálra gyakorolt hatását a JC-1, egy feszültségre érzékeny fluoreszkáló mitokondriális festék segítségével vizsgáltuk. A JC-1 vörös fluoreszcenciát bocsát ki, ha a mitokondriális membránpotenciál magas (aggregált festék), míg a depolarizált mitokondriumok zöld fluoreszcenciát (monomer festék) bocsátanak ki. A Kontroll sejtekben a fluoreszcens mikroszkópia erős

vörös fluoreszcenciát és gyenge zöld fluoreszcenciát mutatott, ami azt jelzi, hogy a $\Delta\Psi_m$ magas a mitokondriumokban. A BGP-15 önmagában nem volt hatással a mitokondriális membránpotenciálra. A H_2O_2 hatására a mitokondriumok depolarizálódtak, ami gyengébb vörös fluoreszcenciát és erősebb zöld fluoreszcenciát eredményezett ($p < 0,01$ H_2O_2 vs. Kontroll). A NRCM-sejtekben a H_2O_2 -BGP-15 csoportban a vörös fluoreszcencia intenzitása növekedett és a zöld fluoreszcencia intenzitása csökkent a H_2O_2 -val kezelt sejtekhez képest ($p < 0,01$ H_2O_2 -BGP-15 vs. H_2O_2). Ezért a kvantitatív értékelés kimutatta, hogy a BGP-15 kezelés csökkentette a mitokondriális membrán H_2O_2 által indukált depolarizációját, a $\Delta\Psi_m$ hasonló volt a kontroll sejtekéhez. A mitokondriális energiametabolizmus és légzésfunkció meghatározásához az Agilent Seahorse XFp Analyzer rendszert és az Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test -t használtuk (6. ábra).



6. ábra A BGP-15 kezelés hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra és az energia metabolizmusra NRCM sejtekben, az Agilent Seahorse XFp készülékkel meghatározva. A mitokondriális energiametabolizmust a Seahorse XFp analizátorral mértük. A tesztelés során a NRCM sejteket $10 \mu M$ oligomicinnel, $10 \mu M$ FCCCP -vel és $5 \mu M$ rotenon/antimycin A -val kezeltük. Az adatokat automatikusan számítottuk az Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Report Generator szerint. (A) Oxigénfogyasztás mértéke (OCR). (B) Bazális légzés. (C) ATP -termelés. (D) Maximális légzés. (E) Tartalék légzési kapacitás. Kontrollcsoport: kezelés nélküli sejtek, BGP-15 csoport: $50 \mu M$ BGP-15 0,5 órán keresztül, H_2O_2 csoport: $150 \mu M$ H_2O_2 0,5 órán át, H_2O_2 +BGP-15 csoport: $150 \mu M$ H_2O_2 és $50 \mu M$ BGP-15 0,5 órán át. Az értékek átlag \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0,05$ vs. Kontroll, $\S p < 0,05$ vs. H_2O_2 csoport.

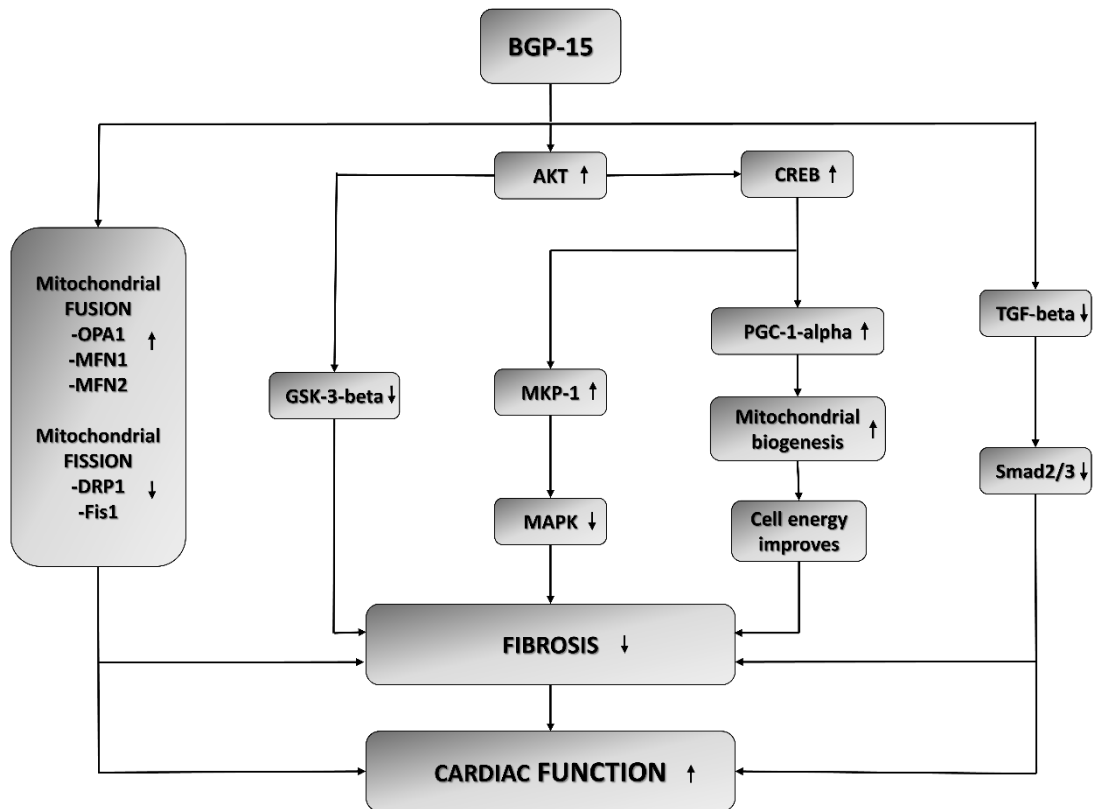
5. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során a BGP-15 kardioprotektív hatásának vizsgálatára törekedtünk krónikus magas vérnyomás okozta szívelégtelenségben. Továbbá célunk volt tisztázni a BGP-15 hatását a mitokondriális minőségkontroll különböző folyamataiban a hipertónia által kiváltott szívelégtelenség modellben és in vitro hidrogén-peroxid által indukált oxidatív stressz alkalmazásával.

Tanulmányunk fő eredményei közé tartozik, hogy igazoltuk, a BGP-15 kezelés pozitív hatással van a szív működésre és szerkezetre, mivel gátolja a profibrotikus jelátviteli utakat, ezáltal magát a kardiális remodellinget a magas vérnyomás indukálta szívelégtelenség állatmodelljében. Ez a kardioprotektív hatás a BGP-15 mitokondriális hatásainak is tulajdonítható. A BGP-15 a mitokondriális fúziót elősegítő hatása mellett gátolja a mitokondriális fisszióban szerepet játszó tényezőket, és fokozza a de novo biogenezist stressz szituációban. Ezen hatások eredményeként a BGP-15 megőrzi a mitokondriális szerkezetet és az energiatermelést a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz során, valamint a szívelégtelenség in vivo modelljében is (7. ábra).

Továbbá munkánk során először mutattuk ki, hogy a BGP-15 kezelés megőrizte a mitokondriális ultrastruktúrát a fokozott mitokondriális fúzió és a csökkent fissziós folyamatok révén, ezáltal pedig pozitívan befolyásolta a transzlokációs folyamatokat a krónikus magas vérnyomás okozta szívelégtelenség állatmodellben. Az in vivo modellhez képest hasonló változásokat figyeltünk meg a primer patkány kardiomiocita sejtenyészetben is a fúziós és fissziós folyamatok esetében. A BGP-15 kezelés megőrizte a mitokondriális membránpotenciált és javította a mitokondriális funkciót. A BGP-15 kezelés védte a mitokondriális genom integritását és fokozta a mitokondriumok de novo biogenezisét hidrogén-peroxid indukálta oxidatív stressz során. Mindazonáltal ezen hatások pontos molekuláris mechanizmusa még mindig ismeretlen, de egyértelmű bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a BGP-15 molekulának hatása van a jelátvitel fontos integráló pontjain bizonyos kóros folyamatokban. A lehetséges molekuláris mechanizmusok tisztázása érdekében a jövőben további célzott vizsgálatokat szükséges végezni.

Eredményeink azt mutatják, hogy a mitokondriális dinamika farmakológiai modulálása celluláris stressz esetén új terápiás megközelítés lehet olyan különböző szívbetegségekben, amelyeket az oxidatív stressz okozta mitokondriális károsodás jellemez.



7. ábra: A BGP-15 kezelés feltételezett mechanizmusa hipertónia által indukált szívelégtelenség modellben. A BGP-15 kedvező hatással rendelkezik a magas vérnyomás okozta kardiális remodellingben és kardiális fibrózisban. A BGP-15 kezelés csökkenti a TGF β /Smad és a MAPK jelátviteli faktorok aktivitását, ezáltal megakadályozza a magas vérnyomás indukálta intersticiális kollagén lerakódást. A BGP-15 kedvezően befolyásolja a túlélést támogató jelátviteli utakat. Ezenkívül a BGP-15 kezelés következtében a mitokondriális biogenezis aktiválódik, ami a mitokondriális tömeg növekedését eredményezi. A BGP-15 növeli az OPA1 és MFN1/2 fúziós mediátorok expressziós szintjét, továbbá csökkenti a DRP1 és Fis1 fission mediátorok expressziós szintjét.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A BGP-15 kezelés hatása a szívizom szerkezetére és működésére.

Kutatócsoportunk elsőként igazolta, hogy a BGP-15 kezelés jótékony hatással van a szív működésre a magas vérnyomás okozta szívelégtelenségben.

2. A BGP-15 kezelés hatása a kardiális remodellingben és szívelégtelenségben szerepet játszó jelátviteli útvonalakra.

BGP-15 kezelés kedvezően befolyásolja a remodellingben szerepet játszó jelátviteli utak aktivitást (Akt/GSK-3 β , ERK1/2, JNK, p38 MAPK).

3. A BGP-15 hatása a miokardiális fibrotikus folyamatokra.

A BGP-15 kezelés a TGF- β /Smad jelátviteli útra gyakorolt kedvező hatása révén véd az intersticiális kollagén felhalmozódás ellen.

4. A BGP-15 hatása a mitokondriális fúziós és fissziós folyamatokra, valamint a mitokondriális biogenezisre.

- A BGP-15 kezelés megőrzi a mitokondriális ultrastruktúrát a ROS által kiváltott mitokondriális fragmentációval szemben.
- A BGP-15 növeli az OPA1 és MFN1/2 fúziós mediátorok expressziós szintjét, továbbá csökkenti a DRP1 és Fis1 fissziós mediátorok expressziós szintjét a szívelégtelenség állatmodelljében.
- A mitokondriális biogenezis fokozódik a BGP-15 kezelés hatására szívelégtelenségben.
- A BGP-15 védi a mitokondriális hálózatot az oxidatív stressz indukálta mitokondriális fragmentációval szemben.
- A BGP-15 növeli az OPA1 és MFN1/2 fúziós mediátorok expressziós szintjét, továbbá csökkenti a DRP1 és Fis1 fissziós fehérjék expressziós szintjét oxidatív stressz esetén in vitro NRCM sejt kultúrában.
- A mitokondriális biogenezis fokozódik hidrogén-peroxid indukálta oxidatív stressz esetén a BGP-15 kezelés hatására NRCM sejtekben.
- A BGP-15 kezelés véd az oxidatív stressz indukálta mitokondriális DNS károsodással szemben.

5. A BGP-15 szerepe a mitokondriális funkcióra stressz szituációkban.

- A BGP-15 kezelés megőrzi a mitokondriális membránpotenciált és javítja a mitokondriális funkciót.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kísérleteinket az I.sz Belgyógyászati Klinika Szentágothai János Kutató Laboratóriumában és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán 2017 és 2021 között.

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Tóth Kálmán professzor úrnak, aki munkám során támogatott és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönetemet szeretném kifejezni projektvezetőimnek, Halmosi Róbert professzor úrnak és Dr. Deres Lászlónak, akik tanulmányaimat végig vezették a kardiovaszkuláris tudományok területén, és lehetőséget biztosítanak jelenlegi munkára. Alapvető útmutatásuk és kitartó segítségük nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Hálás vagyok Sümegi Balázs professzornak (†), aki rendkívüli mentor volt és a biokémiai gondolkodásra tanított.

Szeretném megköszönni kollégáimnak, Dr. Erős Krisztiánnak, Ördög Katalinnak és Dr. Bruszt Kittinek mindazt a segítséget, amelyet munkám során biztosítottak.

Hálával tartozom Dózsa Tímeának, Nyirádi Józsefnek és Halász Helénának, akik jelentős segítséget nyújtottak a laboratóriumi munkában.

Köszönetet mondok közeli barátaimnak a munkám során nyújtott bátorító támogatásért és hatalmas türelemért.

Legmélyebb hálám pedig családomat illeti végtelen szeretetükért, törődésükért és minden áldozatukért, amellyel neveltek és felkészítettek a jövőre. Hálás vagyok nekik, hogy bíztak bennem, a legnehezebb időkben és bátorítottak minden nehézség ellenére.

8. PUBLIKÁCIÓK

8.1 Releváns publikációk

HORVATH O, ORDOG K, BRUSZT K, KALMAN N, KOVACS D, RADNAI B, GALLYAS F, TOTH K, HALMOSI R, DERES L. Modulation of mitochondrial quality control processes by BGP-15 in oxidative stress scenarios: from cell culture to heart failure. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2021 Paper: 6643871, 22 p. (2021)
IF: 6,543

HORVATH O, ORDOG K, BRUSZT K, DERES L, GALLYAS F, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. BGP-15 protects against heart failure by enhanced mitochondrial biogenesis and decreased fibrotic remodelling in spontaneously hypertensive rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2021 Paper: 1250858, 13 p. (2021)
IF: 6,543

8.2 Egyéb publikációk

ORDOG K, HORVATH O, EROS K, BRUSZT K, TOTH SZ, KOVACS D, KALMAN N, RADNAI B, DERES L, GALLYAS F, TOTH K, HALMOSI R. Mitochondrial protective effects of PARP-inhibition in hypertension-induced myocardial remodeling and in stressed cardiomyocytes. Life Sciences 268 Paper: 118936, 15 p. (2021)
IF: 5,037

GAL R, DERES L, HORVATH O, EROS K, SANDOR B, URBAN P, SOOS SZ, MARTON ZS, SUMEGI B, TOTH K, HABON T, HALMOSI R. Resveratrol improves heart function by moderating inflammatory processes in patients with systolic heart failure. Antioxidants 9: 11 Paper: 1108, 19 p. (2020)
IF: 6,312

DERES L, EROS K, HORVATH O, BENCZE N, CSEKO CS, FARKAS S, SERESS L, TOTH K, HALMOSI R. The effects of bradykinin B1 Receptor antagonism on the myocardial and vascular consequences of hypertension in SHR rats. FRONTIERS IN PHYSIOLOGY 10 Paper: 624, 14 p. (2019)
IF: 4,566

VARADI O, HORVATH O, MARCSIK A, MOLNAR E, PALFI GY, BERECZKI ZS. Különleges formájú jelképes trepanációk a Dél-Alföldről. Anthropologiai Közlemények 56 pp. 91-104, 14 p. (2015)

8.3 Absztraktok

HORVATH O, DERES L, ORDOG K, BRUSZT K, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.
Role of BGP-15 treatment in hypertensive heart failure Progression and mitochondrial protection.

EUROPEAN HEART JOURNAL 40: Suppl. 1 Paper: P5994 (2019)

HALMOSI R, GAL R, DERES L, HORVATH O, MARTON ZS, SUMEGI B, TOTH K, HABON T. Resveratrol improves cardiac function and exerts an anti-inflammatory effect in systolic heart failure patients.

EUROPEAN HEART JOURNAL 40: Suppl. 1 Paper: P781 (2019)

HORVATH O, ORDOG K, BRUSZT K, DERES L, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.
A BGP-15 kezelés hatása a mitokondriális dinamikára és funkcióra élő állat modellen és sejt kultúrában.

CARDIOLOGIA HUNGARICA 49: Suppl. B Paper: B23 (2019)

ORDOG K, HORVATH O, BRUSZT K, HALMOSI R, TOTH K, SUMEGI B, DERES L.
Az L-2286 kezelés hatása oxidatív stresszben a mitokondriális dinamikára és funkcióra in vitro kardiomioblaszt modellben.

CARDIOLOGIA HUNGARICA 49: Suppl. B Paper: B14 (2019)

HORVATH O, DERES L, EROS K, ORDOG K, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.

Oxidatív stressz indukálta változások a szívizomsejtek mitokondriális dinamikájára sejtes modellekben.

CARDIOLOGIA HUNGARICA 48: Suppl. C Paper: C38 (2018)

ORDOG K, DERES L, EROS K, HORVATH O, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.

A BGP-15 kezelés hatása a hipertenzió indukált kardiális remodelingre in vivo SHR modellben.

CARDIOLOGIA HUNGARICA 48: Suppl. C Paper: C34 (2018)

GAL R, DERES L, HORVATH O, PRAKSCH D, MARTON ZS, SUMEGI B, TOTH K, HABON T, HALMOSI R.

A rezveratrol hatása a non-invazív klinikai kardiológiai és laboratóriumi paraméterekre szisztolés típusú szívelégtelenségben.

CARDIOLOGIA HUNGARICA 48: Suppl. C Paper: C65 (2018)

HORVATH O, DERES L, EROS K, ORDOG K, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.

Oxidative stress-induced changes in mitochondrial dynamics of cardiomyocytes in cell culture.

EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE 20: Suppl. 1 pp. 616-616. Paper: P2281, 1 p. (2018)

ORDOG K, DERES L, EROS K, HORVATH O, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R.

Effect of BGP-15 treatment on hypertension induced cardiac remodeling in an in vivo SHR model.

EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE 20: Suppl. 1 pp. 515-515. Paper: P1975, 1 p. (2018)

HALMOSI R, GAL R, DERES L, HORVATH O, PRAKSCH D, MARTON ZS, SUMEGI B, TOTH K, HABON T.

The effect of resveratrol on non-invasive cardiologic and laboratory parameters in systolic heart failure.

EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE 20: Suppl. 1 pp. 565-565. Paper: P2133, 1 p. (2018)

HORVATH O.

A paraoxonáz aktivitás, a totál oxidáns státusz és a lipid profil alakulása különböző kardiovaszkuláris rizikócsoportha tartozó egyéneknél.

Érbetegségek, XXIII. évfolyam 2. szám, 2016/2

BERECZKI ZS, VARADI O, HORVATH O, MARCSIK A, MOLNÁR E, PALFI GY.

Healing and Sexual Symbolism - Avar Trephinations in the 7-9th Century AD Carpathian Basin.

In: McGlynn, George; Kirchengast, Sylvia; Zink, Albert; Grosskopf, Birgit (szerk.) 11th Meeting of the Society for Anthropology (GfA). Evolutionary and Modern Challenges to Homo sapiens – An Anthropological Inquiry. Abstract and Program Booklet

München, Németország (2015) 105 p. pp. 15-15, 1 p.

VARADI O, TIHANYI B, HORVATH O, MARCSIK A, MOLNAR E, PALFI GY, BERECZKI ZS.

Symbolic trephinations of extraordinary shape in the Carpathian Basin.

In: Gál, Szilárd Sándor (szerk.) 1st Conference of the Anthropological Association "Aurél Török"

Târgu-Mureş, Románia (2015) pp. 6-6, 1 p.

VARADI O, HORVATH O, BERECZKI ZS.

Szilvamac alakú jelképes trepanációk a Kárpát-medencében.

In: Mesterházy, B (szerk.) XIII. Természet-, Műszaki és Gazdaságtudományok Alkalmazása Nemzetközi Konferencia: Előadások: 13th International Conference on Applications of Natural, Technological and Economic Sciences: Proceedings from Conference

Szombathely, Magyarország: Nyugat-magyarországi Egyetem, Természettudományi és Műszaki Kar, Természetföldrajzi Tanszék, (2014) pp. 25-25, 1 p.