

A metabolikus elváltozások kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett következményei: a mitokondriális oxidatív stressz és autofágia szerepe

Doktori tézisek

Koncsos Gábor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gircz Zoltán, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Hivatalos Bírálók: Dr. Szanda Gergő, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Lekli István, Ph.D., egyetemi adjunktus
Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Szőkő Éva, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Miklós Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Márki Árpád, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

1.1. Metabolikus betegségek kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatása

A metabolikus betegségek (pl. az elhízás, a hiperlipidémia vagy a diabétesz) képesek növelni a kardiovaszkuláris betegségek incidenciáját, ideértve a miokardiális infarktust vagy a kardiomiopátiákat. Így a metabolikus betegségek kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett hatásának vizsgálata kiemelt szereppel bír, mellyel új célpontokat fedezhetünk fel a jövőbeni kardioprotektív terápiaik számára.

Ismert, hogy az úgynevezett iszkémiás kondicionálás kardioprotektív hatása csökkent diabétesz vagy hiperkoleszterinémia jelenlétében, azonban az egyelőre nem teljesen tisztázott, mely jelátviteli útvonalak felelősek a kardioprotekció elvesztéséért hiperkoleszterinémiában. Továbbá a prediabéteszes állapot (károsodott glükóz tolerancia, inzulin és leptin rezisztencia, gyenge vagy közepes mértékű elhízás) előfordulása szintén hozzájárulhat a szív szerkezeti és funkcionális változásához. Habár a miokardiális patofiziológiai elváltozások viszonylag jól karakterizáltak már kialakult diabéteszben (lásd diabéteszes kardiomiopátia), a prediabétesz következményei és molekuláris mechanizmusai nem teljesen ismertek.

1.2. A metabolikus betegségek molekuláris patológiája a szívben

A prediabétesz vagy hiperlipidémia miatt zavart anyagcsereállapot megváltozott jelátviteli útvonalakat eredményezhet a szívizomsejtekben.

Jól ismert, hogy az mTOR (mechanistic target of rapamycin) fehérje különféle regulátorokon keresztül aktiválódhat (pl. aminosavak, megemelkedett glükóz- és oxigénszint), azonban a miokardiális mTOR szerepe hiperkoleszterinémiában és prediabéteszben még nem teljesen ismert.

Az autofágia minden sejtben megtalálható általános mechanizmus, mely részt vesz a fehérjék és különféle sejtalkotók minőség-ellenőrzésében,

valamint a szívsejtek védelmében, azonban szerepe prediabéteszben és hiperkoleszterinémiában még nem teljesen tisztázott.

Az elégtelen autofágia programozott sejthalált (pl. apoptózist) válthat ki, mely a szívizomsejtek elhalását eredményezheti. Korábban kimutatták, hogy az aktivált apoptózis fontos szerepet játszik diabéteszben, azonban a miokardiális apoptózis és nekroptózis szerepe prediabéteszben és hiperkoleszterinémiában még nem teljesen ismert.

1.3. Miokardiális mitokondriumok szerepe metabolikus betegségekben

A mitokondriumoknak fontos szerepük van a metabolikus kórképek (pl. elhízás és diabétesz) kialakulásában, azonban prediabéteszben az állapotuk és hatásuk kevésbé tisztázott. A mitokondriális funkcióra a mitokondriális dinamika változása jelentős hatást gyakorol. Azonban az nem teljesen tisztázott, vajon a megváltozott mitokondriális dinamika prediabéteszben részt vesz-e a károsodott szívfunkciós folyamatokban.

Szubcelluláris elhelyezkedésük alapján a miokardiális és harántcsíkolt izmokból származó mitokondriumoknak három különböző szubfrakcióját különböztetjük meg: szubsarkolemmális (SSM), interfibrilláris (IFM) és perinukleáris (PNM) mitokondriumokat. A proteomikai különbségek biológiai háttere még kevésbé tisztázott; nem sikerült eddig olyan specifikus fehérje markert találni, mely lehetővé tenné a különböző mitokondriális szubfrakciók pontos azonosítását.

A biokémiai vizsgálatok során tapasztalható SSM és IFM közötti különbségek előfordulása nagyban függ a különböző izolálási módszerek alkalmazásától. Habár a legszélesebb körben alkalmazott módszerek által használt proteázok szükségesek az IFM izolációjához, a bakteriális proteázokkal történő enzimatis emésztés hatással lehet a mitokondriumok fehérjetartalmára és/vagy funkciójára. Azonban az eddig nem ismert, hogy a nagárv-alapú, IFM-ok izolálására alkalmas módszer hatással lehet-e a

mitokondriális fehérjék azonosítására a miokardiális mitokondrium szubfrakciókban.

2. Célkitűzések

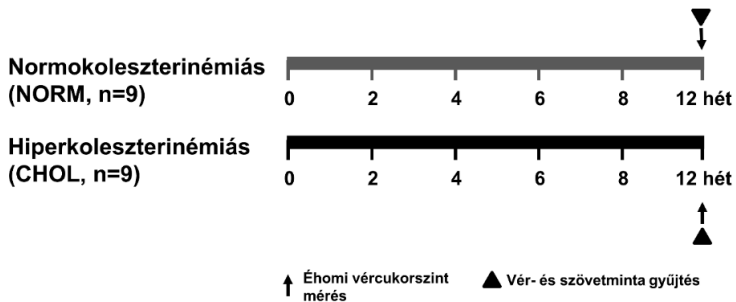
- Megvizsgálni a miokardiális autofágia, mTOR, apoptózis és nekroptózis útvonalak állapotát hiperkoleszterinémias patkánymodellben.
- A prediabétesz funkcionális, morfológiai és molekuláris szempontok szerinti karakterizációja diéta-indukált patkánymodellben.
- A prediabétesz hatásának vizsgálata a kardiovaszkuláris rendszerben.
- Megvizsgálni, vajon az IFM izolálására alkalmas nagárvíz-alapú módszer hatással van-e a mitokondriális proteinek azonosítására a miokardiális mitokondrium szubfrakciókban.

3. Anyagok és módszerek

Ezen vizsgálatokat az USA Egészségügyi Intézetének irányelvei szerint végeztük. Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem és a Justus-Liebig Egyetem Állatjóléti Bizottságai engedélyezték.

3.1. Állatmodellek és kísérleti elrendezések

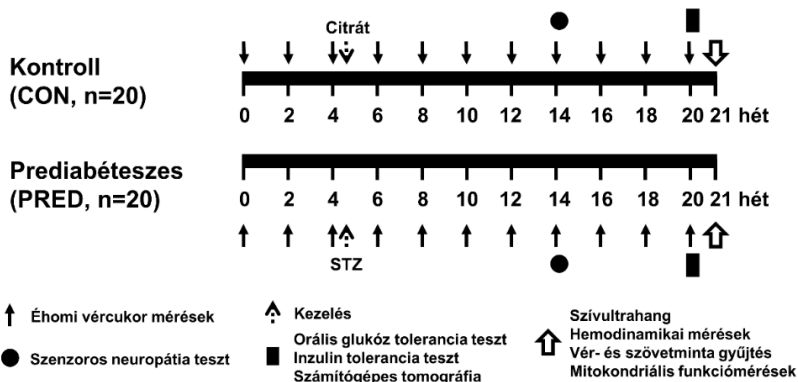
A hiperkoleszterinémia hatásának vizsgálatához hím Wistar patkányokat etettünk normál (NORM) vagy 2% koleszterinnel és 0.25% kolsavval (CHOL) dúsított diétával 12 hétig. Az állatokat dietil-éteres altatásban részéstittük majd az eutanáziát követően szívüket eltávolítottuk, átmostuk és további kísérletek céljára gyorsfagyasztottuk (1. Ábra).



1. Ábra. Hiperkoleszterinémias állatok kísérletes protokollja.

Éhomi vércukor, triglicerid és koleszterinszinteket mértünk a diéta 12. hetén. A mintavételezést az állatok eutanáziája után végeztük. NORM, normokoleszterinémias csoport; CHOL, hiperkoleszterinémias csoport

A prediabeteses modell karakterizációjához hím Long-Evans patkányokat használtunk, melyeket kontroll (CON) illetve magaszsírtartalmú (PRED) táppal etettünk 21 hétig. A PRED állatok egyszeri, alacsony dózisu (20 mg/kg) streptozotocin (STZ) kezelést kaptak a diéta 4. hetén (2. Ábra). Az állatoknak *ad libitum* hozzáférésük volt vízhez és taklálékhoz. Az állatok testsúlyát hetente mértük. Vervétel és vércukormeghatározás az állatok szaféna vénájából történt minden második héten. A szenzoros neuropátia vizsgálatához mechanikai fájdalomküszöböt (hátsó láb elrántása fájdalom ingerre) mértünk a diéta 15. hetén. Orális glükóz toleranciaesztet (OGTT), inzulin toleranciaesztet (ITT) és számítógépes tomográfiás (CT) vizsgálatot végeztünk a diéta 20. hetén. A diéta 21. hetén az állatokat pentobarbitálos altatásban részesítettük. Az állatok terminációja előtt a szívfunkciós paraméterek meghatározásához szívultrahangos illetve nyomás-térfogat katéteres hemodinamikai vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálatokat követően az állatok szívét eltávolítottuk, rövid ideig perfundáltuk Krebs-Henseleit pufferrel Langendorff szerint majd végül a kivett szövetek tömegét lemértük. Az állatok szövetmintáit a további vizsgálatokhoz gyorsfagyasztottuk.



2 Ábra. A prediabéteszes állatok kísérletes protokollja.

Long-Evans patkányokat kontroll (CON) illetve magas zsírtartalmú diétával etettünk, az utóbbi csoportot 20 mg/kg STZ-nal kezeltük a diéta 4. hetén, hogy prediabéteszes állapotot hozzunk létre (PRED). Az állatok testsúlyát hetente mértük, a vérmintákat szaféna vénából vettük a diéta minden második hetén. A szenzoros neuropátia méréseket a diéta 15. hetén végeztük. OGTT, ITT és CT vizsgálatok a diéta 20. hetén történtek. A szívultrahangos és hemodinamikai értékeket illetve a mitokondriumok funkcionális paramétereit a diéta 21. hetén mértük. A szövetmintákat a terminációt követően gyűjtöttük. CON, kontroll csoport; PRED, prediabéteszes csoport; STZ, streptozotocin; OGTT, orális glükóz tolerancia teszt; ITT, inzulin tolerancia teszt; CT, számítógépes tomográfia.

A nagáz enzim hatását a mitokondriális szubfrakciókban hím C57Bl6J egerekben és Wistar patkányokban vizsgáltuk. Az egerek 5%-os izoflurános áltatásban és cervikális diszlokációban részesültek; míg a patkányok 4%-os izoflurános áltatásban részesültek, majd a terminációt követően a szívüket eltávolítottuk és további vizsgálatokhoz felhasználtuk.

3.2. Biokémiai mérések

Szérum koleszterin, HDL (high-density lipoprotein) és triglicerid szinteket mértünk Long-Evans patkányokból, valamint glükóz, koleszterin és triglicerid szinteket mértünk kolometriásan NORM és CHOL Wistar patkányok plazmájából. Plazma leptin szinteket mértünk ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszer segítségével a gyártók utasításai szerint. A pankreász inzulintartalmának meghatározására gyorsfagyasztott és porított pankreásmintákat használtunk szintén a gyártó utasításai szerint.

3.3. Hisztológia

Szív-, máj- és pankreásmintákat fixáltunk 4%-os semleges pH-jú formalinban, melyeket hematoxin-eozin és Masson's trikróm festéssel festettünk. A bal kamrai szívizom nitrotirozin immunfestése szintén megtörtént. A SSM-ok és IFM-ok területe, valamint a lipidcseppek mérete transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével került meghatározásra.

3.4. Kvantitív RT-PCR

A totál RNS izolálás és a cDNS szintézis a szívek bal kamráiból történt a gyártók ajánlása szerint. A kvantitatív RT-PCR-t StepOnePlus Real-Time PCR System-el (Thermo Fisher Scientific) végeztük. Az expressziós különbségek meghatározásához CT (cycle threshold) összehasonlító metodikát ($2^{-\Delta CT}$) használtunk.

3.5. Miokardiális mitokondriumok izolációja és vizsgálata

A SSM és IFM frakciókat patkány és egér bal kamrákból izoláltuk Palmer és mtsai 1977-es publikációja szerint kisebb módosításokkal; így a továbbiakban hagyományos protokollként hivatkozunk rá. Röviden, a bal kamrai szövetmintákat ollóval szétvagdostuk „A” pufferben. Ezt követően a szöveteket Polytron késes homogenizálóval homogenizáltuk majd centrifugáltuk. A (SSM-okat tartalmazó) felülúszókat 2 csoportra osztottuk: az egyik csoportban a SSM-okat nagááz és proteáz inhibitor nélkül izoláltuk

(SSM), a másik csoportban lévő SSM-okat nagárrzal (SSM+N; Bacterial type XXIV) 1 percig kezeltük. Az első centrifugálásból hátramaradó üledéket (mely tartalmazta az IFM-okat tartalmazó frakciót) „A” pufferben reszuszpendáltuk és egy percig nagárrzal kezeltük. Majd az IFM-okat két csoportra osztottuk: az egyik csoporthoz PMSF-ot (fenilmetilszulfonil-fluorid) adtunk (IFM+N+I), míg a másik csoporthoz nem adtunk PMSF-ot (IFM+N). Minden mitokondrium mintát homogenizáltunk és centrifugáltunk. A SSM és IFM frakciók összegyűjtéséhez a keletkező felülúszókat tovább centrifugáltuk. A mitokondriumokat „A” pufferben reszuszpendáltuk, centrifugáltuk majd végül „B” pufferben reszuszpendáltuk. Ezt követően két csoportot (SSM és IFM+N) használtunk arra, hogy meghatározzuk a prediabetészes állatok szívéből származó mitokondriumok oxigénfogyasztását, membránpotenciál változását, Ca^{2+} felhasználását és hidrogén-peroxid termelődését.

Western blot vizsgálat céljára a mitokondriumokat egy ultracentrifugációs lépéssel és 30%-os Percoll használatával tovább tisztítottuk. A centrifugálást követően a mitokondriumokat összegyűjtöttük, kétszer mostuk majd a tisztított mitokondriumokat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.6. Western blot

Egyenlő fehérjemennyiséget választottunk el Tris-glicin-SDS poliakrilamid géleken (teljes balkamrai, SSM és IFM mintákból), majd a fehérjéket polivinylidén difluorid membránokra transzferáltuk. A membránokat borjú szérum albuminnal vagy zsírmentes, száraz tejjel blokkoltuk. Ezt követően a membránokat elsődleges, valamint megfelelő tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcens technikával azonosítottuk.

3.7. Statisztika

Az értékeket átlag \pm SEM (*standard error of mean*) formában adtuk meg. A csoportok közötti statisztikai analízishez *párosítatlan, kétmintás Student-*

féle t-próbát, illetve Mann-Whitney-féle U-próbát alkalmaztunk. A C57B16J egér és Wistar patkány SSM és IFM+N csoportokból származó MFN1, MFN2, DJ-1, p66shc és Cx43 mitokondriális fehérjék adatait VDAC-ra normalizáltuk és párosítatlan, kétmintás Student-féle t-próbát vagy egyutas ANOVA-t alkalmaztunk LSD post hoc teszttel. A mitokondriális oxigénfogyasztás adatainak vizsgálatához egyutas ANOVA-t és LSD post hoc tesztet vagy Kruskal-Wallis analízist és Dunn-féle post hoc tesztet alkalmaztunk a normál eloszlás függvényében. GraphPad Prism 6 szoftvert használtunk a statisztikai analízisekhez. A statisztikai szignifikanciát $p < 0.05$ esetén fogadtuk el.

4. Eredmények

4.1. Magas koleszterol tartalmú diéta hatása Wistar patkányokban

Ebben a kísérletben a diéta végére a CHOL patkányok 41%-al magasabb plazma koleszterinszint emelkedést mutattak a NORM patkányokéhoz képest (4.09 mmol/L vs. 2.89 mmol/L). Továbbá a Western blot eredményeink azt mutatták, hogy a koleszterinnel táplált állatok szívében csökkent az LC3-II, Beclin-1, Rubicon és RAB7 fehérjék expressziója, utalva az autofágia iniciáció és vezikuláris transzportfolyamatok csökkenésére; annak ellenére, hogy az autofágia iniciációs lépésében szintén részt vevő harmadik osztályba tartozó (Class-III) PI3K fehérje expressziója fokozódott. A riboszomális S6 fehérje foszforilációja (mely közvetett markere az mTOR komplex aktivitásának) szignifikánsan megemelkedett a CHOL csoportban a kontroll csoporthoz képest. Az apoptózismarkerként használt, hasított kaszpáz-3 mennyisége szignifikánsan megemelkedett, míg a Bcl-2/Bax fehérje-expressziós hányados nem változott a csoportok között. Ezenfelül a nekrotózis útvonal fontosabb markereinek expressziója, úgymint RIP1, RIP3 vagy MLKL nem változott hiperkoleszterinémiában. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az autofágia csökkent, az apoptózis és mTOR aktivitás

növekedett, míg a nekroptózis mértéke nem változott hiperkoleszterinémiás szívszövetekben a kontrollokhoz képest.

4.2. A magas zsírtartalmú diéta és streptozotocin kezelés hatása Long-Evans patkányokban

A prediabéteszes állatok testsúlya enyhén, de statisztikailag szignifikánsan megemelkedett a diéta 9. hetétől a kontroll csoporthoz képest, majd ez a különbség elérte a 18%-ot a diéta végére. Továbbá, a diéta 20. hetén a plazma leptinszint szignifikánsan megemelkedett prediabéteszben, míg nem változtak a plazma koleszterin-, HDL koleszterin- és trigliceridszintek, valamint a máj és vese funkcionális paraméterei. A CT vizsgálat kimutatta, hogy a prediabéteszes patkányok testzsír-térfogata lényegesen megemelkedett a diéta végére. Ezenfelül az elektron mikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a miokardiumban található lipidcseppek mennyisége prediabéteszben kontroll csoporthoz képest szignifikánsan megemelkedett.

A diéta 10. héttől kezdődően a 20. hétre az éhomi vércukorszint enyhén megemelkedett prediabéteszben, azonban ennek értéke normoglikémiás határon belül maradt. Az OGTT és ITT eredmények bizonyították a károsodott glükóztoleranciát és inzulinrezisztenciát a prediabéteszes csoportban, azonban nem tapasztaltunk sem a pankreasz inzulin tartalmában, sem a morfológiájában eltérést a csoportok között. Továbbá csökkenést tapasztaltunk a prediabéteszes állatok fájdalomküszöbében a diéta 15. hetén, mely enyhe szenzoros neuropátia kialakulását bizonyította.

A prediabétesz kardiovaszkuláris hatásának vizsgálatához a szív morfológiai és funkcionális paramétereit mértük. A száraz szív súly, bal kamrai szívtömeg, bal kamrai ventrikuláris falvastagság, szisztolés és diasztolés ventrikuláris poszterior falvastagság szignifikánsan megnövekedtek, azonban - feltehetően az elhízás miatt - a szív súly/testsúly arány lecsökkent prediabéteszben. A bal kamrai végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés egyenesének meredeksége, mely egy korai és érzékeny

markere a diasztolés diszfunkciónak, szignifikánsan megemelkedett, habár más hemodinamikai paraméter - ideértve a vérnyomást – nem változott. A hematoxilín-eozin festett bal kamrai metszeteken megnövekedett kardiomiocita átmérőt mutattunk ki prediabéteszben. A diasztolés diszfunkcióban részt vevő komponensek azonosítása során a miozin nehéz láncok (MHC) expresszióját vizsgáltuk. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a β -MHC gén expressziója csökkent, valamint az α -MHC gén expressziója illetve a β/α -MHC arány is tendenciózus csökkenést mutatott.

Mitokondriális morfológiát és enzimaktivitást szintén vizsgáltunk a prediabéteszes patkányok bal kamráiból. Nem láttunk különbséget a mitokondriális oxigénfogyasztásban, enzimaktivitásban, Ca^{2+} -felvételben és membránpotenciál változásban. Megemelkedett hidrogén-peroxid termelődést tapasztaltunk a miokardiális SSM-okban glutamát-malát szubsztrát hozzáadása mellett.

A nitrorozoin immunhisztológia kimutatta, hogy a fehérjék nitrozilációja megnövekedett prediabéteszben. Korábban már bizonyították, hogy a CaMKII δ képes aktiválódni oxidatív stressz indukálta kondíciókban, ezért megvizsgáltuk a kináz aktív formáinak expresszióját, melyek hatással lehetnek a szív kontraktilitására és relaxációs kapacitására. CaMKII δ és azzal szoros kapcsolatban lévő foszfolamban (PLB) Thr¹⁷-en történő foszforilációja nem változott prediabéteszben. Másfelől a PLB fehérje foszforilációja Ser¹⁶-on tendenciózus mértékben csökkent prediabéteszben ($p=0.08$). Eredményeink azt mutatják, hogy prediabétesz hatására a mitokondriális dinamika és mitofágia/autofágia lényegesen nem változott, azonban az MFN2 expressziójának emelkedése (magnövekedett mitokondriális fúzió, endoplazmatikus retikulumhoz történő kihorgonyzás) és a BNIP3 expressziójának csökkenése (csökkent mitofágia) hozzájárulhat a mitokondriális homeosztázis korai változásához, mely a károsodott mitokondriumok felhalmozódásához vezethet. Nem találtunk különbséget HSP fehérjék expressziójában és foszforilációjában sem. Bár az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje expressziója csökkent a prediabéteszes állatokban, Bcl-2/Bax arány nem változott.

4.3. Fehérjék azonosítása és mennyiségének mérése miokardiális mitokondriumok alpopulációkban

Wistar patkányok és C57Bl6J egerek szívében a MFN2 és Cx43 fehérjék jelintenzitása magasabb volt az SSM mintákban, míg az MFN1 és a p66shc fehérjék jelintenzitásai nem változtak; a DJ-1 fehérje jelintenzitása pedig magasabb volt az IFM+N csoportban az SSM csoporthoz képest. Az SSM-ok nagárz kezelése a MFN1, MFN2 és Cx43 fehérjék csökkent jelintenzitását eredményezte, ahogy azt Western blot módszer segítségével is kimuttatuk. Ezzel ellentétben, a nagárz kezelésnek nem volt hatása a p66shc mennyiségére SSM-okban, míg a DJ-1 szintje enyhén – de szignifikánsan – megemelkedett az SSM+N csoportban az SSM csoporthoz képest. A nagárz gátlása PMSF-el (IFM+N+I) nem volt hatással a Cx43, DJ-1, p66shc és MFN1 fehérjék jelintenzitására, míg MFN2 jelintenzitása szignifikánsan magasabb lett, hasonlóan a SSM csoportban mért szinthez. A nagárz kezelés nem volt hatással a komplex-I-ben és komplex-II-ben mért alap illetve ADP-stimulált oxigénfogyasztásra a SSM csoporthoz képest. A SSM+N csoportban tendenciózus emelkedést véltünk felfedezni a komplex-I-közvetített oxigénfogyasztásban az SSM csoporthoz képest ($p=0.098$), míg a mitokondriális oxigénfogyasztás hasonló mértékű volt az IFM+N és IFM+N+I csoportokban.

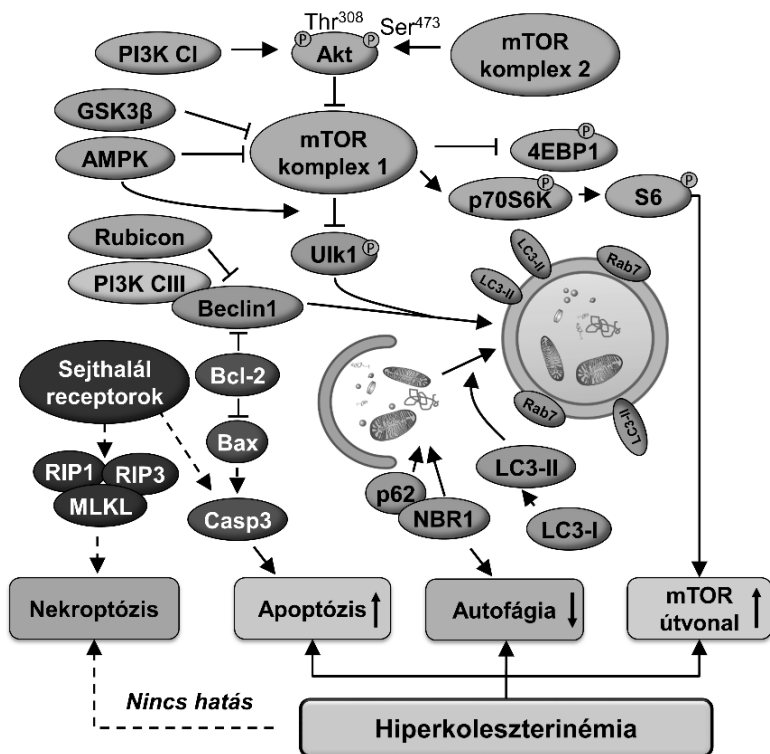
5. Megbeszélés

5.1. A hiperkoleszterinémia hatással van mTOR-ra és autofágiára a szívben

Ebben a tézisben kimutattuk, hogy a hiperkoleszterinémia a szívben csökkenti az autofágiát és aktiválja az mTOR útvonalat valamint az apoptózist (a sematikus ábrázolásért lásd a 3. Ábrát).

Habár megemelkedett hasított kaszpáz-3 aktivációt mutattunk ki, a pro- és anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék egyensúlyát a hiperkoleszterinémia nem befolyásolja. Mi mutattuk meg először a nekroptózis állapotát *in vivo* hiperkoleszterinémiában. Továbbá bizonyítottuk azt, hogy a nekroptózis fő markerei nem változnak a koleszterin-etetett patkányok szívében.

Összefoglalva, az eredményeink bizonyították, hogy a komplex metabolikus betegségek a használt állatmodellektől függően különböző mértékben lehetnek hatással a kardiális autofágiára és mTOR útvonalra. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy fókuszált vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy megfejtjük az autofágia és a specifikus metabolikus útvonalak szerepét ezekben a kórképekben.



3. Ábra. A hiperkoleszterinémia miokardiális hatásának sematikus ábrázolása az autofágia, apoptózis, nekroptózis és mTOR útvonallakkal összefüggésben.

PI3K CI-III, class I-III phosphoinositide 3-kinase; NBR1, neighbor of BRCA1 gene 1; AMPK α , AMP-activated protein kinase α ; GSK3 β , glycogen synthase kinase-3 beta; ULK1, unc-51-like kinase 1; LC3, microtubule-associated protein light chain 3; RAB7, ras-related protein Rab-7a; Rubicon, run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein; SQSTM1/p62, sequestosome 1; mTOR, mechanistic target of rapamycin; P70S6K, ribosomal protein S6 kinase beta-1; S6, ribosomal S6 protein; 4EBP1; eIF-4E binding protein 1; Casp3, caspase 3; Bax, Bcl-2-associated X protein; RIP1-3, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 and 3; MLKL, mixed lineage kinase domain-like protein.

5.2. A prediabétesz diasztolés diszfunkciót és gyenge mitokondriális oxidatív stresszt okozott

Bizonyítottuk, hogy a diasztolés diszfunkció és a szenzoros neuropátia már jóval a diabétesz kialakulás előtt megjelenik, mely együtt jár hipertrófia kezdeti jeleivel a szívben.

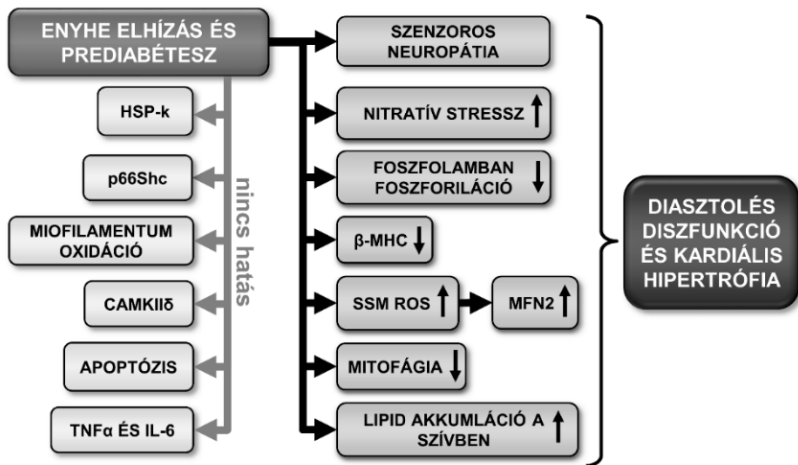
Az oxidatív stressznek fontos szerepe van a diabéteszes kardiomiopátia kialakulásában; azonban még nincs teljesen tisztázva, vajon felelős-e a csökkent szívfunkcióért prediabéteszben. Ebben a tézisben megemelkedett hidrogén-peroxid termelést sikerült kimutatnunk a SSM-okban, valamint megnövekedett nitrotirozin termelődést és megemelkedett MFN2 expressziót a prediabéteszes szívben. Azonban egy korábbi, diéta-indukált prediabéteszes tanulmányban azt találták, hogy nincs jele mitokondriális oxidatív stressznek hím Wistar patkányok szívében 16. hetet követően, mely azt sugallja, hogy a mitokondriális oxidatív stressz nem feltétlenül van jelen a prediabétesz minden állatmodelljében és stádiumában, ezáltal nem valószínű, hogy a prediabétesz által előidézett szívfunkciós elváltozások fő hajtóereje lenne.

Eredményeink bizonyítottak néhány változást a sejt folyamatokban, azt sugallva, hogy a prediabéteszben megfigyelt hipertrófia és diasztolés diszfunkció számos egyidejű eltérés következménye a szív homeosztázisában (lásd 4. Ábra).

Tendenciózus csökkenést figyeltünk meg a PLB foszforilációjában Ser¹⁶-on, valamint meghatároztuk a kontraktilis apparátus és a Ca²⁺ homeosztázis aktív komponenseit prediabéteszben.

Az apoptotikus folyamatok a diabéteszes kardiomiopátiában jellemzően megjelennek, mely folyamatokért az oxidatív stressz szintjének emelkedését lehet felelőssé tenni diabéteszben. Korábban leírták, hogy a kísérletes diabétesz a pro-apoptotikus fehérjék expressziójának emelkedését és anti-apoptotikus fehérjék csökkenését idézi elő. Ebben a tézisben a Bcl-2 enyhe csökkenését mutattuk ki, azonban Bcl-2/Bax arányban és a kaszpáz-3 expresszióban nem tapasztaltunk eltérést a prediabéteszes állatokban.

Mi mutattuk ki először a szívben zajló mitokondriális fúzió és mitofágia korai eltérését prediabetészes állapotban, melyet a megemelkedett MFN2 és csökkent BNIP3 fehérje expressziók erősítenek meg; azonban a hagyományos autofágia-, mitofágia- és apoptózis markerek nem változtak. Ezért feltételezhetjük azt, hogy csak a glükóz és a lipid homeosztázis jelentős zavarai – melyek megfigyelhetőek kezeletlen betegeknél, illetve a diabétesz genetikusan módosított modelljeinél – lehetnek elég erősek ahhoz, hogy nagymértékben befolyásolják a miokardiális mitofágiát vagy a mitokondriális dinamikát, melyek így súlyosan károsodott szív működéshez vezethetnek.



4. Ábra. A prediabetészes miokardiális hatásának sematikus ábrázolása.

SSM, szubsarkolemmális mitokondriumok; ROS, reaktív oxigéngyökök; HSP, hő sokkfehérjék; CAMKII δ , Ca²⁺/kalmodulin-függő protein kináz II; TNF α , tumor nekrozis faktor alfa; IL-6, interleukin-6; MFN2, mitofuzin 2; β -MHC, béta-alfa-miozin nehézlánc.

5.3. A nagárrzal történő mitokondrium izoláció hatással van a mitokondriális fehérjék azonosítására

Bizonyítottuk, hogy az IFM-ok izolációjához használt bakteriális proteáz szignifikáns hatást fejt ki a MFN2 azonosítására a mitokondriális szubfrakciókban. A SSM fehérjék különböző proteáz érzékenységét szintén bizonyítottuk, mivel a nagárrz a MFN1, MFN2, DJ-1 és Cx43 kimutatására is hatással volt, azonban a p66shc fehérjére nem. Továbbá szintén kimutattuk, hogy a mitokondriális respirációra a nagárrz kezelés nem volt hatással.

Ebben a tézisben megvizsgáltuk a különböző mitokondriális kompartmentekből származó fehérjék jelintenzitását kontroll és nagárrz-kezelt SSM-okból. Mikor proteázt adtunk az intakt mitokondriumokhoz feltételezhető, hogy a külső mitokondriális membrán első fehérjéi emésztődtek el, mely során a MFN1 és MFN2 mitokondriális jelintenzitásai valóban csökkentek. Azonban a VDAC jelekre nem volt hatással a nagárrz. Megállapítható, hogy a p66shc jelintenzitására – mely fehérje jelen van az intermembrán térben – a SSM-ok nagárrz kezelése nem volt hatással, mely azt valószínűsíti, hogy elsősorban nem a fehérjék szubmitokondriális lokalizációja határozza meg a nagárrzal történő fehérje emésztés mértékét. Ezenfelül mivel a DJ-1 jelintenzitása magasabb az IFM+N csoportban, mint a SSM és SSM+N csoportokban, ezért elképzelhető, hogy a DJ-1 fehérje nagyobb mennyiségben van jelen IFM+N csoportban, azonban ennek megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink azt mutatták, hogy a Cx43 többnyire a kardiális SSM-okon van jelen. Hasonlóan a Cx43-hoz, a MFN2-t is többnyire a SSM-okon azonosítottuk a hagyományos protokollt alkalmazva. A nagárrzt gátolva a SSM-okban mérthez képest a MFN2 jelintenzitása magasabb volt, míg a Cx43 esetében nem. Ezért azt javasoljuk, hogy érdemes a mitokondriális fehérjék és funkciók meghatározását IFM+N+I csoporttal is elvégezni, összehasonlítva az IFM-okat és SSM-okat, valamint abban az esetben is, ha mitokondriális fehérjék különböző jelintenzitásokat mutatnak a SSM and IFM szubfrakciókban.

6. Összefoglalás

Ebben a tézisben az alábbi megállapításokat foglalhatjuk össze:

- A hiperkoleszterinémia aktiválja az mTOR-t és apoptózist de gátolja az autofágiát a szívben.
- A prediabétesz az emelkedett oxidatív stresszen keresztül enyhe diasztolés diszfunkciót és hipertrófiát okoz.
- A szubsarkolemmális és interfibrilláris mitokondriumok nagárz kezelése bizonyos proteinek pontatlan kvantitatív meghatározásához vezethet a szívben. Ezért mielőtt a mitokondriális proteinek eloszlását megvizsgálnánk, előzetes kísérlet ajánlott a nagárz enzimre ismeretlen fehérjék esetében.

7. Saját publikációk

7.1. A tézishez felhasznált publikációk

1. **Koncsos, G.**, Varga, Z.V., Baranyai, T., Boengler, K., Rohrbach, S., Li, L., Schluter, K.D., Schreckenber, R., Radovits, T., Olah, A., Matyas, C., Lux, A., Al-Khrasani, M., Komlodi, T., Bukosza, N., Mathe, D., Deres, L., Bartekova, M., Rajtik, T., Adameova, A., Szigeti, K., Hamar, P., Helyes, Z., Tretter, L., Pacher, P., Merkely, B., Giricz, Z., Schulz, R., Ferdinandy, P. Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 311(4), H927-h943, 2016. (IF: 3.324)
2. Giricz, Z., **Koncsos, G.**, Rajtik, T., Csonka, C., Szobi, A., Adameova, A., Gottlieb, R.A., Ferdinandy, P. Hypercholesterolemia downregulates autophagy in the rat heart. *Lipids in health and disease* 23; 16(1): 60, 2017. (IF: 2.137)
3. **Koncsos G.**, Varga, Z.V., Baranyai, T., Ferdinandy, P., Schulz, R., Giricz, Z., Boengler, K. Nagarse treatment of cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria accounts for inaccurate quantification of

proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 31;91:50-58, 2018. (IF: 2.238)

7.2. A tézishez fel nem használt publikációk

4. Baranyai, T., Nagy, C.T., **Koncsos, G.**, Onodi, Z., Karolyi-Szabo, M., Makkos, A., Varga, Z.V., Ferdinandy, P., Giricz, Z. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Cardiovascular diabetology* 14: 151, 2015. (IF: 4.015)
5. Baranyai, T., Giricz, Z., Varga, Z.V., **Koncsos, G.**, Lukovic, D., Makkos, A., Sárközy, M., Pávó, N., Jakab, A., Czimbalmos, C., Vágó, H., Ruzsa, Z., Tóth, L., Garamvölgyi, R., Merkely, B., Schulz, R., Gyöngyösi, G., Ferdinandy, P. In vivo MRI and ex vivo histological assessment of the cardioprotection induced by ischemic preconditioning, postconditioning and remote conditioning in a closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction: importance of microvasculature. *Journal of translational medicine* 15: 67, 2017. (IF: 3.991)
6. Giricz, Z., Varga, ZV., **Koncsos, G.**, Nagy, C.T., Görbe, A., Mentzer, R.M. Jr., Gottlieb, R.A., Ferdinandy, P. Autophagosome formation is required for cardioprotection by chloramphenicol. *Life Sciences* 186:11-16, 2017 (IF: 2.936)
7. Varga, ZV., Pipicz, M., Baán, JA., Baranyai, T., **Koncsos, G.**, Leszek, P., Kuśmierczyk, M., Sánchez-Cabo, F., García-Pavía, P., Brenner, GJ., Giricz, Z., Csont, T., Mandler, L., Lara-Pezzi, E., Pacher, P., Ferdinandy, P. Alternative Splicing of NOX4 in the Failing Human Heart. *Front Physiol.* 8:935, 2017 (IF: 4.134)
8. Nagy, AM., Fekete, R., Horváth, G., **Koncsos, G.**, Kriston, C., Sebestyén, A., Giricz, Z., Környei, Z., Madarász, E., Tretter, L. Versatility of microglial bioenergetics machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta.* S0005-2728(17)30193-7. 2017 (IF: 4.932)

8. Köszönetnyilvánítás

A bemutatott eredményeket az alábbi kutatási alapok támogatták: European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD), Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIA; NVKP-16-1-2016-0017 Nemzeti Szívprogram), Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA K 109737 és OTKA PD 109051), és a Semmelweis Egyetem (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009). Továbbá, Pharmahungary Csoport szintén támogatta a vizsgálatokat.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, hogy lehetővé tette a színvonalas munkát a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet Kardiometabolikus kutatócsoportjában.

Köszönettel tartozom a témavezetőmnek, Dr. Giricz Zoltánnak, hogy támogatta a szakmai pályafutásomat segítőkész javaslataival, tudományos hozzáállásával és tanácsaival.

Szeretném kifejezni hálámat Dr. Varga V. Zoltánnak, aki mindig inspirált gondolkodásmódjával, segített és támogatott a PhD-s éveim alatt. Hálás vagyok Károlyi-Szabó Melindának és Benkes Jenőnének az asszisztenciában nyújtott segítségükért. Köszönöm továbbá Baranyai Tamásnak, Nagy Csilla Teréziának, Brenner Gábornak, Makkos Andrásnak, Onódy Zsófiának és a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet minden PhD hallgatójának és munkatársának a baráti támogatást és környezetet. Szintén köszönettel tartozom diákkörös hallgatóimnak, Czakó Balázsnak, Tuza Sebestyénnek és Ézsiás Máténak, hogy folyamatosan segítették a munkámat.

Akiknek még köszönettel tartozom: Tomáš Rajtík, Adriana Adameová, Monika Barteková, Prof. Rainer Schulz, Kerstin Boengler, Prof. Merkely Béla, Radovits Tamás, Oláh Attila, Komlódi Tímea, Prof. Tretter László és minden kollaborátor, aki a tézisben megvalósult munkákban rész vett.

Végezetül, hálás köszönettel tartozom a családomnak, akik türelmükkel, hitükkel és kedvességükkel mindig ösztönöztek és támogattak.