

A MITOKONDRIUMMŰKÖDÉS BEFOLYÁSOLÁSÁNAK HATÁSA A SZÍVFUNKCIÓRA

Ph.D. Tézis



Szerző: Dr. Bruszt Kitti

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Témavezetők: Dr. Deres László, Prof. Dr. Halmosi Róbert

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar & Klinikai Központ

I. sz. Belgyógyászati Klinika

2025

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	angiotenzin konvertáló enzim
ARB	angiotenzin II receptor blokkoló
ATP	adenozin-trifoszfát
BNIP3	BCL2/adenovírus E1B 19kDa interakciós fehérje 3
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
DNS	deoxi-ribonukleinsav
DRP1	dinamin szerű fehérje 1
E	passzív mitrális beáramlási hullám
E'	korai diasztolés mitrális gyűrűsebesség
EF%	ejekciós frakció százalék
Fis1	mitokondriális fissziós fehérje 1
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GTP	guanozin-trifoszfát
JC-1	5,5',6,6'-tetraklór-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-karbocianin-jodid
K	kálium
L-OPA1	hosszú OPA1 fehérje
LV	bal kamra
LVIDd	diasztolés bal kamrai belső átmérő
LVIDs	szisztolés bal kamrai belső átmérő
LVEDV	bal kamrai diasztolés térfogat
LVESV	bal kamrai szisztolés térfogat
MFF	mitokondriális fissziós faktor
Mfn1	mitofuzin 1
Mfn2	mitofuzin 2
MiD49	mitokondriális dinamika fehérje 49
MiD51	mitokondriális dinamika fehérje 51
mtDNA	mitokondriális DNS
n	esetszám
OCR	oxigénfelhasználási ráta
OMA1	OMA1 cink-metallopeptidáz

OPA1	optikus atrófia fehérje 1
PINK1	PTEN (foszfatáz és tenzin homológ) indukált kináz 1
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
S-OPA1	rövid OPA1 fehérje
TG	transzgenikus
VDAC	feszültségfüggő anioncsatorna
WT	vad típus
YME1L1	ATP függő cink metalloproteáz YME1 szerű fehérje 1
$\Delta\Psi$	mitokondriális membránpotenciál

BEVEZETÉS

A szívelégtelenség jelentősége és kezelése

A szívelégtelenség komoly terhet ró az egészségügyre, világszerte közel 40 millió ember érintett, a 70 évnél idősebbek kb. 10-15%-a szenved ebben a betegségben. Hátttere, hogy a szív nem képes fenntartani a megfelelő szöveti perfúziót a normális töltési nyomás ellenére, vagy a megfelelő oxigénellátás csak a megnövekedett töltési nyomás rovására érhető el. A stabil krónikus szívelégtelenség könnyen dekompenzálódhat, de akut szívelégtelenség kardiológiai kórelőzmény nélkül is felléphet.

A krónikus szívelégtelenség evidenciákon alapuló kezelésének célja a szív működésének javítása, a betegség progressziójának lassítása és a tünetek enyhítése. A jelenlegi gyógyszeres terápia elsősorban a szív terhelésének csökkentésére irányul. Az angiotenzin-konvertáló enzim gátlók (ACE-I), az angiotenzin II receptor blokkolók (ARB) és a mineralokortikoid receptor blokkolók a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer befolyásolásával csökkentik a vérnyomást és fokozzák a diurézist. Az ARB-kal kombinációban alkalmazott neprilizin-gátlók a nátriuretikus peptid lebontásának gátlásával segítik elő a nátrium- és vízkiválasztást, csökkentve a szívben a falfeszülést. A béta-blokkolók negatív inotróp és kronotróp hatásuk révén mérséklik a szív terhelését. Az eredetileg antidiabetikumként használt SGLT2-gátlók, számos kedvező anyagcserehatásuk mellett ozmotikus diurézist idéznek elő, amivel a folyadékretenció mértékét csökkentik.

Az akut szívelégtelenség gyógyszeres kezelésének alapját a vazodilatátorok és a diuretikumok képezik. Alacsony vérnyomás esetén azonban a perctérfogat fenntartásához pozitív inotróp szerek és vazopresszorok alkalmazása lehet szükséges. Ezek rövid távon stabilizálhatják a beteg állapotát, de fokozzák a szív oxigénigényét, növelik az aritmiák előfordulását és a perifériás vazokonstrikció révén ronthatják a szöveti oxigenizációt, ami hosszú távon kedvezőtlen hatással lehet a túlélésre.

Bár a szívelégtelenség jelenlegi terápiás megközelítései jelentős előrelépést hoztak a tünetek enyhítésében és a túlélés javításában, egyre nyilvánvalóbb, hogy a szívsejtek energetikai állapotának – különösen a mitokondriális funkciók – célzott javítása alapvető fontosságú lehet a betegség progressziójának megfékezésében.

Mitokondriális dinamika

A mitokondriumok a sejtek energiatermelésének fő forrásai. A felnőtt miokardiumban az ATP termelés főként a zsírsavak, kisebb részben a glükóz lebontásából származó redukált koenzimek oxidációján keresztül, oxidatív foszforiláció útján történik. A folyamatosan dolgozó szív több energiát fogyaszt, mint bármely más szerv, hogy ezt biztosítani lehessen, a szívizomsejtek tömegének 25-35%-át mitokondriumok alkotják. A mitokondriumok az energiatermelés mellett fontos szerepet játszanak a kalcium anyagcserében, a programozott sejthalál szabályozásában, az oxigén szabadgyökök termelésében és semlegesítésében, valamint számos jelátviteli útvonal modulálásában is. A szívizomsejtekben a mitokondriumok összetett hálózatos rendszerben helyezkednek el, ami a sejt energiaszükségleteihez alkalmazkodva kifinomult szabályozás révén állandóan változik. A fúziós és hasadási (fissziós) folyamatok közti dinamikus egyensúly irányítja a mitokondriumok sejten belüli eloszlását, a sérült mitokondriumrészek eltávolítását és szerepet játszik az apoptózisban. Összességében a mitokondriális dinamika segít a sejt egészségének fenntartásában és a változó élettani körülményekre való megfelelő reagálásban egyaránt.

A fisszió fő szabályozója a sejtplazmában inaktív formában előforduló dinaminszerű GTP-áz fehérje, a DRP1. Aktivációját követően a mitokondriumok külső membránjára toborozódik, gyűrűszerű struktúrát képezve körülöleli a mitokondriumot, majd konstriktiót hoz létre, elősegítve a lefűződést és a szétválást. A DRP1 toborzásában és kötődésében a külső membránban elhelyezkedő partnerfehérjék (pl. MFF, MiD49 és MiD51) játszanak fontos szerepet. A Fis1 fehérje közvetett mechanizmusokon keresztül, alternatív útvonalak révén befolyásolja a mitokondriumok szétválását.

A Mfn1 és Mfn2 a mitokondriumok külső membránjában helyezkednek el, és homo- ill. heterodimerek képződésével teszik lehetővé az egymással érintkező mitokondriumok külső membránjának fúzióját. A mitokondriumok összeolvadásáért felelős másik fehérje a GTP-áz családba tartozó OPA1 (optikus atrofia fehérje 1), melynek különböző izoformái eltérő mértékben befolyásolják a fúziós-fissziós folyamatokat. Hosszú formája, az L-OPA1 a mitokondriumok belső membránjához kötődik, hozzájárul a fúzióhoz, segít megőrizni a membránintegritást, szerepet játszik a mitokondriumok krisztastruktúrájának fenntartásában és gátolja a pórusképződést. Stresszhelyzetre fellépő membránpotenciál csökkenés hatására egy mitokondriális metallopeptidáz, az OMA1, az L-OPA1-t rövid formává (S-OPA1) hasítja. Az S-OPA gátolja a fúziót, emellett szerepe van a mitofágiában is, segítve a károsodott

mitokondriumok eliminációját. A belső membránban elhelyezkedő ATP függő metalloproteáz, az YME1L1 konstitutívan aktív módon hasítja az L-OPA-t, ezzel finomhangolja annak aktivitását, és egyensúlyt teremtve a fúzió és a fragmentáció között, hozzájárulva a mitokondriális hálózat stabilitásának fenntartásához.

A sejt egészséges működésének fenntartása céljából a sérült mitokondriumok mitofágia révén eliminálódnak. A mitofágia számos jelátviteli úton szabályozódik, melyek közül a legismertebbek a PINK1-Parkin és BNIP3 útvonal.

A fúziós-fissziós folyamatok és a mitofágia szabályozási zavarai rontják a mitokondriumok működésének hatékonyságát, ezáltal szerepet játszanak olyan kardiovaszkuláris kórállapotok kialakulásában és progressziójában, mint az iszkémiás szívbetegség, a kardiomiopátiák és a szívelégtelenség. A mitokondriális dinamika megértése és befolyásolása egy lehetséges új, ígéretes terápiás célpontot jelenthet a szív- érrendszeri betegségek kezelésében.

Megfigyelték, hogy szívelégtelenségben a kardiomiociták mitokondriális hálózata megbomlik, a dinamika a fisszió irányába tolódik. A túlzott hasadás következtében a mitokondriális belső membrán stabilitása sérül, ami a membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) csökkenéséhez vezet. Ez a mitokondriumok funkciójának romlásával jár, ami az ATP termelésnek elégtelenségét, a kreatin-foszfát/ATP arány csökkenését, az elektrontranszportlánc működésének károsodását, fokozott szabadgyökképződést és az intracelluláris kalciumszint növekedését eredményezi.

A kezdeti kutatások a hasadási folyamatok gátlásával próbálták a membránpotenciálcsökkenést, ezáltal a mitokondriális funkcióromlást megakadályozni, de a következményes mitofágia gátlás a sérült mitokondriumok felszaporodásával járt, ami nem feltétlenül járt hosszútávú előnyökkel. Ezért a krónikus stressz szcenáriókban a hasadásgátlás helyett a fúzió elősegítése és a membránszerkezet stabilizálása került előtérbe.

Számos genetikailag módosított állatmodellt fejlesztettek ki az OPA1 fehérje hatásainak tanulmányozására. Az OPA1 KO mutáció újszülött egerekben halálhoz vezetett, ezért egy indukálható OPA1 knock-out modellt is létrehoztak. Ezek az állatok a korai öregedés jeleit mutatták, és az indukciót követő 3 hónapon belül elpusztultak. X kromoszóma célzott Opa1 transzgenezis alkalmazásával mérsékelt OPA1 overexpressziót tudtak indukálni minden sejtben. Ezek az egerek termékenyek és normális élettartamúak voltak, és ez a mutáció előnyösnek bizonyult egyes mitokondriális betegségmodellekben.

Az általunk alkalmazott modellben olyan heterozigóta knock-in egereket használtunk, amelyekbe az Opa1 gént kódoló szekvencia Δ S1 mutáns változatát transzfektáltuk. Ezek az egerek a vad típusú OPA1 mellett az OPA1 fehérje Δ S1 mutáns változatát is expresszálják, amit a stressz okozta mitokondriális membránpotenciál-csökkenés hatására aktiválódó OMA1 nem tud hasítani. A konstitutívan aktív YME1L1 S2 hasítási helyét a mutáció nem érinti, így a normál működéshez, beleértve a hasadásindukciót és a chaperonfunkciókhoz szükséges S-OPA1 szint is fenntartható.

Pozitív inotróp szerek

A pozitív inotróp szerek fokozzák a szívizom összehúzódásának erejét, növelik a perctérfogatot és javítják a szisztémás keringést. Hosszú távú alkalmazásukat korlátozza, hogy fokozzák a miokardium oxigénigényét, tachycardiát és malignus ritmuszavart válthatnak ki és elősegíthetik a szívizom kimerülését. Különösen a szimpatomimetikumoknál figyelték meg, hogy alkalmazásuk emeli a mortalitást. Ezért használatuk döntően az akut, kardiogén sokkal járó állapotokra korlátozódik, amikor megfelelő folyadékstátusz ellenére a szisztolés vérnyomás 90 Hgmm alatt marad, illetve hipoperfúzióra utaló tünetek vannak.

A 20. század második felében a dopamint széles körben alkalmazták az akut szívelégtelenség kezelésében. Alacsony dózisban az erek falában lévő D1 receptorok aktiválásával értágulatot okoz csökkentve a vérnyomást. Közepes dózisban a szív béta-1-adrenerg-receptorainak stimulálásával jön létre pozitív inotróp és kronotróp hatása. Magas dózisban az erek α -adrenerg receptorain keresztül érszűkítő (vazokonstriktív) hatás lép fel, ezáltal a vérnyomás emelkedik. A korszerűbb gyógyszerek megjelenésével háttérbe szorult, alkalmazása ma már tiszta kardiogén sokkban nem is javasolt.

Jelenleg is használt szintetikus katekolamin a dobutamin. Elsősorban a miokardium béta-1 receptorait aktiválja, ennek hatására emelkedik az intracelluláris cAMP szint, ami fokozza a kalciumbeáramlást, így növekszik a szívösszehúzódás ereje. Mérsékelten a béta-2 adrenerg receptorokat is stimulálja, kisfokú értágulatot okoz csökkentve a perifériás ellenállást. Szemben a dopaminnal az alfa-1 receptorokra csak minimálisan hat, így elkerülhető a túlzott vazokonstriktáció. Alkalmazásának a tachycardia, a ritmuszavarok megnövekedett kockázata és a tolerancia kialakulása szab határt.

Az 1990-es években kifejlesztett levoszimendán a troponin C-hez kötődve fokozza annak kalcium kötő képességét, ezáltal elősegíti az aktin és miozin közötti interakciót. Így a szívizom összehúzódásának erejét az intracelluláris kalciumszint emelése és az oxigénfogyasztás növelése nélkül fokozza. További előnye, hogy az erekben lévő ATP-érzékeny kálium(K)-csatornák aktiválása értágító hatású, amely a perifériás érellenállás mérséklésével csökkenti a szív utóterhelését. Emellett a mitokondriális ATP-függő K⁺-csatornák megnyitása sejtvédő hatással bírhat, ez is hozzájárulhat a szer pleiotróp hatásaihoz. Nagy dózisban foszfodiészteráz-III-gátló tulajdonsága is van, de ennek a terápiás adagban nincs jelentősége. A szervezetben hamar lebomlik, ennek ellenére a hatástartama elnyújtott, mivel 5-10%-a a májban aktív OR-1896 metabolittá alakul. Ez a levoszimendánhoz hasonló farmakológiai hatásokat fejt ki, de rendkívül hosszú, 70-80 órás felezési idővel rendelkezik. Ezáltal tartós pozitív inotróp és vazodilatátor hatást biztosít, így a hemodinamikai és tüneti javulás a kezelést követően több napon át fennmaradhat. Alkalmazását vérnyomáscsökkentő hatása korlátozza.

Az omecamtiv mecarbil egy új generációs pozitív inotróp csoport első képviselője, mely szelektíven stimulálja a szívizomban a miozint, stabilizálja az aktin és miozin közötti kereszthidakat, ezáltal növeli a szisztole erejét és idejét. Hatását az intracelluláris cAMP és kalcium szinttől függetlenül éri el, így a szisztolés funkció anélkül javul, hogy a szívizom oxigénfogyasztása növekedne. A GALACTIC-HF vizsgálat eredményei alapján mérsékelt javulást okozott a jelentősen csökkent ejekciós frakcióval rendelkező szívelégtelen betegeknek, de nem volt szignifikáns különbség a túlélésben a placebohoz képest, így az alkalmazási engedélyt nem kapta meg. A lehetséges mellékhatásokban a meghosszabbodott szisztolés idő és az ebből adódó miokardiális vérellátási zavar játszhatott szerepet.

Sokkal ígéretesebb, új, kísérleti stádiumban lévő pozitív inotróp és lusitrop szer az isztaroxim. Egyrészt a Na⁺/K⁺-ATP-áz gátlásával közvetve növeli az intracelluláris kalciumszintet, fokozva a szívizom kontraktilitását. Másrészt serkenti a SERCA2a enzimet, hatékonyabb lesz a kalcium visszavétele a szarkoplazmatikus retikulumba, így a relaxáció támogatásával a diasztolés funkció javulásához is hozzájárul. Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy az isztaroxim mind a szisztolés, mind a diasztolés szívfunctiót kedvezően befolyásolta anélkül, hogy növelte volna a ritmuszavarok kockázatát.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban a fokozottan expresszáldó OPA1 fehérje kardiális hatásait tanulmányoztuk. A genetikailag módosított, OPA1-et túltermelő egerek életkorral bekövetkező szívfunkcióváltozását kisállat echokardiográfiás vizsgálattal követtük. A funkcionális eltéréseket szövettani vizsgálattal, a mitokondriumok ultrastrukturális feltérképezésével és a mitokondriális dinamikában résztvevő fehérjék mennyiségi változásának kimutatásával próbáltuk megmagyarázni. Emellett törekedtünk arra, hogy a megfigyelt változásokat a mitokondriumok hálózati struktúrájának, működésének analizálásával alátámasszuk.

Másik célunk az volt, hogy a pozitív inotróp szerek mitokondriumműködést módosító hatását tanulmányozzuk. H9C2 patkány kardiomioblaszt eredetű sejteken kívántuk vizsgálni, hogy a dopamin, dobutamin, levoszimendán, OR-1896, omecantiv mecarbil és isztaroxim hogyan változtatja meg a sejttúlélést és a mitokondriumok légzési hatékonyságát, valamint a levoszimendán és aktív metabolitja, az OR-1896 hogyan befolyásolja a mitokondriális membránpotenciált. A feltárt eltérések alapján próbáltunk lehetséges magyarázatot szolgáltatni a pozitív inotróp szerek ellentmondásos hatására.

MÓDSZEREK

Állatmodell

Kísérleteinkben olyan knock-in egereket használtunk, melyek DNS-ébe az Opa1 génszekvencia Δ S1 mutáns változatát transzfektálták PiggyBac transzpozon génexpressziós vektor segítségével. Ebből a mutáns DNS szakaszból hiányzik az S1 hasítási helyet kódoló szekvencia. Az így létrehozott egerek a normál OPA1 fehérje mellett egy mutáns OPA1 változatot is expresszálnak, amit az OMA1 proteáz nem tud hasítani. Az állományt heterozigóta formában tartottuk fenn, hogy mérsékeljük a túlzott OPA hatás következtében fellépő esetleges károsodásokat. Kontrollként a transzgenikus állatok vad típusú alomtársait használtuk. 11 hetes OPA1 transzgenikus egerekkel (n=10) és vad típusú alomtársaikkal (n=12) végeztük a kísérleteket. 11 és 36 hetes korban echokardiográfiát és vérnyomásmérést végeztünk. A kísérleti időszak végén az állatokat inhalációs altatásban leöltük, a plazma BNP szint ELISA módszerrel való meghatározásához közvetlenül a szívből vért vettünk. A szívről leválasztottuk a pitvarokat és a nagyereket, megmértük a kamrák súlyát, majd a kamrákat a szövettani vizsgálatokhoz 6%-os formalinban fixáltuk, illetve a Western blot analízishez a mintákat lefagyasztottuk. A tüdőket lefagyasztottuk a nedves tüdő/száraz tüdő arány meghatározásához. Az intersticiális kollagénlerakódás meghatározására Masson-féle trikróm festést alkalmaztunk, a szívizom-hipertrófia markereként a kardiomiociták sejtátmérőjének mérésére a metszeteket Picrosirius vörössel festettük. Az oxidatív károsodás mértékének meghatározására immunhisztokémiai festést végeztünk, az oxidatív fehérjekárosodást monoklonális anti-nitrotyrosin antitesttel, a DNS-károsodást anti-8-oxoguanin antitesttel vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópos elemzéshez 36 hetes egerek szívét az aortagyökön keresztül retrográd módon perfundáltuk, a szíveket fixáltuk, beágyaztuk, ultramikrotómmal metszeteket készítettünk, a metszetekről JEM 1200EX-II elektronmikroszkóppal 12000-szeres és 25000-szeres nagyítással készítettünk felvételeket. A mitokondriális dinamikában szerepet játszó fehérjék expressziójának változását Western blottal vizsgáltuk. A mitokondriális DNS kópiaszám meghatározását bal kamrafali mintából GenElute™ Mammalian DNA Miniprep kit segítségével határoztuk meg.

Sejtmodell

Neonatális kardiomiocita sejtenyészet

A primer dobogó szívizomsejteket 1-3 napos újszülött OPA1 transzgenikus egerekből és vad típusú alomtársaikból izoláltuk. A sejteket 2×10^4 sűrűséggel 24 lyukú üvegaljű lemezre vagy 4×10^4 sejt/lyuk sűrűségben XFp Miniplate lemezekre szélesztettük. Az így izolált szívizomsejteket steril körülmények között, 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, telített páratartalmú atmoszférán tenyésztettük. 2-3 naponta cseréltük a médiumot. A mitokondriális fragmentáció vizsgálatát MitoTracker Red CMXRos festést követően fluoreszcens mikroszkóppal végeztük 60x-os nagyítással, a mitokondriális morfológia részletes kvantifikációs elemzéséhez az ImageJ alapú Mitochondria Network Analysis (MiNA) segédprogramot használtunk. A mitokondriális membránpotenciál méréséhez JC-1 festést alkalmaztunk, a fluoreszcens mikroszkóppal készült képeket ImageJ szoftver segítségével elemeztük. A sejtek oxigénfogyasztási rátáját Agilent Seahorse Extracellular Flux (XFp) Analyzer segítségével határoztuk meg, az alkalmazási előírat alapján.

H9C2 sejtenyészet

A H9C2 patkány kardiomioblaszt sejtvonalat a European Collection of Cell Culture-től (Salisbury, Egyesült Királyság) szereztük be. A sejteket 37 °C-on, párasított, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférán, steril körülmények között tenyésztettük, 3–4 napos időközönként, 70–80%-os konfluencia elérésekor passzáltuk 1:3 arányban. A kísérlet napján a sejteket PBS-sel mostuk, majd a megadott koncentrációjú pozitív inotróp szert tartalmazó médiummal 2 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, párasított, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférán. A sejttúlélést MTT teszttel, a mitokondriális funkciót Agilent Seahorse Extracellular Flux (XFp) Analyzer segítségével a mitokondriális membránpotenciál változást JC-1 vizsgálattal határoztuk meg.

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést az SPSS for Windows 26.0 verziójával végeztük. Minden adatot az ismételt mérések átlaga $\pm$ az átlag standard hibája (SEM) formában fejeztünk ki. A két csoport átlagértékeinek összehasonlítására Student t-tesztet alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az OPA1 transzgenikus fenotípus hatása a testméretekre, szisztolés vérnyomásra, BNP szintre és a szívultrahangos paraméterekre

A biometriai paraméterek nem különböztek szignifikánsan a csoportok között sem a vizsgálat elején, sem a végén. Hasonlóképpen nem volt szignifikáns eltérés sem szisztolés, vérnyomásértékekben sem a szérumban BNP koncentrációjában a két csoport között. A vizsgálat kezdetén a bal kamrai végdiasztolés térfogat szignifikánsan magasabb volt a transzgenikus állatokban a vad típusú egerekhez képest ($p < 0,05$ TG^{START} vs. WT^{START}), ez a különbség a vizsgálati periódus végére eltűnt (1. táblázat). A 36 hetes transzgenikus egerek ejekciós frakciójában szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kiindulási értékhez képest ($p < 0,01$; TG^{END} vs. TG^{START}). Ezzel szemben a vad típusú állatok esetében a szisztolés balkamra-funkcióban nem volt kimutatható statisztikailag jelentős változás. Az állatok növekedésével természetesen bekövetkező, fiziológias paraméterváltozásokat nem vettük figyelembe.

1. táblázat Az OPA1 transzgenikus fenotípus hatása az echokardiográfiás paraméterekre az öregedés során. LVIDd: végdiasztolés balkamra üregi átmérő; LVIDs: végszisztolés balkamra belső átmérő; LVEDV: balkamra végdiasztolés térfogat; LVESV: balkamra végszisztolés térfogat; LV MASS: balkamra számított tömege; EF: ejekciós frakció; E: mitrális csúcssebesség a korai beáramlás során; A: mitrális csúcssebesség a késői beáramlás során; E': korai diasztolés mitrális anulus csúcssebesség; WT^{START} : vad típusú alomtársak 11 hetes korban, WT^{END} : vad típusú alomtársak 36 hetes korban; TG^{START} : OPA1 transzgenikus egerek 11 hetes korban, TG^{END} : transzgenikus egerek 36 hetes korban. * $p < 0,05$ vs. WT^{START} , ** $p < 0,01$ vs. TG^{START} . A feltüntetett értékek átlagok $\pm$ SEM

	WT^{START} (n=12)	WT^{END} (n=12)	TG^{START} (n=10)	TG^{END} (n=10)
LVIDd (mm)	$4,07 \pm 0,12$	$4,29 \pm 0,11$	$4,35 \pm 0,17$	$4,29 \pm 0,17$
LVIDs (mm)	$2,99 \pm 0,14$	$3,19 \pm 0,18$	$3,02 \pm 0,15$	$3,29 \pm 0,19$
LVEDV (μ l)	$65,82 \pm 4,57$	$86,22 \pm 5,17$	$89,03 \pm 8,02^*$	$90,58 \pm 8,27$
LVESV (μ l)	$30,95 \pm 3,02$	$40,74 \pm 4,38$	$37,49 \pm 4,27$	$49,26 \pm 6,86$
LV MASS (mg)	$110,97 \pm 4,16$	$156,56 \pm 10,39$	$136,94 \pm 13,33$	$159,94 \pm 15,62$
EF (%)	$57,23 \pm 3,35$	$51,94 \pm 3,04$	$58,6 \pm 2,59$	$44,69 \pm 3,56^{**}$
E/A	$1,75 \pm 0,08$	$2,48 \pm 0,45$	$2,02 \pm 0,13$	$2,03 \pm 0,17$
E/E'	$30,21 \pm 2,08$	$27,63 \pm 2,65$	$28,69 \pm 4,92$	$36,72 \pm 4,93$

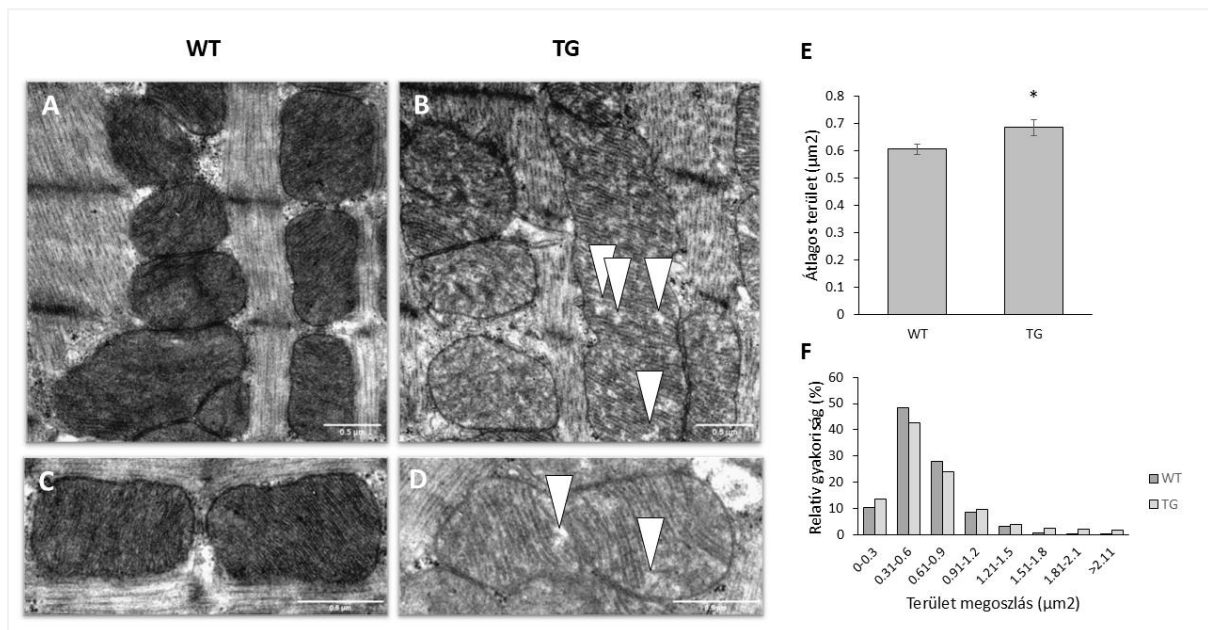
Az OPA1 gén fokozott expressziójának hatása az intersticiális kollagén lerakódásra, a szívizomsejtek átmérőjére és fehérje- és DNS-oxidációjára

A bal kamrai fibrózis mértékének nyomon követésére a 36 hetes állatok szív mintáin Masson-féle trikrómfestést alkalmaztunk, pozitív kontrollként 15 hónapos vad típusú egerekből származó szív mintákat használtunk. Mind a transzgenikus, mind a vad típusú egerekben csupán kis mennyiségű intersticiális kollagénlerakódás volt megfigyelhető, a két csoport között nem

mutatkozott szignifikáns különbség (WT: $12,99 \pm 0,70\%$ vs. TG: $11,92 \pm 0,98\%$). A kardiomiociták átmérőjének meghatározásához 36 hetes egerek bal kamrájából származó Picrosirius-vörössel festett szövettani metszeteket használtunk. Az elemzés alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú és a transzgenikus egerek kardiomiocitátmérő között (WT: $18,45 \pm 0,18 \mu\text{m}$ vs. TG: $18,93 \pm 0,5 \mu\text{m}$). Az oxidatív stressz markereként immunhisztokémiai módszerrel a nitro tirozin és 8-oxoguanin képződést vizsgáltuk a 36 hetes egerek szívének bal kamrájából készült metszetein. Sem a fehérjék oxidatív károsodására specifikus anti-nitro tirozin festés (WT: $17,8 \pm 2,7\%$, TG: $16,4 \pm 1,4\%$), sem a DNS oxidatív károsodását jelző anti-8-oxoguanin festés (WT: $6,7 \pm 0,4\%$, TG: $6,5 \pm 0,5\%$) nem mutatott különbséget a vad típusú és az OPA1 transzgenikus csoport között.

Elektronmikroszkópos változások

Az interfibrilláris mitokondriumok ultrastrukturális állapotának felmérése céljából 36 hetes egerek mintáiból a szívmizomrostok hosszanti metszeteit elektronmikroszkóppal értékeltük (1. ábra).



1. ábra. A fokozott OPA1 expresszió hatása a szívmizom interfibrilláris mitokondriumaira 36 hetes korban. Vad típusú (A) és OPA1 transzgenikus (B) egerek interfibrilláris mitokondriumainak reprezentatív elektronmikroszkópos felvétele (12000-szeres nagyítás, skála: $0,5 \mu\text{m}$). Interfibrilláris mitokondriumok ultrastrukturája vad típusú (C) és transzgenikus (D) állatok miokardiumában (25000-szeres nagyítás, skála: $0,5 \mu\text{m}$). A mért mitokondriális területek relatív gyakorisága az egyes intervallumban (F). WT: vad típus, TG: OPA1 transzgenikus egerek. Az adatok átlag $\pm$ SEM értékben vannak kifejezve. * $p < 0,05$ vs. WT, $n=6$.

A mitokondriumok területét lemértük (csoportonként 500 db), a mért értékek relatív gyakoriságát $0,3\ \mu\text{m}^2$ -es intervallumokban határoztuk meg. Mindkét csoportban a mitokondriumterületek túlnyomó része a $0,3$ és $0,6\ \mu\text{m}^2$ közötti intervallumba esett (WT: 48,4% vs. TG: 42,8%). A transzgenikus csoportban azonban a mitokondriumok mérete heterogénebb volt; mind a $0,3\ \mu\text{m}^2$ alatti (WT: 10,4% vs. TG: 13,6%), mind a $0,9\ \mu\text{m}^2$ feletti tartományban (WT: 13,2% vs. TG: 19,6%) nagyobb arányban találtunk mitokondriumokat, mint a vad típusban (1. F ábra). Továbbá a transzgenikus állatok átlagos mitokondriális területe valamivel nagyobb volt, mint a vad típusú állatokban (WT: $0,606\ \mu\text{m}^2$ vs. TG: $0,684\ \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) (1. E ábra). A transzgenikus csoportban a mitokondriumok ultrastruktúrájában is észleltünk mérsékelt mértékű károsodást, melyet kisebb, vakuolumszerű interkrisztális tágulatok, a krisztaszerkezet diszkrét rendezetlensége, valamint a mitokondriális mátrix csökkent denzitása jellemezte. (1. D ábra).

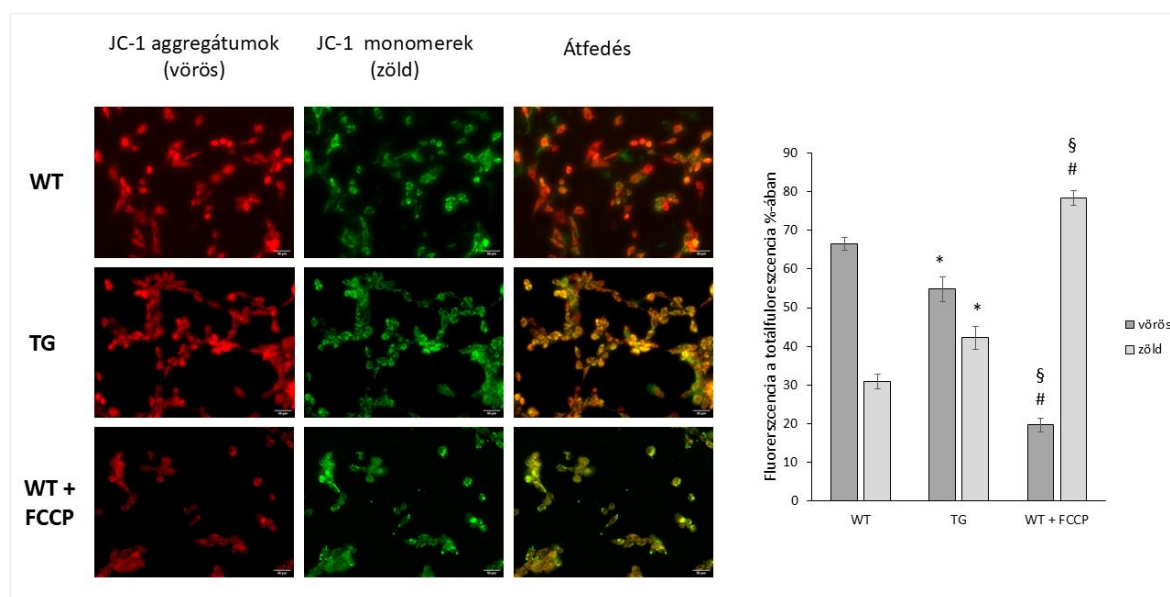
A mitokondriális hálózat morfológiai változásai

A mitokondriális struktúrák kvantitatív elemzését újszülött egerekből izolált szívizomsejteken végeztük az ImageJ szoftver Mitochondria Network Analysis (MiNA) segédprogramjának alkalmazásával. Bár az elektronmikroszkópos vizsgálat során a transzgenikus sejtekben kissé nagyobb átlagos mitokondriális területet figyeltünk meg, ez a különbség nem tükröződött a mitokondriális hálózat morfológiai paramétereiben: a hálózat elágazásainak hossza a vad típusú és a transzgenikus állatok sejtei között nem mutatott szignifikáns eltérést.

Az OPA1 transzgenikus egerekből származó primer kardiomiociták membránpotenciál-változásai

A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\Psi$) JC-1-gyel, egy membránpermeabilis, feszültségérzékeny fluoreszcens mitokondriális festékkel vizsgáltuk. A JC-1 vörös fluoreszcenciát bocsát ki, ha a mitokondriális membránpotenciál magas (aggregált festék), míg a depolarizált mitokondriumok esetén zöld fluoreszcenciát mutat (monomer festék). Megfigyeltük, hogy a mitokondriális membránpotenciál szignifikánsan különbözött a csoportok között. A transzgenikus primer szívizomsejtekben erősebb zöld és gyengébb vörös fluoreszcenciát mutattunk ki, mint a vad típusú kardiomiocitákban ($p < 0,01$). A módszer

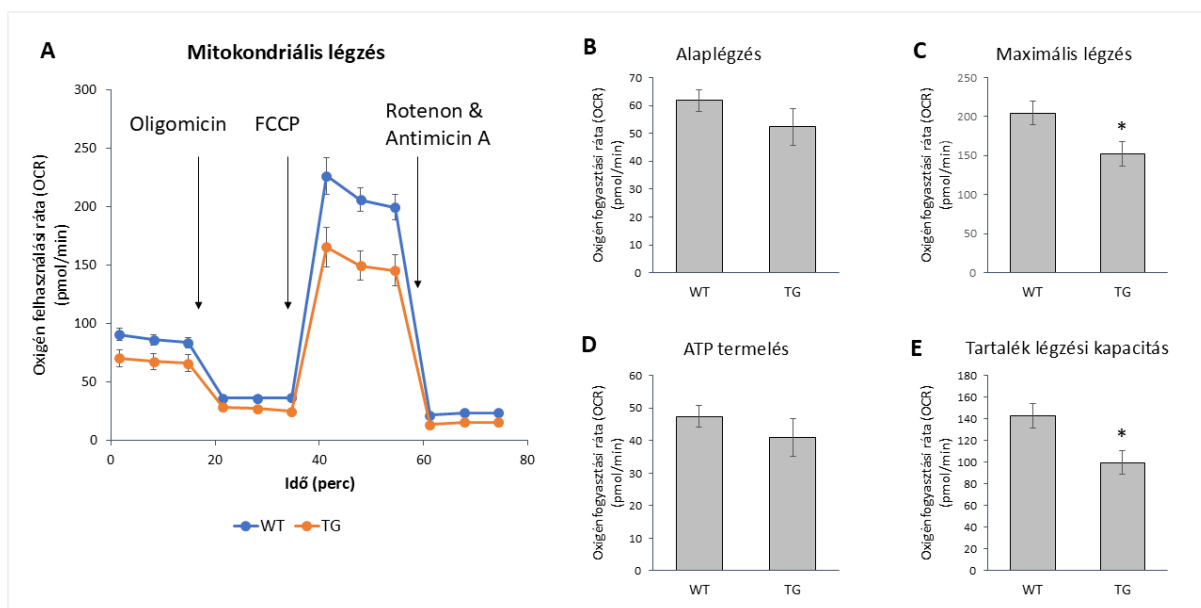
validálásaként alkalmazott FCCP kezelés szignifikánsan erősebb zöld és gyengébb vörös fluoreszcenciát eredményezett vad típusú sejtekben (2. ábra).



2. ábra. A fokozott OPA1 expresszió hatása a mitokondriális membránpotenciálra primer izolált egér szívizomsejteken. Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek JC-1 festést követően, vörös és zöld csatornát alkalmazva (A), skála: 50 μ m, 40-szeres nagyítás. Mitokondriumpolarizáció kvantitatív elemzése (B). Az adatok négy független mérés átlaga $\pm$ SEM, n=6. WT: vad típusú kardiomiociták, TG: OPA1 transzgenikus egerekből származó szívizomsejtek.

Az OPA1 transzgén expressziójának hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra és az energiametabolizmusra

Kardiomiocitákat izoláltunk újszülött transzgenikus állatokból és vad típusú alomtársaikból. A mitokondriális energiametabolizmust és a mitokondriális légzési lánc funkcióját Agilent Seahorse XFp Analyser rendszerrel, Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress alkalmazásával határoztuk meg (3. ábra). Megfigyeltük, hogy a transzgenikus állatokból származó sejtek oxigénfogyasztási rátája alacsonyabb volt a vad típusú sejtekhez képest, ami az energiametabolizmus károsodására utalt. Ez a csökkenés azonban csak a maximális légzés (WT: $204,4 \pm 15,05$ pmol/perc vs. TG: $150,2 \pm 16,22$ pmol/perc, $p < 0,05$) és a tartalék légzési kapacitás (WT: $142,7 \pm 11,29$ pmol/perc vs. TG: $99,2 \pm 10,89$ pmol/perc, $p < 0,05$) esetében volt szignifikáns.



3. ábra. OPA1 transzgenikus primer izolált kardiomiociták oxigénfogyasztási rátájának változása Seahorse XFp analízátorral mérve (A). Az alaplégzés (B), a maximális légzés (C), az ATP termelés (D) és a tartalék légzési kapacitás (E) elemzése Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress alkalmazásával. WT: vad típusú kardiomiociták, TG: OPA1 transzgenikus egerekből származó primer szívizomsejtek. * $p < 0,05$ vs. WT. Az értékek átlagok $\pm$ SEM, $n=6$.

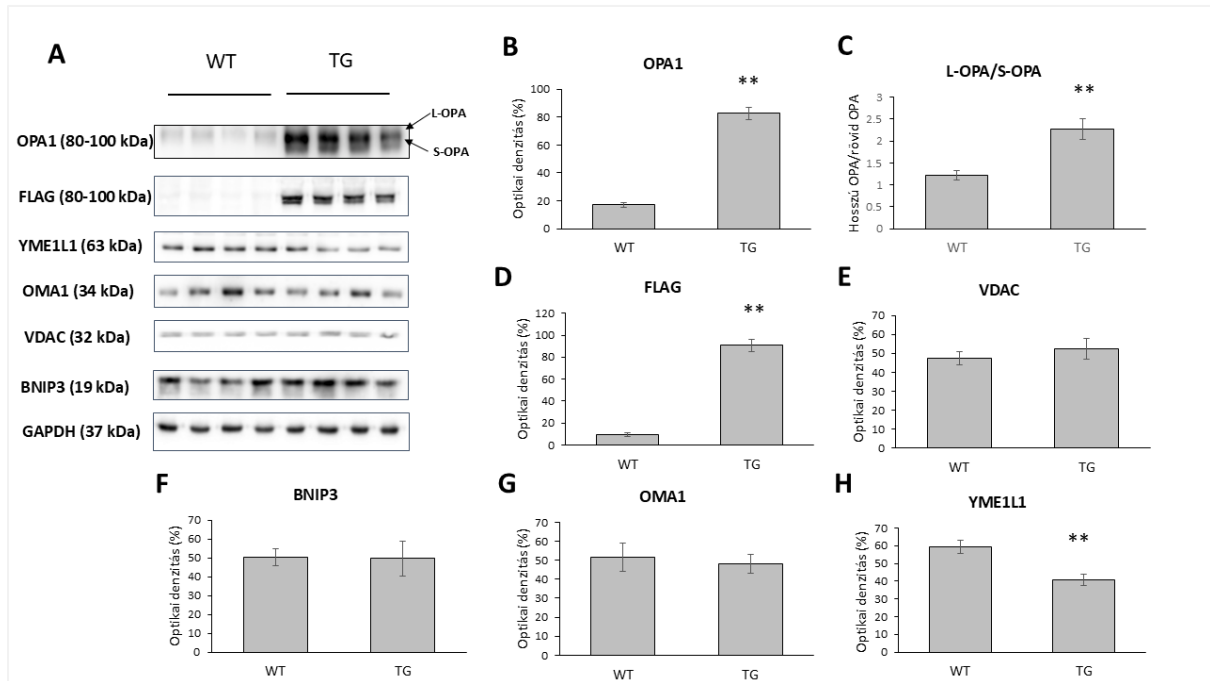
Az OPA1 gén fokozott expressziójának következményei a mtDNS kópiaszámra

Az OPA1 fokozott expressziójának a mitokondriális DNS kópiaszámára gyakorolt hatásának tanulmányozására valós idejű PCR vizsgálatokat végeztünk. A mitokondriális DNS-kópiák átlagos száma szignifikánsan nem különbözött a két csoportban.

A mitokondriális dinamikában szerepet játszó fehérjék mennyiségi változásai

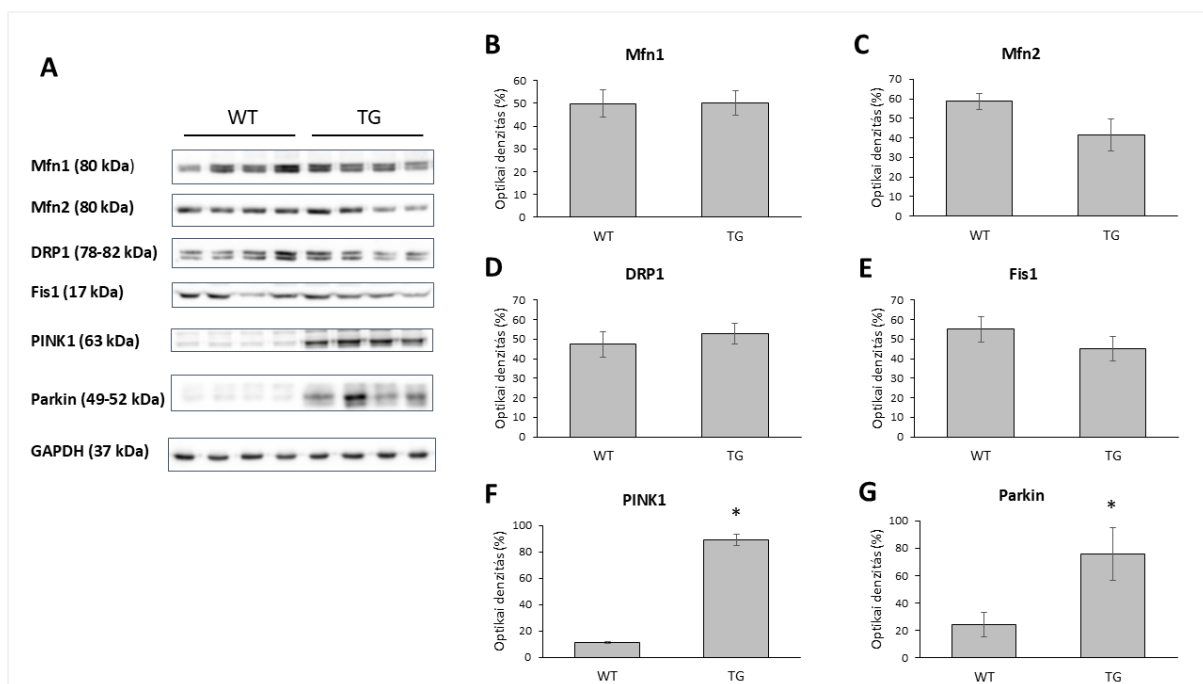
A mitokondriális dinamikában szerepet játszó fehérjék mennyiségi változásait 36 hetes egerek szívéből készített mintákon vizsgáltuk Western blot analízissel. A transzgenikus állatok OPA1 szintje szignifikánsan megnövekedett a vad típushoz képest ($p < 0,01$ vs. WT csoport; 4. B ábra). A transzgenikus csoportban mind a rövid, mind a hosszú OPA1 forma fokozottan expresszáldott, de ez a túlprodukció a hosszú forma esetén kifejezettebb volt, az L-OPA1/S-OPA1 arány pedig szignifikánsan nőtt ($p < 0,01$ vs. WT csoport; 4. C ábra). Az emelkedett OPA1-szint transzgenikus eredetét a DYKDDDDK Tag (FLAG) antitest alkalmazásával igazoltuk ($p < 0,01$ vs. WT csoport; 4. D ábra). A teljes mitokondriális tömeget jelző VDAC mennyisége nem különbözött szignifikánsan a két csoport között (4. E ábra), ahogy a

proapoptotikus mitokondriális BNIP3 szintje sem (4. F ábra). A stresszre indukálódó, S1 helyen hasító OMA1 proteáz szintje hasonló volt a két csoportban (4. ábra G), míg a konstitutívan aktív YME1L1 expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a transzgenikus állatokban ($p < 0,01$ vs. WT csoport; 4. H ábra).



4. ábra. Az OPA1, OMA1 és YME1L1 szint változásai 36 hetes egerek bal kamra mintáiban. Az OPA1, DYKDDDDK Tag (FLAG), VDAC, BNIP3, OMA1, YME1L1 reprezentatív Western blot és denzitometriás kiértékelés látható. A GAPDH-t fehérjemennyiségi kontrollként használtuk. WT: vad típusú egerek (n=8), TG: OPA1 transzgenikus egerek (n=8). Az értékek átlag $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ vs. WT

A Mfn1 esetében nem volt számottevő különbség a csoportok között, míg a Mfn2 expressziója csökkenő tendenciát mutatott a transzgenikus állatokban (5. B–C ábra). A DRP1 és Fis1 fission fehérjék szintjében nem tapasztaltunk lényeges eltérést. A mitofágiában szerepet játszó PINK1 fehérje mennyisége szignifikánsan megnőtt a vad típushoz képest ($p < 0,05$; 5. F ábra), míg a Parkin fehérje expressziójában csupán tendenciózus emelkedést figyeltünk meg (5. G ábra).



5. ábra. A mitokondriális dinamikát szabályozó fehérjék expressziójának változásai. A képen a Mfn1, Mfn2, DRP1, Fis1, PINK1, Parkin fehérjék reprezentatív Western blotjai és denzitometriai kiértékelésük látszik. GAPDH-t használtunk loading kontrollként. WT: vad típusú egerek (n=8), TG: OPA1 transzgenikus egerek (n=8). Az értékek átlag $\pm$ SEM. * $p < 0,01$ vs. WT.

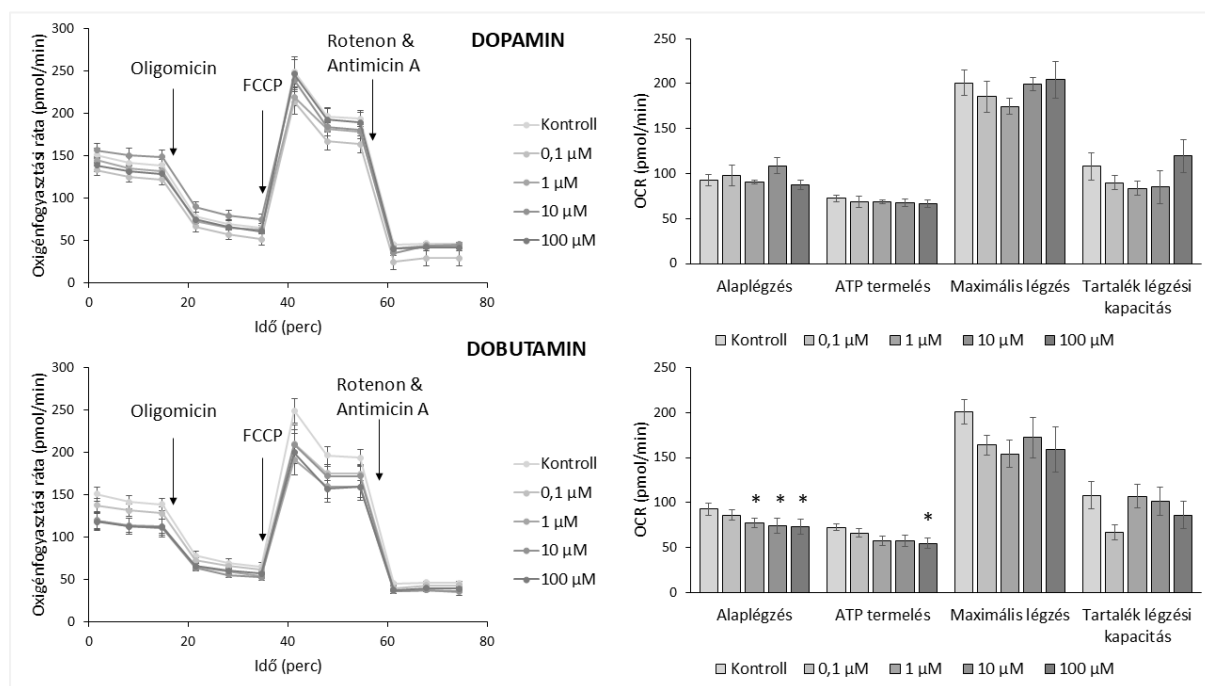
A pozitív inotróp szerek sejttúlélést befolyásoló hatása

H9C2 sejtenyészetet 2 órán keresztül 0,1-0,5-1-5-10-50-100-500-1000 $\mu\text{mol/l}$ dopamin-hidrokloriddal, dobutamin-hidrokloriddal, levoszimendánnal, OR-1896-tal, omecamtiv mecarbilla és isztaroxim-hidrokloriddal inkubáltuk. A vegyületek citotoxicitását 2 órás inkubálást követően MTT módszerrel határoztuk meg. A dopamin, dobutamin és levoszimendán 500 $\mu\text{mol/l}$ -től, az omecamtiv mecarbilla és isztaroxim-hidroklorid csak 1 mmol/l koncentrációban okozott mérhető sejtszámcsökkenést, míg a levoszimendán aktív hatóanyaga, az OR-1896 esetén még a legmagasabb 1 mmol/l-es koncentrációban sem okozott mérhető sejtpusztulást a kontrollhoz képest.

A pozitív inotróp szerek hatása a mitokondriális légzés hatékonyságára

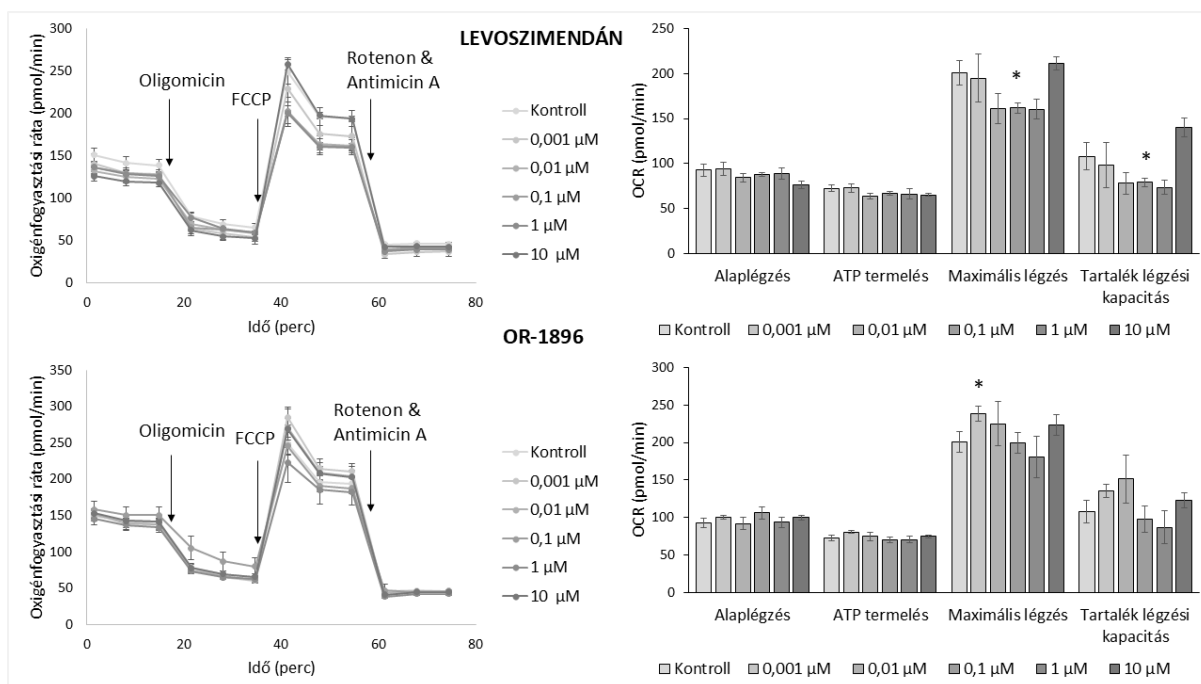
A dopamin-hidrokloridot, a dobutamin- hidrokloridot, az omecamtiv mecarbilla és az isztaroximot 0,1 – 1 – 10 – 100 – 1000 $\mu\text{mol/l}$ -es, a levoszimendánt és aktív metabolitját, az OR-1896-ot 1 – 10 – 100 nmol/l-es valamint 1 és 10 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban vizsgáltuk Agilent Seahorse XFP készülékkel, Seahorse XF Cell Mito Stress Test alkalmazásával. A

dopamin a mért koncentrációkban nem okozott szignifikáns változást a sejtlegzésben a kontrollhoz képest. Ezzel szemben a dobutaminnál az oxigénfelhasználási görbe minden mért koncentrációban a kontrollgörbe alatt futott, ez a csökkenés az alaplégzés esetén 1 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációtól, az ATP termelésnél csak 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban vált szignifikánssá (6. ábra).



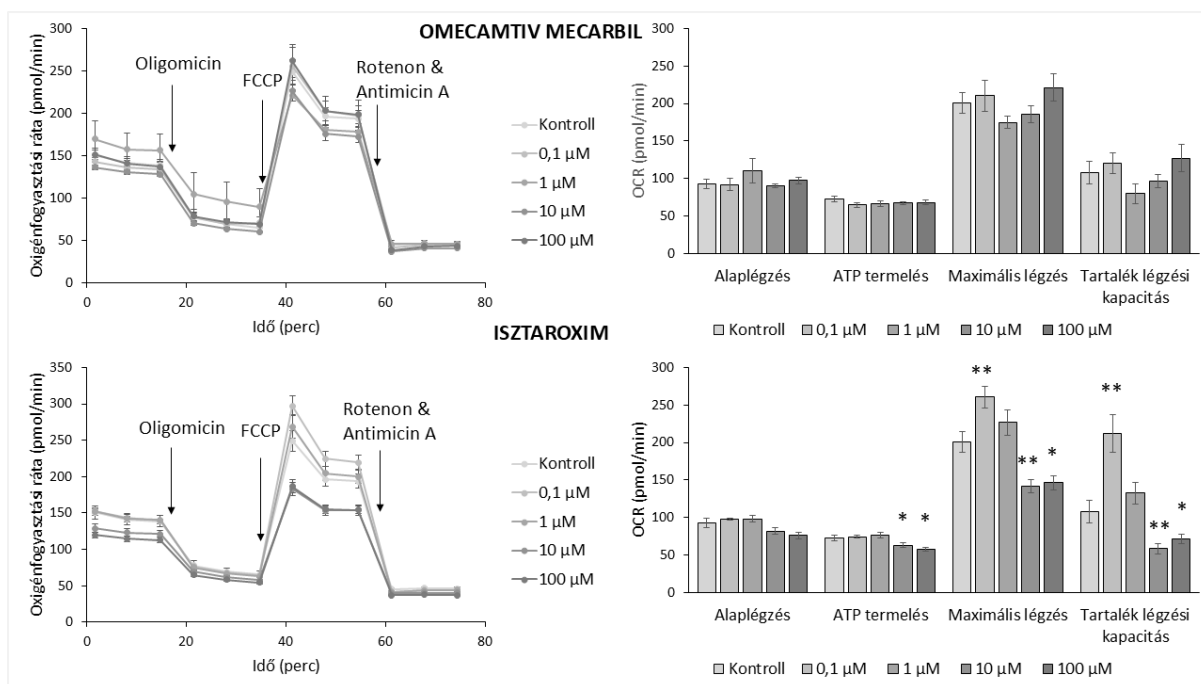
6. ábra. A dopamin és dobutamin hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra és energiaanyagcserére. 2 órás kezelést követően a H9C2 sejteket 10 μM oligomicinnel, 10 μM FCCP-vel és 5 μM rotenon/antimicin A-val kezeltük. Az adatokat Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Report Generator segítségével számítottuk ki. OCR: oxigénfogyasztási ráta. Az értékek átlag $\pm$ SEM ($n=6$). * $p<0,05$ vs., kontroll.

A levoszimendán 10 nmol/l, 100 nmol/l és 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva a sejtek oxigénfelhasználásának csökkenését eredményezte. A maximális légzés és a tartalék légzési kapacitás tekintetében a 100 nmol/l koncentráció mellett a változás szignifikáns mértékű volt, míg a 10 nmol/l és 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációk esetében csupán csökkenő tendenciát figyeltünk meg, amely nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. A levoszimendán aktív metabolitja, az OR-1896 a legalacsonyabb 1 nmol/l koncentrációban fokozta az oxigénfelhasználást, a maximális légzés szignifikánsan nőtt, de 100 nmol/l és 1 $\mu\text{mol/l}$ esetén már tendenciaszerű csökkenést tapasztaltunk a maximális légzés és a tartalék légzési kapacitás vonatkozásában. Mind a levoszimendán, mind az OR-1896 esetén a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (10 $\mu\text{mol/l}$) a kontrollhoz hasonló értékeket rögzítettünk (7. ábra).



7. ábra. A levoszimendán és aktív metabolitjának hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra és energiaanyagcserére. H9C2 sejteket 2 órán keresztül kezeltünk, majd a mitokondriális oxigénfelhasználást Seahorse XFp analizátorral mértük. Az alaplégzést, az ATP termelést, a maximális légzést és a tartalék légzési kapacitást Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Report Generator segítségével számítottuk ki. OCR: oxigénfogyasztási ráta. Az értékek átlag $\pm$ SEM (n=6). *p<0,05 vs., kontroll.

Az omecamtiv mecarbíl nem okozott jelentős változást a mitokondriális respirációban. Az isztaroxim alacsony (0,1 μ mol/l) dózisban fokozta a sejtlégzést, a maximális légzés és tartalék légzési kapacitás tekintetében volt ez a növekedés szignifikáns. Magas koncentrációban (10 és 100 μ mol/l) viszont rontotta az oxigénfelhasználást, szignifikáns csökkenést okozva az ATP szintézisben, a maximális légzésben és a tartalék légzési kapacitásban (8. ábra).



8. ábra. Az omecamtiv mecarbil és az isztaroxim hatása a mitokondriális energiametabolizmusra. 2 órás kezelést követően a H9C2 sejteket Seahorse XFP analizátorral vizsgáltuk. Oligomicin, FCC, és rotenon/antimicin A hozzáadására bekövetkező oxigénfelhasználás változás alapján Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Report Generatorral számítottuk ki az alaplégzést, ATP termelést, maximális légzést és a tartalék légzési kapacitást. OCR: oxigénfogyasztási ráta. Az értékek átlag $\pm$ SEM ($n=6$). * $p<0,05$ vs. kontroll, ** $p<0,01$ vs. kontroll.

A levoszimendán és az OR-1896 hatása a mitokondriális membránpotenciálra

A levoszimendán és aktív metabolitja, az OR-1896 mitokondriális membránpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálatára JC-1 fluoreszcens festést alkalmaztunk. A levoszimendán hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a zöld fluoreszcens monomerek aránya emelkedett volt az összes mért koncentrációban, ami alacsonyabb mitokondriális membránpotenciált jelez. Ugyanakkor ez a változás csak a legalacsonyabb, $0,001 \mu\text{M}$ koncentráció esetén bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ($p<0,05$) a kontrollcsoporthoz képest. Az aktív metabolit, OR-1896 esetében nem figyeltünk meg hasonló eltérést, egyik vizsgált koncentrációnál sem.

KONKLÚZIÓ

Ismert, hogy a szívelégtelenség kialakulását a mitokondriumok morfológiai és funkcionális eltérései kísérik. A mitokondriális dinamika a fragmentáció irányába tolódik el, a hálózati struktúra felbomlik, melyet a membránpotenciál csökkenése kísér – ez a folyamat hozzájárulhat a szívelégtelenségben megfigyelt mitokondriális diszfunkcióhoz. Ugyanakkor a fúziós folyamatok erősítése és a mitokondriális membránszerkezet stabilizálása ígéretes terápiás célpontot jelenthet.

Vizsgálatainkhoz egy transzgénikus egértörzset alkalmaztunk, amely a vad típus mellett egy olyan OPA1 fehérjeváltozatot is expresszál, amely nem tartalmazza az OMA1 hasítási helyet, ez az OPA1 mennyiségének jelentősen növekedésével jár. Az állatok szívfunkcióját kisállat-ultrahanggal követtük, és az öregedés során a transzgénikus egerekben az ejekciós frakció szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. A szisztolés működés romlása nem járt együtt fibrotikus remodellinggel vagy a kardiomiociták átmérőváltozásával, és sem a BNP-szint, sem a nedves-száraz tüdő aránya nem utalt szívelégtelenségre.

Mitokondriális hálózatelemzéssel nem találtunk eltérést a mitokondriumméretben, azonban az ultrastrukturális vizsgálatok heterogén méreteloszlást, enyhén torzult krisztaszerkezetet és csökkent mátrix elektrondenzitást jeleztek. Újszülött egerekből izolált szívizomsejtekből a membránpotenciál csökkenése és az energiametabolizmus zavara is kimutatható volt. A fehérjeanalízis során az L-OPA1 és S-OPA1 szintje egyaránt emelkedett, de az arányuk az L-OPA1 javára tolódott el. A transzgenikus eredetet FLAG-antitesttel igazoltuk. A VDAC normális szintje és a mitokondriális DNS kópiaszám elemzés bizonyítja, hogy a változások a nem a mitokondriális tömeg növekedéséből fakadnak.

Az OMA1 proteáz mennyisége nem változott, míg a konstitutívan termelődő YME1L1 szintje szignifikánsan csökkent, utalva a proteolitikus egyensúly megbomlására. Emellett a mitofágiát szabályozó PINK1 és Parkin fehérjék fokozott expressziója a károsodott mitokondriumok eliminációjára utal, míg a BNIP3 alacsony szintje nem támasztja alá kifejezett mitofágiát vagy proteasomális degradációt.

Bár az OPA1 túlexpressziójától védő hatást vártunk, ehelyett a szívfunkció romlását figyeltük meg. Ezt feltehetően az L-OPA1 túlzott mértékű membránba épülése, a fúziós/felhasadási egyensúly megbomlása és a mitokondriális funkció következményes romlása magyarázza.

A pozitív inotróp szerek mitokondriális hatásainak vizsgálatát az a felismerés motiválta, hogy noha a hagyományos pozitív inotróp szerek – mint a dobutamin vagy a dopamin – rövid távon javítják a szív pumpafunkcióját, hosszú távon paradox módon ronthatják a túlélést. Ennek hátterében mitokondriális hatásaik is állhatnak.

Kísérleteinkben a dobutamin csökkentette az alaplégzést, és nagyobb dózisban az ATP-szintézist is gátolta. A dopamin ezzel szemben nem váltott ki hasonló hatásokat, amely eltérő receptorprofiljával magyarázható. A kalciumérzékenyítő levoszimendán szintén rontotta a mitokondriális működést: csökkentette a maximális és tartalék légzési kapacitást, valamint már kis koncentrációban is membránpotenciál-csökkenést okozott.

Azonban az aktív metabolitja, az OR-1896, alacsony dózisban fokozta a maximális légzést anélkül, hogy a membránpotenciált befolyásolta volna – ez a farmakokinetikai különbségeknek és az elnyújtott hatásnak tudható be.

Az omecamtiv mecarbíl, mint első generációs miozin-aktivátor, fokozza a kontraktilitást anélkül, hogy jelentősen befolyásolná a kalcium-homeosztázist vagy növelné az oxigénfogyasztást. Eredményeink igazolták, hogy nincs számottevő hatása a mitokondriális működésre.

Ezzel szemben az isztaroxim, amely klinikai vizsgálatokban ígéretesnek bizonyult, már alacsony dózisban is javította a légzési paramétereket, de nagyobb koncentrációban negatív hatásokat mutatott, és csökkentette az ATP-termelést. Ez a dózisfüggő kettősség arra utal, hogy az isztaroxim közvetlen mitokondriális hatásokkal is rendelkezik a Na^+/K^+ -ATPáz gátlásán és a SERCA2a aktiválásán túl.

Összefoglalva, eredményeink azt sugallják, hogy a pozitív inotróp szerek túlélésre gyakorolt kedvezőtlen hatása részben a mitokondriális funkciók módosításának tudható be. Ezek az új adatok segíthetik az inotróp terápiák finomhangolását és hozzájárulhatnak a szívelégtelenség kezelésének továbbfejlesztéséhez.

EREDMÉNYEK, MEGFIGYELÉSEK

1. Megfigyeltük, hogy a transzgenikus, OPA1 fehérjét túlexpresszálo egerek szisztolés szívfunkciója az életkoruk előrehaladtával csökkent a vad típusú alomtársakéhoz képest.
2. Igazoltuk, hogy az OPA1 túlexpresszió a mitokondriumok ultrastruktúrájában változásokat idézett elő, a kriszták közötti tér vakuolumszerű kiszélesedésével és helyenként a krisztaszerkezet megszakadásával. A nagy mennyiségű OPA1 fehérje ellenére a mitokondriumok átlagos mérete csak kismértékben növekedett.
3. OPA1 túlexpresszálo egerekből izolált szívizomsejtek mitokondriumfunkciója romlott a vad típusú alomtársakból izolált sejtekhez képest. Ezt a tartalék légzési kapacitás és maximális légzés tekintetében Agilent Seahorse készülékkel igazoltuk, a mitokondriális membránpotenciál csökkenést JC-1 festéssel detektáltuk.
4. Megfigyeltük, hogy az OPA1 túlexpresszió maga után vont a OMA1/YME1L1 arány eltolódását, az YME1L1 szint szignifikáns csökkenésével, valamint detektáltuk a mitofágiában szerepet játszó PINK1 és Parkin fehérjék expressziójának növekedését.
5. Igazoltuk, hogy a dobutamin H9C2 sejtekben dózisfüggően csökkentette a mitokondriális alaplégzést, míg a dopamin szignifikánsan nem befolyásolta a mitokondriumfunkciót.
6. Megfigyeltük, hogy a levoszimendán sejttenyészetben rontotta a mitokondriumfunkciót, ami a maximális légzés és a tartalék légzési kapacitás tekintetében volt szignifikáns, ez a változás a mitokondriális membránpotenciál csökkenésben is megnyilvánult, míg az aktív metabolit OR-1986 kis dózisban javította a mitokondrium maximális légzési kapacitását és lényegesen nem befolyásolta a membránpotenciált.
7. Seahorse vizsgálat során megállapítottuk, hogy az omecamtiv mecarbil nem befolyásolja szignifikánsan a mitokondriumfunkciót.
8. Megállapítottuk, hogy az alacsony koncentrációjú isztaroxim H9C2 sejttenyészetben javította a mitokondriumfunkciót, magas dózisban rontotta azt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetemen, a Szentágothai János Kutatóközpontban és a PTE Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében végeztük 2019 és 2024 között.

Szeretném köszönetemet kifejezni programvezetőmnak, Tóth Kálmán professzor úrnak, hogy lehetőséget biztosított munkám végzéséhez. Köszönet illeti témavezetőimet, Halmosi Róbert professzor urat és Deres Lászlót, akik támogatásukkal és türelmükkel segítették elkötelezettségem kialakulását a téma iránt. Hálás vagyok munkatársaimnak, Horváth Orsolyának, Ördög Katalinnak, Völgyiné Dózsa Tímeának és Tóth Szilárdnak, akik kutatásaimban és kísérleteimben nélkülözhetetlen gyakorlati segítséget nyújtottak.

Külön köszönet illeti Gallyas Ferenc professzor urat, hogy a kísérletek nagy részét a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végezhattük, valamint a Biokémiai Intézet munkatársait, akik munkámban segítettek: Juhász Katát és Vámos Esztert a sejtes vizsgálatoknál, illetve Fekete Katalint, Bárándi Gergőt és Horváthné Szegedi Máriát az állatkísérleteknél nyújtott segítségükért.

Továbbá szeretném megköszönni az elektronmikroszkópos és szövettani képek elkészítésében nyújtott szakmai hozzájárulását Seress László professzor úrnak, Kajtár Bélának és Nyirádi Józsefnek. Végül, de nem utolsósorban, hálás vagyok családomnak, akik támogatták tanulmányaimat és a nehéz pillanatokban is türelmesek voltak.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

BRUSZT K, HORVATH O, ORDOG K, TOTH SZ, JUHASZ K, VAMOS E, FEKETE K, GALLYAS F, TOTH K, HALMOSI R, DERES L. Cardiac effects of OPA1 protein promotion in a transgenic animal model. PLOS ONE 10.1371/journal.pone.0310394 (2024)

Q1, IF: 2,9

Egyéb publikációk:

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)

Q1, IF: 7,31

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)

Q1, IF: 6,78

MAGYAR K, DERES L, EROS K, **BRUSZT K**, SERESS L, HAMAR J, HIDEK K, BALOGH A, GALLYAS F, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. A quinazoline-derivate compound with PARP inhibitory effect suppresses hypertension-induced vascular alterations in spontaneously hypertensive rats. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1842(7):935-944 (2014)

Q1, IF: 2,88

Citálható absztraktok:

BRUSZT K, HORVÁTH O, TAKÁCS-ÖRDÖG K, TÓTH SZ, VAMOS E, JUHÁSZ K, TÓTH K, DERES L, HALMOSI R. A levoszimendan és aktív metabolitjának a mitokondrium működésére kifejtett hatásainak vizsgálata. CARDIOLOGIA HUNGARICA 54: Suppl. C Paper: C260 (2024)

BRUSZT K, HORVÁTH O, ÖRDÖG K, TÓTH SZ, VÁMOS E, GALLYAS F, TÓTH K, DERES L. Hagyományos és új típusú pozitív inotróp szerek hatása a mitokondriális légzés hatékonyságára. CARDIOLOGIA HUNGARICA 53: Suppl. A Paper: A279-A279 (2023)

HORVÁTH O, ÖRDÖG K, **BRUSZT K**, TÓTH SZ, DERES L, GALLYAS F, TÓTH K, SOÓS SZ, HALMOSI R. A BGP-15 kezelés hatása a szívfunkcióra bleomycin indukálta jobb szívfél elégtelenség modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 53 : Suppl. A pp. A301-A301. (2023)

ÖRDÖG K, HORVÁTH O, TÓTH SZ, **BRUSZT K**, HABON T, KOVÁCS K, GALLYAS F, TÓTH K, DERES L, HALMOSI. A kolhicin hatásának vizsgálata pulmonális artériás hipertóniára patkány modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 53 : Suppl. A pp. A303-A303. (2023)

BRUSZT K, HORVÁTH O, ÖRDÖG K, TÓTH SZ, FEKETE K, VÁMOS E, TÓTH K, DERES L, HALMOSI R. Dopamin és dobutamin hatása a mitokondriális légzés hatékonyságára szívizomsejtekben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 52: Suppl. C: Paper: C253 (2022)

TÓTH SZ, ÖRDÖG K, HORVÁTH O, **BRUSZT K**, FEKETE K, GALLYAS F, TÓTH K, HALMOSI R, DERES L. OPA1 fehérje promóció hatása a mitokondriális dinamika folyamataira transzgen állatmodellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 52: Suppl. C: Paper: C261 (2022)

BRUSZT K, HORVÁTH O, ÖRDÖG K, TÓTH SZ, VÁMOS E, TÓTH K, DERES L, HALMOSI R. Mitokondriális légzés változásának vizsgálata dopamin és dobutamin hatására H9C2 sejtenyészetben. Magyar Haemorheológiai Társaság XXVIII., Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság, VII. Közös Kongresszusa Pécs, 2022. április 22-23. Programfüzet: 36. oldal (2022)

TÓTH SZ, ÖRDÖG K, HORVÁTH O, **BRUSZT K**, FEKETE K, GALLYAS F, TÓTH K, HALMOSI R, DERES L. OPA1 fehérje promóció kardiológiai hatásainak karakterizációja transzgen állatmodellben. Magyar Haemorheológiai Társaság XXVIII., Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság, Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság, VII. Közös Kongresszusa Pécs, 2022. április 22-23. Programfüzet: 35. oldal (2022)

ÖRDÖG K, HORVÁTH O, **BRUSZT K**, HABON T, KÁLAI T, DERES L, TÓTH K, HALMOSI R. PARP gátlás hatása oxidatív stresszben a mitokondriális biogenezisre in vitro szívizomsejt modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 51: Suppl. B Paper: B243-244 (2021)

DERES L, TÓTH SZ, **BRUSZT K**, ÖRDÖG K, HORVÁTH O, GALLYAS F, TÓTH K, HALMOSI R. OPA1 fehérje promóció kardiológiai hatásainak karakterizációja transzgén állatmodellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 51: Supp. B Paper: B274 (2021)

HORVÁTH O, ÖRDÖG K, **BRUSZT K**, DERES L, GALLYAS F, TÓTH K, HALMOSI R. A BGP-15 kezelés hatása a mitokondriális minőségkontroll folyamataira in vivo magasvérnyomás indukálta szívelégtelenség modellben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 50: Supp. D Paper: 161 (2020)

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)

HORVÁTH O, ÖRDÖG K, **BRUSZT K**, DERES L, SÜMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. A BGP-15 kezelés hatása a mitokondriális dinamikára és funkcióra élő állat modellen és sejtkultúrában. CARDIOLOGIA HUNGARICA 49: Suppl. B Paper: B23 (2019)

ÖRDÖG K, HORVÁTH O, **BRUSZT K**, HALMOSI R, TOTH K, SÜMEGI 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)

K MAGYAR, Z VAMOS, **K BRUSZT**, A BALOGH, T KALAI, K HIDEG, L SERESS, B SUMEGI, A KOLLER, R HALMOSI, K TOTH. Inhibition of Poly(ADP-ribose) polymerase reduces hypertension induced vascular remodeling in spontaneous hypertensive rat model. Second international Symposium on Hypertension, november 18-21, 2010, Osijek, Croatia, Kidney and Blood Pressure Research 2010; 33: 425 (2010)

K BRUSZT, K MAGYAR, Z VAMOS, A BALOGH, T KÁLAI, K HIDEG, L SERESS, B SUMEGI, A KOLLER, R HALMOSI, K TOTH. Vasoprotective effect of a quinazoline-type Poly(ADP-Ribose)polymerase inhibitor against vascular remodeling in chronic hypertension. VI. International Symposium On Myocardial Cytoprotection, 7.9 October, 2010, Pécs, Hungary, Experimental and Clinical Cardiology, 2010; 5, 42 (2010)

K MAGYAR, **K BRUSZT**, Z VAMOS, I SOLTI, T KÁLAI, K HIDEG, L SERESS, B SUMEGI, A KOLLER, R HALMOSI, K TOTH. Vasoprotective effects of poly(ADP-ribose)polimerase inhibition in a spontaneously hypertensive rat model. VI. International Symposium On Myocardial Cytoprotection, 7.9 October, 2010, Pécs, Hungary, Experimental and Clinical Cardiology 2010; 5, 48 (2010)

K MAGYAR, Z VAMOS, **K BRUSZT**, I SOLTI, K HIDEG, B SUMEGI, A KOLLER, R HALMOSI, K TOTH. Vasoprotective effects of a novel PARP- inhibitor in spontaneously hypertensive rats. Congress of the European Society of Cardiology, 28 August - 01 September, 2010, Stockholm, Sweden EHJ, 31, Abstract Suppl., 84 (2010)

MAGYAR K, VAMOS Z, **BRUSZT K**, SOLTI I, HIDEG K, KOLLER Á, SÜMEGI B, SERESS L, HALMOSI R. Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlásának vazoprotektív hatása spontán hipertenzív patkánymodellben. 40. Membrán-transzport konferencia, 2010. május 18-21., Sümeg. Absztrakt füzet 100. oldal (2010)

MAGYAR K, RIBA Á, **BRUSZT K**, BALOGH A, HIDEG K, SERESS L, SÜMEGI B, TÓTH K, HALMOSI R. Az L-2286 jelű PARP-gátló vegyület lehetséges szerepe a miokardialis őssejt regenerációban. CARDIOLOGIA HUNGARICA 42: Suppl. A Paper: A30 (2010)

MAGYAR K, VAMOS Z, **BRUSZT K**, SOLTI I, CSÉPLŐ P, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K, HALMOSI R, KOLLER Á. Egy új PARP-gátló vazoprotektív hatása spontán hipertóniás patkányokban. CARDIOLOGIA HUNGARICA 40: Suppl. G Paper: G:45 (2010)