

The effect of PPAR γ agonist – pioglitazone on hypertension and redox regulation in young and adult SHR

Vplyv pioglitazónu – agonistu PPAR γ na zmeny v hypertenzii a redoxnej regulácii u mladých a dospelých SHR zvierat

Kvandová M¹, Krátka D², Bališ P¹, Barančík M³, Dovinová I¹

¹Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Kvandova M, Kratka D, Balis P, Baracik M, Dovinova I. **The effect of PPAR γ agonist – pioglitazone on hypertension and redox regulation in young and adult SHR.** Cardiology Lett. 2015;24(4):247–250

Abstract. Aim: The PPAR γ is an nuclear receptor that takes part in the regulation of energy homeostasis, antioxidant response and hypertension development and can be also activated using an exogenous agonist such as pioglitazone. The aim of this study was to determine the influence of pioglitazone (PIO) treatment on blood pressure (BP) and redox systems in the brainstem (BS) and the left heart ventricle (LV) and specify changes among young and adult spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods: Blood pressure was determined by the plethysmography method. Production of superoxide radicals was detected by Lucigenin-enhanced chemiluminescence. Quantitative RT-PCR was used for gene expression and detection. Lipid profile and superoxide dismutase (SOD) activity was determined spectrophotometrically, using specific assays.

Results: Administration of PIO to SHR slowed blood pressure increase and improved lipid profile in young, but not in adult rats. In BS of young rats we observed increase of PPAR γ and SOD2 gene expression without SOD activity changes, while in LV we found SOD activity increase without changes in PPAR γ expression and without influence on superoxide production.

Conclusion: It can be concluded that PPAR γ agonist – PIO directly affected redox regulation in LV, while in BS redox regulation correlated with PPAR γ activation. Influence of PIO treatment was more effective in regulation of hypertension and redox response in young SHR, compared with adult, animals. Experimental data suggests different influence of glitazones according to the age, the type of agonist and/or the experimental model of hypertension. Fig. 2, Tab. 1, Ref. 15, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: pioglitazone – redox regulation – spontaneously hypertensive rats

Kvandová M, Krátka D, Bališ P, Barančík M, Dovinová I. **Vplyv pioglitazónu – agonistu PPAR γ na zmeny v hypertenzii a redoxnej regulácii u mladých a dospelých SHR zvierat.** Cardiology Lett. 2015;24(4):247–250

Abstrakt. Cieľ: PPAR γ je nukleárny receptor podieľajúci sa na regulácii energetickej homeostázy, antioxidačnej odpovede a rozvoja hypertenzie. Môže byť aktivovaný exogénnymi agonistami, ako je pioglitazón. Cieľom práce bolo stanovenie vplyvu pioglitazónu (PIO) na krvný tlak a redoxný systém v mozgovom kmeni (MK), a v ľavej komore srdca (LK) u mladých a dospelých spontánne hypertenzných potkanov (SHR).

Metódy: Krvný tlak sa meral pletyzmograficky. Produkcia superoxidového radikálu bola detegovaná chemiluminiscenčne pomocou lucigenínu. Kvantitatívna RT-PCR sa použila na stanovenie zmien génovej expresie. Zmeny lipidového profilu a celková aktivita superoxiddismutázy (SOD) boli stanovené spektrofotometricky s využitím špecifických analýz.

Výsledky: Podávanie PIO spomaľovalo nárast krvného tlaku a zlepšovalo lipidový profil u mladých, ale nie dospelých SHR. V MK mladých SHR sme pozorovali nárast génovej expresie PPAR γ a SOD2, bez zmien v celko-

Z ¹Ústavu normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, ²Ústavu patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Bratislava a ³Ústavu pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 21. júna 2015, prijaté dňa 30. júna 2015

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Ima Dovinová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika, email: ima.dovinova@savba.sk

vej enzýmovej aktivite SOD, kým v prípade LK SOD aktivita narástla, ale zmeny v expresii PPAR γ pozorované neboli a nebola ovplyvnená ani produkcia superoxidu.

Záver: Doterajšie experimenty ukazujú, že agonista PPAR γ pioglitazón ovplyvňuje redoxnú reguláciu v LK priamo svojím pôsobením, kým v MK je tento účinok sprostredkovaný aktiváciou PPAR γ . Účinok terapie s PIO sa výraznejšie prejavil pri regulácii hypertenzie a redoxnej odpovede u mladých SHR v porovnaní s dospelými jedincami. Experimentálne údaje naznačujú rozdielny účinok glitazónov v závislosti od veku, použitého agonistu PPAR γ a experimentálneho modelu hypertenzie. Obr. 2, Tab. 1, Lit. 15, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: pioglitazón – redoxná regulácia – spontánne hypertenzné potkany

Receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorom (PPAR γ) patrí do skupiny nesteroidných, ligandom aktivujúcich nukleárných receptorov, ktoré sa podieľajú na regulácii energetickej homeostázy, zápalových reakcií (1, 2), antioxidačnej odpovede (3), diferenciácii adipocytov a inzulínovej rezistencie (4). V ostatných rokoch sa tento nukleárny receptor javí aj ako potenciálny cieľ na ovplyvnenie rozvoja hypertenzie a metabolického syndrómu (5). V cievnom endoteli inzulín rezistentných zvieracích modelov je narušená rovnováha medzi vazodilatačnými a vazokonstrikčnými vlastnosťami inzulínu deaktiváciou PI3K/Akt/NO signalizácie. Ligandy PPAR γ znižujú expresiu receptorov typu 1 pre angiotenzín II – AT1R (6), čím zlepšujú vazorelaxáciu (7). Silnými selektívnymi agonistami PPAR γ sú syntetické antidiabetické tiazolidindióny (TZD) – pioglitazón (PIO), rosiglitazón (RZG) a troglitazón. Tiazolidindiónmi aktivovaný PPAR γ znižuje inzulínovú rezistenciu a hladinu glukózy v sére u pacientov s diabetom typu 2 (8), tiež má vplyv na cievnu kontraktilitu v experimentálnej hypertenzii, ovplyvňuje génovú expresiu

mnohých antioxidačných génov (9) a môže ovplyvniť sympatickú reguláciu arteriálneho tlaku (10). Cieľom práce bolo sledovanie vplyvu PIO na mladé a dospelé SHR, vrátane sledovania zmien redoxného systému a bunkovej signalizácie v ľavej komore srdca (LK) a mozgovom kmeni (MK).

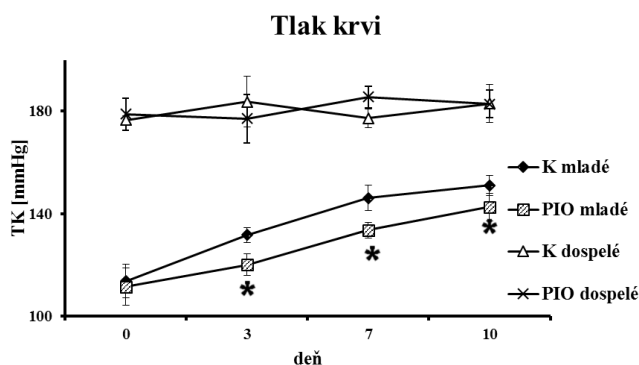
Materiály a metódy

V práci boli použité mladé (päťtyždňové) a dospelé (12-tyždňové) samce spontánne hypertenzných potkanov (SHR), ktorým bol počas 10 dní podávaný agonista PPAR γ – pioglitazón (PIO), žalúdočnou sondou v množstve 10 mg/kg/deň. Kontrolnej skupine bol podávaný žalúdočnou sondou fyziologický roztok. Zvieratám sa meral krvný tlak (TK) na chvostovej artérii neinvazívnou pletyzmografickou metódou. Experimentálnym zvieratám bol v plazme stanovený lipidový profil s využitím špecifických biochemických esejí na meranie cholesterolu a triacylglycerolov. Hladina superoxidu bola stanovená chemiluminiscenčne použitím lucigenínu a merala sa pomocou kvapalinového scintilačného detektora TRI-CARB. Génová expresia bola detegovaná pomocou qRT-PCR a vyhodnotená ako pomer ku „housekeeping“ génu GAPDH. Enzýmová aktivita superoxidodismutázy (SOD) bola stanovená spektrofotometricky, použitím SOD Assay kitu obsahujúceho WST farbivo. Namerané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené pomocou Studentovho t-testu a analýzou rozptylu: One-Way ANOVA. Rozdiely sa považovali za štatisticky významné pri $P < 0,05$.

Výsledky

Podávanie PIO malo rozdielny vplyv na hodnoty krvného tlaku u mladých a dospelých SHR. U mladých prehypertenzných zvierat sa spomalil nárast hodnôt krvného tlaku. U dospelých zvierat, so stabilizovaným krvným tlakom, nedošlo ku ďalším zmenám hodnôt TK (**obrázok 1**).

Rozdiely medzi mladými a dospelými zvieratami sa pozorovali aj v prípade monitorovania lipidového profilu v plazme, kde u mladých SHR podávanie PIO zlepšovalo lipidový profil (zníženie hodnôt celkového cholesterolu a LDL), kým u dospelých SHR sa takýto účinok neprejavil (**obrázok 2**).



Obrázok 1 Zmeny tlaku krvi

Figure 1 Changes in blood pressure

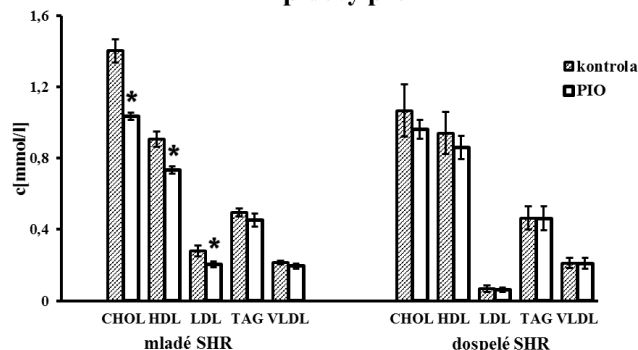
Zmeny TK(0 – 10 dní) u mladých (kontrolná, $n = 6$; PIO mladé, $n = 6$) a dospelých SHR (kontrolná, $n = 6$; PIO dospelé, $n = 6$) po podávaní PIO. Priemerné hodnoty $\pm$ STDEV boli vyhodnotené pomocou One-Way ANOVA (* $P < 0,05$ dávková skupina vs. kontrolná skupina). [Changes in blood pressure (TK) during 10 days (deň) in control young SHR (K mladé), PIO young SHR (PIO mladé), control adult SHR (K dospelé) and PIO adult SHR rats (PIO dospelé) after PIO treatment with $n=6$ in each group. Values are displayed as average $\pm$ STDEV. Significance * $p < 0.05$ represents treated group (PIO mladé, PIO dospelé) vs. control group (kontrola mladé, kontrola dospelé), using One-Way ANOVA].

Hladiny superoxidu po podávaní PIO ostali nezmenené tak u mladých, ako aj u dospelých SHR zvierat (údaje neuvažujeme). Centrálne a periférna regulácia tlaku krvi, ovplyvňujúca génovú expresiu sledovaných génov, sa stanovovali vo vzorkách mozgového kmeňa (MK) a ľavej komore srdca (LK). Podávanie PIO mladým zvieratám zvyšovalo expresiu mRNA PPAR γ len v MK, kým u dospelých SHR neboli pozorované žiadne zmeny (tabuľka 1). Sledovali sme tiež zmenu génovej expresie intracelulárnej SOD1 a mitochondriálnej izoformy SOD2, ako aj celkovú aktivitu SOD. U mladých zvierat dochádzalo k zmenám aj na periférii v LK aj v centrálnej oblasti, v MK. Kým v LK sme zistili najvýraznejšie zmeny v celkovej aktivite SOD, v MK sa pozoroval nárast expresie PPAR γ spolu so izoformou SOD2. U dospelých zvierat nebola pozorovaná zmena génovej expresie sledovaných génov ani v LK ani v MK (tabuľka 1).

Diskusia

Viacere štúdie poukázali na to, že podávanie rosiglitazónu (RZG), jedného z exogénnych agonistov PPAR γ , ovplyvňuje rozvoj krvného tlaku u experimentálnych modelov hypertenzie (7, 10). Účinky RZG sú v humánných štúdiách spájané so zmenami inzulínovej senzitivity (11). Podávanie PIO, ktorý patrí do rovnakej skupiny antidiabetík – tiazolidindióny, malo však v našej práci odlišný efekt na zmeny TK u mladých a dospelých SHR zvierat. U mladých prehypertenzných zvierat sa spomalilo zvyšovanie hodnôt TK. Neboli však pozorované zmeny v hladinách glykémie ani inzulínu v plazme (nepublikované údaje). *In vitro* merania však ukázali lepšiu vazodilatačnú odpoveď po stimulácii inzulínom u mladých SHR s PIO terapiou (3). Tento účinok PIO sa nepotvrdil u dospelých SHR samcov, u ktorých sú už vysoké hodnoty TK stabilizované.

Lipidový profil



Obrázok 2 Zmeny lipidového profilu

Figure 2 Changes in lipid profile

Zmeny lipidového profilu v plazme po podávaní PIO u mladých (kontrolná, n = 6; PIO mladé, n = 6) a dospelých SHR (kontrolná, n = 6; PIO dospelé, n = 6). Priemerné hodnoty $\pm$ STDEV boli vyhodnotené t-testom (* $P < 0,05$ dávková skupina vs. kontrolná skupina). [Changes in lipid profile in control young SHR (K mladé), PIO young SHR (PIO mladé), control adult SHR (K dospelé) and PIO adult SHR rats (PIO dospelé) after PIO treatment with n=6 in each group. Values are displayed as average $\pm$ STDEV. Significance * $p < 0.05$ represents treated group (PIO mladé, PIO dospelé) vs. control group (kontrola mladé, kontrola dospelé), using t-test].

Receptor PPAR γ sa podieľa na udržiavaní lipidovej homeostázy. Preto sme v našej práci sledovali zmeny lipidového profilu v plazme po podávaní PIO. Ukázalo sa však, že účinok na znižovanie hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolov sa prejavil iba u mladých zvierat.

Génová expresia samotného PPAR γ sa po podávaní PIO nezmenila v LK u mladých a podobne ani u dospelých SHR. Niektoré štúdie poukazujú na to, že PPAR γ je v LK za fyziologických podmienok pomerne málo exprimovaný a na regulácii metabolizmu kardiomyocytov sa podieľa iba v malej miere. Preto agonisti tohto receptora a ich protektívny účinok môže byť nezávislý od PPAR γ (12). Keď sme tento parameter sledovali v mozgovom kmeni, pozorovali sme

Tabuľka 1 Zmeny génovej expresie sledovaných génov a celkovej enzýmovej aktivity SOD

Table 1 Changes in gene expression of observed genes and total SOD activity

		mRNA PPAR γ	mRNA SOD1	mRNA SOD2	aktivita SOD (U/mg)
EK (LV)	kontrola (control)	0,9914 $\pm$ 0,2342	1,4643 $\pm$ 0,2571	1,1967 $\pm$ 0,2621	4,5934 $\pm$ 0,5237
mladé (young)	PIO	0,9555 $\pm$ 0,1266	1,2965 $\pm$ 0,1739	0,8496 $\pm$ 0,1994*	5,6230 $\pm$ 0,5172*
MK (BS)	kontrola (control)	0,7892 $\pm$ 0,1191	1,6900 $\pm$ 0,4930	0,9728 $\pm$ 0,1493	6,2648 $\pm$ 1,6219
mladé (young)	PIO	1,1000 $\pm$ 0,2086*	0,7547 $\pm$ 0,2410*	1,2411 $\pm$ 0,1906*	6,3557 $\pm$ 1,7113
EK (LV)	kontrola (control)	0,5973 $\pm$ 0,0798	0,9530 $\pm$ 0,3297	0,9681 $\pm$ 0,1915	0,7484 $\pm$ 0,1124
dospelé (adult)	PIO	0,5917 $\pm$ 0,2027	0,9241 $\pm$ 0,3957	0,8707 $\pm$ 0,2194	0,6289 $\pm$ 0,0909
MK (BS)	kontrola (control)	1,0835 $\pm$ 0,2487	1,1630 $\pm$ 0,4177	1,1084 $\pm$ 0,3066	0,7589 $\pm$ 0,0856
dospelé (adult)	PIO	0,7633 $\pm$ 0,2133	1,2141 $\pm$ 0,3352	1,3261 $\pm$ 0,3556	0,6878 $\pm$ 0,1354

Zmeny génovej expresie PPAR γ , izoformiem SOD (SOD1 a SOD2) v ľavej komore srdca (EK) a v mozgovom kmeni (MK) u mladých a dospelých SHR. Génová expresia bola vyhodnotená ako pomer mRNA sledovaného génu k mRNA „housekeeping“ génu GAPDH. Celková enzýmová aktivita SOD bola stanovená spektrofotometricky s využitím WST farbiva. Priemerné hodnoty $\pm$ STDEV boli vyhodnotené pomocou One-Way ANOVA (* $P < 0,05$ dávková skupina vs. kontrolná skupina). [Changes in gene expression of PPAR γ and SOD isophorms (SOD1 a SOD2) in left ventricle (LV) and brainstem (BS) of young and adult SHR. Gene expression was determined as mRNA ratio of measured gene to mRNA of housekeeping gene GAPDH. Total SOD activity was determined using spectrophotometry with WST dye. Values are displayed as average $\pm$ STDEV. Significance * $p < 0.05$ represents treated group vs. control group, using One-Way ANOVA].

zmenenú expresiu mRNA PPAR γ u mladých SHR zvierat, ale opäť nie u dospelých zvierat. Práca Chan et al. (10) ukazuje, že podávanie RZG má rôzny vplyv na expresiu receptora PPAR γ v jednotlivých častiach mozgu. Výskyt jednotlivých izoform PPAR γ sa v jednotlivých častiach mozgu odlišuje. Z doterajších experimentálnych údajov vyplýva, že aktivácia PPAR γ závisí od typu podávaného agonistu, od veku zvierat, ako aj od lokalizácie v jednotlivých častiach mozgu.

Nukleárny receptor PPAR γ je tiež jedným z prvých respondentov pri odpovedi na oxidačný stres. Prostredníctvom pozitívnej spätnej väzby je prepojený s nukleárnym receptorom Nrf2 (9), ktorý je komplexným systémom, udržiavajúcim za fyziologických i stresových podmienok redoxnú homeostázu (13), a to indukciou exprese protektívnych antioxidantných a detoxifikačných génov obsahujúcich ARE motív (14). V LK sme stanovovali hladinu superoxidu, ktorá sa nezmenila ani u mladých ani u dospelých zvierat. Ďalej sme sledovali aktiváciu antioxidantných mechanizmov prostredníctvom stanovenia génovej exprese jednotlivých izoform a celkovej enzýmovej aktivity SOD. U dospelých zvierat sa sledované parametre po PIO liečbe nezmenili. U mladých zvierat v mozgovom kmeni bola zvýšená expresia SOD2. Tento výsledok súhlasí s „up-reguláciou“ PPAR γ v MK, čo potvrdzuje, že aktivácia nukleárneho receptora PPAR γ vedie priamo i ku zvýšeniu génovej exprese mitochondriálnej SOD2 (15), kým expresia cytozolovej izoformy SOD1 poklesla. Celková enzýmová aktivita SOD sa v MK nezmenila, čo naznačuje, že znížená expresia SOD1 bola vykompenzovaná nárastom exprese izoformy SOD2. V LK sme u mladých zvierat zaznamenali zvýšenie celkovej enzýmovej aktivity SOD, čo je zrejme prejavom antioxidantného pôsobenia PIO, nezávislého od aktivácie PPAR γ .

Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že podávanie PIO malo rozdielny efekt na použité experimentálne skupiny. Výraznejší vplyv PIO na redoxnú reguláciu, antioxidantnú odpoveď a bunkovú signalizáciu sme preukázali u mladých, prehypertenzných zvierat v porovnaní s dospelými SHR. Taktiež môžeme konštatovať, že PPAR γ agonista – PIO výrazne ovplyvnil antioxidantnú odpoveď na úrovni aktivít SOD v LK priamym pôsobením samotného pioglitazónu v porovnaní s MK, kde sa tento účinok prejavoval cez aktiváciu PPAR γ receptora, ale len na génovej úrovni. Ukazuje sa, že glitazóny vykazujú rozdielnú efektivitu na tlak krvi: RZG v porovnaní PIO dokázal redukovať tlak krvi aj u dospelých SHR, avšak pôsobil toxickšie na kardiovaskulárny systém srdca (10). Na záver môžeme konštatovať, že sa zistilo, že účinok glitazónov, agonistov PPAR γ , môže súvisieť okrem veku a typu agonistu aj s typom experimentálnej hypertenzie (3, 5).

Podporené grantmi APVV-0348-12 a VEGA 2/0129/14.

Literatúra

1. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992;68(5):879-887.
2. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008;56(5):331-345.
3. Dovinová I, Barancik M, Majzunova M, Zorad S, Gajdosechová L, Gresova L, et al. Effects of PPAR γ Agonist Pioglitazone on Redox-Sensitive Cellular Signaling in Young Spontaneously Hypertensive Rats. *PPAR Res.* 2013;2013:54187.
4. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell* 1999;4(4):597-609.
5. Wu KL, Chao YM, Tsay SJ, Chen CH, Chan SH, Dovinova I, et al. Role of nitric oxide synthase uncoupling at rostral ventrolateral medulla in redox-sensitive hypertension associated with metabolic syndrome. *Hypertension* 2014;64(4):815-824.
6. Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, et al. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001;142(7):3125-3134.
7. Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C, et al. Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. *Eur J. Pharmacol.* 2010;628(1-3):140-147.
8. Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol.* 1992;41(2):393-398.
9. Polvani S, Tarocchi M, Galli A. PPAR γ and Oxidative Stress: Con(β) Catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res.* 2012;2012(641087).
10. Chan SH, Wu KL, Kung PS, Chan JY. Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010;55 (6):1444-1453.
11. Shargorodsky M, Michaelova K, Boaz M, Gavish D, Zimlichman R. M. Effect of longterm treatment with rosiglitazone on arterial elasticity and metabolic parameters in patients with Type 2 diabetes mellitus: a 2-year follow-up study. *Diabet Med* 2007;24 (11):1254-1260.
12. Barbieri M, Di Filippo C, Esposito A, Marfella R, Rizzo MR, D'Amico M, et al. Effects of PPARs agonists on cardiac metabolism in littermate and cardiomyocyte-specific PPAR- γ -knockout (CM-PGKO) mice. *PLoS One* 2012;7(4):e35999.
13. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009;284(20):13291-13295.
14. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci* 2013;20(69).
15. Yu X, Shao XG, Sun H, Li YN, Yang J, Deng YC, et al. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 2008;1200:146-158.