

Effect of sub-chronic administration of pioglitazone on blood pressure and endothelial function in borderline hypertensive rats: the role of nitric oxide

Účinok subchronického podávania pioglitazónu na tlak krvi a funkciu endotelu u hranične hypertenzných potkanov: úloha oxidu dusnatého

Kvandová M¹, Bališ P², Púzszerová A², Dovinová I^{2,3}

¹Center for Cardiology I, Molecular Cardiology, University Medical Center, Mainz, Germany

Kvandova M, Balis P, Puzserova A, Dovinova I. **Effect of sub-chronic administration of pioglitazone on blood pressure and endothelial function in borderline hypertensive rats: the role of nitric oxide.** Cardiology Lett. 2020;29(2):113–120

Abstract. Aim: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a ligand-dependent intracellular protein and interest in its activation has risen over recent years, considering its influence on hypertension development. The aim of this study was to investigate the effect of sub-chronical activation of PPAR γ by the exogenous agonist – pioglitazone on blood pressure, activity of nitric oxide synthase (NOS), superoxide production ($O_2^{\cdot-}$) and on the functional status on the endothelium of small resistant arteries in experimental borderline hypertensive rats (BHR).

Methods: Young (5 weeks) and adult (12 weeks) male borderline hypertensive rats (BHR) were used. Pioglitazone was administered intragastrically at a dose of 10 mg/kg/day over ten days. The pulse frequency (PF) and systolic blood pressure (sBP) were detected using plethysmography. The superoxide production ($O_2^{\cdot-}$) was determined using chemiluminescence and NOS activity by a method using the conversion of radioactive [3H] L-arginine to [3H] L-citrulline. Vascular reactivity of resistant mesenteric arteries was monitored *in vitro* using Mulvany wire myograph under isometric conditions.

Results: Pioglitazone treatment decreased sBP in young BHR and in adult BHR, and we observed a decreased sBP by trend. PPAR γ activation reduced PF in both young and adult BHR. In the heart, administration of pioglitazone increased the total enzyme activity of NOS in adult BHR, and similarly, we observed a decreased production of $O_2^{\cdot-}$ in adult BHR animals. In young animals, no changes in these parameters in the left heart ventricle were observed. In the aorta, $O_2^{\cdot-}$ production was decreased in both young and adult BHR, although the enzyme activity of NOS was not changed by PPAR γ activation. We observed a slightly improved endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation response of *a. mesenterica* in both young and adult BHR after pioglitazone treatment. Nevertheless the maximal vasorelaxing response was not affected.

Conclusion: In conclusion, pioglitazone-dependent activation of PPAR γ may contribute to BP regulation and thus affect the progression of hypertension through modulation of redox regulation and increased nitric oxide bioavailability. Although the nuclear receptor PPAR γ plays a primarily key role in the energy metabolism regulation, our results suggest that it may be a potential therapeutic target for the influencing of increased blood pressure as well. Fig. 3, Ref. 40, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: PPAR γ – NOS – superoxide – hypertension – vascular endothelium

Z ¹Center for Cardiology I, Molecular Cardiology, University Medical Center, Mainz, Germany, ²Centra experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Bratislava a ³Ústavu biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 25. novembra 2019; prijaté dňa 2. marca 2020

Adresa pre korešpondenciu: Miroslava Kvandová, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg – Universität, Zentrum für Kardiologie I – Labor für Molekulare Kardiologie Langenbeck str. 1, Gebäude 605, Raum 3.2.56, 55131 Mainz, Germany, e-mail: miroslava.kvandova@gmail.com

Kvandová M, Bališ P, Púzserová A, Dovinová I. **Účinok subchronického podávania pioglitazónu na tlak krvi a funkciu endotelu u hranične hypertenzných potkanov: úloha oxidu dusnatého.** Cardiology Lett. 2020;29(2):113–120

Abstrakt. Cieľ: Peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor gama (PPAR γ) je ligand závislý intracelulárny proteín, ktorý je v ostatných rokoch predmetom stále sa zvyšujúceho záujmu vzhľadom na jeho vplyv na progresiu hypertenzie. Cieľom práce bolo sledovať vplyv subchronickej aktivácie PPAR γ pomocou pioglitazónu na tlak krvi, aktivitu syntázy oxidu dusnatého (NOS), produkciu superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) a funkčný stav endotelu malých rezistentných artérií u experimentálnych hranične hypertenzných potkanov (BHR).

Súbor a metodika: V práci sa použili mladé (5-týždňové) a dospelé (12-týždňové) samce hranične hypertenzných potkanov (BHR). Pioglitazón sa podával intragastricky v dávke 10 mg/kg/deň počas desiatich dní. Pulzová frekvencia (PF) a systolický tlak krvi (sTK) sa detekoval pletyzmografickou metódou. Hladina $O_2^{\cdot-}$ sa stanovila pomocou chemiluminiscencie a aktivita NOS metódou využívajúcou konverziu rádioaktívneho [3H]-L-arginínu na [3H]-L-citrulín. Vaskulárna reaktivita rezistentných mezenterických artérií v podmienkach *in vitro* sa sledovala pomocou Mulvaného drôťového myografu.

Výsledky: Liečba pioglitazónom znižovala sTK u mladých BHR a u dospelých BHR sa pozoroval pokles s TK, ktorý však nebol štatisticky významný. Aktivácia PPAR γ redukovala PF u mladých aj u dospelých BHR. Podávanie pioglitazónu v srdci zvýšilo enzýmovú aktivitu NOS u dospelých BHR a podobne sa u dospelých BHR zvierat zaznamenalo aj zníženie množstva $O_2^{\cdot-}$. V ľavej komore u mladých zvierat sa nepozorovali zmeny v týchto parametroch. V aorte bola znížená produkcia $O_2^{\cdot-}$ tak u mladých, ako aj u dospelých BHR, avšak enzýmová aktivita NOS v aorte vplyvom aktivácie PPAR γ zmenená nebola. Ďalej sa po liečbe pioglitazónom zaznamenala mierne zlepšená od endotelu závislá acetylcholínom indukovaná relaxačná odpoveď cievnych segmentov *a. mesenterica* tak u mladých, ako aj dospelých BHR, ale nedošlo k ovplyvneniu maximálnej vazorelaxačnej odpovede.

Záver: Na záver môžeme konštatovať, že aktivácia PPAR γ môže prispievať k regulácii TK a ovplyvňovať tak progresiu hypertenzie prostredníctvom modulácie redoxnej regulácie a zvýšením biologickej dostupnosti oxidu dusnatého. Napriek tomu, že nukleárny receptor PPAR γ zohráva primárne dôležitú úlohu v regulácii energetického metabolizmu, z našich výsledkov vyplýva, že je potenciálnym terapeutickým cieľom na ovplyvnenie zvýšeného tlaku krvi. Obr. 3, Lit. 40, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: PPAR γ – NOS – superoxid – hypertenzia – cievny endotel

Artériová hypertenzia je jedným z najvýznamnejších rizikových faktorov kardiovaskulárnych ochorení. Hypertenzia je dôležitým zdravotným problémom ovplyvňujúcim viac ako 25 % svetovej populácie. Je najčastejšou príčinou kardiovaskulárnej mortality a morbidity v rozvinutých i rozvojových krajinách (1). V Európe je prevalencia artériovej hypertenzie u dospelých populácie v rozmedzí 30 – 45 % s postupným nárastom so zvyšujúcim sa vekom. Samotná patofyziológia hypertenzie je veľmi komplexná, keďže sa do regulácie krvného tlaku (TK) a teda aj do rozvoja hypertenzie zapájajú viaceré regulačné systémy.

Jedným z potenciálnych cieľov, ktorý môže byť zapojený a priamo ovplyvňovať rozvoj hypertenzie, sa javí aj receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorom gama (PPAR γ). PPAR γ pôsobí ako nutričný senzor, ktorý reguluje viacero homeostatických funkcií, vrátane energetického metabolizmu, reguluje vychytávanie, utilizáciu, oxidáciu a ukladanie mastných kyselín, podieľa sa na bunkovom raste, migrácii buniek a apoptóze, a moduluje aj oxidačný stres a zápalové reakcie v kardiovaskulárnom systéme a čiastočne je zapojený i do regulácie vaskulárneho tonusu (2, 3, 4). PPAR γ má tiež kardioprotektívne a nefropotektívne účinky (5), reguluje renálnu hemodynamiku, transport vody a Na^+ iónov, ovplyvňuje normálny vývoj obličiek, renálny metabolizmus lipidov, a po-

dieľa sa aj na modulácii renín-angiotenzínového systému (6, 7). Aktivácia PPAR γ moduluje veľké spektrum antioxidačných a prooxidačných dráh pri udržiavaní redoxnej homeostázy (8). Narušenie týchto dráh vedie k rozvoju viacerých ochorení a patologických stavov, ako je obezita, obezitou indukovaný zápal, ateroskleróza, diabetes mellitus, metabolický syndróm či hypertenzia (3, 9, 10).

Agonisty PPAR γ sa v značnej miere používajú pri liečbe diabetes mellitus 2. typu a práve ich kardioprotektívne a vaskuloprotektívne účinky sú v ostatných rokoch predmetom výskumu so zreteľom na ich potenciálne terapeutické možnosti pri kardiovaskulárnych ochoreniach. Liečba tiazolidínmi (TZD; PPAR γ agonisty) viedla k zníženiu TK u diabetických (11), ako aj nediabetických hypertenzných pacientov (12). Pioglitazón vykazuje tiež protektívny účinok pri infarkte myokardu. V práci Yasuda et al. pioglitazón redukoval veľkosť infarktového ložiska u animálnych modelov, čo bolo sprostredkované práve PPAR γ závislou aktiváciou signálnej kaskády PI3K/Akt/eNOS (PI3K: fosfatidyl-inozitol-3-kináza; Akt: Akt serín/treonín kináza 1; eNOS: endotelová syntáza oxidu dusnatého) (13). Okrem toho pioglitazón zabránil endotelovej dysfunkcii v mezenterických rezistentných artériách u potkanov po podávaní angiotenzínu II (Ang II) (14). Zistilo sa, že pleiotropné benefičné účinky

PPAR γ na cievy a vaskulárny tonus sú nezávislé od účinku na glykémiu (15). Tento efekt je sprostredkovaný viacerými možnými mechanizmami, ako napríklad PPAR γ sprostredkovaná modulácia exprese a/alebo fosforylácie špecifických signálnych molekúl inzulínovej signálnej kaskády, pomocou ktorej dochádza ku znovuobnoveniu rovnováhy medzi PI3K/Akt/eNOS a MAPK/ET-1 (MAPK: mitogénom aktivovaná proteínkináza; ET-1: endotelín 1), a následným zvýšením biologickej dostupnosti oxidu dusnatého (NO) s vazorelaxačným efektom na cievny hladký sval (4). Ďalej PPAR γ priamo moduluje expresiu antioxidantných a prooxidačných génov pri udržiavaní redoxnej homeostázy interakciou so signálnymi dráhami podieľajúcimi sa pri modulácii oxidatívneho stresu. Ide o spoluprácu signálnych dráh Nrf2/Keap1/ARE (Nrf2: nukleárny faktor; z angl. Nuclear factor E2-related factor 2; Keap1: represorický proteín; z angl. Kelch-like ECH associated protein; ARE: antioxidantný responzibilný element); NF- κ B (NF- κ B: nukleárny faktor kapa B); Wnt/ β -katenín (Wnt: Wingless-type MMTV integration site) a Forkhead box protein O (FOXO) (8). Aktivácia PPAR γ redukuje oxidatívny stres v rostrálnej časti ventrolaterálnej predĺženej miechy, ktorý sa podieľa na patogeneze hypertenzie (16), čo vedie k spomaleniu nástupu hypertenzie v predhypertenznom období (17). Okrem toho PPAR γ inhibuje expresiu receptora pre angiotenzín (Ang II) typu 1 (AT $_1$) a potláča Ang II indukovanú aktiváciu extracelulárnym signálom regulovanej kinázy $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$), čím je potlačená cievna remodelácia (18). Taktiež má vplyv na kaskádu renín-angiotenzínového systému, ktorý utlmuje, čím znižuje hodnoty TK (19).

Cieľom predkladanej práce bolo sledovanie vplyvu aktivácie PPAR γ exogénnym agonistom – pioglitazónom (= TZD) na redoxnú reguláciu a biologickú dostupnosť NO v období spontánneho rozvoja hraničnej hypertenzie u genetického modelu BHR potkanov (tzv. v období prehypertenzie).

Materiály a metódy

V práci boli použité mladé juvenilné (dosiahnutý vek sedem týždňov na konci experimentu) a dospelé (dosiahnutý vek 14 týždňov na konci experimentu) samce hranične hypertenzných potkanov (BHR, F1 potomok kríženia spontánne hypertenznej matky a normotenzného Wistar-Kyoto otca). Všetky zvieratá použité v práci sa narodili v schválenom pokusnom zariadení s chovom zvierat pre vlastnú potrebu Ústavu normálnej a patologickej fyziológie CEM SAV (súčasný úradné číslo zariadenia: SK UCH 03018). Všetky postupy na zvieratách boli schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (Č.k. Ro-3022/15-221) a príslušnou Etickou komisiou Ústavu normálnej a patologickej fyziológie. Zvieratá boli chované pri štandardných podmienkach (12/12 hodinový svetelný cyklus

svetlo/tma; konštantná teplota 22 – 24 °C a vlhkosť vzduchu 45 – 60 %; štandardná krmná zmes a pitná voda, ku ktorej mali zvieratá prístup *ad libitum*). Zvieratá boli náhodne rozdelené do štyroch skupín: kontrolné skupiny (7T – sedem týždňové potkany na konci experimentu, n = 6; 14T – 14 týždňové potkany na konci experimentu, n = 7) a skupiny, ktorým sa podával exogénny agonista PPAR γ – pioglitazón (7T, n = 6 a 14T, n = 7). Pioglitazón (AppliChem GmbH, Nemecko) sa podával v dávke 10 mg/kg/deň počas 10 dní intragastricky perorálnou žalúdočnou sondou vo forme suspenzie. Kontrolným zvieratám sa podával fyziologický roztok v ekvivalentnom množstve.

Stanovenie zmien systolického tlaku krvi a pulzovej frekvencie

Systolický tlak krvi (sTK) a pulzovú frekvenciu (PF) sme merali na chvoste potkana neinvazívnou „tail cuff“ pletyzmografickou metódou s použitím Statham Pressure Transducer P23XL (Hugo Sachs, Nemecko) (20).

Stanovenie zmien hladiny superoxidu

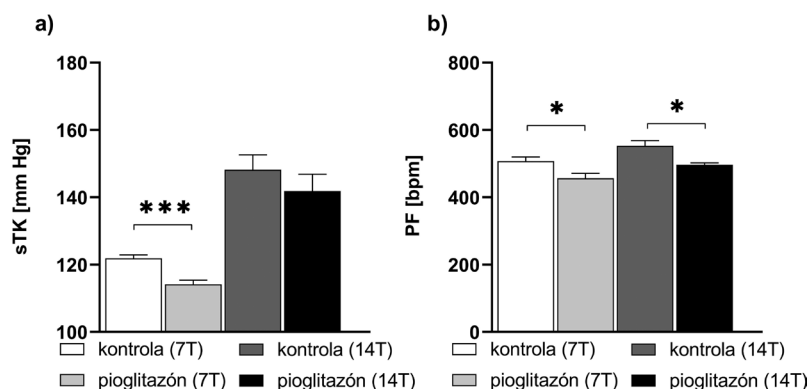
Produkcii superoxidu (O $_2^{\cdot -}$) sme vo vzorkách (ľavá komora srdca, pravá komora srdca a aorta) stanovovali chemiluminiscenčnou metódou s využitím lucigenínu pomocou kvapalinového scintilačného detektora Tri-Carb 2910TR s chemiluminiscenčným nadstavcom. Chemiluminiscenčná odpoveď vzniká reakciou lucigenínu s radikálmi, prednostne so O $_2^{\cdot -}$ (21, 22). Hladinu O $_2^{\cdot -}$ sme vyjadrili ako cpm/mg tkaniva.

Stanovenie zmien celkovej enzýmovej aktivity NOS

Celkovú enzýmovú aktivitu NOS sme stanovili v 20 % homogenátoch tkanív metódou, ktorá využíva konverziu rádioaktívneho [3 H]-L-arginínu (MP Biomedicals, USA) na rádioaktívny [3 H]-L-citrulín (20). Produkt enzýmovej aktivity NOS sme detekovali pomocou kvapalinového scintilátora Tri-Carb 2910TR po pridaní scintilačnej kvapaliny ECOLIT (MP Biomedicals). Enzýmovú aktivitu sme vyjadrili ako pkat/g proteínov detekovaných Lowryho metódou (23).

Stanovenie zmien vaskulárnej reaktivity *in vitro*

Vaskulárnu reaktivitu izolovaných prstencových preparátov malých mezenterických artérií sme hodnotili pri izometrických podmienkach *in vitro* pomocou Mulvaného drôťového myografu Dual Wire Myograph System– 410A (Aarhus, Dánsko). Preparácia a následné merania cievnej reaktivity *a. mesenterica* sa uskutočnili podľa prác Puzserova et al. (20, 24). Zaznamenávali sme od endotelu závislé vazorelaxačné odpovede na acetylcholín (ACh). Zo získaných vazorelaxačných kriviek v závislosti od koncentrácie ACh sme vypočítali aj plochy pod jednotlivými relaxačnými krivkami (AUC – plocha pod krivkou, z angl. area under the curve v arbitrárnych jednotkách – a.u.).



Obrázok 1 Efekt pioglitazónu na a) systolický tlak krvi (sTK) a b) pulzovú frekvenciu (PF) u mladých a dospelých BHR

Figure 1 Effect of pioglitazone on a) systolic blood pressure and b) pulse frequency in young and adult borderline hypertensive rats (BHR)

Kontrolná skupina: kontrola (7T) a kontrola (14T); n = 6–7 a skupina liečená pioglitazónom: pioglitazón (7T) a pioglitazón (14T); n = 6–7. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SEM; * predstavuje štatistickú významnosť: *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001

BHR – hranične hypertenzné potkany; bpm – beats per minute; PF – pulzová frekvencia; sTK – systolický tlak krvi

Štatistická analýza

Všetky výsledky sme vyjadrili ako aritmetický priemer ± stredná chyba priemeru (SEM). Na posúdenie štatistickej významnosti sme použili multifaktoriálny test analýzy rozptylu One-Way (vek × liečba), respektíve Two-Way (vek × liečba × koncentrácia ACh) ANOVA test s následným Bonferroni *post hoc* testom. Za štatisticky významné sme považovali výsledky, pri ktorých sa dosiahla hladina signifikancie $p < 0,05$. Pre štatistickú analýzu a pre grafické spracovanie výsledkov sme použili program Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., USA).

Výsledky

Liečba pioglitazónom znižovala sTK u mladých BHR v porovnaní s kontrolnou skupinou a u dospelých BHR sme pozorovali pokles sTK, ktorý však nebol štatisticky významný (obrázok 1a). Ďalším monitorovaným parametrom bola PF. Aktivácia PPAR γ redukovala PF u mladých aj u dospelých BHR (obrázok 1b).

V práci sme ďalej sledovali efekt pioglitazónu na enzýmovú aktivitu NOS a hladinu $O_2^{\cdot-}$ v ľavej a pravej komore srdca, ako i v aorte. U dospelých BHR zvierat sme zaznamenali zníženie množstva $O_2^{\cdot-}$ po liečbe pioglitazónom (obrázok 2a). Podávanie pioglitazónu zvýšilo enzýmovú aktivitu NOS v ľavej komore srdca u dospelých BHR (obrázok 2d). Vplyvom pioglitazón dependentnej aktivácie PPAR γ sme u mladých zvierat nepozorovali zmeny v týchto parametroch v ľavej komore srdca (obrázky 2a, 2d), avšak v pravej komore srdca sme pozorovali zníženie produkcie $O_2^{\cdot-}$ tak u mladých, ako aj dospelých BHR (obrázok 2b). Podobne ako v ľavej komore, tak i v pravej komore srdca sme pozorovali zvýšenie celkovej enzýmovej aktivity NOS iba u dospelých zvierat

(obrázok 2e). Podobne nás zaujímali i zmeny produkcie $O_2^{\cdot-}$ a enzýmovej aktivity NOS v aorte vplyvom aktivácie PPAR γ . Celková enzýmová aktivita NOS v aorte podávaním PPAR γ agonistu – pioglitazónu ovplyvnená nebola ani u mladých a ani u dospelých BHR (obrázok 2f). Na rozdiel od toho pioglitazón redukoval hladinu $O_2^{\cdot-}$ v aorte BHR u oboch vekových skupín (obrázok 2c).

Vzhľadom na zmeny v produkcii $O_2^{\cdot-}$ a NOS enzýmovej aktivity a s nimi súvisiace zmeny sTK a PF po podávaní pioglitazónu, sme ďalej vyšetrovali vplyv podávania PPAR γ agonistu – pioglitazónu na cievnú reaktivitu *a. mesenterica* v podmienkach *in vitro*. Zamerali sme sa na detekciu od endotelu závislej relaxačnej odpovede *a. mesenterica*, ktorá by mohla byť ovplyvnená podávaním pioglitazónu. Podávanie pioglitazónu mierne zlepšovalo od endotelu závislú relaxačnú odpoveď u mladých (zvýšenie relaxačnej odpovede na ACh pri dvoch koncentráciách), ako aj u dospelých BHR (zvýšenie relaxačnej odpovede na ACh pri jednej koncentrácii) (obrázky 3a a 3b), avšak zmeny v maximálnych relaxačných odpovediach sa pri týchto skupinách nepozorovali. Všetky relaxačné odpovede boli taktiež hodnotené aj plochou pod krivkou (AUC), kde sme podobne zistili zvýšenú celkovú relaxačnú odpoveď u experimentálnych zvierat, ktorým sa podával pioglitazón (obrázok 3c).

Diskusia

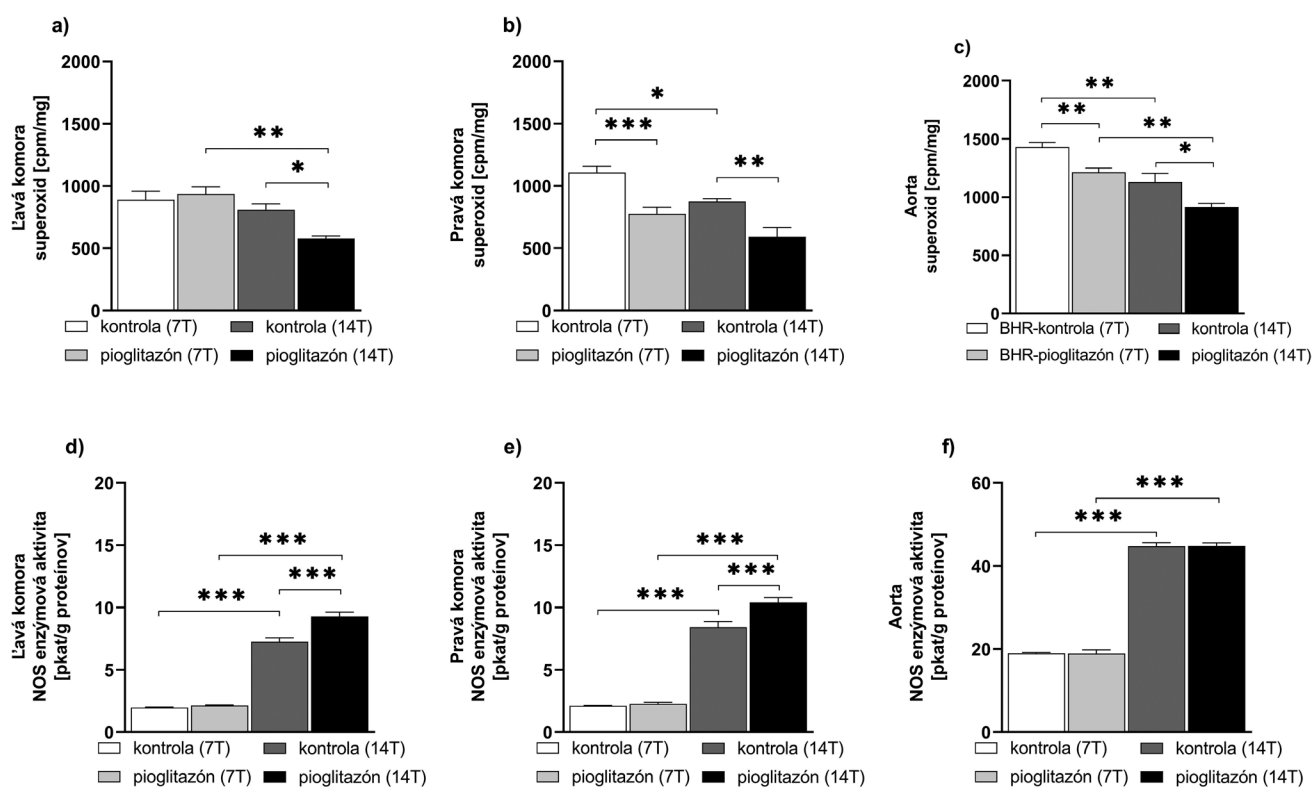
Hypertenzia je najčastejšou príčinou kardiovaskulárnej mortality a morbidity v rozvinutých i rozvojových krajinách (1). Viaceré experimentálne výstupy poukazujú na ovplyvnenie patogenézy hypertenzie prostredníctvom aktivácie nukleárneho receptora PPAR γ . Liečba exogénnymi agonistami PPAR γ znižuje TK u diabetických (11) aj ne-

diabetických hypertenzných pacientov (12) prostredníctvom jeho kardioprotektívnych (2, 3, 4) a nefroprotektívnych účinkov (6, 7). Jeho aktivácia tiež moduluje i veľké spektrum antioxidantných a prooxidantných dráh pri udržiavaní redoxnej homeostázy (8). Vzhľadom na to sme sa v tejto práci zamerali na účinok PPAR γ agonistu – pioglitazónu, ktorý sa podieľa na mechanizmoch regulujúcich TK. V práci sme použili mladé (5-týždňové) a dospelé (12-týždňové) samce BHR, ktorým sme intragastricky podávali pioglitazón v dávke 10 mg/kg/deň počas 10 dní. BHR, používané ako experimentálny model na štúdium ľudskej pre-hypertenzie (25) nám umožňujú zamerať sa na regulačné mechanizmy, ktoré môžu byť modulované práve nukleárnym receptorom PPAR γ pri hraničnej hypertenzii. V práci sme sledovali zmeny hemodynamických parametrov, *in vitro* zmeny v cievnej reaktivite *a. mesenterica*, ako aj zmeny v aktivite NOS a produkcii $O_2^{\cdot-}$ po pioglitazónom indukovaní aktivácii PPAR γ u mladých a dospelých BHR.

Naše výsledky ukazujú, že podávanie pioglitazónu redukovalo sTK u mladých pre-hypertenzných zvierat (obrázok 1a).

Na rozdiel od toho u dospelých BHR, aj keď sme zaznamenali určitý trend poklesu, tento efekt sa neukázal štatisticky významný. Naproti tomu pioglitazón znižoval PF tak u mladých, ako aj dospelých BHR (obrázok 1b). Tieto údaje naznačujú PPAR γ dependentnú reguláciu TK u mladých pre-hypertenzných zvierat. Avšak na základe porovnania našich výsledkov s inými experimentálnymi údajmi sa ukazuje, že efekt aktivácie PPAR γ závisí od typu použitého agonistu, od jeho koncentrácie, dĺžky liečby a samozrejme i typu použitého experimentálneho modelu (16, 17, 26, 27).

Vzhľadom na centrálnu úlohu srdca pri regulácii TK sme sa v našej práci zamerali aj na vplyv pioglitazónu a aktiváciu PPAR γ na obe komory srdca, aj keď je PPAR γ v srdci pomerne málo exprimovaný (28). Po podávaní pioglitazónu sme v ľavej aj v pravej komore srdca zaznamenali zvýšenie celkovej enzýmovej aktivity NOS u dospelých BHR (obrázky 2d a 2e), ktoré bolo u týchto zvierat sprevádzané i znížením hladiny $O_2^{\cdot-}$ (obrázky 2a a 2b), naznačujúc tak pravdepodobnú úlohu PPAR γ pri zachovaní biologickej dostupnosti NO „up-reguláciou“ expresie NOS a elimináciou superoxi-

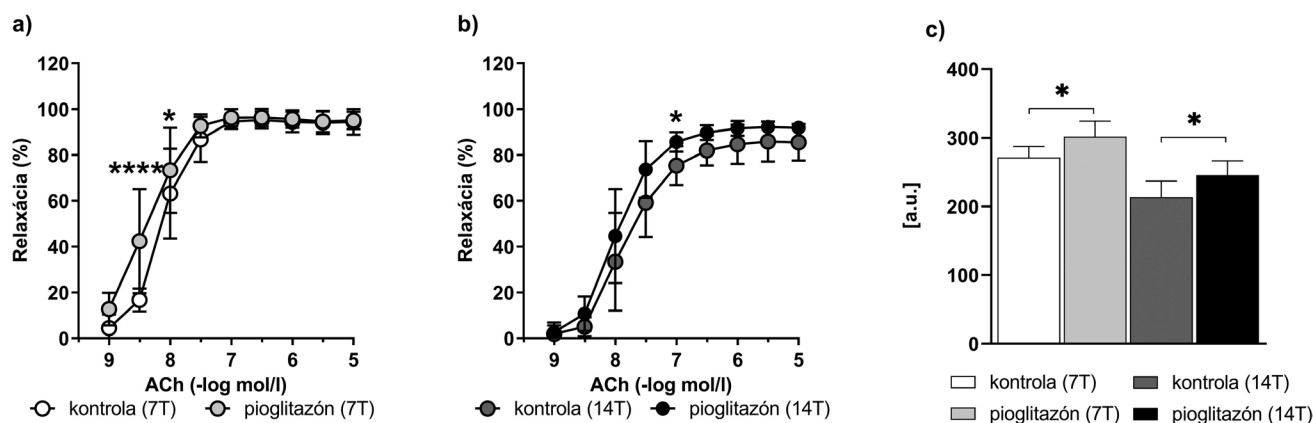


Obrázok 2 Efekt pioglitazónu na produkciu superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) v ľavej komore srdca a); v pravej komore srdca b); v aorte c) a na celkovú enzýmovú aktivitu NOS v ľavej komore srdca d); v pravej komore srdca e); v aorte f) u mladých a dospelých BHR

Figure 2 Effect of pioglitazone on superoxide ($O_2^{\cdot-}$) production a) in the left heart ventricle; b) in the right heart ventricle; c) in the aorta and on the total enzyme activity of nitric oxide synthase (NOS) d) in the left heart ventricle and e) in the right heart ventricle and f) in the aorta of young and adult borderline hypertensive rats (BHR)

Kontrolná skupina: kontrola (7T) a kontrola (14T); n = 6 – 7 a skupina liečená pioglitazónom: pioglitazón (7T) a pioglitazón (14T); n = 6 – 7. Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM; * predstavuje štatistickú významnosť: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

BHR – hranične hypertenzné potkany; NOS – syntáza oxidu dusnatého



Obrázok 3 Efekt pioglitazónu na relaxačnú odpoveď závislú od endotelu, indukovanú acetylcholínom v *a. mesenterica* a) u mladých BHR; b) dospelých BHR a c) AUC celkovej relaxačnej odpovede

Figure 3 Effect of pioglitazone on endothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation response of *a. mesenterica* a) in young borderline hypertensive rats (BHR); b) in adult BHR and c) AUC of total relaxation response

Kontrolná skupina: kontrola (7T) a kontrola (14T); n = 6–7 a skupina liečená pioglitazónom: pioglitazón (7T) a pioglitazón (14T); n = 6–7. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SEM; * predstavuje štatistickú významnosť: *p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001

ACh – acetylcholin; AUC – plocha pod krivkou, z angl. area under the curve; BHR – hranične hypertenzné potkany

dom sprostredkovaným „rozpriahnutím“ NOS. Yasuda et al. vo svojej práci poukazujú práve na možné zvýšenie biologickej dostupnosti NO prostredníctvom PPAR γ dependentnej aktivácie PI3K/Akt/eNOS v srdci, s výsledným kardioprotektívnym efektom pri infarkte myokardu (13). Ďalším potenciálnym mechanizmom zvýšenia NOS enzýmovej aktivity sa javí i pravdepodobné zvýšenie selektívnej exprese receptora pre Ang II typu 2 (AT $_2$) v srdci. Kurisu et al. vo svojej práci poukazujú na NOS/cGMP (cGMP: cyklický guanozínmonofosfát) signalizáciu ako fyziologickú funkčnú odpoveď aktivácie AT $_2$ receptora (29). Tá spolu s inhibíciou MAPK signálnych dráh môže byť modulovaná aktiváciou PPAR γ . Ukázalo sa, že tento účinok PPAR γ agonistu je oddelený od jeho efektu na inzulínovú senzitivitu (30).

Keďže PPAR γ ovplyvňuje aj vaskulárny tonus, v práci sme sa zamerali i na sledovanie zmien enzýmovej aktivity NOS a hladiny O $_2$ v aorte a detekciu zmien cievnej reaktivity *a. mesenterica* v podmienkach *in vitro*. Zlepšená biologická dostupnosť NO sa považuje za hlavný mechanizmus sprostredkujúci účinok PPAR γ agonistov na moduláciu TK. Viaceré *in vitro* štúdie zaoberajúce sa aktiváciou PPAR γ preukázali stimulačný účinok jeho agonistov na produkciu NO endotelovými bunkami (31, 32). Využitie siRNA metód potvrdilo, že zvýšenie produkcie NO je sprostredkované i aktiváciou PPAR γ nukleárneho receptora (31). Dysregulácia NOS signalizácie a integrity endotelu sa podieľa na patogenéze viacerých vaskulárnych ochorení (33). Endotelová integrita nezávisí iba od počtu buniek, ale aj od ich fungovania, kde produkcia a biologická dostupnosť NO je rozhodujúcim ukazovateľom funkcie endotelu (34). Použitie bunkovo-špecifických „knockout“ PPAR γ modelov umožnilo

štúdium úlohy tohto receptora vo fyziologických procesoch v cievnej stene. Wang et al. ukázali na dôležitosť PPAR γ exprimovaného práve v endoteli ciev pri TZD sprostredkovanej vaskulárnej protekcii (35). Naše údaje poukazujú na mierne zlepšenie od endotelu závislej relaxácie *a. mesenterica* u oboch použitých vekových skupín zvierat v období pre-hypertenzie. Vzhľadom však na nezmenenú aktivitu NOS v aorte nastáva otázka, či zmenená relaxačná odpoveď *a. mesenterica* na kumulatívne sa zvyšujúce koncentrácie ACh je spôsobená zvýšenou biologickou dostupnosťou NO. V prípade že nie je, do budúcnosti je dôležité zamerať sa na to, ktorý od endotelu odvodený vazorelaxačný faktor reaguje na aktiváciu nukleárneho receptora PPAR γ a je zodpovedný za zlepšenie relaxačnej odpovede *a. mesenterica*. Okrem NO ďalším plynným transmittrom ovplyvňujúcim cievny tonus je i sirovodík (H $_2$ S). H $_2$ S indukovaná vazorelaxácia je predominantne indukovaná aktiváciou ATP (adenozíntrifosfát; z angl. adenosinetriphosphate) senzitivných K $^+$ kanálov. H $_2$ S tiež môže vyvolať vazodilatáciu zvýšením produkcie cGMP v hladkosvalových bunkách (36, 37). Zaujímavé je, že u diabetických pacientov, ako aj u experimentálnych animálnych modelov obezity a metabolického syndrómu je prítomná redukcia koncentrácie H $_2$ S v krvi (38, 39) a deficit cystationín γ -lyázy, enzýmu podieľajúceho sa na produkcii tohto vaskulárny tonus modulujúceho plynného transmittera (40). U experimentálnych modelov metabolického syndrómu liečba syntetickým agonistom PPAR γ – rosiglitazónom zvýšila expresiu a aktivitu cystationín γ -lyázy, ako aj perivaskulárnym tukom sprostredkovanú produkciu H $_2$ S, s následným znížením kontrakčného účinku perivaskulárneho tuku na aortálne prstence (40).

Záver

Na záver možno konštatovať, že pioglitazón dependentná aktivácia PPAR γ môže prispievať k regulácii TK a ovplyvňovať tak progresiu hypertenzie prostredníctvom modulácie redoxnej regulácie a zvýšením biologickej dostupnosti NO. Z doteraz publikovaných prác však vyplýva, že účinok agonistov PPAR γ sa môže v jednotlivých skupinách experimentálnych modelov hypertenzie odlišovať. Tento rozdiel pri aktivácii PPAR γ môže súvisieť s vekom použitých zvierat, typom použitého agonistu, tkanivom, v ktorom sa efekt aktivácie PPAR γ sleduje, ako aj s typom experimentálneho modelu hypertenzie.

Conclusions

In conclusion, pioglitazone-dependent activation of PPAR γ may contribute to BP regulation and thus affect the progression of hypertension through modulation of redox regulation and increased NO bioavailability. However, the previous studies suggest that the effect of PPAR γ agonists may be different considering the variability of experimental hypertension models. This variability may be related to the type of used experimental animal model (age, genetic predisposition), to the type of used agonist and to the tissue, where the effect of PPAR γ activation is studied.

Finančná podpora

Táto práca bola podporená grantmi APVV-0348-12 Agentúry na podporu výskumu a vývoja a grantmi Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied VEGA 2/0148/17 a 2/0190/17.

Neexistuje žiadny konflikt záujmov.

Literatúra

1. Udani S, Lazich I, Bakris GL. Epidemiology of hypertensive kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:11-21.
2. Chen R, Liang F, Moriya J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their agonists for hypertension and heart failure: Are the reagents beneficial or harmful? *International Journal of Cardiology* 2008;130:131-139.
3. Oyekan A. PPARs and their effects on the cardiovascular system. *Clin Exp Hypertens* 2011;33:287-293.
4. Li J, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular biology. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007;7:109-117.
5. Kobayashi N, Ohno T, Yoshida K, et al. Cardioprotective mechanism of telmisartan via PPAR-gamma-eNOS pathway in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2008;21:576-581.
6. Kroker AJ, Bruning JB. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPARgamma Partial Agonism. *PPAR Res* 2015;2015:816-856.
7. Kvandová M, Majzunova M, Dovinova I. The role of PPARgamma in cardiovascular diseases. *Physiol Res* 2016;65:S343-S363.
8. Polvani S, Tarocchi M, Galli A. PPARgamma and oxidative stress: Con(beta) Catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res* 2012;2012:641087.
9. Kiss M, Czimmerer Z, Nagy L. The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:264-286.
10. Montanez JE, Peters JM, Correll JB, et al. Metabolomics: an essential tool to understand the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Toxicol Pathol* 2013;41:410-418.
11. Shargorodsky M, Wainstein J, Gavish D, et al. Treatment with rosiglitazone reduces hyperinsulinemia and improves arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2003;16:617-622.
12. Raji A, Seely EW, Bekins SA, et al. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lowers blood pressure in hypertensive patients. *Diabetes Care* 2003;26:172-178.
13. Yasuda S, Kobayashi H, Iwasa M, et al. Antidiabetic drug pioglitazone protects the heart via activation of PPAR-gamma receptors, PI3-kinase, Akt, and eNOS pathway in a rabbit model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1558-1565.
14. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation* 2002;105:2296-2302.
15. Sugawara A, Urano A, Kudo M, et al. Effects of PPARgamma on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocr J* 2010;57:847-852.
16. Chan SH, Wu KL, Kung PS, et al. 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;55:1444-1453.
17. Dovinova I, Barancik M, Majzunova M, et al. Effects of PPAR gamma agonist pioglitazone on redox-sensitive cellular signaling in young spontaneously hypertensive rats. *PPAR Res* 2013;2013:541-871.
18. Benkirane K, Viel EC, Amiri F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels in vivo. *Hypertension* 2006;47:102-108.
19. Roszer T, Ricote M. PPARs in the renal regulation of systemic blood pressure. *PPAR Res* 2010;2010:698-730.
20. Puzserova A, Slezak P, Balis P, et al. Long-term social stress induces nitric oxide-independent endothelial dysfunction in normotensive rats. *Stress* 2013;16:331-339.
21. Guzik TJ, Channon KM. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Methods Mol Med* 2005;108:73-89.

22. Cacanyiova S, Dovinova I, Kristek F. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:241-247.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
24. Puzserova A, Slezak P, Balis P, et al. Assessment of vascular reactivity by wire myograph. *Cesk Fysiol* 2011;60:52-56.
25. Puzserova A, Kopincova J, Slezak P, et al. Endothelial dysfunction in femoral artery of the hypertensive rats is nitric oxide independent. *Physiol Res* 2013;62:615-629.
26. Li R, Zhang H, Wang W, et al. Vascular insulin resistance in pre-hypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. *Eur J Pharmacol* 2010;628:140-147.
27. Wu KL, Chao YM, Tsay SJ, et al. Role of nitric oxide synthase uncoupling at rostral ventrolateral medulla in redox-sensitive hypertension associated with metabolic syndrome. *Hypertension* 2014;64:815-824.
28. Barbieri M, Di Filippo C, Esposito A, et al. Effects of PPARs agonists on cardiac metabolism in littermate and cardiomyocyte-specific PPAR-gamma-knockout (CM-PGKO) mice. *PLoS One* 2012;7:e35999.
29. Kurisu S, Ozono R, Oshima T, et al. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 2003;41:99-107.
30. Molavi B, Chen J, Mehta JL. Cardioprotective effects of rosiglitazone are associated with selective overexpression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H687-693.
31. Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1810-1816.
32. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:52-57.
33. Perrault LP, Malo O, Bidouard JP, et al. Inhibiting the NO pathway with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:439-451.
34. Verhaar MC, Rabelink TJ. Endothelial function: strategies for early intervention. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998;12 Suppl 1:125-134.
35. Wang N, Symons JD, Zhang H, et al. Distinct functions of vascular endothelial and smooth muscle PPARgamma in regulation of blood pressure and vascular tone. *Toxicol Pathol* 2009;37:21-27.
36. Yang G, Wang R. H₂S and blood vessels: an overview. *Handb Exp Pharmacol* 2015;230:85-110.
37. Cacanyiova S, Berenyiova A, Kristek F. The role of hydrogen sulphide in blood pressure regulation. *Physiol Res* 2016;65:S273-S289.
38. Jain SK, Bull R, Rains JL, et al. Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1333-1337.
39. Manna P, Jain SK. L-cysteine and hydrogen sulfide increase PIP₃ and AMPK/PPAR gamma expression and decrease ROS and vascular inflammation markers in high glucose treated human U937 monocytes. *J Cell Biochem* 2013;114:2334-2345.
40. Beltowski J. Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91:889-898.