

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL ȘTIINȚE FUNCȚIONALE

SCURTU G. ILEANA LUMINIȚA



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONSIDERAȚII PRIVIND EFECTELE MEDICAȚIEI
HIPOLIPEMIANTE ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE**

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. MUNTEAN M. DANINA

**Timișoara
2016**

CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate	VII
Lista cu abrevieri.....	VIII
Lista cu figuri.....	X
Lista cu tabele.....	XII
Mulumiri	XIV
INTRODUCERE.....	XV

PARTEA GENERALĂ

1. STRUCTURA ȘI FUNCȚIA MITOCONDRIALĂ.....	1
1.1. STRUCTURA MITOCONDRIALĂ.....	1
1.2. FUNCȚIA MITOCONDRIALĂ RESPIRATORIE	3
1.2.1. LANȚUL TRANSPORTOR DE ELECTRONI.....	3
1.3. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ (OXPHOS)	4
1.4. ADN-UL MITOCONDRIAL.....	5
1.5. MUSCULATURA CARDIACĂ.....	5
1.6. BOLILE MITOCONDRIALE	6
1.7. SPECIILE REACTIVE DE OXIGEN.....	6
1.8. METABOLISMUL GLUCOZEI	8
1.9. DIABETUL ZAHARAT	10
2. EFECTELE CELOR DOUĂ MEDICAMENTE HIPOLIPEMIANTE ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE	12
2.1. PRAVASTATINUL.....	12
2.1.1. STATINELE: MECANISM DE ACȚIUNE.....	12
2.1.2. STATINELE ȘI MITOCONDRIA.....	15
2.1.3. TOXICITATEA STATINELOR.....	16
2.1.4. INTERACȚIUNI MEDICAMENTOASE CU STATINELE.....	17
2.2. ACIDUL NICOTINIC.....	18
2.2.1. DEFINIȚIE, MECANISM DE ACȚIUNE.....	18
2.2.2. ACIDUL NICOTINIC ȘI MITOCONDRIA.....	20
2.2.3. TOXICITATEA NIACINULUI	21
2.2.4. INTERACȚIUNI MEDICAMENTOASE CU ACIDUL NICOTINIC	22

PARTEA SPECIALĂ

3. STUDIUL 1: CARACTERIZAREA PROFILULUI BIOENERGETIC AL LINIEI CELULARE H9C2 DE CARDIOMIOBLAȘTI	23
3.1. SCOPUL STUDIULUI.....	23
3.2. CULTIVAREA LINIEI CELULARE H9C2 DE CARDIOMIOBLAȘTI.....	23

3.2.1. MATERIALUL DE LUCRU	23
3.2.2. METODA DE LUCRU	24
3.3. DETERMINAREA PROFILULUI BIOENERGETIC AL CELULELOR H9C2 CU AJUTORUL ANALIZORULUI SEAHORSE XF	25
3.3.1. PROTOCOLUL DE LUCRU	26
3.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	30
3.5. CONCLUZII	32
4. STUDIUL 2: EVALUAREA EFECTELOR PRAVASTATINULUI ȘI ACIDULUI NICOTINIC ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE A CARDIOMIOBLAȘTILOR H9C2	33
4.1. SCOPUL STUDIULUI	33
4.2. MATERIAL DE STUDIU ȘI METODA DE LUCRU	33
4.3. EVALUAREA EFECTELOR PR ȘI AN ASUPRA PROFILULUI BIOENERGETIC AL LINIEI CELULARE H9C2	34
4.3.1. ANALIZA STATISTICĂ	35
4.3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	35
4.3.3. CONCLUZII	43
4.4. EVALUAREA EFECTELOR PR ȘI AN ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE A LINIEI CELULARE H9C2	44
4.4.1. MATERIALUL DE LUCRU	44
4.4.2. STANDARDIZAREA PROTOCOLULUI DE LUCRU	44
4.4.2.1. Prepararea culturilor de celule a constat în următoarele etape de lucru:	44
4.4.2.2. Evaluarea funcției mitocondriale respiratorii in situ prin respirometrie de înaltă rezoluție	45
4.4.2.3. Rezultate și discuții	47
4.4.2.4. Concluzii	49
4.4.3. EVALUAREA EFECTELOR ACUTE ALE PR ȘI AN ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE PE CELULE PERMEABILIZATE	50
4.4.3.1. Protocolul experimental	50
4.4.3.2. Analiza statistică	50
4.4.3.3. Rezultate și discuții	50
4.4.3.4. Concluzii	55
5. STUDIUL 3: EVALUAREA EFECTELOR PRAVASTATINULUI ȘI ACIDULUI NICOTINIC ASUPRA FUNCȚIEI RESPIRATORII A MITOCONDRIILOR CARDIACE IZOLATE DE LA ȘOBOLANI CU DIABET ZAHARAT INDUS CU STREPTOZOTOCIN	57
5.1. SCOPUL STUDIULUI	57
5.2. MATERIAL DE STUDIU	58
5.3. METODA DE LUCRU	58
5.3.1. INDUCEREA DIABETULUI ZAHARAT EXPERIMENTAL	58

5.3.2. IZOLAREA MITOCONDRIILOR CARDIACE.....	58
5.3.3. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI DE PROTEINE MITOCONDRIALE	61
5.3.4. DETERMINAREA CONSUMULUI DE OXIGEN	61
5.3.5. PRODUCȚIA MITOCONDRIALĂ DE H ₂ O ₂	63
5.4. ANALIZA STATISTICĂ.....	63
5.5. REZULTATE ȘI DISCUȚII	63
5.5.1. CARACTERISTICILE CLINICE ȘI BIOCHIMICE ALE ȘOBOLANILOR CU DIABET ZAHARAT (DZ) INDUS EXPERIMENTAL	63
5.5.2. EVALUAREA CONSUMULUI MITOCONDRIAL DE OXIGEN	64
5.5.3. EVALUAREA STRESS-ULUI OXIDATIV	70
5.6. CONCLUZII	72
6. DISCUȚII ȘI CONCLUZII GENERALE	74
6.1. DISCUȚII GENERALE.....	74
6.1.1. EFECTUL STATINELOR ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE	74
6.1.2. EFECTUL ACIDULUI NICOTINIC ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE...	75
6.2. CONCLUZII GENERALE.....	76
6.3. CONTRIBUȚII ORIGINALE	77
6.4. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	77
BIBLIOGRAFIE	78
ANEXE	I

INTRODUCERE

Alterarea funcției mitocondriale este considerată astăzi drept placa turnantă a patogenezei afecțiunilor cronice degenerative. Astfel, afecțiunile cardiovasculare și metabolice (obezitatea și diabetul zaharat) care reprezintă principala cauză de morbi-mortalitate a societății moderne, au ca mecanism central al apariției și progresiunii, disfuncția mitocondrială. Terapia acestor afecțiuni (și cu mare probabilitate și cea a efectelor nefavorabile ale îmbătrânirii) va fi centrată în viitor pe modularea funcției celulare bioenergetice și a producției de specii reactive de oxigen la nivel mitocondrial. Pe de altă parte, prevenția primară și secundară a bolilor cardiovasculare și metabolice, care au drept factor de risc comun hiper/dislipidemia și a căror prevalență cunoaște o creștere alarmantă, reprezintă astăzi unul dintre obiectivele medicinei moderne.

Statinele acționează prin inhibiția enzimei cheie implicată în sinteza colesterolului (calea mevalonatului), HMG-CoA reductaza și constituie astăzi medicația hipolipemiantă de primă-linie, fiind prescrise atât în scop terapeutic cât și profilactic, datorită efectelor benefice pleiotrope. Într-adevăr, efectele benefice ale statinelor la nivelul sistemului cardiovascular merg dincolo de cel hipocolesterolemiant, fiind recunoscute, printre altele, efectul anti-inflamator și cel anti-oxidant. Cu referire la acest din urmă efect, există date în literatura de specialitate care raportează un efect dihotomic al statinelor la nivelul mușchiului cardiac comparativ cu cel scheletic. Astfel, la nivelul cordului administrarea statinelor determină o creșterea ușoară a stress-ului oxidativ responsabilă de un răspuns adaptativ cunoscut drept *hormeză* mitocondrială sau „*mitohormeză*” (echivalentul principiului „*ceea ce nu ne omoară ne întărește*”) manifestat prin creșterea expresiei enzimelor antioxidante și a biogenezei mitocondriale. Cu toate acestea, în mod paradoxal, efectul benefic pe stress-ul oxidativ și pe biogeneza mitocondrială la nivel cardiac nu a fost însoțit de o îmbunătățire a consumului de oxigen/respirației mitocondriale în experimentele pe mitocondrii izolate, iar pe termen lung administrarea statinelor la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică nu a condus la îmbunătățirea prognosticului acestora. Pe de altă parte, la nivelul mușchiului scheletic statinele au indus un stress oxidativ crescut cu alterarea biogenezei mitocondriale. Deoarece statinele sunt prescrise pe scară largă în patologia cardio-metabolică a populației vârstnice, posibilitatea inducerii disfuncției mitocondriale sau a agravării unei disfuncții mitocondriale (latente) preexistente ar putea fi unul dintre mecanismele care explică toxicitatea acestora pe termen lung.

Pe fondul creșterii utilizării statinelor, asistăm inevitabil și la o incidență crescută a efectelor secundare, ele determinând pe termen lung și/sau în doze mari câteva secundare importante, dintre care simptomele musculare asociate statinelor (sau SMAS) au fost sistematic investigate de peste 10 ani atât în cadrul studiilor experimentale cât și a celor clinice. Pe de altă parte, în condițiile în care mușchiul cardiac este striat (asemenea celui scheletic) este surprinzător faptul că în literatura de specialitate studiile adresate evaluării efectelor statinelor asupra funcției mitocondriilor cardiace sunt relativ puține. Este cunoscut faptul că statinele hidrofille (ex., pravastatina, rosuvastatina) sunt mai puțin miotoxice comparativ cu cele lipofile (ex., atorvastatina, lovastatina), pe de-o parte datorită capacității mai reduse de a difuza pasiv la nivelul membranei celulelor musculare și pe de altă parte, datorită lipsei influenței pH-ului acid asupra celor hidrofille (în mediu acid, un procent mai mare din statinele lipofile rămân sub forma de lactonă cu o toxicitate crescută la nivel muscular).

La ora actuală, disfuncția mitocondrială asociată terapiei cu statine rămâne un subiect controversat și departe de a fi elucidat.

Acidul nicotinic (AN) reprezintă unul dintre medicamentele hipolipemiante tradiționale, fiind cunoscut în principal pentru efectul de creștere a HDL-colesterolului și respectiv, de scădere a trigliceridelor și a lipoproteinei (a). Utilizarea AN a fost relativ limitată de incidența crescută a efectelor secundare (în principal vasodilatația cutanată) și de faptul că investigarea efectelor asocierii sale cu statinele în cadrul a 2 trialuri clinice recente, AIM-

HIGH (*Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides*) și respectiv HPS2-THRIVE (*Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events*) nu numai că nu a fost urmată de reducerea suplimentară a riscului cardiovascular, dar s-a asociat cu creșterea incidenței efectelor adverse. Cu toate acestea există studii în literatura internațională care consideră AN drept o alternativă terapeutică fiabilă în cazul pacienților cu hipercolesterolemie și intoleranță la statine, cu sindrom metabolic sau nivel crescut al non-HDL colesterolului și respectiv, în condițiile în care atingerea nivelului țintă pentru LDL-colesterol nu poate fi realizată cu statine. În plus, ca și în cazul statinelor, niacina exercită efecte pleiotrope, independente de cele pe metabolismul lipidic, dintre care cele mai recent investigate sunt efectul antiinflamator la nivelul adipocitelor, monocitelor și al endoteliului vascular, efectul antioxidant, anticoagulant (fibrinolitic și de inhibiție a activării plachetare).

Există foarte puține date în literatura internațională cu privire la efectele acidului nicotinic asupra funcției mitocondriale respiratorii.

Diabetul zaharat (DZ), cea mai severă boală metabolică, a primit statutul de „epidemie a secolului 21”, datorită prevalenței în creștere la nivel mondial, dar mai ales în țările în curs de dezvoltare, inclusiv în România potrivit studiului PREDATOR; o previziune internațională recentă îngrijorătoare estimează că peste 590 de milioane de oameni vor suferi de diabet în anul 2035. Alterarea bioenergeticii mitocondriale - în principal scăderea respirației active - este considerată actualmente drept elementul patogenetic comun al ambelor tipuri de DZ, contribuind cu certitudine la instalarea cardiomiopatiei diabetice. Statinele, continuă să rămână medicația de primă linie pentru reducerea riscului cardiovascular la pacienții cu DZ tip 2. Cu toate acestea, ele au fost incriminate în creșterea cu 10-12% riscului de diabet zaharat nou-diagnosticat potrivit unor meta-analize recente, fără ca mecanismul răspunzător de apariția acestuia să fie elucidat.

Efectele la nivel mitocondrial ale administrării statinelor în prezența DZ au fost doar parțial investigate.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul prezentei teze a constat în evaluarea efectelor a două medicamente hipocolesterolemizante hidrosolubile, pravastatina și acidul nicotinic (niacina), asupra funcției mitocondriale.

Obiectivele cercetării au constat în:

1. Caracterizarea profilului bioenergetic al liniei celulare de cardiomioblaști H9C2.
2. Evaluarea efectelor pravastatinei și acidului nicotinic asupra funcției mitocondriale respiratorii a cardiomioblaștilor H9C2.
3. Evaluarea efectelor pravastatinei și acidului nicotinic asupra funcției respiratorii a mitocondriilor cardiace izolate de la șobolani cu diabet zaharat indus cu streptozotocin.

Cuvinte cheie: pravastatina, acid nicotinic, cardiomioblaști H9c2, mitocondrii cardiace de șobolan, funcția bioenergetică, diabet zaharat experimental

Obiectivele au fost realizate în cadrul următoarelor 3 studii experimentale:

STUDIUL 1:

CARACTERIZAREA PROFILULUI BIOENERGETIC AL LINIEI CELULARE H9c2 DE CARDIOMIOBLAȘTI

Scopul acestui studiu a constat în standardizarea metodologiei de lucru pentru evaluarea profilului bioenergetic (respirație mitocondrială și glicoliză) al cardiomioblaștilor H9c2 nepermeabilizați. În acest scop am testat efectele densității de celule H9c2 asupra ratei consumului de oxigen (RCO) și respectiv, a ratei acidifierii extracelulare (RAEC), atât în condiții bazale cât și în prezența modulatorilor farmacologici ai funcției bioenergetice.

RCO și RAEC au fost simultan măsurate după injectarea secvențială a celor 3 compuși care modifică profilul energetic celular: Oligomicina (1 $\mu\text{g/ml}$); FCCP (1 și 3.0 μM); Antimicina A (5 μM). Următorii parametri OCR au fost calculați și analizați: *Respirația bazală*: respirația măsurată înaintea inițierii injectărilor automate; *Turnover-ul ATP-lui*: cantitatea de O_2 consumat pentru producția de ATP; *Gradientul de protoni - Proton Leak*: cantitatea de O_2 utilizat în vederea menținerii gradientului de protoni; *Respirația maximă*: respirația măsurată în condiții de decuplare; *Capacitatea de rezervă respiratorie*: diferența dintre respirația maximă și cea bazală [2, 4]; *Respirația non-mitocondrială*: cantitatea de O_2 consumată de alte procese decât cele mitocondriale. Raportul controlului respirator (RCR) sau indexul respirator a fost calculat ca raportul dintre respirația maximă și gradientul de protoni.

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Parametrii RCO și RAEC la nivelul liniei celulare H9c2.

Loturi analizate	RCO (nmoli/min/nr celule)						RAEC (mpH/min/nr celule)
	RB	GP	t ATP	RM	CR	RCR	
10K/1FCCP	12.13	5.44	6.7	20.42	8.3	3.7	1.3×10^{-3}
10K/3FCCP	13.53	3.8	9.72	18.83	5.3	4.9	1.6×10^{-3}
20K/1FCCP	6.7	1.7	5	8.94	2.3	5.3	0.8×10^{-3}
20K/3FCCP	7.2	1.8	5.38	11.52	4.34	6.4	1×10^{-3}
25K/1FCCP	4.8	1.33	3.47	9.91	5.12	7.5	0.85×10^{-3}
25K/3FCCP	6.25	1.51	4.73	12.56	6.31	8.3	1.3×10^{-3}

RB = respirație bazală, SP = gradientul de protoni, T ATP = turnover-ul ATP-lui, RM = respirația maximă, CR = capacitatea de rezervă. Datele sunt exprimate ca medii a 6-8 determinări/grup.

În concluzie, profilul bioenergetic optim al celulelor H9c2 a fost obținut la o densitate de 25.000 celule/godeu în prezența a 3 μM FCCP. Aceste rezultate privind standardizarea au fost utilizate în continuare în experimentele de evaluare a efectelor pravastatinului și acidului nicotinic asupra funcției bioenergetice a celulelor H9c2.

Contribuția originală constă în elaborarea în premieră națională a unui protocol standardizat pentru evaluarea funcției bioenergetice celulare care va putea fi utilizat în continuare în studiile de toxicitate mitocondrială.

STUDIUL 2:

EVALUAREA EFECTELOR PRAVASTATINULUI ȘI ACIDULUI NICOTINIC ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE LA NIVELUL CARDIOMIOBLAȘTILOR H9c2

Scopul prezentului studiu a fost de a compara efectele pravastatinei (PR) și acidului nicotinic (AN) asupra profilului bioenergetic și respirației mitocondriale al liniei celulare H9c2 de cardiomioblaști.

2.1. EVALUAREA EFECTELOR PR ȘI AN ASUPRA PROFILULUI BIOENERGETIC AL LINIEI CELULARE H9c2

Profilul bioenergetic celular a fost evaluat în urma tratamentului acut (incubare 60 min) al celulelor H9c2 cu PR și respectiv AN la 4 concentrații diferite (10, 100, 200 și 400 μM).

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Tabelele 2.1 și 2.2.

Tabelul 2.1. Parametrii RCO și RAEC pe grupul de celule injectate cu PR (25 K celule/godeu).

Loturi celulare analizate	RCO (nmoli/min)					RAEC (mpH/min)
	RB	GP	T ATP	RM	CR	
CTRL	189,2	67,87	141,5	457,8	245,6	20.14
10 μM PR	148,6	23,15	105,1	343,8	183,4	30.47
100 μM PR	163,7	27,41	132,0	368,0	190,8	25.34
200 μM PR	161,9	26,09	135,8	357,8	195,9	28.56
400 μM PR	163,2	26,14	137,1	355,5	177,8	26.59

RB = respirație bazală, GP = gradientul de protoni, T ATP = turnover-ul ATP-lui, RM = respirația maximă, CR = capacitatea de rezervă. Datele sunt exprimate ca mediile a 6-8 determinări/grup.

Tabelul 2.2 Parametrii RCO și RAEC la grupul de celule injectate cu AN (25Kcelule/godeu)

Loturi celulare analizate	RCO (nmoli/min)					RAEC (mpH/min)
	RB	GP	t ATP	RM	CR	
CTRL	148,4	26,95	101,3	331,4	186,3	26,83
10 μM	156,6	30,83	125,8	386,0	224,4	31,14
100 μM	151,8	31,81	120,0	357,3	205,5	21,26
200 μM	149,2	39,10	110,1	250,1	100,9	8,306
400 μM	143,5	68,54	75,01	65,91	77,63	-11,62

RB = respirație bazală, GP = gradientul de protoni, t ATP = turnover-ul ATP-lui, RM = respirația maximă, CR = capacitatea de rezervă. Datele sunt exprimate ca mediile a 6-8 determinări/grup.

Efectele PR și AN asupra RAEC sunt prezentate în Fig. 2.1 a și b.

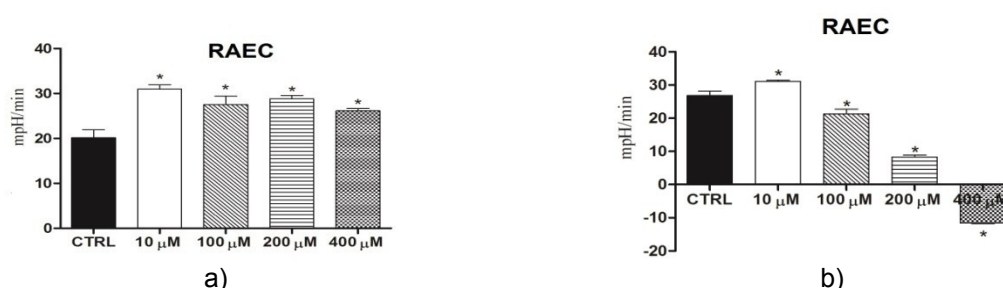


Figura 2.1. Efectele acute ale tratamentului cu PR (a) și AN (b) asupra parametrilor RAEC. (n = 6–8/group. *p < 0.05 vs. Ctrl).

În studiul de față, datele noastre au demonstrat un efect inhibitor al pravastatinei asupra respirației mitocondriale asociat cu o stimulare a glicolizei, indiferent de concentrația testată pe linia celulară de cardiomiocite H9c2 nepermeabilizate. Spre deosebire de efectul statinic, acidul nicotinic a determinat o stimulare a energogenezei atât prin respirația mitocondrială cât și prin glicoliză când a fost administrat în concentrație de 10 μM, în timp ce ambele căi au fost inhibitate la concentrații superioare.

În concluzie, cei doi compuși (în concentrații micromolară echivalentă) exercită un efect opus asupra funcției mitocondriale respiratorii care ar putea explica lipsa unui efect benefic aditiv în condițiile administrării combinate în studiile clinice.

2.2. EVALUAREA EFECTELOR PR ȘI AN ASUPRA FUNCȚIEI MITOCONDRIALE RESPIRATORII A LINIEI CELULARE H9c2

În continuare am investigat efectele concentrației minime (10 μM) de PR și AN asupra funcției mitocondriale respiratorii la nivelul liniei celulare de cardiomioblasti de șobolan H9C2 permeabilizați enzimatic.

Rezultatele obținute în urma experimentelor de respirometrie de înaltă rezoluție cu ajutorul oxigrafului-2K în prezența substratelor complexelor respiratorii CI și respectiv CII sunt prezentate în Tabelele 2.3 și 2.4.

Tabelul 2.3. Ratele respiratorii pentru respirația mitocondrială dependentă de complexul CI exprimate în pmol/(s*ml).

Lotul de control (netratat) de celule H9c2 permeabilizate			
Parametrii analizați	Media	SEM	Nr. Experimente
Stadiul 2	23,98	0,18	6
Stadiul 3	123,6	2,41	6
Stadiul 4	12,43	1,47	6
RCR	19,38	2,48	6
ETS	122,5	2,51	6
Lotul de celule H9c2 permeabilizate tratate cu 10 μM pravastatin			
Stadiul 2	18,45**	0,22	6
Stadiul 3	113,9**	0,52	6
Stadiul 4	7,179*	0,18	6
RCR	15,91	0,37	6
ETS	78,21**	1,84	6
Lotul de celule H9c2 permeabilizate tratate cu 10 μM acid nicotinic			
Stadiul 2	31,28***	0,31	6
Stadiul 3	134,5**	1,82	6
Stadiul 4	16,05	0,92	6
RCR	29,90*	1,32	6
ETS	165,8**	2,97	6

(n = 6/group. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001 vs. Ctrl)

Tabelul 2.4 Ratele respiratorii pentru respirația mitocondrială dependentă de complexul CII exprimate în pmol/(s*ml).

Lotul de control (netratat) de celule H9c2 permeabilizate			
Parametrii analizați	Media	SEM	Nr. Experimente
Stadiul 3	104,4	3,15	6
ETS	96,07	1,97	6
Lotul de celule H9c2 permeabilizate tratate cu 10 μM pravastatin			
Stadiul 3	90,57*	0,78	6
ETS	81,75	3,09	6
Lotul de celule H9c2 permeabilizate tratate cu 10 μM acid nicotinic			
Stadiul 3	99,6	2,90	6
ETS	93,3**	2,4	6

(n = 6/group. *p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs. Ctrl)

În studiul de față, datele noastre sunt sugestive pentru un efect inhibitor al pravastatinei asupra complexelor I și II ale lanțului respirator mitocondrial, la concentrația de 10 μM testată pe celulele H9c2 permeabilizate. În ceea ce privește acidul nicotinic, administrarea acută a aceleiași concentrații a determinat o stimulare a respirației mitocondriale dependente de complexul I (dar nu și de complexul II), ca și în cazul experimentului pe cardiomioblaști.

În concluzie, în administrare acută pravastatina determină inhibarea respirației mitocondriale independent de substrat, în timp ce acidul nicotinic exercită un efect stimulator dependent însă de substrat.

STUDIUL 3:

EVALUAREA EFECTELOR PRAVASTATINULUI ȘI ACIDULUI NICOTINIC ASUPRA FUNCȚIEI RESPIRATORII A MITOCONDRIILOR CARDIACE IZOLATE DE LA ȘOBOLANI CU DIABET ZAHARAT INDUS CU STREPTOZOTOCIN

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectul celor două medicamente hipolipemiante asupra funcției respiratorii și producției de specii reactive de oxigen (SRO) mitocondriale, la șobolanii cu diabet zaharat indus experimental cu streptozotocină administrată intraperitoneal (50 mg/kg greutate corporală).

Respirația mitocondrială a fost cuantificată prin măsurarea polarografică a consumului de oxigen cu ajutorul oxigrafului-2K (Oroboros Instruments, Austria).

Cuantificarea producției mitocondriale de H₂O₂, ca și indicator al producției mitocondriale de SRO, a fost realizată prin măsurarea oxidării markerului fluorescent Amplex Red (10 μM) în prezența a 0.6 U/ml horseradish peroxidazei.

Rezultatele obținute prin măsurarea parametrilor funcției mitocondriale sunt prezentate ca media ± SEM în Tabele 3.1 și 3.1.

Tabelul 3.1. Ratele respiratorii pentru respirația mitocondrială dependentă de complexul CI exprimate în pmol/(s*ml)

CTRL			
Parametri analizați	Media	SEM	Nr. Experimente
Stadiul 2	38,15	1,25	6
OXPHOS	371,7	15,46	6
Stadiul 4	58,47	2,86	6
RCR	9,54	0,35	6
ETS	399,1	25,66	6

Tratatamentul cu 10 μ M pravastatin			
Stadiul 2	36,63	7,72	6
OXPHOS	429,8	86,14	6
Stadiul 4	68,02	11,25	6
RCR	10,53	1,43	6
ETS	389,2	74,63	6
Tratatamentul cu 10 μ M acid nicotinic			
Stadiul 2	52,90	6,93	6
OXPHOS	555,3	83,17	6
Stadiul 4	72,83	2,08	6
RCR	10,95	1,62	6
ETS	554,6	73,61	6

(n = 6/group. *p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs. Ctrl)

Tabelul 3.2. Ratele respiratorii pentru respirația mitocondrială dependentă de complexul CII exprimate în pmol/(s*ml)

CTRL			
Parametri analizați	Media	SEM	Nr. Experimente
Stadiul 2	136,0	13,24	6
OXPHOS	619,3	26,4	6
Stadiul 4	285,7	2,89	6
RCR	5,06	0,31	6
ETS	618,5	15,2	6
Tratatamentul cu 10 μ M pravastatin			
Stadiul 2	128,2	7,42	6
OXPHOS	510,2*	31,39	6
Stadiul 4	272,2	26,84	6
RCR	3,67**	0,19	6
ETS	566,2*	7,79	6
Tratatamentul cu 10 μ M acid nicotinic			
Stadiul 2	148,0*	8,92	6
OXPHOS	610,9*	51,26	6
Stadiul 4	250,0*	33,20	6
RCR	4,50	1,05	6
ETS	582,7*	71,46	6

(n = 6/group. *p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs. Ctrl)

Rezultatele privind efectul pravastatinei și acidului nicotinic asupra producției de H_2O_2 în cazul mitocondriilor energizate cu substratele CI și CII sunt prezentate în Fig. 3.1 și 3.2.

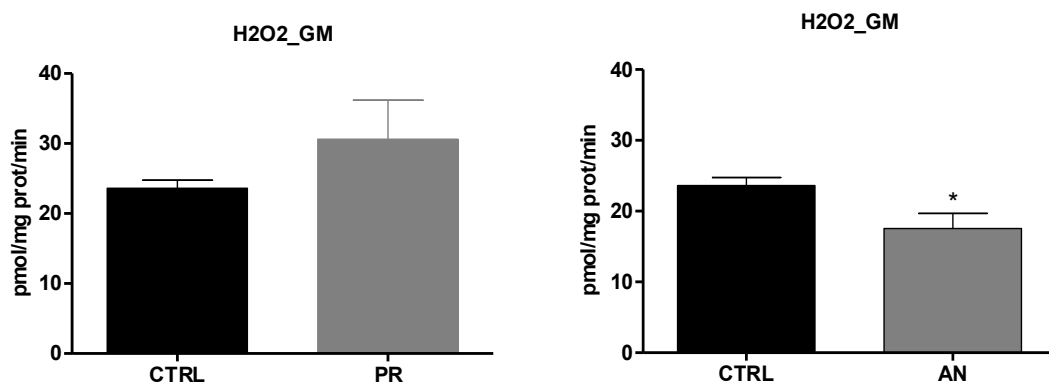


Figura 3.1. Producția mitocondrială de H_2O_2 la loturile tratate cu PR și AN (10 μ M), în condițiile mitocondriilor energizate cu G/M (5 mM glutamat + 5 mM malat). (n = 6/lot *p < 0,05 vs. Ctrl).

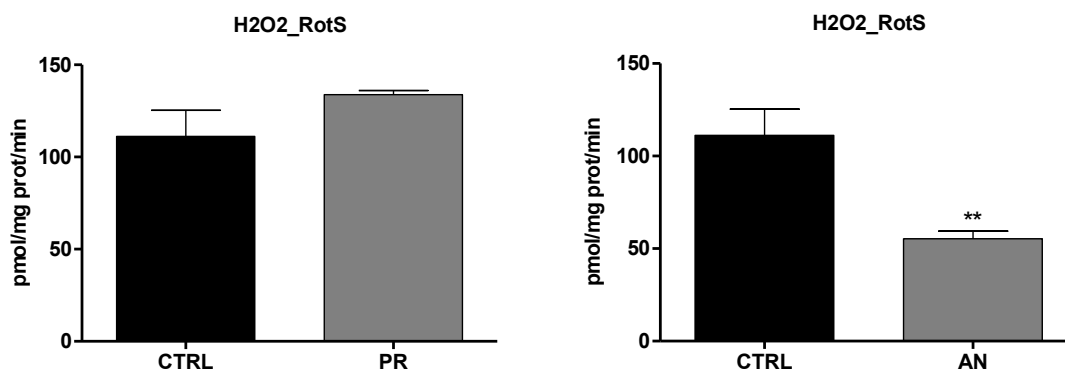


Figura 3.2. Producția mitocondrială de H₂O₂ la loturile tratate cu PR și AN (10 μM), în condițiile mitocondriilor energizate cu S/Rot (5 mM succinat + 0.5 μM rotenonă). (n = 6/lot, **p < 0,01 vs. Ctrl)

În concluzie, în cazul mitocondriilor izolate din țesutul cardiac de la șobolanii cu diabet indus farmacologic, am identificat o alterare a respirației mitocondriale induse de pravastatin (10 μM) la nivelul complexului I și mai ales II al lanțului respirator mitocondrial. În mod contrar, administrarea acută a acidului nicotinic (10 μM) a stimulat respirația mitocondrială independent de substratele energetice, sugerând potențialul efect terapeutic al acestui medicament hipolipemiant la pacienții cu diabet zaharat.

În ceea ce privește efectul acut al pravastatinei (10 μM) asupra stress-ului oxidativ mitocondrial, acesta a indus o ușoară creștere a producției de SRO independent de substrat, în schimb acidul nicotinic (10 μM) a avut un efect antioxidant cert, reducând producția de H₂O₂, independent de substrat. Având în vedere că diabetul zaharat se asociază cu un stress oxidativ la nivel sistemic, putem specula în continuare asupra efectelor benefice al AN la acești pacienți.

Rezultatele noastre cu privire la efectul statinic sunt în concordanță cu cele ale echipei lui Stephan Krahenbuhl, care au demonstrat o creștere ușoară a stress-ului oxidativ indusă de simvastatin la nivel miocardic (și importantă la nivelul mușchiului scheletic) în acord cu paradigma actuală ce postulează că statinele afectează mușchiul scheletic dar nu și pe cel cardiac (efect mitohormetic). Răspunsul cardiomiocitelor la incubarea cu simvastatin a constatat în creșterea generării speciilor reactive de oxigen cu rol benefic, de mesageri secundari responsabili de creșterea expresiei enzimelor antioxidante și respectiv, de stimularea biogenezei mitocondriale, aspecte care în studiul de față nu au putut fi verificate. Cu toate acestea putem specula că asocierea acidului nicotinic (cu efect antioxidant demonstrat) cu statinele poate conduce la abolirea semnalizării intracelulare responsabile de efectul benefic al acestora din urmă la nivel cardiac.

CONCLUZII GENERALE

1. Evaluarea profilului bioenergetic al liniei celulare de cardiomioblaști H9c2 nepermeabilizați cu ajutorul analizorului de flux XF^e24 (Agilent Seahorse Bioscience) a demonstrat următoarele:

- Pravastatina a prezentat un efect inhibitor asupra respirației mitocondriale, asociat cu o stimulare a glicolizei, indiferent de concentrația testată (10, 100, 200, 400 μM).
- Acidul nicotinic în concentrația minimă testată (10 μM) a determinat o creștere a producției de energie celulară atât în ceea ce privește respirația mitocondrială cât și glicoliza, în timp ce ambele căi au fost inhibitate la concentrații superioare.

2. Evaluarea funcției mitocondriale a cardiomioblaștilor H9c2 permeabilizați enzimatic cu ajutorul oxigrafului-2K (Oroboros, Austria) a demonstrat că pravastatinul a prezentat un

efect inhibitor asupra complexelor I și II ale lanțului respirator mitocondrial la o concentrație de 10 μ M, în timp ce acidul nicotinic, la aceeași concentrație, a prezentat un efect de stimulare al respirației mitocondriale.

3. Evaluarea respirației mitocondriale în cazul mitocondriilor izolate din țesutul cardiac de la șobolani cu diabet indus farmacologic a identificat: (i) o alterare a respirației mitocondriale induse de pravastatin, independentă de substrat; (ii) o stimulare a respirației mitocondriale independentă de substratul respirator, indusă de acidul nicotinic, în condițiile aplicării ambilor compuși în aceeași concentrație (10 μ M).

4. Evaluarea stress-ului oxidativ mitocondrial în cazul mitocondriilor izolate din țesutul cardiac de la șobolani cu diabet indus farmacologic a identificat: (i) o producție crescută (dar nesemnificativă) de H_2O_2 indusă de pravastatin (10 μ M) și (ii) o producție semnificativ redusă de H_2O_2 indusă de acidul nicotinic (10 μ M).

CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. **Standardizarea în premieră națională a protocolului de evaluare a funcției bioenergetice a cardiomioblaștilor H9c2 cu ajutorul analizorului de flux extracelular Seahorse XF^e24.**
2. **Standardizarea măsurătorilor de respirometrie de înaltă rezoluție pentru experimentele pe celule permeabilizate cu ajutorul oxigrafului O2-K Oroboros, care vine în completarea protocoalelor de studiu pe fibre musculare permeabilizate puse la punct în cadrul aceleiași discipline.**
3. **Evaluarea comparativă în premieră internațională a efectelor pravastatinei și acidului nicotinic asupra profilului bioenergetic celular și asupra funcției mitocondriilor izolate din inimi de șobolani cu diabet zaharat indus experimental.**

LISTA ARTICOLELOR PUBLICATE

Teza de doctorat se bazează pe următoarele articole:

1. Ileana Scurtu, A Sturza, Ioana Zinuca Pavel, Roxana Popescu, Andreea Privistirescu, Oana Maria Duicu, Danina Mirela Muntean. *Bioenergetic characterization of H9C2 cells using the extracellular flux analyzer*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2015; 119(2):491-5. (revista B+, BDI)
2. Scurtu I, Popescu R, Privistirescu A, Sturza A, Pavel IZ, Verdeș D, Duicu OM, Muntean DM. *The Effects of Two Lipid-Lowering Drugs on Mitochondrial Respiration In H9C2 Cell Line*. Fiziologia – Physiology 2015; 25 (4): 66-69. (revista B+, BDI)

**VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY TIMIȘOARA
MEDICINE FACULTY
DEPARTMENT OF FUNCTIONAL SCIENCES – PATHOPHYSIOLOGY**

SCURTU G. ILEANA LUMINIȚA



PhD THESIS
**CONSIDERATIONS REGARDING THE EFFECTS OF
LIPID-LOWERING MEDICATION ON
MITOCHONDRIAL FUNCTION**

ABSTRACT

Scientific Coordinator
PROF. UNIV. DR. MUNTEAN M. DANINA

**Timisoara
2016**

TABLE OF CONTENTS

LIST OF PUBLISHED PAPERS	VII
LIST OF ABBREVIATION	VIII
FIGURE INDEX	X
TABLE INDEX.....	XII
ACKNOWLEDGMENTS.....	XIV
INTRODUCTION	XV

REVIEW OF THE LITERATURE

1. Structure and function of mitochondria	1
1.1. Mitochondrial structure	1
1.2. Respirator Mitochondrial Function	3
1.2.1. Electron transport chain.....	3
1.3. Oxidative phosphorylation (OXPHOS).....	4
1.4. Mitochondrial DNA	5
1.5. Cardiac muscle.....	5
1.6. Mitochondrial diseases	6
1.7. Reactive oxygen species	6
1.8. Glucose metabolism.....	8
1.9. Diabetes MELLITUS.....	10
2. The effects of the two lipid lowering drugs on mitochondrial function.....	12
2.1. Pravastatin	12
2.1.1. Statins: Mechanism of action	12
2.1.2. Statins and mitochondria	15
2.1.3. Toxicity of statins	16
2.1.4. Drug interactions with statins	17
2.2. Nicotinic acid	18
2.2.1. Definition, mechanism of action	18
2.2.2. Nicotinic acid and mitochondria	20
2.2.3. Niacin toxicity.....	21
2.2.4. Drug interactions with nicotinic acid	22

PERSONAL CONTRIBUTION

3. STUDY 1: Characterization the bioenergy profile of cardiomyoblast	23
3.1. Aim of the study.....	23

3.2. Cell culture of the H9C2 line cardiomyoblast	23
3.2.1. Material.....	23
3.2.2. Methods.....	24
3.3. Determination of bioenergetics profile of the H9c2 cell line with SEAHORSE XF analyser	25
3.3.1. Work protocol	26
3.4. Results and discussions	30
3.5. Conclusions.....	32
4. STUDY 2: Evaluation of the effects of pravastatin and nicotinic acid on mitochondrial function of the H9c2 cardiomyoblasts	33
4.1. Aim of the study.....	33
4.2. Material and Methods.....	33
4.3. Evaluation of the effects of pravastatin and nicotinic acid on the bioenergetics profile of the H9c2 cell line	34
4.3.1. Statistical analysis	35
4.3.2. Results and discussions	35
4.3.3. Conclusions	43
4.4. Evaluation of the effects of pravastatin and nicotinic acid on mitochondrial function H9c2 cell line	44
4.4.1. Work material	44
4.4.2. Standardization of the work protocol.....	44
4.4.2.1. Preparation of the cells cultures.....	44
4.4.2.2. Evaluation of mitochondrial respiratory function in situ by high resolution respirometry	45
4.4.2.3. Results and discussions.....	47
4.4.2.4. Conclusions	49
4.4.3. Evaluation of the effects of pravastatin and nicotinic acid on mitochondrial function on permeabilised cells.....	50
4.4.3.1. Experimental protocol	50
4.4.3.2. Statistical analysis.....	50
4.4.3.3. Results and discussions.....	50
4.4.3.4. Conclusions	55
5. STUDY 3: Evaluation the effects of the pravasatin and nicotinic acid on respiratory function of mitochondria isolated from heart diabetic rats induced with streptozotocin	57
5.1. Aim of the study.....	57
5.2. Material of study	58
5.3. The work method.....	58

5.3.1. The experimental induction of the diabetes MELLITUS	58
5.3.2. Isolation of the heart mitochondria	58
5.3.3. Determination of mitochondrial protein.....	61
5.3.4. Determination of oxygen consumption	61
5.3.5. Mitochondrial production of H ₂ O ₂	63
5.4. Statistical analysis	63
5.5. Results and discussions	63
5.5.1. Clinical and biochemical characteristics of the diabetic rats (DM)	63
5.5.2. Assessment of the mitochondrial oxygen consumption.....	64
5.5.3. Assessment oxidative stress.....	70
5.6. Conclusions	72
6. General discussion and conclusions	74
6.1. General discussions	74
6.1.1. The effect of statins on mitochondrial function	74
6.1.2. The effect of nicotinic acid on mitochondrial function	75
6.2. General Conclusion	76
6.3. Original Contributions	77
6.4. Future research direction.....	77
REFERENCES	78
ANNEX	I

INTRODUCTION

The alterations of mitochondrial function are considered nowadays the turning point in the pathogenesis of chronic degenerative diseases. Thus, cardiovascular and metabolic diseases (obesity and diabetes mellitus), that represent the main cause for the increased morbidity of the modern society, are mainly caused and aggravated by mitochondrial dysfunction. The treatment of these pathological conditions (and most probably the negative effects of ageing) will focus in the next future on modulation of bioenergetic cellular functions and the production of mitochondrial oxygen reactive species. On the other hand, primary and secondary prevention in cardiovascular and metabolic diseases, that share as common risk factor hyper/dyslipidemia, with an alarming increase in prevalence, represent nowadays one of the main objectives of modern medicine.

Statins act by inhibiting the main enzyme that ensures cholesterol synthesis (*via* the mevalonate pathway), HMG-CoA reductase, and constitute the first-line therapy for lipid disorders, with benefits on both therapeutical and prophylactic goals. It is a known fact that the benefits of statin therapy on the cardiovascular system extend beyond the cholesterol-lowering effect, with also anti-inflammatory and anti-oxidant effects. With regards to the last one, several studies have shown that statins present a dichotomic effect on cardiac muscle compared to the skeletal one. Thus, administration of statins will cause within the heart a slight increase in oxidative stress which is responsible for an adaptive modification known as mitochondrial hormesis or 'mitohormesis' (the equivalent of '*what doesn't kill you makes you stronger*' principle), that manifests itself by an increase in antioxidant enzyme expression and mitochondrial biogenesis. Although the benefits on cardiac oxidative stress and mitochondrial biogenesis are more than obvious, there is still no improvement in oxygen consumption/mitochondrial respiration in isolated mitochondria and the long-term statin administration in patients with chronic cardiac failure has not yet succeeded in bringing any improvement regarding the prognosis of these patients. On the other hand, it seems that within the skeletal muscle, statins have induced an increased oxidative stress together with alterations in mitochondrial biogenesis. Because statins are prescribed at a large scale in both cardiac and metabolic disorders in the elderly, the long-term toxicity of this type of treatment could be caused by inducing mitochondrial dysfunction or worsening of an already existing (latent) mitochondrial dysfunction.

Due to an increase in statin administration, we are inevitably assisting on an increased incidence in their side effects, a few being more important related to a long-term administration and/or high dosage, from which statin-associated muscle symptoms (SAMS) have been studied over the last 10 years in both experimental and clinical studies. On the other hand, considering that cardiac muscle is also a striated one (similar to skeletal muscle), it is quite surprising that studies targeting the evaluation of statin effects on mitochondrial function are relatively few. It is a known fact that hydrophilic statins (e.g. pravastatin, rosuvastatin) are less mytotoxic than lipophilic ones (e.g. atorvastatin, lovastatin), on one hand, due to a more reduced passive diffusion capacity thru the muscle cell membrane and on the other hand, due to a lack of effect of the low pH upon the hydrophilic ones (in an acidic environment, a higher percentage of lipophilic statins remain as lactones, with an increased muscular toxicity).

Currently, mitochondrial dysfunction associated with statin therapy remains a controversial and yet to be fully discovered subject.

Nicotinic acid (NA) represents one of the traditional lipid-lowering drugs, being known especially for its effect of increasing HDL-cholesterol levels and, respectively lowering triglycerides and lipoprotein (a) levels. NA administration was relatively limited by a high incidence of side effects (mainly, skin vasodilatation) and by the fact that investigation of its effects after the association with statins in two recent trial studies, AIM-HIGH (*Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides*) and HPS2-THRIVE (*Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events*) was not only followed by a further reduction in cardiovascular risk, but it was associated with an increased incidence of side effects. Even so, there are some studies that consider NA as a potential viable therapeutical alternative regarding patients that manifest hypercholesterolemia and statin intolerance together with metabolic syndrome, or increased levels of non-HDL cholesterol and of course, in which the targeted-level of LDL-cholesterol cannot be achieved with statins only. In addition, similarly with statins, niacin has pleiotropic effects, with no connection whatsoever to those exerted on lipid metabolism, from which the most studied nowadays are the anti-inflammatory effects on vascular endothelium, adipocytes, and monocytes, and the antioxidant and the anticoagulant effects (fibrinolytic and the inhibition of platelet activation).

There are few data in the international literature regarding the effects of nicotinic acid on the respiratory mitochondrial function.

Diabetes mellitus (DM), the most severe metabolic disorder, has been classified as a '21st century epidemic', due to its increased world prevalence, especially in developing countries including Romania, according to the PREDATOR study; a recent worrisome international prediction estimates that over 590 million people will suffer from diabetes in 2035. The alterations in mitochondrial bioenergetics – especially the decrease of active respiration – is considered today as the common pathogenic mechanism for both types of DM, thus contributing to the onset of diabetic cardiomyopathy. Statins continue to remain the first-line therapy for reducing cardiovascular risk in patients with type 2 DM. Even so, they have been incriminated for an increase of 10-12% of the risk for newly-diagnosed diabetes mellitus according to recent meta-analyses, the responsible mechanism still being unknown.

The effects of statin administration on mitochondrial function in DM patients have been partially studied so far.

THE AIM AND RESEARCH OBJECTIVES

The aim of the present thesis was the evaluation of two soluble cholesterol-lowering drugs, pravastatin and nicotinic acid (niacin), effects on mitochondrial function.

The research objectives consist of:

1. The characterization of the bioenergetic profile of the H9c2 cardiomyoblast cellular line.
2. The evaluation of pravastatin and nicotinic acid effects on respiratory mitochondrial function in H9c2 cardiomyoblasts.
3. The evaluation of pravastatin and nicotinic acid effects on respiratory function in isolated cardiac mitochondria from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Key words: pravastatin, nicotinic acid, H9c2 cardiomyoblasts, rat cardiac mitochondria, bioenergetic function, experimental diabetes mellitus

The research objectives have been achieved by 3 experimental studies:

1st STUDY:

CHARACTERIZATION OF THE BIOENERGETIC PROFILE OF THE H2c9 CARDIOMYOBlast CELLULAR LINE

The purpose of this study consisted in the standardization of the study methodology for the evaluation of the bioenergetic profile (mitochondrial respiration and glycolysis) of H9c2 non-permeabilized cardiomyoblasts. To this aim, we have tested the effects of H9c2 cellular density upon the oxygen consumption rate (OCR) and respectively, the rate of extracellular acidifying rate (ECAR), in both basal conditions and in the presence of pharmacological bioenergetic function modulators.

OCR and ECAR were measured simultaneously after the sequence injection of the 3 components that modify the cellular energetic profile: Oligomycin (1 µg/mL); FCCP (1 and 3.0 µM); Antimycin A (5 µM). The following OCR parameters were calculated and analyzed: *Basal respiratory rate*: the respiration measured before automatic injections; *ATP turnover*: the amount of O₂ consumption used for ATP production; *Proton Leak*: the amount of O₂ used to maintain the proton gradient; *Maximal respiratory rate*: the respiration measured in uncoupled conditions; *The respiratory reserve capacity*: the difference between maximal and basal respiration [2, 4]; *Non-mitochondrial respiration*: the quantity of O₂ consumed by other processes than mitochondrial ones. The respiratory control ratio (RCR) or respiratory index was calculated as the ratio between maximal respiration and proton leak.

The results of the experiments are presented in Table 1.1.

Table 1.1. OCR and ECAR parameters in the H9c2 cellular line.

Analyzed Groups	OCR (nmols/min/nr cells)						ECAR (mpH/min/nrcells)
	BR	PL	ATP t	MR	RC	RCR	
10K/1FCCP	12.13	5.44	6.7	20.42	8.3	3.7	1.3x 10 ⁻³
10K/3FCCP	13.53	3.8	9.72	18.83	5.3	4.9	1.6 x 10 ⁻³
20K/1FCCP	6.7	1.7	5	8.94	2.3	5.3	0.8 x 10 ⁻³
20K/3FCCP	7.2	1.8	5.38	11.52	4.34	6.4	1 x 10 ⁻³
25K/1FCCP	4.8	1.33	3.47	9.91	5.12	7.5	0.85 x 10 ⁻³
25K/3FCCP	6.25	1.51	4.73	12.56	6.31	8.3	1.3 x 10 ⁻³

BR = basal respiration, PL = proton leak, ATP t = ATP turnover, MR = maximal respiration, RC = reserve capacity. Data are described as means of 6-8 measurements/group.

In conclusion, the optimal bioenergetic H9c2 cellular profile was obtained at a 25.000 cells/well density in the presence of 3 µM FCCP. These results regarding the standardization method have been used in the following experiments regarding the pravastatin and nicotinic acid effects upon the bioenergetic profile of H9c2 cells.

The original contribution consists of elaborating, at national level, of a standardized protocol for the evaluation of cellular bioenergetic function that can be used in mitochondrial toxicity studies.

2nd STUDY:

EVALUATION OF PRAVASTATIN AND NICOTINIC ACID EFFECTS ON MITOCHONDRIAL FUNCTION IN H9c2 CARDIOMYOBLASTS

The purpose of this study was to compare the effects of pravastatin (PR) and nicotinic acid (NA) on the bioenergetic profile and mitochondrial respiration in the H9c2 cardiomyoblast cellular line.

2.1. EVALUATION OF PR AND NA EFFECTS ON BIOENERGETIC FUNCTION IN H9c2 CELLULAR LINE

The cellular bioenergetic profile has been evaluated after an acute treatment (60 min incubation period) of H9c2 cells with PR and respectively NA in 4 different concentrations (10, 100, 200, and 400 μ M).

Experiment results are described in tables 2.1 and 2.2.

Table 2.1. OCR and ECAR parameters of cells treated with PR (25 K cells/well).

Analyzed cellular groups	OCR (nmols/min)					ECAR (mpH/min)
	BR	PL	ATP t	MR	RC	
CTRL	189,2	67,87	141,5	457,8	245,6	20.14
10 μ M PR	148,6	23,15	105,1	343,8	183,4	30.47
100 μ M PR	163,7	27,41	132,0	368,0	190,8	25.34
200 μ M PR	161,9	26,09	135,8	357,8	195,9	28.56
400 μ M PR	163,2	26,14	137,1	355,5	177,8	26.59

BR = basal respiration, PL = proton leak, ATP t = ATP turnover, MR = maximal respiration, RC = reserve capacity.

Data are described as means of 6-8 measurements/group.

Table 2.2 OCR and ECAR parameters of cells treated with NA (25Kcells/well)

Analyzed cellular groups	OCR (nmols/min)					ECAR (mpH/min)
	BR	PL	ATP t	MR	RC	
CTRL	148,4	26,95	101,3	331,4	186,3	26,83
10 μ M	156,6	30,83	125,8	386,0	224,4	31,14
100 μ M	151,8	31,81	120,0	357,3	205,5	21,26
200 μ M	149,2	39,10	110,1	250,1	100,9	8,306
400 μ M	143,5	68,54	75,01	65,91	77,63	-11,62

BR = basal respiration, PL = proton leak, ATP t = ATP turnover, MR = maximal respiration, RC = reserve capacity.

Data are described as means of 6-8 determination/group.

PR and NA effects on ECAR are presented in Fig. 2.1 a and b.

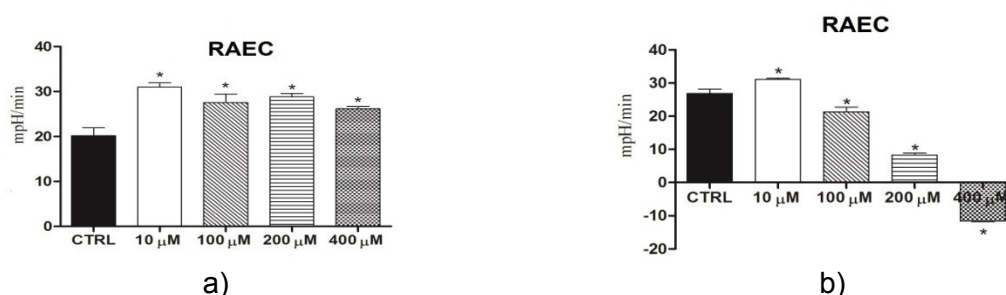


Figure 2.1. The acute effects of PR (a) and NA (b) on ECAR parameters. (n = 6–8/group. *p < 0.05 vs. Ctrl).

We have shown here an inhibitory effect of pravastatin on mitochondrial respiration associated with a stimulation of glycolysis, regardless the tested concentrations on the non-permeabilized H9c2 cardiomyoblast cellular line. Unlike the statin effect, nicotinic acid caused a stimulation of energy production, via both mitochondrial respiration and glycolysis, when it was administered at a concentration of 10 μM, whilst both ways were inhibited at a higher concentration.

In conclusion, the two compounds (in equivalent micromolar concentrations) exert an opposite effect on mitochondrial respiratory function which can explain the lack of additional positive effects during combined administration in clinical studies.

2.2. EVALUATION OF PR AND NA EFFECTS ON MITOCHONDRIAL RESPIRATORY FUNCTION IN H9c2 CELLULAR LINE

Further on, we have studied the effects of minimal PR and NA concentrations (10 μM) on mitochondrial respiratory function in permeabilized H9c2 cells.

The results obtained with high-resolution respirometry experiments, using the oxygraph-2K, in the presence of CI and CII mitochondrial respiratory substrates are presented in Tables 2.3 and 2.4.

Table 2.3. Respiratory rates for CI-dependent mitochondrial respiration measured in pmol/(s*ml).

Permeabilized H9c2 cells in the control group (untreated cells)			
Analyzed parameters	Mean	SEM	Nr. Experiments
State 2	23,98	0,18	6
State 3	123,6	2,41	6
State 4	12,43	1,47	6
RCR	19,38	2,48	6
ETS	122,5	2,51	6
Permeabilized H9c2 cells treated with 10 μM pravastatin			
State 2	18,45**	0,22	6
State 3	113,9**	0,52	6
State 4	7,179*	0,18	6
RCR	15,91	0,37	6
ETS	78,21**	1,84	6
Permeabilized H9c2 cells treated with 10 μM nicotinic acid			
State 2	31,28***	0,31	6
State 3	134,5**	1,82	6
State 4	16,05	0,92	6
RCR	29,90*	1,32	6
ETS	165,8**	2,97	6

Table 2.4 Respiratory rates for *CII*-dependent respiration measured in pmol/(s*ml).

Permeabilized H9c2 cells in the control group (untreated cells)			
Analyzed parameters	Mean	SEM	Nr. Experiments
State 3	104,4	3,15	6
ETS	96,07	1,97	6
Permeabilized H9c2 cells treated with 10 μ M pravastatin			
Stage 3	90,57	0,78	6
ETS	81,75	3,09	6
Permeabilized H9c2 cells treated with 10 μ M nicotinic acid			
Stage 3	99,6	2,90	6
ETS	93,3	2,4	6

In the present study, our data suggest an inhibitory effect of pravastatin (10 μ M) on complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain, on permeabilized H9c2 cells. Regarding nicotinic acid, as expected, the acute administration of the same concentration has induced a stimulation of complex I-dependent respiration (but not on complex II-dependent respiration).

In conclusion, during acute administration, pravastatin inhibits mitochondrial respiration independent of the substrates used, whereas nicotinic acid exerts a substrate dependent stimulatory effect.

3rd STUDY :

EVALUATION OF PRAVASTATIN AND NICOTINIC ACID EFFECTS ON THE RESPIRATORY FUNCTION IN CARDIAC MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RATS WITH STREPTOZOCIN – INDUCED DIABETES MELLITUS

The purpose of this study was to evaluate the effects of the two lipid-lowering drug on respiratory function and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, in rats with experimentally-induced diabetes mellitus, after intraperitoneal administration of streptozotocin (50 mg/kg).

Mitochondrial respiration was quantified by polarographic measurement of oxygen consumption, using the oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria).

Quantification of H₂O₂ mitochondrial production, as an indicator of mitochondrial ROS production, was possible by measuring the degree of oxidation of the Amplex Red fluorescent probe (10 µM) in the presence of 0.6 U/mL horseradish peroxidase.

The results obtained by measuring the mitochondrial function's parameters are presented as means ± SEM in Tables 3.1 and 3.2.

Table 3.1. Respiratory rates for CI-dependent mitochondrial respiration expressed in pmol/(s*mL)

CTRL			
Analyzed Parameters	Mean	SEM	Nr. of Experiments
State 2	38,15	1,25	6
OXPHOS	371,7	15,46	6
State 4	58,47	2,86	6
RCR	9,54	0,35	6
ETS	399,1	25,66	6
Treatment with 10 µM pravastatin			
State 2	36,63	7,72	6
OXPHOS	429,8	86,14	6
State 4	68,02	11,25	6
RCR	10,53	1,43	6
ETS	389,2	74,63	6
Treatment with 10 µM nicotinic acid			
State 2	52,90	6,93	6
OXPHOS	555,3	83,17	6
State 4	72,83	2,08	6
RCR	10,95	1,62	6
ETS	554,6	73,61	6

Table 3.2. Respiratory rates for CII-dependent mitochondrial respiration expressed in pmol/(s*mL)

CTRL			
Analyzed Parameters	Mean	SEM	Nr. of Experiments
State 2	136,0	13,24	6
OXPHOS	619,3	26,4	6
State 4	285,7	2,89	6
RCR	5,06	0,31	6
ETS	618,5	15,2	6
Treatment with 10 µM pravastatin			
State 2	128,2	7,42	6
OXPHOS	510,2	31,39	6
State 4	272,2	26,84	6

RCR	3,67	0,19	6
ETS	566,2	7,79	6
Treatment with 10 μ M nicotinic acid			
State 2	148,0	8,92	6
OXPHOS	610,9	51,26	6
State 4	250,0	33,20	6
RCR	4,50	1,05	6
ETS	582,7	71,46	6

The results obtained regarding the effects of pravastatin and nicotinic acid on H_2O_2 in mitochondria energized with CI and CII substrates are presented in Fig. 3.1. and 3.2.

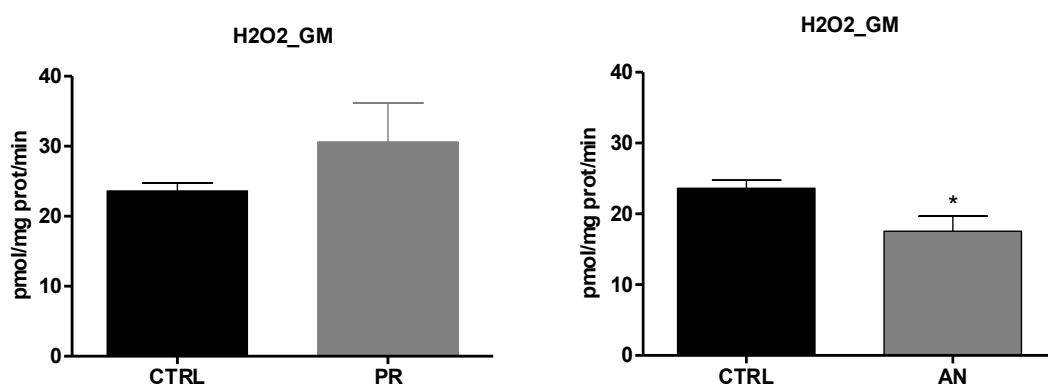


Figure 3.1. H_2O_2 mitochondrial production after PR and NA (10 μ M) acute treatment in mitochondria energized with G/M (5 mM glutamate + 5 mM malate) (n = 6/group, *p < 0,05 vs. Ctrl).

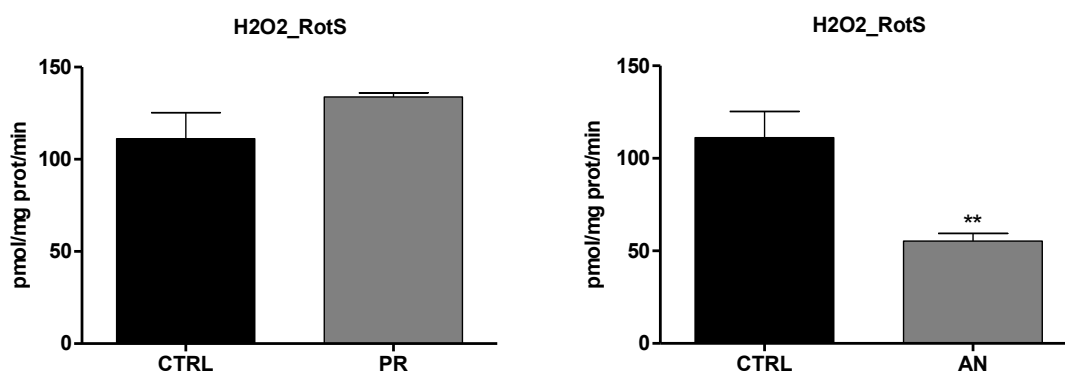


Figure 3.2. H_2O_2 mitochondrial production after PR and NA (10 μ M) acute treatment in mitochondria energized with S/Rot (5 mM succinate + 0.5 μ M rotenone). (n = 6/group, **p < 0,01 vs. Ctrl)

In conclusion, in the case of isolated mitochondria from cardiac tissue obtained from rats with pharmacologically-induced diabetes mellitus, we have identified an alteration of pravastatin-induced mitochondrial respiration (10 μ M) on complex I- and especially complex II-dependent respiration. On contrary, the acute administration of nicotinic acid (10 μ M) has stimulated the mitochondrial respiration independent of substrates used, which suggests a possible therapeutical effect of this type of lipid-lowering drug in DM patients.

Regarding the acute effect of pravastatin (10 μ M) on mitochondrial oxidative stress, we demonstrated a slight increase in ROS production independent of the substrates used, whilst nicotinic acid (10 μ M) had a clear antioxidant effect, by reducing H_2O_2 production,

independent of the substrates used. Considering that diabetes mellitus is associated with a systemic oxidative stress, we might speculate the beneficial effects of NA in these patients.

Our results regarding to statin effects are consistent with those of Stephan Krahenbuhl's group that demonstrated the existence of a slight increase in simvastatin-induced oxidative stress in the myocardium (and extremely evident in the skeletal muscle), which confirms the current paradigm, that statins affect the skeletal muscle but not the cardiac muscle (the mitohormetic effect). In response to cardiomyocytes incubation with simvastatin, the increase of ROS has been associated with a beneficial effect, of secondary messengers able to intensify the antioxidant enzyme expression and to stimulate mitochondrial biogenesis, aspects that could not be evaluated in our study. Nevertheless, we might speculate that the association between nicotinic acid (with proven antioxidant effect) and statins may lead to the inhibition of intracellular signaling that is responsible for the positive cardiac effect of the latter.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Evaluation of the bioenergetic profile of the non-permeabilized H9c2 cardiomyoblast cellular line with the XF^e24 (Agilent Seahorse Bioscience) flow analyzer has proven the following :
 - Pravastatin had an inhibitory effect on mitochondrial respiration, associated with stimulation of glycolysis, regardless the concentration used (10, 100, 200, 400 μ M)
 - Nicotinic acid, in the minimal tested concentration, determined an increase in cellular energy production, with regards to mitochondrial respiration as well as glycolysis, whilst both pathways have been inhibited by higher concentrations.
2. Evaluation of the mitochondrial function in permeabilized H9c2 cardiomyoblasts with the oxygraph-2K (Oroboros, Austria) proved that pravastatin had an inhibitory effect on complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain at a 10 μ M concentration, whilst nicotinic acid, in the same concentration, induced a stimulation of mitochondrial respiration.
3. Evaluation of the mitochondrial respiration in the case of isolated mitochondria from cardiac tissue obtained from rats with pharmacologically-induced diabetes mellitus identified : (i) an alteration of mitochondrial respiration induced by pravastatin, independent of the substrates used ; (ii) a stimulation in mitochondrial respiration, also independent of the substrates used, induced by nicotinic acid, both compounds being tested at the same concentration (10 μ M).
4. Evaluation of the mitochondrial oxidative stress in the case of isolated mitochondria from cardiac tissue obtained from rats with pharmacologically-induced diabetes mellitus identified : (i) an increased (yet insignificant) pravastatin-induced H₂O₂ production (at 10 μ M) and (ii) a significant reduced H₂O₂ production induced by nicotinic acid (at 10 μ M).

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

1. Standardization, as a national premiere, of the evaluation protocol of the bioenergetic profile in H9c2 cardiomyoblasts using the XF^e24 Seahorse extracellular flow analyzer.
2. Standardization of high-resolution respirometry measurements for permeabilized cells using the Oroboros O2-K oxygraph, which complements the study protocols on permeabilized muscle fibers developed in the same scientific department.
3. Comparative evaluation, as an international premiere, between the effects of pravastatin and nicotinic acid on the cellular bioenergetic profile and the function of isolated heart mitochondria obtained from rats with experimentally-induced diabetes mellitus.

LIST OF PUBLISHED ARTICLES

The PhD thesis is based upon the following articles :

1. Ileana Scurtu, A. Sturza, Ioana Zinuca Pavel, Roxana Popescu, Andreea Privistirescu, Oana Maria Duicu, Danina Mirela Muntean. *Bioenergetic characterization of H9c2 cells using the extracellular flux analyzer*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 2015 ; 119(2) :491-5. (B+, BDI journal).
2. Scurtu I., Popescu R, Privistirescu A, Sturza A, Pavel IZ, Verdes D, Duicu OM, Muntean DM. *The Effects of Two Lipid-Lowering Drugs on Mitochondrial Respiration in H9c2 Cell Line*. Fiziologia – Physiology 2015 ; 25(4) :66-69. (B+, BDI journal)