

7. STRESZCZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie bariery śródbłonkowej jest jednym z warunków zachowania homeostazy układu sercowo-naczyniowego. W przebiegu dysfunkcji śródbłonka obserwowane są zmiany w adhezji na poziomie komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, organizacji cytoszkieletu, migracji i śmierci komórek, a co za tym idzie, również w przepuszczalności śródbłonka. Jednym z czynników prowadzących do dysfunkcji śródbłonka jest stres oksydacyjny. Skutkiem zaburzeń równowagi oksydoredukcyjnej w komórce jest uszkodzenie cząsteczek lipidów, białek oraz DNA. Nasilone działanie reaktywnych form tlenu prowadzi również do wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Jony te stanowią istotny wewnątrzkomórkowy przekaznik informacji, stąd ich stężenie jest ściśle kontrolowane przez liczne kanały i pompy jonowe zlokalizowane w błonie komórkowej i siateczce śródplazmatycznej. Jednym z błonowych kanałów wapniowych, którego aktywację obserwuje się w przebiegu stresu oksydacyjnego jest kanał potencjału receptora przejściowego dla melastatyny 2 (TRPM2, ang. *transient receptor potential melastatin 2*). Najlepiej opisanym aktywatorem TRPM2 jest ADP-ryboza. Wzrost poziomu ADP-rybozy następuje z udziałem enzymów PARP i PARG w odpowiedzi na jednoniciowe pęknięcia w obrębie DNA, co może być skutkiem działania stresu oksydacyjnego. Kanał TRPM2 stanowi więc punkt łączący stres oksydacyjny, jony Ca^{2+} i dysfunkcję śródbłonka.

Celem pracy była ocena znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania i odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego na warunki stresu oksydacyjnego, jak również ocena możliwości potencjalnego wykorzystania inhibitorów kanału TRPM2 albo enzymu PARP w prewencji i terapii chorób układu krążenia, których powstawanie związane jest ze stanem dysfunkcji śródbłonka.

Materiałem wykorzystanym w badaniach były modelowe komórki śródbłonka linii EA.hy926. W celu indukcji stresu oksydacyjnego komórki hodowano w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h. W celu manipulacji poziomem ekspresji TRPM2 do komórek wprowadzono siRNA przeciwko TRPM2 wykorzystując technikę elektroporacji metodą nukleofekcji. Jako kontrolę zastosowano zarówno komórki nietransfekowane, jak i transfekowane siRNA o sekwencji niemającej miejsc rozpoznania w ludzkich mRNA. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie nadtlenu wodoru wobec ekspresji TRPM2 badano w zakresie: ich żywotności,

rodzaju indukowanej śmierci, wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , zdolności migracyjnych, poziomu i lokalizacji wybranych białek połączeń międzykomórkowych oraz organizacji cytoszkieletu aktynowego. W celu obniżenia aktywności kanału TRPM2 wykorzystano wstępną inkubację komórek z inhibitorami kanału (kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy – ACA oraz kwas flufenamowy – FFA) lub enzymu PARP (3-amonobenzamid – 3-AB oraz 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon – DPQ) na 30 min przed ekspozycją komórek na działanie nadtlenu wodoru. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium wzrostowym bez dodatku nadtlenu wodoru. Odpowiedź komórek na wybrane inhibitory TRPM2 albo PARP, nadtlenek wodoru oraz kombinację danego inhibitora i nadtlenu wodoru oceniono z wykorzystaniem: testu MTT, w zakresie zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego, rodzaju indukowanej śmierci komórek, potencjału migracyjnego oraz znakowania fluorescencyjnego wybranych białek połączeń międzykomórkowych oraz cytoszkieletu aktynowego. Stężenia zastosowanych inhibitorów TRPM2 lub PARP oraz nadtlenu wodoru zostały wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz wyników testu MTT.

Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTT wykazała, że w grupie komórek nietransfekowanych po potraktowaniu nadtlakiem wodoru dochodzi do spadku ich aktywności metabolicznej w sposób zależny od stężenia. Podobnie, komórki transfekowane siRNA kontrolnym odpowiadały na wybrane stężenia nadtlenu wodoru w sposób zbliżony do komórek nietransfekowanych. Z kolei komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 cechowały się wyższą żywotnością w porównaniu do grupy komórek nietransfekowanych lub transfekowanych siRNA kontrolnym potraktowanych poszczególnymi stężeniami nadtlenu wodoru. Obniżenie aktywności kanału TRPM2 poprzez wstępną inkubację komórek z wybranymi inhibitorami kanału TRPM2 albo enzymu PARP hamowało również negatywne oddziaływanie nadtlenu wodoru na komórki linii EA.hy926. Wyjątkiem był 3-AB, który indukował znaczny spadek żywotności komórek linii EA.hy926 i nie wykazywał działania protekcyjnego względem obecności nadtlenu wodoru w medium wzrostowym, przez co wyeliminowano go z dalszych badań. Na podstawie wyników testu MTT, do kolejnych eksperymentów wybrano stężenie 100 μM nadtlenu wodoru, jako najniższe, dla którego zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w odpowiedzi komórek nietransfekowanych oraz z obniżoną aktywnością lub poziomem TRPM2. Podwójne barwienie komórek aneksyną

V i jodkiem propidyny wykazało, że hodowla komórek linii EA.hy926 w obecności nadtlenu wodoru indukuje śmierć komórek na drodze apoptozy, co było widoczne zarówno w grupie komórek nietransfekowanych oraz transfekowanych siRNA kontrolnym. W przypadku komórek transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w odsetku komórek apoptotycznych pomiędzy nietraktowaną kontrolą a komórkami hodowanymi w obecności nadtlenu wodoru. Indukowana nadtlaniem wodoru śmierć komórek na drodze apoptozy została również efektywnie zahamowana poprzez zastosowanie wybranych inhibitorów kanału TRPM2 albo enzymu PARP. Ponadto, nadtlenek wodoru skutkował szybkim wzrostem fluorescencji wskaźnika jonów Ca^{2+} w komórkach nietransfekowanych. Efekt ten został znacząco ograniczony w komórkach transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2. Cytometryczna ocena intensywności fluorescencji PI w obecności RNAz wykazała zmianę w zakresie rozkładu cyklu komórek traktowanych nadtlaniem wodoru przez 24 h względem komórek kontrolnych. Inkubacja komórek z ACA i FFA nie powodowała widocznych zmian w zakresie rozkładu cyklu komórkowego w odniesieniu do kontroli. Natomiast w przypadku komórek poddanych działaniu DPQ, zaobserwowano niewielki wzrost ilości komórek o zawartości DNA specyficznej dla tych, które znajdują się pomiędzy fazą G1 a G2 cyklu. Nie zaobserwowano zmian w odniesieniu do komórek kontrolnych w zakresie rozkładu cyklu komórek potraktowanych ACA, FFA oraz DPQ a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h. Testy migracyjne, tj. test gojenia się ran oraz test migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego, wykazały, że hodowla komórek linii EA.hy926 w obecności 100 μM nadtlenu wodoru przez 24 h skutkuje ograniczeniem zdolności migracyjnych komórek. W grupie komórek nietransfekowanych po potraktowaniu ich 100 μM nadtlaniem wodoru zaobserwowano istotne statystycznie różnice względem kontroli w powierzchni ran w wybranych punktach czasowych oraz zmniejszenie ilości komórek zdolnych do migracji przez membranę insertów o porach wielkości 3 μm . W przypadku komórek transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 również widoczny był niewielki spadek zdolności migracyjnych komórek, jednak różnice te nie były znaczące względem komórek kontrolnych. Hodowla komórek w obecności wybranych inhibitorów TRPM2 albo PARP nie wpływała istotnie na zdolność ruchu komórek. W przypadku komórek potraktowanych wstępnie inhibitorami przez 30 min, a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru, potwierdzono skuteczne ograniczenie negatywnego oddziaływania nadtlenu wodoru na migrację komórek. Wykorzystany do badań inhibitor enzymu PARP – DPQ, najskuteczniej

hamował ograniczenie migracji komórek spowodowane działaniem nadtlenu wodoru. Fluorescencyjne znakowanie białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych oraz cytoszkieletu aktynowego wykazało, że potraktowanie komórek nadtlakiem wodoru skutkowało przekształceniem się wzoru połączeń międzykomórkowych na rozkład punktowy. Co więcej, utrata komórek poprzez ich śmierć na drodze apoptozy oraz ograniczenie ciągłości połączeń międzykomórkowych skutkowały pojawieniem się dodatkowych przestrzeni pomiędzy komórkami. Obniżenie poziomu TRPM2 wykazywało działanie protekcyjne względem monowarstwy komórkowej. Nawet pod wpływem działania nadtlenu wodoru, zachowany został ciągły charakter połączeń międzykomórkowych oraz nie obserwowano istotnie większych przestrzeni pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Nie widać było również zwiększonej ilości komórek o cechach śmierci na drodze apoptozy. Wprawdzie w przypadku komórek potraktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 albo PARP 30 min przed właściwym traktowaniem nadtlakiem wodoru przez 24 h zaobserwowano cechy poliploidii wyrażone obecnością dodatkowych mikrojąder, to zmiany te nie były jednak tak nasilone jak w przypadku komórek potraktowanych wyłącznie nadtlakiem wodoru. Co więcej, obserwowano wyraźnie mniej komórek o cechach sugerujących śmierć komórek na drodze apoptozy, a gęstość monowarstwy oraz ciągłość struktury połączeń międzykomórkowych była zbliżona do tej obserwowanej w kontroli. Wyniki te potwierdzono wykorzystując ocenę potranslacyjnej ekspresji białek metodą Western blot. W komórkach nietransfekowanych po potraktowaniu ich nadtlakiem wodoru 100 μ M przez 24 h potwierdzono znaczący spadek ekspresji białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych, czego nie potwierdzono dla żadnej z pozostałych grup badanych.

Uzyskane wyniki wskazują, że stres oksydacyjny imitowany w komórkach linii EA.hy926 poprzez traktowanie ich nadtlakiem wodoru prowadzi do zmian charakterystycznych dla dysfunkcji śródbłona. Ograniczenie poziomu kanału TRPM2 poprzez transfekcję komórek siRNA przeciwko TRPM2 oraz zmniejszenie aktywności kanału z wykorzystaniem inhibitorów TRPM2 albo PARP wykazują działanie protekcyjne względem komórek śródbłona linii EA.hy926 traktowanych nadtlakiem wodoru. Błonowy kanał wapniowy TRPM2 może więc być rozważany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, których podłożem jest stres oksydacyjny. Ponadto, wykorzystane w badaniach inhibitory kanału TRPM2 (ACA i FFA) lub enzymu PARP (DPQ) skutecznie hamują

odpowiedź komórek linii EA.hy926 na działanie nadtlenu wodoru, jednak możliwość ich aplikacji klinicznej wymaga dalszych badań.