

Streszczenie

Śródbłonek naczyniowy tworzy pojedynczą warstwę komórek wyściełającą naczynia krwionośne stanowiąc jednocześnie pierwszą linię kontaktu z warunkami panującymi w krwi. Prawidłowe funkcjonowanie śródbłonna przekłada się na prawidłowe działanie układu krążenia a w konsekwencji całego organizmu. Dysfunkcja śródbłonna związana jest z rozwojem wielu chorób sercowo-naczyniowych. W komórkach śródbłonna synteza ATP zachodzi głównie drogą glikolityczną. Stosunkowo niewielka zależność komórek śródbłonna od mitochondrialnego dostarczania energii może sugerować nieznaczną rolę mitochondriów w tych komórkach. Jednakże ostatnie badania pokazują, że mitochondria śródbłonna nie tylko uczestniczą w procesie wytwarzania ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, ale również odgrywają rolę wewnątrzkomórkowego buforu jonów wapnia oraz są istotnym miejscem wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) i tlenku azotu (NO). Mitochondria komórek śródbłonna mogą pełnić rolę czujnika zmian zachodzących w lokalnym środowisku (krwi) oraz wpływać na przeżywanie tych komórek w warunkach stresu oksydacyjnego. Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie metabolizmu tlenowego komórek śródbłonna EA.hy926 w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Zmiany w metabolizmie tlenowym (mitochondrialnym) badano na poziomie całych komórek śródbłonna oraz mitochondriów izolowanych z tych komórek.

Realizacja projektu wymagała opracowania procedury hodowli komórek śródbłonna (unieśmierteliona linia z ludzkiej żyły pępowinowej EA.hy926) na bardzo dużą skalę oraz opracowania procedury izolacji z tych komórek dużej ilości aktywnych, dobrze sprzężonych mitochondriów. Przedstawione wyniki pokazują, że komórki śródbłonna, mimo głównie glikolitycznego dostarczania energii, posiadają bardzo aktywne, sprzężone mitochondria.

Pierwszym celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu chronicznego, wysokiego stężenia glukozy na metabolizm tlenowy komórek śródbłonna. Komórki śródbłonna EA.hy926 hodowano w mediach zawierającym 5.5 mM lub 25 mM glukozę, co reprezentuje odpowiednio normalne i wysokie stężenie glukozy. Zmiany w oddychaniu obserwowano w komórkach śródbłonna rosnących co najmniej 6 dni w 25 mM glukozie. Hodowla komórek śródbłonna w warunkach wysokiej glukozy powoduje znaczne obniżenie mitochondrialnego oddychania podczas utleniania pirogronianu i glukozy (katabolizmu węglowodanów), mniej wyraźne obniżenie mitochondrialnego oddychania z glutaminą (katabolizmu aminokwasów) oraz istotne zwiększenie mitochondrialnego oddychania z palmitynianem (katabolizmu tłuszczu). Efekt Crabtree obserwowano w obu typach komórek.

Komórki śródbłonka rosnące w warunkach wysokiego stężenia wykazują większą ilość koenzymu Q10 oraz podwyższoną produkcję ROS. Ponadto ekspozycja komórek śródbłonka na wysokie stężenie glukozy indukuje wzrost ekspresji heksokinazy I (HK1), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy acetylo-CoA (ACADS), białka rozprzęgającego 2 (UCP2), dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2), oraz obniżoną ekspresję podjednostki E3 kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (E3BP). W mitochondriach izolowanych z komórek śródbłonka hodowanych w warunkach wysokiego stężenia glukozy obserwowano wzrost utleniania palmitylo-karnityny i glicerolo-3-fosforanu oraz obniżenie utleniania pirogronianu. Przeprowadzone badania wskazują, że w komórkach śródbłonka chroniczne, wysokie stężenie glukozy prowadzi do przesunięcia metabolizmu tlenowego w stronę utleniania tłuszczu i aminokwasów.

Występujące we wewnętrznej błonie mitochondrialnej białka rozprzęgające (UCPs) katalizują przeciek protonów prowadzący do zmniejszenia protonowego gradientu elektrochemicznego wytworzonego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. UCPs są aktywowane przez wolne kwasy tłuszczowe a ich allosterycznymi inhibitorami są nukleotydy purynowe. UCPs poprzez rozpraszanie użytecznej energii swobodnej pochodzącej z utleniania substratów oddechowych stanowią ważny punkt kontrolny gospodarki energetycznej komórki oraz mitochondrialnej produkcji reaktywnych form tlenu (mROS). Przedstawione badania charakteryzują funkcjonowanie i antyoksydacyjną rolę UCP2 w komórkach śródbłonka oraz w izolowanych z nich mitochondriach. Badania opisują zmiany w funkcjonowaniu UCP2 wywołane długotrwałą ekspozycją komórek śródbłonka na wysokie stężenie glukozy. Ludzkie komórki śródbłonka EA.hy926 hodowano w medium zawierającym wysokie (25 mM) lub normalne (5.5 mM) stężenie glukozy. W warunkach fosforylujących oraz nefosforylujących, aktywność UCP2 jest znacznie wyższa w mitochondriach izolowanych z komórek śródbłonka rosnących w warunkach wysokiej glukozy. Ponadto obserwowano zwiększoną kontrolę przez UCP2 szybkości oddychania, potencjału błonowego oraz produkcji mROS. Wydajniejsze obniżanie produkcji mROS za pośrednictwem UCP2 wskazuje na zwiększoną antyoksydacyjną rolę UCP2 w mitochondriach izolowanych z komórek rosnących w warunkach wysokiego stężenia glukozy. Mitochondrialna oraz komórkowa produkcja ROS jest znacznie wyższa w komórkach śródbłonka rosnących w warunkach wysokiej glukozy niezależnie od ekspresji UCP2. Wyciszenie ekspresji genu UCP2 prowadzi do znacznie większej produkcji mROS oraz zwiększonej ekspresji ICAM1 (cząsteczki adhezyjnej będącej markerem stanu zapalnego), szczególnie w komórkach rosnących w wysokim stężeniu glukozy. Badania

wykazały, że UCP2 wpływa na żywotność komórek śródbłonka oraz ich odporność na stres oksydacyjny. Komórki śródbłonka wystawione na podwyższony poziom glukozy są znacznie bardziej odporne na nadtlenek wodoru. W komórkach tych, wzrost aktywności UCP2 prowadzi do znacznie zwiększonej odporności na stres oksydacyjny. Przedstawione wyniki pokazują, że UCP2 może służyć jako czujnik oraz negatywny regulator produkcji mROS w odpowiedzi komórek śródbłonka na podwyższony poziom glukozy.

Kolejnym celem przeprowadzonym badań było określenie wpływu niskiego stężenia tlenu w hodowli na metabolizm oksydacyjny ludzkich komórek śródbłonka. Komórki śródbłonka EA.hy926 hodowano w warunkach 1% lub 20% stężenia tlenu, reprezentujących odpowiednio hipoksję oraz normoksję. Badania pokazały, że 6-dniowa ekspozycja komórek śródbłonka na 1% stężenie tlenu powoduje liczne zmiany w ich metabolizmie tlenowym na poziomie komórek oraz izolowanych mitochondriów. Hipoksja powoduje zwiększoną fermentację, jednocześnie nie doprowadzając do zmian w biogenezie mitochondriów oraz w ich pojemności oddechowej. W komórkach śródbłonka chroniczna hipoksja obniża utlenianie węglowodanów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów z wyjątkiem aminokwasów ketogennych. Hipoksja prowadzi do wzrostu całkowitej i mitochondrialnej produkcji ROS, jednakże białka systemu antyoksydacyjnego (SOD1, SOD2, UCP2) nie ulegają zwiększonej ekspresji. Ekspozycja komórek śródbłonka na niedotlenienie prowadzi do znaczącej reorganizacji mitochondrialnego łańcucha oddechowego z przeciwstawną regulacją dwóch najważniejszych dehydrogenaz (zwiększona aktywność kompleksu II, zmniejszona aktywność kompleksu I). Zwiększonej aktywności kompleksu II towarzyszy zwiększona produkcja mROS, głównie poprzez odwrócony transport elektronów. Wzrost komórek śródbłonka w warunkach chronicznej hipoksji prowadzi do obniżenia aktywności oraz ekspresji UCP2. Wyniki te pokazują, że (i) wzrost komórek śródbłonka w warunkach chronicznego niedotlenienia powoduje przesunięcie katabolizmu z tlenowego na beztlenowy; (ii) w mitochondriach komórek poddanych chronicznej hipoksji, kompleks II pełni istotną rolę w produkcji mROS, głównie poprzez odwrócony transport elektronów; oraz (iii) indukowany hipoksją zwiększony poziom mROS stanowi ważny element sygnalizacyjny w metabolicznej odpowiedzi komórek śródbłonka na warunki obniżonego stężenia tlenu.

W przedstawionej pracy scharakteryzowano kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie (BK_{Ca}) mitochondriów komórek śródbłonka EA.hy926. Przy użyciu przeciwciał skierowanych na podjednostki kanału BK_{Ca} błony plazmatycznej, zidentyfikowano w wewnętrznej błonie mitochondriów śródbłonka tworzącą por kanału podjednostkę α oraz podjednostkę regulatorową $\beta 2$. Substancje znane jako modulatory

aktywności kanału BK_{Ca} wpływają na bioenergetykę mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonka. W warunkach niefosforylujących, aktywatory: 100 μM Ca²⁺, 10 μM NS1619 oraz 0.5 μM NS11021 depolaryzują mitochondrialny potencjał błonowy oraz stymulują oddychanie. Efekt ten jest blokowany przez paksylinę i iberiotoksynę w sposób zależny od obecności jonów potasu. Wyniki te pokazują po raz pierwszy, że w wewnętrznej błonie mitochondriów ludzkich komórek śródbłonka EA.hy926 obecny jest kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie mający właściwości podobne to kanału obecnego w błonie plazmatycznej.