

Izabela Broniarek

Streszczenie pracy doktorskiej

Śródbłonek wyściela wszystkie naczynia krwionośne i limfatyczne. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu tych komórek, a także ich mitochondriów, są elementem etiologii i przebiegu wielu chorób cywilizacyjnych np. cukrzyca i miażdżyca. Z rozwojem tych chorób związane są zaburzenia w gospodarce tłuszczowej organizmu. Przykładowo, w przebiegu cukrzyca obserwuje się podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych we krwi, a wśród czynników ryzyka zachorowania na miażdżycę jest hipercholesterolemia, którą leczy się statynami. Zarówno kwasy tłuszczowe jak i statyny są obecne we krwi, w związku z czym śródbłonek jest poddawany ekspozycji na te związki. W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było poznanie wpływu kwasów tłuszczowych i statyn na metabolizm tlenowy komórek śródbłonka na przykładzie komórek linii EA.hy926.

Wyniki pierwszej części pracy wykazały, że długotrwała ekspozycja na podwyższone stężenie kwasu palmitynowego wywołuje obniżenie żywotności i liczebności komórek śródbłonka. Towarzyszy temu przesunięcie komórkowego metabolizmu tlenowego w stronę utleniania kwasów tłuszczowych. Zaobserwowano także nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz wzrost produkcji mitochondrialnych i niemitchondrialnych reaktywnych form tlenu. Opisane zmiany świadczą o tym, że reakcja mitochondriów jest znaczącym elementem odpowiedzi komórek śródbłonka na działanie nadmiaru kwasów tłuszczowych.

Następnie zbadano bezpośredni wpływ statyn na izolowane mitochondria śródbłonka. Okazało się, że hydrofilowa prawastatyna nie zmienia istotnie metabolizmu tlenowego mitochondriów. Natomiast hydrofobowa atorwastatyna zaburza funkcjonowanie łańcucha oddechowego, na co składają się rozprężanie, a w wyższych stężeniach, inhibicja fosforylacji oksydacyjnej. Zmiany wywoływane przez atorwastatynę mają związek z jonami wapnia zawartymi w cząsteczce tej statyny. Atorwastatyna wywołuje także wzrost produkcji nadtlenu wodoru w mitochondriach. Zaobserwowane efekty są niezwiązane z inhibicją szlaku miewalonowego przez statyny.

Z kolei, badania poświęcone długotrwałemu wpływowi statyn na komórki śródbłonka umożliwiły obserwację skutków zahamowania tego szlaku na metabolizm tlenowy tych komórek. Wyniki wykazały, że traktowanie komórek śródbłonka prawastatyną lub atorwastatyną powoduje obniżenie tlenowego oddychania komórkowego (poza utlenianiem kwasów tłuszczowych) niekompensowany przez glikolizę beztlenową. Ponadto, atorwastatyna, ale nie prawastatyna, indukuje znaczący wzrost produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonka. Po ekspozycji komórek na statyny następuje obniżenie stężenia koenzymu Q10. Zaobserwowane zmiany pozwalają stwierdzić, że hydrofobowa atorwastatyna działa na komórki śródbłonka silniej i w bardziej szkodliwy sposób niż hydrofilowa prawastatyna. Długotrwała ekspozycja na statyny w stężeniach występujących fizjologicznie, wpływa znacząco, choć nie drastycznie, na metabolizm tlenowy komórek śródbłonka. Wydaje się, że obniżenie stężenia koenzymu Q10 nie w pełni tłumaczy zaobserwowane zmiany, dlatego też potrzebne są dalsze badania by wyjaśnić ich przyczyny.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały istotne zmiany w metabolizmie tlenowym komórek śródbłonka poddanych ekspozycji na statyny i podwyższone stężenie kwasu palmitynowego. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań i mogą być użyteczne w opracowywaniu nowych terapii zaburzeń układu naczyniowego.

Abstract

All blood and lymph vessels are lined with endothelium. The incorrect functioning of endothelial cells and mitochondria affects the etiology and course of many diseases of civilization, e.g., diabetes and atherosclerosis. In case of both of these medical conditions the origins or symptoms are lipid metabolism disorders. The elevated level of free fatty acids in blood is observed in the course of diabetes. One of the risk factors in atherosclerosis is hypercholesterolemia, normally treated with statins. Therefore, due to the presence of both fatty acids and statins in blood, endothelium is exposed to these chemical compounds. The aim of this study was to assess the influence of fatty acids and statins on oxidative metabolism in endothelial cells and their mitochondria.

The results of the first part of this work show that a chronic exposition to elevated levels of palmitic acid caused a reduced viability and number of endothelial cells. A shift in endothelial aerobic metabolism towards the oxidation of fatty acids was observed. High palmitic acid levels increased intracellular and mitochondrial superoxide generation and caused impairment and uncoupling of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. Our data indicate that free fatty acids significantly affect endothelial oxidative metabolism, reactive oxygen formation and cell viability and, thus, might contribute to endothelial and vascular dysfunction. The mitochondrial reaction could be a significant element in endothelial cellular response to the excess of free fatty acids.

In the second part of this project, it was analyzed how statins could directly affect mitochondria isolated from endothelial cells, independently of the inhibition of mevalonate pathway. Hydrophilic pravastatin did not significantly affect endothelial mitochondrial function. In contrast, hydrophobic calcium-containing atorvastatin induced an increase in hydrogen peroxide formation and reductions in maximal respiratory rate, membrane potential and oxidative phosphorylation efficiency. The atorvastatin-induced changes indicate an impairment of mitochondrial function at the level of ATP synthesis and at the level of the respiratory chain. The atorvastatin action on endothelial mitochondria was highly dependent on calcium ions that induced mitochondrial uncoupling enhancing the inhibition of the mitochondrial respiratory chain. Our results indicate that hydrophobic calcium-containing atorvastatin, widely used as anti-atherosclerotic agent, has a direct negative action on isolated endothelial mitochondria.

The results of the third part of this study show that a prolonged exposition of endothelial cells to physiological concentrations of statins, atorvastatin and pravastatin, caused slight but statistically significant changes in endothelial aerobic metabolism. Statins decreased the oxidation of glucose that was uncompensated by an aerobic glycolysis. In endothelial cells, statins increased intracellular reactive oxygen species generation and caused a decrease in coenzyme Q10 concentration indicating inhibition of mevalonate pathway. The observed changes indicate that hydrophobic atorvastatin affects endothelial cells in a more negative and intense way comparing to hydrophilic pravastatin. Our data indicate that statins significantly influenced endothelial oxidative metabolism, reactive oxygen formation and cell viability and, thus, might contribute to endothelial and vascular dysfunction. Further studies are needed to elucidate statin-induced effects on endothelial oxidative metabolism, especially at the level of endothelial mitochondria.

To sum up, this research showed significant changes in oxidative metabolism of endothelial cells exposed to statins and elevated palmitic acid concentrations. The obtained results are a base for further investigations.