

A magas koleszterinszint hatása szimulált iszkémia/reperfúzió okozta károsodásban izolált felnőtt szívizomsejt modellben

Visontai Péter SE ÁOK IV.
peter.visontai@gmail.com

Bevezetés. A metabolikus betegségek, mint a hiperlipidémia, metabolikus szindróma, vagy az elhízás az iszkémiás szívbetegség fontos rizikófaktorai, és rontják annak prognózisát. Korábban kutatócsoportunk koleszterinnel dúsított táplálékkal már hozott létre kísérletes hiperkoleszterinémiát in vivo patkány modellben, azonban az intracelluláris folyamatok vizsgálatához a sejtenyészeti modellek elengedhetetlenek. Ezért jelen kísérlet célja, hogy szívizomsejt tenyészeteken modellezzük a hiperkoleszterinémiát és vizsgáljuk annak hatását szimulált iszkémia/reperfúziós (SI/R) károsodásban.

Módszer. Fialat felnőtt Wistar patkányokból szívizomsejteket izoláltunk, amelyeket két napig tenyésztettünk kontroll, és három, különböző koleszterin koncentrációjú médiumban (M1, M2, M3 csoportok). Ezt követően a sejtek 30 percen át szimulált iszkémiának voltak kitéve (hipoxiás oldat + 95% N₂ és 5% CO₂ gázkeverék átáramoltatása), amelyet két óra szimulált reperfúzió követett (M1-M3 + normoxiás körülmények). Kontrollként normoxiás csoportokat alkalmaztunk. A sejtek életképességét fluoreszcens calcein festéssel vizsgáltuk, míg a teljes sejtszámot digitonin + propidium-jodiddal határoztuk meg. Az oxidatív stressz szintjének értékelése dihidroetidium (szuperoxid kimutatása) és 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetát eljárás (teljes reaktív oxigén intermedier szint kimutatása) alkalmazásával történt.

Eredmények. Eredményeinket a kontrollhoz (100%) viszonyítva adjuk meg. A sejtek életképessége koleszterinkoncentráció-függő módon csökkent az SI/R csoportokban (M1: 70±18%, M2: 54±14%, M3: 53±5%) és a normoxiás kontroll csoportokban is (M2: 78±24%, M3: 83±23%). Az oxidatív stressz-mérések emelkedett szuperoxid-gyök felszabadulást mutattak az SI csoportokban (M2: 351±117%, M3: 295±23%). Az általános ROS termelés emelkedett a normoxiás csoportokban (M2: 162±26%, M3: 171±62%) és egy szimulált iszkémiás csoportban is (M1: 307±195%). Egyutas ANOVA tesztet használtunk ($p < 0.05$), Tukey posthoc tesztel.

Diskusszió. A szívizomsejtek életképessége hiperkoleszterinémiá modellünkben csökkent, továbbá az oxidatív stressz a koleszterin szint függvényében nőtt, melyet súlyosított a szimulált iszkémia/reperfúziós károsodás. Mindezek alapján a jelen in vitro komorbiditás modell alkalmas lehet gyógyszer-molekula jelöltek hatékonyságának és toxicitásának tesztelésére is szívizomsejt tenyészeteken.

Cholesterol diet leads to attenuation of ischemic preconditioning-induced cardiac protection: the role of connexin 43. Görbe A et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011

Cholesterol-enriched diet inhibits cardioprotection by ATP-sensitive K⁺ channel activators cromakalim and diazoxide. Csonka C et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014

A jelen tanulmány in vitro vizsgálja a magas koleszterinszint hatását, míg az eddigi publikációkban in vivo modelleket alkalmaztunk.

Témavezető(k): Dr. Brenner Gábor tudományos segédmunkatárs, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Dr. Görbe Anikó egyetemi docens Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

A lizofoszfátidsav vazokonstriktor hatásában szerepet játszó egyedi jelátviteli utak azonosítása

Panta Cecília Rita SE ÁOK V.
sokszem@gmail.com

Bevezetés. Munkacsoportunk korábbi megfigyelései szerint a lizofoszfátidsav (LPA) ép endothelium esetén LPA1 receptor (LPA1) által közvetített vazorelaxációt okoz, endothelium hiányában viszont kontrakciót, aminek közvetítésében az LPA1 és/vagy LPA3 receptorok, valamint a thromboxán A₂ (TXA₂) receptor (TP) is szerepet játszik. Jelen kísérleteinkben a vazokonstriktort közvetítő LPA receptor valamint a hozzá kapcsolt jelátviteli út pontos azonosítását tűztük ki célul.

Anyagok és módszerek. Felnőtt him vad típusú (WT) valamint LPA1, LPA2 és ciklooxygenáz-1 (COX1) géndeficiens (KO) egerek ereit teszteltük. Abdominális aortaszegmentumokat preparáltunk, az endotheliumot eltávolítottuk, és válaszaikat izometriás körülmények között, miográfán vizsgáltuk. Kísérleteinkhez az LPA1-3 agonista VPC31143-t (VPC), ciklooxygenáz gátló indomethacin, Gi fehérje gátló pertussis toxint (PTX), és LPA3 antagonistát diacilglicerol pirofoszfátot (DGPP) használtuk. A vaszkuláris TXA₂ felszabadulás mérését TXB2 ELISA-val végeztük.

Eredmények. Az 1-oleoyl-LPA valamint a VPC dózis függő vazokonstriktort okozott, melyek EC₅₀ értékei hasonlóak voltak (LPA: 6,48 μM, VPC: 5,12 μM), azonban a VPC Emax értéke magasabb volt az LPA Emax értékéhez képest (0,95 mN/mm vs. 2,26 mN/mm, az érszegment hosszára normalizálva). A VPC hatására DGPP kezelést követően és LPA2 KO erekben is változatlan mértékű kontrakciót tapasztaltunk, míg LPA1 KO és PTX-kezelt WT erekben a kontrakció gyakorlatilag eltűnt. Meglepő módon COX1 KO és indomethacinnal kezelt WT erekben is a VPC- okozta kontrakció jelentősen csökkent. ELISA mérések során VPC kezelést követően a WT és LPA2 KO erekben a TXB2 szint növekedését tapasztaltuk, míg LPA1 KO és COX1 KO erekben, valamint PTX kezelés esetében ez teljesen hiányzott.

Következtetés. LPA hatására endothel sérülés esetén LPA1 által közvetített vazokonstriktió alakul ki. Az LPA1 aktiválódása Gi fehérje közvetítésével aktiválja a COX1 enzim. A termelő TXA₂ parakrin-autokrin mediátorként stimulálja a simaizomsejtek TP receptorait aminek hatásaként létrejön a kontrakció. A folyamat kórélettani jelentősége az lehet, hogy az endothelium sérüléskor aktiválódó vérlemezék által termelt LPA az érsimaizomra hatva TXA₂-t szabadít fel, így elősegíti a sérülést követő vazokonstriktiót, és a thrombus további propagációját.

Kutatási támogatás: OTKA K-112964.

Ruiz Sanchez É., Dancs P. et al. (2014) FASEB J. 28(2): 880-890

Dancs P., Panta C. (2014) Orvoscépzés 89(2): 205

A korábbi publikációk az LPA által ép endothelium mellett kiváltott vazorelaxáció jelenségét és jelátviteli folyamatait, valamint a sérült endothelium esetén létrejött vazokonstriktió jelenségét írták le thoracalis aortában.

Jelen munka a vazokonstriktor hatás jelátviteli útját vizsgálta abdominális aortában.

Témavezető(k): Dr. Benyó Zoltán egyetemi tanár, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, Dr. Ruiz Sanchez Éva egyetemi tanársegéd Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet