

Śródbłonek, monowarstwa komórek śródbłonka, jest wewnętrzną wyściółką całego układu naczyniowego. Dysfunkcja śródbłonka jest ściśle związana z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) i prowadzi do rozwoju cywilizacyjnych chorób sercowo-naczyniowych. Ponieważ anoksja (brak tlenu), po której następuje reoksygenacja (ponowne natlenienie) (A/R), znacznie zwiększa tworzenie ROS przez mitochondria, prowadząc do stresu oksydacyjnego, stawiamy hipotezę, że A/R wpływa znacząco na funkcję bioenergetyczną mitochondriów śródbłonka. Ponadto adaptacja funkcji mitochondriów śródbłonka spowodowana przewlekłym niedotlenieniem (hipoksją) może prowadzić do lepszej tolerancji na uszkodzenia A/R poprzez: (i) obniżenie poziomu mitochondrialnej zawartości Q oraz (ii) reorganizację bioenergetycznych właściwości mitochondriów śródbłonka.

W naszym laboratorium wykazano, że przewlekła hipoksja wywołuje liczne zmiany funkcji mitochondriów śródbłonka, w szczególności ogólny spadek oddychania mitochondrialnego i zwiększenie produkcji mitochondrialnych ROS. Ostatnio zaobserwowaliśmy, że przewlekła hipoksja prowadzi do 50% zmniejszenia ilości Q w mitochondriach śródbłonka (dane niepublikowane). Dlatego powstają pytania (i) w jaki sposób wcześniejsza adaptacja komórek śródbłonka do przewlekłej hipoksji wpłynie na tolerancję A/R mitochondriów śródbłonka oraz (ii) jaka jest rola silnie obniżonego poziomu mitochondrialnego Q w tym zjawisku?

Głównym celem tego projektu badawczego jest zrozumienie wpływu stresu A/R na właściwości bioenergetyczne mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonka hodowanych w warunkach przewlekłego niedotlenienia w porównaniu z komórkami hodowanymi w normalnych warunkach natlenienia.

Wywołany niedotlenieniem stres oksydacyjny jest ważnym aspektem wielu chorób sercowo-naczyniowych związanych z dysfunkcją śródbłonka. Dlatego badanie wpływu obniżonego poziomu mitochondrialnego Q na produkcję ROS w warunkach niedotlenienia i stresu A/R może być ważne dla zrozumienia funkcji bioenergetycznych i fizjologicznych mitochondriów śródbłonka. Badania te odpowiedzą na pytania, w jaki sposób niedotlenione komórki śródbłonka radzą sobie z A/R oraz jaką rolę odgrywają w tym zjawisku odgrywają mitochondrialny Q i mitochondrialne systemy rozpraszające energię (białko rozprężające 2, UCP2 i mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie, regulowany jonami wapnia, mitoBK_{Ca}). Modele niedokrwienia/reperfuzji *in vitro*, w tym model A/R w izolowanych mitochondriach, są ważne ponieważ pozwalają na szczegółowe badanie mechanizmu adaptacji mitochondriów do stresu oksydacyjnego.

Badanie adaptacji mitochondriów śródbłonka wywołanych przewlekłym niedotlenieniem w połączeniu z tolerancją A/R jest pionierskie. Rola UCP2 i mitoBK_{Ca} w znoszeniu stresu A/R przez mitochondria śródbłonka jest nieznaną. Ponieważ mitochondria są potencjalnym miejscem interwencji farmakologicznej mającej na celu szeroko rozumianą ochronę komórek śródbłonka w warunkach stresu oksydacyjnego, badania te mogą być pomocne w dalszej perspektywie w opracowywaniu nowych terapii lub weryfikacji istniejących terapii (w tym terapii związanych z suplementacją Q) w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych.

Ogólny plan badań:

Badania zostaną przeprowadzone z wykorzystaniem komórek śródbłonka (EA.hy926 i HUVEC) hodowanych w normalnych warunkach tlenowych (21% O₂) i w warunkach niedotlenienia (1% O₂). Mitochondria izolowane z kontrolnych i traktowanych niedotlenieniem komórek śródbłonka zostaną poddane 30-minutowej anoksji, a następnie 5-minutowej reoksygenacji. Następnie zostaną przeprowadzone pomiary bioenergetycznych właściwości mitochondriów. Planowane badania obejmują:

Zadanie 1. Analiza wpływu A/R na właściwości bioenergetyczne fosforylujących mitochondriów izolowanych z kontrolnych i traktowanych niedotlenieniem komórek śródbłonka

Zadanie 2. Analiza wpływu A/R na właściwości bioenergetyczne mitochondriów niefosforylujących izolowanych z kontrolnych i traktowanych niedotlenieniem komórek śródbłonka

W izolowanych mitochondriach śródbłonka zostaną zmierzone następujące parametry bioenergetyczne: szybkość zużycia tlenu, potencjał błonowy, poziom redukcji Q i tworzenie ROS w różnych warunkach oddechowych. Pomiary te pozwolą oszacować kondycję bioenergetyczną mitochondriów śródbłonka po stresie A/R. Porównanie mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonka hodowanych w warunkach hipoksji i kontrolnych pozwoli oszacować wpływ przewlekłej hipoksji na tolerancję stresu A/R przez mitochondria. Badania wyjaśnią rolę obniżonego poziomu mitochondrialnego Q, który obserwowany jest w komórkach śródbłonka hodowanych w warunkach hipoksji, w tolerowaniu stresu A/R. Nasze badania pokażą, czy UCP2 i mitoBK_{Ca} przyczyniają się do lepszego znoszenia stresu A/R przez mitochondria śródbłonka, a zatem czy obydwa systemy rozpraszające energię odgrywają rolę ochronną.