Mgr Dorota Dąbrowska – Zagroba

STRESZCZENIE PRACY ,,Wpływ flawonoidów oraz witaminy C na formowanie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) u chorych na miażdżycę".

 Dotychczasowe badania wykazały, że komórki układu odpornościowego, w tym także neutrofile są obecne w zmianach miażdżycowych i mogą odgrywać istotną rolę w jej patogenezie. Neutrofile, dzięki zdolności do uwalniania reaktywnych form tlenu, enzymów, cytokin, a także formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) na drodze NETozy, biorą udział w promowaniu reakcji zapalnych i mogą wpływać na stan aktywacji komórek śródbłonka.

 Zjawisko NETozy polega na uwalnianiu do przestrzeni pozakomórkowej zdekondensowanej chromatyny w połączeniu z liczną grupą białek, m.in. mieloperoksydazą (MPO). Struktury te, poza bezpośrednim udziałem w eliminacji patogenów, mogą wpływać na rozwój oraz utrzymanie stanu zapalnego, leżącego u podstaw patomechanizmu miażdżycy. Wyniki wielu badań wykazały, że generowanie NETs wymaga obecności aktywnego kompleksu oksydazy NADPH, prowadzącego do uwalniania reaktywnych form tlenu (RFT). W związku z tym substancje o właściwościach antyoksydacyjnych, takie jak flawonoidy czy witamina C, mogą służyć jako regulatory formowania NETs.

Do chwili obecnej nie ma jednak dostępnych danych na temat roli tych związków w regulacji uwalniania sieci NETs w przebiegu miażdżycy. Celem przeprowadzonych badań była ocena intensywności formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych u chorych na miażdżycę, na podstawie obrazu mikroskopowego i ekspresji wybranych markerów: cfDNA i MPO, w połączeniu z aktywnością kompleksu oksydazy NADPH.

Kluczowym etapem było określenie wpływu flawonoidów (kwercetyny oraz luteoliny) oraz witaminy C na uwalnianie NETs oraz cfDNA i MPO. Przeprowadzono także ocenę ekspresji białek kompleksu oksydazy NADPH i generacji anionorodnika ponadtlenkowego przez neutrofile w obecności flawonoidów i witaminy C.

Badania zostały wykonane na próbkach krwi pełnej pobranej od pacjentów z rozpoznaną miażdżycą, u których wykonano oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych. Neutrofile, izolowane przy użyciu odczynnika PolymorphprepTM oraz separatora magnetycznego MACS®, były poddawane inkubacji w obecności LPS, witaminy C oraz flawonoidów (kwercetyny oraz luteoliny). Do oznaczeń zostały wykorzystane następujące metody: generowanie NETs - system mikroskopowy In Cell Analyzer 2200; ekspresja MPO - cytometria przepływowa; stężenie cfDNA oraz MPO – metoda ELISA; ekspresja podjednostek: p47phox, p67phox, Rac1 kompleksu oksydazy NADPH w PMNs – technika Western blot; generacja anionorodnika ponadtlenkowego - test redukcji cytochromu C wg McCorda.

Uzyskane wyniki zostały opracowane z wykorzystaniem testów statystycznych z zastosowaniem programu Statistica 13.1. Badania wykazały nasilenie zjawiska NETozy u chorych na miażdżycę, na co wskazuje wzrost ilości sieci NETs wraz ze zwiększoną zdolnością neutrofilów do uwalniania MPO i cfDNA. Ponadto, zaobserwowano wzrost aktywności oksydazy NADPH, wyrażający się zwiększoną ekspresją badanych podjednostek p47phox i p67phox w neutrofilach pacjentów. Obecność LPS prowadziła do dalszego wzrostu uwalniania NETs, oraz stężeń cfDNA i MPO w supernatantach komórkowych. Ponadto, stwierdzono również wyższą ekspresję białek p47phox i p67phox oraz wzmożoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego przez neutrofile badanej grupy pacjentów. U chorych na miażdżycę, w obecności kwercetyny, luteoliny i witaminy C wykazano osłabienie zdolności neutrofilów stymulowanych LPSem do formowania sieci NETs. Stwierdzono również, że wykorzystane w badaniach flawonoidy i witamina C prowadziły do obniżenia ekspresji podjednostek kompleksu oksydazy NADPH: p47phox, p67phox i Rac1 oraz generacji anionorodnika ponadtlenkowego. Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają, że formowanie sieci NETs i uwalnianie do środowiska ich elementów, o istotnej prozapalnej aktywności, może odgrywać ważną rolę w patogenezie i rozwoju przewlekłego stanu zapalnego związanego z miażdżycą. Nasilona aktywność neutrofilów wyrażająca się wzmożonym formowaniem NETs i aktywnością oksydazy NADPH w obecności LPS wskazuje, że infekcje bakteryjne mogą prowadzić do znacznego postępu tej choroby. Obserwacje własne i innych autorów wskazują na możliwość zastosowania badanych związków o właściwościach antyoksydacyjnych w regulacji generowania sieci NETs.

Korzystne efekty działania kwercetyny, luteoliny i witaminy C mogą zostać wykorzystane w opracowaniu wytycznych dotyczących diety, bogatej w te związki, a także stanowić jeden z kierunków przyszłej terapii wspomagającej leczenie miażdżycy.