

Streszczenie

Przedmiotem niniejszych badań była ocena mechanizmu działania cholekalcytriolu (witaminy D₃) i menadionu (witaminy K₃) na proces apoptozy w komórkach melanomy i w fibroblastach skóry ludzkiej. Wiadomo bowiem, że witaminy D₃ i K₃ wykazują właściwości antyproliferacyjne i pro-apoptotyczne w komórkach nowotworowych. Jednak molekularny mechanizm tych procesów nie jest znany. Poprzednie badania wykazały, że podłożem pro-apoptotycznego działania powyższych witamin jest indukcja reaktywnych form tlenu (RFT).

Jednym z enzymów generujących RFT jest dehydrogenaza prolinowa (PRODH) zwana również oksydazą prolinową (POX). PRODH/POX jest enzymem zlokalizowanym w wewnętrznej błonie komórkowej mitochondrium w sąsiedztwie łańcucha oddechowego. Enzym ten katalizuje konwersję proliny do pirolidyno-5-karboksylanu (P5C). Powstające w tej reakcji elektrony są przekazywane do łańcucha oddechowego w celu wytworzenia cząsteczki ATP. Jednak, w sytuacji rozkojarzenia procesu wytwarzania energii w łańcuchu oddechowym, jaka ma miejsce w komórkach nowotworowych, elektrony są bezpośrednio wychwytywane przez tlen przyczyniając się do powstania RFT indukujących apoptozę. Wcześniejsze badania wykazały, że proces ten jest nasilony w przypadku dostępności proliny, substratu PRODH/POX. Wzrost stężenia proliny w komórce powiązany jest zwykle z obniżeniem biosyntezy kolagenu, procesem zużytkującym wolną prolinę. Z tego względu metabolizm kolagenu i proliny odgrywa ważną rolę w omawianym procesie.

Ocenę mechanizmu działania witaminy D₃ i witaminy K₃ na proces apoptozy przeprowadzono w komórkach melanomy i fibroblastach skóry ludzkiej (komórkach referencyjnych nie wykazujących ekspresji PRODH/POX). Wysłunięto hipotezę, że podłożem pro-apoptotycznego działania powyższych witamin jest pobudzenie ekspresji PRODH/POX generującej RFT, indukujące proces apoptozy. Przeżywalność komórek, integralność błon komórkowych oraz aktywność prolidazy oceniono metodą kolorymetryczną. Biosyntezę DNA i biosyntezę kolagenu oznaczono metodą radiometryczną. Powstawanie RFT oceniono metodą fluorescencyjną. Ekspresję białek oceniono za pomocą techniki Western blot. Stężenie wewnątrzkomórkowej proliny oznaczono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas.

Witamina D₃ i K₃ jak również ich łączne zastosowanie spowodowało znaczące obniżenie przeżywalności komórek, integralność błon komórkowych oraz biosyntezę DNA

w komórkach czerniaka w porównaniu do fibroblastów skóry ludzkiej. Procesom tym towarzyszył wzrost ekspresji aktywnej kaspazy-3 i -9 oraz PRODH/POX, a także powstawania RFT w komórkach czerniaka. Efektem działania witaminy D₃ i witaminy K₃ był również wzrost ekspresji aktywnej formy białka PARP oraz bekliny-1 w komórkach czerniaka. W fibroblastach powyższe zjawiska nie zachodziły pod wpływem badanych związków, sugerując kluczową rolę PRODH/POX w omawianych procesach. Obydwie witaminy stosowane łącznie obniżały biosyntezę kolagenu w omawianych komórkach, jednak witamina K₃ nie wpływała na ten proces w komórkach melanomy, hamowała jednak znacząco ten proces w fibroblastach. Aktywność prolidazy zahamowana była przez badane witaminy jedynie w komórkach czerniaka. Przedstawiono dowody, że witamina D₃ i K₃, zwłaszcza stosowane łącznie działały cytotoksycznie jedynie na komórki melanomy poprzez indukcję ekspresji PRODH/POX, RFT i wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy. Zjawisku temu towarzyszyło zahamowanie biosyntezy kolagenu, zwiększając dostępność proliny do PRODH/POX-zależnej apoptozy.

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują, że mechanizm apoptozy indukowanej przez witaminę D₃ w komórkach czerniaka polega na pobudzeniu ekspresji PRODH/POX, hamowaniu biosyntezy kolagenu, zwiększając dostępność proliny do PRODH/POX generującej RFT. Witamina K₃ nasila efekty działania witaminy D₃. Zjawiska te nie zachodzą w fibroblastach, które nie wykazują ekspresji PRODH/POX. Sugeruje to, że omawiane witaminy podawane łącznie mogą stanowić postępowanie terapeutyczne zapobiegające rozwojowi czerniaka.