

Wpływ aktywacji i inhibicji kanału TRPA1 na przejście fibroblastów płucnych w miofibroblasty

Natalia Kocot^{1,2}, Grażyna Chłoń-Rzepa³, Paweł Żmudzki³, Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk², Aleksandra Łapa², Elżbieta Pękala², Katarzyna Wójcik-Pszczota²

¹Uniwersytet Jagielloński, Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu, Łazarza 16, 31-530, Kraków, Polska

²Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Medyczna 9, 30-688, Kraków, Polska

³Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Leków, Medyczna 9, 30-688, Kraków, Polska

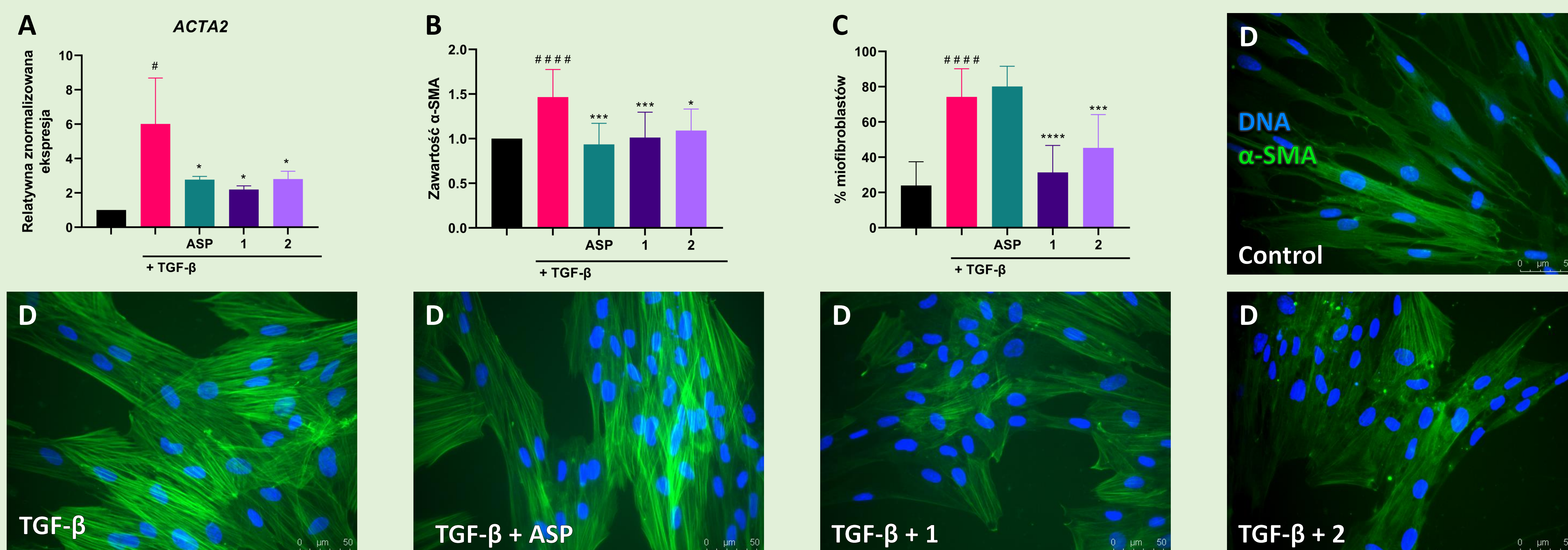
Wstęp

Przebudowa dróg oddechowych jest złożonym procesem, prowadzącym do pogrubienia i zwężenia dróg oddechowych w przebiegu przewlekłych chorób dróg układu oddechowego. Jednym z głównych procesów komórkowych, leżących u podłoża tego zjawisk jest przemiana fibroblastów w miofibroblasty (FMT), napędzana przez transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β). Powstałe miofibroblasty charakteryzują się zwiększoną proliferacją, kurczliwością oraz zdolnością do wytwarzania nadmiernych ilości macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednym z markerów miofibroblastów jest α -aktyna mięśni gładkich (α -SMA). Obiecującym celem molekularnym dla terapii przeciwzwłóknieniowej może być kanał wapniowy TRPA1, dla którego pojawia się coraz więcej dowodów wskazujących na jego potencjalną rolę w przewlekłych chorobach dróg oddechowych.

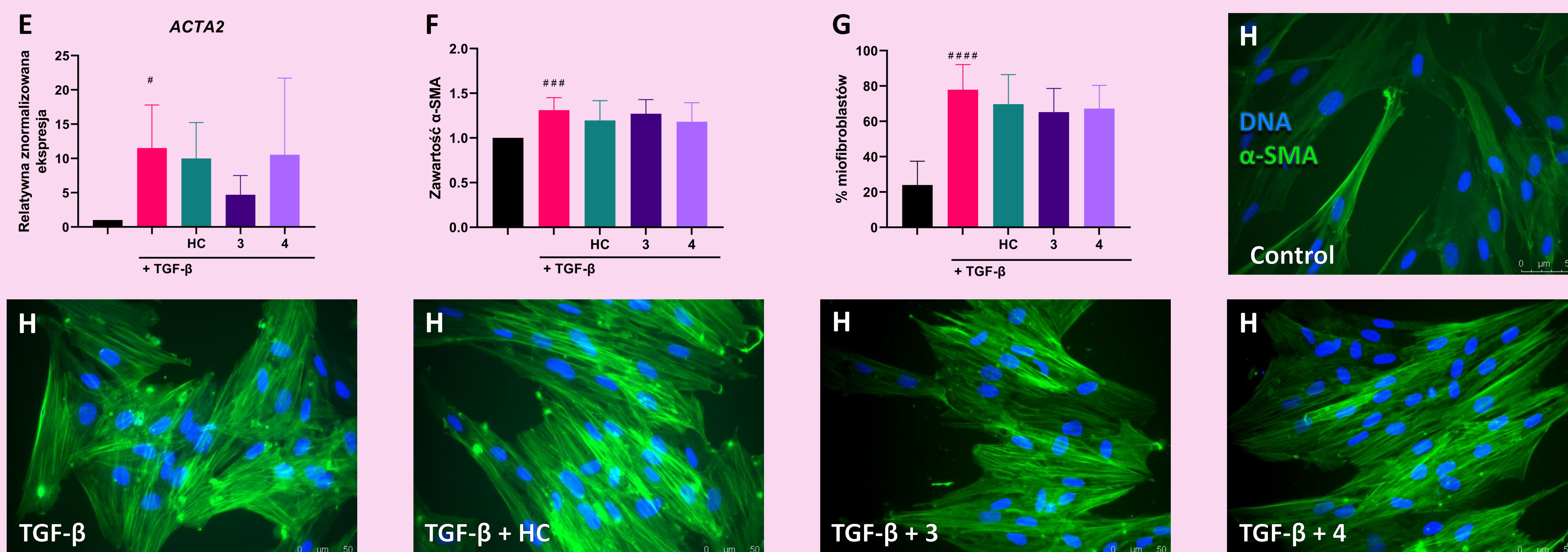
Cel badań: określenie wpływu nowo zsyntezowanych pochodnych teofiliny i teobrominy na indukowany TGF- β proces FMT w fibroblastach płucnych.

Materiały i metody		Związki badane			
Linia komórkowa	MRC-5 – ludzkie fibroblasty płucne	Pochodne triazyny	Referencyjny agonista	Pochodne teobrominy	Referencyjny antagonist
Ekspresję genów profibrotycznych	RT-qPCR				
Zawartość α -SMA	In-Cell ELISA	Związki 1 i 2	ASP-7663	Związki 3 i 4	HC-030031
Fenotyp zwłóknieniowy	Barwienie immunofluorescencyjne				
Funkcje kurczliwe	Test skurczu żelu kolagenowego				

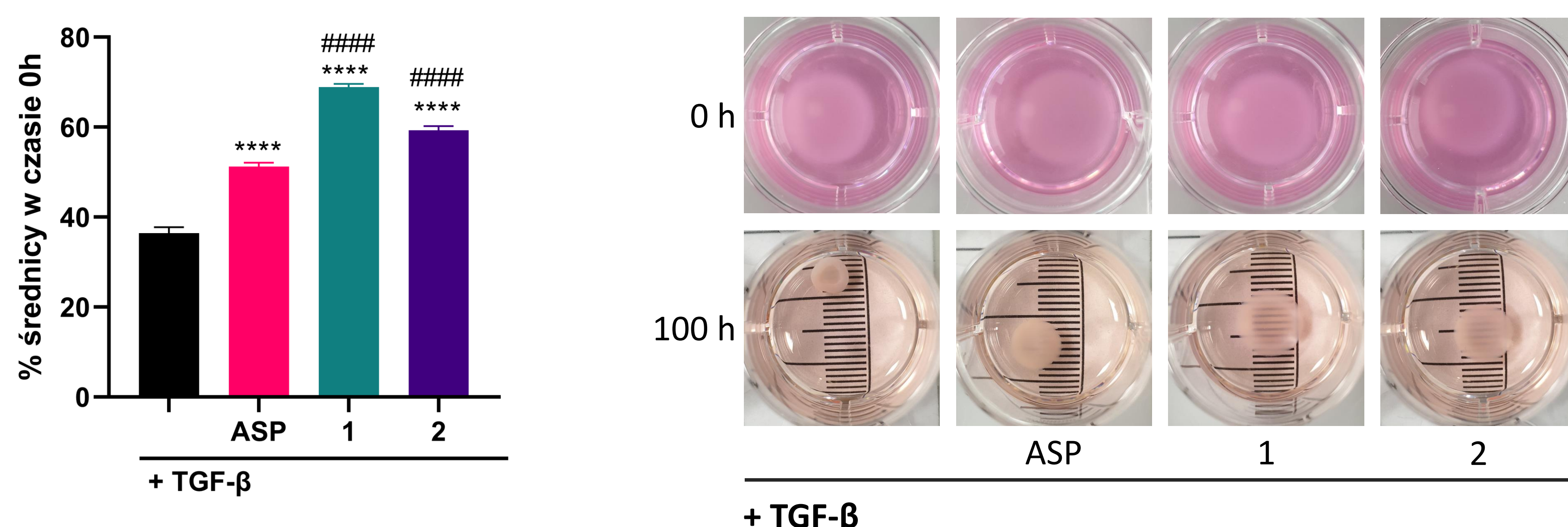
TRPA1 ACTIVATION



TRPA1 INHIBITION



Rys. 1. MRC-5 preinkubowano przez 1h ze związkami, a potem hodowano przez 24h (A, E) lub 48h (B-D, F-H) w TGF- β (3 ng/ml) A,E. Poziom transkryptu ACTA2 określono za pomocą RTqPCR. Próbkę analizowano dwukrotnie w dwóch powtórzeniach. B,F. Poziom α -SMA określono za pomocą In-Cell ELISA, n=15. C,D,G,H. Miofibroblasty policzono w 15 losowych polach widzenia (% wszystkich komórek). Istotność statystyczna na poziomie p<0.05 względem TGF- β (*) i kontroli (#) (one-way ANOVA, test U-Manna-Whitneya dla qPCR).



Rys. 2. Żele kolagenowe z MRC-5 preinkubowano ze związkami, a następnie hodowano przez 100h w TGF β (3 ng/ml). Średnice żelów mierzono w czasie 0h i 100 h i obliczono % skurczu żelu po 100h w stosunku do czasu 0h. Eksperyment powtórzono dwukrotnie. Istotność statystyczna na poziomie p<0.05 względem TGF- β (*) i kontroli (#) (one-way ANOVA)

Wnioski

1. Nowi agoniści TRPA1 efektywnie ograniczyli indukowany TGF- β proces FMT w fibroblastach płucnych.
2. Nowi antagoniści TRPA1 i HC-030031 nie zahamowali procesu FMT w fibroblastach płucnych.
3. Nowi agoniści TRPA1 i ASP-7663 zredukowali kurczliwość fibroblastów płucnych, stymulowaną przez TGF- β .

Podziękowania: Badanie zostało zrealizowane przy wsparciu Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Polsce w ramach grantu nr N42/DBS/000323 oraz Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu nr 2018/29/B/NZ7/00285.