

STRESZCZENIE

Biorąc pod uwagę immunomodulujące i przeciwzapalne właściwości witaminy D, jak i rolę PLA₂s w patogenezie astmy, celem pracy była analiza wpływu 1,25(OH)₂D₃ oraz hamowania UBC, NF-κB na: a) ekspresję cPLA₂s: PLA₂G_{4A}, PLA₂G_{4B}, PLA₂G_{4C} oraz sPLA₂s: PLA₂G₅, PLA₂G₁₀, PLA₂G₁₂, PLA₂G₁₅; UBC; NF-κB; PLAA b) całkowitą aktywność enzymatyczną cPLA₂s i sPLA₂s; c) poziom wydzielonych wybranych eikozanoidów: LXA₄, 15(S)-HETE, LTC₄ i PGE₂.

W badaniu użyto linię komórkową LUVA, jako model komórek tucznych zaangażowanych w patogenezę astmy oskrzelowej. Komórki LUVA inkubowano z: 1,25(OH)₂D₃, inhibitorem NF-κB p65 – helenalinem z lub bez 1,25(OH)₂D₃, inhibitorem ubiquitynacji - PYR-41 z lub bez 1,25(OH)₂D₃, helenalinem i PYR-41. W celu zbadania ekspresji mRNA wybranych PLA₂s, PLAA, UBC i NF-κB p65 zastosowano metodę RT-PCR. Analizę ekspresji białka badanych genów wykonano przy użyciu metody Western blot. Profil wybranych eikozanoidów określono przy użyciu testów ELISA. Aktywność enzymatyczną cPLA₂s i sPLA₂s oszacowano poprzez użycie testów enzymatycznych.

Wyniki moich badań pokazały, że 1,25(OH)₂D₃ zmniejsza ekspresję PLA₂G₅ (Etanol - kontrol (Et-OH): 0,86 ± 0,03, vs. 100 nM 1,25(OH)₂D₃ (100 nM D₃): 0,39 ± 0,08; p <0,001), PLA₂G₁₅ (Et-OH: 1,05 ± 0,1 vs. 100 nM D₃: 0,55 ± 0,18; p <0,05), NF-κB p65 (Et-OH: 1,41 ± 0,24 vs. 100 nM D₃: 0,38 ± 0,09; p <0,01), UBC (Et-OH: 1,3 ± 0,1 vs. 100 nM D₃: 0,54 ± 0,1; p <0,01) oraz zwiększa ekspresję PLA₂G_{4C} (Et-OH: 0,91 ± 0,09 vs. 100 nM D₃: 1,41 ± 0,17; p <0,05) and PLAA (Et-OH: 1,03 ± 0,09 vs. 100 nM D₃: 1,58 ± 0,14; p <0,05). Ponadto, ekspresja PLA₂G₅ i PLA₂G₁₅ zmniejszyła się po zablokowaniu UBC i NF-κB p65. Zaobserwowano także zmniejszony poziom wydzielanego LTC₄ (Et-OH: 1657 pg/ml ± 129,87 vs. 100 nM D₃: 1234,5 pg/ml ± 82,41; p <0,05), zwiększone poziomy wydzielonej LXA₄ (Et-OH: 164,15 pg/ml ± 61,84 vs. 100 nM D₃: 377,38 pg/ml ± 23,19; p <0,05) i wydzielonego 15(S)-HETE (Kontrol (K): 1825 pg/ml ± 59,39 vs. 1 nM D₃: 2997,50 pg/ml ± 285,39; p <0,01; Et-OH: 2235 pg/ml ± 346,84 vs. 100 nM D₃: 4132,5 pg/ml ± 199,55; p <0,01) oraz zmniejszoną aktywność enzymatyczną sPLA₂s (Et-OH: 0,54 μmol/min/ml ± 0,02 vs. 100 nM D₃: 0,25 μmol/min/ml ± 0,02; p <0,001) w odpowiedzi na 1,25(OH)₂D₃. Dodatkowo, hamowanie NF-κB p65 prowadzi do zwiększenia poziomu wydzielonej LXA₄.

Otrzymane wyniki sugerują, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zmniejsza ekspresję PLA_2G_5 , $\text{PLA}_2\text{G}_{15}$, UBC oraz NF- κB p65, ale zwiększa ekspresję $\text{PLA}_2\text{G}_4\text{C}$ oraz PLAA. UBC oraz NF- κB p65 są zaangażowane w szlak przekazywania sygnału odpowiedzialny za zależne od witaminy D_3 zmniejszenie ekspresji PLA_2G_5 oraz $\text{PLA}_2\text{G}_{15}$. Witamina D zmniejsza syntezę LTC_4 , zwiększa wytwarzanie LXA_4 i 15(s)-HETE oraz zmniejsza aktywność enzymatyczną sPLA_2s w komórkach LUVA. Zablokowanie NF- κB p65 prowadzi do zwiększenia wydzielania LXA_4 przez komórki LUVA.

Podsumowując, w moim badaniu wykazałam odmienne efekty działania $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wybrane PLA_2s , PLAA, NF- κB p65 oraz UBC. Badanie sugeruje, że witamina D nie ma efektów jednokierunkowych, a jej działanie w szlakach procesów zapalnych może być pro- i przeciwzapalne. Otrzymane wyniki mogą po części tłumaczyć niejednoznaczne wyniki badań klinicznych skoncentrowanych na roli suplementacji witaminy D_3 w zapobieganiu infekcyjnym zaostrzeniom astmy.

ABSTRACT

Taking into consideration the immunomodulatory and anti-inflammatory properties of vitamin D as well as the role of PLA₂s in pathogenesis of asthma, the aim of the study was to assess the influence of 1,25(OH)₂D₃ and inhibition of UBC, NF-KB on: a) expression of cPLA₂s: PLA₂G_{4A}, PLA₂G_{4B}, PLA₂G_{4C} and sPLA₂s: PLA₂G₅, PLA₂G₁₀, PLA₂G₁₂, PLA₂G₁₅; UBC; NF-KB; PLAA b) overall enzymatic activity of cPLA₂s and sPLA₂s; c) the level of produced selected eicosanoids: LXA₄, 15(S)-HETE, LTC₄ and PGE₂.

In the study, the LUVA cell line was used as a mast cell model involved in the pathogenesis of bronchial asthma. LUVA cells were incubated with: 1,25(OH)₂D₃; an inhibitor of NF-κB p65 - helenalin with or without 1,25(OH)₂D₃; ubiquitination inhibitor - PYR-41 with or without 1,25(OH)₂D₃; helenalin and PYR-41. In order to examine the mRNA expression of selected PLA₂s, PLAA, UBC and NF-KB p65, the RT-PCR method was used. The analysis of protein expression of the studied genes was performed using the Western blot method. The profile of selected eicosanoids was determined using ELISA tests. The enzymatic activity of cPLA₂s and sPLA₂s was estimated by the use of enzymatic assays.

The results of my studies showed that 1,25(OH)₂D₃ decreases expression of PLA₂G₅ (Ethanol control (Eth-OH): 0.86 ± 0.03 vs. 100 nM 1,25(OH)₂D₃ (100 nM D₃): 0.39 ± 0.08; p <0.001), PLA₂G₁₅ (Eth-OH: 1.05 ± 0.1 vs. 100 nM D₃: 0.55 ± 0.18; p <0.05), NF-κB p65 (Eth-OH: 1.41 ± 0.24 vs. 100 nM D₃: 0.38 ± 0.09; p <0.01), UBC (Eth-OH: 1.3 ± 0.1 vs. 100 nM D₃: 0.54 ± 0.1; p <0.01) and increases expression of PLA₂G_{4C} (Eth-OH: 0.91 ± 0.09 vs. 100 nM D₃: 1.41 ± 0.17; p <0.05) and PLAA (Eth-OH: 1.03 ± 0.09 vs. 100 nM D₃: 1.58 ± 0.14; p <0.05). Moreover, expression of PLA₂G₅ and PLA₂G₁₅ decreased after inhibition of UBC and NF-κB p65. Decreased levels of secreted LTC₄ (Et-OH: 1657 pg/ml ± 129.87 vs. 100 nM D₃: 1234.5 pg/ml ± 82.41; p <0.05), elevated levels of secreted LXA₄ (Et-OH: 164.15 pg/ml ± 61.84 vs. 100 nM D₃: 377.38 pg/ml ± 23.19; p <0.05) and secreted 15(S)-HETE (Control (C): 1825 pg/ml ± 59.39 vs. 1 nM D₃: 2997.5 pg/ml ± 285.39; p <0.01; Et-OH: 2235 pg/ml ± 346.84 vs. 100 nM D₃: 4132.5 pg/ml ± 199.55; p <0.01) and decreased enzymatic activity of sPLA₂s (Et-OH: 0.54 μmol/min/ml ± 0.02 vs. 100 nM D₃: 0.25 μmol/min/ml ± 0.02; p <0.001) in response to 1,25(OH)₂D₃ were also observed. In addition, inhibition of NF-κB p65 leads to increasing of secreted LXA₄ level.

The obtained results suggest that 1,25(OH)₂D₃ decreased expression of PLA₂G₅, PLA₂G₁₅, UBC and NF-κB p65 but increased expression of PLA₂G_{4C} and PLAA. UBC and NF-κB p65 are involved in signaling pathway responsible for 1,25(OH)₂D₃ -dependent decreasing of PLA₂G₅ and PLA₂G₁₅ expression. Vitamin D decreases synthesis of LTC₄, increases releasing of LXA₄ and 15(s)-HETE, and decreases enzymatic activities of sPLA_{2s} in LUVA cells. Blocking of NF-κB p65 leads to increasing of releasing of LXA₄ by LUVA cells.

In conclusion, in my study I demonstrated the differential effects of 1,25(OH)₂D₃ action on chosen PLA_{2s}, PLAA, NF-κB p65 and UBC. The study suggests that vitamin D has no one-way effects and its action in the pathways of inflammatory processes might be pro- and anti-inflammatory. The obtained results might partially explain the ambiguous results of clinical trials focused on the role of vitamin D₃ supplementation in the prevention of infectious asthma exacerbations.