

STIMULÁCIA SPONTÁNNE IMORTALIZOVANÝCH ĽUDSKÝCH DERMÁLNYCH FIBROBLASTOV S TGF- β 1

Melegová N.¹, Čoňa M.^{1,2}, Kuruc T.¹, Petrová K.¹, Michalková R.¹, Mirossay L.¹, Matoušková E.⁴, Zajíček R.⁴, Gál P.^{2,3,4}

¹Ústav farmakológie, UPJŠ LF, Tr. SNP 1, 04011 Košice, Slovenská republika

²Referát biomedicínskeho výskumu, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Ondavská 8, 040 66 Košice, Slovenská republika

³Laboratórium bunkových interakcií, CKPV MediPark, UPJŠ LF, Tr. SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika

⁴Klinika popáleninové medicíny, 3.LF UK, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Česká republika

Fibroblasty sa cytokín-dependentnou diferenciáciou menia na ich aktívnu formu, myofibroblasty. Tieto bunky sú charakteristické expresiou hladkosvalového aktínu α (α -SMA). Vie sa, že indukcia diferencie fibroblastov na myofibroblasty je spúšťaná aj dráhou transformujúceho rastového faktora- β 1 a je kľúčová pri hojení rán (TGF- β 1).

Spontánne imortalizované dermálne fibroblasty (LF-HDF) boli získané z 8-rokov starého rozsiahlo popáleného chlapca (90% TBSA, III. stupeň), ktorý vykazoval veľmi dobrú schopnosť hojenia a bol po pol roku od úrazu zahojený a prepustený do domáceho liečenia. Cieľom tejto práce bolo stimulovať LF-HDF pomocou cytokínu TGF- β 1 a zhodnotiť ich špecifické charakteristiky. Bunky sme stimulovali s ľudským rekombinantným TGF- β 1 v koncentráciách 5, 10, 30 a 50 ng/ml. Experiment sme analyzovali pomocou prietokovej cytometrie (bunkový cyklus) a na detekciu prítomnosti/aktívacie α -SMA sme použili metódy western blotu a imunoflorescencie. Značením fibronektínu sme pomocou fluorescenčnej mikroskopie pozorovali tvorbu extracelulárnej matrice.

Analýzou bunkového cyklu sme zistili, že približne 90% LF-HDF sa po zbere nachádzali v presyntetickej G₁ fáze bunkového cyklu. Metóda western blotu ukázala, že bunky exprimujú α -SMA, a to dokonca aj v kontrole nestimulovanej s TGF- β 1. Na rozdiel od normálnych ľudských kožných fibroblastov, k premene na myofibroblasty teda došlo aj bez predchádzajúcej stimulácie TGF- β 1, s jeho stúpajúcou koncentráciou sa však množstvo α -SMA ešte zvyšovalo. Naše ďalšie výsledky ukázali, že v kontrolnej kultúre nestimulovanej s TGF- β 1 sa tvorilo len minimálne množstvo fibronektínovej matrice, kým po stimulácii buniek s TGF- β 1 bola tvorba matrice výraznejšia. Získané výsledky teda potvrdzujú, že TGF- β 1 je schopný potencovať expresiu α -SMA a fibronektínu aj u buniek, ktoré už tieto proteíny produkujú aj za normálnych podmienok. Zároveň je tento model vhodný na štúdium látok so synergickým alebo inhibičným efektom k TGF- β 1 dráhe diferencie fibroblastov na myofibroblasty.

Táto štúdia bola podporená grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (VEGA-1/0753/17, VEGA-1/0561/18, VEGA-1/0653/19), Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-14-0731, APVV-16-0207 a APVV-16-0446) a Univerzitou Karlovou (PROGRES Q37).