

STRESZCZENIE

Wstęp

Miażdżyca jest chorobą znaną i analizowaną od ponad dwóch stuleci, pozostaje jednak głównym problemem klinicznym we wszystkich krajach rozwiniętych na świecie. Dotychczasowy stan wiedzy pozwala na określenie najważniejszych czynników ryzyka powstawania chorób sercowo-naczyniowych, klasyfikację blaszek miażdżycowych pod względem budowy i stopnia złożenia, określenie udziału czynników lipidowych i pro-zapalnych w powstawaniu zmian miażdżycowych. Jednak wciąż niektóre zagadnienia są niewyjaśnione, na wiele pytań wciąż nie zna się jednoznacznych odpowiedzi. Wśród nich jest kwestia tego czy ilość kolagenu przyrasta wraz z postępem choroby czy nie, jeśli nie zawsze – od czego to zależy, jaki jest rzeczywisty udział poszczególnych typów kolagenu oraz elastyny w powstawaniu ognisk kalcyfikacji, jaki jest wpływ pojedynczych komponentów białek macierzy w utrzymywaniu właściwości biomechanicznych tkanki oraz czy glikacja ma wyłącznie działanie aterogenne?

Kolagen i elastyna są głównymi białkami zewnątrzkomórkowymi występującymi w naczyniach krwionośnych. Szczególnym obiektem zainteresowania są tu cztery pierwsze typy kolagenu, przy czym pierwsze trzy są białkami fibrylarnymi, a czwarty jest typem budującym błony podstawne. Kolagen typu II jest charakterystyczny dla chrząstki. Głównie przypisuje się im funkcję strukturalną, pełnią jednak również wiele funkcji regulacyjnych. Zmiany we wzajemnych stosunkach pomiędzy białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, następujące przez ich nadekspresję, bądź wzmożoną degradację, a także ich modyfikacje przez glikację, mogą mieć poważne konsekwencje objawiające się powstawaniem zmian miażdżycowych.

Cel

Celem badań było określenie korelacji pomiędzy budową wewnętrzną ścian naczyń krwionośnych, ze szczególnym uwzględnieniem składu białek macierzy zewnątrzkomórkowych a właściwościami biomechanicznymi, wiekiem i stopniem zaawansowania miażdżycy oraz analiza wpływu glikacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej na proces migracji komórek mięśni gładkich tętnicy.

Materiały i metody

Praca doświadczalna przeprowadzana była na dwóch rodzajach materiału – na wycinkach aort odcinka piersiowego i brzuszego (103) oraz na hodowli komórkowej mięśni gładkich wyizolowanych z tętnicy. Metodami stosowanymi podczas realizacji badań były: techniki histologiczne, immunohistologiczne i immunocytochemiczne, metoda immunoenzymatyczna ELISA, chromatografia cieczowa sprzęgnięta ze spektrometrią masową, dot blotting, test jednoosiowego rozciągania, test cytotoksyczności MTT, testy migracyjne z użyciem insertów ThinCert. Wyżej wymienionymi metodami oznaczano zawartość kolagenu typu I, II, III, IV, proliny i hydroksyproliny, kolagenu całkowitego, elastyny, produktów zaawansowanej glikacji, oceniono lokalizację wyżej wymienionych białek i AGE, a także intensywność kalcyfikacji. Zastosowano również cztery rodzaje selektywnego trawienia – kolagenazą, elastazą, kwasem mrówkowym z autoklawowaniem oraz stężoną zasadą z kwasem taninowym, po czym wykonano badania wytrzymałości i sprężystości tętnic. W części *in vitro* oceniano

lokalizację i intensywność wybarwienia α -aktyny, β -kateniny i kolagenu typu IV, oceniano poziom proliferacji SMC w obecności składników glikacji i badano wpływ glikacji na zdolności migracyjne komórek.

Wyniki

Ilości kolagenów typu I, III i IV a także elastyny korelują ze sobą pozytywnie (r ok. 0,5, $p < 0,005$). W opisywanym tu modelu badawczym nie obserwuje się jednak zależności między zawartością tych białek a stopniem zaawansowania miażdżycy, ani związku z płcią. Nie obserwuje się zależności ilości tych białek od wieku, z wyjątkiem kolagenu typu III – tu istnieje istotna statystycznie ujemna korelacja ($r = -0,218$, $p = 0,0262$) sugerująca, że wraz z postępowaniem wieku ilość tego białka spada. Podobnie z ilością prolina ($r = -0,259$, $p = 0,0155$) i stosunku prolina/hydroksyprolina ($r = -0,217$, $p = 0,0435$). Odwrotny znak mają korelacje dotyczące związku wieku z zawartością kolagenu typu II ($r = 0,211$, $p = 0,0362$) i stosunku kolagenu typu II do hydroksyproliny ($r = 0,23$, $p = 0,032$), świadczące o tym, że wraz z postępowaniem czasu białko to akumulowane jest w tętnicach. Kolagen typu II jest również jedynym analizowanym typem kolagenu, którego ilość koreluje z postępowaniem zaawansowania miażdżycy ($r = 0,301$, $p = 0,0029$), a także wykazano dla tego białka związek z kalcyfikacją ($p = 0,006$), przy czym istotne są również stosunki między zawartością tego białka a zawartością kolagenu typu I ($p = 0,067$), kolagenu typu III ($p = 0,002$) i kolagenu typu IV ($p = 0,02$). W wyizolowanych depozytach wapnia jest znacznie mniej wszystkich oznaczanych białek macierzy niż w otaczającej tkance, z wyjątkiem kolagenu typu III dla którego nie obserwuje się statystycznie istotnej różnicy między zwapniałą a miękką częścią tętnicy. Mają tu też znaczenie stosunki między zawartością tego typu kolagenu a innymi komponentami – stosunek ilości kolagenu typu I do kolagenu typu III jest istotnie wyższy w tętnicy niż w depozycie ($p = 0,018$), podobnie stosunek ilości kolagenu typu II do kolagenu typu III ($p = 0,0003$), natomiast stosunek ilości kolagenu typu III do kolagenu typu IV oraz stosunek ilości kolagenu typu III do elastyny jest istotnie niższy w tętnicy ($p = 0,0042$ i $p = 0,0012$). Kolagen typu III jest intensywnie wybarwiany technikami immunohistochemicznymi w przydanie, tam też mogą występować intensywnie wybarwiający się alizaryną związki wapnia, co naprowadza na wniosek o możliwości związku między kolagenem typu III a kalcyfikacją. Granica między przydanką a media jest regionem w którym mogą zachodzić również ważne procesy związane z reorganizacją białek macierzy zewnątrzkomórkowej, oprócz kolagenu typu III również typu IV.

Badania biomechaniczne wykazały, że w próbkach z wytrawionym kolagenem za pomocą kolagenazy obserwuje się dodatnią korelację między wytrzymałością a modułem Younga ($r = 0,699$, $p = 0,0002$), natomiast w próbkach z wytrawionym tym białkiem za pomocą kwasu mrówkowego notuje się ujemne korelacje między modułem Younga a zawartością kolagenu typu I ($r = -0,67$, $p = 0,0447$) oraz zawartością hydroksyproliny ($r = 0,775$, $p = 0,0408$). Po wytrawieniu elastyny za pomocą elastazy obserwuje się korelację między wiekiem a wytrzymałością ($r = -0,518$, $p = 0,0029$) oraz z odwrotnym znakiem korelację między wiekiem a modułem Younga ($r = 0,542$, $p = 0,0016$). Innymi parametrami, które korelują wtedy z wytrzymałością, to stosunek kolagenu typu II do kolagenu typu III ($r = -0,394$, $p = 0,0231$), stosunek kolagenu typu II do kolagenu typu IV ($r = -0,419$, $p = 0,0153$), stosunek kolagenu typu III do elastyny ($r = 0,374$, $p = 0,035$), stosunek kolagenu typu IV do elastyny ($r = 0,361$, $p = 0,0425$).

Ilość AGE w wycinkach aort koreluje z zawartością kolagenu typu III ($r = -0,258$, $p = 0,0122$) oraz kolagenem typu IV ($r = -0,206$, $p = 0,0456$), stwierdza się jednak, że wraz ze wzrostem wieku maleje

korelacja pomiędzy AGE a kolagenem typu III. Produkty glikacji kolokalizują z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz z białkami jądrowymi, nie zaobserwowano natomiast wyraźnej koncentracji badanego antygeny w blaszkach miażdżycowych, nie stwierdzono również statystycznie istotnej zależności między zawartością AGE a stopniem zaawansowania miażdżycy.

Testy migracyjne nie wykazały istotnej statystycznie zależności między ilością komórek mięśni gładkich tętnicy, które przemigrowały przez membrany opłaszczone glikowanymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej w porównaniu do komórek migrujących przez niezmodyfikowane białka, nie mniej jednak widoczna była tendencja do obniżania się ilości komórek wraz ze stopniem glikacji białek przez które miały migrować miocyty. Doświadczenia immunocytochemiczne wykazały natomiast nieznaczną tendencję do obniżania się ilości β -kateniny w komórkach hodowanych na glikowanych substratach, co wskazywałoby na spadek adhezji komórek będących w kontakcie z glikowanymi kolagenami i elastyną. Morfologia takich komórek jest jednak znacznie zmieniona w porównaniu do komórek kontrolnych, także ich ilość jest znacznie mniejsza, co wskazuje na niekorzystny stan metaboliczny komórek kontaktujących się z glikowanymi białkami macierzy.

Wnioski

- (1) Wykazano, że ilość kolagenu typu III w aorcie spada wraz z rozwojem miażdżycy, jego ilość natomiast jest stosunkowo duża w depozytach wapnia. Wnioskuje się, że kolagen tego typu jest związany z kalcyfikacją, a wzrost udziału tego białka powoduje zaburzenia w strukturze włókien kolagenowych, co sprzyja gromadzeniu się soli wapnia w danym obszarze. Kolagen tego typu może odgrywać rolę w różnicowaniu się osteoblastów.
- (2) Wykazano, że zawartość kolagenu typu II wzrasta wraz z rozwojem miażdżycy i z wiekiem osoby od której pochodziła próbka. Kolagen tego typu jest zaangażowany w kalcyfikację tętnic, przynajmniej w przypadku twardnienia tętnic typu Mönckeberga. Wyniki potwierdzają tezę, że białko to bierze udział w mechanizmie kostnienia endochondrialnego.
- (3) Ustalono, że w ścianie tętnicy glikacji podlegają białka macierzy zewnątrzkomórkowej, a także histony.
- (4) W niniejszym układzie doświadczalnym stwierdzono, że glikacja elastyny jest efektywniejsza niż kolagenu.
- (5) Wnioskuje się, że powstawanie produktów zaawansowanej glikacji z udziałem białek macierzy zewnątrzkomórkowej może stanowić źródło artefaktów w oznaczaniu tych białek metodami immunoenzymatycznymi.
- (6) Glikacja kolagenu i elastyny otaczających komórki mięśni gładkich hamuje ich migrację z medii do intymy, co stanowi mechanizm anty-aterogeny.
- (7) Kolagen i elastyna warunkują wytrzymałość i sprężystość wymaganą do przeprowadzania krwi przez naczynia pod wysokim ciśnieniem generowanym podczas każdego skurczu serca. Elastyna warunkuje rozciągliwość, kolagen przeciwnie – usztywnia strukturę tkanki i zapobiega zbyt niemu jej rozszerzaniu.
- (8) Wyniki tych badań wskazują na potrzebę realizowania projektów dążących do zaprojektowania strategii diagnostycznych i terapeutycznych mających na celu kontrolę zawartości białek macierzy zewnątrz komórkowej w tętnicach i poziomu ich glikacji.