

STRESZCZENIE.

Białko aktywujące fibroblasty jako nowy marker aktywowanych komórek mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej.

Wstęp

Blaszka miażdżycowa powstaje w przewlekłym procesie zapalnym będącym rezultatem interakcji pomiędzy zmodyfikowanymi lipoproteinami, makrofagami, komórkami T i składnikami naczyniowej ściany komórkowej. Pęknięcie blaszki miażdżycowej leży u podstaw patomechanizmu ostrych zespołów wieńcowych i związanej z nimi śmiertelnością chorych z chorób niedokrwiennych serca. Głównymi elementami blaszki miażdżycowej, jest rdzeń oraz otoczka włóknista, która zbudowana z komórek mięśni gładkich i macierzy zewnątrzkomórkowej. Otoczka włóknista nadająca blaszce miażdżycowej odporność na pęknięcie.

Komórki mięśni gładkich odgrywają główną rolę w syntezie i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i są kluczowe dla stabilności blaszki miażdżycowej. Lepsze zrozumienie procesu różnicowania i proliferacji aktywowanych komórek mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej jest niezbędne dla rozwoju przyszłych terapii ostrych zespołów wieńcowych.

Białko aktywujące fibroblasty (FAP) jest glikoproteiną typu II błony komórkowej należącej do rodziny enzymatycznej proteinaz serynowych. Proteina ta ulega ekspresji na miofibroblastach w miejscach aktywnego tkankowego

remodelingu (np. gojące się rany, przewlekłe zmiany zapalne), w zrębie nowotworów endothelialnych, a fizjologicznie tylko w okresie płodowym. Nie stwierdza się ekspresji FAP w zdrowych, dojrzałych, nieaktywowanych komórkach mięśni gładkich. Dystrybucja tkankowa sugeruje, iż FAP jest związany z aktywacją, proliferacją, różnicowaniem i migracją miofibroblastów.

Posiadając aktywność enzymatyczną kolagenazy, zelatynazy i peptydazy, FAP może wpływać na równowagę pomiędzy rozkładem i syntezą składników macierzy zewnątrzkomórkowej (a co za tym idzie na stabilność blaszki miażdżycowej), oraz pełnić rolę w nadmiernej proliferacji mięśni gładkich w naczyniach wieńcowych.

Pojedyncze badanie obecności FAP w ludzkiej blaszce miażdżycowej zasugerowało rolę FAP w niestabilności blaszki miażdżycowej, powiązując FAP z rozkładem kolagenu i obecnością cienkiej otoczki włóknistej w blaszce miażdżycowej. Jednakże inne badanie ekspresji FAP w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych wykazało wiązanie specyficznego inhibitora FAP niezależnie od stopnia niestabilności blaszki miażdżycowej. Znaczenie i dystrybucja ekspresji FAP przez komórki mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej i możliwa rola w patogenezie różnych form ostrych zespołów wieńcowych pozostaje niejasna.

Cele pracy

1. Głównym celem pracy jest zbadanie obecności białka aktywującego fibroblasty w blaszce miażdżycowej i stwierdzenie czy białko aktywujące fibroblasty może być nowym markerem specyficznej subpopulacji aktywowanych komórek mięśni gładkich w zmianie miażdżycowej.

Cele pośrednie to:

2. Ocena ekspresji białka aktywującego fibroblasty w blaszce miażdżycowej aorty mysiego modelu miażdżycy oraz porównanie ekspresji FAP z innymi markerami aktywowanych komórek mięśni gładkich, degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i procesu zapalnego.
3. Ocena ekspresji FAP w ludzkich naczyniach wieńcowych bez zmian miażdżycowych i ze zmianami miażdżycowymi o różnej patogenezie i stopniu progresji (zmiany miażdżycowe u pacjentów zmarłych z powodu ostrego zespołu wieńcowego, miażdżycy w by-pasie żylnym i naczyniach wieńcowych serca przeszczepionego).
4. Analiza ekspresji i dystrybucji FAP na tle innych markerów charakteryzujących aktywowane komórki mięśni gładkich w ludzkiej blaszce miażdżycowej.

Metodyka

1. Ponieważ nie było dostępnych komercyjnie: przeciwciał przeciwko mysiemu FAP i przeciwciał przeciwko ludzkiemu FAP, pierwszy etap pracy polegał na wytworzeniu ich przez autora z zastosowaniem technik biologii molekularnej, immunologii, biochemii.
2. Do zbadania obecności i dystrybucji FAP w mysim modelu miażdżycy użyto łącznie 15 genetycznie zmodyfikowanych myszy (apobec LDL receptor double knockout) podzielonych na 3 grupy w zależności od zaawansowania zmian miażdżycowych. 5 myszy w wieku 13 tygodni (bez istotnych zmian miażdżycowych), 5 myszy w wieku 23 tygodni (umiarkowane zmiany miażdżycowe) i 5 myszy w wieku 33 tygodni (zaawansowane zmiany miażdżycowe).
3. Przeprowadziłem charakterystykę ekspresji i dystrybucji FAP w zmianach miażdżycowych aorty wstępującej mysiego modelu miażdżycy metodami barwienia immunohistochemicznego na tle innych znanych markerów blaszki miażdżycowej. W celu dalszej charakteryzacji FAP dokonałem korelacji wyników immunohistochemii zmian miażdżycowych aorty wstępującej myszy (apobec/LDL receptor double knockout) z oceną materiału genetycznego uzyskanego ze zmian miażdżycowych łuku aorty tych myszy. Po homogenizacji i lizie tkanki, przeprowadziłem następnie ekstrakcję RNA z zastosowaniem preparatu RNeasy, umożliwiającego otrzymanie cDNA z RNA w reakcji RT-

PCR. Pozwoliło to na detekcję FAP DNA oraz DNA innych markerów charakteryzujących blaszkę miażdżycową poprzez użycie specyficznych sekwencji primerów w polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). W badaniu porównawczym zastosowano markery aktywowanych komórek mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej (alfa aktyna mięśni gładkich, typ II ciężkiego łańcucha miozyny), markery degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (prokolagen, metaloproteinaza-9, Ki-67) oraz procesu zapalnego w miażdżycy (CD-44, IL-12, TGF beta).

4. W celu identyfikacji FAP w ludzkiej blaszce miażdżycowej zastosowałem przeciwciała anty-FAP używając metod immunohistochemii do oceny preparatu mikroskopowego: niezmiennych miażdżycowo naczyń wieńcowych oraz blaszek miażdżycowych ludzkich naczyń wieńcowych o różnym stopniu progresji i patogenezie (wczesne stadium miażdżycy, zaawansowane zmiany miażdżycowe, miażdżycy w by-pasie żylnym, i arteriosklerozę w naczyniach wieńcowych serca przeszczepionego).
5. Przy zastosowaniu immunofluorescencji przeprowadziłem dalszą charakteryzację dystrybucji FAP w zaawansowanej blaszce miażdżycowej, w porównaniu z innymi markerami aktywowanych komórek mięśni gładkich.

Wyniki

1. Badanie obecności białka aktywującego fibroblasty w blaszce miażdżycowej mysiego modelu miażdżycy wykazało wzrost ekspresji FAP z progresją zmian miażdżycowych oraz specyficzny charakter ekspresji FAP w porównaniu z innymi markerami aktywowanych komórek mięśni gładkich, degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz procesu zapalnego w miażdżycy.
2. Stwierdziłem brak ekspresji FAP w ludzkich naczyniach wieńcowych bez zmian miażdżycowych.
3. Wszystkie rodzaje zmian miażdżycowych ludzkich naczyń wieńcowych wykazały pozytywne barwienie FAP, z najwyższym poziomem ekspresji w zaawansowanej blaszce miażdżycowej, w arteriosklerozie w by-pasie żylnym i w naczyniu serca przeszczepionego.
4. Porównanie ekspresji FAP z innymi markerami aktywacji komórek mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej (α SMA i VCAM), wykazało różne obszary pozytywnego sygnału pomiędzy FAP, α SMA i VCAM.

Wnioski

1. Białko aktywujące fibroblasty ulega ekspresji w blaszce miażdżycowej i innych formach choroby wieńcowej (arteriosklerozie w by-pasie żylnym i naczyniach serca przeszczepionego).
2. FAP może identyfikować specyficzną podgrupę aktywowanych, proliferujących komórek mięśni gładkich znajdującą się w zaawansowanej blaszce miażdżycowej i odpowiedzialną za proliferację mięśni gładkich w zmianach miażdżycowych w by-pasie żylnym i w arteriosklerozie naczyń serca przeszczepionego.