

Klinika Ogólna Chorób Wewnętrznych. Instytut Chorób Wewnętrznych.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Hanzlik

Ośrodek Naukowo-Badawczy. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr hab. med. Jeremiasz Tomaszewski

Janusz HANZLIK, Jeremiasz TOMASZEWSKI,
Krystyna WOŹNIAK, Ireneusz WOLAŃSKI,
Marek GRZYWA, Elżbieta KIMAK

**Badania nad składem chemicznym ściany naczyniowej. XVII. Kolagen
i elastyn ściany aorty królików po podaniu diety miażdżycorodnej
i wywołaniu hipertyreozy doświadczalnej**

Изучение химического состава сосудистой стенки. XVII. Коллаген и эластин
стенки аорты кролика после артериосклеротической диеты и вызванного
экспериментального гипертириоза

Studies on the Chemical Composition of the Vascular Wall.

XVII. Collagen and Elastin of the Aortic Wall in Rabbits on an Atherogenic Diet
and after the Production of Experimental Hyperthyroidism

W świetle współczesnych poglądów zaburzenia metaboliczne w obrębie ściany tętniczej są podstawowym czynnikiem w etiopatologii miażdżycy naczyń. Dostarcza-
ją na to dowodów liczne badania, między innymi dotyczące zmienionej aktywności
układów enzymatycznych 4), zwyrodnienia komórek mięśni gładkich pod wpływem
lipidów (20) oraz wykazana ostatnio monoklonalna proliferacja tych komórek pod
wpływem czynników miażdżycorodnych (2, 18).

Udział regulacji hormonalnych w metabolizmie ściany naczyniowej był dotych-
czas przedmiotem nielicznych publikacji. Wpływem hormonów tarczycy interesował
się Baló, który podając królikom duże dawki tyroksyny obserwował rozległe
zmiany morfologiczne aorty (1). Wyników tych nie potwierdziły prace innych auto-
rów (9). Duże zmiany makro- i mikroskopowe, łącznie z obrazem elektronomikrosko-
powym stwierdzono natomiast w aortach zwierząt traktowanych tyroksyną i adre-
naliną (8, 13). Jak wynika z wczesnych badań Lorenzena (12) oraz pracy Lan-
gerna i Fullera (10), pod wpływem tych hormonów dochodzić może do wzmo-
żonej syntezy kolagenu i jego odkładania w warstwie śródbłonna w blaszkach miażd-
życowych. Nie wiadomo jednak, w jakim stopniu efekty te zależą od samej tyro-
ksyny, a w jakim od potencjalizacji działania katecholamin. Jest to szczególnie in-

interesujące, jeżeli się uwzględni wpływ hormonów tarczycy na przemianę lipidową. Wiadomo, iż tyroksyna i trójiodotyronina powodują obniżenie stężenia lipidów i cholesterolu w surowicy krwi, a więc czynników odgrywających negatywną rolę w rozwoju miażdżycy naczyń (16).

Celem podjętych obecnie badań było określenie wpływu hipertyreozy doświadczalnej oraz hipertyreozy skojarzonej z miażdżycą wywołaną dietą bogato cholesterolową na frakcje kolagenowe i zawartość elastynu w warstwie środkowej i wewnętrznej aorty królików.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 16 królikach rasy New Zealand w wieku 8 mies., wagi 3,2–4,2 kg. Zwierzęta podzielono na 4 grupy doświadczalne:

- I — grupa kontrolna,
- II — grupa pozostająca na diecie bogato cholesterolowej,
- III — grupa z hipertyreozą doświadczalną,
- IV — grupa z miażdżycą doświadczalną i hipertyreozą.

Wszystkie zwierzęta przebywały w jednakowych warunkach, karmione standardową karmą laboratoryjną z dodatkiem świeżych jarzyn. Królikom grupy II i IV przez okres 100 dni podawano dodatkowo cholesterol w dawce 0,5 g/kg wagi ciała dziennie. Zwierzęta grupy III i IV w celu wywołania hipertyreozy otrzymywały w diecie dzienną dawkę 150 mg preparatu tarczycy (Thyreoidium „Polfa”). Wyniki oznaczeń wskaźników lipidowych i trójiodotyroniny w surowicy krwi, stanowiące dokumentację hiperlipemii i hipertyreozy w grupach badanych, są przedmiotem odrębnej publikacji (23).

Dietę miażdżycorodną oraz podawanie preparatu tarczycy przerywano na 24 godz. przed zakończeniem doświadczenia. Zwierzęta zabijano przez wytworzenie zatoru powietrznego i natychmiast preparowano tętnicę główną, począwszy od części wstępującej do miejsca podziału na tętnice udowe. Po przecięciu i przepłukaniu zimnym roztworem soli fizjologicznej, warstwę środkową i wewnętrzną preparowano w sposób opisany przez Wołynsky'ego (26). Fragmenty tkanki przeznaczone do badań składu białkowego poddawano preparatyce opisanej szczegółowo w poprzedniej pracy (24). W wyniku zastosowanej procedury rozdziału otrzymano:

- 1) frakcję kolagenu rozpuszczalnego w 0,45 M NaCl,
- 2) frakcję kolagenu rozpuszczalnego w 0,5 M CH_3COOH ,
- 3) frakcję kolagenu nierozpuszczalnego (żelifikującego),
- 4) frakcję białek rozpuszczalnych w 0,1 M NaOH,
- 5) osad elastynu ściany aorty.

W otrzymanych preparatach oznaczano zawartość białka całkowitego metodą Lowry i wsp. (14), zawartość hydroksyproliny zmodyfikowaną metodą Prockopa i Udenfrienda (22) oraz we frakcji elastynu zawartość proliny metodą Trolla i Lindsleya (25). Oznaczenia aminokwasów przeprowadzono po 16-godzinnej hydrolizie w 6 N HCl w temp. 110°C. Zawartość kolagenu wyliczano z ilości hydroksyproliny, stosując mnożnik 7,14 (6). Zawartość białka w osadzie elastynu oznaczano za pośrednictwem azotu całkowitego według Burcka (3). Wyniki oznaczeń przeliczano na 1 g świeżej wilgotnej tkanki i oceniano statystycznie z użyciem testu t Studenta.

WYNIKI BADAŃ

Makroskopowa ocena zmian miażdżycowych

Stosowana dieta bogato cholesterolowa u wszystkich zwierząt grupy II i IV spowodowała rozległe zmiany miażdżycowe, obejmujące 30—50% powierzchni tętnicy głównej. Zmian takich nie obserwowano u zwierząt grupy kontrolnej i u królików z hipertyreozą doświadczalną. Nie stwierdzono również makroskopowo widocznych różnic między grupą II i IV. Wyniki histochemicznych badań mikroskopowych są przedmiotem odrębnego doniesienia (5).

Kolagen i białka rozpuszczalne ściany aorty

Zawartość białek rozpuszczalnych i frakcji kolagenowych w warstwie środkowej i wewnętrznej aort w badanych grupach zestawiono w tab. 1.

Jakkolwiek nie udało się wykazać statystycznie istotnych różnic, na uwagę zasługuje obniżona zawartość białka i kolagenu rozpuszczalnego w 0,45 M NaCl w grupie zwierząt pozostających na diecie miażdżycorodnej i pewne podwyższenie białka i kolagenu tej frakcji w grupach III i IV z wywołaną hipertyreozą doświadczalną. Podobnie przedstawia się udział kolagenu frakcji rozpuszczalnej w puli kolagenu całkowitego warstwy środkowej i wewnętrznej aorty. O ile w grupie kontrolnej kolagen rozpuszczalny w 0,45 M NaCl stanowi 2,82% kolagenu całkowitego, to w grupie II jest on niższy i wynosi 2,48%, natomiast w grupach III i IV wzrasta odpowiednio do 3,43 i 3,06%. Podobną sytuację obserwuje się odnośnie do kolagenu rozpuszczalnego w 0,5 M CH_3COOH . Najniższy wskaźnik stwierdzono w grupie II, wyższe od grupy kontrolnej w grupie III i IV. U królików grupy II w porównaniu z pozostałymi grupami stwierdzono natomiast najwyższą zawartość hydroksyproliny we frakcji rozpuszczalnej w 0,1 M NaOH. Należy także podkreślić, że tylko w grupie II stwierdzono ogólnie niższą zawartość kolagenu w warstwie środkowej i wewnętrznej aorty, co jest zgodne z wynikami naszych wcześniejszych badań (24).

Elastyn ściany aorty

Wyniki badań frakcji nierozpuszczalnej w 0,1 M NaOH po jej delipidacji acetonem i eterem zestawiono w tab. 2.

We frakcji tej hydroksyprolina stanowiła 1,50—1,77% obecnego białka, a stosunek proliny do hydroksyproliny wahał się w granicach 7,43—8,53. Stosunkowo najwyższą zawartość białka tej frakcji obserwowano w grupie zwierząt z miażdżycą doświadczalną, wyraźnie niższe ilości w grupie z miażdżycą i hipertyreozą. Różnice te nie są jednak statystycznie znamienne. Względnie stały stosunek proliny do hydroksyproliny oraz

Tab. 1. Białka rozpuszczalne i frakcje kolagenowe warstwy środkowej i wewnętrznej
 Proteins and collagen fractions in intima-media layer of aorta of rabbits

Grupa	Frakcja rozpuszczalna w 0,45 M NaCl			Frakcja rozpuszczalna w 0,5 M CH ₃ OOH		
	Białko mg/gwt*	Kolagen mg/gwt	%	Białko mg/gwt	Kolagen mg/gwt	%
I	16,65 ±1,22	0,70 ±0,04	4,2	3,15 ±0,78	0,30 ±0,04	9,5
II	15,28 ±1,34	0,53 ±0,09	3,5	5,62 ±0,71	0,25 ±0,07	4,4
III	19,23 ±4,15	0,81 ±0,21	4,2	3,18 ±0,71	0,36 ±0,14	11,3
IV	20,07 ±3,58	0,73 ±0,32	3,6	6,65 ±1,08	0,41 ±0,06	6,2

* 1 g świeżej wilgotnej tkanki.

* mg/1 g of fresh, wet tissue.

zawartość tego ostatniego aminokwasu pozwala przypuszczać, że otrzymana frakcja reprezentuje elastyn ściany naczyniowej królików.

W tab. 3 zestawiono łączną zawartość białek podporowych, kolagenu i elastynu warstwy środkowej i wewnętrznej aorty w badanych grupach zwierząt. Mimo braku istotnych statystycznie różnic na uwagę zasługuje obniżony stosunek kolagenu do elastynu w grupie II i brak takiej zmiany w grupie zwierząt, u których obok miażdżycy wywołano hipertyreozę doświadczalną.

DYSKUSJA

Rola kolagenu w rozwoju zmian miażdżycowych jest przedmiotem dużego zainteresowania. Akumulacja włókien kolagenowych w blaszkach miażdżycowych uważana jest za przyczynę nieodwracalnych zmian morfologicznych (15). W miażdżycy doświadczalnej, szczególnie wywołanej uszkodzeniem ściany naczyniowej lub nadciśnieniem, obserwuje się wzrost aktywności hydroksylazy prolinowej oraz zawartości kolagenu w warstwie wewnętrznej (11, 17). Podobne zmiany wykazano w aortach królików poddanych działaniu adrenaliny i tyroksyny (10, 12). Jak wynika z prac Roberta i wsp. (19) oraz Kivirikko i wsp. (7), sama tyroksyna lub trójiodotyronina, jak się wydaje, nie wpływa na syntezę kolagenu w fibroblastach, a nawet hamuje jego powstawanie. W przeprowadzonych obecnie badaniach nie wykazano statystycznie istotnych zmian w zawartości kolagenu całkowitego warstwy środkowej i wewnętrznej aorty królików, u których wywołano hipertyreozę lub hipertyreozę skojarzoną z miażdżycą doświadczalną. Niemniej jednak nieco wyższa zawartość kolagenu rozpuszczalnego w aortach zwierząt grupy IV w porównaniu z grupą miażdżycową może sugerować, iż hormony tarczycy

aorty królików z miażdżycą doświadczalną i hipertyreozą (wartości średnie $\pm$ SD)
with experimental atherosclerosis and hyperthyroidism (mean value $\pm$ SD)

Frakcja żelifikująca (nierozpuszczalna)			Frakcja rozpuszczalna w 0,1 M NaOH			Razem frakcje kolagenowe		
Białko mg/gwt	Kolagen mg/gwt	%	Białko mg/gwt	Kolagen mg/gwt	%	Białko mg/gwt	Kolagen mg/gwt	%
42,08 $\pm$ 1,51	23,59 $\pm$ 1,94	56,1	10,72 $\pm$ 1,51	0,27 $\pm$ 0,04	2,5	72,60	24,86	34,2
35,20 $\pm$ 3,80	20,26 $\pm$ 2,23	57,5	8,40 $\pm$ 0,81	0,35 $\pm$ 0,06	4,2	64,50	21,39	33,5
38,72 $\pm$ 5,42	22,23 $\pm$ 2,67	57,4	6,47 $\pm$ 1,30	0,21 $\pm$ 0,08	3,2	67,60	23,61	34,9
41,99 $\pm$ 2,09	22,43 $\pm$ 2,62	53,4	8,18 $\pm$ 1,85	0,30 $\pm$ 0,06	3,7	76,89	23,87	31,0

hamują w pewnym stopniu zmiany w zakresie kolagenu, charakterystyczne dla miażdżycy wywołanej dietą bogato cholesterolową.

Sugestie te nie znajdują potwierdzenia w badaniach histochemicznych (20). Wprawdzie wywołana hipertyreozą powodowała obniżenie stężenia lipidów całkowitych i cholesterolu w surowicy królików grup III i IV, pozostawało to jednak bez wpływu na rozwój zmian miażdżycowych wywołanych hipercholesterolemią w grupie IV. Patomechanizm miażdżycy doświadczalnej wywołanej przewlekłą hiperlipemią nie został w pełni wyjaśniony. Według Rossa i Harkera (21), pierwotna inhibicja lipidów do warstwy śródbłonka prowadzi do jego uszkodzenia, proliferacji komórek mięśni gładkich, przerostu pozakomórkowych elementów tkanki łącznej i innych następstw wspólnych dla procesu miażdżycowego. Ponieważ w warunkach doświadczenia, mimo obniżenia stężenia cholesterolu hipertyreozą nie doprowadziła do normalizacji lipemii, należy przypuszczać, że hormony tarczycy nie mają bezpośredniego wpływu na hiperlipemiczną inicjację procesu miażdżycowego. Fakt braku jakichkolwiek zmian miażdżycowych w grupie III nie wyklucza jednakże pośredniej korzystnej roli hormonów tarczycy w warunkach normalnej i umiarkowanej hiperlipoproteidemii.

Wnioski

1. Hipertyreozą doświadczalną wywołana u królików zdrowych i pozostających na diecie miażdżycorodnej nie powoduje istotnych zmian w zawartości kolagenu, elastynu i białek podporowych warstwy środkowej i wewnętrznej aorty.

Tab. 2. Białko całkowite, prolina i hydroksyprolina we frakcji elastynu aorty królików (wartości średnie $\pm$ SD)
 Proteins, proline and hydroxypoline in elastin fraction of rabbits aorta (mean value $\pm$ SD)

Grupa	Sucha masa mg/gwt *	Białko		Prolina		Hydroksyprolina		Pro	
		mg/gwt	% s.m.	mg/gwt	% białka	mg/gwt	% białka	OH-Pro	
I	131,50 $\pm$ 29,95	81,02 $\pm$ 17,10	61,61	9,05 $\pm$ 1,71	11,17	1,22 $\pm$ 0,17	1,50	7,42	
II	149,19 $\pm$ 25,05	93,20 $\pm$ 14,80	62,47	10,49 $\pm$ 4,80	11,25	1,30 $\pm$ 0,27	1,39	8,07	
III	149,24 $\pm$ 18,23	81,18 $\pm$ 13,79	54,40	11,49 $\pm$ 5,42	14,15	1,44 $\pm$ 0,85	1,77	7,98	
IV	140,98 $\pm$ 41,50	77,30 $\pm$ 18,13	54,83	10,92 $\pm$ 3,16	14,13	1,28 $\pm$ 0,44	1,66	8,53	

* 1 g świeżej wilgotnej tkanki.

* mg/lg of fresh, wet tissue.

Tab. 3. Zawartość i skład frakcji białkowych warstwy środkowej i wewnętrznej aorty królików (wartości średnie $\pm$ SD)
 Content and composition of protein fractions in intima-media layer of rabbits aorta (mean value $\pm$ SD)

Grupa	Zawartość białka ogółem mg/gwt*	Frakcje białkowe						Kolagen	Elastyn
		Białka podporowe		Kolagen		Elastyn			
		mg/gwt	%	mg/gwt	%	mg/gwt	%		
I	153,62 ±22,12	47,74 ±7,16	31,08	24,86 ±2,06	16,18	81,02 ±17,10	52,74	0,307	
II	157,70 ±21,46	43,11 ±5,88	27,34	21,39 ±2,47	13,56	93,20 ±14,80	59,10	0,230	
III	148,78 ±25,37	43,99 ±7,55	29,57	23,61 ±3,00	15,87	81,18 ±13,79	54,56	0,291	
IV	154,19 ±26,74	53,02 ±9,18	34,38	23,87 ±3,06	15,48	77,30 ±18,13	50,14	0,309	

* 1 g świeżej wilgotnej tkanki.

* mg/l g of fresh, wet tissue.

2. W grupie zwierząt z miażdżycą doświadczalną i hipertyreozą obecność hormonów tarczycy ogranicza zmiany w zakresie kolagenu, co obserwowano w grupie pozostającej wyłącznie na diecie bogato cholesterolowej.

3. W warunkach doświadczenia wywołana hipertyreozą nie spowodowała zmian miażdżycowych w grupie zwierząt kontrolnych oraz pozostała bez wpływu na rozwój takich zmian w grupie królików pozostających na diecie miażdżycorodnej.

*

Praca objęta planem resortowym nr 10 RMZ-I-1/47. Koordynator: Instytut Reumatologii, Warszawa, Spartańska 1.

PIŚMIENNICTWO

1. Baló J. J.: Beitr. path. Anat. **102**, 341—348, 1939.
2. Benditt E. P.: Am. J. Pathol. **86**, 693—702, 1977.
3. Bürck H. C.: Microchim. Acta **2**, 200—205, 1960.
4. Cardinale G. J., Udenfriend S.: Adv. Enzymol. **41**, 245—300, 1974.
5. Hanzlik J., Stępień A., Tomaszewski J.: w druku.
6. Heikkinen E.: Acta Physiol. Scand., Suppl. **317**, 1—69, 1968.
7. Kivirikko K. I., Risteli L.: Med. Biol. **54**, 159—186, 1976.
8. Kobayasi T.: Acta Path. Microbiol. Scand. **76**, 193—202, 1969.
9. Kirtchevsky D., Tepper S. A., Story J. A.: Atherosclerosis **23**, 249—252, 1976.
10. Langer R. O., Fuller G. C.: Atherosclerosis **17**, 463—469, 1973.
11. Levene C. J.: Brit. J. Exp. Pathol. **43**, 469—472, 1962.
12. Lorenzen I.: Acta Endocrin **39**, 615, 1962.
13. Lorenzen I.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **108**, 325—328, 1962.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265—275, 1951.
15. McCullagh K. A., Balian G.: Nature (London) **258**, 73—75, 1975.
16. Oberdisse K., Klein E.: Die Krankheiten der Schilddrüse. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967, 76.
17. Ooshima A., Fuller G., Cardinale G., Spector S., Udenfriend S.: Science **190**, 898—900, 1975.
18. Pearson T. A., Wang A., Solez K., Heptinstall R. H.: Am. J. Pathol. **81**, 379—388, 1975.
19. Robert A. M., Ouzilou J., Robert L.: Rev. Europ. Etudes Clin. Biol. **16**, 544—553, 1971.
20. Ross R., Gomset J. A.: Science **180**, 1332—1339, 1973.
21. Ross R., Harker L.: Science **193**, 1094—1400, 1976.
22. Tomaszewski J., Hanzlik J.: Diagn. Lab. **7**, 183—188, 1971.
23. Tomaszewski J., Hanzlik J., Łopatyński J., Grzywa M., Kozak J., Dmoszyńska E.: w przygotowaniu do druku.
24. Tomaszewski J., Hanzlik J., Łopatyński J., Wolański I., Grzywa M., Zawiślak H.: Pol. Arch. Med. Wewn. **50**, 793, 1973.
25. Troll W., Lindsley J.: J. Biol. Chem. **215**, 655—664, 1955.
26. Wolynsky H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **135**, 364—369, 1970.

Otrzymano 3 XI 1978.

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование содержания коллагеновых фракций, эластина и подпорочных белков в средней и внутренней части аорты кроликов в четырех группах: I — контрольной, II — находящейся на диете богатой холестерином, III — экспериментальным гипертириозом, IV — с гипертириозом и экспериментальной атероматозой.

Обнаружено, что гипертириоз вызванный у здоровых кроликов и у животных получавших атероматогенную диету не вызывает существенных изменений содержания коллагена, эластина и подпорочных белков средней и внутренней части аорты. Обнаруженное незначительное повышение количества коллагена у животных из экспериментальной атероматозы и с гипертириозом, по сравнению с группой животных только с экспериментальной атероматозой, не оказало влияния на появление макроскопических атероматозных изменений.

SUMMARY

The content of collagen fractions, elastin and core proteins was determined in the intima-media layer in the aorta wall of 4 groups of rabbits: I — in the control group, II — in the group on a cholesterol rich diet, III — in the group with experimental hyperthyroidism, IV — in the group with both hyperthyroidism and experimental atherosclerosis.

It was stated that hyperthyroidism in rabbits both on normal and atherogenic diet does not produce significant changes in the collagen, elastin and core proteins contents of the intimamedia layer of the aorta wall.

A mildly higher soluble collagen content was observed in the group with both experimental atherosclerosis and hyperthyroidism in the relation to the experimental atherosclerosis group but the macroscopic atherosclerotic signs did not differ.