

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIV, 35

SECTIO D

1979

Ośrodek Naukowo-Badawczy. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. med. Jeremiasz Tomaszewski
Klinika Ogólna Chorób Wewnętrznych. Instytut Chorób Wewnętrznych.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Hanzlik

Jeremiasz TOMASZEWSKI, Janusz HANZLIK,
Ireneusz WOLAŃSKI, Marek GRZYWA,
Helena DONICA, Krystyna WOŹNIAK,
Mirosława IŁENDA

**Badania nad składem chemicznym ściany naczyniowej.
XVIII. Glikozoaminoglikany ściany aorty królików po podawaniu diety
miażdżycorodnej i wywołaniu hipertyreozy doświadczalnej**

Изучение химического состава сосудистой стенки. XVIII. Гликозаминогликаны
стенки аорты кролика после артериосклерозогенной диеты и вызванного
экспериментального гипертирозидизма

Studies on the Chemical Composition of the Vascular Wall.
XVIII. Glycosoaminoglycans of the Aortic Wall in Rabbits on an Atherogenic
Diet and after the Production of Experimental Hyperthyroidism

Glikozoaminoglikany (GAG), stanowiące ok. 1% suchej masy warstwy środkowej i wewnętrznej ściany tętniczej, są ważnym elementem strukturalnym substancji podstawowej tkanki łącznej (25). W połączeniu z białkami podporowymi tworzą one agregaty proteoglikanów, zaangażowane w organizację struktury przestrzennej elementów włókninkowych tkanki. Poza udziałem w zabezpieczaniu własności mechanicznych ściany tętniczej, dzięki dużej aktywności metabolicznej GAG uczestniczą w regulacji przemian wewnątrztkankowych, między innymi poprzez interakcję z wynikającymi ze światła naczyń krwionośnych lipoproteidami (1, 21).

Jak wykazano w poprzednich naszych badaniach (24, 4, 5, 6), zawartość i skład GAG warstwy środkowej i wewnętrznej ulega pewnym zmianom w procesie fizjologicznego starzenia, w miażdżycy doświadczalnej oraz w przebiegu zaburzeń metabolicznych towarzyszących cukrzycy. Z prac Lorenzena (11, 12) wynika, że podawanie zwierzętom doświadczalnym tyroksyny powoduje również wzrost zawartości heksozamin w ścianie naczyń tętniczych. Przedmiotem obecnych badań było określenie zawartości i składu GAG tętnicy głównej królików w przebiegu hipertyreozy doświadczalnej oraz hipertyreozy skojarzonej z miażdżycą wywołaną przewlekłym podawaniem diety bogato cholesterolowej.

MATERIAŁ I METODY

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

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

Sposób przeprowadzenia eksperymentu, łącznie z podawaniem diety miażdżycorodnej i wywołaniem hipertyreozy, opisano szczegółowo w poprzedniej pracy (6). Po zakończeniu cyklu doświadczalnego zwierzęta zabijano, wypreparowywano tętnice główne i po przecięciu oceniano stopień zmian miażdżycowych. Z wypreparowanej warstwy środkowej i wewnętrznej pobierano wycinki do badań histochemicznych, natomiast w pozostałej tkance określano zawartość i skład frakcji białkowych oraz GAG. Tkanekę przeznaczoną do badania GAG homogenizowano w homogenizatorze szklanym w 4-krotnej objętości wody destylowanej i liofilizowano. Suchy liofilizat odtłuszczano acetonem i eterem, a po wysuszeniu do stałej wagi w temp. pokojowej poddawano trawieniu papainą przez 6 godz. w temp. 65°C. Preparatykę GAG oraz rozdział na poszczególne frakcje prowadzono według zmodyfikowanej procedury Sveicara i Robertsona (23), opisanej w poprzedniej pracy (24). W wyniku rozdziału oczyszczonych GAG na kolumnach celulozowych w postaci kompleksów z chlorkiem cetylopirydyniowym otrzymano 7 frakcji:

- 1) frakcję nie kompleksującą (siarczan keratanu, glikoproteidy),
- 2) frakcję kwasu hialuronowego,
- 3) frakcję siarczanu heparanu,
- 4) frakcję chondroityno-4-siarczanu,
- 5) frakcję chondroityno-6-siarczanu,
- 6) frakcję siarczanu dermatanu,
- 7) frakcję heparyny.

Zawartość GAG w poszczególnych frakcjach wyrażano w μg kwasów uronowych oznaczanych metodą opisaną przez Sittera i Muir (2). Wyniki przeliczono na 100 mg suchej odtłuszczonej tkanki i poddano analizie statystycznej według testu *t* Studenta.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki oznaczeń całkowitej ilości GAG warstwy środkowej i wewnętrznej aorty królików po trawieniu papainą oraz w preparatach oczyszczonych po precypitacji octanem potasu w etanolu przedstawiono w tab. 1. Jakkolwiek nieco niższą zawartość GAG obserwuje się w aortach królików pozostających na diecie miażdżycorodnej, wykazane różnice nie są statystycznie istotne.

Procentową zawartość poszczególnych frakcji GAG po rozdziale na kolumnach celulozowych przedstawiono w tab. 2. Skład GAG ściany aorty w badanych grupach zwierząt również nie wykazuje statystycznie istotnych różnic. Jedynie w grupie królików otrzymujących przez 100 dni

Tab. 1. Zawartość GAG w warstwie środkowej i wewnętrznej aorty królików w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnia $\pm$ SD)

Grupa	Zawartość kwasów uronowych		Odzysk %
	całkowita μg/100 mgst*	w oczyszczonej frakcji GAG μg/100 mgst	
I	464,9 ± 56,7	315,8 ± 58,5	67,9
II	399,5 ± 63,8	261,6 ± 42,1	65,5
III	463,8 ± 36,2	313,2 ± 12,4	67,5
IV	472,6 ± 33,8	313,7 ± 18,4	66,3

* 100 mg suchej odłuszczonej tkanki.

* 100 mg of the dry defatted tissue.

Tab. 2. Procentowy skład frakcji GAG ściany aorty królików w poszczególnych grupach doświadczalnych (wartości średnie $\pm$ SD)

Grupa	Frakcja nie komplek- sująca	Frakcje glikozoaminoglikanów					Hepatyna
		Kwas hialuronowy	Siarczan heparanu	Chondroityno- -4-siarczan	Chondriotyno- -6-siarczan	Siarczan dermatanu	
I	23,1 ± 6,6	13,2 ± 7,4	18,9 ± 2,5	23,9 ± 8,4	17,4 ± 4,6	1,8 ± 1,7	1,8 ± 2,3
II	20,7 ± 2,8	12,8 ± 7,0	20,4 ± 4,0	26,9 ± 3,4	13,1 ± 2,6	4,0 ± 3,7	2,1 ± 3,4
III	24,9 ± 8,5	11,6 ± 3,5	17,2 ± 4,4	25,3 ± 8,3	14,7 ± 1,3	3,8 ± 3,3	2,5 ± 2,8
IV	23,3 ± 1,4	11,2 ± 8,7	19,8 ± 2,2	27,7 ± 6,0	13,6 ± 4,4	1,6 ± 1,4	2,8 ± 2,8

dietę bogato cholesterolową obserwuje się zmniejszoną zawartość frakcji nie kompleksującej oraz wzrost zawartości siarczanu heparanu i chondroityno-4-siarczanu. W grupie tej łączna zawartość GAG siarkowych sięga 64,4% całkowitej ilości GAG, wobec 62,9% stwierdzonych w grupie kontrolnej. U zwierząt z współistniejącą hipertyreozą GAG siarkowe stanowiły 62,7%, natomiast ich udział w grupie III był nieco niższy i wynosił średnio 61%.

DYSKUSJA

Podawana w literaturze zawartość i skład GAG warstwy środkowej i wewnętrznej aorty wykazują duże różnice, uwarunkowane głównie względami metodycznymi (10, 17). Jak wynika z naszych poprzednich badań (24, 4) oraz prac innych autorów (14), podstawowym składnikiem GAG ściany naczyniowej są chondroityno-siarczany i siarczany heparanu. Rola tych związków w rozwoju zmian miażdżycowych nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Z badań biochemicznych i histologicznych (4, 15, 18) można przypuszczać, że obserwowany wzrost zawartości GAG siarkowych nasila procesy włóknienia, których następstwem może być powstawanie blaszek miażdżycowych. Zachwianie prawidłowych proporcji poszczególnych frakcji GAG może ponadto upośledzać inne procesy metaboliczne, między innymi infiltrację lipidów (3), wewnątrznaczyniowe procesy krzepnięcia i fibrynolizy (7, 16) itp.

Wpływ regulacji hormonalnej na przemiany GAG jest przedmiotem zainteresowania nielicznych autorów. W badaniach *in vitro* wykazano stymulację syntezy GAG w chondrocytach pod wpływem hormonu przytarczyc i kalcytoniny (13, 22). Proces ten szczególnie aktywnie przebiega w komórkach młodych tkanek i jest prawdopodobnie związany z procesem mineralizacji kości. Schiller (19) w badaniach *in vivo* stwierdziła obniżony poziom chondroityno-siarczanów chrząstki i skóry po wycięciu przysadki mózgowej, po podawaniu kortykosterydów, w przebiegu cukrzycy alloxanowej i w hipertyreozie. Po tyreoidektomii obserwuje się spadek aktywności transferazy ksylozowej, hamujący syntezę GAG i odwracalny po podaniu egzogennej L-tyroksyny (20). Nie wiadomo jednak, czy aktywności tego enzymu można przypisać wzrost zawartości heksozamin ściany tętniczej po podawaniu adrenaliny i tyroksyny obserwowany przez Lorenzena (11, 12). Autor przypuszcza, że jest to wynik odpowiedzi reparacyjnej na uszkadzające działanie adrenaliny. W naszych obecnych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości i składzie GAG warstwy środkowej i wewnętrznej aorty królików z hipertyreozą doświadczalną w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast, po-

dobnie jak w przypadku kolagenu i elastynu (6), hipertyreozą wydaje się ograniczać zmiany wywołane miażdżycą doświadczalną, wyrażające się wzrostem udziału GAG siarkowych. Wyniki powyższe, mimo braku różnic w nasileniu makroskopowych zmian miażdżycowych, jak się wydaje potwierdzają ochronne działanie hormonów tarczycy sugerowane przez innych autorów (8, 9).

Wnioski

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości i składzie GAG aorty królików z hipertyreozą doświadczalną i grupy kontrolnej.
2. W porównaniu z grupą miażdżycową u królików z miażdżycą i hipertyreozą obserwowano niższy odsetek GAG siarkowych.

*

Praca finansowana w ramach planu resortowego nr 10 RMZ-I-1/47. Koordynator: Instytut Reumatologii Warszawa, Spartańska 1.

PIŚMIENNICTWO

1. Bihari-Varga M., Simon I., Gero S.: *Acta Biochim. Biophys.* **3**, 385—396, 1968.
2. Bitter T., Muir H. M.: *Anal. Biochem.* **4**, 330—334, 1962.
3. Day E. C., Powell I. R., Levy R. S.: *Artery* **1**, 126—137, 1975.
4. Hanzlik J., Tomaszewski J., Łopatyński J., Wolański I., Gilatowska B.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* **50**, 755—761, 1973.
5. Hanzlik J., Tomaszewski J., Nicer T., Stępień A., Kozak J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **31**, 321—326, 1976.
6. Hanzlik J., Tomaszewski J., Woźniak K., Wolański I., Grzywa M., Kimak E.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **34**, 275—282, 1979.
7. Izuka K., Murata K.: *Atherosclerosis* **16**, 217—224, 1972.
8. Kritchevsky D., Moynihan J. L., Langan J., Tepper S. A., Sachs M. L.: *J. Atheroscler. Res.* **1**, 211—221, 1961.
9. Kritchevsky D., Tepper S. A., Story J. A.: *Atherosclerosis* **23**, 249—252, 1976.
10. Kumar V., Berenson G. S., Luiz H., Dalferes E. R. Jr., Strong J. P.: *J. Atheroscler. Res.* **7**, 573—581, 1967.
11. Lorenzen I.: *Acta Endocrin.* **37**, 183—190, 1961.
12. Lorenzen I.: *Acta Endocrin.* **39**, 615—626, 1962.
13. Luben R. A., Goggins J. F., Raisz L. G.: *Endocrinology* **94**, 737—745, 1974.
14. Murata K., Harada T., Okubu K.: *J. Atheroscler. Res.* **8**, 951—958, 1968.
15. Murata K., Oshima Y.: *Atherosclerosis* **14**, 121—128, 1971.

16. Murata K., Nakazawa K., Hamai A.: *Atherosclerosis* **21**, 93—103, 1975.
17. Nakamura R. I., Tokita K., Tateno S., Kotoku T., Ohba T.: *J. Atheroscler. Res.* **8**, 891—902, 1968.
18. Okada R., Hazato N., Nishijo T., Sugiura M.: *Jap. Circ. J.* **37**, 253—259, 1973.
19. Schiller S.: *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 137—158, 1966.
20. Schiller S.: *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 457—464, 1976.
21. Srinivasan S. R., Dolan P., Radharishnamurthy B., Berenson G. S.: *Atherosclerosis* **16**, 95—104, 1972.
22. Suzuki F., Yoneda T., Shimomura Y.: *FEBS Letters* **70**, 155—158, 1976.
23. Svejcar J., Robertson W. B.: *Anal. Biochem.* **18**, 333—350, 1967.
24. Tomaszewski J., Hanzlik J., Łopatyński J., Gilatowska B.: *Badania nad składem chemicznym ściany naczyniowej. XI. Glikozoaminoglikany ściany ludzkiej tętnicy głównej w procesie fizjologicznego starzenia. Pol. Arch. Med. Wewn.* **47**, 51—59, 1971.
25. Tomaszewski J.: *Glikozoaminoglikany tkanki łącznej. Post. Biochem.* **20**, 447—469, 1974.

Otrzymano 3 XI 1978.

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние применения атероматозогенной диеты и экспериментального гипертириоза на абсолютный состав и соответствующие фракции гликозаминогликанов стенки основной аорты кроликов.

В результате проведенных исследований не обнаружено существенных расхождений в составе и количестве гликозаминогликанов аорты кроликов по сравнению с экспериментальным гипертириозом. Сравнивая группу животных получающих атероматозогенную диету с кроликами, у которых обнаружено атероматоз и гипертириоз, был замечен более низкий процент серных гликозаминогликанов.

SUMMARY

The authors studied the effect of the administration of an atherogenic diet and experimental hyperthyroidism on the total content and on the individual fractions of glycosoaminoglycans in the aortic wall of rabbits. No significant differences in the glycosoaminoglycans content and its fractions in the group of animals with experimental hyperthyroidism were ascertained. The content of sulfuric glycosoaminoglycans in the group with both atherosclerosis and hyperthyroidism was lower in the relation to the group with atherosclerosis alone.