

SESJA IV PIĄTEK 21.10, 15.20–16.15 APOPTOZA

19

Zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej prowadzi do zwiększonej apoptozy limfocytów krwi obwodowej

Jarosław Wójcik¹, Anna Korycińska², Jakub Drozd¹,
Andrzej M. Kot³, Jacek Roliński²,
Teresa Widomska-Czekajka¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Lublin

²Zakład Immunologii Klinicznej, Akademia Medyczna, Lublin

³Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademia Medyczna, Lublin

Zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej (PCI) ma na celu przywrócenie prawidłowego krążenia w obrębie niedokrwionego, hibernowanego mięśnia sercowego. Prowadzi to do przerwania procesu postępującej martwicy miokardiocytów, zapobiega pęknięciu niestabilnej blaszki miażdżycowej lub też stabilizuje ją w trakcie zawału mięśnia serca. Zabieg ten niesie jednak ze sobą ryzyko uszkodzenia miokardiocytów, do którego dochodzi w wyniku reperfuzji, kiedy to z serca wypłukiwane są toksyczne metabolity, wolne rodniki tlenowe i prozapalne cytokiny nagromadzone w nim w warunkach deficytu tlenowego. Znajduje to odbicie w wywoływaniu miejscowego oraz ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Wiąże się z tym aktywacja i następcza apoptoza komórek immunokompetentnych krwi (m. in. limfocytów). Celem naszego badania było wykazanie, że zabieg angioplastyki wieńcowej prowadzi do aktywacji limfocytów, któremu towarzyszy zwiększona apoptoza tych komórek.

Do badania zakwalifikowano 25 chorych (16 mężczyzn i 9 kobiet) w wieku 39–71 lat, poddanych zabiegowi PCI. Analizowaną grupę podzielono na 2 podgrupy: do grupy pierwszej włączono 15 chorych ze stabilną chorobą wieńcową (APS), do grupy drugiej – 10 chorych ze świeżym zawałem mięśnia serca (AMI). Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana z tętnicy udowej trzykrotnie: 1) przed zabiegiem, 2) bezpośrednio po zabiegu, 3) 24 godz. po zabiegu PCI. Dla wykrycia apoptotycznych limfocytów we krwi obwodowej użyto dwuocianu fluoresceiny (FDA) i metod cytometrii przepływowej.

Odsetek apoptotycznych limfocytów we krwi obwodowej chorych narastał w czasie w obydwu grupach. W grupie pierwszej wynosił on kolejno: w 1. etapie 1,05%±0,59; w 2. etapie 1,49%±1,15; w 3. etapie 4,27%±2,15; a w grupie drugiej odpowiednio: 2,02%±0,74; 3,09%±2,1; 6,79%±3,42. Zarówno w grupie pierwszej, jak i drugiej obserwowano istotny wzrost odsetka apoptotycznych limfocytów w etapie 3. w porówna-

niu do etapu 1. (dla grupy pierwszej p=0,004; dla grupy drugiej p=0,04), a także w porównaniu do etapu 2. (dla grupy pierwszej p=0,005; dla grupy drugiej p=0,03). Porównania międzygrupowe wykazały istotnie wyższy odsetek apoptotycznych limfocytów w 1. etapie badania we krwi pacjentów z AMI w porównaniu do pacjentów z APS p=0,02.

W wyniku procesów niedokrwienia-reperfuzji towarzyszących zabiegom PCI dochodzi do aktywacji i następczej apoptozy limfocytów krwi obwodowej, która nasila się po zabiegu w obydwu grupach chorych. Zjawisko to zachodzi być może równoległe do procesów apoptozy i martwicy komórek mięśnia serca, zaznaczonych szczególnie wyraźnie podczas zawału. Dlatego też zrozumiąły jest obserwowany przez nas wyższy odsetek apoptotycznych limfocytów we krwi obwodowej pacjentów z AMI w porównaniu do pacjentów z APS.

20

Zjawisko apoptozy w blaszce miażdżycowej tętnic wieńcowych

Grzegorz Piotrowski¹, Barbara Cebula², Maciej Kośmider¹,
Zenon Gawor¹, Tadeusz Robak², Piotr Smolewski²

¹Oddział Kardiologii i Chorób Wewnętrznych,
WSS im. M. Kopernika, Łódź

²Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Bezpośredni mechanizm destabilizacji blaszki miażdżycowej w tętnicy wieńcowej pozostaje wciąż nieznany. Pęknięcia lub owrzodzenia blaszki miażdżycowej doprowadzają do klinicznej manifestacji pod postacią ostrych zespołów wieńcowych.

Materiał i metody: U 16 pacjentów (9 mężczyzn i 7 kobiet) w wieku 54±17 lat badano stan komórek śródbłonna pokrywających blaszkę miażdżycową. Postępując się metodą cytometrii przepływowej wspomaganą oceną w mikroskopie fluorescencyjnym, oceniano odsetek komórek śródbłonna wykazujących zaburzenia integralności błony komórkowej barwionych jodkiem propydydy (JP). W komórkach tych, za pomocą metody z aneksyną V, badano także obecność fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej, zjawiska stanowiącego jeden z markerów apoptozy. U pacjentów z objawami stabilnej dusznicy bolesnej wykonano zabieg angioplastyki wieńcowej (PTCA). Materiał z balonu, którym wykonywano PTCA, sputkiwano za pomocą PBS natychmiast po wykonaniu zabiegu. W uzyskanej w ten sposób zawiesinie oznaczano odsetek komórek JP+. Równoległe badano obecność charakterystycznych dla apoptozy zmian błonowych w barwieniu z aneksyną V, weryfikując ocenę w mikroskopie fluorescencyjnym. Ponadto we krwi obwodowej (w osoczu ubogopłytkowym) oznaczano odsetek JP+ mikrocząstek śródbłonna przed i po PTCA. Dla identyfikacji komórek oraz mikrocząstek śródbłonna oznaczano powierzchniową ekspresję antygenów CD31+/CD41- oraz CD51+/CD31+.

Wyniki: Odsetek komórek JP+ korelował z odsetkiem komórek wykazujących dodatnią reakcję z aneksyną V. Wśród

komórek śródbłonna złuszczonego podczas zabiegu PTCA, komórki JP+, wykazujące cechy apoptozy, stanowiły około 75% wszystkich zarówno w przypadku komórek o fenotypie CD31+/CD42 jak i komórek o fenotypie CD51+/CD31+. Wśród mikrocząstek komórek śródbłonna krążących we krwi odsetek komórek JP+ był znamienne mniejszy i nie różnił się istotnie przed i po wykonaniu PTCI. Szczegółowe wyniki przedstawia Tabela I.

Tabela I.

	CD31+/CD42-	CD51+/CD31+
% mikrocząstek komórek śródbłonna JP+ we krwi obwodowej przed PTCI	33,88±18,92	29,27±19,94
% mikrocząstek komórek śródbłonna JP+ we krwi obwodowej 30 min po PTCI	46,9±20,71	34,68±30,15
% komórek śródbłonna JP+/aneksyna V+ w popłuczynach z balonu po PTCI	76,87±14,82	74,27±26,40

Wnioski:

1. Bardzo duża część komórek śródbłonna w blaszkach miażdżycowych w tętnicach wieńcowych wykazuje utratę integralności błony komórkowej, ze zmianami błonowymi charakterystycznymi dla apoptozy.
2. Apoptoza komórek śródbłonna jest prawdopodobnie zjawiskiem odgrywającym kluczową rolę w ewolucji zmian miażdżycowych, prawdopodobnie także w destabilizacji blaszki miażdżycowej.
3. Dla wykluczenia możliwości zmian w obrębie błony komórkowej indukowanych mechanicznym uszkodzeniem śródbłonna w czasie PTCA konieczne są dalsze badania z użyciem innych markerów apoptozy, takich jak aktywacja kaspaz czy fragmentacja DNA.

Wstęp: Choroba niedokrwienna mięśnia serca coraz częściej traktowana jest jako przewlekła choroba zapalna, ze źródłem zapalenia zlokalizowanym w obrębie blaszek miażdżycowych, jak również w obrębie niedokrwionego miokardium. Główną rolę przypisuje się tu odpowiedzi komórkowej zachodzącej z udziałem aktywowanych limfocytów T oraz monocytów i makrofagów. Powtarzające się epizody niedokrwienia podtrzymują i nasilają stymulację układu immunologicznego. Jednymi z surowiczych markerów apoptozy i ogólnoustrojowego stanu zapalnego są cząsteczki sFas i sFasL. Wzmogłą ekspresję ich cytoplazmatycznych odpowiedników obserwuje się na komórkach narządów objętych zapaleniem i naciekających te narządy komórkach immunokompetentnych. Uważa się, że są one odpowiedzialne za wchodzenie w apoptozę aktywowanych limfocytów T, a także innych komórek wykazujących zwiększoną ekspresję cytoplazmatycznego receptora Fas. W naszym badaniu ocenialiśmy stężenie cząsteczek sFas i sFasL w osoczu pacjentów z chorobą 3 naczyń wieńcowych.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 14 chorych w wieku 41-68 lat ze stabilną chorobą 3 naczyń wieńcowych poddanych badaniu koronarograficznemu w trybie planowym. Grupę kontrolną stanowiło 12 zdrowych ochotników. Stężenie cząsteczek sFas i sFasL w osoczu osób badanych i zdrowych ochotników mierzono metodą immunoenzymatyczną przy użyciu komercyjnych zestawów oraz czytnika ELISA.

Wyniki: W osoczu pacjentów z chorobą 3 naczyń wieńcowych stwierdzono znacząco wyższe stężenie cząsteczki sFasL jak również cząsteczki sFas w porównaniu do osocza grupy kontrolnej. Wartości tych stężeń wynosiły odpowiednio: dla sFasL – 0,43±0,31 ng/ml vs 0,12±0,2 ng/ml; p<0,005 i dla sFas – 744,83±413,76 pg/ml vs 388,66±90,39 pg/ml; p<0,005.

Wnioski: U pacjentów z chorobą 3 naczyń wieńcowych i rozległym obszarem niedokrwionego mięśnia serca obserwowano wyższe stężenia cząsteczek sFas i sFasL w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej. Cząsteczki te zaangażowane są w procesy apoptozy komórek, szczególnie aktywowanych limfocytów T. Być może ich wyższy poziom w surowicy koreluje ze stopniem nasilenia ogólnoustrojowego stanu zapalnego, ale także z procesami apoptozy i uszkodzenia miokardocytów w przebiegu choroby niedokrwiennej serca.

21

Ocena stężenia cząsteczek sFas i sFasL w surowicy pacjentów ze stabilną chorobą 3 naczyń wieńcowych

Anna Korycińska¹, Jarosław Wójcik², Agnieszka Bojarska-Junak¹, Michał Dragan¹, Teresa Widomska-Czekajka², Jacek Roliński¹

¹Zakład Immunologii Klinicznej, Akademia Medyczna, Lublin

²Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Lublin

22

Niska dawka lipopolisacharydu bakteryjnego zmniejsza apoptozę w mięśniu sercowym w przebiegu wstrząsu septycznego u myszy

Monika Szaryńska-Urowicz¹, Karol Kamiński¹, Wojciech Karwowski², Maria M. Winnicka², Marcin Kożuch¹, Lech Chyczewski³, Włodzimierz J. Musiał¹, Bożena Sobkowicz¹

¹Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Białystok

²Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Białystok

³Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Akademia Medyczna, Białystok

W przebiegu wstrząsu septycznego, jednej z najczęstszych przyczyn hospitalizacji na oddziałach intensywnej terapii, często dochodzi do niewydolności serca. Badania doświadczalne udowodniły istotny udział apoptozy w tym zjawisku. Wskazały również na możliwość poprawy kurczliwości lewej komory przez wcześniejsze podanie niskiej dawki lipopolisacharydu (LPS). Jednakże po podaniu zwierzętom niskiej dawki LPS wykazano zarówno wzrost ekspresji białek antyapoptotycznych, jak i aktywację procesów sprzyjających śmierci komórek. Wpływ takiego hartowania na nasilenie procesu apoptozy w mięśniu sercowym w przebiegu wstrząsu septycznego nie został dotąd wyjaśniony. Celem pracy było określenie efektu wcześniejszego podania niskiej dawki LPS na wywołaną endotoksemią apoptozę w mięśniu sercowym.

Samcom myszy szczepu C57BL/6J w wieku 12 tygodni podano dootrzewnowo roztwór lipopolisacharydu *E. coli* (055: E5 Sigma) w dawce 4 lub 10 mg/kg. Potowie zwierząt z grupy, która otrzymała LPS w dawce 10 mg/kg, 24 godz. wcześniej podano 0,5 mg/kg LPS (dawkę hartującą), a drugiej potowie oraz zwierzętom grupy kontrolnej analogiczną objętość rozpuszczalnika. 24 godz. po podaniu ostatniej dawki LPS zwierzęta były uśmiercane, a ich serca perfundowane formaliną pod ciśnieniami fizjologicznymi. Nasilenie procesu apoptozy mierzono metodą TUNEL w mikroskopie fluorescencyjnym. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy metody ANOVA oraz testu Fishera.

Dootrzewnowe podanie LPS powodowało zależny od dawki wzrost częstości apoptozy w mięśniu sercowym ($0,28\% \pm 0,5\%$ w grupie kontrolnej, $1,38\% \pm 1,4\%$ w grupie, która otrzymała 4 mg/kg oraz $3,68\% \pm 2,9\%$ po podaniu 10 mg/kg; $p < 0,05$ ANOVA). Podanie niskiej dawki LPS 24 godziny wcześniej, powodowało zmniejszenie apoptozy w mięśniu sercowym, wywołanej wysoką dawką LPS ($1,51\% \pm 0,9\%$ vs $3,68\% \pm 2,9\%$; $p < 0,05$).

Wcześniejsze podanie niskiej dawki LPS zmniejsza, ale nie znosi proapoptotycznego wpływu wysokiej dawki endotoksyny bakteryjnej na mięsień sercowy. Wyjaśnienie mechanizmów związanych z tym zjawiskiem wymaga dalszych badań.