

SESJA X SOBOTA 22.10, 13.05–14.15 KOMÓRKI MACIERZYSTE – ANGIOGENEZA, WASKULARYZACJA

54

Impaired mobilisation of CXCR4⁺/CD34⁺ stem cells early in acute myocardial infarction is associated with low left ventricular ejection fraction and high nt-probnp levels after 1 year of follow-up

Rafał Wyderka, Wojciech Wojakowski, Joanna Ciosek,
Anna Zebzda, Anna Michałowska,
Katarzyna Maślankiewicz, Marcin Majka, Andrzej Ochała,
Mariusz Z. Ratajczak, Michał Tendera

III Katedra i Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna,
Katowice

Background: Stem cells are mobilised into the peripheral blood early in acute myocardial infarction (AMI). In patients with low left ventricular ejection fraction (LVEF) and high levels of NT-proBNP in the acute phase of AMI the mobilisation of CD34/CXCR4⁺ cells is significantly impaired, however there is no data concerning the long-term follow-up.

The aim of the study was to correlate the early mobilisation of CD34⁺, CD117⁺, CXCR4⁺, c-met⁺ stem cells in patients with STEMI treated with primary PCI with LVEF, NT-proBNP levels, hematopoietic cytokines, cardiopulmonary exercise test results in one-year follow-up.

Methods: 40 patients with STEMI (<12 hours) treated with primary PCI were enrolled. Blood samples were obtained on admission, after 24 hours and 7 days as well as after 1 year (12-16 months). The stem cells number was measured using FACS and concentrations of NT-proBNP, SDF-1, G-CSF, VEGF, IL-6 and HGF were measured using ELISA kits. Echocardiography was carried out on admission and after 1 year and the cardiopulmonary exercise test after 1 year.

Results: In patients with baseline LVEF ≤40% as well as with NT-proBNP levels in the highest tertile, the number of mobilised CXCR4⁺/CD34⁺ stem cells on admission was significantly lower in comparison to patients with LVEF >40% (p<0.03) and NT-proBNP levels in the lowest tertile (p<0.001). Moreover, patients with LVEF ≤40 after 1 year had lower baseline CXCR4⁺ cell counts than patients with LVEF>40%

during the follow-up visit (p<0.03). The baseline number of CXCR4⁺ cells was positively correlated with LVEF after 1 year (r=0.55; p<0.03). The peak number of mobilised CXCR4⁺ stem cells early in STEMI was also significantly positively correlated with the number of circulating CD34⁺, CXCR4⁺ and CD117⁺ cells after 1 year (CD34⁺: r=0.35, p<0.05; CXCR4⁺: r=0.38; p<0.03; CD117⁺: r=0.4, p<0.02) and patients with low baseline CXCR4⁺ cell counts had a lower number of CD34⁺, CD117⁺ and CXCR4⁺ cells as well as higher levels of NT-proBNP after 1 year (all p<0.03).

No significant correlations between baseline stem cells number and exercise test results were found.

Conclusion: The impaired mobilisation of stem cells early in STEMI is associated with lower LVEF, higher levels of NT-proBNP and lower circulating stem cells number after 1 year.

55

Powstawanie wysp krwiotwórczych w sercu jako wczesny etap waskulogenezy płodowej

Anna Ratajska¹, Elżbieta Czarnowska²

¹ Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Akademia Medyczna,
Warszawa

² Zakład Patomorfologii, Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa

Pierwszymi strukturami naczyniowymi w sercu płodowym są skupienia angioblastów i erytroblastów, które pojawiają się, zanim jeszcze system krążenia uzyska drożność z systemem naczyniowym serca. Do niedawna utrzymywał się pogląd, że erytroblasty i angioblasty powstają ze wspólnej komórki progenitorowej bądź erytroblasty powstają z migrujących angioblastów, podobnie jak w woreczku żółtkowym zarodków. Zgodnie z tym poglądem serce płodowe bądź narząd przednasierdziowy jako dostawca angioblastów powinny być narządem hematopoetycznym. Postanowiliśmy sprawdzić ten pogląd. Badaliśmy serca płodowe przed i tuż po zawiązaniu się pierwszych wysp krwiotwórczych oraz narząd przednasierdziowy ultrastrukturalnie i za pomocą markerów hematopoezy (CD34, CD45, c-myb) oraz markerów późnych komórek progenitorowych erytropoezy (Terr119). Zastosowaliśmy również markery komórek śródbłonna naczyniowego (angioblastów), takie jak PECAM1, VE-katherynę oraz lektynę *Griffonia simplicifolia I*. W żadnym z badanych przypadków serc płodowych myszy (10 dpc–13 dpc) nie stwierdziliśmy obecności markerów hematopoezy we wczesnych wyspach krwiotwórczych serca ani w narządzie przednasierdziowym (9,5–10 dpc). Morfologicznie również nie znaleźliśmy podobieństwa erytroblastów wysp do wczesnych komórek hematopoezy płodowej oraz wykluczaliśmy obecność komórek hematopoetycznych w narządzie przednasierdziowym. Znaleźliśmy natomiast w wyspach krwiotwórczych późniejsze markery komórek progenitorowych krwi. Komórki te znajdowały się na tym samym etapie erytro-

poęzy jak komórki krwi z krążenia systemowego (zawierały jądra komórkowe oraz resztki organelli cytoplazmatycznych – aparatu Golgiego i siatki szorstkiej). Co więcej, znajdowaliśmy również pojedyncze erytroblasty, bez kontaktu z angioblastami lub takie, które dopiero zaczynały tworzyć taki kontakt (wypustki komórkowe sięgające do zbliżającego się angioblasta). Pojedyncze erytroblasty znajdowane przez nas były zlokalizowane pod wsierdziem lub były uchwycone w momencie przechodzenia przez wsierdzie (diapedeza). Postulujemy, że erytroblasty wysp krwiotwórczych nie powstają *in situ* z angioblastów, lecz przechodzą do serca z krążenia ogólnego i tam tworzą kontakt z angioblastami.

56

Różnicowanie się komórek progenitorowych z krwi pępowinowej pod wpływem β -karotenu

A. Polus¹, J. Grzybowska¹, A. Balwierz¹, U. Rażny¹, Ł. Wątor¹, G. Schmitz², J. Keijer², J. Stachura³, A. Dembińska-Kieć¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Dept. Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, University Hospital, Regensburg, Germany

³ Food Bioactives Group, RIKILT -Institute of Food Safety, Wageningen, Netherlands

⁴ Katedra Patomorfologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Komórki progenitorowe mogą różnicować się w specyficznych warunkach w komórki różnych tkanek, np. w komórki śródbłonna naczyń, co obserwowane jest w procesie angiogenezy. Składniki pokarmowe dostarczane organizmowi z codzienną dietą, w tym β -karoten, jego pochodne i kwas retinowy w kooperacji z kwasami tłuszczowymi i ich metabolitami stanowią naturalne źródło substancji wpływających na różnicowanie się tkanek organizmu. Celem pracy było wykazanie wpływu β -karotenu na angiogenezę w modelach *in vitro* i *in vivo*.

Metody: Do badań zostały użyte ludzkie komórki progenitorowe AC133⁺ izolowane z mononuklearnej frakcji komórek z krwi pępowinowej przy użyciu MACS Kit i inkubowane z VEGF (50ng/ml) i SCF (100ng/ml) w celu otrzymania wczesnych progenitorowych komórek śródbłonna (EPC). Wychwyty β -karotenu był badany metodą HPLC. Apoptozę oceniano przez pomiar aktywności kaspazy przy użyciu testu Apo Fluor TM Green Kit. Do badania proliferacji zastosowano test Elisa BrdU. Ekspresję genów analizowano metodą oligonukleotydomikromacierzy i potwierdzana przy użyciu metody Real-Time PCR. Chemotaksję mierzono przy użyciu komory Boyde-

na. Wpływ czynników na różnicowanie się komórek obserwowano w modelu tubulogenezy *in vitro*. Angiogeneza w *in vivo* była badana w podskórnie wstrzykniętym matrygelu myszom skarmianym paszą z dodatkiem lub bez dodatku β -karotenu. Wycięte z matrygelu skrawki były wybarwiane hematoksyliną i eozyną oraz immunohistochemicznie z użyciem przeciwciała przeciwko antygenowi komórek endotelialnych CD31 (PECAM). Analizowano ilościowo zarówno ilość wrosniętych naczyń, jak i pojedynczych komórek śródbłonna.

Wyniki: Nie wykazano istotnego wpływu β -karotenu na procesy proliferacji, apoptozy i różnicowania się komórek EPC w badaniach *in vitro*. Istotnym wydaje się fakt, że badane substancje silnie aktywują proces migracji zarówno w modelu angiogenezy *in vitro*, jak i *in vivo*. Analiza wyników microarray wykazała, że β -karoten reguluje geny związane z regulacją cyklu komórkowego i aktywacją szlaków wewnątrzkomórkowego przekazu sygnału regulowanych przez małe białka G oraz szlaki Ras/Rho/Rac. Prezentowane dane wykazujące promigracyjne działanie β -karotenu mogą sugerować rolę tego czynnika w angiogenezie.

Projekt sponsorowany przez EU F5 DLARFID
QLTR-2001-00183 i STEC QLK3-CT-2002-30307,
PBZ-MIN-005/P04/2002/5, 501/KL/438/L, WŁ/194/P/L

57

Wpływ kwasów tłuszczowych na różnicowanie komórek progenitorowych ludzkiej tkanki tłuszczowej

U. Czech¹, A. Balwierz¹, J. Grzybowska-Gąsuszka¹, A. Polus¹, J. Skrzeczyńska², P. Kołodziejczyk³, A. Dembińska-Kieć¹, J. Pryjma², J. Kulig³

¹ Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Zakład Immunologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

³ I Katedra Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wprowadzenie: Tkanka tłuszczowa jest źródłem subpopulacji komórek zwanej SVF (*stromal vascular fraction*). Celem badań jest sprawdzenie wpływu aktywatorów PPAR γ (wolnych kwasów tłuszczowych) na różnicowanie komórek SVF w kierunku adipocytów, jak i komórek śródbłonna.

Metody: Markery błony komórkowej progenitorów tkanki tłuszczowej zostały scharakteryzowane przy użyciu cytometrii przepływowej oraz RT-PCR. Różnicowanie komórek w kierunku śródbłonna badane było analizą tworzenia tubul (metoda Methocult). Do zidentyfikowania akumulacji lipidów w dojrziałych adipocytach stosowano barwienie czerwieńią olejo-

wą. Komórki SVF traktowane były kwasem arachidonowym (AA), palmitynowym (PA), eikozapentaenowym (EPA) oraz tetradecyltioacetowym (TTA) w stężeniach 1-100µM. Cytotoksyczność kwasów tłuszczowych mierzona była przez wydzielanie LDH do medium. W celu zbadania wpływu FFA na proliferację komórek progenitorowych zmierzono poziom syntezy DNA przez wbudowanie BrdU. Zbadano również wpływ kwasów tłuszczowych na ekspresję genów.

Wyniki: Scharakteryzowanie komórek SVF uwidoczniło heterogenność tej subpopulacji (komórki CD34, CD45, CD14, CD31-pozytywne). Podobne wyniki uzyskano, badając ekspresję genów charakterystycznych dla adipocytów: PPARγ, C/EBPα, LPL, ap2, jak również dla śródbłonna: eNOS, vWF, CD31, CD34. Zaobserwowano również tendencję tych komórek do różnicowania zarówno w kierunku adipocytów, jak i komórek śródbłonna. W stężeniach nietoksycznych dla komórek wolne kwasy tłuszczowe nie miały wpływu na proliferację progenitorów tkanki tłuszczowej. 24-godzinna inkubacja komórek SVF z wybranymi kwasami tłuszczowymi nie spowodowała znaczącej różnicy w ekspresji genów.

Wnioski i plany na przyszłość: Nasze wyniki wykazują, że populacja komórek progenitorowych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej nie jest jednorodna. Ta populacja (w odpowiednich warunkach) może różnicować się zarówno do adipocytów, jak i komórek śródbłonna. Wolne kwasy tłuszczowe nie wpływały na proliferację komórek SVF, a 24-godzinna inkubacja z nimi nie spowodowała zmiany ekspresji genów. Planujemy przedłużyć inkubację (48, 72 godz.) z FFA, jak również sprawdzić ich wpływ na różnicowanie. Zbadanie wpływu wolnych kwasów tłuszczowych na różnicowanie progenitorów tkanki tłuszczowej może w przyszłości pozwolić na użycie tych komórek w terapii naprawczej tkanek.

Cel badań: Zdefiniowanie powiązania między wybranymi biochemicznymi parametrami zespołu metabolicznego i angiogenezą.

Metody: Do badań zostały użyte modele mysie prezentujące różne cechy zespołu metabolicznego: myszy z wyłączonym genem RXRα w hepatocytach (dyslipidemia, hiperleptynemia), myszy NZO (otyłość, insulinooporność, hiperinsulinemia) oraz kontrolne szczepy SJL, Balb/c i C57/B1/6. Myszy były skarmiane standardową i wysokotłuszczową paszą przez siedem tygodni. Podczas skarmiania zwierzęta były ważone oraz miary mierzone parametry biochemiczne w surowicy (glukoza, triglicerydy i cholesterol). W 6. tygodniu skarmiania zwierzętom został podskórnie wstrzyknięty matrigel (kontrolny i zawierający bFGF lub VEGF). Po sześciu dniach poduszki matrigelowe zostały wycięte i wybarwione immunohistochemicznie (CD31+). Wyniki immunohistochemii zostały przedstawione jako liczba naczyń z i bez światła oraz liczba komórek śródbłonna penetrujących matrigel.

Wyniki: Immunohistochemiczne analizy wybarwionych skrawków matrigelu pokazały wpływ bFGF na tworzenie naczyń i chemotaksję komórek śródbłonna do matrigelu. VEGF nie stymulował angiogenezy *in vivo*. Myszy Balb/c wykazały wyższą odpowiedź angiogenną na bFGF niż myszy z objawami zespołu metabolicznego X. Wysokotłuszczowa pasza wydatniała różnice pomiędzy zwierzętami z zespołem metabolicznym a kontrolnymi. Pasza nie wywarła istotnego wpływu na poziom odpowiedzi angiogennej w badanych modelach zwierzęcych.

Projekt finansowany przez Komitet Badań Naukowych, grant Nr: PBZ-MIN-005/P04/2002/5

58

Mechanizmy patologicznej angiogenezy w zespole metabolicznym x na modelu transgenicznym myszy

Ł. Wątor¹, U. Rażny¹, A. Polus¹, J. Grzybowska-Gałaszka¹, Ł. Partyka¹, G. Dyduch², J. Stachura², A. Dembińska-Kieć¹

¹Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Zakład Patomorfologii Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Metaboliczny zespół X charakteryzowany przez: insulinooporność (hiperinsulinemia, hiperglikemia, dyslipidemia), otyłość (wzrost poziomu triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych) oraz podwyższony poziom cytokin (leptyna, adiponektyna, TNFα) prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyń, której konsekwencją jest patologiczna angiogeneza.

59

Odpowiedź naczynia na uszkodzenie mechaniczne podczas zabiegu angioplastyki. Model zwierzęcy stenozy w naczyniu tętniczym zdrowym oraz naczyniu tętniczym zwierzęcia z wywołaną cukrzycą

Joanna Łoś^{2,3}, Mirosław Tyrpień³, Ewa Jędrzejczyk³, Katarzyna Zapołka-Zielińska³, Natalia Jamróz³, Adam Sokal^{1,3}

¹ Katedra i Kliniczny Oddział Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

² Katedra i Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

³ Pracownia Kardiologii Doświadczalnej, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

Angioplastyka wieńcowa (PTCA) jest zabiegiem polegającym na mechanicznym poszerzeniu lub udrażnianiu zwężonej lub zamkniętej tętnicy wieńcowej. Pomimo zastosowania

stentów uwalniających leki, zwężenie naczynia w miejscu poszerzania określane mianem restenozy stanowi nadal czynnik istotnie ograniczający długotrwałą skuteczność angioplastyki wieńcowej.

Restenoza jest złożonym procesem patologicznym, w wyniku którego dochodzi do zmniejszenia światła tętnicy poprzez przerost śródbłonka oraz warstwy mięśniowej. Przerost ten jest spowodowany przez rozrost komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) w warstwie mięśniowej, jak również ich migrację do śródbłonka naczyń w miejscu interwencji. Jednocześnie dochodzi do zwiększenia zawartości macierzy międzykomórkowej w obu warstwach.

Cukrzyca jest poważnym czynnikiem ryzyka dla wszystkich chorych, którzy przebyli zabieg PTCA. Jak wykazano w wielu doniesieniach, częstość wystąpienia restenozy u tych chorych kształtuje się na poziomie od 49% do 71%.

Celem pracy jest ocena zmian w ścianie tętnicy szyjnej wspólnej na modelu zwierzęcym poprzez określenie odpowiedzi naczyń na uszkodzenie. Oceniony został stopień zniszczenia śródbłonka, pogrubienie błony wewnętrznej naczynia, tzw. neointymy, zmiana średnicy naczynia, typ i nasilenie nacieku zapalnego oraz stopień endotelializacji w miejscu interwencji.

Badanie przeprowadzono na modelu zwierzęcym z wykorzystaniem zdrowych szczurów rasy Wistar oraz szczurów z wywołaną cukrzycą (przy zastosowaniu streptozotocyny), u których tętnica szyjna wspólna poddana została zabiegowi standardowego rozprężania balonu

do angioplastyki. Badane zwierzęta podzielono na trzy grupy w zależności od okresu obserwacji – 7, 14 lub 28 dni.

Oceny stopnia zwężenia naczynia w różnych punktach czasowych dokonywano za pomocą programu IAMETER (stworzonego na potrzeby badania). Stopień proliferacji określano poprzez znakowanie komórek bromohexurydyną (BrdU) na 24 godz. przed pobraniem tętnicy. Oznaczano indeks proliferacji w celu określenia częstości replikacji oraz czasowej i przestrzennej migracji komórek ściany naczynia w miejscu uszkodzenia.

Dokonano oceny histopatologicznej tętnicy w 7., 14. i 28. dobie po zabiegu. Oceniano stopień uszkodzenia śródbłonka, nacieki zapalne, stopień endotelializacji w miejscu uszkodzenia, nasilenie stenozy w miejscu uszkodzenia. Określano stopień proliferacji komórek.

Działanie mechaniczne jest silnym czynnikiem uszkadzającym naczynie i wywołującym proces naprawczy, prowadzący do zwężenia światła w miejscu przeprowadzenia zabiegu angioplastyki.