

**Rola melatoniny w patogenezie miażdżycy-  
- wpływ na śródbłonek, remodeling naczyniowy i lokalną odpowiedź  
immunologiczną**

Dr n. med. Roksana DORANTOWICZ

Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej  
Kierownik: prof. nadzw. dr hab. n. med. Marlena Broncel

Rozprawa doktorska – streszczenie

Promotor - prof. nadzw. dr hab. n. med. Marlena Broncel  
Recenzenci - prof. dr hab. Dariusz Moczulski, dr hab. Krzysztof Łabuzek

Publiczna obrona – 16 grudnia 2014 r.  
Zatwierdzona decyzją Rady Wydziału Wojskowo – Lekarskiego 7 stycznia 2015 r.

**Założenia teoretyczne:**

Melatonina (MEL) jest neurohormonem syntetyzowanym przez szyszynkę o działaniu chronobiotycznym. Poza najlepiej poznanymi efektami w regulacji rytmu okołodobowego, MEL odgrywa istotną rolę w wielu fizjologicznych i patologicznych procesach. Liczne badania eksperymentalne wykazały jej onkostatyczne, immunomodulacyjne, antyproliferacyjne, antyoksydacyjne i przeciwzapalne działanie. MEL może również odgrywać istotną rolę w angiogenezie.

7-ketocholesterol (7K) to jeden z głównych produktów oksydacji sterolu znajdujący w blaszce miażdżycowej. 7K charakteryzuje się dużą cytotoksycznością, powoduje apoptozę zarówno komórek śródbłonna, jak i mięśni gładkich, upośledza barierowość warstwy śródbłonna, działa prozapalnie.

Można przypuszczać, że MEL poprzez swoje przeciwzapalne i antyoksydacyjne właściwości może przeciwdziałać toksycznym efektom 7K wywieranym na komórki śródbłonna i mięśni gładkich aorty.

**Cel pracy:**

Zbadanie wpływu MEL, 7K, jak również modulacyjnego działania MEL na zmiany indukowane 7K w pierwotnych ludzkich aortalnych komórkach śródbłonna (HAEC) i ludzkich pierwotnych komórkach mięśni gładkich aorty (HuAoSMC) poprzez ocenę impedancji komórkowej, żywotności i procesów śmierci, powierzchniowej ekspresji molekuł adhezyjnych oraz ekspresji mRNA cytokin i chemokin związanych z procesem miażdżycowym.

**Material i metodologia:**

Praca oparta była o hodowle komórkowe HAEC i HuAoSMC. Komórki stymulowano MEL (10nM, 100µM), 7K (40µg/ml) oraz jednocześnie 7K (40µg/ml) z MEL (10nM,100 nM,100 µM). Impedancja komórkowa HAEC i HuAoSMC była mierzona w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem innowacyjnego systemu xCELLigence. Procesy śmierci komórek oceniano poprzez immunofluorescencyjne barwienia aneksyną V i jodkiem propidyny w cytometrii przepływowej. Powierzchniowa ekspresja PECAM-1 (CD31) i ICAM-1 (CD54) na HAEC została zmierzona z

wykorzystaniem ludzkich przeciwciał FITC-anty-CD31 i PE-anty-CD54 w cytometrze przepływowym. Śródbłonkowe zmiany ekspresji mRNA cytokin (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10) i chemokin (MCP-1, RANTES, fraktalkina, SDF-1  $\alpha$ ) oceniano w real time PCR.

#### **Wyniki:**

7K zmniejszał impedancję komórkową, żywotność oraz zwiększał ilość apoptotycznych/nekrotycznych HAEC i HuAoSMC. 7K zwiększał ilość żywych HAEC z powierzchniową ekspresją ICAM-1, ale nie miał wpływu ani na ekspresję PECAM-1 ani na zmiany ekspresji mRNA badanych cytokin i chemokin. MEL zmniejszała impedancję HAEC i HuAoSMC. MEL nie wpływała na procesy apoptozy/ nekrozy, nie modyfikowała ekspresji molekuł adhezyjnych ani nie miała wpływu na zmiany ekspresji mRNA badanych cytokin i chemokin. MEL nie chroniła przed spadkiem impedancji HAEC i HuAoSMC indukowanym 7K, ale w stężeniu 10nM przeciwdziałała procesowi apoptozy wywołanemu 7K. MEL również zmniejszała ilość HAEC z powierzchniową ekspresją ICAM-1 po stymulacji 7K i zwiększała ekspresję mRNA IL-10 w HAEC poddanych działaniu 7K. MEL nie miała wpływu na procesy apoptozy/nekrozy HuAoSMC indukowane 7K.

#### **Wnioski:**

7K jest substancją toksyczną dla HAEC i HuAoSMC, gdyż upośledza barierowość warstwy tworzonej przez te komórki, nasila procesy apoptozy i nekrozy, zwiększa śródbłonkową powierzchniową ekspresję ICAM-1. W środowisku czynnika proaterogennego MEL działa ochronnie na śródbłonek- zmniejsza nasilenie procesów apoptozy i nekrozy, zapobiega zwiększeniu ilości komórek śródbłonka z powierzchniową ekspresją ICAM-1, działa przeciwzapalnie poprzez zwiększenie ekspresji IL-10. MEL nie wpływa na barierowość śródbłonka zmniejszoną działaniem 7K. MEL nie moduluje ekspresji chemokin remodelingowych w komórkach śródbłonka. MEL nie chroni HuAoSMC przed toksycznym działaniem 7K, nie wpływa na barierowość tych komórek ani nie zapobiega procesom apoptozy i nekrozy.

