

Rozprawa doktorska

Ocena funkcji immunologicznych i barierowych ludzkich komórek śródbłónka naczyniowego i mięśniówki gładkiej w patogenezie miażdżycy

Paulina Gorzelak-Pabiś

Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. n. med. Marleny Broncel

Streszczenie

U podstaw formowania zmian miażdżycowych leży przenikanie z krwi do ściany naczynia utlenionych form cholesterolu zawartego w lipoproteinach LDL oraz komórek generujących proces zapalny. Kumulacja przynajmniej częściowo zmodyfikowanych lipidów w warstwie podśródbłonnej poprzedza rekrutację limfocytów T i monocytów, które następnie inicjują proces zapalny. W procesie zapalnym toczącym się w miażdżycowo zmienionej ścianie naczynia dominuje odpowiedź zależna od limfocytów Th1 nad mechanizmami zależnymi od limfocytów Th2. Wydaje się jednak, że zaburzenie tej równowagi wynika z nieprawidłowego nadzoru przez komórki T regulacyjne (T regs). W badaniach nad przyczynami rozwoju miażdżycy coraz więcej uwagi poświęca się wzajemnym interakcjom komórek układu odpornościowego.

Celami prac doświadczalnych była ocena wpływu 7-ketocholesterolu, 25-hydroksycholesterolu, IL-33 i IL-4 na funkcje barierowe i immunomodulujące pierwotnych ludzkich komórek śródbłónka naczyniowego (HAEC, HUVEC), IL-4 na ekspresję receptorów FcεR dla IgE na komórkach śródbłónka naczyniowego oraz ocena wpływu IL-22, IL-35 na funkcje barierowe i immunomodulujące ludzkich pierwotnych komórek mięśniówki gładkiej aorty (HuAoSMC) w warunkach in vitro.

W badaniu klinicznym analizowano poziom IL-35 w surowicy pacjentów z chorobą niedokrwinną serca (ChNS) w porównaniu do grupy osób zdrowych. Zbadano również zależność pomiędzy poziomem IL-35 a poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i HDL oraz hsCRP.

Materiał i Metody:

Badania in vitro: ludzkie komórki śródbłonna naczyniowego (HAEC, HUVEC) stymulowano 7-ketocholesterolem, 25-hydroksycholesterolem, IL-33, IL-4, przeciwciałami anti-DNP-BSA IgE i DNP-BSA.

Ludzkie aortalne komórki mięśniówki gładkiej stymulowano IL-35 oraz IL-22.

Funkcje barierowe oceniano w systemie Real-time Cell Electric Impedance Sensing system (RTCA-DP). Żywotność, apoptozę, ekspresję powierzchniową cząstki adhezyjnej ICAM-1 oceniano metodą cytometrii przepływowej. Ekspresję mRNA dla IL-33, podjednostek IL-35: p35 i EBI3, okludyny i VE-kadheryny, receptorów FcεRI, FcεRII, oceniano metodą real-time pcr (RT-PCR).

Badanie kliniczne: poziom IL-35 w surowicy pacjentów z ChNS (n=31) oraz w grupie kontrolnej (n=30) badano metodą immunoenzymatyczną ELISA, lipidogram metodą enzymatyczną, do oceny hsCRP użyciu metody immunoturbometrycznej.

Wyniki:

Badania in vitro: 7-ketocholesterol (10ug/ml) i 25-hydroksycholesterol (10ug/ml) obniża integralność(nCl) EC odpowiednio o 80% i 20 %. 7-ketocholesterol w przeciwieństwie do 25-hydroksycholesterolu zwiększa apoptozę EC.

IL-33 (50ng/ml), jak i IL-4 (10ng/ml, 50ng/ml), obniżają nCl EC. IL-33 w przeciwieństwie do IL-4 nie zwiększa istotnie apoptozy EC, IL-33(50ng/ml) zmniejsza ekspresję mRNA okludyny o 40% i VE-kadheryny o 40% w porównaniu do niestymulowanej próby kontrolnej.

IL-4 (50ng/ml) zmniejsza 2-krotnie ekspresję mRNA okludyny, IL-4 (10 i 50ng/ml) zmniejsza ekspresję mRNA VE-kadheryny odpowiednio o 50 i 75% w porównaniu do niestymulowanej próby kontrolnej. IL-33 (10 i 50ng/ml) 3-krotnie zwiększa ekspresję ICAM-1 na EC w przeciwieństwie do IL-4.

Komórki HAEC wykazują ekspresję mRNA receptorów FcεRI, FcεRII dla IgE, IL-4 (1ng/ml i 10ng/ml) 2-krotnie zwiększa ekspresję mRNA dla FcεRI i 3-krotnie dla FcεRII w porównaniu do niestymulowanej próby kontrolnej, prestymulacja EC IL-4 zwiększa nCl o 20%.

IL-35(10ng/ml) obniża istotnie nCl AoSMC, zwiększa ekspresję ICAM-1 o 13%, nie wpływa na apoptozę oraz żywotność komórek mięśniówki gładkiej.

IL-22(1ng/ml) zwiększa odpowiednio 2 i 3-krotnie ekspresji mRNA EBI-3 i p35 podjednostek IL-35, obniża ekspresję mRNA IL-33 o 40%. IL-22 zmniejsza ekspresję ICAM-1 o 30% nie wpływając na żywotność i apoptozę AoSMC.

Badanie kliniczne:

Pacjenci z ChNS wykazują wyższe stężenie IL-35 w surowicy w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, dodatkowo wykazano ujemną korelację poziomu IL-35 z poziomem cholesterolu LDL oraz dodatnią korelację poziomu IL-35 z poziomem cholesterolu HDL.

Wnioski:

1. 7-ketocholesterol, 25-hydroksycholesterol, IL-33, IL-4 wpływają na komórki śródbłónka naczyniowego poprzez obniżenie jego integralności (nCl).
2. IL-35 obniża integralność (nCl) mięśniówki gładkiej oraz wpływa na jej funkcje immunomodulujące.
3. IL-22 zmniejsza ekspresję ICAM-1 i IL-33, nasila produkcję IL-35 przez komórki mięśni gładkich, nie wpływając na ich apoptozę i żywotność, co sugeruje jej wpływ na homeostazę ścian naczyń krwionośnych.
4. Wykazano zwiększone stężenie IL-35 w grupie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej.
5. Komórki śródbłónka naczyniowego wykazują ekspresję receptorów dla IgE, co sugeruje ich bezpośrednią zdolność odpowiedzi na antygen drogą IgE zależną. Ekspresja receptorów FcεR zwiększa się pod wpływem stymulacji IL-4.

Paulina Gorzelak-Pabis
lekarz medycyny
2614898

dr hab. n. med. Marlena Broniec
specjalista chorób wewnętrznych i farmakologii klinicznej
5767432