

Zawartość cholesterolu we fragmentach tętnic – studium 34 przypadków

The content of cholesterol in arterial fragments
– study of 34 cases

Aleksandra Kuzan^{1,2}, Agnieszka Chwiłkowska², Magdalena Kobielarz^{1,3}

STRESZCZENIE

WSTĘP

Miażdżycy jest chorobą wieloczynnikową. Powszechnie uważa się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie blaszek miażdżycowych w tętnicach jest wysoki poziom cholesterolu w osoczu krwi. Cząsteczki tego lipidu wchodzi w skład nie tylko tętnic objętych patologicznym stłuszczeniem, ale też każdego naczynia krwionośnego jako element budulcowy błon komórkowych. Celem pracy jest odpowiedź na pytanie, czy ilość cholesterolu całkowitego w tętnicach jest skorelowana z poziomem zaawansowania miażdżycy.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były 34 wycinki tętnic pochodzące ze zwłok ludzi zmarłych śmiercią nagłą. Próbki były podzielone na 4 grupy ze względu na stopień zaawansowania miażdżycy. Cholesterol oznaczano kolorymetryczną metodą z użyciem chlorku żelaza w stężonym kwasie siarkowym i fosforowym.

WYNIKI

Zaobserwowano, że średnia zawartość cholesterolu w próbkach tętnic wzrastała wraz ze stopniem zaawansowania miażdżycy. Tętnice pochodzące od osób ze znacznym i bardzo dużym nasileniem choroby charakteryzują się wysokim poziomem cholesterolu.

WNIOSKI

1. Istnieje związek między zawartością cholesterolu w ścianie naczynia krwionośnego a zaawansowaniem miażdżycy; nie jest to jednak zależność wprost proporcjonalna, gdyż blaszki miażdżycowe wraz z postępem choroby wzbogacane są nie tylko w lipidy, ale także w komórkowe i białkowe składniki, takie jak monocyty, makrofagi, trombocyty, komórki nekrotyczne, białka macierzy zewnątrzkomórkowej i inne.
2. Konieczne są dalsze badania w celu pogłębienia wiedzy na temat patomechanizmu miażdżycy i weryfikacji tezy o nadrzędnej roli cholesterolu w powstawaniu zmian miażdżycowych.

¹Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
²Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
³Politechnika Wrocławska, Zakład Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Mgr Aleksandra Kuzan
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Chalubińskiego 10
50-368 Wrocław
tel. +71 784 13 75
e-mail: aleksandra.kuzan@gmail.com

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 1, 23–27
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
eISSN 1734-025X
www.annales.sum.edu.pl

SŁOWA KLUCZOWE

cholesterol, tętnice, miażdżyca

ABSTRACT

BACKGROUND

Atherosclerosis is a multifactor disease. It is commonly believed that a high cholesterol level in blood plasma is the main factor which is responsible for the formation of atherosclerotic plaques in arteries. Lipid molecules form not only pathological arteries, but are also part of each blood vessel as an important element of cell membranes. The aim of this study is to investigate whether the amount of cholesterol in the arteries is correlated with the degree of atherosclerosis.

MATERIAL AND METHODS

The research material consists of 34 fragments of arteries originated from the bodies of people who died a sudden death. The samples were divided into four groups according to the severity of atherosclerosis. Cholesterol was determined using a colorimetric method with ferric chloride in concentrated phosphoric and sulfuric acid.

RESULTS

It was observed that the content of arterial cholesterol in the samples increased with the severity of atherosclerosis. The arteries from persons with severe and very high intensification of the disease were characterized by high levels of cholesterol.

CONCLUSIONS

There is a relationship between the content of cholesterol in the blood vessel wall and the severity of atherosclerosis, but it is not a directly proportional rectilinear relationship due to the fact that plaques with the progression of the disease are not only enriched in lipids but also in cellular and protein components, such as monocytes, macrophages, thrombocytes, necrotic cells, extracellular matrix proteins and others. Further studies are needed to better understand the pathogenesis of atherosclerosis and verify the thesis of the key role of cholesterol in the formation of atherosclerotic lesions.

KEY WORDS

cholesterol, arteries, arteriosclerosis

WSTĘP

W krajach wysokorozwiniętych choroby sercowo-naczyniowe są jedną z głównych przyczyn zgonów – w Stanach Zjednoczonych co trzeci człowiek umiera na zawał, udar, z powodu pękniętego tętniaka lub innych przyczyn związanych z układem krwionośnym [1]. W Polsce umieralność wskutek chorób sercowo-naczyniowych wynosi 48% [2].

Główną przyczyną tych chorób jest przewlekły proces, zwany miażdżycą, podczas którego w tętnicach – na skutek procesów biomechanicznych i biochemicznych – powstają tzw. blaszki miażdżycowe, mogące po pewnym czasie pękać lub tworzyć blokadę dla swobodnego przepływu krwi (stenozę). Powszechnie za rozwój choroby obwinia się cholesterol. Rzeczywiście, stwierdzono korelację między zawartością tego

lipidu we krwi a stopniem zaawansowania choroby, ryzykiem wystąpienia zawału serca czy ryzykiem zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych [3]. Na tej podstawie stworzono złoty standard diagnostyki miażdżycy, polegający na oznaczaniu cholesterolu we krwi (cholesterol całkowity, LDL, HDL). Opracowano także strategie terapeutyczne – podawanie leków mających obniżyć poziom cholesterolu we krwi (głównie statyn, takich jak: prawastatyna, lowastatyna, fluwastatyna, simwastatyna, atorwastatyna, rosuwastatyna, pitawastatyna, ceriwastatyna) [4]. Według badań epidemiologicznych przeprowadzonych z udziałem dużej części populacji (NATPOL, WOBASZ), u co najmniej połowy Polaków należy rozważyć interwencje mające na celu obniżenie stężenia LDL [4].

Mimo uwrażliwiania pacjentów na szkodliwość cholesterolu, warto zauważyć, że cząsteczka ta spełnia wiele istotnych funkcji w organizmie. Jest ona m.in.

prekursorem wielu hormonów (testosteronu, estrogenów, aldosteronu, kortykosteronu, kortyzolu) oraz witaminy D, a więc ma duże znaczenie w gospodarce wapniowo-fosforanowej, przez co odpowiada za prawidłową budowę kośćca. Z lipidu tego tworzone są ponadto kwasy żółciowe niezbędne do trawienia. Cholesterol jest też składnikiem błon komórkowych regulującym ich płynność [5].

Warto pamiętać, że poziom cholesterolu jest związany z występowaniem miażdżycy, nie jest jednak czynnikiem decydującym o jej przebiegu, gdyż ma ona charakter wyjątkowo złożony. Za przyczynę powstawania blaszek miażdżycowych uważa się również: uwarunkowania genetyczne [6], nadciśnienie [7], czynniki infekcyjne (głównie *Chlamydia pneumoniae* i *Helicobacter pylori* oraz cytomegalowirus i wirusy *Herpes*) [8,9], nadekspresję białek stanu zapalnego [10], nadekspresję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP – *matrix metalloproteinases*) [11], intensywną glikację białek związaną z cukrzycą, prowadzącą do powstawania zbyt dużej ilości produktów AGE (*advanced glycation end-products* – końcowe produkty zaawansowanej glikacji) [12,13] czy w końcu stres oksydacyjny, wywoływany głównie przez reaktywne formy tlenu, który może odpowiadać za uszkodzenia komórek śródbłonna i zapoczątkowywanie powstawania blaszki miażdżycowej [14].

Celem pracy było określenie związku między ilością cholesterolu w tętnicach a stopniem zaawansowania miażdżycy. Zaznacza się, że jest to badanie wstępne, które zamierza się rozszerzyć w celu pogłębienia wiedzy na temat patomechanizmu miażdżycy.

30 µl wody i 300 µl mieszaniny metanol–chloroform (2 : 1 v/v), homogenizowano w homogenizatorze FastPrep – 24® (MP Biomedicals) 1 min w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzono wirowanie 15 min przy 14 000 x g, po czym zdekantowano supernatant, a do pozostałości tkanki dodano 380 µl mieszaniny metanol–chloroform – 0,2 N HCl (2 : 1 : 0,8, v/v), homogenizowano i wirowano jak wyżej.

Do złączonych supernatantów dodano po 200 µl chloroformu i wody, przeprowadzono kolejne wirowanie, po czym dolną chloroformową fazę zbierano, neutralizowano dodając kroplę 0,2 N metanolowego NH₄OH i przeprowadzono ewaporację nad strumieniem azotu. Do otrzymanego osadu dodano 60 µl lodowego kwasu octowego i 40 µl barwnego reagentu (0,2% FeCl₃·6H₂O w 85% kwasie ortofosforowym i 96% kwasie siarkowym), wymieszano, inkubowano 10 min i mierzono absorbancję przy 550 nm względem próby ślepej z odczynnikami. Analogiczne postępowanie przeprowadzono ze standardowym roztworem cholesterolu. Zawartość cholesterolu całkowitego [mg] obliczano według wzoru:

$$\frac{Ab_{\text{próbki}}}{Ab_{\text{standardu}}} \times \text{zawartość cholesterolu w roztworze standardowym [mg]}$$

Wykonano statystyczną analizę testem ANOVA rang Kruskala-Wallisa, według której różnica poziomu cholesterolu w poszczególnych fazach miażdżycy jest istotna statystycznie dla p = 0,05.

Obliczono również współczynnik korelacji Spearmana (p = 0,0005), a także przeprowadzono test Manna-Whitneya z poprawką Holma.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem badawczym były 34 wycinki tętnic pochodzące ze zwłok ludzi zmarłych śmiercią nagłą. Próbkę, zgodnie z makroskopową obserwacją, były podzielone na 4 grupy ze względu na stopień zidentyfikowanych zmian miażdżycowych:

- grupa 0 – 12 próbek niezmiennych patologicznie,
- grupa 1 – 9 próbek z nieznacznymi nacieczeniami tłuszczowymi,
- grupa 2 – 5 próbek z blaszkami miażdżycowymi typu *preatheroma* lub *atheroma*,
- grupa 3 – 8 próbek wykazujących cechy zaawansowanej miażdżycy (duże tłuszczowe rdzenie, depozyty wapnia, ogniska martwicy, itp.).

Procedurę oznaczania zawartości cholesterolu w tkance przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu Kates [15]. Do 60 mg świeżej tkanki dodano

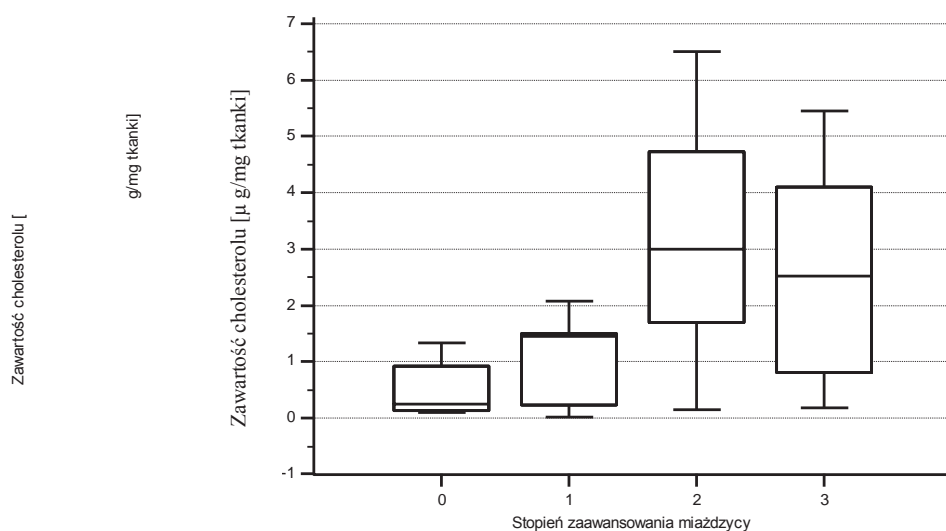
WYNIKI

Średnie zawartości cholesterolu w ścianach tętnic były następujące: w grupie 0 – 0,51 µg/mg tkanki, w grupie 1 – 1,04 µg/mg tkanki; w grupie 2 – 3,20 µg/mg tkanki; w grupie 3 – 2,55 µg/mg tkanki (tab. I, ryc. 1). Na podstawie analizy statystycznej można stwierdzić, że zawartość cholesterolu w próbkach tętnic wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania miażdżycy (współczynnik korelacji Spearmana 0,563 przy p = 0,005, gdzie przedział ufności zawierał się między 0,278 a 0,757). W ostatniej grupie zaobserwowano nieznaczny spadek średniej zawartości cholesterolu w stosunku do grupy 3. Analiza *post hoc* wykonana metodą wielokrotnych powtórzeń testem Manna-Whitneya wykazała, że wyłącznie różnica w zawartości cholesterolu dla tętnic w 0 i 3 fazie zaawansowania miażdżycy jest istotna statystycznie.

Tabela I. Zawartość cholesterolu w badanych tętnicach
Table I. Content of cholesterol in examined arteries

Stopień miażdżycy	n	Mediana 25–75%	Poziom cholesterolu
0	12	0,250	0,130–0,925
1	9	1,450	0,233–1,505
2	5	3,000	1,695–4,725
3	8	2,525	0,815–4,095

n – wielkość próby (sample size)



Ryc. 1. Wykres zależności między zawartością cholesterolu w wycinkach tętnic a stopniem zaawansowania miażdżycy w poszczególnych grupach: 0 – bez widocznych zmian miażdżycowych (12 próbek), 1 – niewielkie blaszki z nacieczeniami tłuszczowymi (9 próbek), 2 – większe, złożone blaszki miażdżycowe (5 próbek), 3 – blaszki miażdżycowe z ogniskami nekrozy, dużym tłuszczowym rdzeniem i/lub depozytami wapnia. Zaznaczono wartości mediany i minimalne–maksymalne.

Fig. 1. Dependency graph of cholesterol content in arterial specimens on severity of atherosclerosis. Numbers in individual groups: 0 – no visible atherosclerosis (12 samples), 1 – small plates with fatty infiltration (9 samples), 2 – larger, complex atherosclerotic plaques (5 samples), 3 – plaques with necrotic core, fatty core and/or calcium deposits (8 samples). Median and minimum–maximum are marked.

DYSKUSJA

Zaprezentowane wyniki wykazały związek między stopniem zaawansowania miażdżycy a zawartością cholesterolu w próbkach tętnic. Im więcej było go w tkance, tym stopień zaawansowania zmian chorobowych był wyższy. Analogicznie jest w przypadku zawartości cholesterolu we krwi [3]. Można postawić hipotezę, że im jest ona większa, w tym większym stopniu jest on pochłaniany przez komórki mięśni gładkich i makrofagi w tętnicach. Warto jednak zauważyć, że aż 50–70% cholesterolu ma pochodzenie endogenne, czyli jest wytwarzane przez ustrój, głównie przez wątrobę, jelita i skórę [16], ale też przez inne komórki, w tym mięśnie gładkie tętnic, szczególnie w miejscach, gdzie tworzą się ogniska zapalne [17].

Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowano, że na niskim i średnim poziomie zaawansowania miażdżycy zawartość cholesterolu w ścianach tętnic rośnie w miarę rozwoju choroby, tylko w ostatniej

grupie zaobserwowano nieznaczny spadek średniej zawartości cholesterolu w stosunku do grupy 2. Może to wskazywać, iż poziom tego lipidu w tętnicy wzrasta tylko do pewnego stopnia, a dalszy rozwój patologii prowadzi do zmian zawartości innych związków budujących ścianę naczynia krwionośnego, tj. białek tkanki łącznej macierzy zewnątrzkomórkowej, związków nieorganicznych (np. hydroksyapatytu, tlenku wapnia) i innych. Okazuje się, że najbardziej złożone blaszki miażdżycowe składają się w dużym stopniu również z innych składników komórkowych i różnorodnych związków organicznych – trombocytów, makrofagów, innych komórek układu odpornościowego, resztek nekrotycznych komórek, a w końcu z białek macierzy zewnątrzkomórkowych, głównie kolagenu [18].

Z badań innych autorów wynika, że wraz z rozwojem miażdżycy przybywa kolagenu [19,20]. Potwierdza to również obserwowane postępujące sztywnienie tętnic u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Mniejsza sprężystość ścian tętnic jest z pewnością związana z większą ilością kolagenu, który jako biał-

ko długie, włókienkowe, zbite w fibryle, nadaje tkance sztywność. Na jej wzrost ma więc wpływ przyrost ilości kolagenu w tętnicach – nadekspresja tego białka, a przynajmniej przewaga ekspresji kolagenu nad jego degradacją, za co odpowiadają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, a także zwiększenie usieciowania kolagenu przez tworzenie się zaawansowanych produktów glikacji AGE. Glikowany kolagen nie tylko jest bardziej sztywny, ale wpływa także na zwiększenie szybkości utleniania LDL, a tym samym stymuluje procesy miażdżycowe [21].

W literaturze przedmiotu funkcjonuje teoria wiążąca kolagen, cholesterol oraz miażdżycę. Rath i Pauling zaproponowali już w latach 90. ubiegłego wieku hipotezę, według której pierwotną przyczyną formowania blaszek miażdżycowych jest subkliniczny niedobór witaminy C, powodujący agregację lipoproteiny(a) i fibrynogenu/fibryny, zaś kolagen, do produkcji którego witamina C jest niezbędna, nie jest syntetyzowany lub jego synteza jest niewystarczająca, przez co miejscowo, zwłaszcza w regionach układu krwionośnego, gdzie ciśnienie krwi jest największe, dochodzi do zniszczenia wewnętrznej warstwy tętnicy i zapoczątkowania tworzenia blaszki [22,23,24]. Autorzy sugerują, że cholesterol nie jest przyczyną powstawania choroby (choć, oczywiście, odgrywa w niej dużą rolę), a więc metody prewencyjne i lecznicze dotyczące miażdżycy nie powinny koncentrować się na lekach obniżających jego poziom, ale na

substratach i kofaktorach potrzebnych do syntezy kolagenu (witamina C, prolina, lizyna) i przeciwutleniaczach [24].

Jak zaznaczano we wstępie, niniejsza praca jest badaniem wstępnym. Analiza wyników doprowadziła do wniosku, że należy je rozszerzyć o takie parametry, jak zawartość kolagenów różnych typów, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, innych białek macierzy (jak osteoprotegeryna, osteopontyna), zaawansowanych produktów glikacji, a także o badania strukturalne – immunohistochemiczne i inne. Dopiero wnikliwa analiza wszystkich uzyskanych danych pozwoli wysnuć wiarygodne wnioski i przybliżyć poznanie patomechanizmu miażdżycy.

Opisywane tu badania nie są rozstrzygające, ale wskazują na pewną problematykę dotyczącą prewencji i zabiegów terapeutycznych w miażdżycy ukierunkowanych na obniżenie poziomu cholesterolu we krwi. Analiza danych własnych i literaturowych pozwala wskazać potencjalne leki przynoszące zamierzony efekt, tj. związki przełamujące AGE [25] czy też substraty do syntezy kolagenu [24].

Publikacja jest częścią projektu „Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007–2013, realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. i wsp. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics–2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127: e6–e245.
2. Gersh B.J., Sliwa K., Mayosi B.M., Yusuf S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *Eur. Heart J.* 2010; 31: 642–648.
3. Elis A. Should HDL cholesterol levels be the primary target of cardiovascular disease risk assessment and therapy? *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2012; 10: 675–677.
4. Starzyk K., Wozakowska-Kaplon B. Statyny w terapii chorego z nadciśnieniem tętniczym. *Nadciśn. Tętn.* 2010; 14: 157–165.
5. Bańkowski E. *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych.* Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2009; str. 204–213, 421–428.
6. Pasierski T. Patogeneza miażdżycy i występowanie zdarzeń wieńcowych. *Post. Nauk. Med.* 2002; 1: 3–5.
7. Sznajderman M. Miażdżycza a nadciśnienie tętnicze – aktualne problemy. *Czyn. Ryz.* 2002; 28–33.
8. Banach M., Markuszewski L., Zaslónka J., Grzegorzczak J., Okoński P., Jegier B. The role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Prz. Epidemiol.* 2004; 58: 663–670.
9. Kośmicki M. Czynniki zakaźne w patogenezie choroby wieńcowej. *Przew. Lek.* 2004; 11: 35–43.
10. Chłopicki S. Zapalenie śródbłonna w atherothrombosis. *Kardiól. Dypł.* 2005; 4: 77–88.
11. Bäck M., Ketelhuth D.F., Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2010; 52: 410–428.
12. Kiuchi K., Nejima J., Takano T., Ohta M., Hashimoto H. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. *Heart* 2001; 85: 87–91.
13. Kuzan A., Chwiłkowska A., Kobielarz M., Pezowicz C., Gmian A. Glikacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej i jej znaczenie w miażdżycy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2012; 66: 804–809.
14. Fenyo I.M., Gafencu A.V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* 2013; 2013: 218:1376–1384.
15. Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Eds. R.H. Burdon & P.H. van Knippenberg. Elsevier, Amsterdam 1986, p. 100–112.
16. Russell D. W. Cholesterol Biosynthesis and Metabolism. *Cardiovasc. Drugs, Ther.* 1992; 6: 103–110.
17. Ruan X.Z., Moorhead J.F., Tao J.L., Ma K.L., Wheeler D.C., Powis S.H., Varghese Z. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1150–1155.
18. Kot M., Kobielarz M., Maksymowicz K. Assessment of mechanical properties of arterial calcium deposition. *Transactions of Farnham* 2011; 35: 49–56.
19. Lee H.Y., Oh B.H. Aging and arterial stiffness. *Circ. J.* 2010; 74: 2257–2262.
20. Adiguzel E., Ahmad P.J., Franco C., Bendeck M.P. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc. Med.* 2009; 14: 73–89.
21. Hicks M., Delbridge L., Yue D.K., Reeve T.S. Catalysis of lipid peroxidation by glucose and glycosylated collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 151: 649–655.
22. Rath M., Pauling L. Immunological evidence for the accumulation of lipoprotein(a) in the atherosclerotic lesion of the hypoascorbemic guinea pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 9388–9390.
23. Rath M., Pauling L. Hypothesis: lipoprotein(a) is a surrogate for ascorbate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 6204–6207. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11588.
24. Ivanov V., Roomi M.W., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 49: 140–145.
25. Bailey A.J., Paul R.G., Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing. Dev.* 1998; 106: 1–56.