

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY
LABORATORYJNEJ



**Mechanizm dysfunkcji śródbłonna w patogenezie
miażdżycy naczyń**

Anna Siekierzycka

Rozprawa doktorska

Promotor pracy
dr hab. Leszek Kalinowski, prof. nadzw.

Praca wykonana w
Zakładzie Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2018

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było poznanie molekularnego podłoża dysfunkcji śródbłonna w miażdżycy ludzkich naczyń tętniczych związanego z obniżeniem biodostępności tlenku azotu (NO).

Materiał do badań stanowiły fragmenty tętnicy szyjnej wspólnej (tętnica niezmiażdżycowana) oraz tętnicy szyjnej wewnętrznej (tętnica zmiażdżycowana), pozyskane od pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu transendarterektomii tętnicy szyjnej wewnętrznej (n=15 w każdej badanej grupie).

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano wzrost całkowitej ekspresji białka eNOS w tętnicy objętej procesem miażdżycowym w porównaniu do tętnicy niezmiażdżycowanej. Wyniki te były zgodne z ekspresją mRNA *NOS3*. Wykonano także analizy mające na celu określenie ekspresji formy monomerycznej i dimerycznej eNOS, w których zaobserwowano, że stosunek formy dimerycznej do całkowitej ekspresji eNOS był wyższy w tętnicy niezmiażdżycowanej. Natomiast stosunek formy monomerycznej uzyskanej w warunkach nieredukujących do formy dimerycznej eNOS był statystycznie znamienne wyższy w tętnicy zmiażdżycowanej w porównaniu do tętnicy niezmiażdżycowanej.

W pośrednich metodach oceniających aktywność eNOS (konwersja L-argininy do L-cytruliny) oraz ilość produkowanego NO (ocena stężenia azotanów i azotynów metodą Griessa) zaobserwowano wzrost aktywności enzymu oraz wzrost stężenia metabolitów NO w tętnicy zmiażdżycowanej w porównaniu do tętnicy niezmiażdżycowanej. Jednakże wykorzystując metodę pozwalającą na ilościowe oznaczenie wolnego biologicznie NO produkowanego przez eNOS wykazano spadek stężenia tlenku azotu w tętnicy zmiażdżycowanej w porównaniu z tętnicą nie wykazującą cech miażdżycy. Ponadto stężenie O_2^- oraz $ONOO^-$ wydzielanych przez eNOS było statystycznie znamienne wyższe w tętnicy objętej procesem miażdżycowym w porównaniu do tętnicy niezmiażdżycowanej. Zmierzono również ilość cynku pochodzącą z formy dimerycznej eNOS, która była większa w tętnicy niezmiażdżycowanej w porównaniu do tętnicy zmiażdżycowanej.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie z dużym prawdopodobieństwem, że wzrost ekspresji mRNA *NOS3*, całkowitej ekspresji białka eNOS oraz aktywności eNOS jest mechanizmem kompensującym obecne w tętnicy zmiażdżycowanej

rozprężenie eNOS, czego skutkiem jest wytwarzanie przez eNOS wzmożonej ilości O_2^- kosztem NO. Jednym z mechanizmów prowadzącym do rozprężenia enzymu jest rozerwanie klastra tiolowo-cynkowego, co w konsekwencji prowadzi do dysocjacji dimerów enzymu i obniżenia jego fizjologicznej aktywności - w znaczeniu wytwarzania NO przez eNOS w takich warunkach, które zapewniają plejotropowe cytoprotekcyjne i przeciwmiażdżycowe działanie NO.

Śródbłonek naczyniowy jest zatem nowym celem terapeutycznym w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych związanych z dysfunkcją śródbłonka. Jednakże przyszłe cele terapii kardioprotekcyjnej muszą opierać się na zrozumieniu, że równowaga pomiędzy ilością NO i O_2^- w komórkach śródbłonka którego źródłem jest eNOS *per se*, jest znacznie ważniejsza niż bezwzględny poziom samego NO.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the molecular basis of endothelial dysfunction in atherosclerotic plaque of human arterial vessels associated with a decrease of nitric oxide (NO) bioavailability.

The study material consisted of fragments of the common carotid artery (non-atherosclerotic artery), and internal carotid artery (atherosclerotic artery), obtained from patients qualified for transarterectomy of the internal carotid artery (n=15 in each group).

The experiments showed increased total eNOS protein expression in the atherosclerotic artery compared to the non-atherosclerotic artery. These results were consistent with the expression of *NOS3* mRNA. Determination of the monomeric and dimeric forms of eNOS revealed higher dimer-to-total eNOS expression ratio in non-atherosclerotic artery. However, monomer-to-dimer ratio was significantly elevated in atherosclerotic plaque in comparison to non-atherosclerotic artery.

Indirect evaluation of eNOS activity (assayed by conversion of L-arginine to L-citrulline) and the amount of NO production (measurements of nitrite and nitrite concentration by the Griess method) revealed increased enzyme activity and elevated NO metabolites concentrations in atherosclerotic plaque related to non-atherosclerotic artery. Nevertheless, the quantitative determination of biologically active NO generation by eNOS showed decreased concentration of NO in atherosclerotic artery in comparison to non-atherosclerotic artery. In addition, the concentration of O_2^- and $ONOO^-$ released by eNOS were statistically significantly higher in atherosclerotic plaque compared to non-atherosclerotic artery. The amount of zinc derived from the dimeric form of eNOS was also measured, which was higher in the atherosclerotic artery.

Obtained results determine with high probability that the increased of *NOS3* mRNA expression, total expression of eNOS protein and eNOS activity is a mechanism compensating the eNOS uncoupling. The consequence of this phenomenon is increased production O_2^- instead of NO by eNOS. The possible mechanism leading to the eNOS uncoupling is disruption of zinc-thiolate cluster. This eventually results in dissociation of enzyme dimers and reduction of its physiological activity – in terms of production of NO by eNOS in amounts that can provide pleiotropic cytoprotective and antiatherosclerotic effects of NO.

In conclusion, endothelium is a new therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction. However, future goals of cardioprotective therapy must be based on the understanding that the balance between NO and O_2^- in endothelial cells - whose source is eNOS *per se* - is much more important than the absolute level of NO itself.