

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 19ΗΣ ΜΑΪΟΥ 1994

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ ΔΙΑΝΝΕΛΙΔΗ

ΙΑΤΡΙΚΗ.— **Έκφραση του αύξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων, της ινονεκτίνης και των όγκογονιδίων c-fos, c-myc και K-ras σε άρχόμενες αρτηριοσκληρυντικές αλλοιώσεις υπερλιπιδαιμικών κουνιλιών, υπό του 'Ακαδημαϊκού κ. Γρ. Σκαλκέα και των Έμμ. 'Αγαπητού, Π. Καραγιαννάκου, Δ. Κωτσαρέλη, 'Ισμ. Δοντά, Δ. 'Ηλιοπούλου\*, δια του 'Ακαδημαϊκού κ. Γρ. Δ. Σκαλκέα.**

Τò προσδόκιμο έπιβιώσεως αλλά και ή ποιότητα τής ζωής είναι κατά κανόνα έξηρητημένα από την κατάσταση του κυκλοφορικού συστήματος. Πολλά είναι τὰ αίτια που προκαλοϋν αλλοιώσεις του τοιχώματος των άρτηριών και άποφράσσου τόν αύλό τους, ή περισσότερο όμως συχνή νόσος είναι ή άθρωμάτωση. Είναι πάθηση που προσβάλλει τις άρτηρίες μεγάλου και μέσου μεγέθους και χαρακτηρίζεται από τοπική πάχυνση του έσω χιτώνα του τοιχώματος του άγγείου και έναπόθεση, στην περιοχή αυτή, λιπιδιδών.

Παρά τή μείωση των θανάτων, όπως άποδεικνύεται από τις στατιστικές, που όφείλονται στην άθρωμάτωση, ή θνητότητα από τή νόσο αυτή εξακολουθεϊ, για τις προηγμένες χώρες να παραμένει έξαιρετικά ύψηλή άποτέλεσμα κυρίως των έγκεφαλικών και των καρδιακών έπεισοδίων καθώς και τής ισχαιμικής γαγγραιίνης των κάτω άκρων.

Τò παθογενετικό υπόστρωμα τής άθρωματικής νόσου είναι γνωστό από τόν περασμένο αιώνα, ενώ πολλές αξιόλογες θεωρίες για τήν έρμηνεία του μηχανισμού

---

\* GR. SKALKEAS, EM. AGAPITOS, P. KARAYANNACOS, D. KOTSARELI, I. DONTA, D. ILIOPOULOS, **The expression of platelet derived growth factor fibronectin and oncogenes c-fos, c-myc and K-ras in early atheromatous lesions of hyperlipidemic rabbits.**

πρόκλησης τῆς νόσου ἔχουν διατυπωθεῖ ἀπὸ τὸν Virchow, τὸν Rokitsansky καὶ ἄλλους ἐρευνητές. Εἶναι γενικὰ παραδεκτὸ σήμερα ὅτι ὁ παθογενετικὸς μηχανισμὸς τῆς δημιουργίας τῶν ἀθηρωματικῶν ἀλλοιώσεων χαρακτηρίζεται ἀπὸ τὴν διείσδυση καὶ τὴν συγκέντρωση, ὑπὸ τὸ ὑγιὲς ἐνδοθήλιο τῶν ἀρτηριῶν, μονοκυττάρων-μακροφάγων κυττάρων, τὴν ἐναπόθεση λιπιδίων πέριξ καὶ ἐντὸς τῶν κυττάρων αὐτῶν καὶ τὴ μετατροπὴ τους σὲ κύτταρα ποὺ περιέχουν ἀφθονο λίπος (foam cells) καὶ τέλος τὸν πολλαπλασιασμὸ τῶν λεῖων μυϊκῶν κυττάρων τοῦ τοιχώματος μὲ παράλληλο συσσώρευση δομικῶν στοιχείων γιὰ τὴν δημιουργία συνδετικῶ ἰστοῦ [1]. Τὸ αἷτιο ὅμως ποὺ ὀδηγεῖ στὴν ἀλληλουχία τῶν μεταβολῶν αὐτῶν καὶ τελικὰ προκαλεῖ τὶς ἀθηρωματικὲς ἀλλοιώσεις δὲν εἶναι ἀκόμη γνωστὸ καὶ ἀποτελεῖ τὸ ἐπίκεντρο ἐντατικῶν ἐρευνητικῶν προσπαθειῶν. Ἡ ἐξιχνίαση τοῦ μηχανισμοῦ τῆς ἐνάρξεως τῶν διαδοχικῶν μεταβολῶν θὰ ἀποτελέσει γεγονός μεγάλῃς ἐπιστημονικῆς σημασίας διότι θὰ ὑποβοηθήσει στὴν κατανόηση τοῦ παθογενετικοῦ μηχανισμοῦ καὶ πιθανῶς στὴν προσπάθεια πρόληψης τῆς ἀθηρωματικῆς νόσου.

Ὁ ρόλος τῶν προδιαθεσικῶν παραγόντων στὴν πρόκληση τῆς ἀθηρωμάτωσης εἶναι γνωστὸς καὶ ἔχει λεπτομερειανὰ μελετηθεῖ. Παχυσαρκία, ὑπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, ἔντονος τρόπος διαβίωσης, ὑπέρταση, ἔλλειψη ἀσκήσεως κ.λπ. Πολλοὶ ὅμως ἐρευνητές σήμερα ὑποστηρίζουν ὅτι τῶν ἀθηρωματικῶν ἱστολογικῶν ἀλλοιώσεων προηγεῖται ἢ ἔπεται ἢ ἔκφραση τῶν πρωτεϊνῶν διαφόρων γονιδίων στὸ ἀρτηριακὸ τοίχωμα, συμπεριλαμβάνοντας κατὰ τὸν τρόπο αὐτὸ τὴν ἀθηρωματικὴ νόσο στὶς γενετικῶς προκαθοριζόμενες παθήσεις [2].

Σκοπὸς τῆς παρουσίας μελέτης ἦταν νὰ διερευνηθεῖ ἡ ἔκφραση τῶν πρωτεϊνῶν διαφόρων γονιδίων, ὅπως τοῦ c-myc, τοῦ c-fos καὶ τοῦ K-ras, καθὼς καὶ τοῦ ἀυξητικοῦ παράγοντα τῶν αἰμοπεταλίων (PDGF) καὶ τῆς ἰνονεκτίνης (fibronectin), σὲ πρῶτες ἀθηρωματικὲς βλάβες ποὺ προκλήθηκαν πειραματικὰ σὲ ὑπερλιπιδαιμικὰ κουνέλια.

#### ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Γιὰ τὴν παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 40 ἄρρενα, λευκὰ κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, μέσου σωματικοῦ βάρους 2,5 kg. Πρὶν ἀπὸ τὴν ἔναρξη τῆς μελέτης ἔγινε αἰμοληψία σὲ ὅλα τὰ ζῶα γιὰ τὸν προσδιορισμὸ τῶν λιπιδίων τοῦ αἵματος (χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL-χοληστερόλης). Τὰ πειραματόζωα χωρίστηκαν σὲ δύο ομάδες, στὴν ομάδα Α με 10 ζῶα ποὺ ἔλαβαν κανονικὴ τροφή ἐμπορίου καὶ στὴν ομάδα Β με 30 ζῶα ἡ τροφή τῶν ὁποίων εἶχε ἐμπλουτισθεῖ μὲ χοληστερόλη 2% καὶ καλαμποκέλαιο 6%. Ἐκτεταμένη ἐμπειρία τοῦ Ἐργαστηρίου μας ἀπὸ τὴν χρησιμοποίησή τοῦ πειραματικοῦ αὐτοῦ προτύπου ἔχει δείξει ὅτι ἡ χορήγηση τροφῆς

έμπλουτισμένης με χοληστερόλη προκαλεί μετά από 12 εβδομάδες στα πειραματόζωα τυπικές και έκτεταμένες αθηρωματικές αλλοιώσεις του τοιχώματος της άορτης από την έκφυση των στεφανιαίων μέχρι του διχασμού των λαγονίων αγγείων.

Τρεις μήνες μετά την έναρξη της μελέτης έγινε νέα αίμοληψία και στη συνέχεια τα πειραματόζωα εθανατώθηκαν. Με μέση θωρακοκοιλιακή τομή παρασκευάστηκε το αρτηριακό δένδρο από την ανιούσα άορτη μέχρι τις λαγόνιες αρτηρίες, και στη συνέχεια έγινε διάνοιξη της θωρακικής και της κοιλιακής άορτης κατά τον μέσο επιμήκη άξονα.

Ίστοτεμάχια του τοιχώματος της ανιούσης άορτης και από τις δύο ομάδες των πειραματοζώων αφαιρέθηκαν και μετά από μονιμοποίηση σε διάλυμα ουδέτερης φορμαλίνης για 24 ώρες εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης. Τομές πάχους 3 μ λήφθηκαν από τους κύβους και χρώστηκαν με τη μέθοδο ήωσίνης-αιματοξυλίνης. Με ανοσοϊστοχημική τεχνική αναζητήθηκαν ή έκφραση των πρωτεϊνών των όγκογονιδίων c-myc, c-fos και K-ras καθώς και του αύξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων και της ίνωσησης.

Η μελέτη των ιστολογικών παρασκευασμάτων έγινε με φωτονικό μικροσκόπιο τόσο για την αναζήτηση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων όσο και των υπό μελέτη βιολογικών δεικτών. Η ανάγνωση των αντικειμενοφόρων πλακών έγινε από μέλος της ομάδας που δεν γνώριζε την ομάδα στην οποία ανήκε το πειραματόζωο.

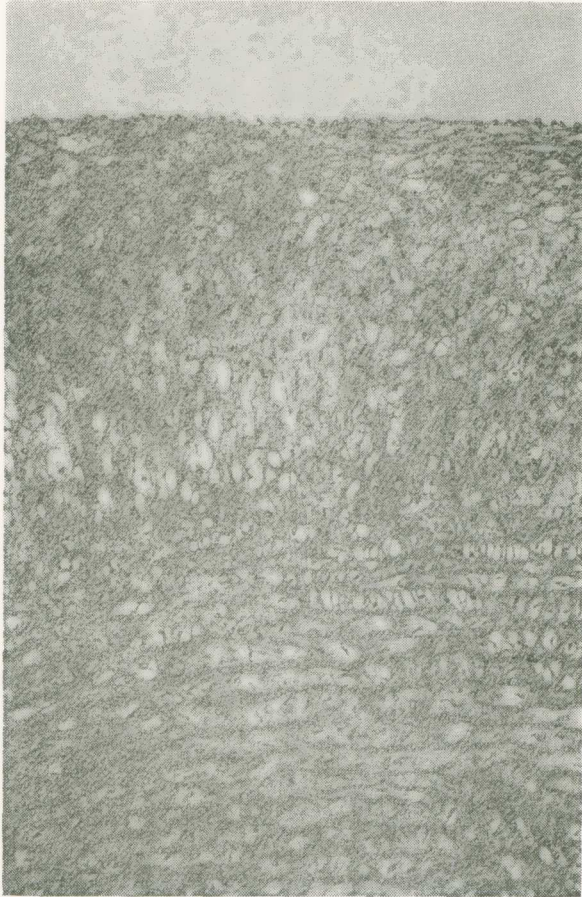
#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η χορήγηση τροφής έμπλουτισμένης σε χοληστερόλη, για χρονικό διάστημα 3 μηνών, προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων. Η χοληστερόλη στο τέλος της μελέτης ήταν  $55.49 \pm 5.55$  mg% για την ομάδα Α και  $218.91 \pm 24.49$  mg% για την ομάδα Β ( $p < 0,05$ ). Αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε και στις τιμές των τριγλυκεριδίων.

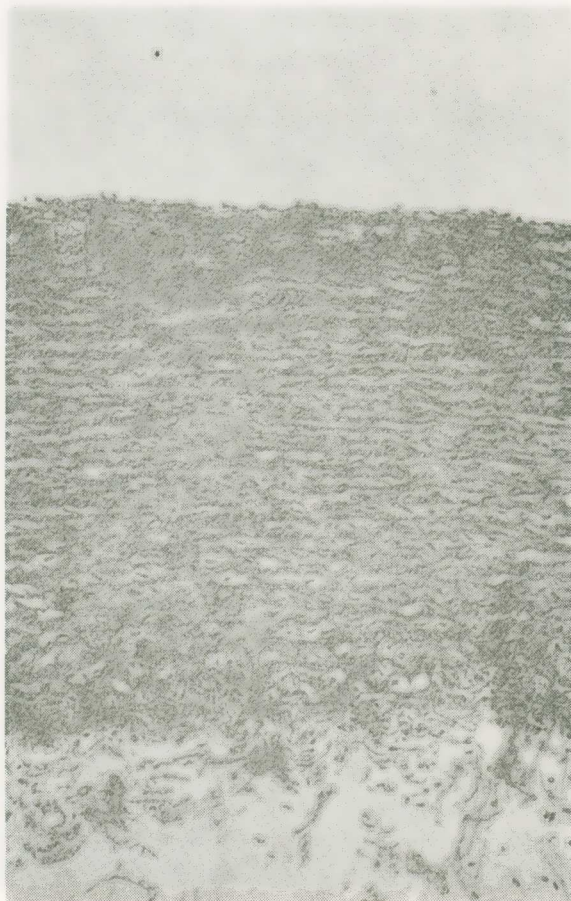
Η ιστολογική εξέταση του τοιχώματος της άορτης των πειραματοζώων που έλαβαν τροφή έμπλουτισμένη με χοληστερόλη, έδειξε τυπικές αλλοιώσεις πρώιμων αθηρωματικών βλαβών (Εικόνα 1) σε αντίθεση με την φυσιολογική ιστολογική εικόνα των αγγείων των ζώων της ομάδας Α (Εικόνα 2).

Σε 12 από τα 20 πειραματόζωα της ομάδας Β, στα όποια αναζητήθηκε ο αύξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων διαπιστώθηκε έντονη ή παρουσία του μέσα στο κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων του έσω χιτώνα, κάτω από τις περιοχές που παρατηρήθηκε ή συγκέντρωση των άφρωδών κυττάρων (Εικόνα 3). Αντίθετα ο παράγοντας αυτός δεν ανευρέθηκε στα πειραματόζωα της ομάδας Α που δεν ανέπτυξαν αθηρωματικές αλλοιώσεις (Εικόνα 4).

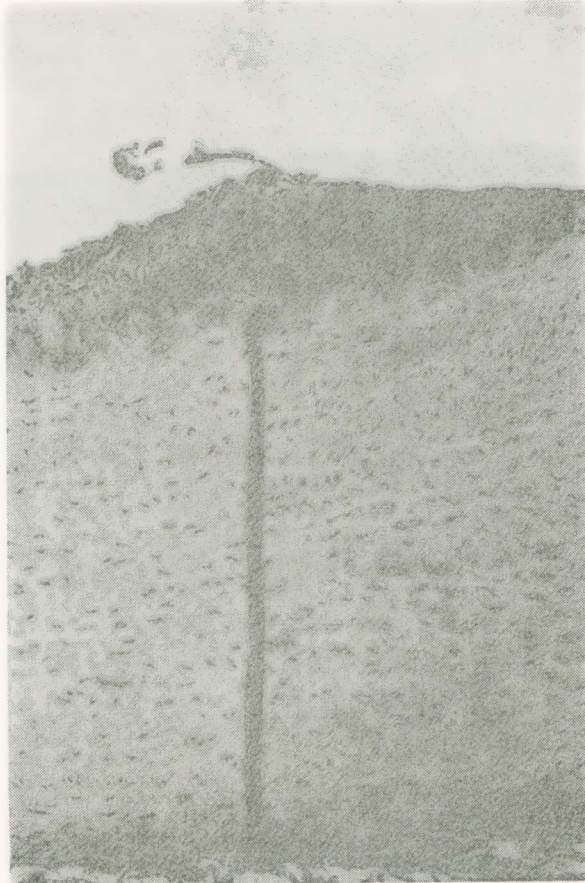




Εικόνα 1: 'Ανάπτυξη πρώιμων αθηρωματικών αλλοιώσεων στο τοίχωμα αρτηής. Το άνω ήμισυ τής εικόνας καταλαμβάνεται από αφρώδη μακροφάγα κύτταρα. Η Ε × 125.

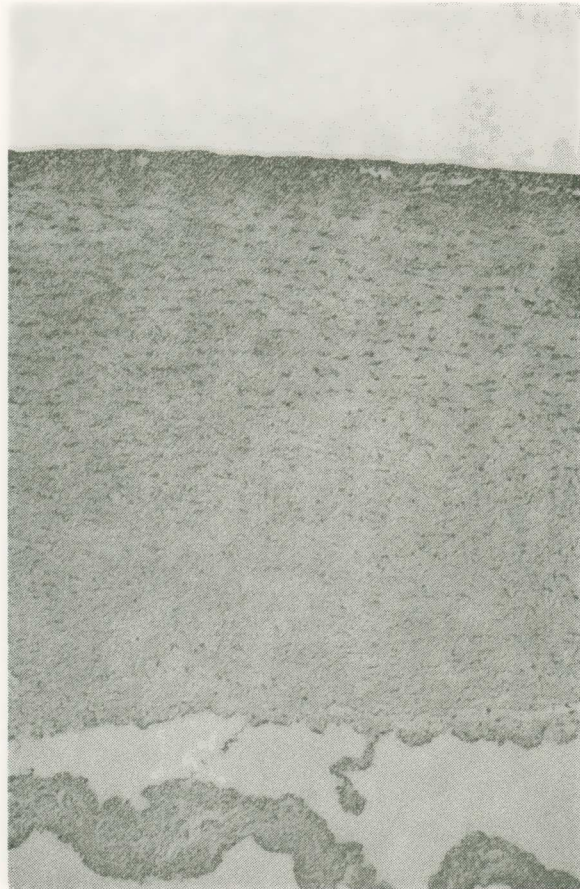


Εικόνα 2: Φυσιολογική ιστολογική εικόνα ολοκλήρου του τοιχώματος της αρτηρίας. Η Ε × 125.



Εικόνα 3: Ανίχνευση του αύξητικού παράγοντα τῶν αἰμο-  
πεταλίων ὑπενδοθηλικῶς στὶς πρώιμες ἀθηρωματικῆς  
ἀλλοιώσεις. P A P  $\times$  125.





Εικόνα 4: Φυσιολογική ιστολογική εικόνα τοιχώματος  
αρτηής. P A P  $\times$  125.

Στην ύπερδοθηλιακή μοίρα του τοιχώματος των αγγείων της υπερλιπιδαιμικής ομάδος παρατηρήθηκε αύξημένη έναπόθεση ινονεκτίνης. Στις πολύ πρώιμες αθηρωματικές βλάβες ή ινονεκτίνη ήταν διάχυτος στον διάμεσο ιστό με την ινιδιακή της μορφή (Εικόνα 5). Σε πλέον προχωρημένες όμως αλλοιώσεις ανιχνεύτηκε μέσα στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων και των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και διάχυτα στον διάμεσο ιστό (Εικόνα 6). Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή δεν ανιχνεύτηκε στο τοίχωμα της αορτής των πειραματοζώων της ομάδας Α που έλαβαν φυσιολογική τροφή (Εικόνα 7).

Με την ίδια ανοσοϊστοχημική μέθοδο ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων, κάτωθεν των αφρωδών κυττάρων του τοιχώματος της αορτής των πειραματοζώων της ομάδος Β, έντονη ή παρουσία των πρωτεϊνών έκφρασης των όγκογονιδίων c-myc (Εικόνα 8), c-fos (Εικόνα 9) και K-ras (Εικόνα 10). Ουδέμια έκφραση των πρωτεϊνών των όγκογονιδίων αυτών παρατηρήθηκε σε παρακείμενες περιοχές των αρτηριών των ζώων της αυτής ομάδας με απουσία αθηρωματικών αλλοιώσεων καθώς και στα άγγεϊα των ζώων της ομάδας έλέγχου με την κανονική διατροφή.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την διάρκεια της τελευταίας 15ετίας σημαντικός αριθμός γονιδίων έχουν αναγνωρισθεί και κλωνοποιηθεί. Υποστηρίζεται ότι μερικά από αυτά λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της δημιουργίας και της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας χωρίς όμως ή ακριβής δράση τους να είναι γνωστή. Τα περισσότερα από τα γονίδια αυτά εκφράζουν πρωτεΐνες που έχουν σχέση με διάφορες λιποπρωτεΐνες [3]. Η έκφραση των όγκογονιδίων που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα μελέτη και κυρίως το c-myc έχουν συνδεθεί στενά με τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση κυτταρικών στοιχείων και κυρίως των λείων μυϊκών κυττάρων, ο έντονος πολλαπλασιασμός των οποίων φαίνεται, σύμφωνα με τελευταίες μελέτες, ότι αποτελεί κυριαρχικό παράγοντα στην ανάπτυξη των αποφρακτικών αγγειακών αλλοιώσεων [4].

Ο αυξητικός παράγοντας των αίμοπεταλίων αποτελεί ένα βιορυθμιστικό μόριο που απελευθερώνεται άμέσως μετά από οποιαδήποτε κάκωση του αγγειακού τοιχώματος. Αποτελεί δυνητικό μιτογόνο που παράγεται από αρκετά είδη κυττάρων, όπως αίμοπετάλια, μακροφάγα, ένδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος [5, 6], ενώ ταυτόχρονα έχει και θετική χημειοτακτική δράση για τα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος. Η έκφραση του μιτογόνου αυτού παράγοντα στις αθηρωματικές αλλοιώσεις οδηγεί στην μετανάστευση λείων

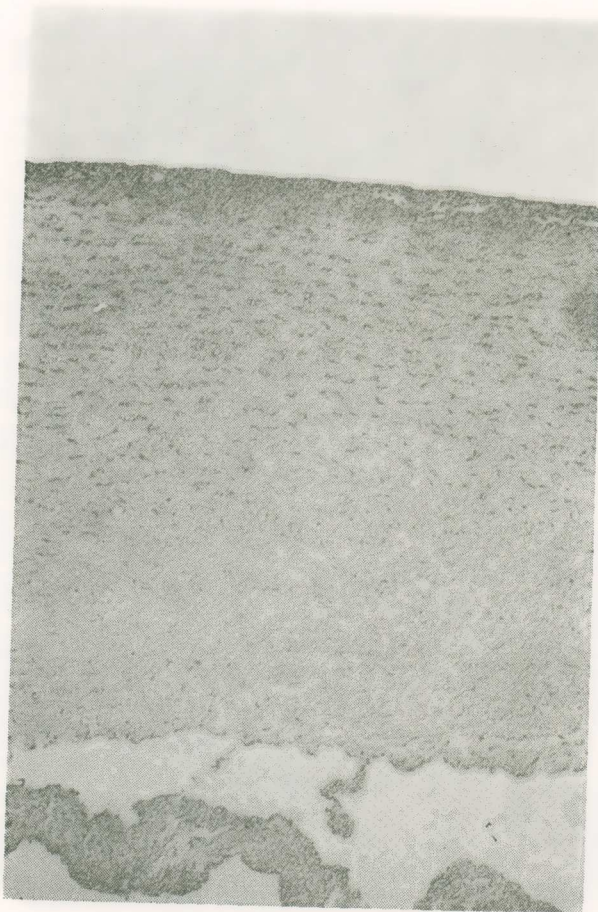




Εικόνα 5: Ανίχνευση ίνωσης, υπενοθηλιακά, στις πρώιμες θηροματιχές  
αλλοιώσεις τοχώματος όορτης. P A P × 125.

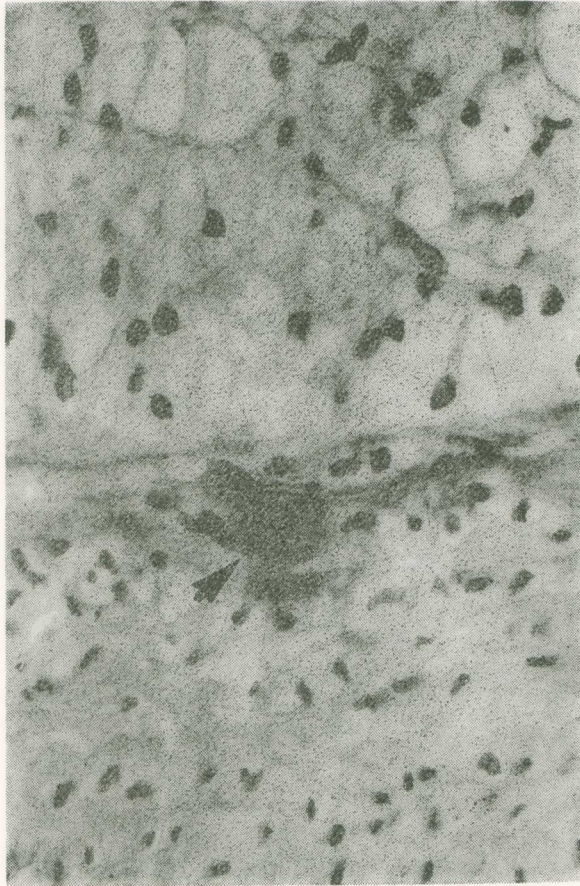


Εικόνα 6: Τροποποιημένα λεία μινικά κύτταρα θετικά στην ίνωση. Ρ Α Ρ × 400.

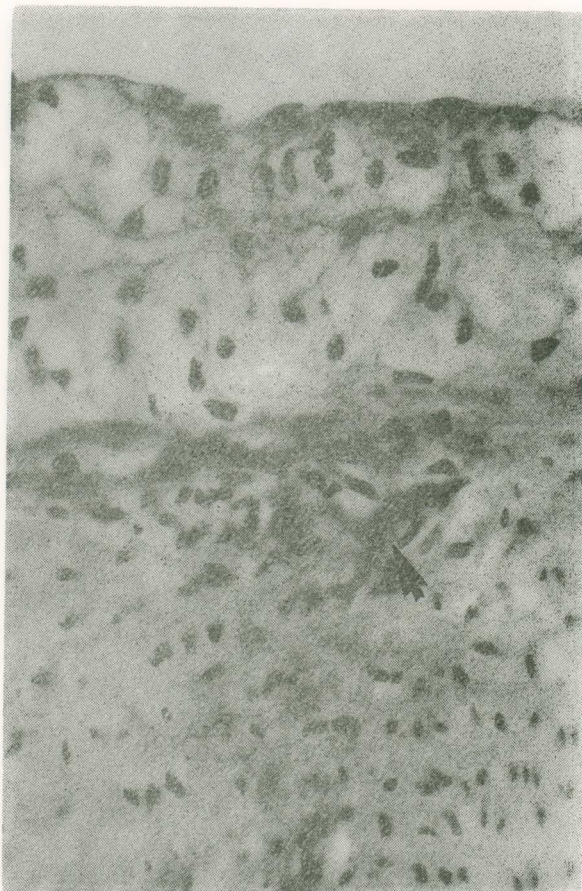


Εικόνα 7: Φυσιολογική ιστολογική εικόνα τοιχώματος  
αρτηΐς. P A P  $\times$  125.

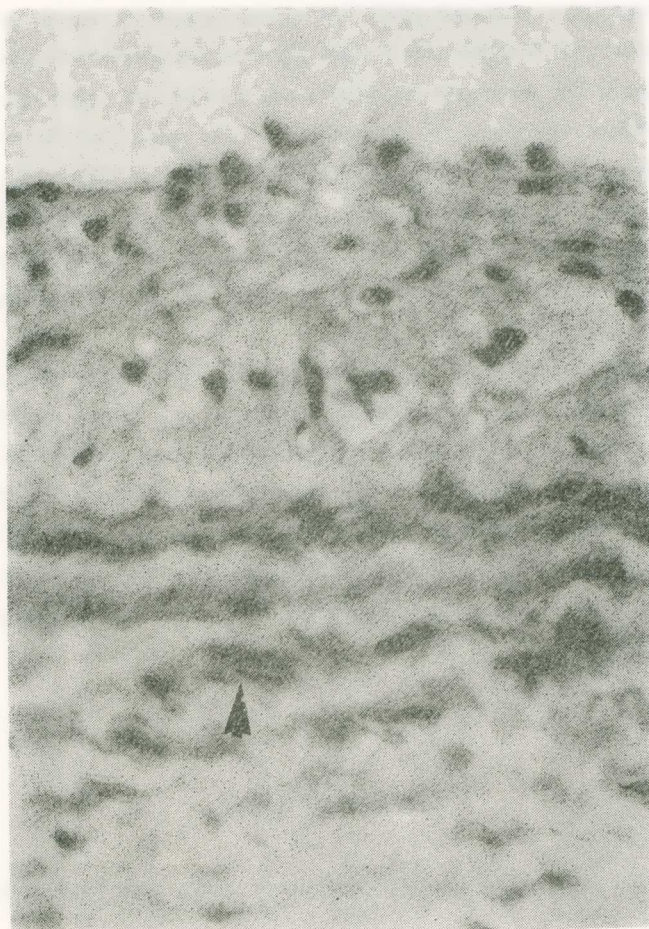




Εικόνα 8: Άνιχνευση πρωτεΐνης ογκογονιδίων c-myc στο κυτταρόπλασμα τροποποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων σε πρώιμες αθηρωματικές αλλοιώσεις τοιχώματος αορτής.  
P A P × 250.



Εικόνα 9: 'Ανίχνευση πρωτεΐνης όγκογονιδίου c-fos στο κυτταρόπλασμα τροποποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων, σε πρώιμες αθηρωματικές αλλοιώσεις τοιχώματος άορτῆς.  
P A P  $\times$  250.



Εικόνα 10: 'Ανίχνευση πρωτεΐνης ογκογονιδίου K-ras στο πρωτόπλασμα τῶν λείων μυϊκῶν κυττάρων σὲ πρώιμες ἀθηρωματικῆς ἀλλοιώσεις τοιχώματος ἀορτῆς. P A P  $\times$  250.



μυϊκών κυττάρων από τον μέσο στόν έσω χιτώνα (τροποποιημένα λεϊα μυϊκά κύτταρα) καθώς και στον πολλαπλασιασμό αυτών [7].

‘Η ίνονεκτίνη παράγεται από τὰ αναγεννώμενα ένδοθηλιακά κύτταρα και διασπᾶται από ένδογενείς πρωτεάσες σέ μικρά τμήματα, τὰ όποια δροϋν χημειοτακτικά και έλκουν μονοπύρρηνα μακροφάγα [2]. ‘Ινονεκτίνη παράγεται επίσης και από τὰ μακροφάγα, γεγονός που ένισχύει τήν άποψη τής αυτόδιαιωνίσεως τής νόσου [8].

Τὰ εύρήματα τής παρούσης έργασίας είναι πρωτότυπα, προστίθενται στον μικρό αριθμό διεθνών έργασιών που έμφανίζονται στην βιβλιογραφία και συνηγοροϋν στην άποψη τής συμμετοχής του γενετικού ύποστρώματος στον παθογενετικό μηχανισμό προκλήσεως τής άθηρωμάτωσης. Τόσο ό αύξητικός παράγοντας των αίμοπεταλίων όσο και ή ίνονεκτίνη και τὰ τρία όγκογονίδια που μελετήθηκαν έκφράστηκαν έντονα και άναγνωρίστηκαν μόνο στις περιοχές τής άορτής κουνελιών με σαφή παρουσία άθηρωματικών βλαβών.

Πιθανολογείται, έπομένως, ότι τὰ γονίδια αυτά θά πρέπει να συμπεριλαμβάνονται μέσα στον πολύπλοκο μηχανισμό προκλήσεως τής άθηρωματικής νόσου και να άποτελούν έναν από τους κύριους παράγοντες που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη διάρκεια του πρώιμου σχηματισμού τής άθηρωματικής πλάκας. ‘Ο προσδιορισμός τής άλληλουχίας και κυρίως τής χρονικής φάσεως στη διαδρομή τής εξέλιξεως τής άθηρωματικής άλλοιώσεως, που έκφράζονται τὰ γονίδια αυτά, άποτελούν ένα ένδιαφέρον έρευνητικό πεδίο και προς τήν κατεύθυνση αυτή εργάζεται ή ομάδα μας.

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *New Engl. J. Med.* 1986, **314** 488-495.
2. Ylä-Herrtuala S., M. E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, E. Sigal, T. Särkioja, J. L. Witzum, D. Steinberg, Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-Pipoxygenase and acetyl LDL receptor mRNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J. Clin. Invest.* 1991, **87**, 90-99.
3. Yamamoto T., C. G. Davis, M. S. Brown, W. J. Schneider, M. L. Casey J. L. Goldstein, D. W. Russell, The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple alusequences in its mRNA. *Cell.* **39**(1984) 27-38.
4. Neufeld H. N., Goldbourt V., Coronary heart disease: genetic aspects. *Circulation* 1983, **67**, 943-54.
5. Betsholtz C., J. Johnson, C. H. Heldin, B. Westermarck, P. Lind, M. S. Urdea, R. Eddy, T. B. Shows, K. Philpott, A. L. Mellot, T. J.

- Knott, J. Scott, cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-Chain and its expression in tumor cell lines. *Nature (Lond.)* (1986) **320**, 695-699.
6. Josephs S. F., L. Rathner, M. F. Clarke, E. H. Westin, M. S. Feitz, F. Wong - Staal, Transforming potential of human c-sis nucleotide encoding platelet-derived growth factor. *Science* 1984, **225**, 636-639.
7. Clark R. A. F., Quinn J. H., Winn H. J., Lanigan J. M., Dellepella P., Colvin R. B., Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J. Exp. Med.* 1982, **156**, 646-651.
8. Alitalo K., Hovi T., Vaheri A., Fibronectin produced by human macrophages *J. Exp. Med.* 1980, **151**, 602-613.

#### SUMMARY

**The expression of platelet derived growth factor fibronectin and oncogenes c-fos, c-myc and K-ras in early atheromatous lesions of hyperlipidemic rabbits.**

Platelet derived growth factor, fibronectin, as well as the three oncogenes c-fos, c-myc and K-ras investigated, were strongly positive in early atheromatous lesions of hyperlipidemic rabbits.

The results of this experimental study suggest that genetic back-ground contributes in the pathogenesis of atherosclerosis.