

ANDRZEJ LEDWOŻYW, ADAM KADZIOLKA

## Rola komórkowych czynników wzrostu w miażdżycy

Zakład Patofizjologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Przypuszczenie, że komórki wydzielają czynniki będące ważnymi elementami procesów normalnego wzrostu i rozwoju, zostało potwierdzone odkryciem naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, epidermal growth factor) i wykazaniem, że jest on odpowiedzialny za otwarcie szpary powiekowej i wyrzynanie się zębów (9). Po odkryciu, oczyszczeniu i scharakteryzowaniu EGF odkryto szereg innych czynników wzrostu, z których wiele jest w trakcie oczyszczania i charakteryzacji. Fakt, że komórki w hodowlach *in vitro* wymagają do kontynuacji proliferacji surowicy krwi oraz, że usunięcie z gojącej się rany aktywnych makrofagów powoduje znaczne zahamowanie namnażania się fibroblastów, był podstawą odkrycia dwu innych czynników wzrostu: płytkowego (PDGF, platelet-derived factor) i pochodzącego z makrofagów (MDGF, macrophage-derived growth factor (34).

Stwierdzenie, że jeden z podstawowych czynników wzrostu obecnych w surowicy pochodzi z płytek krwi, oparte było na obserwacji, że surowica otrzymana z osocza bezkomórkowego nie posiada aktywności mitogennej (2, 39). W szeregu doświadczeń wykazano, że płytki krwi są jedynymi jej komórkami posiadającymi czynnik mitogenny, uwalniany w procesie krzepnięcia (39). Mitogen ten, PDGF, wysoce oczyszczono (31); stał się on też obiektem intensywnych badań, gdy okazało się, że jest on homologiczny z niektórymi produktami onkogenów (38).

PDGF jest silnie kwaśnym glikoproteidem o c.c.z. 30 000, zbudowanym z dwu podjednostek połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Jest on uwalniany z płytek krwi w miejscach ich przylegania do ściany naczyń i ich agregacji, w następstwie aktywacji tych komórek z uwolnieniem ziarnistości alfa.

Początkowo nie był on uważany za składnik płytek krwi, lecz za krążący hormon, dostający się wraz z prądem krwi do miejsca uszkodzenia ściany naczyniowej, zwany „hormonem rany”. Inicjował on proliferację komórek tkanki łącznej jak fibroblasty, czy komórki mięśni gładkich, biorąc tym samym udział w gojeniu rany i stanowiąc ważny mechanizm obronny.

PDGF reprezentuje grupę białek, których ekspresja genetyczna może zachodzić w wielu rodzajach komórek, w tym także komórek, które uległy transformacji i które mogą odgrywać znaczną rolę nie tylko w gojeniu się ran.

Z powodu swego silnie kwaśnego charakteru (28), PDGF może wiązać się z różnego rodzaju powierzchniami biologicznymi. Wykazano np.,

że w fizjologicznym zakresie pH jego cząsteczka posiada regiony hydrofobowe, co pozwala na wiązanie się z błonami komórkowymi (1). Prócz tego komórki posiadają receptory specyficzne dla PDGF (30). PDGF posiada wysokie powinowactwo do tych receptorów, gdyż po związaniu się z nimi dysocjacja następuje bardzo wolno (29). Wiązanie się PDGF z receptorem nie jest jednak nieodwracalne, gdyż może on być wymyty z nich rozcieńczonym kwasem octowym (pH 3,7). Procedura taka nie powoduje uszkodzenia receptorów (5).

PDGF wiąże się przede wszystkim z komórkami tkanki łącznej. Jest to cząsteczka wysoce konserwatywna w ewolucji, gdyż występuje u wielu gatunków ssaków, a także u prymitywnych kręgowców, jak minogi i płaszczki (40). Ilość receptorów dla PGF jest różna w różnych typach komórek. Większość z nich posiada 25 000—150 000 receptorów na 1 komórkę, jak np. komórki mięśni gładkich, fibroblasty, komórki gleju i chrząstki. Najwięcej receptorów posiada linia komórkowa fibroblastów 3T3, bo 600 000 na 1 komórkę (37). Komórki nie posiadające receptorów dla PDGF to komórki nabłonkowe i linia A-431 pochodząca z raka nabłonkowego, a posiadająca dużą liczbę receptorów dla EGF (16). Innymi komórkami nie posiadającymi receptorów dla PDGF są komórki śródbłonna tętnic. Są one jednak zdolne do syntezy tego czynnika w hodowli.

Związanie się PDGF z receptorem wywołuje w komórce cały szereg zjawisk, z których niektóre związane są z funkcjonowaniem samego receptora. Receptor dla PDGF jest receptorem funkcjonalnym, gdyż stężenia wymagane dla wysycenia receptora i dla stymulacji mitogennej są bardzo podobne (6). Nie stwierdzono natomiast istnienia receptorów dla PDGF działających jak receptory dla insuliny czy EGF, które dla nasycenia wymagałyby 100-krotnie wyższych stężeń czynnika niż stężenia niezbędne do wywołania odpowiedzi biologicznej (11). PDGF nie wiąże się też z innymi receptorami komórkowymi. Po związaniu się ze swym receptorem, kompleks receptor—ligand ulega internalizacji, co jest cechą charakterystyczną receptorów dla mitogenów (33).

Receptor PDGF jest glikoproteidem znajdującym się na powierzchni błony komórkowej o c.c.z. 164 000 (27). Po związaniu się z czynnikiem wzrostu białko to ulega szybkiej fosforylacji (15). Fosforylacji ulega też szereg białek cytozolowych, jednak rola tego zjawiska nie jest jeszcze znana (10). Oprócz tego zachodzą w komórce szybkie i istotne zmiany w metabolizmie

fosfolipidów. W ciągu 5—10 minut od momentu związania się PDGF z receptorem, następuje znaczny wzrost syntezy diacylogliceroli, rozkładanych następnie do monoacylogliceroli i wolnego kwasu arachidonowego. Synteza diacylogliceroli spowodowana jest prawdopodobnie aktywacją błonowej fosfolipazy C. Powstające diacyloglicerole odgrywają ważną rolę w aktywacji kinaz białkowych i mobilizacji  $Ca^{2+}$  w komórce, co indukuje szereg procesów, prowadzących w końcu do podziału komórki. Kwas arachidonowy służy jako substrat dla syntezy prostaglandyn, a w przypadku komórek mięśni gładkich — do syntezy prostacykliny (25).

PDGF wzmacnia endocytozę (13), wiązanie lipoproteidów o niskiej gęstości (LDL, low density lipoproteins) z ich receptorem o wysokim powinowactwie (8), syntezę cholesterolu oraz białek i RNA (8). Wykazano, że PDGF powoduje powstawanie nowych cząsteczek mRNA, których specyficzność nie została jeszcze ustalona. Jest on też jedynym, jak dotąd, czynnikiem wzrostu, posiadającym zarówno aktywność mitogenną, jak i chemotaktyczną. Tę ostatnią przejawia w stosunku do fibroblastów i komórek mięśni gładkich (23), a także — prawdopodobnie — dla krwinek białych.

MDGF wykryto w pożywce hodowli makrofagów otrzewnowych (35). Płyn ten stymulował wzrost fibroblastów i komórek mięśni gładkich. Dało to podstawę przypuszczeniom, że aktywne makrofagi mogą być przyczyną wzmożonej proliferacji fibroblastów w gojącej się ranie i w zjawiskach związanych z zapaleniem. Niedawno wykazano, że monocyty i makrofagi są podstawowymi komórkami związanymi z rozwojem wczesnych zmian miażdżycowych. Możliwe więc, że komórki te są źródłem czynnika wzrostu dla komórek mięśni gładkich i fibroblastów w tym procesie (18).

Hodowle monocytów krwi mogą być wydajnym źródłem MDGF (22). Jest on też produkowany przez makrofagi pęcherzykowe płuc (4). Jego c.c.z. wynosi 20 000—30 000 (4) i nie jest on pokrewny ani EGF, ani insulinie.

Stwierdzono, że pożywka, w której hodowano komórki śródbłonna tętnic, zawiera silne czynniki powodujące wzrost komórek mięśni gładkich i fibroblastów (21). Okazało się, że oprócz PDGF zawiera ona także inny czynnik, zasadniczo od niego różny (14).

Wyizolowano również inne czynniki wzrostu, jak: czynnik wzrostu chondrocytów produkowany przez przysadkę (CGF, chondrocyte growth factor), posiadający właściwości silnego mitogenu dla różnych komórek pochodzenia mezodermalnego (41), mózgowy czynnik wzrostu (BDGF, brain-derived growth factor) (3), czy czynnik wzrostu komórek glejowych (GDGF, glial-derived growth factor) (7). Wykazano także, że fibroblasty płuc wcześniaków pawianów produkują czynnik wzrostu stymulujący syntezę lipidów w komórkach nabłonka płuc (LDGF, lung-derived growth factor) (32). Także

mleko kobiece zawiera czynnik stymulujący syntezę DNA w komórkach różnych odcinków przewodu pokarmowego (HMDGF, human milk-derived growth factor) (12).

W miażdżycy doświadczalnej, indukowanej hipercholesterolemią lub homocysteinemią wykazano istnienie interakcji między monocytami, makrofagami i płytkami krwi w miejscu uszkodzenia naczynia. Próby zapobiegania rozwojowi zmian miażdżycowych na drodze hamowania aktywności płytek za pomocą środków farmakologicznych (26), wywołania trombocytopenii (19) oraz wyniki uzyskane w badaniach świń chorych na chorobę von Willebranda lub z niedoborem czynnika VIII (20) wykazały, że wzajemna interakcja płytek krwi jest niezbędna dla wywołania odpowiedzi proliferacyjnej ze strony komórek mięśni gładkich.

Wczesna obecność monocytów i makrofagów w początkowych stadiach zmian miażdżycowych (nacieczenia tłuszczowe) sugeruje, że komórki te i uwalniane przez nie czynniki odgrywają ważną rolę w chemotaksji dla komórek mięśni gładkich i ich proliferacji (17, 18). Przypuszczenie to potwierdza fakt, że zjawiskom tym zapobiegają przeciwciała przeciwko PDGF. Głębsze poznanie roli czynników wzrostu w patogenezie miażdżycy otwiera nowe horyzonty dla diagnostyki i leczenia tej choroby.

#### Piśmiennictwo

1. Antoniadou H. N., Scher C. D., Stiles C. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1809, 1979.
2. Balk S. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 271, 1971.
3. Barrittault D., Plouet J., Courty J., Courtois Y.: Neurosci. Res. 8, 477, 1982.
4. Bitterman P. B., Rennard S. I., Hunnighake G. W., Crystal R. G.: J. Clin. Invest. 70, 806, 1982.
5. Bowen-Pope D. F., DiCorleto P. E., Ross R.: J. Cell Biol. 96, 679, 1983.
6. Bowen-Pope D. F., Ross R.: J. Biol. Chem. 257, 5161, 1982.
7. Brookes J., Lemke G., Hatcher V. B.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 282, 1984.
8. Chait A., Ross R., Albers J., Bierman E. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4084, 1980.
9. Conen S.: J. Biol. Chem. 237, 1555, 1962.
10. Cooper J. A., Bowen-Pope D. F., Raines E., Ross R., Hunter T.: Cell 31, 263, 1982.
11. Cuatrecasas P., Hollenberger M. D.: Adv. Protein Chem. 30, 251, 1976.
12. Dal S., Klagsburn M., Ogle C. W., Shing Y. W.: Med. Sci. Res. 15, 353, 1987.
13. Davies P. K., Ross R.: J. Cell Biol. 79, 663, 1978.
14. DiCorleto P. E., Bowen-Pope D. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1919, 1983.
15. Ek B., Heidén C. H.: J. Biol. Chem. 257, 10486, 1982.
16. Fabricant R. N., Detarco J. E., Todaro G. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 565, 1977.
17. Faggiotto A., Ross R.: Arteriosclerosis 4, 341, 1984.
18. Faggiotto A., Ross R., Harker L.: Arteriosclerosis 4, 323, 1984.
19. Friedman R. J., Stemerman M. B., Wenz B., Moore S., Gauldie J., Gent M., Tiell M. L., Spaet T. H.: J. Clin. Invest. 60, 1191, 1977.
20. Fuster V., Bowie E. J., Lewis J. C., Fass D. N., Owen C. A., Brown A.: J. Clin. Invest. 61, 722, 1978.
21. Gajdusek C., DiCorleto P., Ross R., Schwartz S.: J. Cell Biol. 85, 467, 1980.
22. Glenn K., Ross R.: Cell 25, 603, 1981.
23. Grotendorst G. R., Chang T., Seppa H. E. J., Kleinman H. K., Martin G. R.: J. Cell Physiol. 113, 261, 1982.
24. Habenicht A. J. R., Glomset J. A., King W. C., Nist C., Mitchel C. D., Ross R.: J. Biol. Chem. 256, 12329, 1981.
25. Habenicht A. J. R., Goerig M., Grullin J., Rothe D., Gronwald R., Loth V., Schettler G., Kommerell B., Ross R.: J. Clin. Invest. 75, 1381, 1985.
26. Harker L., Ross R., Süchter S., Scott C.: J. Clin. Invest. 58, 731, 1976.
27. Heidén C. H., Ronnstrand L.: J. Biol. Chem. 258, 10054, 1983.
28. Heidén C. H., Wasteson A., Westermark B.: Exp. Cell Res. 109, 429, 1977.
29. Heidén C. H., Wasteson A., Westermark B.: J. Biol. Chem. 257, 4126, 1982.

30. *Heldin C. H., Westermarck B., Wasteson A.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3722, 1979.
31. *Heldin C. H., Westermarck B., Wasteson A.*: Biochem. J. 193, 907, 1981.
32. *Jones M. B., King R. J., Kuehl T. J.*: Am. Rev. Respir. Dis. 135, 997, 1987.
33. *Kaplan J.*: Science 212, 14, 1981.
34. *Leibovich S. J., Ross R.*: Am. J. Pathol. 73, 71, 1975.
35. *Leibovich S. J., Ross R.*: Am. J. Pathol. 84, 501, 1976.
36. *Nishizuka Y.*: Nature 303, 693, 1984.
37. *Pruss R. M., Herschman H. R.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3918, 1977.
38. *Raines E. W., Ross R.*: J. Biol. Chem. 257, 5154, 1982.
39. *Ross R., Glomset J., Kriya B., Harker L.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1207, 1974.
40. *Singh J. P., Chaikin M. A., Stiles C. D.*: J. Cell Biol. 95, 657, 1982.
41. *Too C. K. L., Murphy P. R., Hamel A. M., Friesen H. G.*: Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 1128, 1987.

Adres autora: dr Andrzej Ledwożyw, ul. Grażyny 29/13, 29-602 Lublin

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

STEFAN WIERZBOWSKI, WIESŁAW KARETA

### Gatunkowe uwarunkowania oceny przydatności rozplodowej tryków

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice/Kraków

Badania mające na celu prognozowanie przydatności rozplodowej samców mają już pewną historię. Jest oczywiste, że ponosząc odpowiedzialność za zapłodnienie określonej grupy samic, reproduktor jest pierwszoplanowym składnikiem układu, który musi być brany pod uwagę. W odniesieniu do owiec, zebrano już do tej pory dostateczną ilość informacji, aby można formować pogląd charakteryzujący sytuację dotyczącą tego gatunku. Jest też oczywiste, że zarówno specyficzne cechy gatunkowe, jak i określone sposoby utrzymywania owiec, wymagają rozpoznania zarówno właściwości samców tego gatunku i warunków organizacji rozrodu owiec, jak i oczywiście specyficznych czynników chorobowych, związanych z rozrodem tych zwierząt. Najmniej, jak się wydaje, wiadomo do tej pory o genetycznych uwarunkowaniach cech decydujących o płodności i plenności owiec.

W świetle dotychczasowych wyników badań tryków przeprowadzanych na skalę masową można przyjmować, że 10 do 25% jest obciążonych zmianami klinicznymi w zakresie narządów płciowych. Zmiany te jako prowadzące do niepłodności względnie obniżonej płodności, stanowią powód eliminacji obciążonych nimi tryków z hodowli. W Australii Gunn i wsp. (4) — jako pierwsi — na podstawie przebadania 6420 tryków, stwierdzili zmiany zapalne (względnie pozapalne) w obrębie jąder i najądrzy u 9,6% badanych zwierząt. Następnie Moule (10) prowadząc do rozpoznania sytuacji w stadach o szczególnie niskiej płodności wykazał, że aż 26% tryków odznaczało się patologicznymi zmianami w zakresie jąder i najądrzy. Potem znowu Miller i Moule (9) na podstawie sprawdzenia 16 665 tryków wykazali zmiany kliniczne jąder i najądrzy u 10,8% zwierząt. Również w Australii Murray (11) zajmując się brucelozą owiec stwierdził postępujący wraz z

wiekami tryków (od 3,6% u rocznych do 28% u tryków siedmioletnich) wzrost częstotliwości występowania zmian pozapalnych w obrębie narządów worka mosznowego. Gancik (2) na podstawie badania 3860 tryków na Słowacji stwierdził u 9% zwierząt zapalenie najądrzy. Z tymi danymi korespondują wyniki zebrane przez Karetę (6), który wykazał, że 12,6% badanych tryków było obciążonych zmianami klinicznymi mogącymi stanowić przyczynę obniżonej płodności. Badania te, przeprowadzone w okresie ostatnich 10 lat, pozwalają na wyrobienie sobie poglądu na wielkość problemu, jakim w naszej hodowli owiec są tryki niepłodne, względnie przekazujące na potomstwo wady wrodzone, obniżające płodność. Otóż w badaniach przeprowadzonych przez Karetę (6) na przestrzeni lat 1977—1986, którymi objęto 6319 tryków dorosłych i 1876 tryczków, zebrano dane pozwalające na sformułowanie wniosków o istotnym, jak się wydaje, znaczeniu dla naszej praktyki zarówno weterynaryjnej, jak i hodowlanej. Z 1876 tryczków w wieku 4—6 miesięcy, dyskwalifikacji uległo 23,3% zwierząt. Powodem brakowania były wyłącznie wady wrodzone, a mianowicie jedno lub dwustronne wnętrostwo oraz niedorozwój jąder. W grupie 4357 tryków w wieku od 18 miesięcy do 8 lat, od których uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej, przyczyny nieprzydatności rozplodowej 12,6% zbadanych zwierząt były całkowicie inne. Poza 7 trykami z jednostronnym wnętrostwem, które widocznie nie zostały rozpoznane w czasie selekcji hodowlanych, wszystkie pozostałe były obciążone wadami nabytymi\*. W 3,7% były to nieodwracalne zmiany w zakresie jąder lub najądrzy powstałe w następstwie przebytych procesów zapalnych. Pozostałe 8,9% przypadków było kwalifikowane jako

\* W tych badaniach nie uwzględniono jeszcze oceny stanu rozwoju jąder.