

Hipoteza transdukcji bodźca hemodynamicznego i potencjalna rola w aterogenezie

Kryspin MIROTA

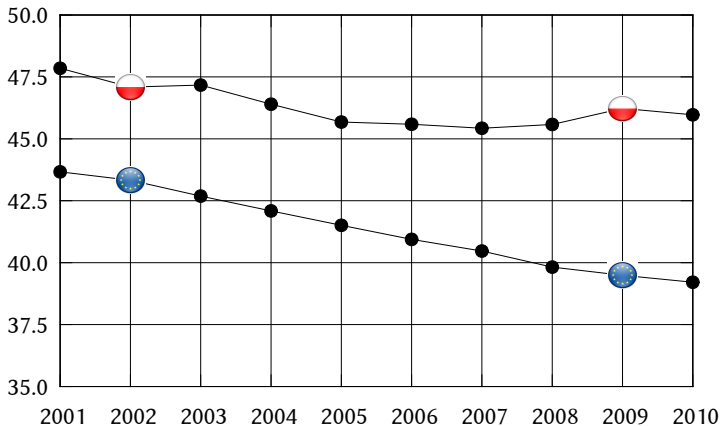
kmirota@ath.bielsko.pl, kryspin.mirota@gamil.com

Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

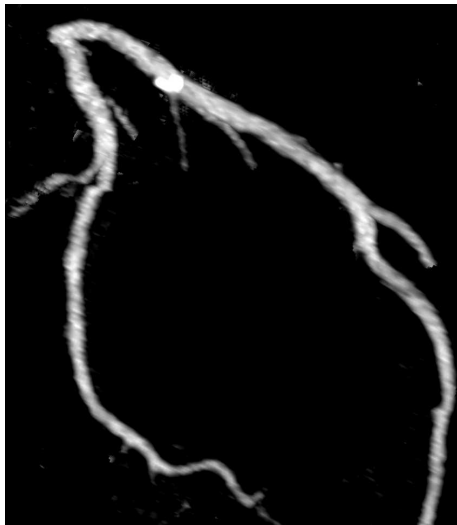
Warszawa, 15 stycznia 2014 r.

WSPÓŁCZESNA EPIDEMIA

Choroby układu krążenia stanowią poważny problem zdrowotny dla społeczeństw krajów rozwiniętych (rys. zestawia odsetek zgonów wg EUROSTAT).



MIAŻDŻYCA NACZYŃ



Jej zasadniczymi cechami są:

- zmiany zwyrodnieniowo-wytwórcze w tunica intima i media;
- obejmuje duże i średnie tętnice sprężyste a także wieńcowe;
- okres utajony jest zawsze bardzo długi, może sięgać nawet kilkudziesięciu lat;

i prowadzi do:

- zwężenie naczynia i utraty cech podatnych;
- okresowych niedostatków w aprowizacji;
- lokalnych stanów zapalnych i wykrzepień.

POWSTAWIANIE PŁYTKI

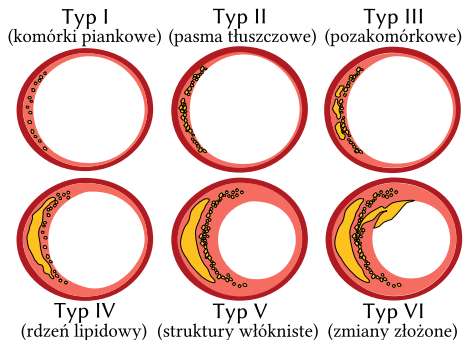


Według aktualnie obowiązującego poglądu przebieg jest następujący:

- nadmierna podaż lipidów prowadzi do zwiększonej dyfuzji biernej między połączeniami komórek endothelium;
- proteoglikany PG posiadają duże powinowactwo i zdolność wiązania tego rodzaju cząstek;
- uwięzione w przestrzeni podśródbłonkowej LDL ulega licznym przemianom lipo- i proteolitycznym;
- w momencie proces utleniania sięgnie składnika proteinowego, zwłaszcza powstanie zdegenerowanej formy apo B-100, rozpoczyna się niekontrolowany wychwyt przez makrofagi;
- proces ten ma charakter ciągły i postępujący.

PROGRESJA ZMIAN

Wg systematyki AHA wyróżnia się sześć stadiów choroby, przy czym występowanie zmian typu I stwierdza się we wczesnym dzieciństwie a typu V i VI w wieku 40...50 lat.

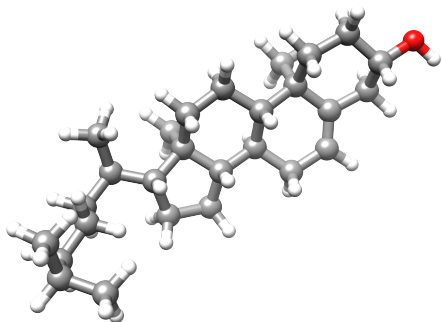


Przez okres kilkudziesięciu lat choroba ma przebieg utajony, następnie ujawnia się gwałtownie¹ w postaci schorzeń:

- naczyńiowo-mózgowych (→ udary),
- niedokrwienych serca (→ zawały),
- naczyń obwodowych (→ wylewy).

¹Bardzo często pierwsze objawy dają przebieg ostry.

CHOLESTEROL



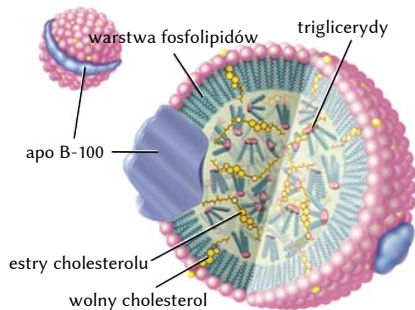
Cholesterol jest molekułą, o dość elementarnej strukturze chemicznej ($C_{27}H_{46}O$), znany biochemikom już od 1769 roku, kiedy [Francois Poulletier de la Salle](#) opisał go po raz pierwszy.

Wbrew potocznemu rozumieniu [cholesterol jest bardzo ważnym substratem biochemiczny dla prawidłowej czynności organizmu](#): stanowi materiał budulcowy błon komórkowych, bierze udział w syntezie witaminy D3, wielu hormonów, jest niezbędny dla utrzymania funkcji układu nerwowego, jak i wiele innych.

LIPOPROTEINY TRANSPORTOWE

Cholesterol jako steroid i lipid ma cechy hydrofobowe - zaś transportowany jest przez krew a więc w środowisku hydrofilowym.

Natomiast problem polega na tym, że to jego lipoproteiny, a zwłaszcza frakcje LDL są łatwo wiązane w przestrzeni podśródbłonkowej.

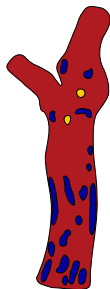


Transformacje oksydacyjne apoprotein prowadzą do niekontrolowanego wchłaniania przez makrofagi i inicjują rozwój płytki miażdżycowej.

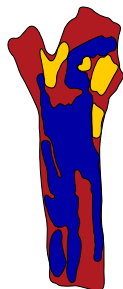
ZOZNISKOWANY PRZEGIEG

Paradoksalnie – choć substrat biochemiczny dostępny jest ogólnoustrojowo, to rozkład ognisk miażdżycowych nigdy nie jest jednorodny (przykład na rysunku²).

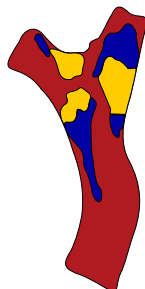
CCA01 (79♂J18)



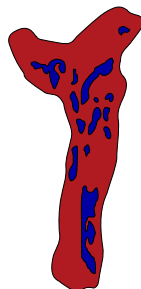
CCA04 (50♂I21)



CCA07 (49♀I21)



CCA15 (80♂J18)



Zmiany typu II  oraz V  wg systematyki AHA

²Wg systematyki ICD: J18 – odoskrzelowe zapalenie płuc, I21 – zawał mięśnia sercowego

NARODZINY KONCEPCJI

1872 Georg Eduard von RINDFLEISCH, niemiecki patolog, prof. Uniwersytetu w Würzburg, w podręczniku "*A Manual of Pathological Histology*" zawarł sugestię, że zmiany patologiczne w ścianie naczyniowej mogą mieć związek z przepływem.



Rindfleisch von G.E. (1872) *A Manual of Pathological Histology. Vol.I To Serve as an Introduction to the Study of Morbid Anatomy*, New Sydenham Society, London

NARODZINY KONCEPCJI

1913, 1933 **Nikołaj Nikołajewicz ANICZKOW**, rosyjski patofizjolog, prof. Uniwersytetu w Leningradzie (równocześnie generał) wysunął hipotezę o hemodynamicznej naturze ateroszy.



Anitschkow N.N., Chalатов S. (1913) *Über experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse*, Zentralbl. Allg. Pathol., Vol.24, 1-9

Anitschkow N. (1913) *Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose*, Beitr. Pathol. Anat., Vol.56, 379-404

NARODZINY KONCEPCJI

Szkic z pracy

Aniczko N.N. (1933) *Experimental arteriosclerosis in animals*. Cowdry E.V. *Arteriosclerosis: A survey of the problem*. New York: MacMillan Publishing, 271-322

pokazujący zaobserwowaną lokalizację małych żółtawych nacieków o kształt trójkątnym lub półksiężycowym położonych poniżej ujścia gałęzi bocznych odcinka piersiowego aorty.



NARODZINY KONCEPCJI

1971 Colin CARO, brytyjski fizjolog, prof. Imperial College of London, formułuje tezę odnośnie roli naprężeń przyściennych wywołanych przepływem.

Caro C.G., Fitz-Gerald J.M., Schroter R.C. (1971) *Atheroma and arterial wall shear observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis*, Proceedings of the Royal Society of London.

Series B, Biological Sciences, Vol.177, No.46, 109-59.



Jak możemy przeczytać w podsumowaniu...

RESUMÉ AND INFERENCES

We have considered aspects of arterial fluid mechanics, describing in particular the distribution of arterial wall shear. We have also examined the localization of early atheroma and have demonstrated that there is a relationship between arterial wall shear and the occurrence of early lesions. Essentially we have shown that naturally occurring (quasi-steady state) lesions are found preferentially (both locally and overall in the arterial system) in regions of low shear, while regions of high shear are spared. We infer from this finding, and consideration of the natural progression of the condition, that a major controlling factor in the rate of development of the early stage of the process is the local wall shear, i.e. that progression is retarded by high shear. We have discussed in some detail a shear dependent mass

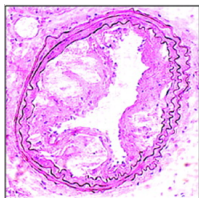
WSPÓŁCZESNY POGLĄD

Panuje względna zgodność, że styczne naprężenia przyścienne (WSS):

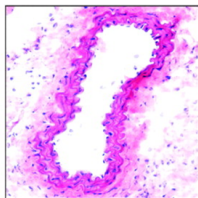
- mniejsze od fizjologicznych, na poziomie do 10 dyn/cm^2 (rzadziej 12 dyn/cm^2);
- okresowo zmieniające swój kierunek o wartości średniej bliskiej zeru;

oddziałują w sposób patogeniczny, stymulując rozwój zmian miażdżycowych w określonej lokalizacji.

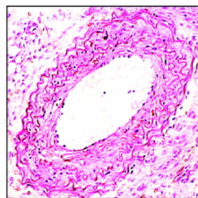
Istnieją po temu dowody eksperymentalne – przykład dotyczący myszy na rysunku.



WSS niskie



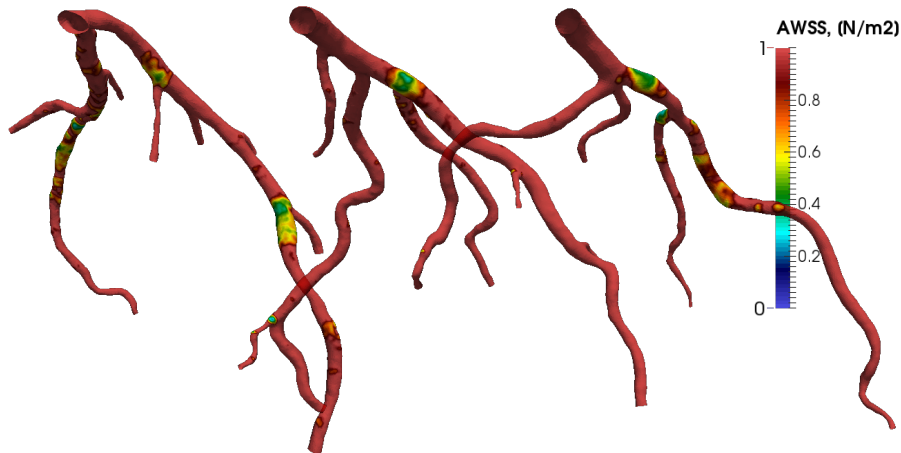
WSS wysokie



WSS oscylacyjne

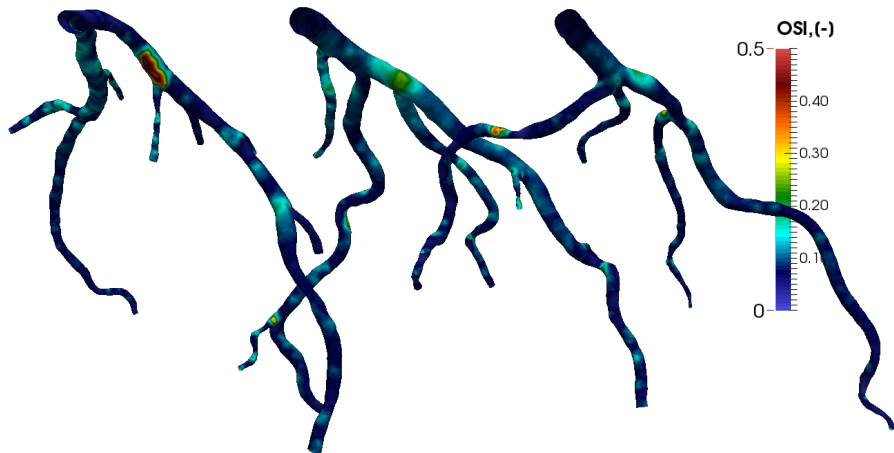
PRÓBY KLINICZNE

Przykładowe wyniki obliczeń rozkładów naprężeń przyściennych **AWSS** (uśrednione w cyklu), dla trzech przypadków.



PRÓBY KLINICZNE

Przykładowe wyniki obliczeń rozkładów wskaźnika oscylacyjności OSI, dla trzech przypadków.



PRÓBY KLINICZNE

Próby weryfikacji przynoszą generalnie dość dobrą, aczkolwiek niepełną, zgodność.

Tabela pokazuje porównania dla tętnic wieńcowych LCA i RCA³.

Parametr	AWSS	WSSG	OSI	RRT
RCA				
S	72 ± 25%	68 ± 36%	60 ± 30%	69 ± 59%
PPV	47 ± 27%	37 ± 23%	68 ± 34%	59 ± 34%
LCA				
S	86 ± 25%	65 ± 37%	67 ± 32%	48 ± 38%
PPV	31 ± 20%	16 ± 12%	35 ± 19%	49 ± 39%

³Obliczono *Sensitivity* (S) jako iloraz poprawnie zidentyfikowanych lokalizacji płytki do ogólnie istniejących oraz *Positive Predictive Value* (PPV) będący ilorazem liczby poprawnie zidentyfikowanych do sumy porwanych i błędnych.

PYTANIE O ZASADĘ

Jeżeli założyć, że to przyścienne naprężenia styczne **WSS** stanowią ten dodatkowy czynnik regulujący czy i kiedy nastąpi rozwój płytki miażdżycowej, to pytanie

W jaki sposób przedstawia się sprzężenie między bodźcem mechanicznym (hemodynamicznym) a efektem biochemicznym ?

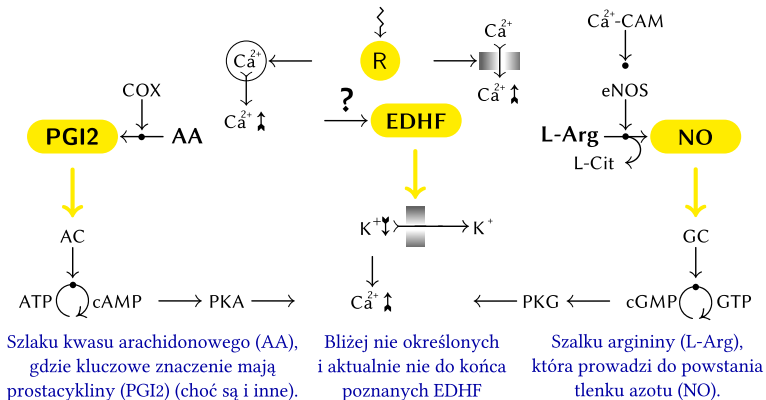
a więc

Jaka jest natura **MECHANOTRANSDUKCJI** tego rodzaju sygnałów ?

SZLAKI WAZODYLATACYJNE

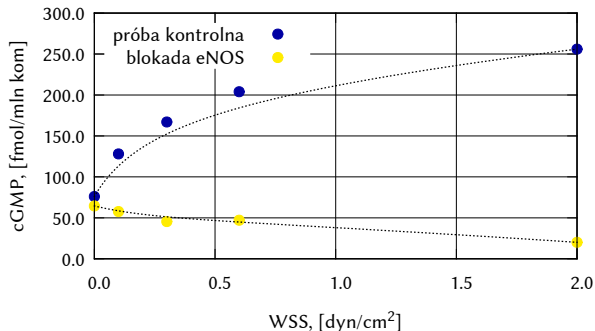
Ogólnie obserwowaną prawidłowością jest fakt, że zanim uda się zaobserwować ślady histologiczne zmian miażdżycowych na poziomie mikroskopowym, poprzedza je zawsze **upośledzenie zdolności naczyniorozkurczowej**.

W przypadku tkanki naczyniowej istnieją trzy potencjalne szlaki wazodylatacyjne.



ZNACZENIE TLENU AZOTU

Wśród bardzo wielu syntetyzowanych związków pierwszoplanowe znaczenie ma tlenek azotu dowody - poniżej zmiany stężenie $cGMP^4$ pod wpływem stymulacji zmiennymi WSS (próbki pobrane z aorty bydlęcej).



Poza tym tlenek azotu działa także:

przeciwzakrzepowo, atyproliferacyjnie, przeciwzapalnie, ...

⁴cGMP jest nukleotydem wywołującym rozkurcz mięśni gładkich.

HIPOTEZA TRANSDUKCJI

Racjonalna wydaje się w takim razie hipoteza robocza...

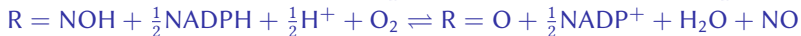
TRANSDUKCJA

bodźca stymulacji przepływem w postaci naprężeń przyściennych (WSS) odbywa się w obrębie kaskady tlenu azotu (NO)

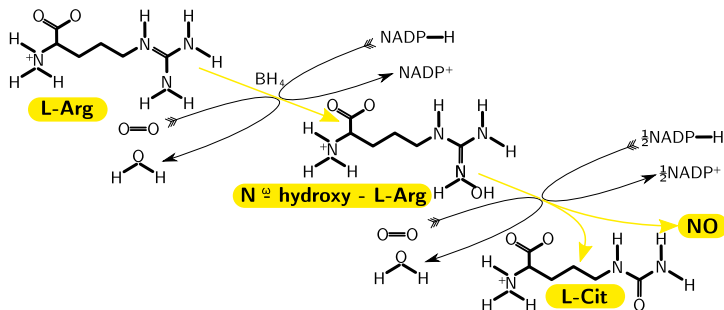


REAKCJA SYNTEZY

Synteza tlenu azotu przebiega w dwóch cyklach monooksydacyjnych:

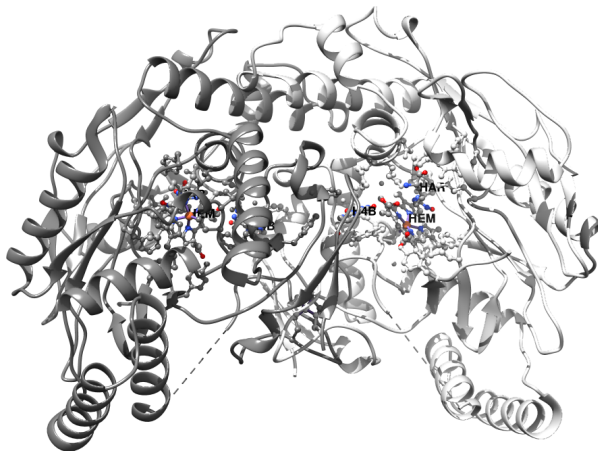


w pierwszym kroku następuje utlenianie argininy L-Arg ($R = NH$) do N^ω -hydroxy-L-Arg ($R = NOH$) będącego produktem przejściowym, utlenianym dalej do cytruliny (L-)Cit ($R = O$) i tlenu azotu NO.



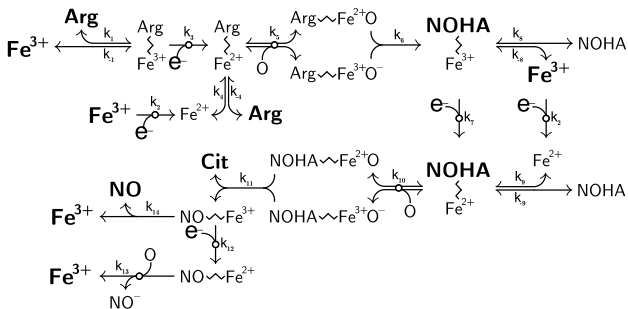
ENZYM SYNTAZY

Całość reakcji, w której **L – Arg** (arginina) utleniana jest w **L – Cit** (cytrulinę), z ubocznym produktem **NO** (tlenek azotu) katalizowana jest przez enzym **eNOS**.



Dyfrakcyjny obraz rentgenograficzny eNOS (rendering własny w POV-Ray).

MODEL SYNTEZY



Mamy tutaj dwie następujące po sobie reakcje redox. Na początku każdej z nich atom żelaza w grupie **HEM** domen oksigenazowych znajduje się na trzecim stopniu utlenienia Fe^{3+} . Stając się akceptorem pojedynczego elektronu ulega redukcji



Dalej wiązany jest tlen cząsteczkowy O_2 i tworzy się przejściowo Fe^{2+}O_2 (lub $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$). W dalszej kolejności tlen, z grupy **HEM**, zostaje przeniesiony na substrat tworząc produkty reakcji (a żelazo powraca na trzeci stopień utlenienia).

MODEL MATEMATYCZNY

Chwilowe stężenie można opisać układem 15 równań różniczkowych.

$$\frac{d[\text{Arg}]}{dt} = k_{-1} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}] + k_{-4} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}] - k_1 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{3+}] - k_4 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{2+}] \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe}^{3+}]}{dt} &= k_{-1} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}] + k_{14} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}] \\ &+ k_{13} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2] + k_8 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}] \\ &- k_1 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{3+}] - k_2 [\text{Fe}^{3+}] - k_{-8} [\text{NOHA}] [\text{Fe}^{3+}] \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe}^{2+}]}{dt} &= k_2 [\text{Fe}^{3+}] + k_{-4} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}] + k_9 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}] \\ &- k_4 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{2+}] - k_9 [\text{NOHA}] [\text{Fe}^{2+}] \end{aligned} \quad (3)$$

$$\frac{d[\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}]}{dt} = k_1 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{3+}] - k_{-1} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}] - k_3 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}] \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}]}{dt} &= k_3 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+}] + k_{-5} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] \\ &+ k_4 [\text{Arg}] [\text{Fe}^{2+}] - k_5 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2] - k_{-4} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}] \end{aligned} \quad (5)$$

MODEL MATEMATYCZNY

$$\frac{d [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-]}{dt} = k_5 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2] \quad (6)$$

$$- k_6 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] - k_{-5} [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-]$$

$$\frac{d [\text{NOHA}]}{dt} = k_8 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}] + k_9 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}] \quad (7)$$

$$- k_{-8} [\text{NOHA}] [\text{Fe}^{3+}] - k_{-9} [\text{NOHA}] [\text{Fe}^{2+}]$$

$$\frac{d [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}]}{dt} = k_6 [\text{Arg} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] + k_{-8} [\text{NOHA}] [\text{FE3}] \quad (8)$$

$$- k_7 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}] - k_8 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}]$$

$$\frac{d [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}]}{dt} = k_7 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+}] + k_{-10} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] \quad (9)$$

$$+ k_{-9} [\text{Fe}^{2+}] [\text{NOHA}] - k_9 [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}]$$

$$- k_{10} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2]$$

MODEL MATEMATYCZNY

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-]}{dt} &= k_{10} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2] \\ &- k_{11} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] - k_{-10} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] \end{aligned} \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{Cit}]}{dt} = k_{11} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] \quad (11)$$

$$\frac{d[\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}]}{dt} = k_{11} [\text{NOHA} \cdot \text{Fe}^{3+} \text{O}_2^-] - k_{14} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}] - k_{12} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}] \quad (12)$$

$$\frac{d[\text{NO} \cdot \text{Fe}^{2+}]}{dt} = k_{12} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}] - k_{13} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2]. \quad (13)$$

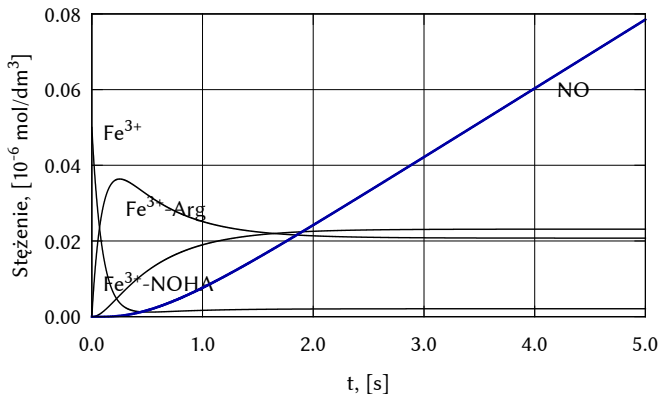
$$\frac{d[\text{NO}]}{dt} = k_{14} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}] \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{NO}_3^-]}{dt} = k_{13} [\text{NO} \cdot \text{Fe}^{2+}] [\text{O}_2] \quad (15)$$

MODEL MATEMATYCZNY

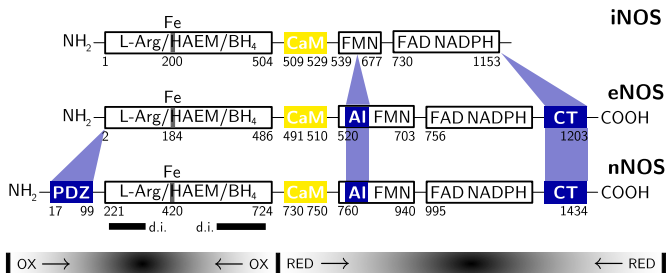
Przykładowe wyniki uzyskane na bazie modelu, dla:

$$[L - Arg] = 100\mu M, [eNOS] = 0.05\mu M \text{ i } [O_2] = 100\mu M.$$



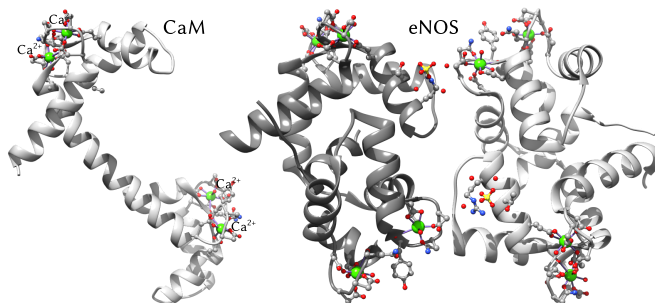
CALCIUM MODULATED PROTEIN

Regulacja całości procesu syntezy możliwa jest wyłącznie poprzez regulację enzymu eNOS, odbywa się za pośrednictwem domeny CaM.



Za jej pośrednictwem wiązane jest białko kalmodulinowe (CALcium MODULated proteIN) a właściwie jony Ca²⁺, gdyż stanowi ono sensor stężenia cytoplazmatycznego tego jonu.

CALCIUM MODULATED PROTEIN



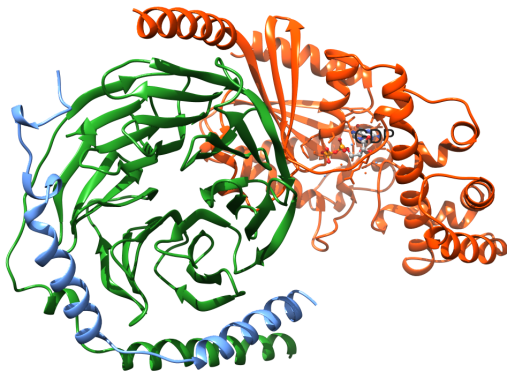
TRANSDUKCJA

bodźca stymulacji przepływem (WSS) realizowana jest na szlaku syntezy tlenku azotu (NO), którego mediatorem są jony wapnia Ca²⁺



RECEPTORY SPRZĘŻONE Z G-PROTEINAMI

Uniwersalnym momentem inicjującym szlak sygnalizacji w komórkach ludzkich, dla którego przekaźnikiem wtórnym jest Ca^{2+} , stanowi związanie liganda przez receptor błonowy sprzężony z G-proteinami (GPCRs).



Jest to najbardziej typowy naturalny szlak sygnalizacyjny – korzystają z niego:

drobnoustroje jak przecinkowiec cholery

leki przykładowo Prozac, Claritine, Loratidine

toksyny w tym marihuana, heroina, kokaina

RECEPTORY SPRZĘŻONE Z G-PROTEINAMI

O znaczeniu jakie przywiązuje się do zrozumienia roli **GPCRs** świadczyć może przyznana nagroda Nobla.



Nobel Prize 2012 Robert J. Lefkowitz Brian K. Kobilka
for studies of G-protein-coupled receptors

SYGNALIZACJA GPCRs

Stężenie cytoplazmatyczne jonów Ca^{2+} jako sygnału sterującego stanowi wypadkową bilansów i czynności następujących indywidualnie:

IP₃ czyli trifosforan inozytoli jako produkt hydrolizy bifosforanu fosfatydyloinozytoli **PIP₂**, który w wyniku stymulacji receptorów błonowych **GPCRs**, stanowi ogniwo inicjujące kaskadę poprzez otwarcie receptorów **IP₃R** retikulum endoplazmatycznego;

SERCA/PMCA stanowiąc dwie pompy jonowe, czerpiące energię z hydrolizy **ATP** do **ADP** katalizowanej enzymem **ATPaz**, aktywnie usuwające Ca^{2+} z cytoplazmy do retikulum i na zewnątrz komórki;

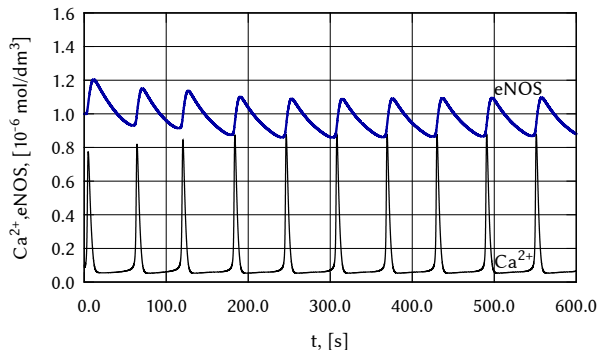
CCE czyli mechanizm *Capacitative Calcium Entry* uzupełnia zasoby wewnątrzkomórkowe, dzięki otwarciu kanałów jonowych w błonie cytoplazmatycznej i napływowi zgodnie z gradientem stężenia;

mCU, mCA czyli mitochondrialnego uniportera zalanego energią hydrolizy **ATP** i antyporterów $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$;

bufor jaki tworzą proteiny cytoplazmy wiąże 99% wolnych jonów wapniowych.

SYGNALIZACJA GPCRs

Przygotowano kompletny model matematyczny dla sygnalizacji przez Ca^{2+} jako wtórny przekaźnik na szlaku GPCRs.



Zauważmy, że brak zgodności skal czasowych w relacji do hemodynamiki a nadto wpływu WSS na aktywność receptorów sprzężonych z G-proteinami – zatem

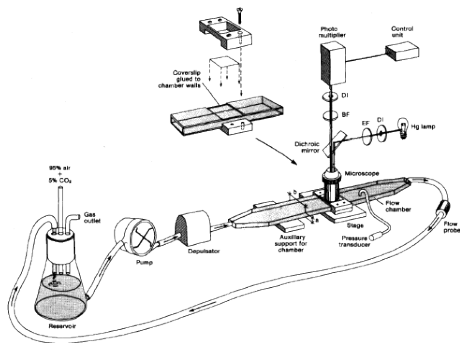
musi istnieć odrębny szlak sygnalizacyjny przez jony Ca^{2+} niezależny od sprzężonego z białkami G.

BADANIA J.ANDO

W kwietniu 1988 r. ukazał się kilkustronicowy artykuł sygnowany przez Joji Ando.

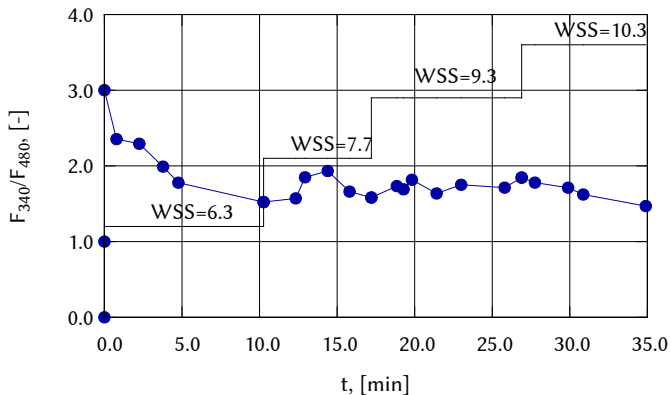
Jego autorzy podjęli następujący problem – cytując wg oryginału...

Because Ca^{2+} is a major component of the internal signaling system of the cell, mediating a wide variety of stimuli to the internal organelles, we examined the response of Ca^{2+} to fluid shear stress applied to cultured endothelial cell monolayers.



BADANIA J.ANDO

Rezultaty oceny wpływu zmiennych WSS na stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie pokazują rysunek.

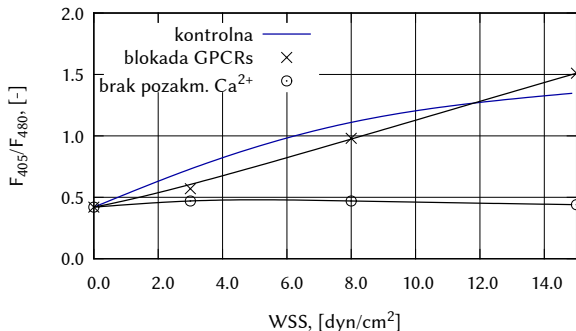


⁵Metodą fotometryczną mierzono fluorescencję dla światła o długości fali $\lambda = 340$ i $\lambda = 380$ nanometra.

POCHODZENIE Ca^{2+}

Skoro zmiany WSS powoduje gwałtowny wzrost stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} , to jeżeli pochodzenie Ca^{2+} jest:

- intra** powinien istnieć (jakiś ?) związek sygnalizacji GPCRs ze zmiennymi naprężeniami WSS;
- extra** napływ musi odbywać się przez (jakiś ?) kanał jonowy Ca^{2+} , zmieniającą swą czynność pod wpływem WSS.



Zatem stymulacja zmianami WSS wywołuje napływ Ca^{2+} z przestrzeni pozakomórkowej (poprzez kanał jonowy ?)

PURINERIC NERVES

Wyjaśnienie natury tego osobliwego szlaku sygnalizacyjnego Ca^{2+} tkwi w odkryciu Geoffrey'a BURNSTOCKa. W prowadzonych pod koniec lat 60-tych XX wieku badaniach zaobserwował występowanie zaskakującego efektu wazodylatacyjnego komórek mięśni gładkich (okrężnicy świnki morskiej) - mimo, że podał środek stymulujący skurcz.



Dopiero lektura pracy Drury i Szent-Györgyi z 1929 nasunęła mu przypuszczenie, że jest to efekt działania ATP na pewną specyficzną grupę receptorów.

...So we tried ATP and to our surprise it satisfied all the criteria needed...

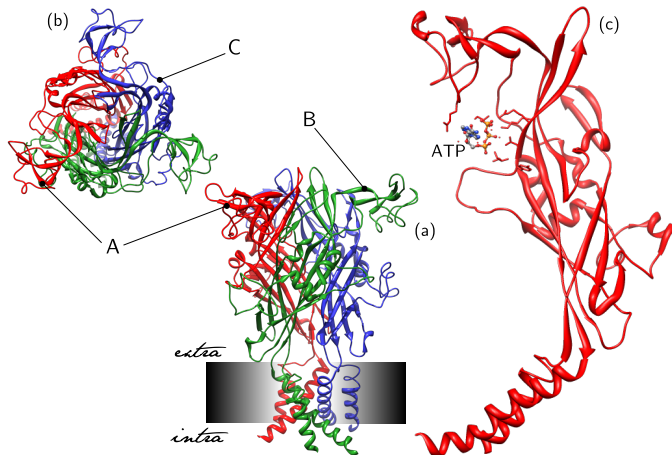
1972 hipoteza purineric nerves

1978 hipoteza o istnieniu specyficznych receptorów purynowych

1985 identyfikacja receptora P2X

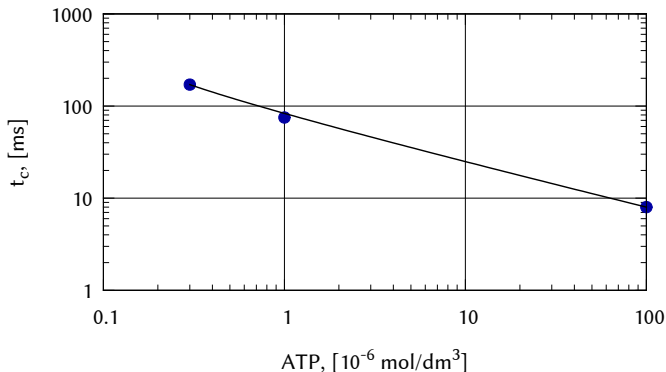
RECEPTORY P2X

Receptory P2X stanowią kanały jonowe Na^+ , K^+ a głównie Ca^{2+} bramkowane ligandem (ATP i tylko nim).



RECEPTORY P2X

O ile strumień Ca^{2+} płynący w wyniku aktywacji GPCRs jest rzędu $2.5\mu\text{M/s}$, to generowany przez P2X rzędu $138.0\mu\text{M/s}$. Równocześnie receptory te realizują najszybszy ze znanych szlaków transdukcji sygnału z otoczeni do wnętrza komórki.



STRUMIEŃ JONÓW

TRANSDUKCJA

bodźca stymulacji przepływem (WSS) realizowana jest na szlaku syntezy tlenku azotu (NO), którego mediatorem są jony wapnia Ca^{2+}



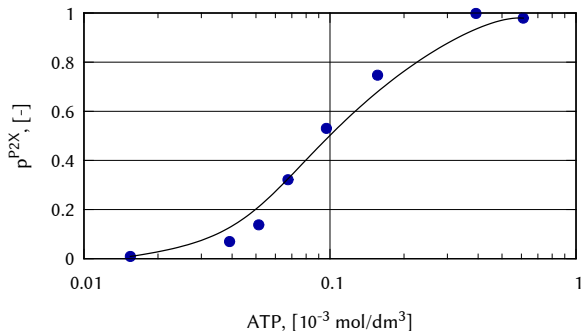
a jony Ca^{2+} są pochodzenia pozakomórkowego, napływając zgodnie z gradientem stężeń w wyniku otwarcia kanału P2X bramkowanego ATP.

Jako model dla strumienia jonów napływających do komórki endothelium przyjęto

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]}{dt} = v_{\max}^{\text{P2X}} p^{\text{P2X}} \Delta[\text{Ca}^{2+}], \quad (16)$$

PRAWDOPODOBIEŃSTWO OTWARCIA

Badania eksperymentalne kinetyki receptora P2X dowodzą, że prawdopodobieństwo jego otwarcia ma typową, sigmoidalną postać.



W opisie przyjęto model kooperatywny Hilla

$$p^{P2X} = \frac{[ATP]^n}{K_{P2X}^n + [ATP]^n} \quad (17)$$

POCHODZENIE ATP

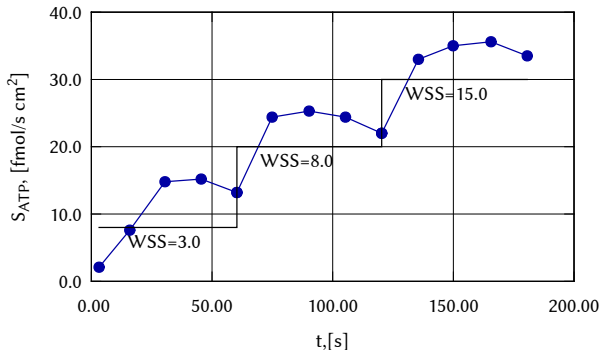
Aby postulowany szlak sygnalizacyjny mógł być skutecznie realizowany musiałyby istnieć organellum, które pod wpływem stymulacji **WSS** wydziela odpowiednio duże ilości **ATP**. Ostatecznego wyjaśnienia dostarczył Phillipe Bodin w pracy

Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular.



REGULACJA WYDZIELANIA ATP

O ile dane eksperymentalne odnośnie badań kinetyki receptorów **P2X** są bardzo ubogie, to są już dostępne.



Zgodnie z tymi wynikami przyjęto związek modelowy postaci

$$S_{ATP} = S_0(WSS) + \Delta S(WSS) f(p_1(t), p_2(t)). \quad (18)$$

REGULACJA WYDZIELANIA ATP

Założono, że gęstość strumienia będzie warunkowana prawdopodobieństwem:

- $p_1(t)$ otwarcia ścieżek uwalniania ATP, przy czym ewidentnie obserwuje się tutaj pewną inercję, zatem wypada zakładać, że również i prędkość zmiany będzie zależeć od wymuszenia

$$\tau_1 \frac{dp_1(t)}{dt} + p_1(t) = k_1 x(t), \quad (19)$$

przy czym w chwili początkowej jest bliskie zero, czyli $p_1(0) = 0$;

- $p_2(t)$ odnoszącym się do desensytyzacji, w przypadku której również mamy do czynienia z inercją odpowiedzi, jednak nie wobec samego bodźca ale zmiany w czasie

$$\tau_2' \frac{dp_2(t)}{dt} + p_2(t) = \tau_2'' \frac{d}{dt} (k_2 x(t)) \quad (20)$$

a ponieważ nie występuje ona w chwili początkowej to $p_2(0) = 1$.

W obu tych równaniach wprowadzono stałe czasowe τ_1 , τ_2' i τ_2'' oraz współczynniki wzmocnienia k_1 i k_2 .

REGULACJA WYDZIELANIA ATP

Rozwiązując postulowany układ równań uzyskujemy związek modelowy

$$\mathcal{S}_{\text{ATP}} = \mathcal{S}_0(\text{WSS}) + \Delta\mathcal{S}(\text{WSS}) k_{\tau} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) e^{-\frac{t}{\tau_2}}. \quad (21)$$

Wartość $\mathcal{S}_0(\text{WSS})$ obliczono, korzystając z faktu że

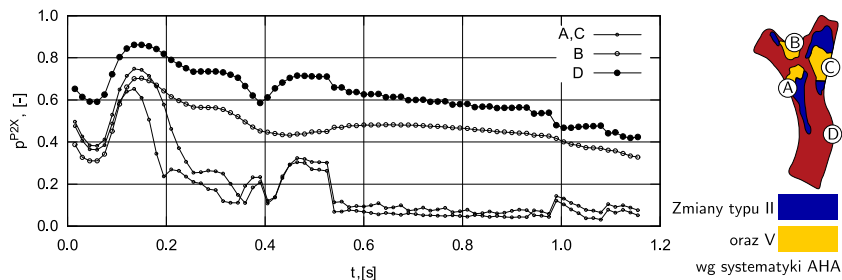
$$\mathcal{S}_0 = \mathcal{S}_{\text{max}} - \Delta\mathcal{S}, \quad (22)$$

a jeżeli o maksimach $\mathcal{S}_{\text{max}}(\text{WSS})$ decydować będzie faza otwierania receptora a nie desensytyzacji, to opisująca je relacja powinna mieć strukturę

$$\mathcal{S}_{\text{max}}(\text{WSS}) = 100.0 \left(1 - e^{-\text{WSS}/\text{WSS}_0}\right). \quad (23)$$

AKTYWNOŚĆ P2X A MIAŻDŻYCA

Rysunek przedstawia rozkłady p^{P2X} dla uzyskanych ze wcześniejszych obliczeń rozkładów WSS.



Najsilniej rozwinięte i najbardziej rozległe złogi umiejscowione są w rejonach oznaczonych jako **A** i **C**, nieco mniejsze jako **B**, natomiast całkowicie brak ich w rejonie **D**. W kontekście wyników obliczeń, w regionie **A** i **C** poziom aktywacji receptorów **P2X** był skrajnie niski. Prowadziło to do silnego upośledzenia zdolności wydzielniczej komórek śródbłonna, a stan ten utrzymywał się od chwili narodzin.

SPOSTRZEŻENIA

Ewidentnie – miażdżyca, i powiązane z nią patologie krążeniowe, stanowią poważny problem dla zdrowotności społeczeństw krajów rozwiniętych...

w krajach UE, prawie co drugi zgon ma swe podłoże w patologiach miażdżycowych

Zwyczajowo powstawanie i rozwój zmian miażdżycowych wiąże się zwyczajowo z niewłaściwą dietą, zaburzeniami metabolizmu lipidów, bowiem w sensie biochemicznych objawia się degradacją lipoprotein transportowych.

W świetle aktualnej wiedzy

węzłowym problemem dla zrozumienia natury i skutecznej terapii,
jest wyjaśnienie przyczyn wyraźnie zogniskowanego przebiegu choroby.

a wszelkie strategie koncentrujące się i ograniczające do substratu biochemicznego nie wydają się uzasadnione.

MECHANOTRANSDUKCJA

Jest bardzo prawdopodobne, że to

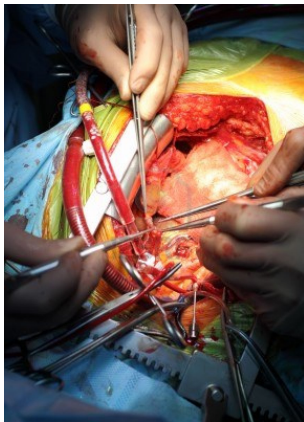
sposób ewolucji przyływu w obszarze przyściennym może wywoływać dysfunkcyjność śródbłonna naczyniowego, stając się bezpośrednią przyczyną powstawania ognisk miażdżycowych, a w dalszej kolejności stymulując ich rozwój.

Postulowany scenariusz zdarzeń...

- WSS** wywołane przepływem stymulują akcję wydzielniczą **ATP** endothelium
- ATP** w pętli zwrotnej sygnalizacji autokrynalnej, stanowi ligand receptorów błonowych endothelium
- P2X4** jest głównym receptorem aktywnymi w transdukcji zwrotnego sygnału **ATP**, występują w ilości około 20-krotnie większej niż **GPCR**
- 1000x** większe stężenie **Ca²⁺** w przestrzeni ekstracellularnej, powoduje gwałtowny ich napływ na skutek otwarcia kanałów jonowych sterowanych przez **P2X**.

LECZENIE NASTĘPSTW

Leczenie zachowawcze postępujących zmian miażdżycowych z wiekiem staje się co raz mniej skuteczne i wymagane jest nierzadko podjęcie interwencji chirurgicznych.



Warunkiem powodzenia tych działań jest możliwie precyzyjna ocena stopnia istotności hemodynamicznej zmian miażdżycowych.

Jak do tej pory

nie istnieje metoda diagnostyczna
dająca możliwość oceny
stopnia istotności i prawdopodobnej progresji.

Perspektywicznie wartościową propozycją w tym zakresie mogą okazać się zastosowania metod obliczeniowych biomechaniki.