

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXIX
2009
SUPPLEMENT 3**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Cecylia Tukaj

**Strukturalne i fizjologiczne skutki oddziaływania
aktywnego metabolitu witaminy D₃ -
[1 α ,25(OH)₂D₃]
na komórki mięśniowe aorty szczura
w warunkach *in vitro***

*Structural and physiological effects
of an active vitamin D₃ metabolite
– 1 α ,25(OH)₂D₃
on smooth muscle cells from rats aorta in vitro*

Rozprawa habilitacyjna

Zakład Mikroskopii Elektronowej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: dr hab. n. med. Jolanta Kubasik, prof. nadzw.

GDAŃSK 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1,80-211 Gdańsk
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

*Wyrażam serdeczne podziękowanie
Pani Profesor Teresie Zawrockiej-Wrzółkowej
za wskazanie kierunku i zachętę do badań
oraz za przekazane doświadczenie i wiedzę
w ważnym dla mnie
momencie rozwoju zawodowego.*

Spis treści

1. WSTĘP	11
1.1. KOMÓRKI MIĘŚNIOWE NACZYŃ	12
1.1.1. Morfologia i modulacja fenotypowa	12
1.1.2. Pochodzenie	14
1.1.3. Istota międzykomórkowa	14
1.2. MIAŻDŻYCA.....	15
1.2.1. Poglądy na patogenezę miażdżycy.....	15
1.2.2. Znaczenie SMC w powstawaniu zmian miażdżycowych.....	16
1.2.2.1. Inicjacja procesu miażdżycowego	16
1.2.2.2. Wczesne zmiany miażdżycowe	19
1.2.2.3. Niestabilna blaszka miażdżycowa.....	20
1.2.2.4. Proces naprawczy.....	21
1.2.2.5. Komplikacja zmian miażdżycowych.....	22
1.3. WITAMINA D	23
1.3.1. Historia badań	23
1.3.2. Metabolizm witaminy D	24
1.3.3. Mechanizm działania $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	27
1.3.3.1. Działanie genomowe.....	27
1.3.3.2. Działanie niegenomowe.....	28
1.3.4. Źródła witaminy D w organizmie	30
1.3.4.1. Egzogenne źródło	30
1.3.4.2. Endogenne źródło	30
1.3.4.3. Ograniczenia syntezy witaminy D.....	32
1.3.4.4. Zapotrzebowanie na witaminę D	32
1.3.5. Przyczyny niedoboru witaminy D.....	32
1.3.6. Plejotropowy efekt działania witaminy D i skutki jej niedoboru	33
1.3.7. Witamina D a choroby układu sercowo naczyniowego	35
2. CEL PODJĘTYCH BADAŃ.....	36
3. MATERIAŁ I METODY	38
3.1. MATERIAŁ	38
3.1.1. Izolacja SMC	38
3.1.2. Hodowla komórkowa	38
3.2. METODY MIKROSKOPOWE.....	39
3.2.1. Mikroskopia świetlna	39
3.2.1.1. Badania przyżyciowe.....	39
3.2.1.2. Preparatyka histologiczna	39
3.2.2. Immunofluorescencja.....	39
3.2.3. Mikroskopia elektronowa transmisyjna (TEM)	41
3.2.4. Mikroskopia elektronowa skaningowa (SEM).....	41
3.3. CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA	42
3.3.1. Dynamika podziałów komórkowych.....	42
3.3.2. Cykl komórkowy.....	42
3.3.3. Ocena apoptozy i nekrozy	43
3.3.4. Analiza poziomu beta-1 integryny	43
3.3.5. Analiza wydzielania cytokin zapalnych	44
3.4. METODY ANALITYCZNE	44
3.4.1. Chromatograficzna analiza (HPLC) zawartości adenylianów	44

3.4.2. Oznaczanie zawartości białka metodą Bradford	44
3.5. OCENA PROLIFERACJI Z ZASTOSOWANIEM [³ H]-TYMIDYNY	45
3.6. OCENA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	45
4. WYNIKI	46
4.1. OCENA MORFOLOGICZNA KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH W HODOWLI.....	46
4.1.1. Subpopulacje komórek mięśniowych.....	46
4.1.1.1. Fenotyp „synthetic”	46
4.1.1.2. Fenotyp „contractile”	49
4.1.1.3. Fenotyp „intermediate”.....	52
4.2. ZMIANY MORFOLOGII SMC POD WPŁYWEM 1 α ,25(OH) ₂ D ₃	54
4.2.1. Modyfikacja charakteru wzrostu	54
4.2.2. Wpływ na modulację fenotypową.....	58
4.3. WPŁYW 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ NA PROCESY WZROSTOWE KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH.....	62
4.3.1. Ocena mikroskopowa intensywności podziałów komórkowych.....	62
4.3.2. Proliferacja.....	65
4.3.2.1. Liczebność komórek.....	65
4.3.2.2. Analiza inkorporowania [³ H]-tymidyny	66
4.3.2.3. Dynamika podziałów komórkowych	67
4.3.2.4. Cykl komórkowy	68
4.3.3. Synteza białka	69
4.3.4. Status energetyczny.....	70
4.4. WPŁYW 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ NA ŻYWIENIE I ŻYWIENNOŚĆ KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH W HODOWLI.....	72
4.4.1. Ocena morfologiczna	72
4.4.2. Analiza cytometryczna (AnV/Pi).....	80
4.5. WPŁYW 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ NA MIGRACJĘ KOMÓREK MIĘŚNIOWYCH	82
4.5.1. Analiza mikroskopowa.....	82
4.5.2. Analiza cytometryczna ekspresji cząstek adhezyjnych	87
4.6. WPŁYW 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ NA ECM	88
4.6.1. Zaburzenia w formowaniu włókien elastycznych	88
4.6.2. Wapnienie	96
4.7. WPŁYW 1 α ,25(OH) ₂ D ₃ NA WYDZIELANIE CYTOKIN ZAPALNYCH	97
5. DYSKUSJA	99
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	110
7. STRESZCZENIE	111
8. SUMMARY	114
9. PIŚMIENNICTWO	117

Wykaz ważnych skrótów stosowanych w pracy

Ac	- komórka apoptotyczna (<i>apoptotic cell</i>)
BM	- błona podstawna (<i>basement membrane</i>)
CVD	- choroby układu sercowo-naczyniowego (<i>cardiovascular diseases</i>)
DBP	- białko wiążące witaminę D (<i>vitamin D binding protein</i>)
DAPI	- barwnik fluorescencyjny (<i>tiamino-2-fenylindol</i>)
DB	- ciała gęste (<i>dense bodies</i>)
EC	- komórka śródbłonna (<i>endothelial cell</i>)
ECM	- istota międzykomórkowa (<i>extracellular matrix</i>)
FBS	- surowica płodowa (<i>fetal bovine serum</i>)
FITC	- fitocyjanina
Fc	- czapeczka włóknista (<i>fibrous cap</i>)
Fo	- komórka piankowata (<i>foam cell</i>)
FM	- mikroskop fluorescencyjny (<i>fluorescence microscope</i>)
GA	- struktura Golgiego (<i>Golgi apparatus</i>)
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IL	- interleukina
IFN	- interferon
LM	- mikroskop świetlny (<i>light microscope</i>)
Ma	- makrofag
MMP	- metaloproteinazy (<i>matrix metalloproteinases</i>)
MEM	- pożywka hodowlana (<i>minimal essential medium</i>)
MF	- miofilamenty
PBS	- bufor fosforanowy (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PI	- jodek propidyny (<i>propidium iodide</i>)
PS	- fosfatydyloseryna
RER	- siateczka endoplazmatyczna szorstka (<i>rough endoplasmic reticulum</i>)
SEM	- mikroskop elektronowy skaningowy (<i>scanning electron microscope</i>)
SM α -aktyna	- aktyna (<i>smooth muscle α-actin</i>)
SMC	- komórka mięśniówki gładkiej (<i>smooth muscle cell</i>)
TEM	- mikroskop elektronowy transmisyjny (<i>transmission electron microscope</i>)
TNF	- czynnik martwicy nowotworu (<i>tumor necrosis factor</i>)
VCAM	- cząstki adhezyjne komórek mięśniowych (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VDR	- receptor witaminy D (<i>vitamin D receptor</i>)

Rozprawa habilitacyjna jest kontynuacją badań, które zostały opublikowane w wykazanych poniżej pracach i zawiera ich niektóre częściowe elementy.

1. Tukaj C., Kubasik- Juraniec J., Kraszpulski M.: Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med. Sci. Monit.* 2000, 6, 668-674.
2. Tukaj C., Bohdanowicz J., Kubasik-Juraniec J.: Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on cytoskeleton organisation of aortal smooth muscle cells in primary culture. In: Norman A. W. (ed): *Vitamin D Endocrine System: structural, biological, genetic and clinical aspects.* Riverside (Calif) 2000, 431-434.
3. Tukaj C, Bohdanowicz J, Kubasik-Juraniec J.: A scanning electron microscopic study of phenotypic plasticity and surface structural changes of aortal smooth muscle cells in primary culture. *Folia Morph.* 2002, 61, 191-298.
4. Tukaj C., Trzonkowski P., Kubasik Juraniec J., Myśliwski A.: Quantifying division of aortal smooth muscle cell in culture stimulated by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007, 103, 525-528.
5. Tukaj C.: Enhanced proliferation of aortal smooth muscle cells treated by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vitro coincides with impaired formation of elastic fibers. *Int. J. Exp. Path.* 2008, 89, 117-124.
6. Tukaj C.: Adequate level of vitamin D is essential for the maintenance of good health. *PHMD.* 2008, 62, 502-510.
7. Tukaj C. Role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Post. N. Med.* W druku

1. WSTĘP

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD – *cardiovascular diseases*), a wśród nich miażdżycza i jej powikłania, są główną przyczyną śmierci w społeczeństwach o wysokim stopniu rozwoju ekonomicznego [89, 102, 112, 147, 150, 241, 288, 300, 319].

Chociaż do tej pory przedstawiano liczne hipotezy na temat etiologii i patogenezы miażdżycy, oraz proponowano nowatorskie strategie terapeutyczne i sposoby prewencji, to nadal pozostajemy bezsilni wobec skutków tej choroby.

Komórki mięśniowe (SMC – *smooth muscle cells*) są dominującym składnikiem ściany naczynia tętniczego. Podstawową funkcją SMC jest kurczliwość, która pozwala zachować odpowiednie napięcie naczynia (tonus) i stwarza warunki dla prawidłowego przepływu krwi [240, 244, 251]. Niezwyčajną cechą komórek mięśniowych naczyń jest ich duża plastyczność, która manifestuje się zmiennością fenotypową zarówno w różnych fazach rozwoju osobniczego jak i w odpowiedzi na lokalne zmiany w otaczającym środowisku [14, 65, 82, 131]. Takim szczególnym środowiskiem (*milieu*) dla SMC jest ściana naczynia krwionośnego, w którym toczy się proces miażdżycowy, a one same podlegają skomplikowanym interakcjom typu komórka–komórka i komórka–ECM (*extracellular matrix*) [5, 26, 33, 45, 176, 195, 196, 197, 227, 238, 261]. Zaawansowane badania z zastosowaniem metod biologii molekularnej pozwoliły jedynie w części poznać oddziaływanie czynników wzrostu, cytokin i hormonów, które mogą powodować aktywację SMC, zmianę ich fenotypu i funkcji [56, 65, 228].

Wśród wielu różnych związków, uczestniczących w rozwoju procesu miażdżycowego na uwagę niewątpliwie zasługuje witamina D, a precyzyjniej jej aktywny metabolit – $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kalcytriol). Dobrze rozpoznana została podstawowa funkcja tego hormonu witaminowego w organizmie człowieka polegająca na regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz modelowaniu i mineralizacji kości [50, 109, 110, 160, 161, 194]. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spełnia tę ważną biologicznie rolę oddziałyując poprzez receptory (VDR – *Vitamin D Receptor*) na nabłonek jelita, nabłonek kanalików nerkowych oraz komórki tkanki kostnej [94, 95, 219, 234]. Obecnie wiadomo, że receptory witaminy D obecne są w znakomitej większości tkanek i komórek ludzkiego ciała, a różne aspekty jej działania zaobserwowano u przynajmniej 36 różnych typów komórek [123, 193, 221, 232, 264]. Bezpośrednio lub pośrednio, $1\alpha,25$ -dihydroxywitamina D wpływa na ekspresję ponad 200 genów, których produkty regulują między innymi proliferację komórek, różnicowanie, apoptozę i angiogenezę [37, 53, 57, 68, 69, 76, 159].

Odkrycie zaś mitochondrialnej 1α -hydroksylazy w różnych tkankach ludzkiego organizmu, także w SMC, nadało badaniom nad witaminą D nowy kierunek i intensywność [110, 123, 154, 162, 203, 258]. Wiadomo też, że pozanerkowo, lokalnie syntetyzowana $1\alpha,25$ -dihydroksywitamina D_3 reguluje na drodze

auto- i parakryinii ważne funkcje około 10 różnych komórek ludzkiego ciała [112, 162, 215, 258, 316].

Istnieje bogate piśmiennictwo dokumentujące fakt, iż niedobór witaminy D poważnie narusza równowagę fizjologiczną organizmu i zwiększa ryzyko wystąpienia przewlekłych schorzeń o odmiennej etiologii [4, 6, 36, 37, 57, 68, 76, 107, 108, 114, 143, 159, 187, 319]. Szeroko zaś zakrojone badania epidemiologiczne wskazują na wyraźną zależność między częstotliwością występowania CVD a niedoborem witaminy D [150, 181, 182, 318].

Od czasu, gdy w 1987 roku komórki mięśniowe naczyń zostały zaliczone do grupy komórek docelowych (*target cells*) dla kalcytriolu, istnieją przesłanki ku temu, aby sądzić, że $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wpływając na morfologię i funkcje tych komórek spełnia ważną rolę w procesie powstawania zmian miażdżycowych [9, 35, 115, 137, 174, 180, 184, 186, 205, 232, 279, 283, 284, 285, 308]. I mimo tego, że szczegółowe wyniki badań niejednokrotnie różnią się między sobą, to coraz częściej podkreśla się protekcyjne lub wręcz dobroczynne działanie aktywnego metabolitu witaminy D w różnych stadiach rozwoju miażdżycy. [204, 205, 223, 250, 317, 320].

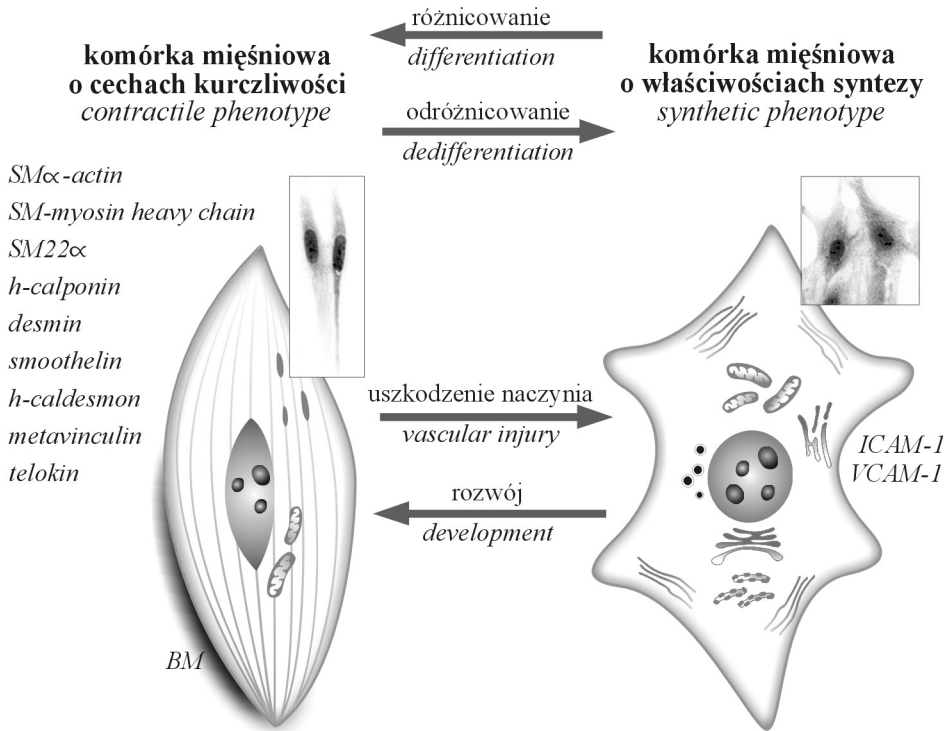
1.1. Komórki mięśniowe naczyń

1.1.1. Morfologia i modulacja fenotypowa

W ścianie naczyń u osobników dorosłych, zróżnicowane komórki mięśniowe posiadają fenotyp o cechach kurczliwości *contractile*. Na terenie cytoplazmy tych komórek dominują włókienka kurczliwe o równoległym przebiegu, zorientowane wzdłuż długiej osi komórki oraz ciała gęste (Db – *dens bodies*). Ekspresja unikalnego zestawu białek kurczliwych i cząstek sygnałowych umożliwia komórkom mięśniowym wypełnianie ich podstawowej funkcji, jednocześnie zapewnia bardzo niski potencjał proliferacyjny i niewielką aktywność syntetyczną (*quiescent*) [93, 197, 270, 273, 300].

Zidentyfikowano liczne geny oraz produkty ich ekspresji będące użytecznymi markerami służącymi ocenie poziomu zróżnicowania SMC. Takimi markerami są w szczególności izoformy białek budujących aparat kurczliwy komórek mięśniowych: *SM- α -actin*, *SM-myosin heavy chain*, *SM22 α* , *h-calponin*, *desmin*, *smoothelin*, *h-caldesmon*, *metavinculin* i *telokin* [252, 255, 257, 259, 270, 279].

Oprócz wymienionych białek budujących aparat kurczliwy inną ważną cechą komórki mięśniowej naczynia krwionośnego jest zlokalizowana na jej powierzchni błona podstawna (BM – *basement membrane*). Składnikami BM są głównie lamina, i kolagen typu IV, ale także siarczan heparanu, entaktyna i perlekan [100, 272]. Błona podstawna odgrywa istotną rolę w ochronie SMC przed odróżnicowaniem i w związku z tym uznawana jest za negatywny regulator wzrostu tych komórek.



Ryc. 1. Schemat obrazujący przebieg modulacji fenotypowej komórek mięśniówki gładkiej naczyń.

Fig. 1. Scheme showing pathways of vascular smooth muscle cells phenotype modulation.

SMC ściany naczyń krwionośnego w przeciwieństwie do włókien mięśni szkieletowych i komórek mięśnia sercowego nie są terminalnie zróżnicowane, i dlatego w określonych sytuacjach mogą ulegać modulacji fenotypowej (*phenotype switching*) [135]. Sprzyjające okoliczności ku temu istnieją w warunkach patologicznych oraz w warunkach *in vitro*. W odpowiedzi na lokalne zmiany w otaczającym środowisku, komórki mięśniowe odróżnicowują się, a prezentowany fenotyp określany jest mianem *synthetic* [3, 13, 26, 32, 33, 56, 65, 141, 233, 240]. Na poziomie ultrastruktury komórki te cechuje bogato rozbudowana siateczka endoplazmatyczna szorstka, duża liczba profili mitochondrialnych, rozbudowane struktury Golgiego oraz wolne rybosomy. Nieliczne miofilamenty są zlokalizowane pod plazmalemą wzdłuż długiej osi komórki [244, 259, 270, 274, 279].

Fenotyp o analogicznych cechach posiadają także SMC we wczesnej fazie rozwoju embrionalnego osobnika. Wówczas cechuje je wysoki wskaźnik proliferacyjny i wzmożone tempo syntezy [128, 135].

Proces modulacji fenotypowej wiążący się ze wzmożoną proliferacją SMC, migracją i syntezą elementów istoty międzykomórkowej przy wydatnym spadku ekspresji genów markerowych, uznawany jest za kluczowy w patogenezie procesu miażdżycowego [3, 58, 101, 102, 208, 246, 248].

1.1.2. Pochodzenie

Zdecydowana większość SMC budujących ścianę naczynia krwionośnego wywodzi się z lokalnego źródła mezodermu (*mesenchymal vascular smooth muscle cells*). Dowiodły tego szczegółowe badania przeprowadzone na wczesnych zarodkach kręgowców, z których wynika ponadto, iż pochodzenie mięśniówki gładkiej naczyń jest bardziej niejednorodne niż powszechnie sądzono. Naczynia głowy i szyi zawierają bowiem frakcję komórek mięśniowych pochodzącą z grzebieni nerwowych (NCC – *neural crest cells*), a komórki mięśniowe naczyń wieńcowych wywodzą się z *proepicardium*. Wykazano ponadto, że cyrkulujące komórki pnia (*stem cells*), których źródłem jest szpik kostny, mogą także różnicować się do SMC [104, 314]. Tak odmienne pochodzenie komórek mięśniowych uzasadnia różnice występujące w budowie naczyń jak również różnice dotyczące ich fizjologii oraz potencjalnych schorzeń [77].

W latach 60. ubiegłego stulecia Benditt przedstawił oryginalną koncepcję, według której populacja komórek mięśniowych budująca *neointymę* ma naturę monoklonalną i wywodzi się ze specjalnie predysponowanych do tego komórek błony środkowej (*tunica media*) [11, 192]. Ostatecznie jednak zwyciężyła koncepcja oligoklonalna poparta badaniami z zastosowaniem nowoczesnych technik *in situ*, według której prócz określonej subpopulacji SMC migrujących z błony środkowej ściany naczynia istnieją inne źródła komórek mięśniowych budujących *neointymę*. Okazało się, że w niewielkim stopniu w procesie tym mogą uczestniczyć SMC powstałe na skutek transdiferencjacji komórek śródbłonna lub fibroblastów, oraz zdolne do różnicowania cyrkulujące progenitorowe komórki szpiku kostnego [13, 90, 168].

1.1.3. Istota międzykomórkowa

Homeostaza strukturalno-czynnościowa naczynia tętniczego jest utrzymana dzięki doskonałej organizacji w układzie SMC i ECM. Produkowane przez komórki mięśniowe takie białka włókniste jak elastyna i kolagen umożliwiają stworzenie w błonie środkowej zwartego koncentrycznego układu kolejnych warstw SMC. ECM może także regulować istotne fizjologiczne funkcje komórek mięśniowych dzięki temu, że posiada unikalne właściwości uwarunkowane budową chemiczną [41, 102, 130, 227, 241, 242].

Wśród makromolekuł budujących ECM najistotniejszymi są kolagen typu I i III, szeroki wachlarz glikoprotein (fibronektyna, witronektyna, tenascyna, trombospondyna), proteoglikany (zawierające siarczan dermatanu i siarczan chondroityny) oraz elastyna. Związki te pełnią kluczową rolę w trakcie morfogenezy naczyń, ale również modulują reakcje SMC na działanie czynników patologicznych między innymi w procesie miażdżycowym [32, 121, 122, 274].

Szczególnie podkreśla się znaczenie wzajemnych interakcji fibronektyny i SMC w kontrolowaniu cyklu komórkowego [100, 101]. Dobrze udokumentowana jest też rola elastyny jako autokrynnego regulatora polimeryzacji aktyny i organizacji aparatu kurczliwego komórek mięśniowych [127]. Stwierdzono, że zmiany pojawiające się w strukturze genu elastyny powodują wystąpienie w naczyniu patologicznych zjawisk związanych z proliferacją SMC [32, 210, 237].

Wzajemne interakcje SMC - ECM oraz SMC - SMC mogą zostać zaburzone poprzez zewnątrzkomórkowe proteazy z grupy metaloproteinaz (MMP – *matrix metalloproteinases*), które w warunkach fizjologicznych są wydzielane przez SMC w formie latentnej, a uaktywniają się w warunkach uszkodzenia naczyń [121, 122, 196, 197].

Poznanie mechanizmów kontrolujących zarówno syntezę jak i degradację ECM przyczyni się niewątpliwie do lepszego zrozumienia złożoności procesów formowania blaszki miażdżycowej, utrzymania jej stabilności bądź też przerwania jej ciągłości.

SMC posiadają transbłonowe receptory dla składników ECM spełniające ważną rolę w regulacji takich funkcji komórki jak przyleganie, polaryzacja, ruch a także proliferacja, różnicowanie i żywotność. Te receptory istotne w procesie transdukcji sygnału zaliczane są do rodziny integryn [30, 31]. Cząsteczki integryn są heterodimerami złożonymi z podjednostek α i β , z których każda posiada dużą domenę zewnątrzbłonową dla wiązania liganda, pojedynczą domenę transbłonową oraz domenę cytoplazmatyczną umożliwiającą interakcję z elementami cytoszkieletu [315]. Molekułą docelową dla sygnału przekazywanego z ECM za pośrednictwem integryn jest w komórkach mięśniówki naczyń aktyna budująca elementy cytoszkieletu. Natomiast ligandami receptorów integrynowych są zazwyczaj fibronektyna, laminina i kolagen [302].

1.2. Miażdżyca

1.2.1. Poglądy na patogenezę miażdżycy

Wskazanie przyczyn rozwoju miażdżycy i rozwikłanie złożoności tego procesu absorbowano badaczy od dziesięcioleci. W XIX wieku Virchow zaprezentował histologiczną charakterystykę zmian miażdżycowych zwracając uwagę na obecność cholesterolu w komórkach piankowatych oraz zlokalizowanych poza-

komórkowo kryształów cholesterolu. Na tej podstawie sformułował aktualną do dzisiaj hipotezę określaną mianem „*infiltration*”, według której u podstaw formowania zmian miażdżycowych leży przenikanie z krwi do ściany naczynia lipidów oraz komórek generujących proces zapalny. Jeszcze przez długi czas, w badaniach eksperymentalnych i klinicznych, dominującą problematyką było szukanie zależności pomiędzy występowaniem miażdżycy i zaburzonym metabolizmem lipidów. Nie przypadkiem więc kolejna hipoteza otrzymała miano „*modified low-density lipoprotein*” [262].

W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia bardzo duże uznanie zyskała hipoteza „*response to injury*” prezentowana przez Rossa i współpracowników [240]. Autor eksponował zjawisko proliferacji komórek mięśniowych błony środkowej naczyń oraz ich migracji do błony wewnętrznej występujące jako odpowiedź na uszkodzenie ściany naczynia. Od tego czasu nie tylko dobrze poznano czynniki i procesy uszkadzające ścianę naczynia tętniczego, lecz także zidentyfikowano i zbadano czynniki wzrostowe oraz mediatory zapalenia ważne w progresji choroby. I chociaż hipoteza Rossa jest nadal aktualna, stworzono nową, zuniifikowaną koncepcję aterosklerozy, uwzględniającą elementy wszystkich hipotez wykreowanych wcześniej ze wskazaniem jednakże na kluczową rolę procesu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej [55, 157, 158, 247, 249, 293, 300].

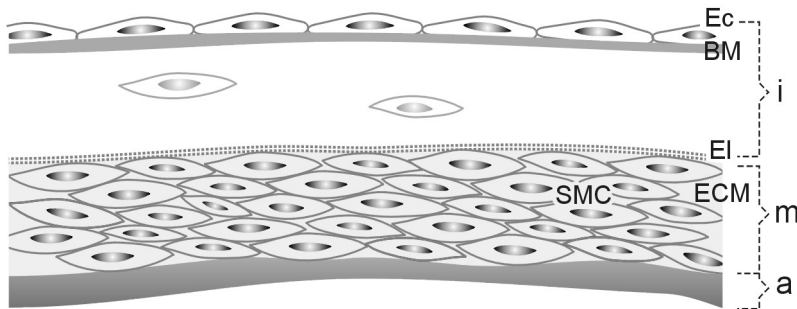
Jeszcze do niedawna uważano miażdżycę za wolno postępującą chorobę zwyrodnieniową naczyń tętniczych, która doprowadza do zaburzeń w przepływie krwi u osób w podeszłym wieku. Obecnie miażdżycę przedstawiana jest jako dynamiczny proces zapalny, który nieustannie jest modyfikowany na skutek działania czynników regulacyjnych. Coraz częściej też podkreśla się znaczenie dynamicznej równowagi pomiędzy destrukcyjnym oddziaływaniem komórek zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej, a odpowiedzią i stabilizującym wpływem SMC [10, 24, 35, 56, 246, 250].

1.2.2. Znaczenie SMC w powstawaniu zmian miażdżycowych

1.2.2.1. Inicjacja procesu miażdżycowego

Czynniki fizyczne, biochemiczne lub immunologiczne mogą powodować uszkodzenia śródbłonna wyścielającego naczynie krwionośne zapoczątkowując w ten sposób proces miażdżycowy (*atherogenesis*) [75, 240, 242, 293]. W następstwie uszkodzenia dochodzi do zmian właściwości śródbłonna, które polegają na zwiększeniu jego przepuszczalności dla lipidów (*permeability*) oraz na zmianie w ekspresji licznych genów [2, 75]. Produkowane selektyny P i E, cząsteczki adhezyjne ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*),

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) umożliwiają adhezję monocytów i limfocytów T do śródbłonka [31, 47, 48, 119].



Ryc. 2. Elementy budujące ścianę naczynia krwionośnego. Komórka śródbłonka, Ec (*endothelial cell*), błona podstawna, BM (*basement membrane*), błona elastyczna, El (*elastic lamina*), istota międzykomórkowa, ECM (*extracellular matrix*), komórka mięśniówki gładkiej naczyń, SMC (*smooth muscle cell*), błona wewnętrzna, i (*tunica intima*), błona środkowa, m (*tunica media*), błona zewnętrzna, a (*tunica adventitia*).

Fig. 2. *Vascular wall components. Endothelial cell (Ec), basement membrane (BM), elastic lamina (EL), extracellular matrix (ECM), smooth muscle cell (SMC), tunica intima (i), tunica media (m), tunica adventitia (a).*

Postęp w rozwoju zmian miażdżycowych wiąże się z rekrutacją limfocytów T i monocytów do *intimy* oraz wywiązaniem się stanu zapalnego. Jednakże reakcja zapalna zawsze jest poprzedzona kumulacją przynajmniej częściowo zmodyfikowanych lipidów w warstwie podśródbłonkowej [188, 217, 300].

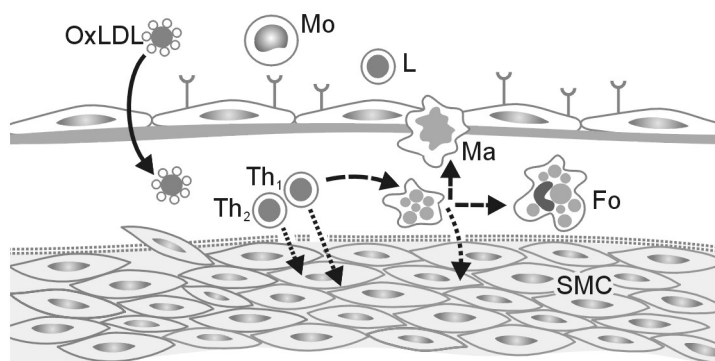
Pod wpływem chemokin, w szczególności MCP 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), odbywa się migracja monocytów do błony wewnętrznej naczyń oraz ich transformacja w kierunku makrofagów. Makrofagi kumulują w cytoplazmie aterogenne, zmodyfikowane lipoproteiny, głównie ox-LDL (*low density lipoprotein*) oraz estry cholesterolu i stają się komórkami piankowatymi (Fo – *foam cells*.) [28, 157, 158].

Na tym etapie rozwoju miażdżycy powstają zauważalne makroskopowo, charakterystyczne zmiany w wewnętrznej błonie naczynia, zwane smugami tłuszczowymi (*fatty streak*).

Nie tylko makrofagi lecz także SMC mogą przekształcać się w komórki piankowate uczestnicząc w formowaniu złogów lipidowych, czego dowodzi

obecność w ich błonie właściwych receptorów związanych z funkcją magazynowania tłuszczów [239].

SMC podobnie jak komórki śródbłonna ujawniają ekspresję molekuł adhezyjnych takich jak VCAM-1 i ICAM-1 odgrywających istotną rolę podczas migracji do błony wewnętrznej naczynia tętniczego [57, 58]. Wspomniane cząstki adhezyjne do pewnego stopnia chronią SMC przed apoptozą przyczyniając się do obecności dużej liczby tych komórek we wczesnej fazie formowania blaszki miażdżycowej [119].

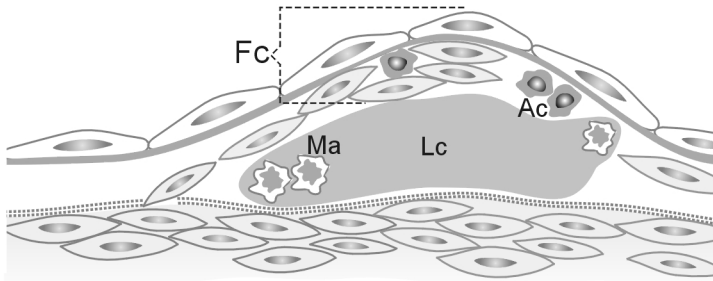


Ryc. 3. Inicjacja procesu miażdżycowego. Komórki uszkodzonego śródbłonna przejawiają na swojej powierzchni ekspresję cząsteczek adhezyjnych ((ICAM-1, VCAM-1) ułatwiających rekrutację monocytów (Mo) i limfocytów, które następnie penetrują warstwę śródbłonna i zasiedlają błonę wewnętrzną (*intima*). Następuje transformacja monocytów do makrofagów (Ma), pochłanianie przez nie zmodyfikowanych lipidów i przemiana w komórki piankowe (Fo). Cytokiny uwalniane przez makrofagi i limfocyty T inicjują proces zapalny w ścianie naczynia. Czynniki wzrostu stymulują modulację fenotypową SMC polegającą na transformacji ze stadium *contractile* do aktywnego metabolicznie stadium *synthetic*. Zaktywowane SMC zaczynają migrować z błony środkowej ściany naczynia do błony wewnętrznej, a następnie proliferować w warstwie podśródbłonkowej.

Fig. 3. Initiation of atherosclerotic process. Altered endothelium (Ec) begins to express the adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1) which attracts monocytes and lymphocytes. Next, these cells migrate through the endothelial layer into the intima. Within the arterial intima, the monocytes (Mo) transform into macrophages (Ma), engulf Ox-LDL to become foam cells (Fo). Macrophages and T-lymphocytes secrete cytokines and provoke inflammation in arterial wall. Growth factors stimulate phenotypic modulation of smooth muscle cells from quiescent, contractile state to an active, synthetic state. Activated SMC derived from the tunica media start to migrate and proliferate under sub-endothelial space.

1.2.2.2. Wczesne zmiany miażdżycowe

Rozwój kolejnych zmian miażdżycowych następuje głównie za sprawą cytokin prozapalnych, wśród których najważniejszymi wydają się być interleukina-1 β i czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor- α* , *TNF- α*) [70, 126]. Aktywowane limfocyty Th₁ produkują interferon- γ (*INF- γ*), który z kolei aktywuje makrofagi oraz SMC intensyfikując proces zapalny [87, 92, 149]. Natomiast limfocyty zaliczane do grupy Th₂ wydzielają cytokiny przeciwzapalne IL-4, IL-10 i TGF- β (*transforming growth factor*), które niewątpliwie wywierają działanie modulacyjne w procesie miażdżycowym [134]. A zatem progresja zmian miażdżycowych będzie zależała w dużej mierze od tego na ile reakcje prozapalne i antyzapalne pozostają w równowadze [71, 72, 73, 85, 87, 89, 92, 101, 126, 158, 209].



Ryc. 4. Wczesna zmiana miażdżycowa (*fibroatheroma*). Komórki mięśniowe spełniają kluczową rolę w formowaniu otoczki włóknistej (Fc) i stabilizacji blaszki miażdżycowej. Tworzenie Fc odbywa się w następstwie migracji i proliferacji SMC oraz odkładania składników macierzy międzykomórkowej. Składnikami budującymi obszar stłuszczenia (Lc) są komórki piankowe, krople lipidowe leżące pozakomórkowo oraz resztki nekrotyczne. Otoczka włóknista zawierająca liczne SMC stanowi barierę uniemożliwiającą kontakt między krążącą krwią i trombogenicznym lipidowym rdzeniem. Makrofag (Ma), komórka ulegająca apoptozie (Ac).

Fig. 4. Early fibroatheroma. Smooth muscle cells play a key role in fibrous cap (Fc) formation and plaque stability. Fc arises from the migration and proliferation of vascular SMC and from matrix deposition. Lipid core (Lc) region is built by foam cells, extracellular lipid droplets and necrotic debris. SMC-rich fibrous cap acts as a barrier between lipid-rich protrombogenic plaque core and blood flow. Macrophage (Ma), apoptotic cell (Ac).

Proces zapalny przyczynia się do wzmożonej syntezy i zwiększonego wydzielenia przez komórki mięśniowe metaloproteinaz, enzymów uczestniczących w degradacji białek istoty międzykomórkowej [10, 66, 85, 89]. Strawienie błony podstawnej ułatwia proliferację SMC i migrację z błony środkowej tętnic poprzez perforowaną błonę elastyczną (*elastic lamina*) do określonych obszarów w błonie wewnętrznej (*tunica intima*) [100, 101, 130].

Aktywność proliferacyjna i migracyjna komórek mięśniowych pozostaje w ścisłym związku z modulacją fenotypową polegającą na zmianie fenotypu z kurczliwego na syntetyzujący [45, 65, 101, 128, 217]. Wymienione procesy są regulowane na zasadzie auto- i parakrynni w szczególnym środowisku (*highly mitogenic milieu*) zawierającym oprócz wspomnianego zestawu mediatorów stanu zapalnego także czynniki wzrostu: czynnik płytkowy, PDGF (*platelet derived growth factor*), endotelinę-1 (*endothelin-1*), trombinę oraz czynnik wzrostowy fibroblastów (FGF – *fibroblast growth factor*). Funkcję regulacyjną spełniają także inhibitory wzrostu: siarczan heparanu, tlenek azotu oraz czynnik transformujący β (TNF β – *transforming growth factor*) [131, 141, 312].

Komórki mięśniowe podobnie jak limfocyty i makrofagi syntetyzują i wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, które mają istotne znaczenie w przebiegu procesu zapalnego [72, 134, 154]. Niektóre z produkowanych cząstek sygnałowych mogą działać regulacyjnie na takie procesy jak migracja, proliferacja, kurczliwość i podatność SMC na apoptozę. Szczególna debata dotyczy roli IFN- γ (*interferon- γ*) oraz synergizmu w działaniu IFN- γ i TNF- α [70, 92, 126, 154].

Wysokiej aktywności proliferacyjnej komórek mięśniowych w trakcie rozwoju blaszki miażdżycowej towarzyszy intensywna synteza ECM, czego skutkiem jest kumulacja proteoglikanów, włókien kolagenowych i elastynowych [32, 45, 67, 81, 227].

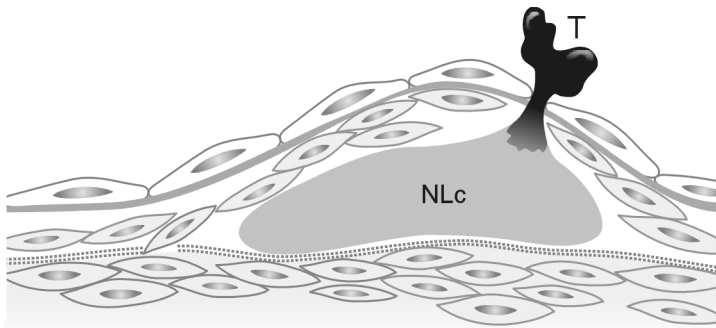
W efekcie na powierzchni lipidowego rdzenia tworzona jest różnej grubości charakterystyczna włóknista czapeczka (*fibrous cap*) umożliwiająca strukturalną integralność i mechaniczną stabilność utworzonej blaszki miażdżycowej [35, 116, 250]. Włóknista tkanka stanowi barierę oddzielającą wysoce trombogeniczną tkankę (*atheroma*) od krążących płytek krwi i białek o właściwościach koagulujących. Odpowiednia grubość i struktura otoczki włóknistej jest cechą stabilnej blaszki miażdżycowej (*stable atheroma*) [156].

1.2.2.3. Niestabilna blaszka miażdżycowa

Daleko posunięta destrukcja ECM jest jednym z powodów zmniejszenia grubości tkanki włóknistej osłaniającej trombogeniczny lipidowy rdzeń w blaszce miażdżycowej [130, 147, 195]. Procesy degradacyjne występują jako następstwo aktywności komórek układu immunologicznego produkujących mediatory stanu zapalnego, oraz jako następstwo aktywności enzymów proteolitycznych

[5, 67, 155]. Za nie mniej istotną przyczynę prowadzącą do osłabienia otoczki włóknistej uważa się także zwiększoną częstotliwość występowania apoptozy wśród SMC [12, 24, 43, 88].

Konsekwencją wymienionych procesów jest powstanie niestabilnej blaszki miażdżycowej (*unstable/vulnerable plaque*) [147, 241]. W sytuacji, gdy zaburzenie integralności okrywy włóknistej będzie poważne, a komórki mięśniowe nie podejmą skutecznych działań reperacyjnych, istnieje duże prawdopodobieństwo jej pęknięcia i wytworzenia wewnątrznaczyniowej skrzepliny [71, 142].



Ryc.5. Niestabilna blaszka miażdżycowa posiada cienką pokrywę włóknistą osłaniającą duży rdzeń, w którym skumulowane są zmodyfikowane lipidy oraz obumarłe makrofagi i komórki mięśniowe. Destabilizacja i pęknięcie blaszki miażdżycowej występuje na skutek degradacji składników istoty międzykomórkowej. Kontakt elementów krwi z trombogenicznym bogatym w lipidy nekrotycznym rdzeniem (NLC) powoduje wytworzenie skrzepliny (T) zamykającej światło naczynia tętniczego.

Fig. 5. Unstable plaque has a thin fibrous cap overlying a large core consisted of oxidized lipids, apoptotic macrophages and SMC. Destabilization and rupture of atherosclerotic plaque is associated with degradation of extracellular matrix components. Contact of the blood with the thrombogenic lipid-rich necrotic core (NLC) initiates coagulation cascade, and thrombosis (T), which causes occlusion of the atherosclerotic artery.

1.2.2.4. Proces naprawczy

Jakkolwiek postępująca erozja, a następnie pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej może spowodować zamknięcie światła naczynia, to w rzeczywistości powtarzające się wielokrotnie incydenty pęknięcia nie powodują skutków klinicznych [49, 265]. Miejsca uszkodzenia podlegają procesowi reperacji dzięki inwazji SMC w miejsce skrzepliny, ich proliferacji i syntezie ECM. Kolejne

pęknięcia i naprawy wiążą się z rozrostem blaszki miażdżycowej i nieuchronnie prowadzą do sytuacji krytycznej, w której po pęknięciu i wytworzeniu skrzepu jednak dochodzi do zamknięcia światła naczynia [83, 227, 250].

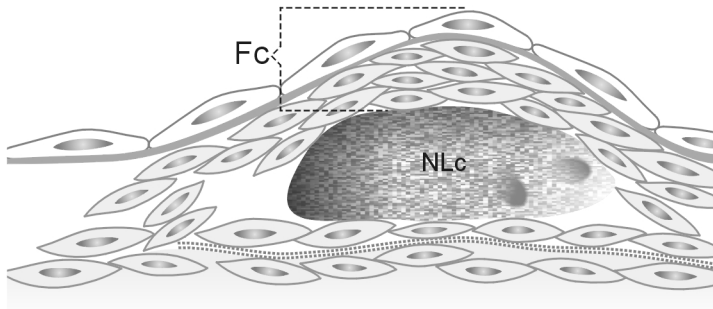
Niewątpliwie najistotniejszym zjawiskiem wiążącym się z procesem naprawczym jest proliferacja komórek mięśniowych [3, 73, 240]. Intensyfikacja proliferacji zachodzi pod wpływem czynników wzrostowych; fibroblastycznego-FGF, insulinowego (IGF – *insulin-like growth factor*,) i płytkowego-PDGF, które są wydzielane przez komórki indukujące proces zapalny oraz przez aktywowane SMC [147, 155, 165]. Ponadto obecny w zmianach miażdżycowych czynnik transformujący-TGF- β wspomaga proces naprawczy stymulując syntezę ECM [169, 300].

Z procesem naprawczym związane jest także zjawisko migracji komórek mięśniowych do miejsc uszkodzenia [10, 35, 248]. Proces migracji jest ułatwiony dzięki aktywności wydzielanych proteinaz powodujących degradację składników błony podstawnej. Z drugiej strony aktywowane SMC są zdolne do syntezy białek będących składową macierzy międzykomórkowej – w szczególności kolagenu i elastyny uczestniczących w naprawie miejsc uszkodzenia naczynia [32, 67, 227]. Ponieważ SMC są jedynymi komórkami zdolnymi do tworzenia włóknistej pokrywy, oddzielającej wysoce trombogeniczny lipidowy rdzeń od krążących płytek krwi i białek zaangażowanych w proces krzepnięcia, spełniają podstawową rolę w budowaniu stabilności płytki miażdżycowej, która stanowi kulminacyjny moment procesu naprawczego [241, 242].

1.2.2.5. *Komplikacja zmian miażdżycowych*

Rozwój zawansowanych zmian miażdżycowych następuje również przy istotnym udziale SMC i w ścisłym związku z procesem zapalnym [102, 242, 260]. W tzw. zaawansowanych zmianach miażdżycowych, na terenie *atheroma* wzrasta ilość obumarłych komórek (*necrotic debris*) i postępuje proces odkładania soli wapniowych (*fibrocalcific lesion*). Przypuszcza się, że u podstaw tworzenia takich skomplikowanych zmian leży apoptoza SMC oraz aktywnie postępujący i podlegający regulacji proces wapnienia [27, 55, 115, 275].

Istnieją doniesienia na temat możliwości nabywania przez komórki mięśniowe nowych właściwości zbliżających je fenotypowo do osteoblastów, w których następuje ekspresja białek związanych z procesem kostnienia [74, 117].



Ryc. 6. Stabilna blaszka miażdżycowa. Zdecydowana większość blaszek miażdżycowych po pęknięciu ulega reperacji dzięki proliferacji SMC, migracji i syntezie składników ECM. Wspólną cechą stabilnej blaszki miażdżycowej jest gromadzenie kryształów cholesterolu i soli wapniowych, z początku w postaci niewielkich skupień następnie dużych złogów. Zaawansowane, wapniejące zmiany miażdżycowe zwykle powodują zwężenie naczyń.

Fig. 6. Stable atherosclerotic lesion. The majority of disrupted plaques are repaired because of SMC proliferation, migration and synthesis of ECM components. Common feature of stable atheroma is accumulation of cholesterol crystals and calcium minerals initially in small aggregates and later as large nodules. Intensification and complication of atherosclerosis usually cause stenosis.

1.3. Witamina D

1.3.1. Historia badań

Biogenetycznie witamina D (cholekalcyferol) wywodzi się z cholesterolu i niewątpliwie jest substancją bardzo starą filogenetycznie. Istnieją dowody na to, iż pewne prymitywne, roślinne organizmy planktoniczne (*Emiliani huxleyi*), obecnie występujące w Oceanie Atlantyckim, już ponad 750 milionów lat temu nabyły umiejętność syntezy witaminy D pod wpływem promieniowania słonecznego [108].

Historia badań nad witaminą D jest długa i przynajmniej na swoim początku łączy się ściśle z rozwojem badań nad krzywicą. Pierwsze klinicznie potwierdzone obserwacje na temat krzywicy u dzieci zostały przedstawione przez Whistlera i Glissona już w połowie XVII stulecia, lecz związek przyczynowo-skutkowy niedostatku promieniowania słonecznego i występowania krzywicy ostatecznie udowodniono i zaakceptowano dopiero na początku XX wieku.

Prekursorem badań epidemiologicznych był Jędrzej Śniadecki, który w 1822 roku opublikował wyniki świadczące jednoznacznie o antyrachitycznym działa-

niu promieni słonecznych [189]. Niewątpliwy przełom w badaniach dokonał się w latach 1919-21, kiedy to Edward Mellanby [178] empirycznie wykazał w pożywieniu obecność czynnika przeciwwkrzywiczego i nazwał go *fat-soluble vitamin*, a wkrótce potem Mc Collum przypisał tej nowej substancji nazwę witamina D [175].

Intensywne badania pozwoliły w kolejnych dziesięcioleciach w pełni poznać szlaki przemian metabolicznych witaminy D [304]. Szczególnie owocne były lata 1968-71, ponieważ w tym czasie odkryto aktywny metabolit witaminy D – kalcytriol [200], dokonano identyfikacji jego receptora jądrowego, i poznano genomowy mechanizm działania tego związku, zwanego powszechnie hormonem steroidowym [95]. W roku 1994 zidentyfikowano receptor błonowy, ale dopiero w obecnym dziesięcioleciu zostały szczegółowo poznane i opisane mechanizmy transdukcji sygnału oraz związki między działaniem genomowym i niegenomowym [164, 195, 202]. Rewolucyjnym niewątpliwie było doniesienie Stumpfa i współpracowników w 1979 roku na temat obecności receptorów aktywnego metabolitu D₃ w organach i tkankach dotąd niekojarzonych z gospodarką fosforanowo-wapniową [264]. Kolejne odkrycia utwierdziły badaczy w przekonaniu, że kalcytriol wykazuje działanie plejotropowe mogąc spełniać w organizmie wielorakie funkcje [4, 37, 52, 54, 123, 161, 193, 234].

1.3.2. Metabolizm witaminy D

Potoczna nazwa „Witamina D” odnosi się do cząsteczki zbudowanej z 4 pierścieni (A, B, C, D) oraz łańcucha bocznego. Jednakże metabolizm witaminy D jest wieloetapowy i możemy rozważać kilka związków różniących się budową cząsteczki i właściwościami. Prekursorem dla tych związków jest cholesterol, a wywodzący się z niego 7-dehydroksycholesterol, zwany prowitaminą D, zlokalizowany jest w błonach komórkowych keratynocytów, budujących warstwę podstawną i kolczystą naskórka, oraz w fibroblastach skóry właściwej. Zatem pierwszy etap biosyntezy witaminy D odbywa się w skórze człowieka i polega na fotolitycznej konwersji 7-dehydrocholesterolu do cholekalcyferolu (kalciol) [42, 107].

Na tym etapie pod wpływem promieni słonecznych (UVB 290-315 nm) i przy udziale odpowiedniej reduktazy następuje zerwanie podwójnego wiązania w pozycji węgla 9 i 10 i otwarcie pierścienia B. Powstały związek, zwany prewitaminą D, prawie natychmiast ulega izomeryzacji pod wpływem temperatury skóry tj. 25°C. W efekcie tworzony jest cholekalcyferol (kalciol), czyli cząsteczka witaminy D, która w świetle zasad termodynamiki ma stabilną strukturę. W tej właśnie postaci witamina D jest uwalniana z błon do przestrzeni międzykomórkowych, a następnie do krwi [295, 296].

Kolejne przemiany metaboliczne polegające na syntezie form biologicznie aktywnych witaminy D₃ zachodzą dwuetapowo.

Synteza 25-hydroksycholekalcyferolu (kalcydiol)

Cholekalcyferol syntetyzowany w skórze dyfunduje do krwioobiegu, a następnie w formie związanej z białkami osocza jest transportowany do wątroby. Natomiast cholekalcyferol i ergokalcyferol, których źródłem jest pokarm, są transportowane do wątroby za pomocą chylomikronów (ryc 9). Związki te ulegają hydroksylacji przy udziale 25-hydroksylazy (CYP27A1 - monoooksydaza zależna od cytochromu P-450). Proces ten przebiega we frakcji mitochondrialnej hepatocytów przy współudziale enzymów frakcji mikrosomalnej CYP2J3, CYP2R1 i CYP3A4 [162, 173, 226, 253].

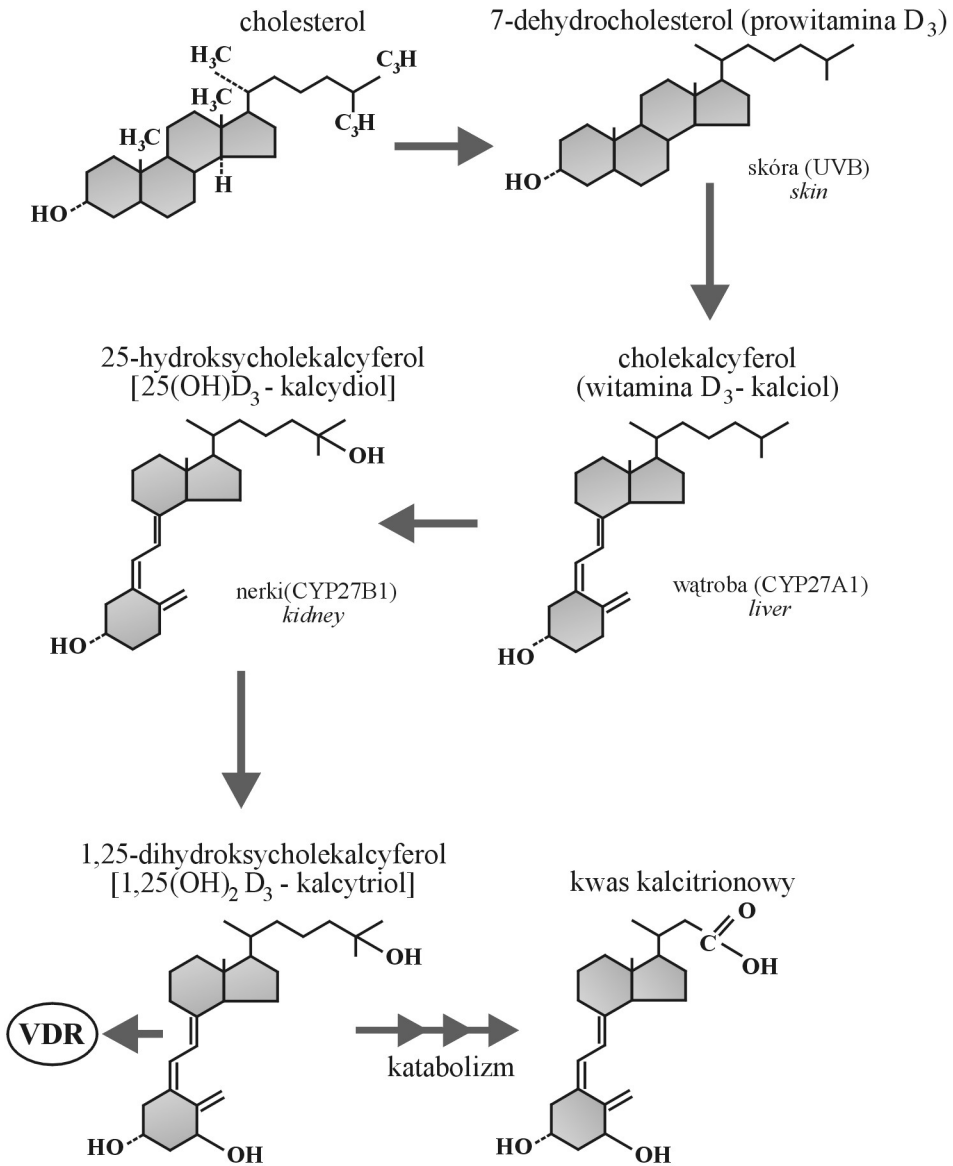
Powstały 25-hydroksycholekalcyferol (kalcydiol) jest główną postacią witaminy D obecnej w krwioobiegu. Aktywność biologiczna kalcydiolu jest niewielka, bo jedynie 1,5 krotnie wyższa od cholekalcyferolu, a okres połowicznego rozpadu jest szacowany na około 15 dni [124].

Synteza 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferolu (1 α ,25(OH)₂D₃ = kalcytriol)

Kolejnym miejscem aktywacji witaminy D w organizmie jest nerka. W mitochondriach kanalików proksymalnych nefronu następuje hydroksylacja w pozycji 1 pierścienia A kalcydiolu z udziałem 1 α -hydroksylazy (CYP27B1) [16, 200, 234].

Szacuje się, że aktywność biologiczna powstałego 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferolu [1 α ,25(OH)₂D₃=kalcytriol] jest nawet do 1000 krotnie wyższa niż kalcydiolu, natomiast okres połowicznego rozpadu jest znacznie krótszy i wynosi zaledwie kilka godzin [42, 53, 167, 226].

Podaż 1 α ,25(OH)₂D₃ pozostaje pod kontrolą PTH (*parathormon*) i zależy od poziomu wapnia i fosforu [50, 51]. Synteza kalcytriolu regulowana jest także przez czynnik wzrostowy fibroblastów (FGF-23) produkowany przez tkankę kostną [253]. Ponadto nadmiernie wysokie stężenie kalcytriolu we krwi indukuje ekspresję genu D-24-hydroksylasy (CYP24), która katabolizuje kalcytriol do biologicznie nieaktywnego kwasu kalcytrionowego [111, 123].



Ryc. 7. Metabolizm witaminy D (wzorowane na Tukaj C. 2008)

Fig. 7. Vitamin D metabolism (adopted from Tukaj C. 2008)

Pozanerkowa synteza $1\alpha,25$ -dihydroksycholekalcyferolu

Niezwykle istotnym z biologicznego punktu widzenia jest fakt, iż hydroksylacja w kanalikach nerkowych nie jest jedynym źródłem aktywnego metabolitu witaminy D. Ponad 20 lat temu wykazano obecność 1α -hydroksylazy (CYP27B1) w hodowli keratynocytów. Od tego czasu aktywność mitochondrialnej 1α -hydroksylazy stwierdzono w wielu różnych tkankach ludzkiego organizmu takich jak; makrofagi, przystarczyce, komórki beta wysp trzustkowych, różnego typu nowotwory oraz komórki mięśniówki gładkiej naczyń [162, 203, 258, 316]. Jak dotąd, nie stwierdzono obecności tego enzymu jedynie w mięśniu sercowym, wątrobie i korze nadnerczy. Pozanerkowo, lokalnie syntetyzowana $1,25$ dihydroksywitamina D_3 reguluje na drodze auto- i parakrynni istotne funkcje fizjologiczne wymienionych tkanek [4, 6, 103, 154, 258].

Synteza $1\alpha,24,25$ -dihydroksycholekalcyferolu

Znany jest także inny metabolit witaminy D, mianowicie $1\alpha,24,25$ -dihydroksycholekalcyferol, niemający jednak większego znaczenia biologicznego. Hydroksylacja w pozycji 24 jest początkiem jednego ze szlaków katabolicznych witaminy D, gdzie w następstwie oksydacyjnego rozszczepienia łańcucha bocznego powstaje kwas kalcytrionowy – związek dobrze rozpuszczalny w wodzie i dlatego łatwo usuwalny z organizmu.

Czynnikiem indukującym ekspresję 24OH-azy (CYP24A1) jest kalcytriol, a zatem jego poziom w organizmie jest regulowany na zasadzie sprzężenia zwrotnego [123].

1.3.3. Mechanizm działania $1\alpha,25(OH)_2D_3$

1.3.3.1. Działanie genomowe

Aktywna biologicznie, podwójnie hydroksylowana postać witaminy D, a także jej analogi oddziałują na komórki docelowe poprzez VDR [57, 96, 97, 200, 219, 234]. VDR (55-56 kDa) jest aktywatorem liganda w procesie regulacji transkrypcji genów, i z tego powodu został zaliczony do nadrodziny receptorów hormonów steroidowych [95].

Konserwatywna domena VDR wiążąca DNA zawiera 60-80 aminokwasów, spośród których 20 tworzy struktury zwane palcami cynkowymi. O rozpoznaniu specyficznej sekwencji w regionie promotora genu docelowego VDRE (*vitamin D-responsive element*) decydują 3 aminokwasy położone u nasady pierwszego

palca. Domena wiążąca ligand składa się z około 210 aminokwasów, a w jej sąsiedztwie znajduje się obszar zwany domeną dimeryzacyjną.

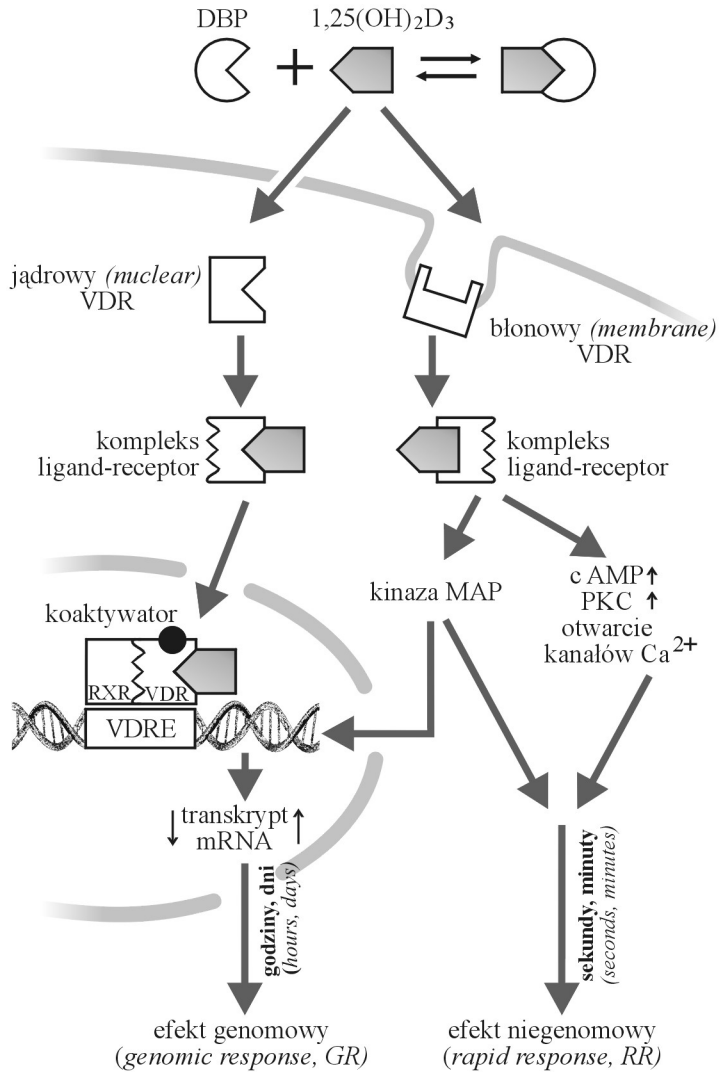
Połączenie ligand-receptor indukuje w domenie dimeryzacyjnej zmiany konformacyjne umożliwiające interakcję z RXR (*retinoid x receptor*). Utworzony kompleks liganda z heterodimerem VDR-RXR pełni funkcję aktywnego czynnika transkrypcyjnego o wysokim powinowactwie do VDRE [96, 133]. Na przebieg transkrypcji wpływają także kompleksy aktywujące receptorów steroidowych, wykazujące aktywność acetylotransferazy histonowej, zdolne do „re-modelowania chromatyny”.

Liczne doniesienia wskazują na znaczenie kalcytriolu w kontrolowaniu ekspresji ponad 200 genów, przy czym pełna odpowiedź na poziomie genomu (GR – *genomic response*) wymaga czasu liczonego w godzinach, a nawet dniach.

1.3.3.2. Działanie niegenomowe

Kalcytriol może oddziaływać na organy docelowe również według odmiennego mechanizmu niż wyżej opisany, mianowicie za pośrednictwem receptorów umiejscowionych na powierzchni błony komórkowej [59, 170, 201, 202]. Znaczenie szybkich niegenomowych odpowiedzi (RR – *rapid response*,) jest różne dla poszczególnych organów docelowych, ponieważ dotyczy aktywacji odmiennych szlaków sygnałowych [57, 164, 221]. W procesie tym uczestniczy szeroki wachlarz wtórnych przekaźników, obecnych w cytoplazmie komórki [202]. Niektóre ważne molekuly zaangażowane w systemie transdukcji sygnału są przedstawione na schemacie ilustrującym mechanizm działania kalcytriolu (ryc. 8).

Czas niegenomowej odpowiedzi jest znacznie krótszy niż w przypadku oddziaływania na genom i może być mierzony w sekundach (np. otwarcie kanałów jonowych) lub minutach (np. aktywacja kinazy IP_3). Jednakże najnowsze badania sugerują, iż zarówno cząsteczki receptora zlokalizowane w różnych miejscach komórki jak i molekuly liganda (izoformy: *6-s-cis* i *6-s-trans*) wykazują zmienność konformacyjną i dlatego są zdolne w sposób selektywny powodować zarówno odpowiedzi typu GR jak i RR.



Ryc. 8. Mechanizm działania $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (wzorowane na Tukaj C. 2008)

Fig. 8. Mode of action of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (adopted from Tukaj C. 2008). VDRE, vitamin D responsive element; cAMP, cyclic AMP; MAP, mitogen activated protein; mRNA messenger RNA; PKC, protein kinase C

1.3.4. Źródła witaminy D w organizmie

1.3.4.1. Egzogenne źródło

Stosunkowo niewielkie ilości witaminy D₃ (cholekalcyferolu) zawierają produkty spożywcze. Najbogatszym naturalnym źródłem witaminy D są tłuste ryby morskie, wśród nich łosoś, makrela i śledź, a także tran oraz suszone w słońcu grzyby. Produkty te zawierają 16 do 27 µg witaminy D w 100g masy, co sprawia, że jednorazowo możemy jej dostarczyć organizmowi około 400-500 IU [98, 99, 110, 120, 301].

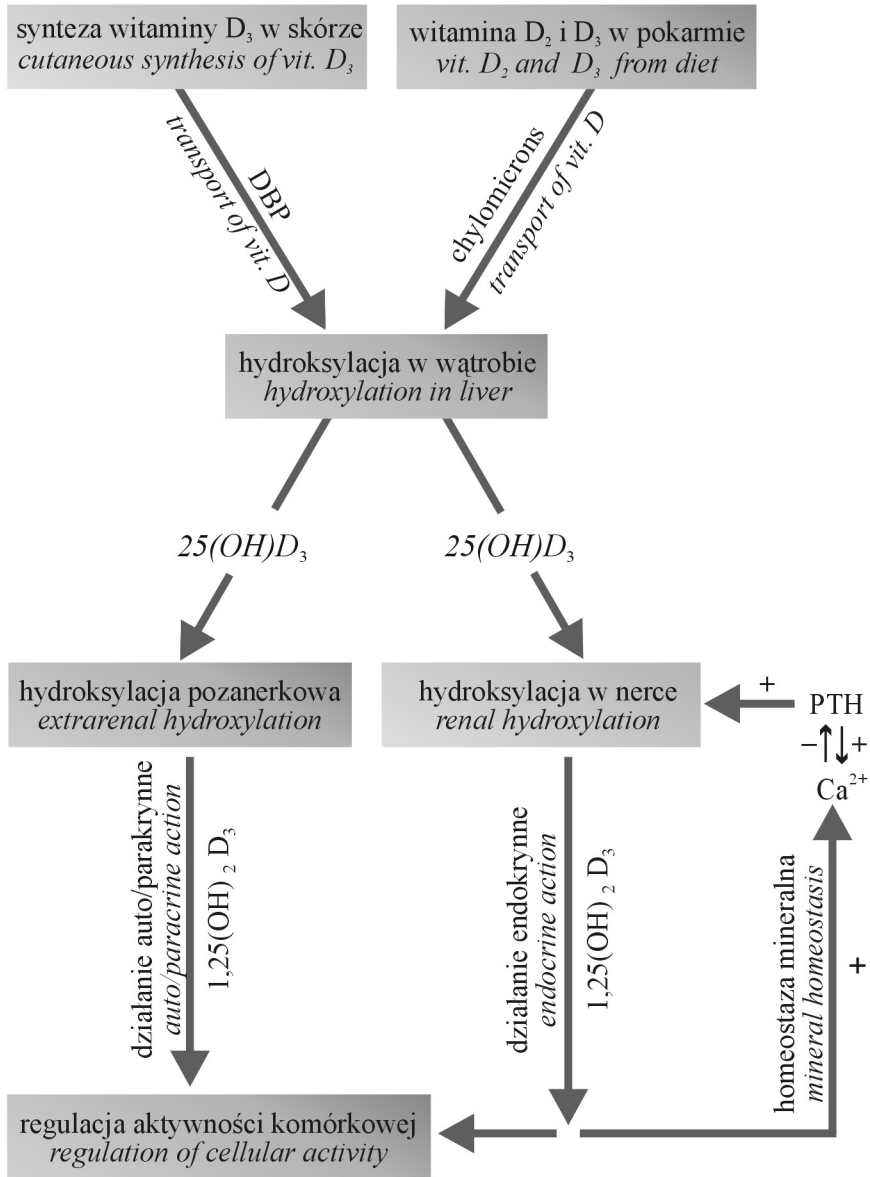
W organizmach pewnych gatunków roślin i grzybów znajduje się inna forma witaminy D, mianowicie ergokalcyferol (D₂). Posiada ona mniejsze znaczenie biologiczne z powodu niższej aktywności, krótszego czasu oddziaływania oraz odmiennego profilu toksykologicznego [7].

1.3.4.2. Endogenne źródło

Ludzki organizm nabył w trakcie filogenezy zdolność do syntezy znacznych ilości witaminy D [78, 99, 108, 118, 234, 309]. Ponad 90% obecnej w organizmie witaminy D ma więc pochodzenie endogenne, a jej poziom w osoczu zależy od tego jak sprawnie zachodzi synteza w skórze pod wpływem promieniowania słonecznego [8, 82, 162]. Skóra jest zatem istotnym elementem układu endokrynnego, a sama witamina D jest prehormonem.

Fotochemiczna konwersja prekursora witaminy D obecnego w skórze, czyli 7-hydroksycholesterolu, zachodzi pod wpływem promieni ultrafioletowych typu B (290-315 nm) o natężeniu nie mniejszym niż 20 mJ/cm² [173]. Produkcja witaminy D w skórze jest procesem bardzo efektywnym. Stwierdzono, iż po ekspozycji całego ciała na MED następuje uwolnienie do krwioobiegu, w ciągu 24 godzin, 10.000 – 20.000 IU 25(OH)D₃ [113]. Przy czym MED (*minimal erythemic dose*) stanowi minimalną dawkę promieniowania UVB powodującą zaróżowienie skóry i osiąga się ją zazwyczaj po około 10 minutach ekspozycji. Przed nadmierną syntezą witaminy D i ewentualną intoksykacją organizm broni się włączając procesy degradacyjne, w wyniku których powstają takie nieaktywne związki jak lumisterol i tachysterol [296].

Syntezę witaminy D można również indukować w sposób sztuczny za pomocą lamp emitujących promieniowanie UV o odpowiedniej długości fali [79, 267].



Ryc. 9. Źródła i znaczenie witaminy D dla organizmu

Fig.9. The source and role of vitamin D

1.3.4.3. Ograniczenia syntezy witaminy D

Na intensywność syntezy witaminy D wydatnie wpływają takie czynniki zewnętrzne jak; szerokość geograficzna, pora roku oraz pora dnia [42, 79, 86, 222]. Istotne znaczenie posiadają także naturalne czynniki limitujące syntezę witaminy D w skórze jak; pigmentacja skóry [44, 111], wiek [167], oraz odzienie i filtry przeciwsłoneczne [172, 173]. Obecnie szeroko propaguje się styl życia bez ekspozycji na promieniowanie słoneczne w obawie przed nowotworami skóry, co zdaniem wielu autorów wyraźnie zwiększa ryzyko niedoboru witaminy D w organizmie. Powyższe zagadnienia zostały przeze mnie szerzej omówione w pracy przeglądowej [286].

1.3.4.4. Zapotrzebowanie na witaminę D

Uznany wskaźnikiem aktualnego poziomu witaminy D w organizmie jest stężenie kalcydiolu ($25(\text{OH})\text{D}_3$) w osoczu. Kalcydiol stanowi kombinację witaminy D pochodzenia endogennego i egzogennego, i co istotne, nie podlega mechanizmom regulacyjnym [18, 113, 310].

Uważa się, iż optymalne stężenie $25(\text{OH})\text{D}_3$ winno kształtować się na poziomie równym lub wyższym niż 80 nmol/l. Stężenie tego markerowego metabolitu witaminy D w surowicy niższe od 25 nmol/l świadczy o jego niedoborze (*deficiency*). O niedostatku (*insuficiency*) mówi się, gdy wartości wynoszą od 25 do 50 nmol/l, zaś obniżony poziom (*hypovitaminosis*) występuje u osobników przy wartościach stężenia 50-70 nmol/l [40, 51, 94, 160, 161, 301, 310].

Granice normy fizjologicznej (*adequacy*) określa stosunkowo szeroki zakres stężeń, bo od 70 do 100 nmol/l, a nawet do 250 nmol/l [113]. Trudno było uzyskać konsensus przy wyznaczaniu wartości stężenia kalcydiolu, powyżej której ma działanie toksyczne (*toxicity*). Ostatecznie, za najwyższą wartość stężenia, która jest tolerowana przez organizm (*tolerable uptake upper level*) uznano 250 nmol/l [124, 311].

Szacuje się, że ponad 99% cyrkulującej witaminy D jest związana z białkiem, głównie z DBP (*vitamin D binding protein*). DBP wykazuje powinowactwo do metabolitów witaminy D w kolejności $25(\text{OH})\text{D} = 24,25(\text{OH})_2\text{D} > 1,25(\text{OH})_2\text{D} > \text{vitamin D}$, przy czym poziom tego globularnego białka w osoczu krwi jest 20-krotnie wyższy niż całkowita zawartość metabolitów witaminy D [46].

1.3.5. Przyczyny niedoboru witaminy D

Przypadki hiperwitaminozy D spotykamy rzadko, natomiast niedobór lub niedostatek witaminy D jest powszechny i dotyczy około miliarda osób na świe-

cie, w szczególności starszych mieszkańców miast USA i Europy [51, 111, 112, 160, 161]. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w amerykańskich uniwersytetach dowodzą, że problem ten dotyczy również ludzi młodych, jako że u około 50% młodzieży poziom kalcydiolu nie przekraczał 50 nmol/l [17, 40, 82].

Głównym powodem niedoboru witaminy D w organizmie jest jej ograniczona synteza w skórze [295, 296]. Istnieją także inne, poważne, aczkolwiek stosunkowo rzadkie przyczyny niedoboru witaminy D. Przyczyną niedoboru może być obniżona biodostępność z przewodu pokarmowego w przypadku zaburzonego wchłaniania (*malabsorption*) lub niemożność korzystania z zapasów zgromadzonych w tkance tłuszczowej u osób otyłych (*sequestration*) [306]. Niedobór witaminy D może także wystąpić u osób stosujących specjalne diety żywieniowe przy jednocześnie ograniczonym korzystaniu z działania promieni słonecznych.

W swojej obszernej pracy przeglądowej, Holick [111] dokonał szczegółowego zestawienia chorób metabolicznych, często uwarunkowanych genetycznie, w następstwie których dochodzi niejednokrotnie do poważnego niedoboru witaminy D. I tak, w przypadku dysfunkcji wątroby upośledzona bywa synteza kalcydiolu, a w chronicznych schorzeniach nerek synteza kalcytriolu oraz może występować utrata z moczem kalcydiolu, który nie jest związany z białkiem.

Choroby nowotworowe bywają przyczyną zwiększonej podaży FGF-23, który hamując ekspresję genu kodującego 1α hydroksylazę, powoduje w konsekwencji obniżenie stężenia kalcytriolu. Natomiast niektóre leki stosowane w terapii AIDS intensyfikują katabolizm kalcytriolu do kwasu kalcitriolowego.

Wśród przyczyn niedoboru witaminy D ważną grupę stanowią również zaburzenia powstałe na skutek mutacji określonych genów. Opisano mutacje genu 1α -hydroksylazy (CYP27B1), genu FGF-23 oraz genu dla receptora witaminy D.

1.3.6. Plejotropowy efekt działania witaminy D i skutki jej niedoboru

Skutkiem długotrwałego niedoboru witaminy D (na poziomie 25 nmol/l) jest krzywica u dzieci, a u osobników dorosłych osteomalacja i osteoporoza [6, 18, 109, 309]. W przypadku wymienionych chorób zaburzeniu ulega regulacja gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz modelowanie i mineralizacja kości. Co prawda efekt wapniowy, jaki powoduje witamina D, a precyzyjniej jej postać podwójnie hydroksylowana został szczegółowo zbadany, to jednak powszechne występowanie wymienionych chorób wciąż stanowi poważny problem.

Zważywszy na fakt, że zakres działania witaminy D jest bardzo szeroki a nie ogranicza się jedynie do efektu wapniowego, jej niedobór wynikający z niedostatecznej syntezy w skórze zwiększa ryzyko występowania przewlekłych chorób o odmiennej etiologii. Dostrzeżono wyraźny związek między zwiększoną częstotliwością występowania różnego typu nowotworów, cukrzycy typu I, reu-

matooidalnego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego i schizofrenii u osób zamieszkujących tereny o niskiej ekspozycji na promieniowanie słoneczne (powyżej 35° szerokości geograficznej) [6, 52, 107, 114, 185, 215, 220, 317]. W kwestii nowotworów, szczegółowe badania u mieszkańców wspomnianej strefy klimatycznej wykazały wzrost ryzyka zachorowania na nowotwór jelita grubego, trzustki, prostaty, piersi, jajnika i niektóre postaci białaczek. Dodatkowo prospektywne i retrospektywne studia epidemiologiczne ujawniły, że poziom 25(OH)D₃ poniżej 50 nmol/l zwiększa niebezpieczeństwo zachorowania na wymienione nowotwory nawet o 50% [68, 69, 84, 143].

Do tej pory stosunkowo niewiele wiadomo na temat zależności pomiędzy niedoborem witaminy D w dzieciństwie i wieku młodzieńczym, a ryzykiem występowania chronicznych chorób w wieku dojrzałym [144]. W jednej ze swoich ostatnich prac przeglądowych Holick [110] przytacza dane świadczące o tym, że u osobników, którzy spędzają pierwsze 10 lat życia w obszarze powyżej 35° szerokości geograficznej ryzyko zachorowalności na stwardnienie rozsiane i inne choroby autoimmunizacyjne wzrasta o 100%. Od pewnego też czasu pojawiają się doniesienia wskazujące na związek między niedoborem witaminy D w okresie płodowym i wczesnym dzieciństwie, ze zwiększoną częstotliwością występowania schizofrenii i depresji w okresie późniejszym [177].

Poziom kalcydiolu ma także wyraźny związek z rozwojem i stopniem nasilenia różnych postaci chorób autoimmunizacyjnych, w szczególności stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów, choroby Crohna oraz cukrzycy typu 1 [37, 222]. Intensywnie prowadzone w wielu ośrodkach naukowych badania są źródłem danych na temat pozytywnego oddziaływania kalcytriolu w procesie modulacji odpowiedzi immunologicznej [4, 6, 148]. Zidentyfikowano receptory witaminy D w komórkach dendrytycznych, makrofagach oraz limfocytach T. Aktywny metabolit witaminy D może regulować odpowiedź immunologiczną na wielu poziomach, w tym szczególnie istotne wydaje się oddziaływanie na komórki prezentujące antygen (APC – *antygen presenting cells*). I tak, komórki dendrytyczne o zmienionej morfologii i odmiennych właściwościach, powodowanych przez 1 α ,25(OH)₂D₃ i jej analogi, noszą miano *tolerogenic* i skutkują obniżeniem aktywności limfocytów T, która jest niezbędna w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Immunosupresja przy udziale 1 α ,25(OH)₂D₃ i jej analogów była demonstrowana na różnych modelach schorzeń autoimmunizacyjnych oraz w eksperymentalnych przeszczepach [171].

Badania wskazują na możliwość i celowość aplikacji kalcytriolu w przypadku takich schorzeń jak; choroby proliferacyjne, choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, zaburzenia funkcji układu dokrewnego oraz choroby metaboliczne układu kostnego [36, 212].

Oczywistym jest jednak, że hormon witaminowy w swojej naturalnej postaci nie może spełniać wymogów terapeutycznych z uwagi na silne „działanie wapniowe”, które mogłoby spowodować gwałtowny efekt hiperkalcemii i w konse-

kwencji wapnienie tkanek miękkich. Zatem wysiłki badaczy zmierzają do wyeksponowania korzystnych właściwości biologicznych hormonu witaminowego i zniwelowania niekorzystnego w tym wypadku „działania wapniowego” metodą selektywnych modyfikacji chemicznych jego struktury [39]. Dążąc do uzyskania idealnego hormonu spełniającego te wymogi zsyntetyzowano do tej pory około 2000 analogów witaminy D.

1.3.7. Witamina D a choroby układu sercowo naczyniowego

W latach 80-tych ubiegłego stulecia zidentyfikowano VDR w komórkach mięśniowych naczyń, kardiomiocytach oraz komórkach śródbłonna, i na tej podstawie zaliczono je do grona komórek docelowych (*target cells*) dla witaminy D [179, 180, 290]. Chociaż od tego czasu przeprowadzono wiele badań klinicznych i epidemiologicznych, jednakże dopiero w obecnym dziesięcioleciu ukazały się znaczące prace, w których wykazano zależność między występowaniem CVD a poziomem witaminy D w organizmie [182, 223, 245, 298, 299, 318, 319].

Strefa klimatyczna oraz przynależność do określonej rasy ma wpływ na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego w tym choroby nadciśnieniowej. Spostrzeżenia te pozostają w zgodzie z wcześniej rozpoznany działaniem regulacyjnym witaminy D w układzie renina-angiotensyna [154]. Badania Formana [61] wykazały zwiększone o 95% ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego u osobników z niedoborem witaminy D na poziomie niższym niż 15 ng/ml. Nadciśnienie, cukrzyca, otyłość oraz hyperlipidemia są od dawna uznane jako czynniki ryzyka dla miażdżycy. Wymienione kliniczne objawy korelują wyraźnie z występowaniem u pacjentów niedoboru witaminy D (kalcydiolu) [61, 114, 140, 243]. Z szeroko zakrojonych badań epidemiologicznych wynika, że u 77% pacjentów w Wielkiej Brytanii dotkniętych ostrym zawałem stężenie kalcydiolu w surowicy było na poziomie niższym niż 20 ng/ml [223]. Bardzo przekonujące dane kliniczne dotyczą też śmiertelności wśród pacjentów dializowanych, u których występuje upośledzony proces hydroksylacji kalcydiolu [150, 268]. Śmiertelność z powodu chorób układu sercowo naczyniowego jest u takich pacjentów nawet 20-krotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną [60].

2. CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Badania dotyczące miażdżycy są niezwykle trudne do realizowania w warunkach *in vivo*, ze względu na wyjątkową złożoność zachodzących procesów i bardzo długi czas rozwoju. Analiza materiału pochodzącego z sekcji, nawet przy użyciu zaawansowanych technik badawczych, pozwala jedynie na precyzyjną ocenę patologicznych zmian, które się dokonały w naczyniu. Wykorzystanie zwierząt doświadczalnych wprawdzie umożliwi badanie wpływu wybranego czynnika na rozwój miażdżycy, jednakże uzyskane efekty zawsze będą wypadkową interakcji wielu innych, bardziej lub mniej znanych czynników, oraz wypadkową działania różnych mechanizmów kontrolujących procesy miażdżycowe. Badania *in vitro* wydają się mieć przewagę nad pozostałymi ze względu na możliwość określenia i kontrolowania warunków, w jakich przebiega eksperyment. Niestety zawsze istnieje poważna trudność w formułowaniu na podstawie uzyskanych wyników jednoznacznych wniosków odnoszących się do warunków *in vivo*.

Poznanie roli komórek mięśniowych naczyń w powstawaniu zmian miażdżycowych jest kluczowe w profilaktyce tej choroby, a także dla opracowania metod służących opanowaniu jej progresji. Problem ten interesuje badaczy właściwie od dziesięcioleci i obecnie mamy pewność, że SMC aktywnie uczestniczą w formowaniu *neointimy* i w budowaniu *fibrous cap* przyczyniając się do niwelowania uszkodzeń powstałych w błonie wewnętrznej oraz do stabilizacji blaszki miażdżycowej. Z drugiej zaś strony, w zaawansowanych stadiach miażdżycy, SMC prawdopodobnie przyczyniają się do powstawania niestabilnej blaszki miażdżycowej poprzez uleganie apoptozie i czynnym udziale w degradacji elementów istoty międzykomórkowej. Ciągłe intrygująca i nie do końca wyjaśniona jest także rola SMC w procesach naprawczych, które zachodzą w naczyniu po kolejnych epizodach przerwania ciągłości blaszki miażdżycowej.

Zidentyfikowano liczne czynniki wzrostu, hormony i cytokiny, które występują w miejscu tworzenia zmian miażdżycowych. Poznano mechanizmy ich działania i określono regulacyjny wpływ na morfologię i ważne procesy fizjologiczne komórek mięśniowych. Jednakże dalecy jesteśmy od wyjaśnienia złożoności procesu miażdżycowego i chyba dalecy jesteśmy od opanowania progresji tej choroby.

Aktywny metabolit witaminy D - $1\alpha,25$ -dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol), oddziaływający na SMC podobnie jak inne hormony steroidowe za pośrednictwem VDR, może być substancją zaangażowaną w rozwój procesu miażdżycowego. Wobec niekompletnych, niejednoznacznych, a często nawet kontrowersyjnych danych literaturowych, badanie tego zagadnienia jest ważne zarówno ze względów poznawczych jak i terapeutycznych.

Dla rozpoznania oddziaływania suprafizjologicznych stężeń $1\alpha,25$ -dihydroksycholekalcyferolu na komórki mięśniowe aorty szczura w hodowli komórkowej postawiono następujące cele badawcze:

1. Dokonanie morfologicznej oceny (LM, FM, TEM, SEM) zmian związanych z modulacją fenotypową, ruchem, wzrostem, syntezą ECM oraz śmiercią SMC pod wpływem kalcytriolu.
2. Określenie efektu proliferacyjnego kalcytriolu.
3. Zbadanie wpływu kalcytriolu na występowanie apoptozy i nekrozy.
4. Ocena oddziaływania kalcytriolu w procesie formowania włókien sprężystych.
5. Określenie wpływu kalcytriolu na intensywność migracji komórek.
6. Oszacowanie regulacyjnego wpływu kalcytriolu na produkcję niektórych mediatorów procesu zapalnego.

Założono, iż wyniki uzyskane przy realizacji postawionych wyżej celów upoważnią do wnioskowania na temat roli zarówno SMC jak i kalcytriolu w patogenezie zmian miażdżycowych.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Izolacja SMC

Komórki mięśniowe izolowano z błony środkowej aorty grzbietowej noworodków szczurzych rasy Wistar. Każdorazowo do doświadczenia używano 10-15 zwierząt pochodzących z hodowli wsobnych.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację, następnie wycinano aortę grzbietową i umieszczano w pożywce hodowlanej MEM (*Minimal Essential Medium, Eagle'a, Biomed, Poland*). Wyizolowane aorty mechanicznie pozbawiano przydanki, płukano wielokrotnie w świeżym roztworze pożywki a następnie cięto na fragmenty długości około 1mm. Zastosowana procedura oraz projekt badań otrzymał akceptację lokalnej Komisji do Spraw Etyki.

Do izolacji komórek stosowano roztwór kolagenazy o stężeniu 3,0 mg/ml (*Collagenase Type IA, Sigma, USA*), a proces trawienia istoty międzykomórkowej zachodził w temperaturze 37°C z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Po upływie 15 min usuwano roztwór enzymu wraz z komórkami śródbłonna i fibroblastami przydanki. W kolejnym etapie, przy użyciu świeżego roztworu kolagenazy izolowano komórki mięśniowe obecne w błonie środkowej. Po upływie 1-1,5 h neutralizowano działanie enzymu dodając surowicę płodową (*Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma, USA*).

Uzyskaną zawiesinę komórek filtrowano przez siatkę nylonową o \varnothing 50 μ m w celu usunięcia resztek (*debris*) a następnie płukano dwukrotnie w PBS i wirowano (100xg przez 5 minut). Komórki zawieszano w pożywce wzbogaconej 10% dodatkiem surowicy płodowej i antybiotyku (penicylina 100 U/ml).

Żywotność SMC izolowanych w oparciu o wyżej opisaną metodę oceniana po każdej izolacji testem z błękitem trypanu wynosiła 90-95%. Liczebność pozyskanych komórek określano przy użyciu hemocytometru.

3.1.2. Hodowla komórkowa

Hodowle pierwotne i pasażowane (pasaże od 1 do 4) komórek mięśniowych prowadzono w pożywce Eagle'a z 10% dodatkiem surowicy płodów cielęcych i antybiotyku w standardowych warunkach (37°C, 95% wilgotności względnej, 5% CO₂).

Używano polistyrenowych naczyń hodowlanych (\varnothing 3,5 mm lub 6 mm *Petri dishes, Corning, USA*) na dnie których umieszczano sterylne mikroskopowe szkiełka nakrywkowe.

Medium hodowlane zmieniano co drugi dzień dodając za każdym razem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (*D1530 Sigma, USA.*). W doświadczeniach użyto kalcytriolu w stężeniach - 1, 10 lub 100 nmol/l, które zostały określone i wyselekcjonowane na podstawie wcześniej prowadzonych badań. Z uwagi na hydrofobowy charakter kalcytriolu macierzysty roztwór tego związku (*stock solution*) sporządzano w 95% EtOH. Finalna wartość stężenia etanolu w medium hodowlanym nie była jednak wyższa niż 0,1%, co powszechnie uznaje się za wartość dopuszczalną.

Kontrolą dla hodowli SMC traktowanych kalcytriolem były komórki rosnące bez dodatku witaminy i komórki rosnące w środowisku etanolu aplikowanego w odpowiednim stężeniu. Hodowle SMC prowadzono, a następnie oceniano z zastosowaniem metod morfologicznych, analitycznych i cytometrii przepływowej w okresie między 3 a 21 dniem. Jednak z uwagi na postawiony cel badań większość wyników pochodzi z eksperymentów przeprowadzonych na komórkach mięśniowych w hodowlach będących w logarytmicznej fazie wzrostu, czyli między 5 a 11 dniem.

3.2. Metody mikroskopowe

3.2.1. Mikroskopia świetlna

3.2.1.1. *Badania przyżyciowe*

SMC we wszystkich wariantach doświadczenia oceniano przyżyciowo za pomocą mikroskopu odwróconego każdorazowo przed zmianą pożywki.

3.2.1.2. *Preparatyka histologiczna*

Materiał hodowlany utrwalano bezpośrednio na szkiełkach nakrywkowych w metanolu (temp. -20°C) i rutynowo barwiono metodą H&E. Włókna elastynowe uwidacziano za pomocą barwienia orceiną. Skrawki półcienkie ($1,5\ \mu\text{m}$) sporządzane z bloczków eponowych dobarwiano roztworem błękitu toluidyny.

3.2.2. Immunofluorescencja

Technika immunofluorescencji została wykorzystana dla oceny zmian dotyczących ekspresji i lokalizacji białkowych składników budujących cytoszkielet i aparat kurczliwy komórek mięśniowych. Ponadto zastosowano ją dla wizualizacji chromatyny jądrowej a także włókien elastynowych i złogów wapniowych znajdujących się w przestrzeniach międzykomórkowych.

Komórki mięśniowe rosnące na szkiełkach nakrywkowych płukano dwukrotnie zimnym PBS, następnie przez 10 minut utrwalano w 100% metanolu w temp. -20 °C. Niespecyficzne reakcje immunologiczne blokowano za pomocą 1% FBS w PBS, przez 1 godzinę w temp. pokojowej.

Białka cytoszkieletu i białka kurczliwe zostały wyznakowane i uwidocznione przy zastosowaniu bezpośredniej metody immunofluorescencyjnej. Inkubację SMC z monoklonalnymi przeciwciałami dla tubuliny (*anti- α -tubulin monoclonal FITC-conjugated antibody*, Sigma, rozcieńczenie 1:200) prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. W podobny sposób wyznakowano α -aktynę (*anti- α -actin monoclonal FITC conjugated antibody*, Sigma, rozcieńczenie 1:500).

Elastynę, amorficzne białko będące składnikiem włókien sprężystych, wyznakowano stosując pośrednią metodę immunofluorescencyjną opartą na reakcji dwustopniowej. Jako pierwsze zostało użyte przeciwciało przeciw elastynie (*polyclonal rabbit anti-rat elastin*, Cedarlane, Kanada, rozcieńczenie 1:250). Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej przez 40 minut. Następnie hodowle (na szkiełkach nakrywkowych) płukano w PBS i przez 1 godzinę traktowano przeciwciałami zkonjugowanymi z fluorochromem (*chicken anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 fluorochrome*, Molecular Probes, USA, rozcieńczenie 1:200). Test kontrolny wykonano bez użycia przeciwciała pierwszorzędowego.

Złogi wapniowe w hodowlach SMC wyznaczano stosując specyficzny wskaźnik (*Calcium GreenTM-1*, Molecular Probes, USA) w stężeniu 5 μ M przez 20 min. w temperaturze pokojowej.

DNA wyznakowano stosując stabilny barwnik DAPI (*4'-6 diamidyno-2-fenyloindol*, Sigma), który tworzy fluorescencyjne kompleksy selektywnie wiążąc się z sekwencjami bogatymi w pary adenina-tymina.

Preparaty wykonane zgodnie z procedurami zalecanymi przez producentów płukano dwukrotnie w PBS w celu usunięcia nadmiaru płynów reagujących, następnie umieszczano na szkiełkach podstawowych z kroplą płynu chroniącego przed utratą fluorescencji (*anti-fade mounting medium*, Citifluor, Agar Int, U.K.).

Materiał oceniano i fotografowano przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse 800 używając odpowiedniego zestawu filtrów.

3.2.3. Mikroskopia elektronowa transmisyjna (TEM)

Po usunięciu podłoża hodowlanego, SMC płukano dwukrotnie PBS bezpośrednio w szalkach Petriego a następnie utrwalano płynem o składzie: 2,5% aldehyd glutarowy (GA), 0,15% kwas pikrynowy, 1,5% OsO₄, 3% sacharoza w 0,1% buforze kakodylanowym, pH 7,4. Utrwalanie następowało w temp. 4°C przez 2 godz., po czym hodowlę płukano 3x w buforze kakodylanowym. Następnie materiał traktowano przez 1 godzinę 1,5% kwasem taninowym, po czym odwadniano etanolem o wzrastającym stężeniu i prześwietlano tlenkiem propylenu.

Dla części materiału stosowano także odmienny sposób utrwalania, a procedura jest szczegółowo opisana w pracy opublikowanej przez autorkę [284].

Hodowlę po „zdjęciu” z powierzchni naczynia hodowlanego bez naruszenia jej struktury przestrzennej, poddawano kilkustopniowej procedurze przepajania żywicą epoksydową (*Epon 812, Merck*). Następnie zatapiano w żywicy i poddawano polimeryzacji w temp. 37°C. Skrawki półcienkie (1,5 μm) zostały wykonane przy użyciu ultramikrotomu (*Om U2, Reichert*), następnie barwione błękitem toluidyny i oceniane w mikroskopie świetlnym.

Skrawki ultracienkie (60 nm) zbierano na siatki miedziane pokryte formwarem, następnie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Ocena materiału i dokumentacja fotograficzna została wykonana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (*JEM 1200EX II, Jeol, Japonia*), a stosowane napięcie wynosiło 80 kV.

3.2.4. Mikroskopia elektronowa skaningowa (SEM)

Komórki mięśniowe rosnące na szkiełkach nakrywkowych po płukaniu PBS utrwalano 2% aldehydem glutarowym w 0,1 M buforze kakodylanowym z sacharozą (pH 7,2) kolejno przez 5 minut, 1 godzinę i 24 godziny za każdym razem podając świeżą miksturę utrwalającą i zmieniając temperaturę [281, 282]. Następnie materiał dodatkowo utrwalano przez 1 godzinę w 1% OsO₄, po czym odwadniano stopniowo w etanolu.

Suszenie w „punkcie krytycznym” przy użyciu ciekłego CO₂ wykonano bezpośrednio przed napyleniem złotem koloidowym w napylarce próżniowej (*Sputter coater, Balzers*).

Preparaty oceniano w elektronowym mikroskopie skaningowym (*Philips XL 30*) stosując napięcie 10 kV.

3.3. Cytometria przepływowa

3.3.1. Dynamika podziałów komórkowych

Do badania dynamiki podziałów komórkowych użyto ester dwuoctanu karboksyfluoresceiny (CFSE, *5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, *Molecular Probes, Eugene, OR, USA*). Związek ten jest niepolarną, niefluoryzującą pochodną fluoresceiny, który dyfunduje do wnętrza komórek, a następnie jest substratem dla wewnątrzkomórkowych esteraz. Powstała po hydrolizie fluoresceina o właściwościach fluoryzujących ulega długotrwałej retencji w komórce na skutek utworzenia wiązań kowalencyjnych z grupami aminowymi. Wraz z kolejnymi podziałami komórkowymi ilość barwnika, a tym samym jego fluorescencja ulega zmniejszeniu o połowę.

Roztwór podstawowy CFSE sporządzono przez rozpuszczenie w DMSO uzyskując stężenie 10 mM. Tuż przed użyciem do badań wykonano roztwór użytkowy w PBS, który po wprowadzeniu do hodowli miał ostateczne stężenie 10 μ M.

Komórki mięśniowe uzyskane na drodze izolacji enzymatycznej po 36 godzinach przywarły do dna naczynia hodowlanego i po tym czasie przeprowadzono inkubację z CFSE przez 10 min. w temp. 37°C. Następnie SMC płukano w roztworze PBS/0,1% BSA i dwukrotnie w medium hodowlanym. Pożywkę zmieniano co drugi dzień za każdym razem stosując $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w odpowiednim stężeniu (1, 10, 100 nmol/l). Po 10 dniach, SMC trypsynizowano, utrwalano 3,5% formaldehydem, płukano w PBS, a następnie zawieszano w roztworze PBS/0,1% BSA przechowując w ciemności w temp. 4°C.

Analizę cytometryczną wykonywano przy użyciu cytometru (*EPICS XL Coulter, USA*) wykorzystując laser emitujący światło o długości fali 488 nm.

3.3.2. Cykl komórkowy

Dla określenia odsetka SMC znajdujących się w określonych fazach cyklu komórkowego: G0/G1 oraz S+G2/M posłużono się metodą cytometrii przepływowej oznaczając zawartość DNA związanego z jodkiem propidyny (PI).

Komórki mięśniowe z hodowli kontrolnej i hodowli wystawionej przez 9 dni na działanie kalcytriolu w stężeniach 1, 10, 100 nmol/l izolowano trypsyną i płukano w PBS. Materiał utrwalano w 70% roztworze etanolu i przechowywano w temperaturze -20°C. Po odwirowaniu i przepłukaniu roztworem PBS, utrwalone komórki zawieszano w 1ml roztworu barwiącego o składzie: 800 μ l PBS, 100 μ l RNaza, 100 μ l PI. Analiza przy użyciu cytometru przepływowego (*EPICS XL, Coulter, USA*) była prowadzona po 30 minutowej inkubacji w ciem-

ności, w temperaturze 37°C. Dane z pomiarów analizowano przy pomocy programu Cylchred -wersja 1.2 (*Terry Hoy*).

3.3.3. Ocena apoptozy i nekrozy

W celu identyfikacji komórek mięśniowych ulegających apoptozie oraz oszacowania odsetka komórek podlegających temu procesowi w hodowli komórkowej wykorzystano właściwość fosfatydyloseryny (PS) do przemieszczania z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Eksternalizowana w trakcie apoptozy PS wiązana jest swoiście z Aneksyną V sprzężoną z izotocyjanianem fluoresceiny (*Annexin V-FITC, BD Pharmingen*).

Zawiesinę komórek mięśniowych przygotowano zgodnie z procedurą proponowaną przez producenta, a następnie 100 µl zawiesiny zawierającej 1×10^5 komórek inkubowano z 5 µl aneksyny i 5 µl jodku propidyny (PI) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Barwienie PI, który wiąże się z DNA komórek z uszkodzoną błoną pozwala na identyfikację komórek nekrotycznych.

Zastosowanie opisanej procedury pozwala wyróżnić następujące populacje komórek:

- komórki żywe, niewiążące aneksyny i PI (AN-/PI-)
- komórki wczesnoapoptotyczne, wiążące aneksynę i niewiążące PI (An+/PI-)
- komórki późnoapoptotyczne lub nekrotyczne, wiążące aneksynę i PI (An+/PI+)

Próbki analizowano w cytometrze przepływowym (*LSRI, Becton-Dickinson*) przy użyciu wiązki lasera o długości fali 488 nm.

3.3.4. Analiza poziomu beta-1 integryny

Po 7 dniach hodowli, SMC rosnące w środowisku kalcytriolu i SMC z hodowli kontrolnej przepłukiwano ciepłym roztworem PBS i trypsynizowano (37°C). Po procedurze trypsynizacji, zawiesinę komórek płukano roztworem PBS, następnie komórki w liczbie 5×10^5 inkubowano z mysimi przeciwciałami monoklonalnymi (*Ig G1, klon MAR4, Becton Dickinson*) skierowanymi przeciw integrynie beta-1, sprzężonymi z allofikocyjaniną (APC). Po 30 minutowej inkubacji ekspresję beta-1 integryny oceniano cytometrycznie (*LSRI, Becton-Dickinson*).

Wykorzystywane były lasery emitujące światło o długości fali 488 nm oraz 633 nm. Zbierano sygnał *Forward Scatter*, *Side Scatter*, a uzyskane dane analizowano używając oprogramowania WinMDI 2.9.

3.3.5. Analiza wydzielania cytokin zapalnych

Pomiaru poziomu cytokin prozapalnych: IFN- γ , TNF- α , IL-2 i IL-6 dokonano w supernatantach z hodowli pierwotnych i pasażowanych komórek mięśniowych poddanych działaniu $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nmol/l. Supernatanty zbierano z hodowli stymulowanej przez 48 godz. kalcytriolem po każdorazowej zmianie pożywki aż do 9 dnia trwania hodowli. Analogicznie postępowano z hodowlą rosnącą bez dodatku witaminy.

Pomiarów dokonano przy użyciu zestawu (*Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kits, Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, Ca*), wg procedury podanej przez producenta. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym (*LSRI, Becton-Dickinson*).

Wyniki pomiarów oznaczanych cytokin analizowano przy użyciu programu *BD CBA Analysis Software*. Krzywe standardowe dla mierzonych cytokin mieściły się w zakresie stężeń 20-5000 pg/ml.

3.4. Metody analityczne

3.4.1. Chromatograficzna analiza (HPLC) zawartości adenylanów

Komórki mechanicznie usuwano z dna szalki Petriego i wirowano (3 minut 300xg). Uzyskany osad zawieszano w 1,4 M HClO₄ i inkubowano w lodzie przez 15 minut w celu ekstrakcji nukleotydów, po czym wirowano (5 minut, 20000xg, temp. 4°C). Supernatant zobojętniano do pH 5-6 przy użyciu 3 M K₃PO₄. Uzyskany ekstrakt przeznaczono do dalszej analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC – *high performance liquid chromatography*).

Pomiar był wykonywany przy użyciu zestawu chromatograficznego (*Merck-Hitachi/Hewlett-Packard*). Próbkę (20 μ l) rozdzielano przy użyciu termostatowej kolumny wysokociśnieniowej. Dane chromatograficzne archiwizowano i analizowano przy użyciu programu *HPChem firmy Hewlett-Packard* [231]. Wartości stężenia ATP (nmol/próba) przeliczano na białko uzyskując wartości stężenia ATP wyrażone w nmol/mg białka.

3.4.2. Oznaczanie zawartości białka metodą Bradford

Całkowitą zawartość białka w hodowli komórkowej mierzono spektrofotometrycznie (przy długości fali 595 nm) z zastosowaniem metody Bradford [29, 231]. W tym celu wykorzystano osad pozostały po ekstrakcji nukleotydów roz-

puszczony w 0,5 M NaOH, błękit brylantynowy (*Coomassie Brilliant Blue G-250, PoCH*) i albuminę (*Sigma-Aldrich*) jako białko wzorcowe.

3.5. Ocena proliferacji z zastosowaniem [³H]-tymidyny

Posłużono się metodą autoradiograficzną z zastosowaniem tymidyny znakowanej trytem, zdolnej do wbudowania się do nowosyntetyzowanego DNA. Ilość wbudowanej [³H]-tymidyny jest proporcjonalna do efektywności syntezy DNA przez populację komórek i jest wskaźnikiem rozrostu komórkowego.

Komórki mięśniowe (pasaż 2 i 3) hodowano przez 7 dni w mikropłytkach 96-dółkowych w obecności kalcytriolu o stężeniu 10 nmol/l. Wyjściowa koncentracja komórek w hodowli wynosiła 5×10^5 SMC/ml. Kontrolę stanowiły komórki mięśniowe hodowane bez dodatku witaminy. Następnie do pożywki hodowlanej dodano tymidynę znakowaną trytem o aktywności 2,0 Ci/mmol w ilości 20 μ l (*[metyl ³H] thymidyne, Amersham Biosciences, U.K.*). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 12 godzin.

Po inkubacji komórki zbierano na filtr celulozowy przy użyciu zbieracza komórek (*Skatron, Oslo, Norwegia*). Bibułę suszono, a kążki bibuły zawierające wyznakowane trytem jądra komórkowe umieszczano w naczynkach zawierających płyn scyntylicyjny (*Opti-Scint, WallacOy, Turku, Finlandia*).

Pomiarów aktywności inkorporowanej do komórek tymidyny znakowanej trytem dokonywano przy użyciu czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej (*LSC-Beckman Instruments, Inc, CA*). Kontrolę stanowiły komórki mięśniowe hodowane bez dodatku kalcytriolu. Uzyskano wartości cpm (*counts per minute*) z korektą tła.

3.6. Ocena statystyczna wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Excel (Microsoft Office, 2003). Wykresy słupkowe przedstawiają wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Do porównania wartości średnich wykorzystano test t-Studenta i przyjęto poziom istotności granicznej $P \leq 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Ocena morfologiczna komórek mięśniowych w hodowli

Komórki mięśniowe izolowane enzymatycznie z aort noworodków szczurzych były oceniane od momentu przyłgnięcia i ustabilizowania się na powierzchni naczynia hodowlanego do 21 dnia trwania hodowli.

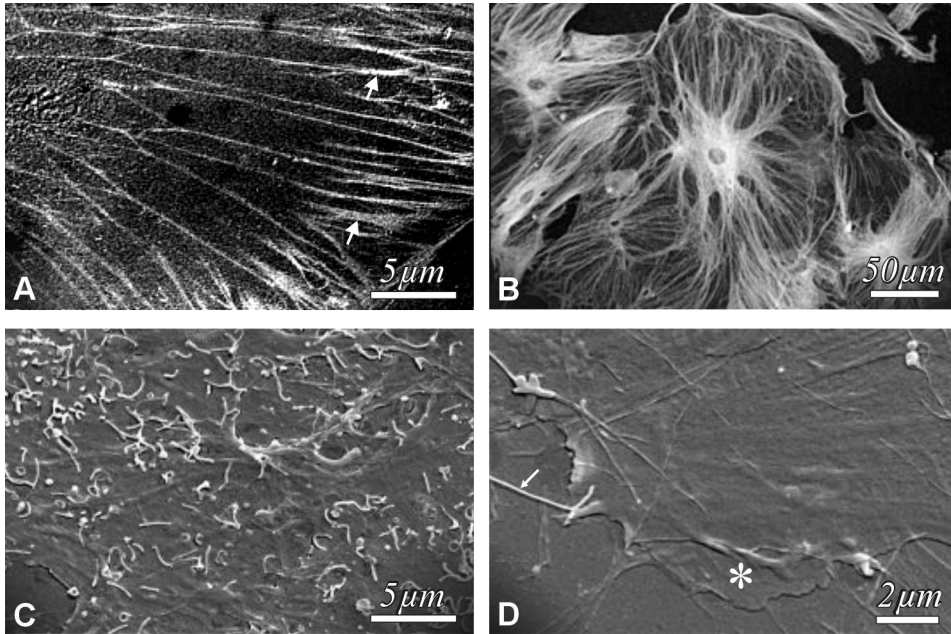
Przez bardzo krótki czas, tuż po zainicjowaniu hodowli i w trakcie „zakotwiczenia” się do dna naczynia hodowlanego, czyli przez około 2 doby komórki mięśniowe wyraźnie przejawiały określone cechy morfologiczne związane z kurczliwością. Stadium to odpowiadało fenotypowi *contractile*. Po tym czasie następował proces intensywnych przemian nazywany modulacją fenotypową albo odróżnicowaniem. Komórki sukcesywnie traciły cechy charakteryzujące fenotyp *contractile* i zaczęły przejawiać cechy charakterystyczne dla fenotypu *synthetic*. Modulacja przebiegała w różnym tempie, z różnym nasileniem i nie dotyczyła całej populacji komórek w hodowli, lecz jej części. Można szacować, że po około 5 dniach więcej niż 70% SMC w hodowli pierwotnej uległo odróżnicowaniu i został osiągnięty stan konfluencji. W tym też czasie, czyli po około 5 dniach zaczęto obserwować proces przeciwny – spontaniczną transformację SMC w kierunku fenotypu *contractile*.

Zmiany fenotypu SMC pociągały za sobą zmiany behawioralne dotyczące adhezji, migracji i proliferacji. Typowy dla SMC brak zahamowania kontaktowego podczas kolejnych podziałów mitotycznych umożliwiał tworzenie hodowli wielowarstwowych (*mutilayer*). Badania mikroskopowe pozwoliły na wyodrębnienie trzech typów morfologicznych komórek mięśniowych gładkich, które odpowiadają ich określonym stanom fizjologicznym.

4.1.1. Subpopulacje komórek mięśniowych

4.1.1.1. Fenotyp „*synthetic*”

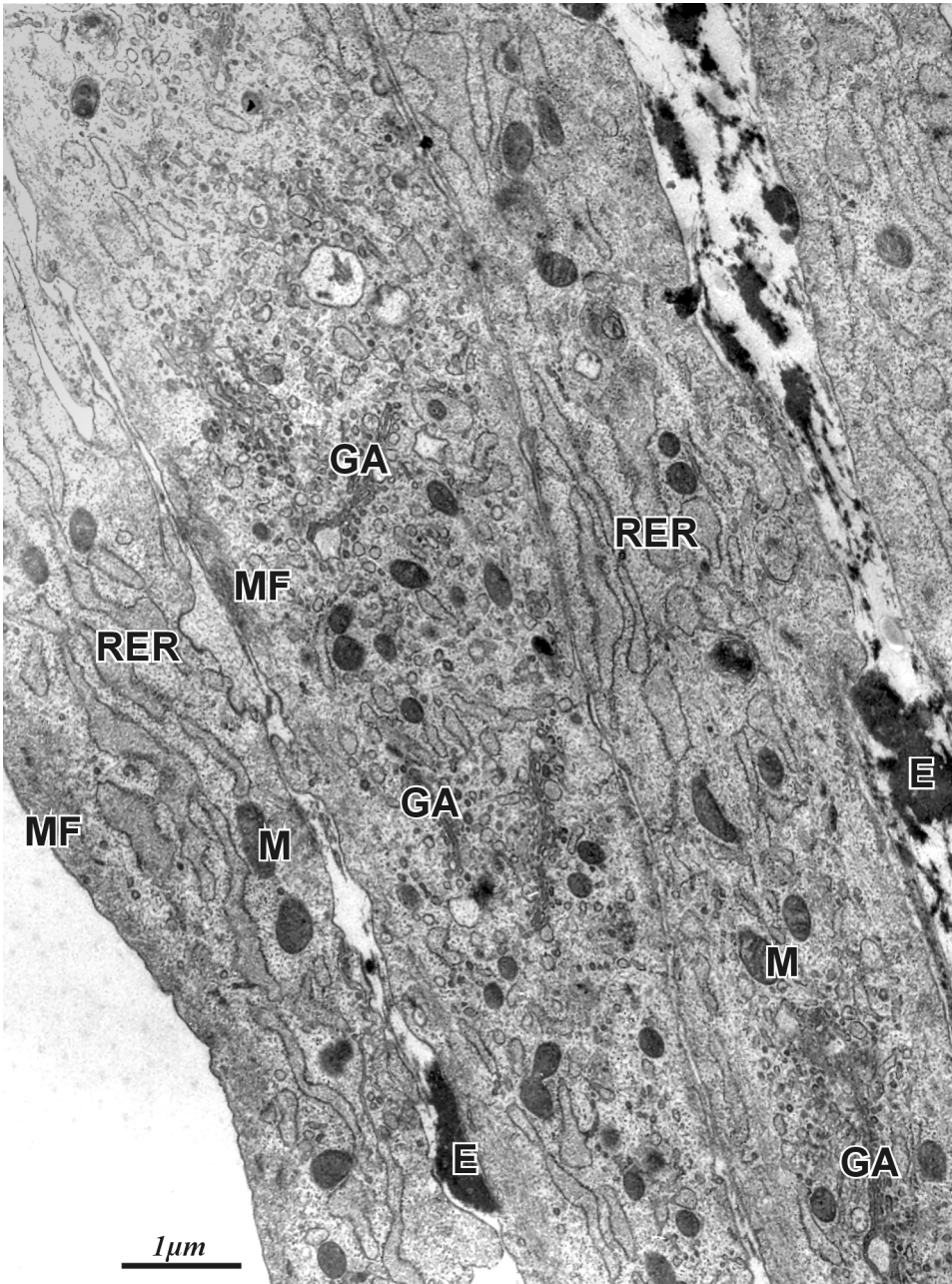
Na ryc.10. przedstawiono typowe morfologiczne cechy komórek mięśniowych o fenotypie *synthetic*. Uwagę zwracają wyraźne własności „rozlewania” się po podłożu (*spreading*) oraz duże rozmiary komórek. Słabo wyrażona fluorescencja α -aktyny (ryc. 10A) oraz charakterystyczny, promienisty układ mikrotubul (ryc. 10B) u obserwowanych komórek, świadczą o ich niewielkich możliwościach kurczenia.



Ryc. 10. Komórki mięśniowe po spontanicznej modulacji w kierunku fenotypu *synthetic* w obrazie FM (A,B) i SEM (C,D). Filamenty aktynowe współtworzą liczne miejsca kontaktu z powierzchnią naczynia (A↓). Układ mikrotubul w obrazie mikroskopu fluorescencyjnego (B). Wyraźnie „rozłana” na podłożu komórka mięśniowa posiadająca na powierzchni liczne mikrokosmki (C). Lamellipodia zaznaczono na rycinie gwiazdką (D*), strzałka wskazuje lokalizację filopodiów (D↓).

Fig. 10. Smooth muscle cells after spontaneous modulation toward “synthetic” phenotype. FM (A,B) and SEM (C,D) examination. The actin filaments terminate at focal adhesions, where the cell adheres to the surface (A↓). α -tubulin FITC distribution under fluorescence microscope (B). Spread SMC with numerous microvilli (C). Lamellipodia indicated by asterisk (D), filopodia by arrow (D↓).*

W obrazie mikroskopu skaningowego, na powierzchni błony komórkowej, szczególnie w rejonie jądra komórkowego, widoczne były liczne mikrokosmki (*microvili*) (ryc. 10C). Obserwowano także wyraźnie uformowane wypustki cytoplazmy, które odgrywają ważną rolę w procesie migracji poprzez tworzenie miejsc kontaktu między komórkami oraz między komórką i ECM (ryc. 10D). Były to blaszkowate wypustki cytoplazmy *lamellipodia* oraz cienkie, nitkowate wyrostki z aktynowym rdzeniem *filopodia*. Na elektronogramach umieszczonych w dalszej części pracy, gdy jest rozważane zagadnienie migracji SMC (ryc. 41) można będzie dostrzec, iż budowa lamellipodium i filopodium jest związana ze zmianami w organizacji aktynowego cytoszkieletu.



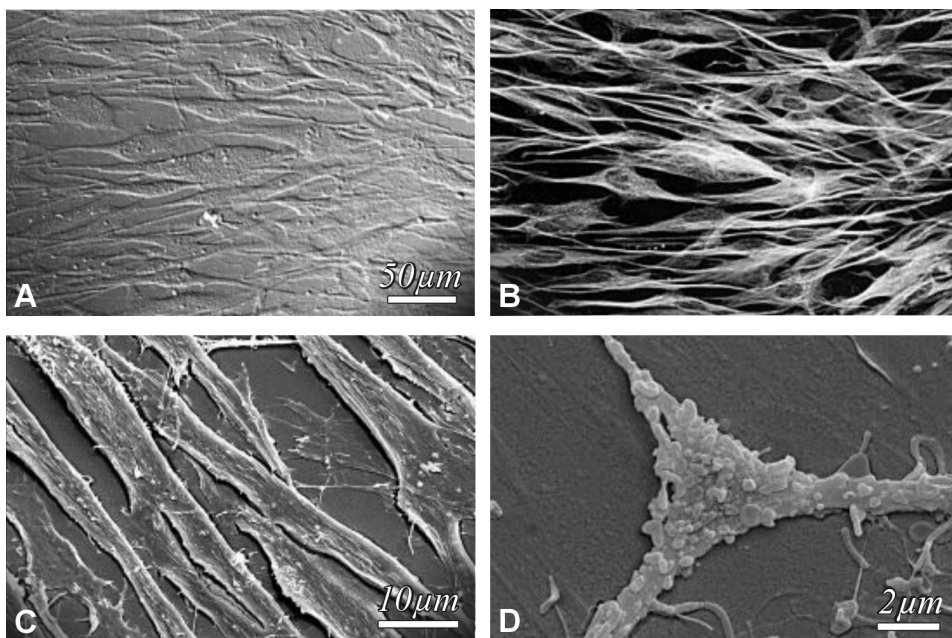
Ryc. 11. Ultrastruktura zorientowanych równolegle SMC o fenotypie *synthetic*. Na terenie cytoplazmy komórek mięśniowych obecna jest dobrze rozbudowana siateczka endoplazma szorstka (RER), wyraźnie zaznaczone struktury aparatu Golgiego (GA) oraz liczne mitochondria (M). Nieliczne miofilamenty (MF) występują w częściach peryferycznych komórek. W przestrzeniach między komórkami zlokalizowane są elementy istoty międzykomórkowej zawierające amorficzną elastynę (E). SMC o fenotypie *synthetic* są pozbawione błony podstawnej.

Fig.11. Ultrastructure of "synthetic" SMCs oriented in parallel arrays. Cytoplasm is largely filled by abundant rough endoplasmic reticulum (RER), prominent Golgi apparatus (GA) and numerous mitochondria (M). These cells have only little appearance of peripherally organized myofilaments (MF). Extracellular matrix including amorphous elastin (E) is located in extracellular spaces. SMC exhibiting "synthetic" phenotype are entirely devoid of basement membrane.

Spostrzeżenia na temat modulacji fenotypowej dokonane przy pomocy różnych technik mikroskopii świetlnej korespondują z obserwacjami wykonanymi na poziomie subkomórkowym przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Na terenie cytoplazmy komórek mięśniowych o fenotypie *synthetic* stwierdzono obecność struktur nierozdzielnie związanych z intensywnym metabolizmem komórkowym (ryc. 11). Bogato rozbudowany system siateczki endoplazmatycznej szorstkiej, duża liczba profili mitochondrialnych, liczne struktury Golgiego oraz wolne rybosomy były organellami dominującymi na przekrojach komórek ocenianych pod względem ultrastruktury. Miofilamenty będące charakterystycznym elementem aparatu kurczliwego komórek mięśniowych występowały nielicznie, zwykle lokując się pod plazmalemą. Jądra komórkowe o wydłużonym kształcie zawierały euchromatynę typową dla komórek aktywnych metabolicznie oraz jąderka.

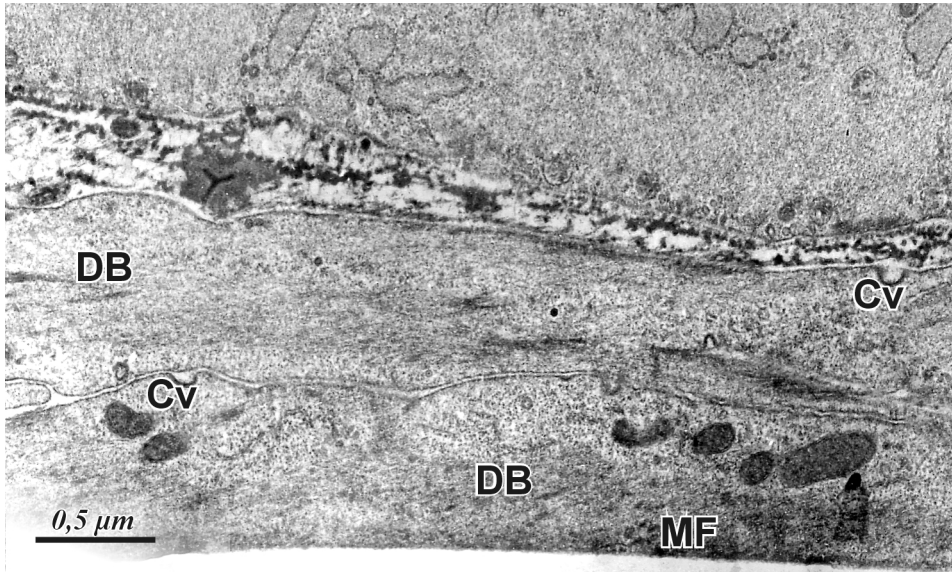
4.1.1.2. Fenotyp „contractile”

Przedstawione na rycinie 12, SMC o charakterystycznym kształcie wrzeciona (*spindle shaped*) posiadały morfologiczne cechy odpowiadające komórkom mięśniowym budującym błonę środkową ściany naczyń (*differentiated, mature*). Różniły się od wcześniej opisanych SMC typu *synthetic* nie tylko kształtem i wielkością (były mniejsze), ale także właściwościami przylegania do podłoża. Na powierzchni występowały mniej liczne i słabiej wykształcone mikrokosmki.



Ryc. 12. Wrzecionowate komórki mięśniowe przejawiające fenotyp *contractile* w obrazie mikroskopu kontrastowo-fazowego (A), fluorescencyjnego (B) i elektronowego mikroskopu skaningowego (C,D).

Fig. 12. Spindle-shaped SMC revealed “contractile” phenotype under phase-contrast light microscope (A) fluorescence microscope (B) and scanning electron microscope (C,D) examination.

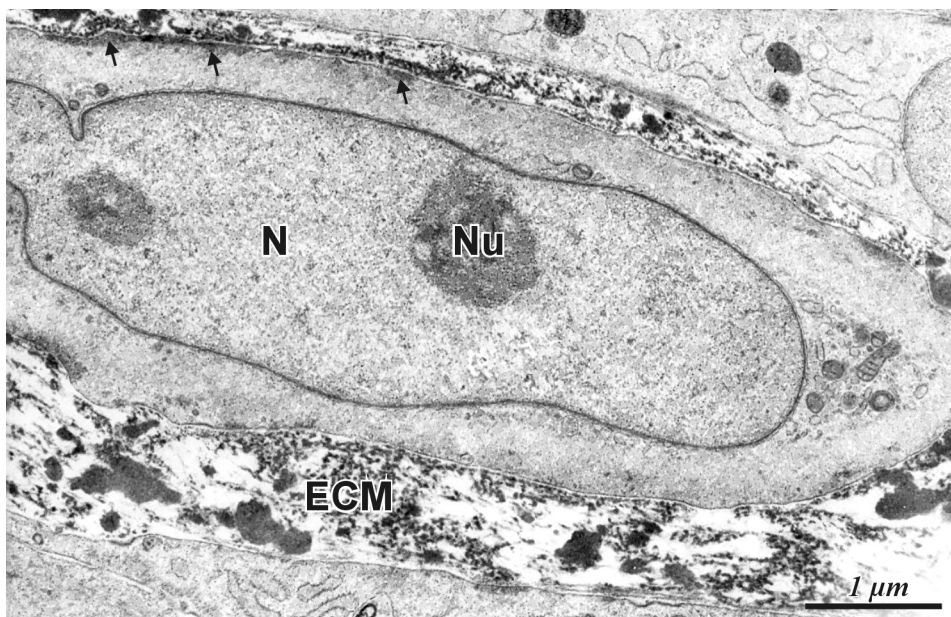


Ryc. 13. Ultrastruktura komórek mięśniowych w 9-dniowej hodowli kontrolnej reprezentujących fenotyp *contractile*. Uwagę zwracają gęsto upakowane miofilamenty (MF) przebiegające wzdłuż długiej osi komórki. Widoczne są również ciała gęste (DB) i kaweole (Cv) typowe dla ultrastruktury zróżnicowanych SMC.

Fig. 13. Ultrastructure of SMCs representing differentiated, "contractile" phenotype observed in control culture (9 days). Note tightly packed arrays of myofilaments (MF) running along the long axis of the cell. Typical ultrastructural features of contractile SMC - dens bodies (DB) and caveolae (Cv) are visible.

Badanie mikroskopowo-elektronowe pozwoliło wyodrębnić i scharakteryzować komórki mięśniowe o fenotypie *contractile* na podstawie cech ultrastrukturalnych. Obserwowano gęsto upakowane miofilamenty o równoległym przebiegu wzdłuż długiej osi komórki oraz ciała gęste (*dens bodies*). Cytoplazma komórek o cechach *contractile* zawierała nieliczne organelle komórkowe związane z syntezą.

Analizując obrazy hodowli SMC wykonane techniką TEM często można było dostrzec regiony w sąsiedztwie błony komórkowej szczególnie mocno przylegające do ECM. Takie struktury morfologiczne, zwane *focal adhesions*, tworzone głównie przez pęczki filamentów aktynowych służą komórkom z dobrze rozwiniętym aparatem kurczliwym do „kotwiczenia” w podłożu (ryc.14). Wrzecionowatego kształtu SMC o fenotypie *contractile* posiadają niewielką zdolność do migracji, dlatego też nie obserwowano u nich lamellipodiów, natomiast dzięki wyznakowaniu elementów cytoszkieletu można było obserwować bogato rozwinięte włókna naprężeniowe stabilizujące fenotyp (ryc. 20).



Ryc. 14. Ultrastrukturalne cechy zróżnicowanej komórki mięśniowej reprezentującej fenotyp *contractile* w obrazie transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Widoczny układ miofilamentów charakterystyczny dla przekroju poprzecznego SMC. Strzałki wskazują miejsca występowania gęsto upakowanych filamentów aktynowych, które są strukturalnym wyznacznikiem kontaktu z ECM (↓). W przestrzeniach między sąsiadującymi komórkami obecne są elementy istoty międzykomórkowej (ECM). Jądro komórkowe (N), jąderko (Nu).

Fig. 14. Electron micrograph illustrating the ultrastructural features of differentiated, “contractile” SMCs in culture. Typical arrangement of myofilaments in transverse section of SMCs is clear. Note densely packed actin filaments in focal adhesions to ECM indicated by arrows (↓). Extracellular matrix (ECM) elements are visible between neighboring cells. Nucleus (N), nucleolus (Nu).

4.1.1.3. Fenotyp „intermediate”

W hodowli komórkowej SMC często prezentują fenotyp o cechach pośrednich określany mianem *intermediate*, który zawiera zarówno elementy budowy fenotypu *contractile* jak i *synthetic*. Badanie morfologii tych komórek za pomocą techniki kontrastowo-fazowej, fluorescencyjnej i skaningowej pozwoliło zauważyć ich cechy, odmienne od wcześniej opisanych, a dotyczące przede wszystkim kształtu, właściwości przylegania oraz kontaktu z sąsiednimi komórkami.

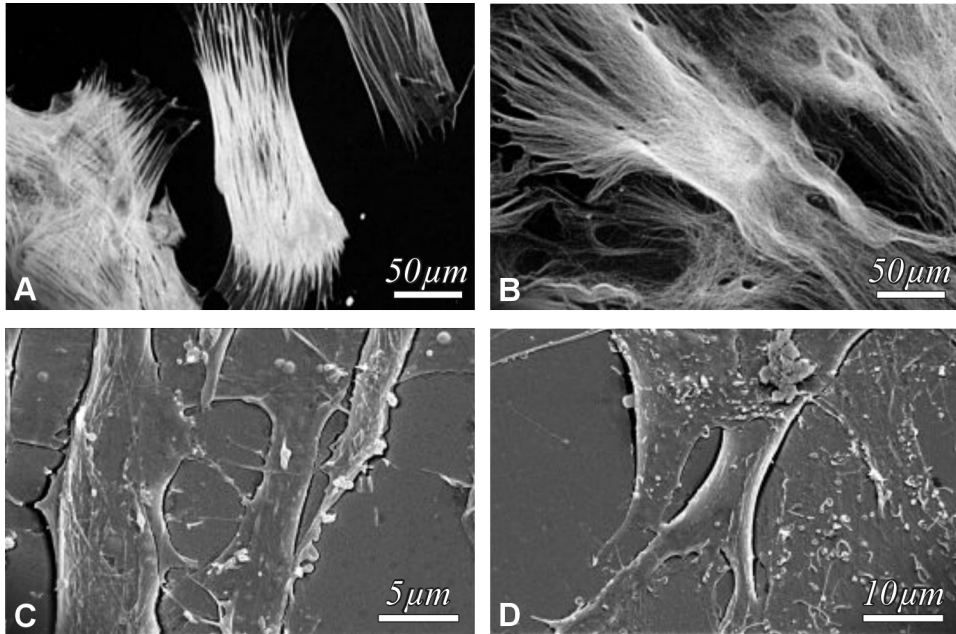
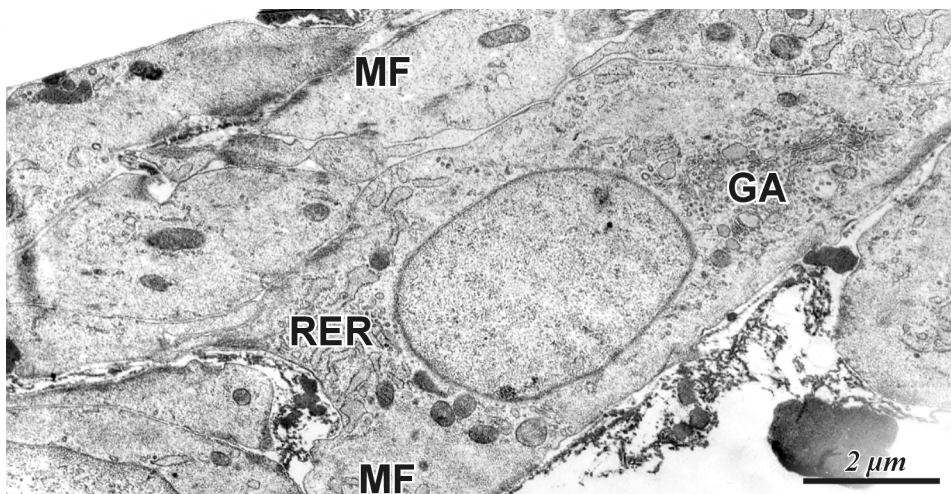


Fig. 15. Komórki mięśniowe przejawiające fenotyp *intermediate* w obrazie mikroskopu fluorescencyjnego (A,B) i elektronowego mikroskopu skaningowego (C,D). Włókna naprężeniowe komórek mięśniowych są widoczne dzięki wyraźnej reakcji z α -SM aktywną.

Fig. 15. "Intermediate" phenotype of smooth muscle cells under fluorescence microscope (A,B) and scanning electron microscope (C,D) examination. Cells maintained well-defined smooth muscle α actin-positive stress fibers (A).

Badania ultrastruktury SMC o fenotypie *intermediate* wykazały obecność na terenie cytoplazmy zarówno elementów aparatu kurczliwego jak i struktur zaangażowanych w procesy metaboliczne. Komórka mięśniowa przedstawiona w centrum elektronogramu (ryc. 16) posiada dobrze widoczne miofilamenty, jednakże w obszarze wokółjądrowym obserwujemy błony siateczki szorstkiej, profile mitochondrialne i stosunkowo dobrze rozbudowane struktury Golgiego.



Ryc. 16. Ultrastruktura komórek mięśniowych w hodowli reprezentujących fenotyp *intermediate*. Cytoplazma komórek zawiera stosunkowo dobrze rozbudowane błony siateczki endoplazmatycznej szorstkiej (RER), struktury aparatu Golgiego i mitochondria, lecz jednocześnie znaczną jej część wypełniają skupiska miofilamentów (MF).

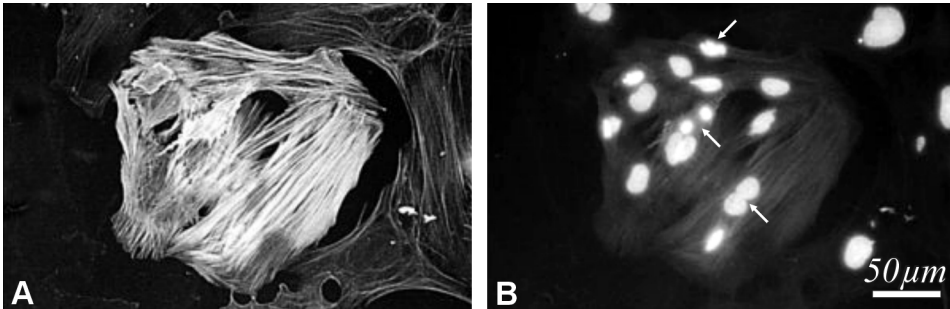
Fig. 16. Ultrastructure of "intermediate" phenotype of smooth muscle cells in culture. The cytoplasm of the cells is filled with rough endoplasmic reticulum (RER) well developed Golgi complex (GA), and mitochondria, but a certain portion of the cells retained myofibril bundles (MF).

W podsumowaniu obserwacji dotyczących różnorodności fenotypowej komórek mięśniowych należy podkreślić, że wymienione trzy typy morfologiczne występują i są obserwowane jednocześnie w pierwotnej hodowli SMC. Jednakże udział liczbowy poszczególnych fenotypów w hodowli zmienia się w zależności od intensywności procesów różnicowania (*differentiation*) i odróżnicowywania (*redifferentiation*).

4.2. Zmiany morfologii SMC pod wpływem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

4.2.1. Modyfikacja charakteru wzrostu

Suprafizjologiczne stężenia $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zakresie od 1-100 nmol/l w istotny sposób zmieniały charakter wzrostu komórek mięśniowych. Każdorazowo podczas zmiany pożywki dokonywano przyżyciowej oceny komórek mięśniowych w hodowli kontrolnej i traktowanej kalcytriolem w mikroskopie świetlnym odwróconym.



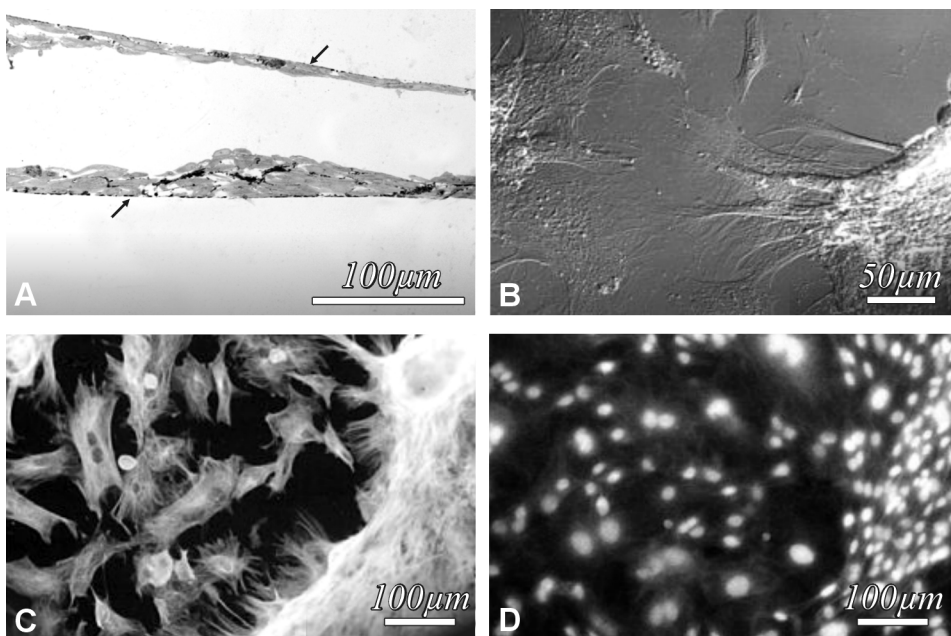
Ryc. 17. Morfologiczne cechy i charakter wzrostu SMC w hodowli rosnącej bez dodatku kalcytriolu. Komórki odmienne fenotypowo przejawiają różną ekspresję α -aktyny. Włókienka aktynowe w komórkach mięśniowych o fenotypie *synthetic* są słabo widoczne, a ich układ jest chaotyczny (17A). Wybarwienie jąder komórkowych DAPI pozwala wskazać komórki (\downarrow) w trakcie różnych faz podziału mitotycznego (17B).

Fig. 17. Morphological features and growth pattern of aortal SMCs in control primary culture. Smooth muscle α -actin expression in different two phenotypes of SMCs characterized by immunocytochemistry. Weakly stained and randomly organized actin filaments are present in SMCs revealed "synthetic" state (17A). DAPI intercalating with DNA make able to see cells (\downarrow) during different phases of mitotic mitotic divisions (70B).

Już na tym etapie badań można było zaobserwować istotne różnice dotyczące morfologii komórek, adhezji, migracji oraz intensywności podziałów komórkowych.

Na rycinie 17A przedstawiono morfologiczne cechy komórek mięśniowych i charakter ich wzrostu w hodowli rosnącej w standardowych warunkach opisanych w rozdziale „materiał i metody”. Filamenty aktynowe aparatu kurczliwego tych komórek wyznakowano za pomocą przeciwciał dla α -aktyny sprzężonych z FITC. α -aktyna będąca markerowym białkiem dla mięśniówki gładkiej naczyń jest jednocześnie wyznacznikiem stopnia zróżnicowania tych komórek. Silna ekspresja α -aktyny występuje w SMC o kształcie wydłużonym, które zbudowały kilka pokładów oraz w komórkach dzielących się. Komórki posiadające bogato rozbudowany aparat kurczliwy prezentują fenotyp typu *contractile*. W części obwodowej preparatu obecne są komórki o nieokreślonym kształcie, słabo wyrażonej ekspresji α -aktyny, wyraźnie rozlewające się po podłożu (*spreading*). Te komórki mięśniowe o słabo wyrażonych cechach kurczliwości prezentują fenotyp typu *synthetic*.

Wyznakowanie jąder komórkowych (na tym samym preparacie) barwnikiem DAPI pozwoliło zidentyfikować komórki znajdujące się w różnych fazach podziału mitotycznego i odróżnić od komórek znajdujących się w interfazie cyklu komórkowego (ryc. 17B). Obrazy dają też dodatkowe informacje o rozmiarach SMC, które są wyraźnie zależne od fenotypu, który te komórki prezentują.



Ryc. 18. Komórki mięśniowe w hodowli kontrolnej (9 dni) formujące charakterystyczny układ zwany „hills and valleys”. Preparat półcienki (1,5 μm), krojony w płaszczyźnie prostopadłej, zabarwiony błękitem toluidyny uwidacznia bliski kontakt pomiędzy SMC. Strzałki wskazują miejsce przylegania do naczynia hodowlanego (\downarrow). Włókna sprężyste znajdujące się w przestrzeniach międzykomórkowych są widoczne w postaci ciemnych amorficznych struktur (A). Hodowla w obrazie mikroskopu kontrastowo-fazowego (B). Wizualizacja cytoskieletu po reakcji z anti- α -tubuliną FITC (C). Jądra SMC uwidocznione metodą DAPI (D).

Fig. 18. “Hills and valleys” appearance in control culture of smooth muscle cells (9 days). Light microscopy image of toluidine blue stained semi-thin (1.5 μm) transverse sections. Arrows show the regions of adhesion to Petri dish (\downarrow). Characteristic close contact occurring between the cells is visible. Elastic fibers in extracellular spaces are visualized as black aggregates (A). SMC culture viewed under phase-contrast light microscope. (B). Cytoskeleton of SMCs visualized by reaction with anti- α -tubulin FITC (C). SMC nuclei stained with DAPI (D).

W celu wieloaspektowej oceny morfologicznej komórek w hodowli wykonano różnego typu preparaty trwale posługując się odmiennymi technikami mikroskopowymi. Cennych informacji dostarczyła analiza preparatów półcienkich (1,5 μm) przygotowanych z materiału zatopionego w żywicy epoksydowej (ryc. 18A i ryc. 19A). Na odpowiednio wykonanych i dobarwionych błękitem toluidyny skrawkach uzyskiwano obraz hodowli ciętej prostopadłe do powierzchni naczynia hodowlanego.

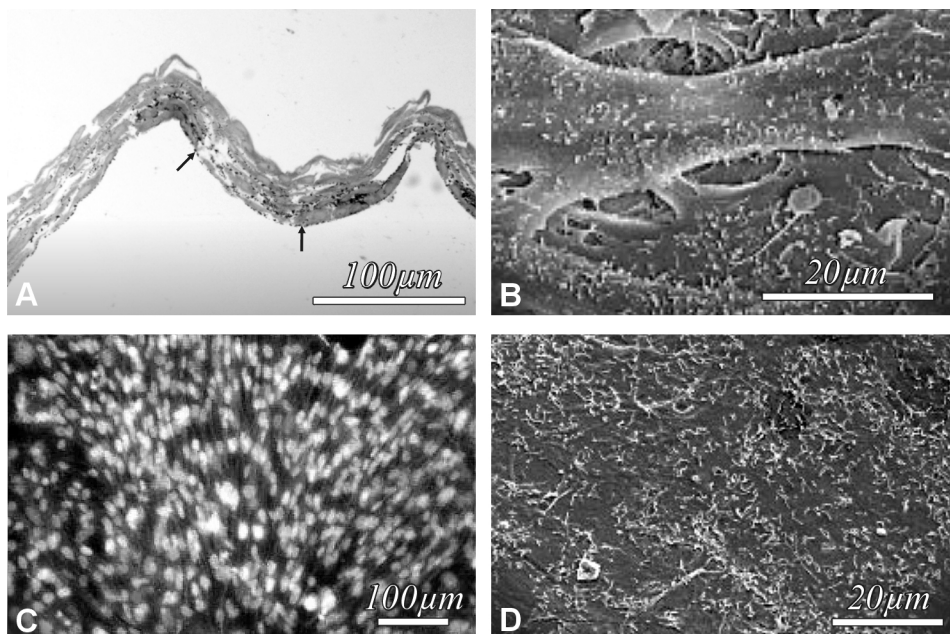


Fig. 19. Komórki mięśniowe rosnące w środowisku $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (9 dni). Zwraca uwagę, odmienny niż wariacje kontrolnym, typ wzrostu komórek i zaburzenia w układzie włókien sprężystych. SMC traktowane kalcytriolem formują wiele warstw o równomiernym układzie (preparat półcienki, 1,5 μm , barwienie błękitem toluidyny). Strzałki wskazują miejsca przylegania do dna naczynia hodowlanego (A). Przestrzenna organizacja wielopokładowej hodowli SMC widoczna w obrazie SEM i FM nie podlega zmianom przez długi czas trwania hodowli (B,C). Jądra komórkowe po barwieniu DAPI dobrze uwidaczniają wielopokładowy równomierny wzrost SMC (C). Intensywnie rozbudowany układ mikrokosmków na powierzchni SMC (D).

Fig. 19. Smooth muscle cells in $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated culture (9 days). Note changed cell growth and altered deposition of elastic fibres. Calcitriol-treated SMCs exhibit uniform, highly abundant multilayer in culture (semi-thin section, 1.5 μm , toluidine blue staining). Arrows show the regions of adhesion to Petri dish (A). The three-dimensional arrangement of smooth muscle cells within the culture become unchanged under prolonged cultivation, SEM (B) FM (C). SMC nuclei stained with DAPI indicate uniform multilayered growth pattern (C). Abundant microvilli on the surface of SMCs (D).

Na rycinie 18A i 19A można zaobserwować miejsca szczególnie intensywnie wybarwione, które odpowiadają włóknom sprężystym, zlokalizowanym w przestrzeniach międzykomórkowych. W skrawkach ultracienkich elastynowa komponenta włókien sprężystych widoczna jest w postaci elektronowo nieprzeziernych złożeń (ryc. 45, 47, 48). Efekt taki, widoczny na elektronogramach niniejszej pracy, uzyskano dzięki zmodyfikowaniu procedury przygotowującej

materiał do badań polegającej na wykorzystaniu kwasu taninowego i pikrynowego.

Bardzo wcześnie, między 4 a 6 dniem w hodowli kontrolnej widoczne były liczne miejsca, gdzie SMC po kolejnych podziałach mitotycznych nawarstwiały się tworząc grudkowate struktury (*nodule*) otoczone strefą komórek luźno rozlokowanych. W ciągu kilku następnego dnia prowadzenia hodowli nierównomierny układ komórek stawał się coraz bardziej wyraźny. Na rycinie 18 (A-D) oraz rycinie 31 (A,B) przedstawiono charakterystyczny typ wzrostu SMC w hodowli, potocznie nazywany *hills and valleys*. Obrazy uzyskano dzięki wykorzystaniu różnych sposobów preparatyki materiału i kilku technik mikroskopowych.

W hodowli SMC traktowanej kalcytriolem (w zakresie stężeń 1–100 nmol/l) obserwowano odmienny charakter wzrostu i nietypowy układ komórek. Komórki mięśniowe po upływie około 5 dni od zainicjowania hodowli osiągnęły stan konfluencji. Przez następne 5–6 dni, na skutek intensywnej proliferacji i wzmożonej migracji formowały liczne warstwy o równomiernym układzie na całej powierzchni naczynia hodowlanego (ryc. 19). Komórki mięśniowe rosnące w obecności witaminy D nie tworzyły grudkowatych struktur.

4.2.2. Wpływ na modulację fenotypową

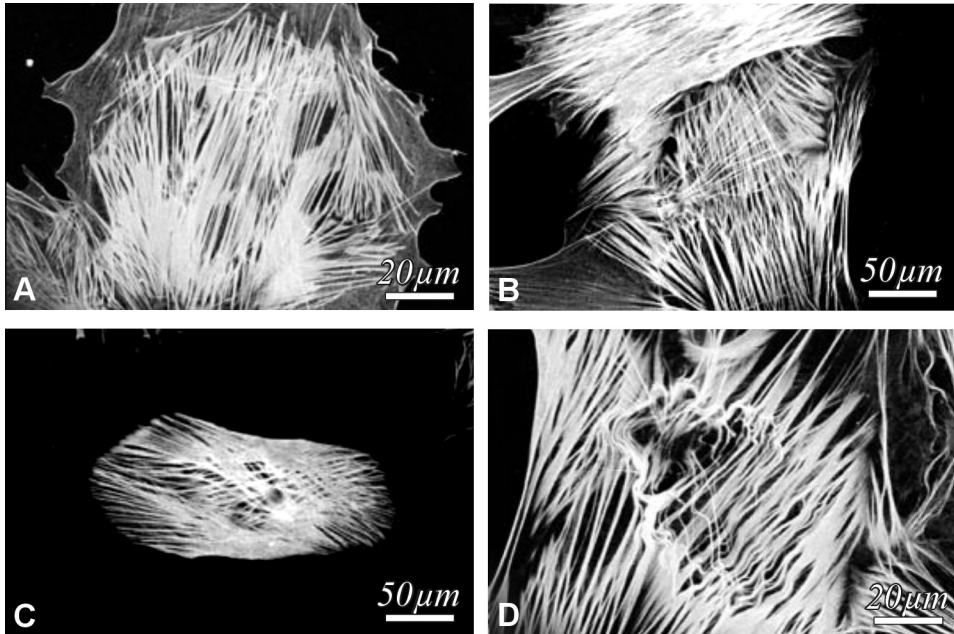
Jest znanym faktem, że w pierwotnej hodowli komórkowej SMC podlegają modulacji fenotypowej określanej często w literaturze jako *phenotype switching*.

Po około 2 dobach od założenia hodowli i adhezji do dna naczynia hodowlanego komórki mięśniowe zaczynały spontanicznie transformować zmieniając swój fenotyp z *contractile* na *synthetic*. Przez kolejne 3 doby większość SMC w hodowli uzyskiwała cechy komórek o wysokim stopniu odróżnicowania. W tym wypadku określenie *synthetic* będzie synonimem *immature*. Jednakże po upływie około 5 dni rozpoczął się proces odwrotny polegający na różnicowaniu i powrocie do stanu *contractile*.

Badania ultrastrukturalne potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia, iż SMC rosnące w hodowli bez dodatku kalcytriolu i formujące wielopokładowe *nodule*, wcześniej podlegały różnicowaniu i przejawiały cechy fenotypu *contractile* (ryc. 13 i 14). Na ultracienkich przekrojach komórkowych widoczny był dobrze wykształcony, wypełniający cytoplazmę aparat kurczliwy.

Szczegółowa charakterystyka komórek o cechach fenotypu *contractile*, *synthetic* i *intermediate* oraz dokumentacja zdjęciowa została przedstawiona w poprzednim rozdziale (4.1).

W toku badań zaobserwowano także inne ważne cechy strukturalne, które dodatkowo charakteryzowały SMC podczas spontanicznie zachodzącego procesu różnicowania.

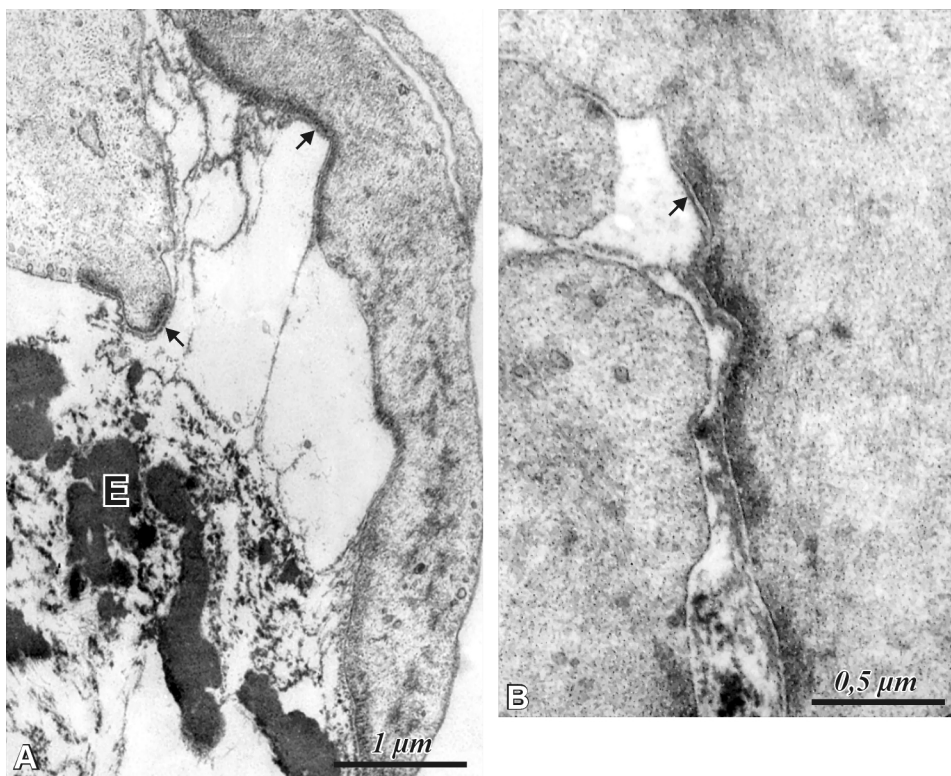


Ryc. 20. Analiza obrazów w mikroskopie fluorescencyjnym z uwidocznionymi strukturami zbudowanymi z SM α -aktyny ujawniła, że komórki mięśniowe w 7-dniowej hodowli kontrolnej posiadają wysoce zorganizowaną sieć aktynowych włókien naprężeniowych. Taka organizacja elementów aparatu kurczliwego jest czynnikiem stabilizującym kurczliwy fenotyp SMC. Dlatego też włókna naprężeniowe spotykane były głównie w komórkach nieprzemieszczających się.

Fig. 20. Immunofluorescence analysis for SM α -actin reveals that smooth muscle cells culturing for 7 days under control conditions have a highly organized network of actin stress fibres. This indicates that mature contractile phenotype of SMCs is stabilized by contractile apparatus organization. Therefore stress fibers are more prominent in non-migratory cells.

Cechą zróżnicowanych SMC były włókna naprężeniowe, odgrywające ważną rolę w tworzeniu stabilnych miejsc kotwiczenia do podłoża i generowaniu skurczu. Mikrofotografie przedstawione na rycinie 20 pokazują, że elementy te są stworzone przez zorganizowaną sieć włókienek aktynowych.

Ponadto SMC o fenotypie *contractile*, które od 2 tygodnia zaczynały dominować w hodowli kontrolnej, zdolne były do odtwarzania błony podstawnej (ryc. 21), stanowiącej istotny element stabilizujący dla tego fenotypu.

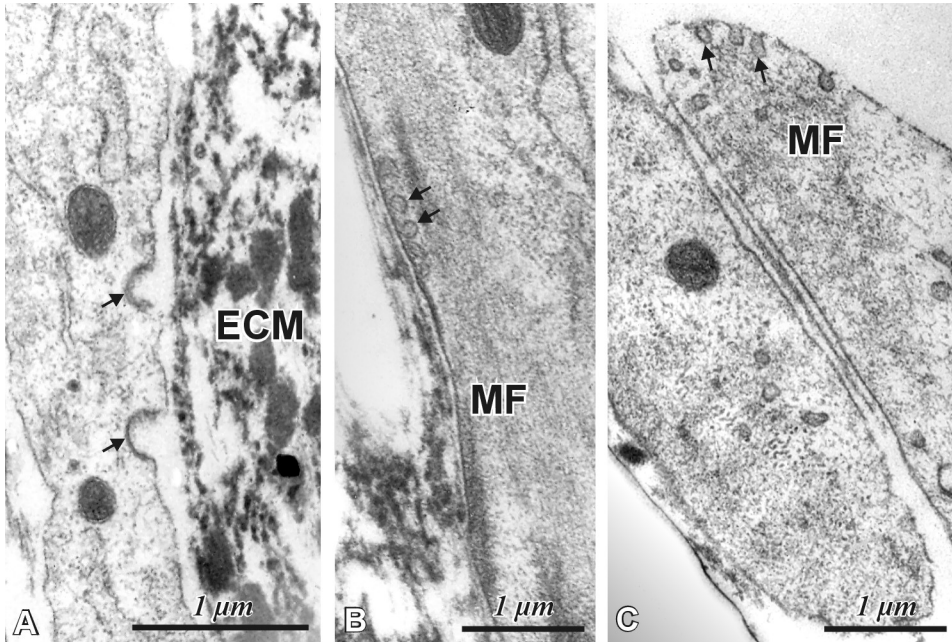


Ryc. 21. Elektronogramy przedstawiają komórki mięśniowe o fenotypie „contractile” w 9-dniowej hodowli kontrolnej. Na terenie cytoplazmy dominują miofilamenty. Błona podstawna częściowo zostaje odbudowana w związku z procesem różnicowania komórek. Błona podstawna (↓), elastyna (E).

Fig. 21. Electron micrographs of contractile SMCs found in 9-day old control culture. The cytoplasm is in large part densely filled with myofilaments. Basement membrane was partially rebuilt after differentiation of cells. Basement membrane (↓), elastin (E).

Kolejną istotną strukturą dla oceny modulacji fenotypowej SMC były kawole funkcjonalnie związane z transportem cholesterolu przez błonę cytoplazmatyczną. Te charakterystyczne małe, butelkowatego kształtu inwaginacje błony komórkowej występowały w dużych ilościach i znacznie częściej na powierzchni zróżnicowanych SMC (ryc. 22).

W odróżnieniu od komórek wzrastających w warunkach kontrolnych, większość SMC rosnących w środowisku $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ przejawiała w tym samym czasie, ultrastrukturalne cechy charakterystyczne dla komórek niezróżnicowanych (ryc. 11).



Ryc. 22. Analiza mikroskopowo elektronowa komórek mięśniowych z 9-dniowej hodowli kontrolnej. SMC o wysokim stopniu zróżnicowania posiadają liczne wpuklenia błony komórkowej (*caveolae*, Cv ↓). Miofilamenty (MF). Elementy istoty międzykomórkowej (ECM).

Fig. 22. Electron microscopic analysis of smooth muscle cells in 9-day old control culture. Variable numbers of flask-shaped plasmalemmal invaginations (*caveolae*, Cv ↓) were identified in differentiated state of smooth muscle cells. Miofilaments (MF). Extracellular matrix components (ECM).

Liczne struktury obecne w cytoplazmie niezróżnicowanych SMC o fenotypie *synthetic*, związane z syntezą, świadczyły o dużej aktywności metabolicznej badanych komórek. Nie obserwowano natomiast ani włókien naprężeniowych, ani błony podstawnej, ani kaweoli, które były charakterystyczne dla zróżnicowanych SMC w hodowli kontrolnej.

Na podstawie obserwacji mikroskopowych (LM, FM, TEM, SEM) można stwierdzić, że kalcytriol hamuje proces różnicowania SMC *in vitro*. Stymulacja kalcytriolem pozwalała bowiem na utrzymanie komórek mięśniowych w stadium *synthetic* przez wiele dni. Proces różnicowania następował co prawda dosyć intensywnie jednakże kilka dni później w porównaniu z hodowlą rosnącą bez dodatku kalcytriolu.

4.3. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na procesy wzrostowe komórek mięśniowych

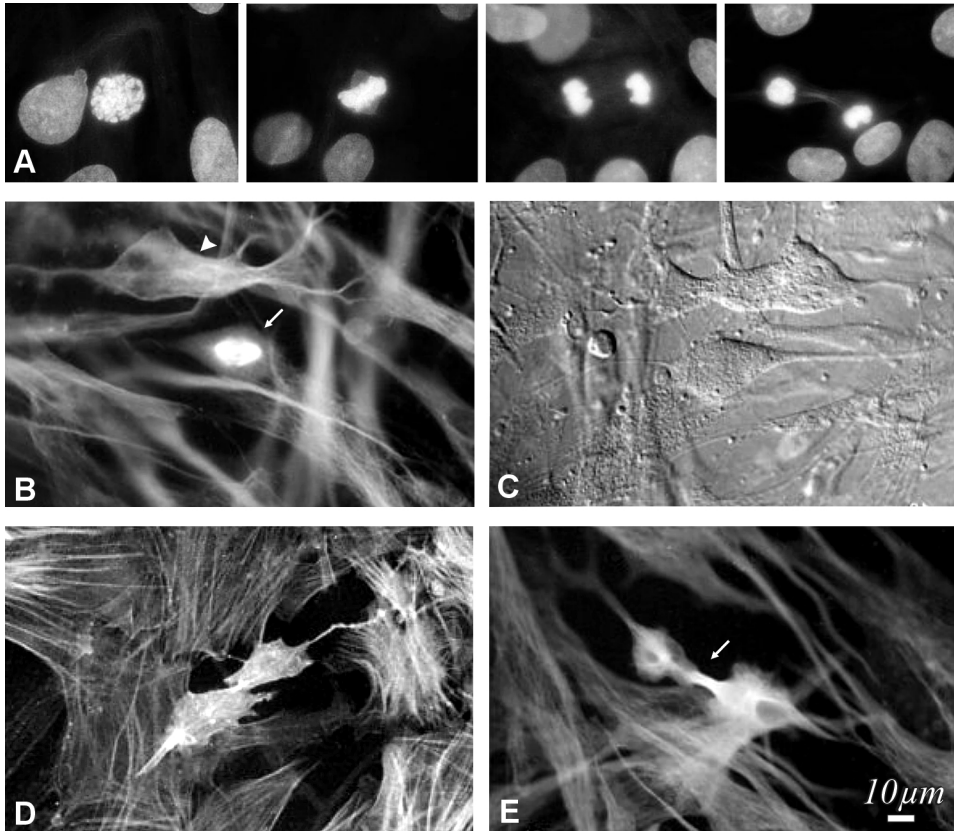
4.3.1. Ocena mikroskopowa intensywności podziałów komórkowych

Komórki mięśniowe izolowane z aort noworodków szczurzych w hodowli pierwotnej przejawiały duży potencjał proliferacyjny. Optymalne warunki dla podziałów komórkowych zapewniał 10% dodatek FBS. W niniejszej pracy gęstość początkowa komórek wynosiła 5×10^4 /szalka, co uznano za wartość korzystną dla badania różnych aspektów zmian zachodzących w hodowli pod wpływem kalcytriolu.

Obserwacje mikroskopowe pozwoliły stwierdzić istnienie zasadniczych różnic w intensywności podziałów komórkowych w porównywanych hodowlach. Podczas oceny hodowli w mikroskopie odwróconym zanotowano, że SMC poddane działaniu kalcytriolu szybciej rozprzestrzeniały się na powierzchni naczynia hodowlanego dzięki intensywniejszej migracji i proliferacji. Kalcytriol powodował, że komórki mięśniowe wcześniej osiągały stan konfluencji a następnie efektywniej formowały kolejne pokłady w porównaniu z hodowlą kontrolną. Różnice między porównywanymi hodowlami dotyczące typu wzrostu hodowli oraz wyraźny efekt stymulujący kalcytriolu dobrze ilustrują ryciny 18 i 19.

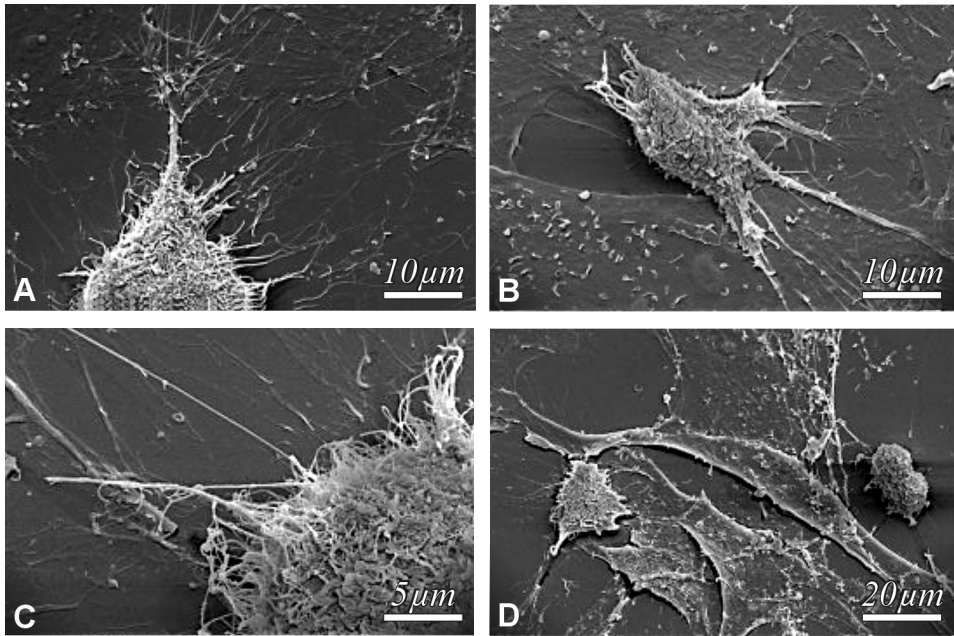
W hodowlach komórkowych podziały mitotyczne i apoptoza są obserwowane w tym samym czasie i niewątpliwie jest to zjawisko typowe dla rozwijających się populacji. Różnice morfologiczne między komórkami dzielącymi się i komórkami ulegającymi apoptozie są właściwie niedostrzegalne przyżyciowo podczas obserwacji w mikroskopie odwróconym i słabo widoczne podczas obserwacji z zastosowaniem techniki kontrastowo-fazowej (ryc. 23C). Wyznaczenie elementów cytoszkieletu przeciwciałami skierowanymi przeciwko α -SM aktynie i α -tubulinie pozwala jednoznacznie odróżnić wspomniane dwa typy aktywności SMC. Te spostrzeżenia są przedstawione na rycinach 23B, D i E oraz 32A-D i uzupełnione stosownymi opisami. Bardziej precyzyjnej charakterystyki morfologicznej, wskazującej na istotne różnice pomiędzy komórkami dzielącymi się i ginącymi na drodze apoptozy, dokonano na podstawie analizy obrazów w mikroskopie skaningowym (ryc. 24 i 33).

Badania mikroskopowe i dokonana na ich podstawie analiza porównawcza materiału pochodzącego z kilkunastu hodowli SMC (w wariacie kontrolnym i po ekspozycji na kalcytriol) unaoczniała fakt, że pod wpływem kalcytriolu SMC prezentowały wyższy potencjał proliferacyjny przy jednoczesnym spadku tendencji do śmierci na drodze apoptozy. Te spostrzeżenia znalazły swoje potwierdzenie w badaniach ilościowych, prezentowanych w kolejnych rozdziałach tej pracy.



Ryc 23. Proliferacja komórek mięśniowych w hodowli (A-E). Różne fazy mitozy w obrazie mikroskopu fluorescencyjnego. Stopień kondensacji chromatyny uwidoczniiony dzięki reakcji z DAPI (A). Widoczne różnice w ekspresji α -tubuliny w komórce mięśniowej podczas mitozy (↓) i wczesnej apoptozy (∇) (B). Apoptoza i mitoza są nieodróżnialne morfologicznie w obrazie mikroskopu kontrastowo-fazowego (C). Układ gęsto upakowanych i przypadkowo zorientowanych filamentów aktynowych (D) i charakterystyczny układ mikrotubul (E) pod koniec cytokinezy.

Fig. 23. Proliferation of smooth muscle cells in culture. Mitotic figures under fluorescence microscope examination. DAPI-staining visualizes chromatin condensation of dividing nuclei (A). Differences in α -tubulin expression during mitosis (↓) and during early stage of apoptosis are visible (∇) (B). Apoptosis and mitosis are morphologically indistinguishable under phase-contrast light microscope (C). Distribution of densely packed randomly oriented actin filaments (D) and characteristic distribution of microtubules (E) in almost completed cytokinesis.



Ryc. 24. Obrazy z mikroskopu elektronowego skaningowego przedstawiające SMC w trakcie podziałów mitotycznych. Dzielące się komórki mięśniowe mają zmieniony kształt i obkurzoną cytoplazmę, co je wyraźnie odróżnia od sąsiednich komórek, które się nie dzielą (A, B, C i D). Błonę cytoplazmatyczną dzielących się komórek pokrywają gęsto upakowane mikrokosmki, a kotwiczenie do podłoża wspomagają cienkie wypustki o charakterze filopodiów. Komórki podlegające mitozie stopniowo zatracają kontakt ze składnikami podłoża.

Fig. 24. Scanning electron micrographs of SMCs during mitotic division observed in calcitriol-treated and control culture. The presented cells have altered shape, shrunk cytoplasm (A, B, C and D) and substantially differ from neighboring cells. Cytoplasmic membrane is covered by densely distributed microvilli. Attaching to the surface is supported by thin filopodia. Note that dividing SMCs are poorly adhered to the surface.



Ryc. 25. Ultrastruktura dzielącej się mitotycznie komórki mięśniowej w hodowli poddanej przez 5 dni działaniu kalcytriolu. Widoczne dwa nowo utworzone jądra komórkowe tuż przed cytokinezą. W trakcie mitozy w komórce mięśniowej odtwarzana jest gęsta sieć włókien kurezliwych.

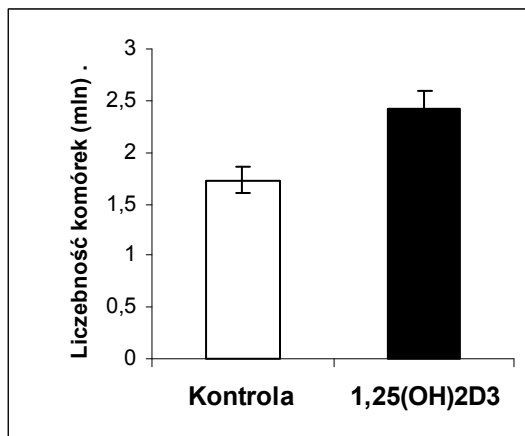
Fig. 25. Higher magnification electron micrographs illustrating the ultrastructure of individual smooth muscle cell during mitotic division on day 5 of calcitriol-treated culture. Two newly formed nuclei photographed before cytokinesis of SMCs. During mitotic division densely packed miofilament network reappeared.

4.3.2. Proliferacja

Ilościowa analiza badanego materiału potwierdziła opisane w poprzednim podrozdziale spostrzeżenia na temat stymulującego wpływu kalcytriolu na intensywność podziałów mitotycznych.

4.3.2.1. Liczebność komórek

Szacując liczbę SMC rosnących w obecności kalcytriolu oraz komórek rosnących bez dodatku kalcytriolu, uzyskano istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami oraz wysoką powtarzalność wyników pochodzących z niezależnych doświadczeń.

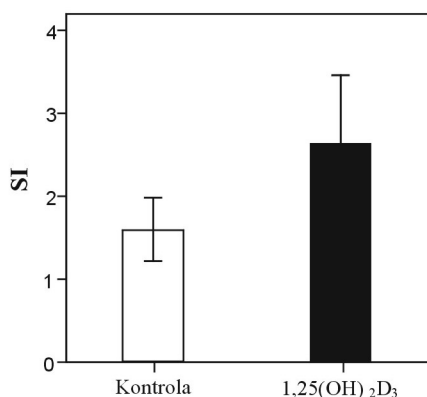


Ryc. 26. Wpływ kalcytriolu na liczebność SMC w hodowli. Analiza wskazuje na znaczący wzrost liczby komórek mięśniowych w hodowli poddanej działaniu kalcytriolu przez 7 dni. Dane uzyskano licząc w hemocytometrze komórki z 3 niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. Na histogramach przedstawiono wartości średnie \pm SD, a statystycznie istotne różnice ($P < 0,001$) stwierdzono za pomocą testu t-Studenta.

Fig. 26. Effect of calcitriol on SMC number in culture. Analysis reveals significant increase in the number of SMCs exposed to calcitriol for 7 days. Values were obtained by counting the cells in hemacytometer. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. Values are given as mean \pm SD and statistically ($P < 0.001$) significant differences were assessed using the unpaired Student's t-test.

4.3.2.2. Analiza inkorporowania [3 H]-tymidyny

Mierzono ilość [3 H]-tymidyny wbudowanej do DNA jądrowego komórek mięśniowych w hodowli poddanej działaniu aktywnego metabolitu witaminy D oraz hodowli kontrolnej. Radiograficzna aktywność znakowanej trytem tymidyny, proporcjonalna do szybkości syntezy DNA przez badane komórki, była w wybranym modelu badawczym dobrym wskaźnikiem rozrostu komórkowego.

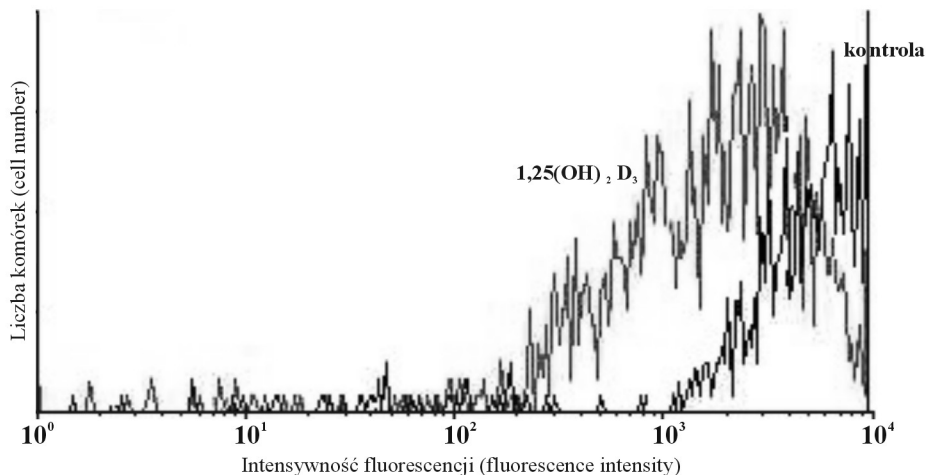


Ryc. 27. Pomiar aktywności [³H]-tymidyny inkorporowanej do komórek wskazuje, że SMC wystawione przez 7 dni na działanie kalcytriolu proliferują znacznie intensywniej w porównaniu z SMC rosnącymi w warunkach kontrolnych. Histogramy ilustrują istotną statystycznie różnicę ($P < 0,01$) w ilości [³H]-tymidyny wbudowanej do DNA po 12 godzinnej inkubacji komórek mięśniowych pochodzących z dwóch porównywanych grup. Przedstawiono średnie wartości \pm SD uzyskane z trzech niezależnych doświadczeń. SI (indeks stymulacji).

Fig. 27. Assay measuring [³H]-thymidine incorporation demonstrates that SMCs exposed to calcitriol for 7 days proliferate at a much higher rate than do SMC from control culture. Histograms demonstrate statistically significant difference ($P < 0.01$) in [³H]-thymidine uptake to DNA between experimental and control values after 12 hour incubation. Data obtained in three different experiments are given as mean \pm SD. SI (stimulation index).

4.3.2.3. Dynamika podziałów komórkowych

Na podstawie analizy cytometrycznej stopnia wbudowywania CFSE do dzielących się komórek stwierdzono zwiększoną dynamikę podziałów pod wpływem suprafizjologicznych stężeń aktywnego metabolitu witaminy D.



Ryc. 26. Histogramy prezentują poziom fluorescencji w komórkach mięśniowych w 10-dniowej hodowli po wyznakowaniu estrem dwuocianu fluoresceiny (CFSE). Utrata fluorescencji o połowę następuje po kolejnych podziałach komórkowych. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zastosowano w stężeniu 10 nmol/l.

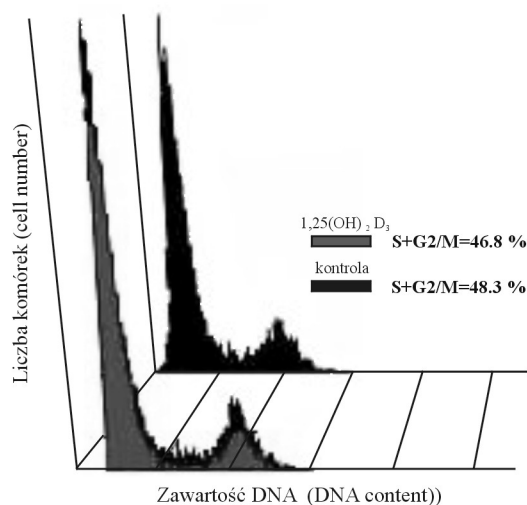
Fig. 26. SMCs labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) tracked in vitro for 10 days. Fluorescence histograms demonstrate progressive halving of the fluorescence intensity of CFSE in cells after each division. The 10 nmol/l concentration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was tested.

Ilość barwnika fluorescencyjnego w cytoplazmie badanych komórek po kolejnych ich podziałach, a tym samym intensywność fluorescencji ulega zmniejszeniu dokładnie o połowę.

Wyniki wskazują, że SMC rosnące przez 10 dni w obecności kalcytriolu uległy większej liczbie podziałów (4) niż SMC w hodowli kontrolnej (2-3). Oznacza to, że czas generacji w porównywanych grupach jest różny i ulega skróceniu po zastosowaniu kalcytriolu.

4.3.2.4. Cykl komórkowy

Mierzona zawartość DNA w jadrach komórek mięśniowych metodą cytofotometryczną przy zastosowaniu barwienia jodkiem propidyny (PI) nie wykazała różnic pomiędzy porównywanymi grupami. Odsetek komórek znajdujących się w fazie S+G2/M był podobny i zawierał się w przedziale 45–50%.

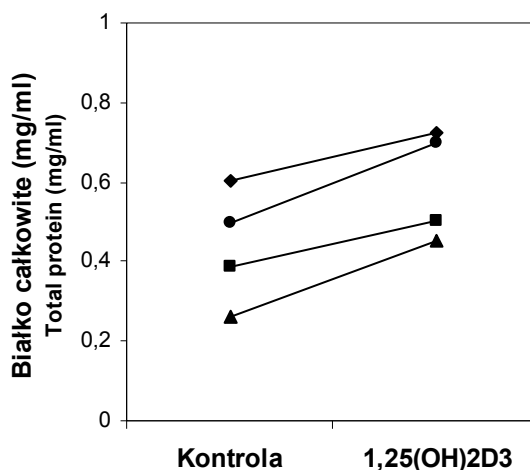


Ryc. 28. Wybrane histogramy (jeden z 4 eksperymentów) oznaczeń cytometrycznych zawartości DNA komórek mięśniowych w hodowli. Komórki mięśniowe rosące w środowisku kalcytriolu o stężeniu 10 nmol/l oraz bez dodatku kalcytriolu, po zebraniu i utrwaleniu wybarwiono jodkiem propidyny. Określono odsetek SMC w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Analiza cyklu komórkowego przeprowadzona w 9 dniu trwania hodowli nie wykazała różnic pomiędzy badanymi grupami.

Fig. 28. Representative cell cycle analysis (one from 4 experiments) of smooth muscle cells in culture determined by DNA content distribution. SMCs were grown without or with $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, in concentration of 10 nmol/l, harvested, permeabilized and labeled with propidium iodide. The percentages of SMCs in phases of cell cycle are shown. Analysis performed at day 9 did not reveal any differences between cultures.

4.3.3. Synteza białka

Pomiary białka całkowitego wykonane w ekstraktach z hodowli komórek mięśniowych dotyczyły zarówno białka zawartego w strukturach wewnątrzkomórkowych jak również białka będącego składnikiem istoty międzykomórkowej. Dane wskazują, że kalcytriol stosowany w stężeniach suprafizjologicznych (10 nmol/l) w istotny sposób zwiększa poziom białka całkowitego w hodowli SMC.



Ryc. 29. Wpływ kalcytriolu na zawartość białka całkowitego w 9-dniowej hodowli SMC. Dane pochodzą z 4 niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. Istotność statystyczna została stwierdzona za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności $P < 0,001$. Wzrost ilości białka całkowitego w hodowlach wystawionych na działanie kalcytriolu w stężeniu 10 nmol/l pozostaje w związku ze wykazaniem zwiększeniem aktywności proliferacyjnej SMC.

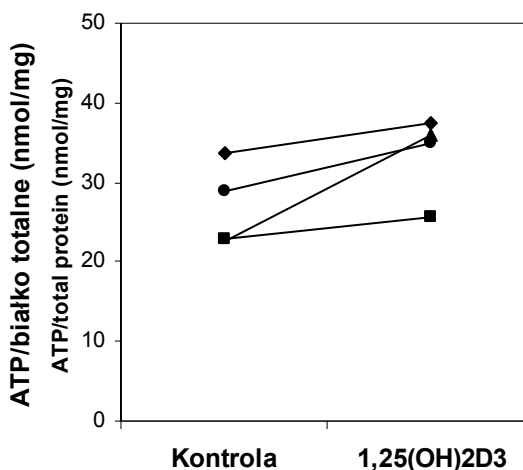
Fig. 29. Effects of calcitriol on total protein content on day 9 of SMC culture. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least four times. Statistical significance was assessed by an impaired Student's t-test. P-value of < 0.001 was considered significant. Increased amount of total proteins after exposition to 10 nmol/l concentration of calcitriol coincides with increased proliferative activity of SMCs.

Uzyskany wynik do pewnego stopnia potwierdza też spostrzeżenia poczynione podczas analizy obrazów mikroskopowych (ryc. 19 oraz ryc. 46 i 47), które wskazują na większą kumulację składników ECM w poszerzonych przestrzeniach międzykomórkowych.

4.3.4. Status energetyczny

Intensywny metabolizm komórek mięśniowych w hodowli komórkowej jest zależny między innymi od ciągłej regeneracji ATP, będącego donorem energii. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ATP w hodowlach komórek mięśniowych traktowanych kalcytriolem. Stwierdzony wyższy poziom tego nukleotydu adenylowego dotyczy więc hodowli, w których SMC w większości

przejawiają fenotyp *synthetic*, dynamiczniej się dzielą, intensywniej migrują i rzadziej giną na drodze apoptozy. Widoczne na elektronogramach struktury nierozzerwalnie związane z procesami syntezy (ryc. 11) niejako uzasadniają wyższy poziom ATP po stymulacji kalcytriolem.



Ryc. 30. Wpływ kalcytriolu na zawartość ATP w komórkach mięśniowych w 9-dniowej hodowli. Obserwuje się wyraźny wzrost stężenia ATP w hodowlach wystawionych na działanie kalcytriolu o stężeniu 10 nmol/l. Dane pochodzą z 4 niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. Istotność statystyczna została potwierdzona za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności $P < 0,047$.

Fig. 30. Effects of calcitriol on ATP content in SMC cultured for 9 days. Concentration of ATP after exposition of SMCs to 10 nmol/l of calcitriol is significantly increased. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least four times. Statistical significance was assessed by an impaired Student's t-test. P-value of < 0.047 was considered.

Dla określenia stanu energetycznego SMC w hodowli wyliczono wartość tzw. ładunku energetycznego (AEC – *adenylate energy charge*) opisującą stosunkowe nasycenie układu adenylaów w bezwodnikowe wiązania fosforanowe.

$$AEC = (ATP) + 0,5 (ADP) / (ATP) + (ADP) + (AMP)$$

W warunkach aktywności metabolicznej AEC zazwyczaj przekracza wartość 0,8 i plasuje się na poziomie 0,85.

Wartość ładunku energetycznego adenylanów w hodowli SMC poddanej działaniu kalcytriolu i hodowli kontrolnej wynosiła odpowiednio 0,8957 i 0,8959.

4.4. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na żywotność komórek mięśniowych w hodowli

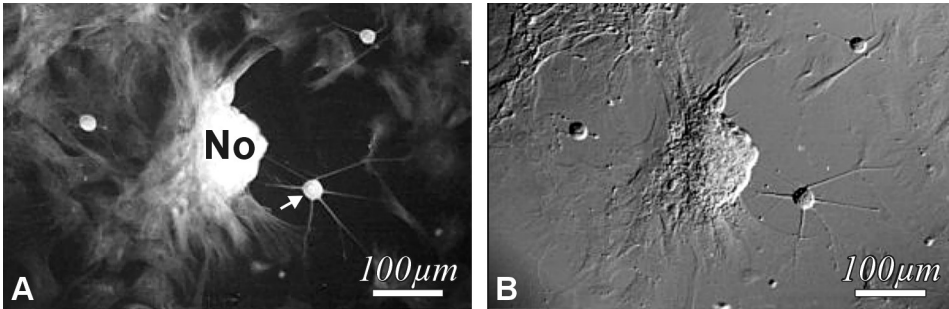
4.4.1. Ocena morfologiczna

Analizując obrazy wykonane przy wykorzystaniu różnych technik mikroskopii świetlnej i elektronowej dostrzegano morfologiczne cechy zmian w komórkach mięśniowych świadczące o uleganiu apoptozie. Odnotowano i opisano również zmiany charakterystyczne dla nekrozy.

Przedstawiono cykl rycin zawierających szczegółowe opisy cech, które posiadały SMC na różnych etapach degradacji ich struktury, przy czym większość materiału pochodzi z hodowli kontrolnych.

Chociaż cechy degradacji SMC widoczne były już w 4 dniu, to zdecydowanie nasilały się w kolejnych dniach hodowli. Interesujące spostrzeżenia zostały poczynione za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego na temat reorganizacji w układzie mikrotubul stanowiących element cytoszkieletu komórek (ryc. 32). Obserwacje w mikroskopie skaningowym dały informacje co do zmiany kształtu komórek, szczegółów ukształtowania błony komórkowej oraz relacji z sąsiednimi komórkami i podłożem w trakcie postępującej śmierci (ryc. 33). Badania ultrastrukturalne natomiast uwidocznily cały wachlarz zaburzeń na poziomie subkomórkowym, począwszy od kumulacji lipidów i wakuolizacji a skończywszy na daleko posuniętej degradacji z objawami zaawansowanej autofagii.

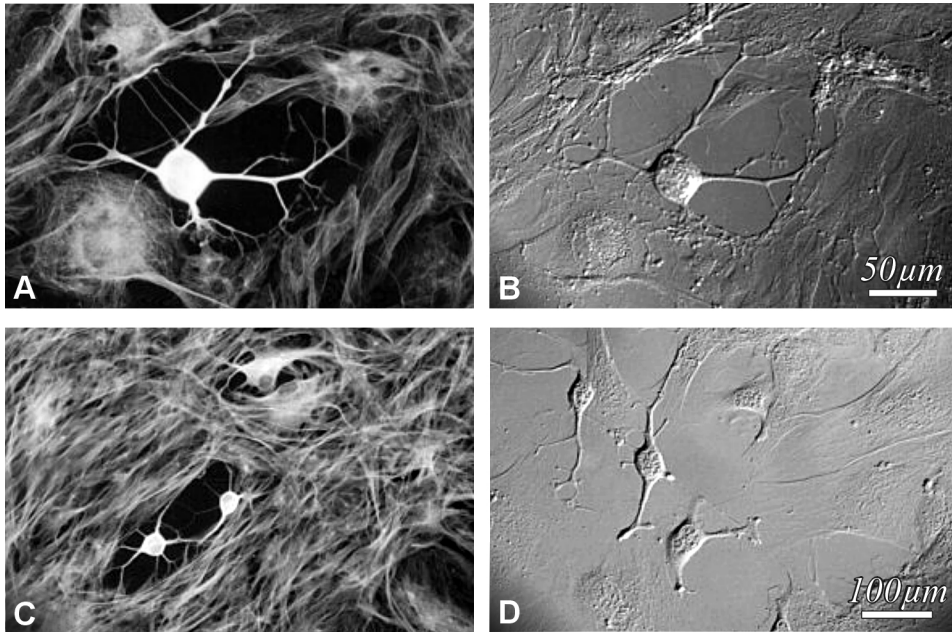
Przy każdorazowej zmianie pożywki tracono niewielką, aczkolwiek zauważalną część populacji SMC, które ulegając wspomnianym procesom destrukcyjnym traciły kontakt z podłożem. Sytuacja ta dotyczyła w zdecydowanej większości komórek mięśniowych w hodowlach rosnących bez dodatku kalcytriolu.



Ryc. 31. Mikrofotografie przedstawiają SMC w 9-dniowej hodowli, rosnące bez dodatku kalcytriolu. Mikroskop fluorescencyjny (A) kontrastowo-fazowy (B). Komórki mięśniowe tworzą charakterystyczny wielopokładowy układ w postaci *hills and valleys*. Takie wzniesienia i grudkowate skupienia są spontanicznie formowane z komórek o małych rozmiarach i słabej przyczepności do podłoża (No). Rozrost hodowli w kierunku wytworzenia trójwymiarowego układu obserwowanego w grudkach skutkuje wystąpieniem w SMC znamion strukturalnej ich degradacji. Strzałką zaznaczono SMC w trakcie apoptozy (A↓).

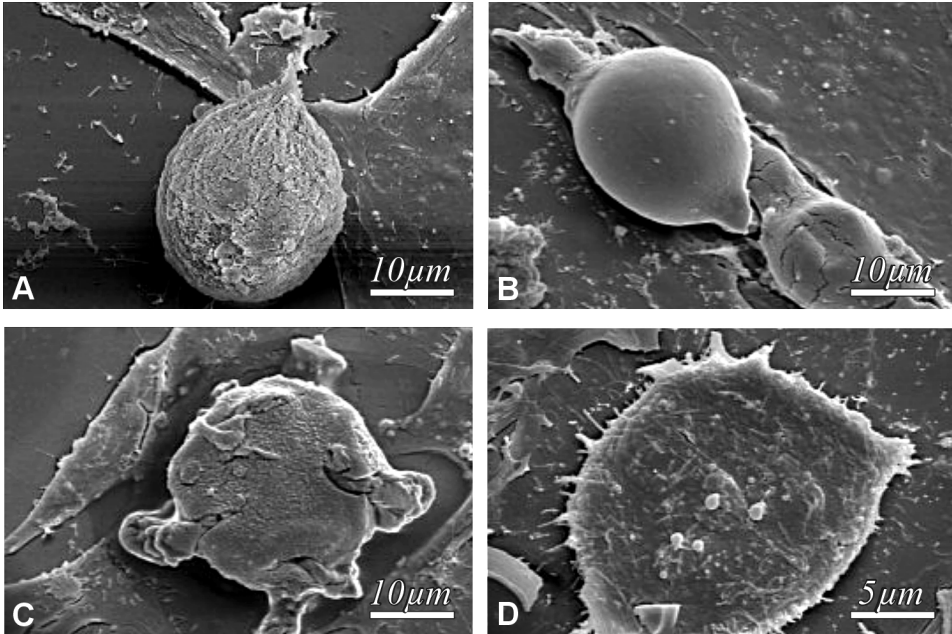
Fig. 31. SMCs on day 9 of control culture viewed by fluorescence (A) and phase-contrast microscopy (B) are presented. Characteristic "hills and valleys" growth pattern is visible. Hills, mounds or nodules (No) are spontaneously formed by small-sized cells with low adhesivity. Transfer to three-dimensional arrangement in nodules was followed by marked cellular changes with signs of structural degradation. SMC undergoing apoptosis is indicated by arrow (A↓).

Zaobserwowano, że suprafizjologiczne stężenia kalcytriolu miały wpływ na żywotność komórek mięśniowych w hodowli obniżając częstość występowania zmian doprowadzających do ich śmierci.



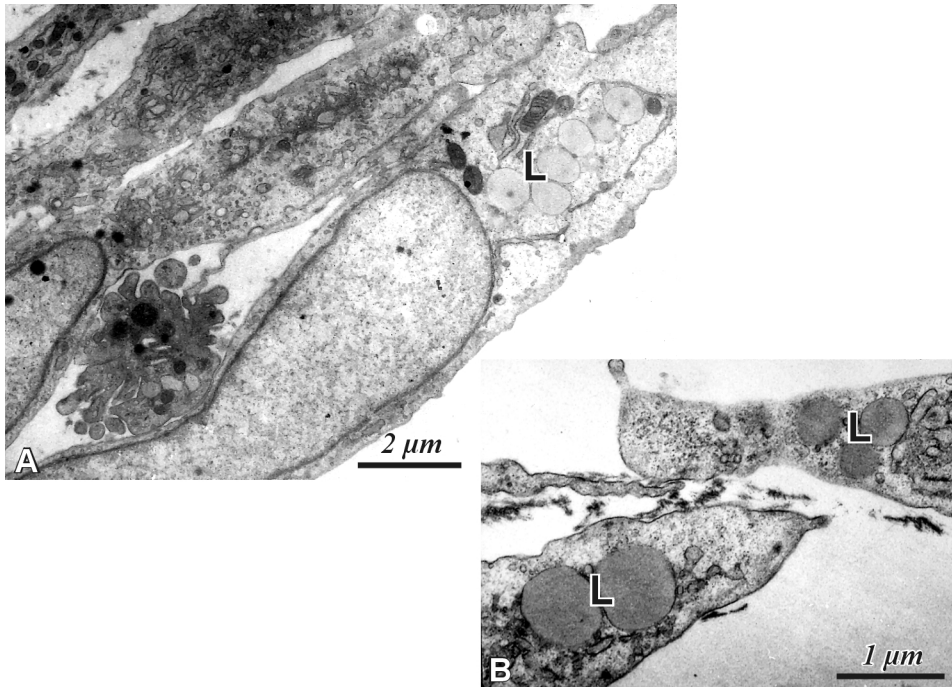
Ryc. 32. Komórki mięśniowe hodowane przez 9 dni bez dodatku kalcytriolu. Fotografie wykonane techniką fluorescencji (A, C) oraz kontrastowo-fazową (B, D) demonstrują wyraźne zmiany morfologiczne w SMC ulegających apoptozie. Zmiany te polegają na utracie kontaktu z podłożem oraz sąsiednimi komórkami. Obserwuje się ponadto wyraźną kondensację cytoplazmy komórek mięśniowych, zdecydowaną zmianę ich kształtu i uformowania powierzchni. Drastycznym zaburzeniem ulega organizacja tubulinowych elementów cytoskieletu (A, C).

Fig. 32. Smooth muscle cells cultured without addition of calcitriol for 9 day. Prominent morphological changes in the cells ongoing apoptosis are observed under fluorescence (A,C) and contrast-phase microscope (B, D). Changes involve separation from the surrounding cells in culture and from ECM attachment. Cytoplasmic condensation, alteration of the surface and changes in shape are also noted. Tubulin cytoskeleton reflects a drastic self-destruction (A,C).



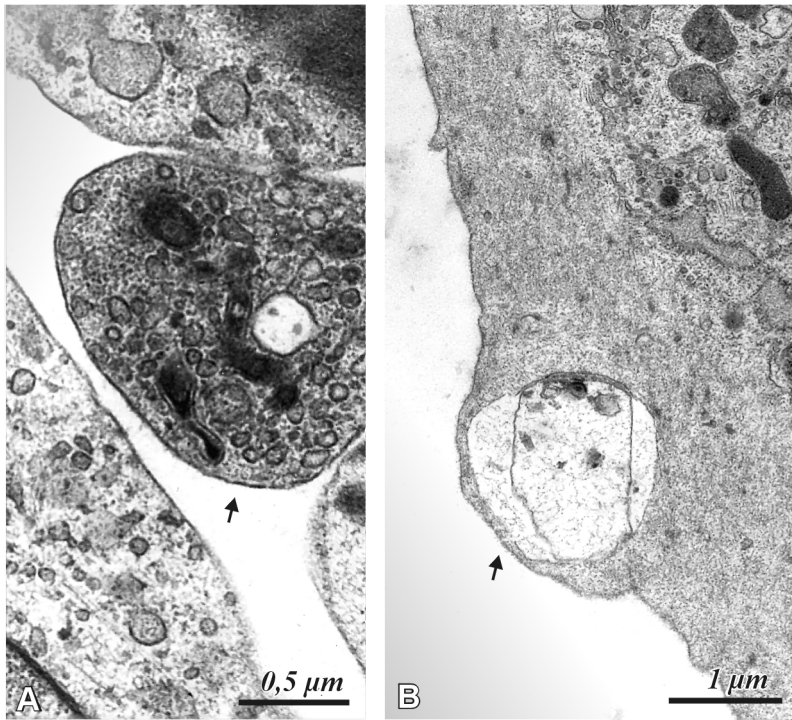
Ryc. 33. Komórki mięśniowe w 9-dniowej hodowli komórkowej ulegające apoptozie w obrazie mikroskopu elektronowego skaningowego. Widoczne są takie cechy jak utrata kontaktu z podłożem, obkurczona cytoplazma, zaokrąglony kształt i zmiany w ukształtowaniu błony cytoplazmatycznej. SMC ulegające apoptozie straciły kontakt z sąsiednimi komórkami charakteryzującymi się wysoką adhezją i „rozpłaszczeniem” na podłożu (A, B, C i D). Widoczne są także nietypowe wypustki cytoplazmatyczne (C) i wyraźna utrata mikrokosmków na powierzchni ginących SMC.

Fig. 33. Scanning electron micrographs show apoptotic SMC in control culture (9 days). The visualized cells have an abnormal rounded shape, disintegrated cell membrane and shrunk cytoplasm. They lost their contact with completely spreaded, strongly adhered neighboring cells (A, B, C, and D). Untypical protrusions from the cell surface (C) and the loss of microvilli are observed in SMC undergoing apoptosis.



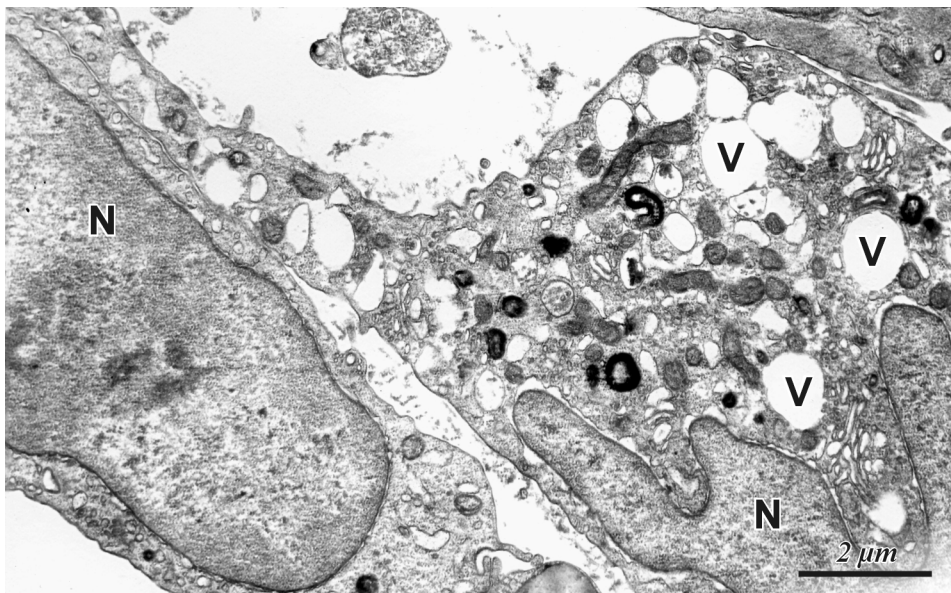
Ryc. 34. Krople lipidowe (L) obecne na terenie cytoplazmy komórek mięśniowych pochodzących z 9-dniowej hodowli kontrolnej (A, B). Obserwowano także obłonione wypustki cytoplazmatyczne różniące się rozmiarami, kształtem i zawartością zwane ciałkami apoptotycznymi (A). Takie struktury występowały samodzielnie na terenie ECM, w przestrzeniach międzykomórkowych lub w kontakcie z błoną komórkową SMC (↓).

Fig. 34. Lipid-rich droplets (L) accumulated within the cytoplasm of smooth muscle cells growing for 9 days in control culture are observed (A,B). Membrane-bound vesicles named apoptotic bodies reflected a variable size, shape and composition were consistently seen in culture. These apoptotic remnants were present in ECM, isolated or in membrane contact.



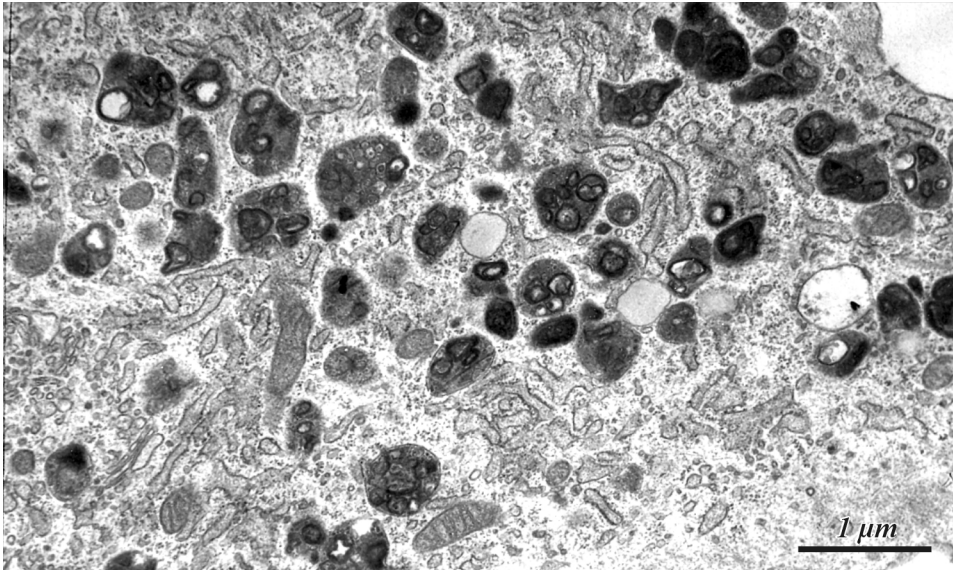
Ryc. 35. Ultrastruktura SMC w 10-dniowej hodowli rosnącej bez dodatku kalcytriolu. Widoczne są uwypuklenia błony komórkowej świadczące o postępującym procesie degradacji strukturalnej typowej dla procesu apoptozy (A, ↓). Charakterystycznymi strukturami obecnymi w SMC podczas apoptozy są także pęcherzyki zawierające macierz komórkową (B, ↓). Struktury te oddziela od cytoplazmy dobrze wyróżnialna błona, a ich zawartość często ma naturę ziarnistą. Błoniaste organelle komórkowe obecne na terenie cytoplazmy pozostały morfologicznie niezmienione.

Fig 35. Ultrastructure of SMCs grown 10 days in culture without calcitriol. Membrane outpouching with condensed cytoplasm, indicates structural degradation process characterized apoptosis of SMCs (A, ↓). Matrix vesicle (B, ↓) the other typical structural feature of apoptosis is visible in SMC. This engulfed structure is clearly demarcated from cytoplasm by distinct membrane and contains granular material. Intracytoplasmic membranous organelles appear to be morphologically normal.



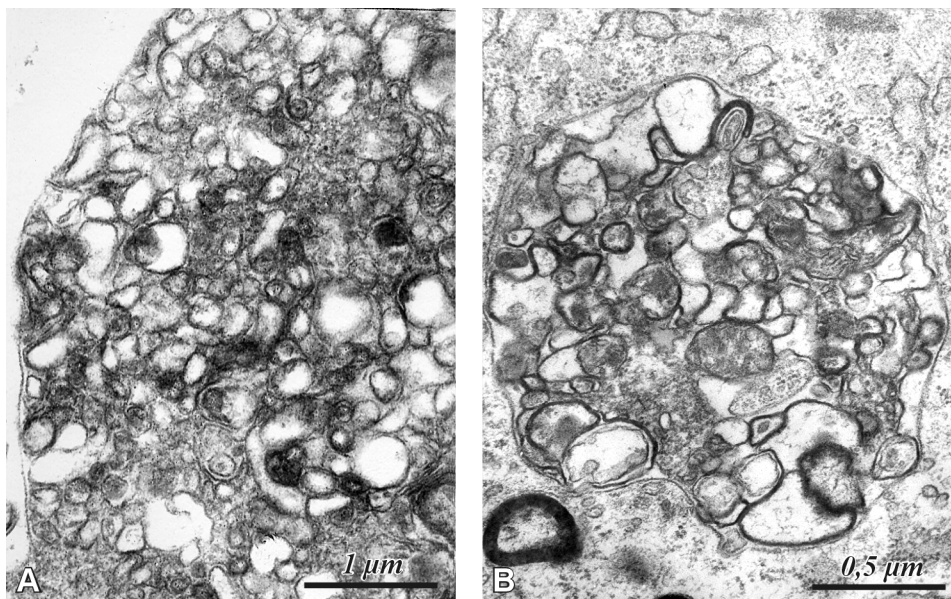
Ryc. 36. W hodowli rosnącej bez dodatku kalcytriolu po upływie 12 dni komórki mięśniowe często przejawiały ultrastrukturalne cechy komórek piankowatych. Znamiona degradacji komórek mięśniowych, takie jak wakuolizacja i autofagocytoza występowały znacznie częściej w hodowli kontrolnej w porównaniu z hodowlą, w której SMC były wystawione na działanie kalcytriolu. Jądro komórkowe (N), wakuole (V).

Fig. 36. After 12 days in control culture numerous SMCs had the electron microscopic appearance of foam cells. Signs of cellular degeneration like vacuolization and autophagocytosis were even more prominent than in calcitriol-treated culture. Nucleus (N), Vacuole (V).



Ryc. 37. Ultrastruktura komórki mięśniowej z 15-dniowej hodowli kontrolnej. Na zaawansowany proces autofagocytozy w komórce wskazują liczne obłonione wakuole trawiące zawierające gęsty elektronowo materiał pochodzenia komórkowego. Wydaje się prawdopodobnym, że nasilony proces fagocytozy i postępująca degradacja komórki na skutek działania enzymów lizosomalnych jest zaawansowanym stadium apoptozy.

Fig. 37. Ultrastructure of SMCs from 15-day old control culture. Membrane-bounded digestive vacuoles (secondary lysosomes) contained electron dense material of obvious cellular origin indicated pronounced autophagocytosis. It is likely that increased phagocytosis and degradation by lysosomal enzymes is the advanced stage of apoptosis.

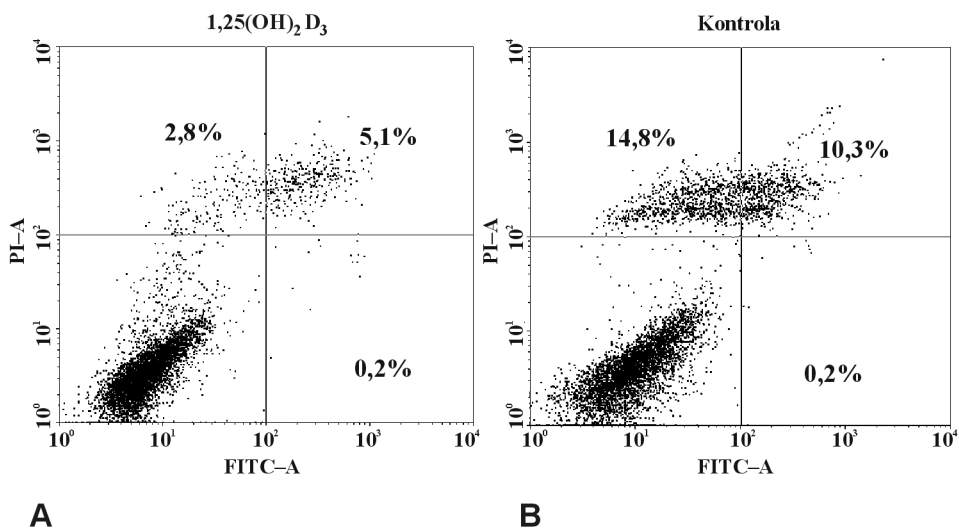


Ryc. 38. Cechy ultrastrukturalne komórek mięśniowych podlegających procesom degradacyjnym w starszej (18 dni) hodowli kontrolnej. Organelle komórkowe ulegają rozproszeniu, zaczynają dominować elektronowo gęste złoże oraz wakuole. Licznie występują struktury błoniaste o kolistym układzie zaliczane do ciał wielopęcherzykowych. Oznaki degradacji komórkowej częściej występowały i były bardziej zaawansowane w komórkach rosnących bez dodatku kalcytriolu.

Fig. 38. Electron microscopic analysis revealing ultrastructural features of degenerating cells observed with prolonged time (18 days) in control SMC culture. Dispersed cytoplasmic organelles, electron-dense granules as well as vacuoles dominate in the cytoplasm. Many structures containing whorled membranes resembling so-called multivesicular bodies are also visible. Signs of cellular degradation were more pronounced in SMC growing without calcitriol.

4.4.2. Analiza cytometryczna (AnV/Pi)

Wczesną zmianą apoptotyczną, którą można odnotować w komórkach jest eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS), czyli jej przemieszczanie się z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony komórkowej. Zjawisko to zbadano w 9-dniowej hodowli SMC wykorzystując właściwość swoistego związania PS z aneksyną V (FITC). Ponadto, jednoczesne barwienie komórek jodkiem propidyny (PI), który wiąże się z DNA uszkodzonych komórek pozwoliło na odróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych.



Ryc. 39. Reprezentatywny wynik, przedstawiający wykresy punktowe fluorescencji FITC sprzężonego z aneksyną V oraz jodku propidyny: hodowla komórek mięśniowych w obecności (A) oraz braku kalcytriolu (B). Lewy dolny region wskazuje komórki żywe, które nie inkorporują jodku propidyny oraz nie wiążą aneksyny V. Prawy dolny region zawiera komórki we wczesnym etapie apoptozy (wiążące aneksynę, brak inkorporacji PI). Prawy górny region przedstawia komórki w późnej fazie apoptozy (wiążące aneksynę V oraz inkorporacja PI). Lewy górny region przedstawia komórki martwe. Wyniki analizy cytometrycznej prezentujące znacznie obniżony odsetek komórek ulegających apoptozie i nekrozie w hodowli traktowanej kalcytriolem wskazują na ochronne działanie tego aktywnego metabolitu witaminy D dla żywotności SMC w hodowli komórkowej.

Fig. 39. Representative flow cytometric dot-plots of FITC-Annexin V/propidium iodide (PI) dual color flow cytometry for smooth muscle cells grown in the presence of calcitriol (A) and absence of calcitriol (B). Bottom left quadrant of each dot plot shows the viable cells, which exclude PI and are negative for FITC-Annexin V binding. Bottom right quadrant represents the early apoptotic cells (FITC-Annexin V positive and PI negative), demonstrating cytoplasmic membrane integrity. Top right quadrant contains the late apoptotic cells (positive for FITC-Annexin V binding and for PI uptake) and the upper left quadrant shows dead cells. The significant decrease in number of apoptotic and necrotic cells in calcitriol-treated culture evaluated by flow cytometric analysis indicate that low concentration of calcitriol influence viability of SMCs in culture.

Kalcytriol stosowany w hodowli komórek mięśniowych powodował znaczący spadek odsetka komórek podlegających apoptozie lub nekrozie. Badania wykonane metodą cytometrii przepływowej zdecydowanie potwierdziły wcześniej

poczynione na ten temat obserwacje morfologiczne. Pomiary wykonano wykorzystując materiał pochodzący z czterech niezależnych doświadczeń.

Odsetek SMC ulegających apoptozie:

- w hodowli traktowanej kalcytriolem w stężeniu 10 nmol/l wynosił: $6,95 \pm 1,11$
- w hodowli rosnącej bez dodatku kalcytriolu wynosił: $11,1 \pm 1,19$

Odsetek SMC ulegających nekrozie:

- w hodowli traktowanej kalcytriolem w stężeniu 10 nmol/l wynosił: $3,57 \pm 0,71$
- w hodowli rosnącej bez dodatku kalcytriolu wynosił $9,97 \pm 4,45$

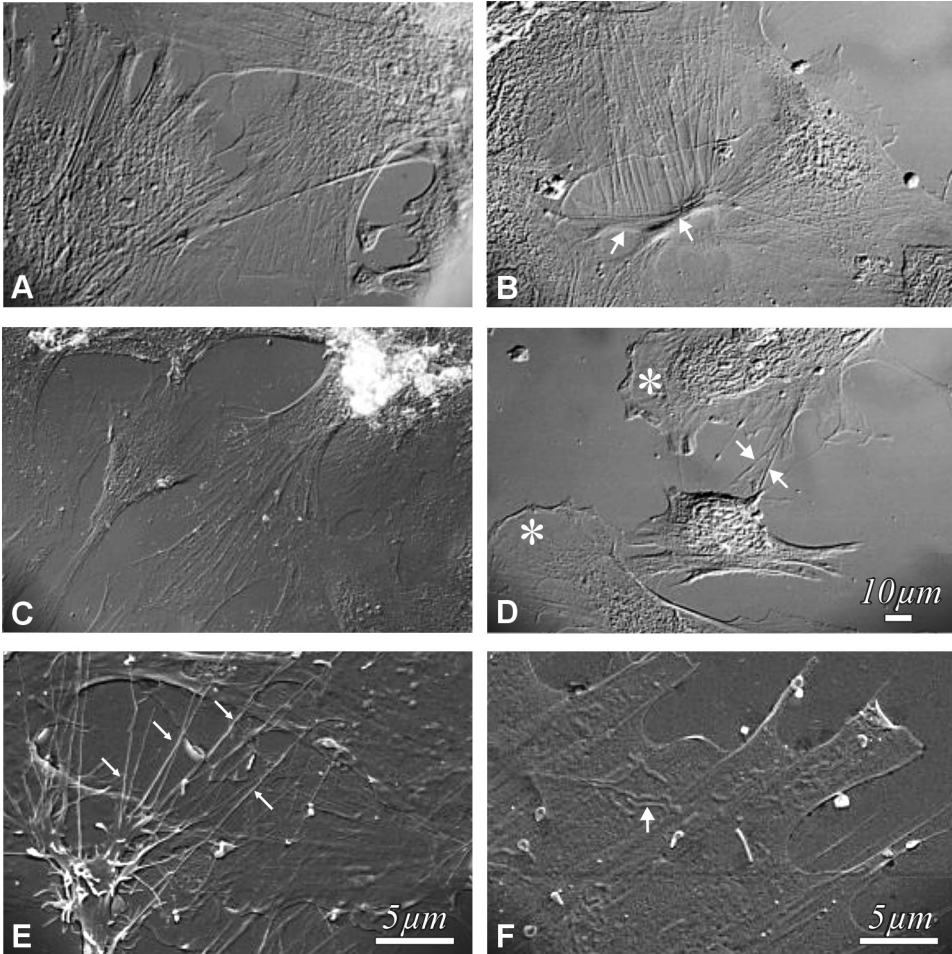
W podsumowaniu można stwierdzić, iż kalcytriol ogranicza w znaczny sposób procesy degradacyjne zachodzące w SMC, chroni też przed występowaniem apoptozy.

4.5. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na migrację komórek mięśniowych

4.5.1. Analiza mikroskopowa

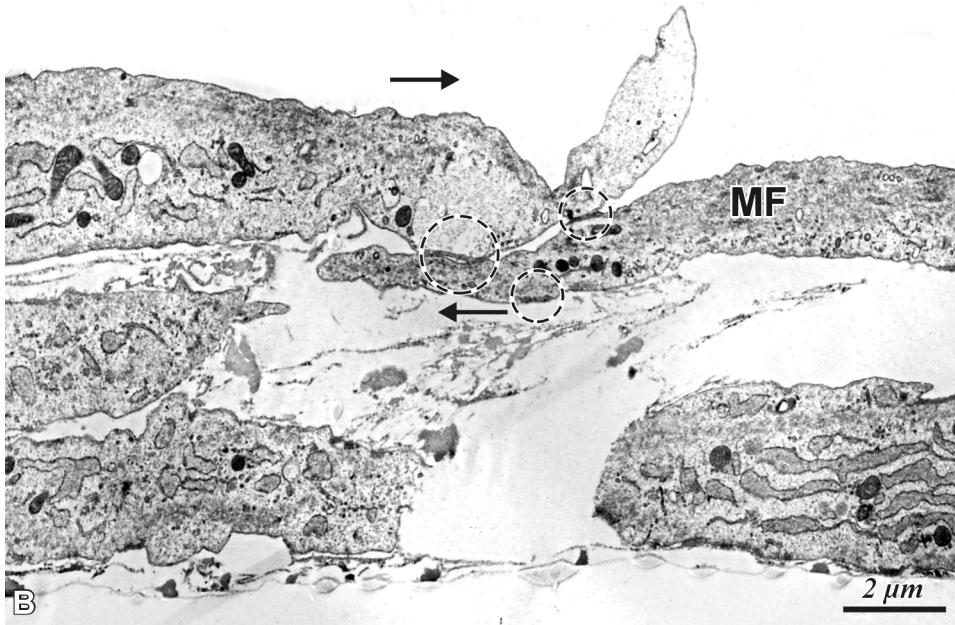
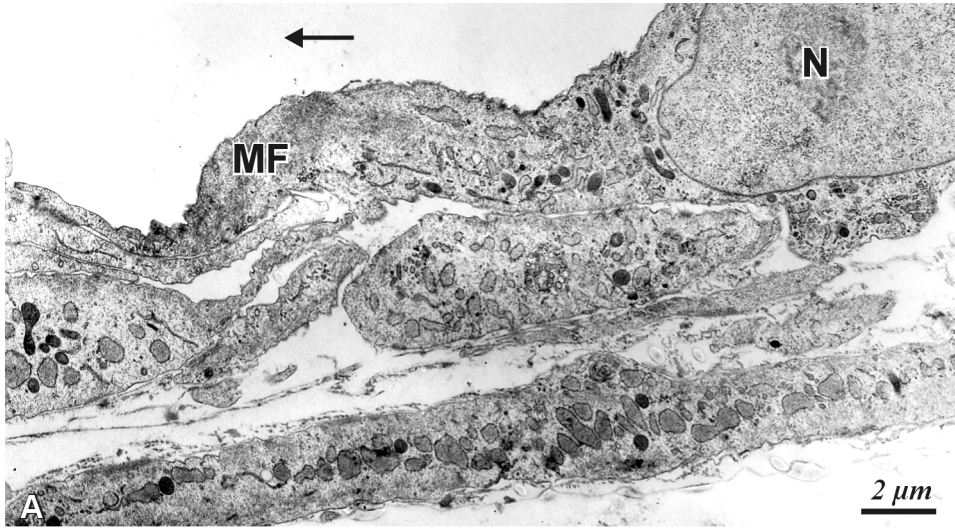
Zaobserwowano, że komórki mięśniowe w hodowli posiadały zdolność do zmiany kształtu, a także do ruchu w określonym kierunku. Ta aktywność SMC związana była z obecnością złożonego zestawu włóknistych struktur białkowych występujących na terenie cytoplazmy, tworzących cytoszkielet. Ilość elementów cytoszkieletu oraz ich układ przestrzenny ulegały niezwykle dynamicznym przemianom zależnie od aktywności biologicznej SMC.

Podczas ruchu komórki cytoplazma i struktury zlokalizowane pod błoną komórkową formowały blaszkowate wypustki lamellipodia (ryc. 40D). Lamellipodia zawierały wyraźne rusztowanie z cienkich filamenów aktynowych, co dobrze obrazują elektronogramy przedstawione na rycinie 41 i 41B. Nieco pogrubiona krawędź lamellipodium buduje płytkę wiodącą (*leading edge*), która jest ważnym miejscem kotwiczenia komórki do podłoża i w efekcie umożliwia jej płynne przemieszczanie (ryc. 40D). Wielokrotnie obserwowano także skierowane ku górze, wyrostki na grzbietowej części lamellipodium zwane *ruffles* (ryc. 41B). Opisane struktury występują w części komórki, która tworzy tzw. biegun „ciągnący”, natomiast większość cytoplazmy wraz z jądrem komórkowym podąża pasywnie w wyznaczonym kierunku (ryc. 42). Nie trudno więc było określić kierunek ruchu migrujących komórek, co zaznaczono strzałkami na rycinach 41A,B i 42.



Ryc. 40. Wybrane mikrofotografie przedstawiają morfologiczne cechy migrujących komórek mięśniowych w 6-dniowej hodowli traktowanej kalcytriolem. Komórki w obrazie mikroskopu kontrastowo-fazowego (A, B, C, D), oraz mikroskopu elektronowego skaningowego (E, F). Gwiazdkami zaznaczono rozplaszczone szerokie wypustki zwane lamellipodiami (D, *), strzałki wskazują palczaste wypustki zwane filopodiami (E, ↓), włóka naprężeniowe (B, ↓) oraz mitochondria (F, ↑).

*Fig. 40. Micrographs selected to show various morphological features of migrating smooth muscle cells on day 6 of calcitriol-treated culture. Cells viewed under phase-contrast light microscope (A, B, C, D) and scanning electron microscope (E, F). Sheet-like protrusive structures named lamellipodia are indicated by asterisk (D, *), finger-like protrusions named filopodia (E, ↓), stress fibers (B, ↓) and mitochondria (F, ↑) by arrows.*



Ryc. 41. Wypustki cytoplazmatyczne, zawierające gęstą sieć filamentów aktynowych, zwane lamellipodiami, często były spotykane w przemieszczających się komórkach mięśniowych traktowanych kalcytriolem. Lamellipodia formowane na przednim biegunie spolaryzowanej komórki wchodziły w kontakt z błoną komórek położonych niżej lub z ECM. Miejsca przylegania (Fc) stabilizujące lamellipodium umieszczono w kole. Pogrubione strzałki wskazują kierunek migracji (→). MF – miofilamenty.

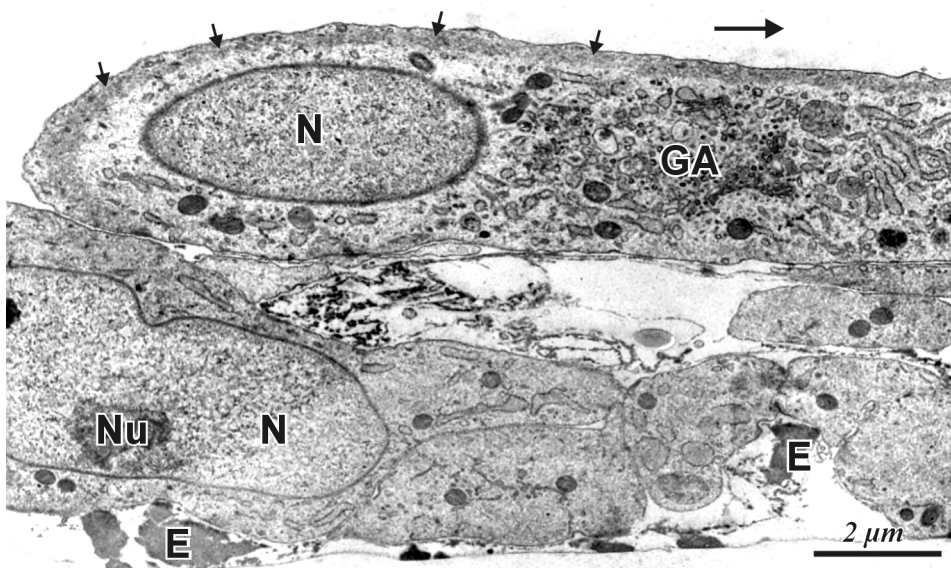
Fig. 41. Cytoplasmic protrusions that contain a thick cortical network of actin filaments, called lamellipodia were frequently visible in migrating SMC of calcitriol-treated culture. Lamellipodia protrude at the front of the cell and weakly attach to the underlying cell or substratum. Focal contacts (Fc) stabilizing lamellipodium are indicated by circle. Thick arrows mark direction of cell movement (→). MF – myofilaments.

Obrazy uzyskane w mikroskopie skaningowym pozwoliły zidentyfikować kolejne, ważne w lokomocji struktury, zwane filopodiami. Te cienkie, różnej długości wyrostki cytoplazmatyczne ze względu na lokalizację i dynamikę powstawania zdają się pełnić rolę czujników przy wyznaczaniu kierunku ruchu (ryc. 40D, E). Jeszcze innym morfologicznie typem wypustek chociaż podobnym do filopodiów są *microspikes*. Są to niezwykle delikatne, cienkie struktury występujące na obrzeżach komórek wyjątkowo efektywnie rozpostartych na powierzchni szkiełka mikroskopowego (ryc. 40F).

W mikroskopie elektronowym transmisyjnym (TEM) obserwowano natomiast specyficzne miejsca przylegania (Fc – *focal contacts*), które są krótkotrwałymi połączeniami SMC - ECM, niezbędnymi dla generowania ruchu kroczącego komórek. Fc były widoczne jako niewielkie obszary spolimeryzowanej aktyny zlokalizowane po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Obserwowano także miejsca kontaktu SMC - SMC, o podobnej strukturze, które często określa się mianem *focal complexes* zamiast *focal contacts* (ryc.41B).

Wymienione miejsca kontaktu, o subtelnej strukturze, występowały w regionie płytki wiodącej na krawędzi lamellipodium. Duża dynamika w tworzeniu i degradacji tych przejściowych struktur sprawiała, że lamellipodia stosunkowo słabo były kotwiczone do ECM lub błony innych komórek mięśniowych, co umożliwiało ich płynny ruch w określonym kierunku.

Odminną lokalizację i znaczenie dla SMC posiadały struktury zwane *focal adhesions* (Fa) obecne w komórkach mięśniowych pozostających w ścisłym kontakcie z ECM. Rozległe obszary spolimeryzowanej aktyny, o regularnym przebiegu filamentów wyznaczały miejsca przy błonie SMC gdzie poprzez receptory cząstek adhezyjnych występowała silna interakcja ze składnikami ECM. Fa były typowe dla komórek mięśniowych o fenotypie *contractile* stabilizowały fenotyp tych komórek i ograniczały ich ruch (ryc. 13 i 14).



Ryc. 42. Ultrastruktura komórki mięśniowej w trakcie migracji w 8-dniowej hodowli traktowanej kalcytriolem (część górna fotografii). Wyraźnie widoczny jest zwarty wąski układ filamentów aktynowych w warstwie „korowej” tej części ciała komórki, która jest pasywnie pociągana w kierunku ruchu (↓). Jądro komórkowe (N), aparat Golgiego (GA). Kierunek ruchu SMC (→)

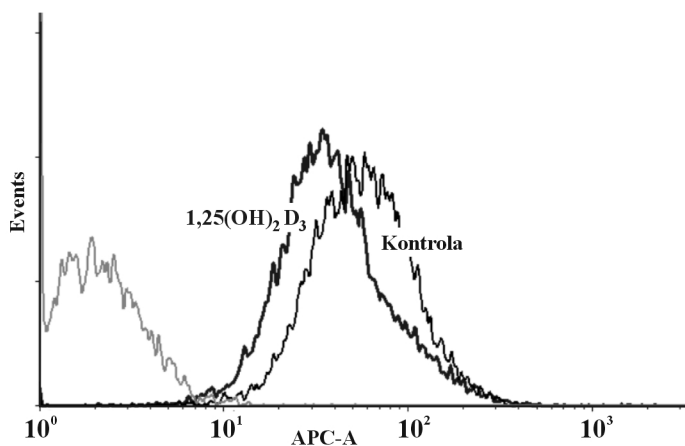
Fig.42. Ultrastructure of migrating SMCs (upper position of photograph) cultured for 8 days in the presence of calcitriol. Cortical array of actin filaments is clearly visible beneath the plasma membrane in part of the cell passively moving forward (↓). Nucleus (N). Golgi apparatus (GA). Elastin (E). Direction of SMC movement (→).

Zwraca uwagę fakt, iż komórki przejawiające morfologiczne cechy wysokiej aktywności migracyjnej posiadały jednocześnie cechy komórek o fenotypie synthetic. W hodowli poddanej działaniu suprafizjologicznych stężeń kalcytriolu dominowały właśnie komórki mięśniowe niezróżnicowane, aktywne metabolicznie, zdolne do migracji (ryc. 10, 11, 40, 41).

Skutkiem wzmożonej wędrówki SMC po stymulacji kalcytriolem był zupełnie odmienny niż w wariancie kontrolnym sposób budowania układu przestrzennego komórek w hodowli. Uformowane liczne pokłady komórek mięśniowych stanowiły w miarę regularną strukturę trójwymiarową, podczas gdy w hodowli SMC rosnącej bez dodatku kalcytriolu dominował typ wzrostu zwany *hills and valleys* (ryc. 18 i 19).

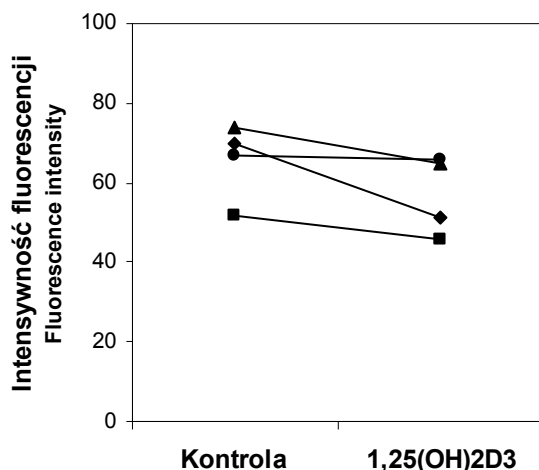
4.5.2. Analiza cytometryczna ekspresji cząstek adhezyjnych

Badając poziom beta1-integrzyn, zalicznych do rodziny cząstek adhezyjnych, w błonie komórek mięśniowych metodą cytometrii przepływowej odnotowano ich spadek w hodowlach traktowanych kalcytriolem (ryc. 43 i 44). Stwierdzona obniżona ekspresja tych ważnych receptorów powierzchniowych, które spełniają kluczową rolę w przewodzeniu sygnału pomiędzy komórką i ECM, pozostaje w ścisłym związku z oceną morfologiczną SMC poddanych działaniu kalcytriolu przez 7 dni trwania hodowli. W porównaniu z wariantem kontrolnym komórki te przejawiały wyraźne cechy fenotypu *synthetic*, intensywniej przemieszczały się, proliferowały i tworzyły regularny wielopokładowy układ przestrzenny. Spadek ilości beta1-integrzyn po działaniu kalcytriolu wyraźnie korespondował z zahamowaniem procesu różnicowania i zwiększeniem stopnia przeżywalności komórek mięśniowych.



Ryc. 43. Reprezentatywny wynik, przedstawiający ekspresję beta-1 integrzyn na powierzchni komórek mięśniowych hodowanych w obecności kalcytriolu, komórek hodowanych bez kalcytriolu oraz komórek niebarwionych. Poziom cząstek adhezyjnych jest znacznie niższy w przypadku SMC hodowanych w obecności kalcytriolu (7 dni). Cytometria przepływowa, LSRII.

Fig. 43. Representative histograms illustrating expression of beta-1 integrin receptors in plasma membrane of SMCs from calcitriol-treated and control culture. Diminished level of adhesion molecules on SMC after calcitriol treatment for 7 days is evident. Flow cytometry, LSRII.



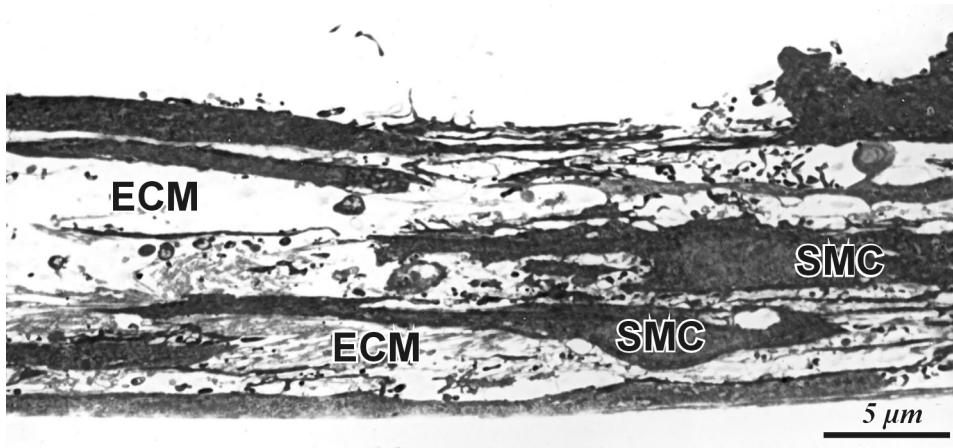
Ryc. 44. Wpływ kalcytriolu na poziom beta-1 integryn w 7-dniowej hodowli. Uśrednione dane pochodzą z czterech niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczna została stwierdzona za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności $P < 0,01$. Mniejsza ekspresja receptorów integrynowych po działaniu kalcytriolu w stężeniu 10 nmol/l pozostaje w związku ze zwiększeniem aktywności proliferacyjnej i migracyjnej SMC.

Fig. 44. Effects of calcitriol on beta-1 integrin level after culturing for 7 days. Data were averaged from at least four independent experiments in each group. Statistical significance was assessed by an impaired Student's t-test. P-value of < 0.01 was considered significant. Diminished expression of beta-1 integrin receptors after exposition to 10 nmol/l concentration of calcitriol coincides with increased proliferative and migratory activities of SMCs.

4.6. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na ECM

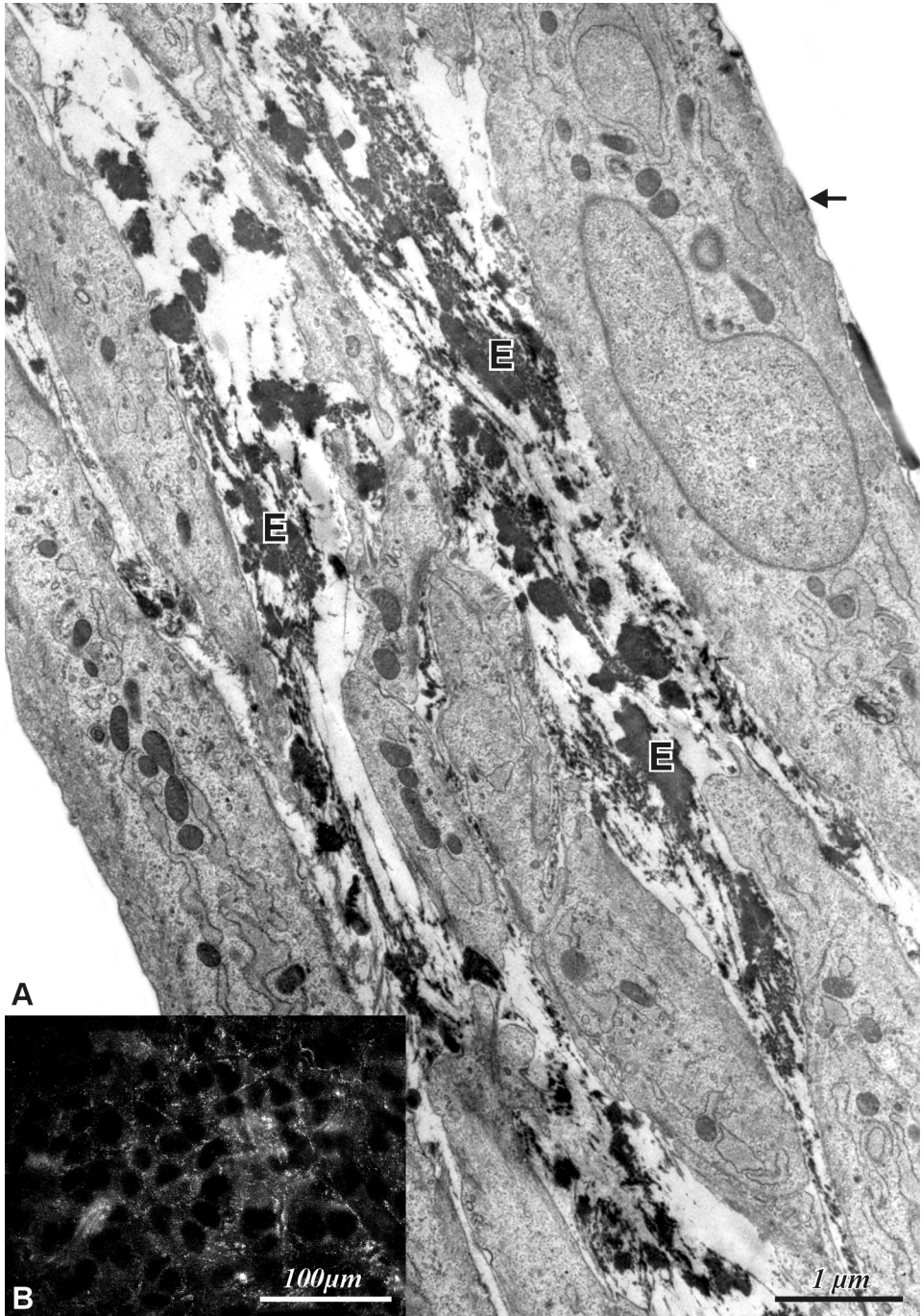
4.6.1. Zaburzenia w formowaniu włókien elastycznych

Komórki mięśniowe hodowane w obecności kalcytriolu oraz bez dodatku tego aktywnego hormonu witaminowego syntetyzowały i wydzielaly do przestrzeni międzykomórkowych znaczne ilości składników ECM. Odpowienia preparatyka chemiczna i obróbka techniczna (opisana wcześniej) pozwoliły na uzyskanie obrazów informujących o ilości i jakości odkładanych składników włókien elastycznych.



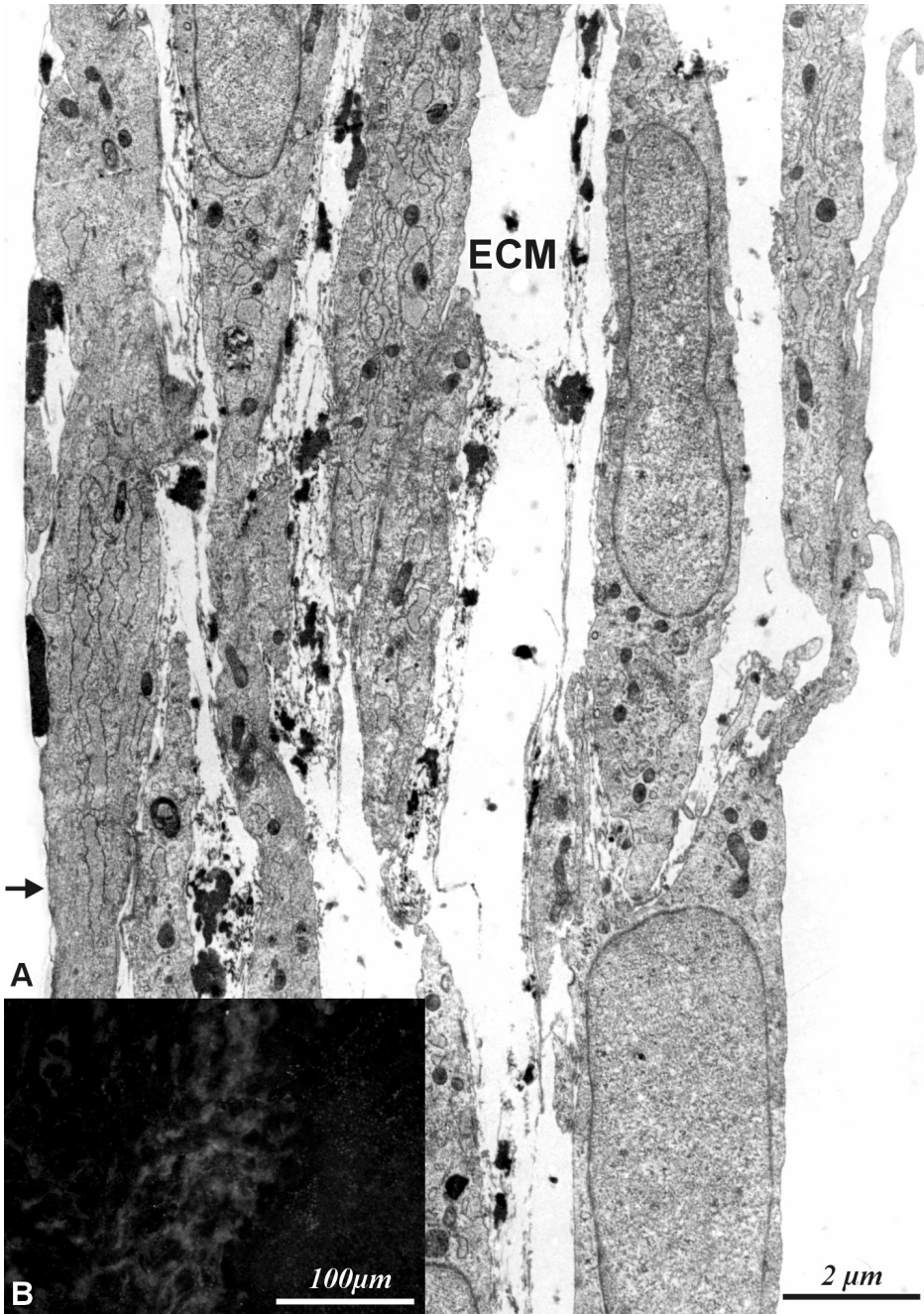
Ryc. 45. Hodowla komórek mięśniowych traktowanych kalcytriolem. Małe powiększenie TEM uwidacznia intensywnie rozbudowane liczne pokłady SMC w hodowli wielowarstwowej. Szczególny kształt komórek mięśniowych oraz obecność licznych cytoplazmatycznych wyrostków wskazuje na ich aktywne przemieszczanie. Szerokie przestrzenie komórkowe zawierają ECM. Materiał przygotowano bez kontrastowania włókien elastycznych.

Fig. 45. Calcitriol-treated culture of SMCs. Low power magnification of TEM visualize intensely abundant multilayer of SMCs. Oddly shaped cells with long cytoplasmic projections indicating ongoing migration are visible. Note wide extracellular spaces filled by ECM. Material was prepared without visualization of elastic fibers.



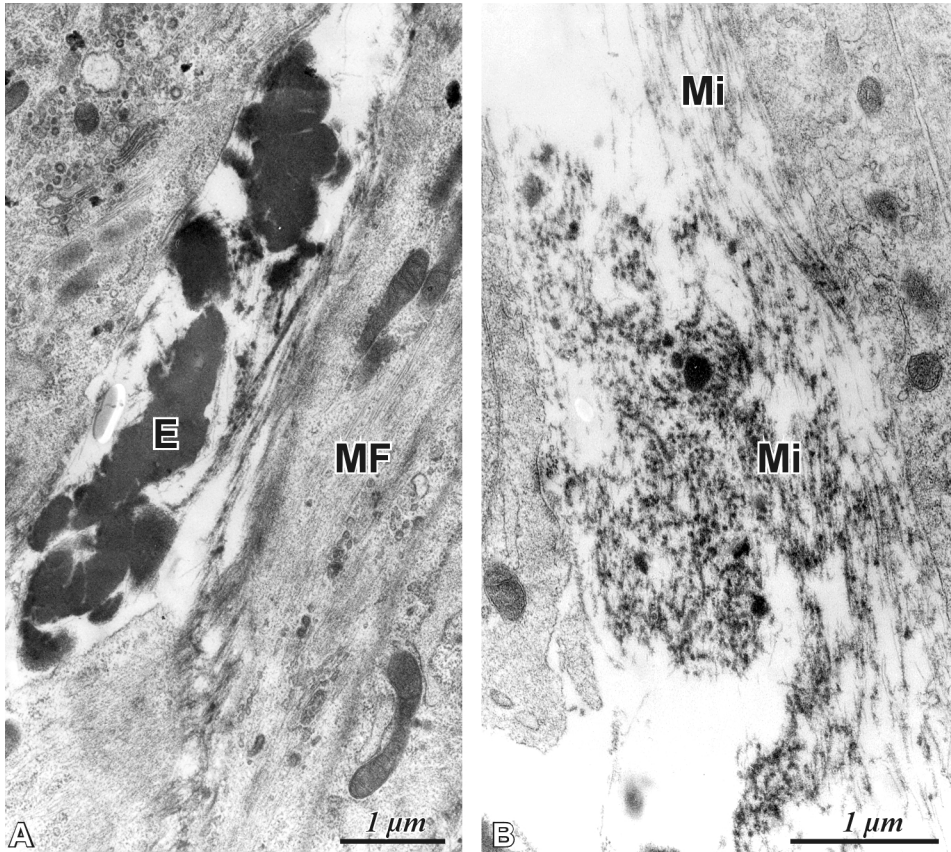
Ryc.46. Analiza mikroskopowa uwidacznia cechy ultrastrukturalne komórek mięśniowych w 9-dniowej hodowli prowadzonej bez dodatku kalcytriolu (A). Strzałki wskazują miejsca przylegania do naczynia hodowlanego. W obszarze wzrostu wielopokładowego SMC tworzą stosunkowo zwarty układ i przejawiają cechy komórek zróżnicowanych, posiadających dobrze rozbudowany aparat kurczliwy. W przestrzeniach międzykomórkowych znajdują się skupienia wyraźnie kontrastowanej amorficznej elastyny (E). Elastyna uwidoczniła za pomocą techniki immunofluorescencyjnej z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko elastynie (B).

Fig. 46. Electron microscopic analysis show structural features of SMCs after culturing for 9 days without calcitriol (A). Arrows indicate the regions of adhesion to Petri dish. In multilayered region the closely arranged cells exhibit differentiated, myofilament-rich contractile phenotype. Network of newly formed elastic fibers within the matrix is demonstrated. Elastic fibers are composed of clearly distinguishable conglomerates of highly stained amorphous elastin (E). Immunofluorescence localization of matrix associated elastin using anti-elastin antibody (B).



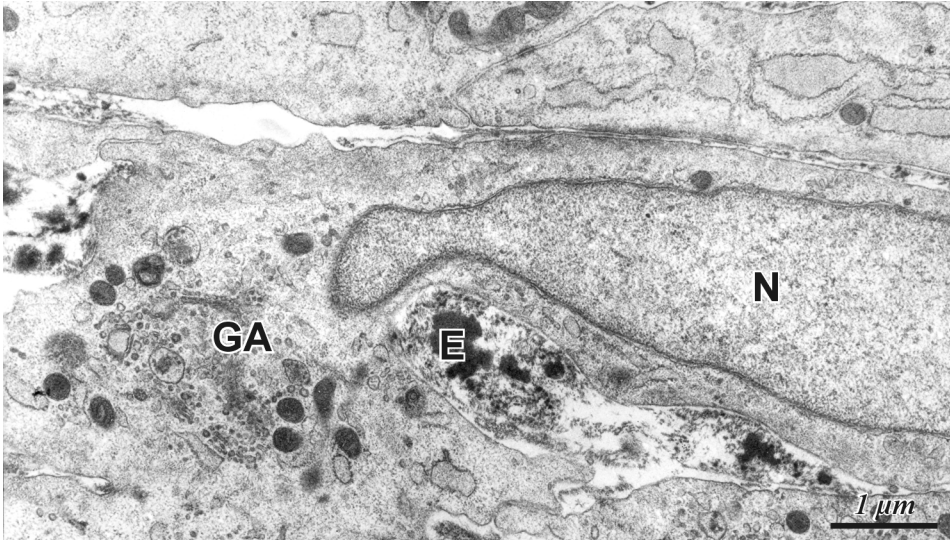
Ryc. 47. Analiza ultrastrukturalna komórek mięśniowych w 9-dniowej hodowli komórkowej poddanej działaniu kalcytriolu. SMC prezentują cechy charakterystyczne dla komórek o fenotypie *synthetic*. Rozbudowane błony siateczki endoplazmatycznej, liczne mitochondria świadczą o dużej aktywności metabolicznej. Dodatek kalcytriolu do hodowli wyraźnie wpływał na proces elastogenezy, szczególnie na dojrzewanie włókien sprężystych. Można zaobserwować zaburzenia w procesie formowania włókien sprężystych polegające na kumulacji w przestrzeniach międzykomórkowych jedynie małych skupień amorficznej elastyny. Istota międzykomórkowa (ECM). Czarne strzałki wskazują miejsce przylegania do naczynia hodowlanego (↓). Próba identyfikacji elastyny w przestrzeniach międzykomórkowych za pomocą techniki immunofluorescencyjnej z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko elastynie (B). W przeciwieństwie do hodowli prowadzonej w warunkach kontrolnych nie udało się uwidocznić elementów dojrzałej elastyny.

Fig. 47. Electron microscopic analysis show ultrastructural features of SMCs after culturing for 10 days with calcitriol. SMC cultured in the presence of calcitriol resemble the typical smooth muscle cell synthetic phenotypes. Intensively abundant rough endoplasmic reticulum and mitochondria cause evidence high metabolic activity. Note that addition of calcitriol to the culture markedly altered elastogenesis especially elastic fibers maturation. Impaired elastic fiber assembly, as small small patches of amorphous material in extracellular spaces is visible. Extracellular matrix (ECM). Black arrows indicate the region of adhesion to Petri dish (↓). Immunofluorescence localization of matrix associated elastin using anti-elastin antibody (B). In contrast to control conditions there is no visualization of mature elastin.



Ryc. 48. Obraz z mikroskopu elektronowego obrazujący formowanie włókien sprężystych w przestrzeni między dwiema komórkami mięśniowymi w hodowli rosnącej przez 9 dni bez dodatku kalcytriolu (A). Fotografia wybrana dla pokazania gęstej sieci mikrofibryli (Mi) zlokalizowanych w przestrzeni międzykomórkowej hodowli SMC traktowanych kalcytriolem (B). Z mikrofibrylami związane są jedynie niewielkie skupienia amorficznej elastyny. Kalcytriol wyraźnie zaburza proces elastogenezy na etapie polimeryzacji elastyny. Obserwuje się więc ewidentny spadek zawartości dojrzałej elastyny i nie-normalnie dużą kumulację składnika mikrofibryllarnego.

Fig. 48 Electron micrograph illustrated elastic fiber assembly between two SMC in 9 day of control culture (A). Electron micrographs selected from calcitriol-treated culture to demonstrate large amounts of cross-linked fine microfibrillar meshwork (B). Small elastin aggregates are intimately associated with microfibrils (Mi). Addition of calcitriol to the culture markedly alters elastogenesis especially elastic fibers maturation. A substantial decrease in the insoluble elastin content and abnormal accumulation of microfibrillar component is evident.



Ryc. 49. Analiza miroskopowo elektronowa SMC w 7-dniowej hodowli poddanej działaniu kalcytriolu. Utworzone przez komórkę mięśniową, zatokowe zagłębienie zawiera sieć mikrofibryli ze złożami elektronowo gęstej elastyny (E) tworząc włóknisto-ziarnistą strukturę. W sąsiedztwie „zatoki” na terenie cytoplazmy SMC występują intensywnie rozbudowane cysterny aparatu Golgiego (Ga). Struktura Golgiego jest bezpośrednio związana z syntezą i sekrecją elementów istoty międzykomórkowej.

Fig. 49. Electron microscopic examination of SMCs after culturing for 7 days with calcitriol. Microfibrils arranged into the three dimensional meshwork within the matrix were covered with electron dense granule elastin (E) build fibrillogranular bundles located in the bay. Intensively developed Golgii apparatus (GA) with abundant cisterne is typical of cells synthesizing and secreting of extracellular matrix elements.

Specjalne, dodatkowe kontrastowanie spolimeryzowanej elastyny dało możliwość obserwacji procesu formowania włókien sprężystych. Kalcytriol zaburzał przebieg tego procesu powodując wyraźnie jego spowolnienie. W obrazach z TEM dominowała komponenta włóknista (mikrofibryle glikoproteinowe) na niekorzyść aglomeratów dojrzałej elastyny (ryc. 47 i 48B).

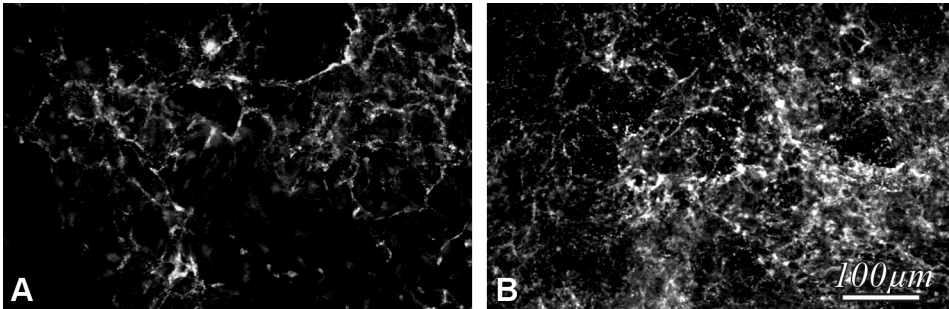
Na podstawie analizy morfologicznej uzyskanych obrazów mikroskopowych można wyszczególnić najbardziej znaczące zmiany dotyczące ECM powodowane przez kalcytriol:

- poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych i zwiększenie ilości odkładanych składników ECM (porównanie rycin 18A i 19A oraz rycin 45A i 46, 47A)
- zmniejszenie ilości dojrzałej polimeryzowanej elastyny (porównanie rycin 46A i 47A oraz 46B i 47B)
- nadmierna akumulacja mikrofibryli (porównanie rycin 48A i 48B)

4.6.2. Wapnienie

Dla oszacowania wpływu kalcytriolu na proces mineralizacji w hodowli komórek mięśniowych wykorzystano bardzo czułą metodę opartą na zastosowaniu fluorescencyjnego wskaźnika (*Calcium Green-1*). W 9 dniowych hodowlach SMC rosnących bez dodatku kalcytriolu stwierdzono niewielkie złoże wapniowe (ryc. 50A). Natomiast odnotowano intensywną fluorescencję wskazującą na kumulację mineralnych depozytów zawierających wapń w przestrzeniach międzykomórkowych SMC hodowanych w środowisku kalcytriolu o stężeniu 10 nmol/l (ryc. 50B).

Przedstawione na rycinach różnice w intensywności mineralizacji hodowli w porównywanych grupach, bardzo wyraźnie korelowały z cechami fenotypu, charakterem wzrostu komórek i budową ECM. Mianowicie, wyraźną tendencję do kumulacji wapnia posiadały hodowle traktowane kalcytriolem, w których SMC przejawiały fenotyp *synthetic*. W takich hodowlach występowały liczne pokłady „luźno” rozłokowanych komórek produkujące duże ilości istoty międzykomórkowej. Przede wszystkim zaś, złoże wapniowe znajdowały się w hodowlach o zaburzonym procesie formowania włókien sprężystych.

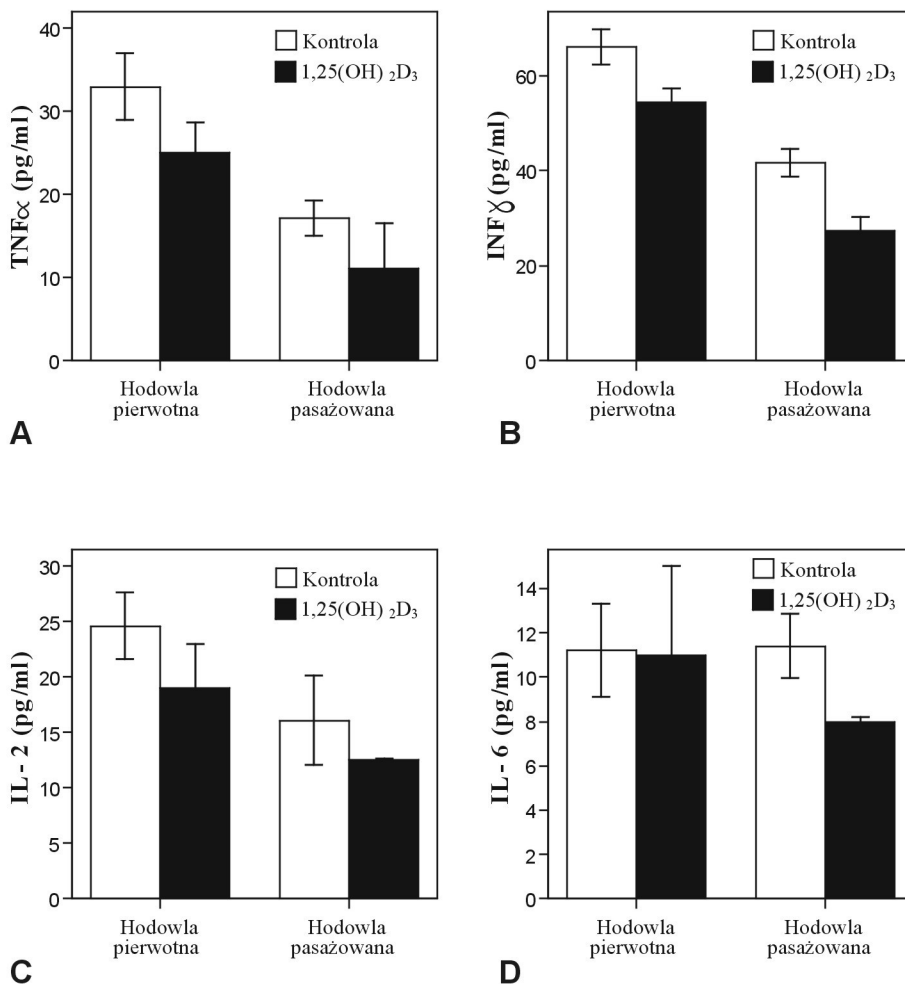


Ryc. 50. Reprezentatywne mikrografie spod mikroskopu fluorescencyjnego ukazujące złoże wapniowe w hodowli komórek mięśniowych. Obraz hodowli komórek mięśniowych rosnących bez dodatku kalcytriolu przedstawia niewielkie nasilenie reakcji z zastosowanym fluorofores Calcium-greenTM (A). W hodowli SMC wystawionej przez 9 dni na działanie kalcytriolu widoczne są liczne rozproszone lub skupione depozyty wapniowe, zlokalizowane głównie w rejonie macierzy zewnątrzkomórkowej (B).

Fig. 50. Representative photomicrographs of immunofluorescence detection of calcium deposits in smooth muscle cell culture. SMC cultured without calcitriol demonstrate only weak immunostainability with Calcium-greenTM-1 (A). SMC incubated for 9 days with calcitriol supplemented medium show diffusive and granular calcification predominantly in the extracellular matrix regions of the cultures (B).

4.7. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wydzielanie cytokin zapalnych

SMC w hodowli są aktywne metabolicznie i czynnościowo, co manifestuje się także zdolnością do syntezy i wydzielania cząstek sygnałowych, będących mediatorami stanu zapalnego. Stwierdzono istotne różnice w ilości wydzielanych cytokin prozapalnych w supernatantach pomiędzy dwiema porównywanymi grupami. Kalcytriol w stężeniu 10 nmol/l powodował spadek poziomu TNF- α , IFN- γ , IL-2 i IL-6 w supernatantach z hodowli pierwotnych i pasażowanych, rosnących w środowisku kalcytriolu.



Ryc. 51. Wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nmol/l) na produkcję cytokin prozapalnych przez komórki mięśniowe. Kalcitriol powodował obniżenie poziomu wszystkich badanych cytokin prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6) w supernatantach z hodowli. Przedstawiono średnie wartości pomiarów \pm SD uzyskane z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. Istotność statystyczna została stwierdzona za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności $P < 0,01$.

Fig. 51. The effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nmol/l) on proinflammatory cytokine production by SMCs in culture. Calcitriol decreased the levels of all proinflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6) examined in the culture supernatants. All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. Values are given as mean \pm SD and statistically significant ($P < 0.01$) differences were assessed using the unpaired Student's t-test.

5. DYSKUSJA

Powszechnie przyjęto uważać, że wysokie ciśnienie krwi, wzrost poziomu LDL przy niskiej koncentracji HDL, palenie papierosów oraz podwyższony poziom glukozy, są oprócz uwarunkowań genetycznych, najistotniejszymi czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym miażdżycy. Brak aktywności ruchowej, otyłość oraz nieodpowiednia dieta dodatkowo nasilają działanie wymienionych czynników [116, 142, 183]. Kwestia przestaje być oczywista, gdy rozważamy tzw. paradoksy, jak np. paradoks francuski czy włoski. Zauważa się bowiem jawną sprzeczność polegającą na występowaniu niskiego wskaźnika śmiertelności z powodu CVD dla wspomnianych populacji, przy jednocześnie wysokim wskaźniku występowania określonych czynników ryzyka. Lub odwrotnie, w przypadku paradoksu irlandzkiego lub indyjskiego występuje wysoka śmiertelność z powodu CVD, przy braku zdefiniowanego czynnika ryzyka. Przytoczone paradoksy wspierają wysuwaną coraz częściej tezę, że jeden lub więcej dodatkowych aczkolwiek nie do końca rozpoznanych czynników odgrywa ważną rolę w patogenezie chorób serca i naczyń.

Obecnie wiele danych przemawia za słusznością założenia, iż zbyt niski poziom witaminy D w organizmie, może być właśnie tym istotnym, poszukiwanym czynnikiem [187, 154, 287, 292]. Niedobór lub niedostatek witaminy D jest poważnym problemem o zasięgu globalnym, a zjawisko przybrało rozmiary pandemii [6, 18, 82, 109, 320]. W tym miejscu wypada jeszcze raz podkreślić, że stężenie kalcydiolu – 25(OH)D₃, głównego metabolitu witaminy D, który znajduje się we krwi, zależy bezpośrednio od efektywności syntezy w skórze i w niewielkim stopniu od podaży w pokarmie [78, 82, 107, 118, 162, 309]. Kalcydiol zaś jest prekursorem aktywnej formy witaminy D₃ – kalcytriolu, który reguluje ważne funkcje organizmu poprzez wpływ na ekspresję ponad 200 różnych genów, lub poprzez działanie w układach transdukcji sygnału [53, 57, 159, 203, 213].

Głównym elementem komórkowym ściany naczynia krwionośnego są SMC, one też są głównymi aktorami zmian, które występują w procesie miażdżycowym [9, 33, 56, 90, 191, 195, 250, 273, 275, 300]. Właśnie ta szczególna pozycja komórek mięśniowych i intrygująca, potencjalna rola kalcytriolu w procesie miażdżycowym skłoniła mnie do badania i opisanie wybranych aspektów działania suprafizjologicznych stężeń (1–100 nmol/l) tego aktywnego metabolitu witaminy D₃ na SMC.

Pierwsze doniesienia związane z problematyką podejmowaną w tej pracy ukazały się w roku 1987 i dotyczyły identyfikacji VDR w komórkach mięśniowych naczyń. Na tej podstawie SMC zaliczono je do grona tzw. *target cells* [137, 138, 179]. Ci sami badacze opisując efekty oddziaływania 1 α ,25 dihydroksywitaminy D₃ na proliferację SMC w hodowli zakwalifikowali ten związek do grupy czynników wzrostowych (*growth factors*).

Planując doświadczenia z wykorzystaniem witaminy D, miałam na uwadze silną toksyczność jej podwójnie hydroksylowanego metabolitu, jakim jest kalcytriol [229, 311]. Niejednokrotnie przedstawiano wyniki badań na zwierzętach, u których po aplikacji wysokich dawek witaminy D występowały poważne zmiany martwicowe i zwapnienia w licznych tkankach i narządach [213, 214, 266, 298, 307]. Zastosowanie do eksperymentów *in vitro* kalcytriolu w zbyt wysokich stężeniach może indukować spektakularne efekty biologiczne, takie jak zahamowanie wzrostu komórek oraz wzmożone ich obumieranie na drodze apoptozy lub nekrozy. Z drugiej zaś strony, ze względu na niezwykle krótki okres połowicznego rozpadu kalcytriolu, szacowany na 4–6 godzin [124], oraz duże niebezpieczeństwo degradacji w trakcie czynności laboratoryjnych, można wogóle nie odnotować biologicznego efektu działania tej witaminy.

Decyzja o zastosowaniu kalcytriolu w zakresie stężeń od 1–100 nmol/l, przy czym opisane wyniki odnoszą się zwykle do stężenia 10 nmol/l, była poprzedzona licznymi wstępnymi eksperymentami. Pozwoliły one wyselekcjonować dawkę, która powodowała biologiczne, ale nie toksyczne efekty, dające się zaobserwować na poziomie struktury i skutkujące zmianami funkcji SMC [279, 284, 285].

Wydaje się, że zastosowane przeze mnie stężenia kalcytriolu mogą być porównywalne z ilością tego endogennego związku w miejscach rozwoju zmian miażdżycowych. Stężenie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ może lokalnie wzrastać na skutek syntezy przez makrofagi, komórki śródbłonna, a według ostatnich doniesień, także przez same komórki mięśniowe [57, 258, 316].

O tym, że witamina D odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego ostatecznie przesądzają wyniki pracy D. Somjen, zaprezentowane na łamach czasopisma *Circulation* [258]. Mianowicie, w komórkach mięśniowych naczyń stwierdzono obecność wewnątrzkomórkowego systemu 1α -hydroxylazy. I tak, syntetyzowana *on site* $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ może regulować na drodze auto- i parakrynnie ważne funkcje fizjologiczne SMC. Sugestie na temat auto/parakrynnych mechanizmów warunkujących wzrost SMC wysuwano zresztą znacznie wcześniej [35, 41, 242], a określenie *autocrine growth* oznaczało wzrost ekspresji genów w komórkach mięśniowych i zwiększoną podaż różnych biologicznie aktywnych czynników. I chociaż zagadnienie regulacji behawioru komórek mięśniowych naczyń zostało dosyć dobrze zbadane [32, 127, 131, 168, 244, 313], to rola kalcytriolu jako mediatora ważnych funkcji tych komórek nie jest do końca rozpoznana. Trudno też odpowiedzieć na pytanie, do jakiego stopnia reakcja SMC na kalcytriol zależy od związku, który cyrkuluje we krwi i działa na zasadzie endokrynnie, a do jakiego stopnia od produkowanego *on site* i działającego auto- lub parakrynnie.

Część wyników przedstawionych w niniejszej pracy dotyczy wpływu tego aktywnego metabolitu witaminy D – $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na modulację fenotypową SMC. Termin „modulacja fenotypowa” jest powszechnie używany w odniesie-

niu do komórek mięśniowych od prawie 30 lat, i jest niewątpliwie bardzo użyteczny dla określenia całokształtu zmian zachodzących podczas procesu ich różnicowania i odróżnicowywania [33, 41, 91, 271, 273].

Komórki mięśniowe w hodowli charakteryzują się unikalnymi cechami morfologicznymi i nietypowym wzrostem [23, 25, 62, 64, 205], co też uwzględniłam podczas dokonywania wyboru modelu badawczego [277, 279]. Jedną z takich cech, które odróżniają SMC od innych typów komórek, jest wzrost wielowarstwowy (*multilayer*), możliwy ze względu na brak zahamowania kontaktowego [41, 272, 277, 278, 279]. Pod tym względem SMC wykazują podobieństwo do komórek transforowanych [20].

Nie przypadkowo też większość doświadczeń w niniejszej pracy została wykonana na pierwotnych hodowlach SMC. Komórki mięśniowe pasażowane lub ich wyselekcjonowane linie zatracają prawie całkowicie właściwość spontanicznego różnicowania, nie są zatem odpowiednie do badania modulacji fenotypowej [34, 272, 279]. Duże znaczenie dla efektów prowadzonych przeze mnie doświadczeń miał także wiek zwierząt [62] oraz sposób pozyskiwania komórek mięśniowych do hodowli [34, 41]. Izolacja komórek z błony środkowej wykonywana za pomocą enzymu proteolitycznego – kolagenazy, powodowała strawienie składników błony podstawnej, głównie lamininy i kolagenu typu IV, promując w ten sposób fenotypową modulację SMC, i co się z tym wiąże – proliferację i migrację [100, 197, 227].

Problem modulacji fenotypowej badałam w oparciu o kryteria morfologiczne. Podczas tego procesu następowały zarówno zmiany ilościowe dotyczące elementów budujących cytoskielet i aparat kurczliwy, jak i zmiany w ich organizacji. Następstwem odróżnicowania SMC była intensywne proliferacja, a faza wykładnicza wzrostu hodowli trwała do około 10–11 dnia [278].

Istotną cechą SMC z hodowli kontrolnej był ich charakterystyczny nierównomierny układ, powszechnie określany jako *hills and valleys*. W miejscach wzrostu wielopokładowego SMC pozostawały w dużym zagęszczeniu i bliskim kontakcie, przybierały kształt wrzecionowaty, a na terenie cytoplazmy wyraźnie wzrastała ilość elementów kurczliwych. Komórki takie częściowo odbudowywały błonę podstawną. W 7-dniowej hodowli kontrolnej proces różnicowania SMC zachodził intensywniej w porównaniu z hodowlą poddaną działaniu kalcytriolu.

Zaobserwowano, że $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nmol/l drastycznie zmienił charakter wzrostu komórek mięśniowych w hodowli. Liczne pokłady luźno rozmieszczonych komórek tworzyły szeroką warstwę o równomiernym układzie. Większość SMC przejawiała cechy fenotypu *synthetic*, którego wyznacznikami strukturalnym były: utrata elementów kurczliwych, intensywne rozbudowa błon siateczki endoplazmatycznej i wyraźnie ukształtowane struktury Golgiego.

Badania immunofluorescencyjne uwiarydowiły, że SMC z hodowli traktowanych kalcytriolem prezentowały niski poziom ekspresji alfa-aktyny, będącej markerem różnicowania [255, 256, 259]. Wymienione cechy były także dowodem na pozostawanie SMC w cyklu komórkowym [199, 233, 280].

Opóźniony pod wpływem kalcytriolu proces różnicowania wpływał na przedłużoną w czasie aktywność proliferacyjną SMC, co skutkowało zwiększeniem ich liczby w porównaniu z liczbą komórek mięśniowych rosnących w hodowli bez dodatku kalcytriolu. Analiza cytometryczna dostarczyła danych na temat kinetyki podziałów komórkowych [166], z których wynika, że w hodowli traktowanej kalcytriolem nastąpiło skrócenie czasu generacji zachodzących podziałów. Potwierdzeniem proproliferacyjnego efektu działania kalcytriolu były również wyniki badań radiologicznych świadczące o efektywniejszej inkorporacji znakowanej tymidyny do DNA jądrowego, a także wyniki analizy zawartości białka. Zwiększona synteza białka niekoniecznie jednak w prosty sposób koreluje z proliferacją, ponieważ do puli białka całkowitego zaliczyć należy także białko syntetyzowane, wydzielane, a następnie kumulowane w przestrzeniach międzykomórkowych. Zwiększone ilości składników ECM w hodowlach SMC eksponowanych na działanie kalcytriolu były obserwowane w poszerzonych przestrzeniach międzykomórkowych na elektronogramach wykonanych techniką TEM.

Stwierdzono ponadto statystycznie znamienne wyższy poziom ATP w ekstraktach z hodowli traktowanych kalcytriolem. Efekt ten dotyczył więc hodowli, w których SMC w większości przejawiały fenotyp *synthetic*, dynamiczniej się dzieliły, intensywniej migrowały i przejawiały słabsze tendencje do śmierci na drodze apoptozy.

Przedstawione powyżej efekty działania kalcytriolu potwierdziły wcześniej poczynione przeze mnie i opisane spostrzeżenia na temat stymulującego działania kalcytriolu w stosunku do SMC [278, 284, 285].

Nie uzyskano natomiast spodziewanych różnic pomiędzy porównywanymi grupami podczas analizy cyklu komórkowego. Oceniana cytofotometrycznie zawartość DNA w komórkach mięśniowych była w obu przypadkach podobna, a odsetek komórek w fazach S+G2/M wynosił 45–50%. Ten brak różnic pomiędzy porównywanymi grupami można tłumaczyć faktem dokonywania analizy cytometrycznej cyklu komórkowego w 9-dniowej hodowli, czyli w czasie kiedy komórki mięśniowe traktowane kalcytriolem i komórki wariantu kontrolnego wykazywały podobny poziom zróżnicowania. Tak więc 9, 10-dniowa hodowla SMC jest najbardziej odpowiednia do oceny dynamiki podziałów mitotycznych, lecz zdecydowanie „za stara” dla porównań odnośnie przebiegu cyklu komórkowego.

Podobnie przedstawia się kwestia dotycząca wartości ładunku energetycznego adenylanów (AEG) dla dwóch porównywanych grup. Sądzę, że odpowiednio wysoka wartość AEG, oszacowana na poziomie 0,896, zarówno dla SMC z 9-dniowej hodowli kontrolnej jak i hodowli poddanej działaniu kalcytriolu, pra-

widłowo oddaje ich stan energetyczny. Wartość AEG mogłaby być znacznie obniżona w przypadku zastosowania substancji o działaniu toksycznym, co oczywiście w tym przypadku nie miało miejsca.

W literaturze światowej istnieje zdecydowanie niewiele danych, za to sporo kontrowersji na temat proliferacyjnego efektu, jaki wywołuje kalcytriol w stosunku do komórek mięśniówki w hodowli. Niektóre dane literaturowe wskazują na efekt hamujący [174, 258] inne stymulujący [38, 137, 184, 204, 205]. Rozbieżności często wynikają ze stosowania przez eksperymentatorów odmiennych sposobów izolowania komórek, różnych warunków doświadczalnych oraz stężeń $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Prawdopodobnie właśnie z tego powodu, w pracach przeglądowych, aspekt działania witaminy D na komórki mięśniowe naczyń, chociaż wydaje się niezwykle ważny, jest traktowany powierzchownie lub bywa pomijany [57, 215].

Wzmoczona proliferacja SMC, opisana w niniejszej pracy, związana była także z innymi przejawami aktywności komórek mięśniowych, w tym z migracją. Na podstawie analizy obrazów mikroskopowych można było stwierdzić, że zastosowany hormon witaminowy wyraźnie wpływa na przyleganie SMC do podłoża oraz zaburza kontakty między komórkami. Pod wpływem kalcytriolu redukcji ulegała ilość włókien naprężeniowych i miejsc przylegania (Fa) do ECM. Badania z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazały spadek ilości cząstek adhezyjnych β_1 -integryn w błonie komórek poddanych działaniu kalcytriolu.

Dyskutując kwestie związane z migracją SMC w hodowli komórkowej, należy uwzględnić szczególną i wyjątkową plastyczność tych komórek [141, 176, 305]. W ścianie niezmiennych patologicznie naczyń krwionośnych obecne są SMC o fenotypie kurczliwym i nie przejawiają właściwości migracyjnych ani proliferacyjnych [9, 56, 93, 244]. Sytuacja ta jest możliwa głównie dzięki odpowiednio wysokiej adhezji SMC do ECM, co daje gwarancję zachowania mechanicznej stabilności i elastyczności ściany naczynia [10, 195, 261]. Do tego stanu przyczyniają się ponadto liczne cząstki adhezyjne obecne w błonie SMC o fenotypie *contractile*, które generują sygnał pozwalający zachować niezmienność tego fenotypu, zabezpieczając jednocześnie przed migracją i proliferacją [1, 30, 237, 297, 315].

Migracja komórek jest procesem dynamicznym, wielostopniowym, wysoce zintegrowanym, który oprócz swojego oczywistego znaczenia w morfogenezie naczyń, odgrywa istotną rolę w miażdżycy [80, 235]. W trakcie tworzenia zmian miażdżycowych migracja podobnie jak proliferacja wymaga reorganizacji elementów ECM i molekuł adhezyjnych [242, 248, 250, 260]. Komórki mięśniowe zatracają dotychczasowe prawidłowe interakcje z ECM na skutek degradacji błony podstawnej przez enzymy z rodziny MMP, których cały panel jest w dużej ilości produkowany przez same SMC [10, 66, 67, 129, 130]. W tych okolicznościach komórki mięśniowe modułują fenotypowo, a finalnym stadium tego pro-

cesu jest fenotyp *synthetic* predysponujący je do proliferacji i migracji [3, 10, 14, 26, 33, 65, 135, 240].

Podczas moich obserwacji zauważyłam, że w pierwotnej hodowli komórkowej SMC najpierw modulują fenotypowo w kierunku stanu *synthetic*, następnie proliferują i rozprzestrzeniają się po podłożu, zajmując w krótkim czasie dostępną powierzchnię i formując grudkowate nawarstwienia (*nodule*) [19, 20, 277, 278, 279, 283]. W ten sposób odzwierciedlają do pewnego stopnia sytuację panującą w warunkach tworzenia zmian miażdżycowych [15, 34, 41]. Jednakże po kilku dniach w hodowli pierwotnej zachodzi proces odwrotny, SMC spontanicznie różnicują się i przybierają cechy fenotypu *contractile*. Ich zdolności proliferacyjne i migracyjne zostają osłabione [153]. W obrazach spod mikroskopu elektronowego można było dostrzec dobrze uformowane elementy aparatu kurczliwego, odbudowaną błonę podstawną oraz liczne kaweole. Natomiast wyznakowanie przeciwciałami dla α -aktyny sprzężonymi z fluorochromem pozwoliło zidentyfikować w mikroskopie fluorescencyjnym włókna naprężeniowe, a nawet miejsca przylegania do podłoża zwane *focal adhesions*, które stanowiły wyznacznik stabilizacji fenotypu kurczliwego SMC i silnego związku z ECM.

SMC hodowane w środowisku kalcytriolu po 5 dniach tylko w niewielkim stopniu ulegały różnicowaniu, dlatego też wymienione wyżej cechy morfologiczne były obserwowane rzadziej niż w wariacie kontrolnym. W obrazach TEM widoczne były natomiast wyraźnie poszerzone przestrzenie międzykomórkowe, cechy degradacji włókien elastycznych oraz subtelne, strukturalne wyznaczniki ruchu komórek. Także analiza materiału w mikroskopie skaningowym i kontrastowo-fazowym dostarczyła informacji na temat formowania struktur zaangażowanych w przemieszczenie się komórek. Rozróżniano lamellipodia i filopodia, które po zakotwiczeniu komórki do podłoża na tzw. biegunie ciągnącym, generują siły umożliwiające kurczenie pozostałej części komórki i w konsekwencji pozwalają spolaryzowanej komórce na płynny ruch w określonym kierunku [63].

Bogata literatura przedmiotu wyjaśnia, że interakcja komórek mięśniowych ze składnikami istoty międzykomórkowej odbywa się za pośrednictwem transbłonowych receptorów dla ECM [119, 139, 146]. Zidentyfikowano cząstki adhezyjne zaliczane do rodziny integryn, będące ważnym elementem w układzie transdukcji sygnału, dzięki którym regulowane są takie funkcje komórek mięśniowych jak adhezja, ruch, polaryzacja a także proliferacja, różnicowanie i żywotność [30, 73, 302, 303]. Integryny są heterodimerami złożonymi z podjednostek α i β , z których każda posiada dużą domenę zewnątrzbłonową dla wiązania liganda, pojedynczą domenę transbłonową oraz domenę cytoplazmatyczną umożliwiającą interakcję z elementami cytoszkieletu. O specyficzności kontaktu z ECM decyduje różnorodność podjednostek α i β , a następnie ich kombinacja [315]. Zdecydowanie molekułą docelową, dla sygnału przekazywanego z ECM za pośrednictwem integryn, jest w komórkach mięśniówki naczyni aktywina bud-

jąca elementy cytoszkieletu, chociaż ważną rolę spełniają także białka kotwiczące (*adapter proteins*) powiązane z aktyną [302]. Ligandami receptorów integrynowych są zazwyczaj fibronektyna, laminina i kolagen. Podjednostka beta domeny cytoplazmatycznej zaś jest szczególnie istotna dla lokalizacji miejscowej adhezji.

Poszukując miarodajnych wyznaczników dla adhezji i intensywności migracji określono i porównano poziom beta-1 integryny w błonie komórek mięśniowych rosnących w środowisku kalcytriolu i tych z hodowli kontrolnych. Wyrażne obniżenie ilości badanych cząstek adhezyjnych na komórkach mięśniowych traktowanych kalcytriolem jest efektem, który w dużym stopniu uzasadnia rezultaty obserwacji morfologicznych. Mianowicie, SMC po działaniu kalcytriolem miały słabszy kontakt z ECM, w mniejszym stopniu następowała u nich polimeryzacja aktyny umożliwiająca formowanie *stress fibers* istotnych do konstruowania miejsc przylegania (*focal adhesions*). Jak już wspomniano, włókna naprężeniowe są typowe dla mocno zakotwiczonych w ECM i nieruchliwych komórek mięśniowych [1, 139, 211, 235, 259]. Jako molekularne podłoże dla migracji komórek wskazują badacze mechanizm transdukowania sygnału poprzez fosfolipazę C, kinazę fosfatydylinositolu 3 i kinazę MAP [163, 216, 232, 291].

Mając na uwadze szczególne właściwości SMC do formowania włókien sprężystych w hodowli komórkowej, postanowiono zbadać na ile $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jest w stanie wpływać na ten proces. W 10-dniowej hodowli kontrolnej obserwowano regularny układ dojrzałych włókien sprężystych zbudowanych z konglomeratów amorficznej, nieprzezierniej elektronowo elastyny, otoczonej pęczkami mikrofibrylli. Pod wpływem kalcytriolu, w hodowli SMC następował znaczny spadek ilości nierozpuszczalnej elastyny, wzrastała natomiast ilość drugiego składnika włókien sprężystych, mianowicie glikoproteinowych mikrofibrylli. Opisane w pracy efekty działania kalcytriolu, polegające na zaburzeniu procesu tworzenia włókien sprężystych wyraźnie współistniały z intensywniejszą proliferacją i migracją komórek mięśniowych [285].

W kontekście moich spostrzeżeń nie bez znaczenia jest fakt, iż elastyna jest zgodnie uznawana przez badaczy za autokrynną, negatywny regulator aktywności metabolicznej komórek mięśniowych ściany naczynia tętniczego, stabilizujący ich kurczliwy fenotyp [127, 238]. Prawidłowa budowa włókien sprężystych pozwala więc zachować funkcjonalną homeostazę naczynia i przeciwdziała patologicznym stanom [151, 237]. Przedstawiony w tej pracy efekt działania kalcytriolu nie pozostaje w sprzeczności z doniesieniami innych autorów, mimo że wyniki uzyskiwano w odmiennych warunkach doświadczalnych, z zastosowaniem innych technik badawczych [105, 106, 218]. Wielce prawdopodobnym wyjaśnieniem dla poczynionych przeze mnie obserwacji dotyczących strukturalnych nieprawidłowości w budowie włókien sprężystych może być zahamowanie syntezy tropoelastyny [105, 218], chociaż niebagatelną rolę prawdopodobnie

odgrywa nasilony proces elastolizy istniejących lub nowosyntetyzowanych włókien elastynowych przy udziale MMP [67, 236].

W odniesieniu do procesu miażdżycowego, fragmentacja i translokacja włókien sprężystych oraz utrata kontaktu SMC – elastyna ma znaczenie dwojakie. Może sprzyjać odróżnicowaniu, migracji i proliferacji komórek mięśniowych, co umożliwia zbudowanie czapeczki włóknistej i stworzenie skutecznej bariery odgraniczającej trombogeniczną tkankę (*atheroma*) od krążącej krwi. Z drugiej strony proces degradacji włókien sprężystych może osłabiać czapeczkę włóknistą i przyczyniać się do pęknięcia blaszki miażdżycowej [32, 127, 195, 196, 197].

Ważną morfologicznie i klinicznie cechą zmian miażdżycowych są zwapnienia w ścianie naczyń [22, 54]. Kiedyś cecha ta była postrzegana jedynie jako element świadczący o daleko posuniętej degradacji. Obecnie wiemy, że wapnienie naczyń, zarówno w rejonie błony wewnętrznej (*intima*) jak i środkowej (*media*) to proces aktywny, który podlega złożonej regulacji i jest w dużym stopniu związany z funkcją SMC [55, 275, 276]. Szczegółową analizę całego wachlarza czynników endokrynnych i genetycznych wpływających na proces mineralizacji naczyń przedstawił Doherty i wsp.[55], jednakże w konkluzji tej obszernej pracy przeglądowej zawarte są jedynie pytania a brakuje odpowiedzi. W badaniach dużą wagę przykładają się do rozpoznania w tym procesie roli PTH, BMP (*bone morphogenic protein*) i osteopontyny [28, 125, 145, 289]. Opisano wielokrotnie związek wapnienia naczyń z występowaniem osteoporozy wskazując na odwrotną zależność między ilością wapnia w naczyniach i tkance kostnej [187]. Poza tym rozpoznano również istnienie ewidentnie odwrotnej zależności między poziomem witaminy D w organizmie, a stopniem zwapnienia naczyń, i to zarówno w intymie jak i medii [294]. Pozornie więc może się wydawać niedorzecznością to, iż całe serie doświadczeń wykazały drastyczny efekt wapnienia naczyń na skutek aplikowania zwierzętom witaminy D. Ponieważ jednak stosowano zdecydowanie toksyczne dawki, trudno było w tej sytuacji rozważać działanie mechanizmów regulacyjnych [198, 307].

W przedstawionym modelu badawczym zastosowałam czułą metodę immunocytochemiczną, która pozwalała śledzić wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na proces mineralizacji. W przestrzeniach międzykomórkowych komórek hodowanych w obecności kalcytriolu złogi soli wapniowych gromadzone były ze większą intensywnością niż w hodowli kontrolnej. Wzmoczona mineralizacja powiązana była wyraźnie ze zmianą typu wzrostu hodowli, modulacją fenotypową SMC oraz z zaburzeniami w formowaniu włókien sprężystych.

Podobne do opisanych w tej pracy, zmiany fenotypowe SMC oraz degradacja elementów ECM, powstałe w związku z postępującą mineralizacją, zostały odnotowane także przez innych autorów, chociaż w odmiennych warunkach doświadczalnych [74, 115, 198, 263]. Przekonywającym wyjaśnieniem dla obserwowanych zależności w hodowlach rosnących w środowisku kalcytriolu,

wydaje się wzmożona aktywność MMP (2 i 9), które powodują degradację włókien elastycznych, a następnie ich wapnienie [145]. Ten sam autor postuluje również możliwość występowania takich ektopowych zwapnień, gdy po degradacji ECM komórki mięśniowe zaczynają przejawiać właściwości komórek osteogennych. Obserwowane przez Jono [125] zjawisko kumulacji wapnia pod wpływem kalcytriolu w hodowlach SMC było natomiast ściśle związane z obniżeniem działania endogenego inhibitora wapnienia (*PTH-related peptide*) i zaburzeniem sygnalizacji na drodze PTH – receptor. Z kolei zagadnienie spontanicznej kalcyfikacji w starszych hodowlach SMC próbuje się wiązać ze wzmożoną apoptozą, występującą głównie w miejscach tworzenia grudkowatych skupień komórek [191, 225].

Procesowi miażdżycowemu zwykle towarzyszy stan chronicznego zapalenia, który jest związany z produkcją i podażą cytokin zapalnych w miejscach powstawania zmian [89, 224, 228, 242, 293]. Chociaż podstawowym źródłem cytokin są limfocyty i makrofagi, to komórki śródbłonna oraz SMC też mogą wydzielać mediatory stanu zapalnego [134, 148, 149]. Znane są właściwości komórek mięśniowych do produkcji i wydzielania cytokin, będących aktywnymi mediatorami procesu zapalnego [56, 72, 254].

W tej pracy przedstawiono hamujący wpływ kalcytriolu na ilość wydzielanych cytokin prozapalnych w supernatantach z hodowli komórek mięśniowych pierwotnych i pasażowanych. Uzyskano znamienne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami w przypadku IFN- γ , TNF- α i IL-2. Poziom IL-6 nie uległ zmniejszeniu w hodowli pierwotnej pod wpływem kalcytriolu.

Można wskazać na kilka interesujących zależności pomiędzy obniżeniem zawartości kluczowych cytokin prozapalnych a innymi efektami działania kalcytriolu. Mianowicie wyniki tej pracy pokazują, że spadek ilości cytokin w supernatantach wiązał się ze wzmożoną żywotnością SMC, intensywną proliferacją i migracją. Natomiast wyższy poziom IFN- γ , TNF- α i IL-2 odnotowany był w hodowlach rosnących bez dodatku kalcytriolu, w których występowały zmiany degradacyjne i wyższy odsetek komórek apoptotycznych.

Co prawda dane literaturowe przytaczają efekty jakie poszczególne cytokiny wywierają w stosunku do komórek mięśniowych [70, 72, 152, 207, 208], jednakże ich działanie w złożonym procesie miażdżycowym nie zostało w pełni wyjaśnione [134, 140, 228]. Nie ma wątpliwości co do tego, że cytokiny wpływają na proliferację i apoptozę SMC, jednakże efekt raczej jest rezultatem regulacji przez nie podaży czynników wzrostowych, takich jak PDGF lub EGF, po wywiązaniu się stanu zapalnego [126, 230, 269]. Proponowany jest też podział cytokin na pro- i antyaterogenne, a szczególna debata dotyczy roli typowych cytokin prozapalnych, IFN- γ i TNF- α , tym bardziej, że przypisuje się im działanie synergistyczne [87, 92]. Zaobserwowano, że TNF- α wywołuje efekt cytotoksyczny często wspólnie z IL-1. [254]. Prowadzone przez Genga [70] badania *in vitro* dowiodły, że SMC wyizolowane z naczyń mają zwiększoną apoptozę

przy ekspozycji na IFN- γ , TNF- α i IL-1. Podobne rezultaty uzyskali także inni badacze obserwując indukcję formowania komórek piankowatych w materiale pochodzącym ze zmienionych miażdżycowo naczyń [85, 269]. Istnieją również, chociaż nieliczne sugestie, iż niektóre prozapalne cytokiny, szczególnie INF- γ – hamują proliferację SMC i syntezę kolagenu typu I i III [300], a także promują przejawianie fenotypu „contractile” w hodowli pierwotnej SMC [254]. Z kolei rola Il-6 w miażdżycy wydaje się być ambiwalentna, jako że różni badacze przypisują jej działanie pro- lub antyzapalne.

W świetle aktualnego stanu wiedzy na temat roli kalcytriolu w procesie zapalnym, który towarzyszy procesowi miażdżycowemu, wyniki moich badań wydają się być zgodne z tezą proponowaną przez Zittermanna [319], że kalcytriol wpływa na poziom cytokin prozapalnych obniżając te kluczowe. Wydaje się więc, że działanie aktywnego metabolitu witaminy D na rzecz utrzymania balansu w ekspresji cytokin pro- i antyzapalnych może odgrywać ważną rolę ochronną w inicjacji i progresji procesu miażdżycowego.

W warunkach fizjologicznych, w ścianie naczynia, ustalony jest pewien rodzaj równowagi, gdzie zarówno proliferacja jak i apoptoza występują na bardzo niskim poziomie [24, 81]. Problem przedstawia się zgoła odmiennie w trakcie rozwoju zmian miażdżycowych, gdy ten balans zostaje drastycznie zaburzony [43, 85, 132, 136, 147]. Do wzmożonej apoptozy dochodzi głównie na skutek aktywacji powierzchniowych receptorów śmierci niezbędnych dla uruchomienia szlaku transdukcji sygnału *Fas/Fas ligand /caspase*. Występują także zmiany w podaży czynników wewnętrznych, istotnych w tym procesie, szczególnie białek z rodziny *Bcl-2* i *p53* oraz *c-myc* protoonkogenów [29, 132].

Chociaż apoptozie ulegają wszystkie typy komórek budujących zmiany miażdżycowe i najważniejszymi wydają się być makrofagi budujące *lipid core*, to nie można umniejszać w tym procesie roli komórek mięśniowych. SMC będące głównym komponentem pokrywy włóknistej osłaniającej nekrotyczny rdzeń i głównym producentem ECM pełnią bardzo ważną funkcję polegającą na stabilizacji blaszki miażdżycowej [147]. Nienormalna zaś ekspresja genów regulujących apoptozę SMC doprowadza do tzw. apoptozy chronicznej w blaszce miażdżycowej. W następstwie tego zostaje zredukowana grubość pokrywy włóknistej, zwiększona objętość nekrotycznego rdzenia, ulega destrukcji elastyna i postępuje proces wapnienia [43, 191]. To wszystko poważnie zaburza integralność i stabilność blaszki miażdżycowej [71] oraz powoduje konsekwencje kliniczne w postaci jej pęknięcia [136, 155]. Apoptotyczne SMC po zetknięciu z krwią mogą prowokować proces koagulacji i powstawanie skrzepu ze względu na zmianę właściwości błony komórkowej po ekspozycji fosfatydyloseryny [136].

Pierwotne hodowle komórek mięśniowych do pewnego stopnia odzwierciedlają warunki panujące podczas tworzenia blaszki miażdżycowej [34, 190]. W jednym i drugim przypadku postępuje intensywna proliferacja SMC, wzmożony

ruch oraz synteza i odkładanie składników ECM [3, 15, 56]. W swoich badaniach, w analogicznym czasie, oprócz wymienionych aktywności SMC obserwowałam także różne przejawy degradacji i śmierci tych komórek. I chociaż komórki mięśniowe wchodziły na drogę apoptozy zarówno w hodowli traktowanej kalcytriolem jak i w hodowli rosnącej bez dodatku tego aktywnego związku, to niewątpliwie dało się odnotować różnice co do częstotliwości występowania tego zjawiska. Wyniki cytometrycznych pomiarów ilościowych (test wiązania aneksyny V i jodku propidyny) wykazały wyraźny spadek procentowy komórek ginących zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy po stymulacji kalcytriolem. Przytoczone dane pozwalają wnioskować na temat korzystnego znaczenia niskich stężeń tego aktywnego metabolitu witaminy D dla żywotności SMC w hodowli.

Śmierć komórek mięśniowych na drodze apoptozy jest zagadnieniem intensywnie badanym, jako że odgrywa istotną rolę w zachowaniu stabilności blaszki miażdżycowej. Wyjaśnienia antyapoptotycznego działania kalcytriolu może należałoby doszukiwać się w związku z jego działaniem immunosupresyjnym i antyzapalnym [37, 148, 171, 222]. Dowiedziono mianowicie, że wysokie stężenie cytokin prozapalnych, a szczególnie asocjacja TNF- α i IFN- γ promuje apoptozę w blaszce miażdżycowej [70], natomiast czynniki wzrostowe i TGF- β redukują apoptozę promując żywotność SMC [71, 169, 230, 169].

Przedstawiona w tej pracy problematyka dotycząca oddziaływania kalcytriolu na komórki mięśniowe naczyń wzbudza obecnie coraz większe zainteresowanie. Niewątpliwie mają na to wpływ wyniki badań epidemiologicznych wskazujące na wyraźny związek pomiędzy poziomem witaminy D w organizmie i częstością występowania chorób układu sercowo-naczyniowego.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Aktywny metabolit witaminy D – 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol) stosowany w suprafizjologicznych stężeniach w hodowlach komórek mięśniowych aorty szczura:

- *wpływa na przebieg modulacji fenotypowej-opóźnia proces różnicowania*
- *stymuluje proliferację i migrację*

Wymienione efekty działania kalcytriolu wskazują, iż ten endogenny związek stymuluje SMC w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej, szczególnie na etapie formowania pokrywy włóknistej (*fibrous cap*). Kalcytriol może też spełniać podobną stymulującą funkcję w stosunku do SMC, gdy po pęknięciu niestabilnej blaszki miażdżycowej są zaangażowane w proces naprawczy.

- *hamuje proces apoptozy i nekrozy*

Taki efekt działania aktywnego metabolitu witaminy D w stosunku do komórek mięśniowych *in vitro* sugeruje korzystną rolę w utrzymaniu ciągłości i stabilności blaszki miażdżycowej.

- *indukuje zaburzenia w budowie włókien elastycznych*
- *stymuluje odkładanie złogów wapniowych*

Powodując zaburzenia w budowie ECM kalcytriol stwarza warunki do skutecznej proliferacji i migracji SMC z błony środkowej do wewnętrznej naczyń krwionośnego na etapie budowania pokrywy włóknistej tworzącej barierę dla trombogenicznego nekrotycznego rdzenia.

- *powoduje spadek wydzielania kluczowych cytokin prozapalnych*

Obniżenie pod wpływem kalcytriolu zawartości kluczowych cytokin prozapalnych: INF- γ , TNF- α , IL-2, i IL-6 sugeruje, że związek ten spełnia ważną rolę w modulacji procesu zapalnego, który towarzyszy rozwojowi zmian miażdżycowych.

Podsumowując, 1 α ,25-dihydroksycholekalcyferol – aktywny metabolit witaminy D - poprzez wpływ na strukturę i funkcje SMC, spełnia ochronną a nawet dobroczynną rolę w procesie miażdżycowym.

7. STRESZCZENIE

Błona środkowa (*tunica media*) ściany zdrowego naczynia krwionośnego jest wysoce zorganizowaną strukturą anatomiczną, zbudowaną głównie z komórek mięśniówki gładkiej, które pełnią ważną rolę w zachowaniu szeroko pojętej homeostazy naczynia. Jakkolwiek główną rolą komórek mięśniowych naczyń w dojrzałym organizmie jest kurczliwość, to w określonych warunkach cechuje je daleko posunięta plastyczność w zakresie zarówno budowy jak i funkcji. W odpowiedzi na uszkodzenie naczynia, SMC modulują fenotypowo ze stanu zwanego *contractile* w kierunku fenotypu określanego jako *synthetic*. Na skutek transformacji fenotypowej zaczynają przejawiać wzmożoną aktywność biologiczną, dzięki której migrują do warstwy podśródbłonkowej naczynia, intensywnie proliferują oraz wydzielają składniki istoty międzykomórkowej przyczyniając się do powstania i progresji procesu miażdżycowego.

Podobny proces modulacji komórek mięśniowych w kierunku fenotypu *synthetic* można także obserwować w warunkach doświadczalnych. W niniejszej pracy posłużyłam się modelem badawczym *in vitro* aby zbadać morfologiczne i fizjologiczne aspekty działania $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kalcytriol) na SMC w kontekście procesu miażdżycowego. Do badań wykorzystano komórki mięśniowe izolowane enzymatycznie z aort noworodków szczurzych.

Istotną rolę $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w biologii komórek mięśniowych uzasadnia fakt, iż posiadają one swoiste receptory tej witaminy, a ponadto same mogą być miejscem syntezy aktywnego metabolitu witaminy D. Kalcytriol powoduje efekt plejotropowy działając na SMC poprzez receptory jądrowe, bądź wywołuje szybkie niegenomowe efekty za pośrednictwem receptorów błonowych i wtórnych przekaźników.

W celu zbadania efektu jaki wywiera $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na komórki mięśniowe wykorzystano różne metody mikroskopowe, immunocytochemiczne i biochemiczne. Do doświadczeń wykorzystano suprafizjologiczne stężenia (1–100 nmol/l) kalcytriolu, wybrane na podstawie wcześniej uzyskanych wyników. Stosowane dawki kalcytriolu są porównywalne ze stężeniami tego aktywnego metabolitu cyrkulującego we krwi, co więcej, w warunkach patologicznych poziom kalcytriolu może miejscowo znacznie przekraczać wspomniane wartości.

Zaobserwowano, że wkrótce po zakotwiczeniu do dna naczynia hodowlanego większość SMC przechodzi spontaniczną modulację w kierunku fenotypu *synthetic*. Podczas tego procesu następowały zarówno zmiany ilościowe dotyczące elementów budujących cytoszkielet i aparat kurczliwy jak i zmiany w ich organizacji. Następstwem odróżnicowania SMC była intensywna proliferacja, a faza wykładnicza wzrostu w hodowli trwała do około 10–11 dnia.

Analiza mikroskopowa wykazała istnienie znacznych różnic w morfologii pomiędzy komórkami rosnącymi w warunkach kontrolnych i komórkami ekspozycjonowanymi na działanie $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Istotną cechą SMC z hodowli kontrolnej

był ich charakterystyczny nierównomierny układ, powszechnie określany jako *hills and valleys*. W miejscach wzrostu wielopokładowego SMC pozostawały w dużym zagęszczeniu i bliskim kontakcie, przybierały kształt wrzecionowaty, a na terenie cytoplazmy wyraźnie wzrastała ilość elementów kurczliwych. Komórki takie częściowo odbudowywały błonę podstawną. W hodowli kontrolnej proces różnicowania SMC zachodził intensywniej w porównaniu z hodowlą poddaną działaniu kalcytriolu.

Zaobserwowano, że $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, stosowany w stężeniu 10 nmol/l drastycznie zmieniał charakter wzrostu komórek mięśniowych w hodowli. Liczne pokłady luźno rozmieszczonych komórek tworzyły szeroką warstwę o równomiernym układzie. Większość SMC przejawiała cechy fenotypu *synthetic*, którego wyznacznikami strukturalnym były; utrata elementów kurczliwych, intensywna rozbudowa błon siateczki endoplazmatycznej i wyraźnie ukształtowane struktury Golgiego.

W komórkach mięśniowych porównywanych hodowli, kontrolnej i wystawionej na działanie kalcytriolu mierzono ilości wbudowanego CFSE i dokonano analizy kinetyki zachodzących podziałów komórkowych. Wykazano skrócenie czasu generacji komórek traktowanych kalcytriolem, co wiązało się ze zwiększeniem liczby ich podziałów. Ponadto komórki traktowane kalcytriolem efektywniej inkorporowały znakowaną tymidynę i przejawiały intensywniejszą syntezę białka w porównaniu z SMC w hodowli kontrolnej. Reasumując można stwierdzić, że $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stymuluje proliferację komórek mięśniowych i jednocześnie hamuje proces ich różnicowania.

Ruch komórek mięśniowych był przedmiotem badań ze względu na kluczową rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych. Na podstawie analizy obrazów mikroskopowych można było stwierdzić, że zastosowany hormon witaminowy wyraźnie wpływa na przyleganie SMC do podłoża oraz zaburza kontakty między komórkami. Pod wpływem kalcytriolu redukcji ulegała ilość włókien naprężeniowych i miejsc przylegania (Fa) do ECM. Badania z zastosowaniem cytometrii przepływowej wykazały spadek ilości cząstek adhezyjnych; β_1 -integryn w błonie komórek poddanych działaniu kalcytriolu. Skłania to do konkluzji, że kalcytriol zaburza oddziaływanie między SMC i składnikami istoty międzykomórkowej, determinuje ekspresję fenotypu *synthetic* oraz indukuje proces migracji.

Śmierć komórek mięśniowych na drodze apoptozy jest zagadnieniem intensywnie badanym, jako że odgrywa istotną rolę w zachowaniu stabilności blaszki miażdżycowej. W obu wariantach hodowli obserwowano SMC posiadające morfologiczne cechy charakteryzujące apoptozę lub nekrozę związane z destrukcją cytoszkieletu i organelli komórkowych. Wyniki cytometrycznych pomiarów ilościowych (test wiązania aneksyny V i jodku propidyny) wykazały wyraźny spadek procentowy komórek ginących zarówno na drodze apoptozy jak i nekrozy po stymulacji kalcytriolem. Przytoczone dane pozwalają wnioskować na te-

mat korzystnego znaczenia niskich stężeń tego aktywnego metabolitu witaminy D dla żywotności SMC w hodowli.

Mając na uwadze szczególne właściwości SMC do formowania włókien sprężystych w hodowli komórkowej, postanowiono zbadać na ile $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jest w stanie wpływać na ten proces. W 10-dniowej hodowli kontrolnej obserwowano regularny układ dojrzałych włókien sprężystych zbudowanych z konglomeratów amorficznej, nieprzeiernej elektronowo elastyny, otoczonej pęczkami mikrofibrylli. Pod wpływem kalcytriolu, w hodowli SMC następował znaczny spadek ilości nierozpuszczalnej elastyny i wysoka kumulacja składnika mikrofibrylarnego. Opisane w pracy efekty działania kalcytriolu polegające na zaburzeniu procesu tworzenia włókien sprężystych współistnieją z intensyfikacją proliferacji i migracji komórek mięśniowych.

W przedstawionym modelu badawczym zastosowano czułą metodę immunocytochemiczną, która pozwalała śledzić wpływ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na proces mineralizacji. W przestrzeniach międzykomórkowych komórek hodowanych w obecności kalcytriolu złogi soli wapniowych gromadzone były ze znacznie większą intensywnością niż w hodowli kontrolnej. Wzmoczona mineralizacja powiązana była wyraźnie ze zmianą typu wzrostu hodowli, modulacją fenotypową SMC oraz z zaburzeniami w formowaniu włókien sprężystych. Poczynione obserwacje zwracają uwagę na pewne podobieństwa istniejące pomiędzy mineralizacją w hodowli SMC a mineralizacją zachodzącą w zmianach miażdżycowych.

Znane są właściwości SMC do produkcji i wydzielania cytokin, będących aktywnymi mediatorami procesu zapalnego. W następstwie stymulacji kalcytriolem SMC wykazywały obniżoną zdolność do produkcji kluczowych cytokin prozapalnych $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 i IL-6 . Stężenie tych cytokin w supernatantach z hodowli było znamienne niższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi z hodowli kontrolnych.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że aktywny metabolit witaminy D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, odgrywa istotną rolę w biologii SMC, wpływając na ich strukturę i ważne funkcje fizjologiczne. Działanie tego hormonu witaminowego może odgrywać pozytywną rolę w tworzeniu okrywy włóknistej oraz chronić przed destabilizacją blaszki miażdżycowej.

8. SUMMARY

The medial layer in healthy arteries is a well-organized structure mainly consisting of highly specialized smooth muscle cells, which play an important role in the maintenance of vascular homeostasis. Although the principal function of SMCs in mature animals is contraction, they exhibit a high degree of phenotypic and functional plasticity. In response to vascular injury, SMC can undergo a phenotypic modulation from a “contractile” (differentiated) to a more immature, “synthetic” (dedifferentiated) state. Under pathophysiological conditions, activated SMC derived from the vessel wall, migrate and proliferate under endothelial space, secrete and deposit ECM, thereby contributing to the formation and progression of atherosclerosis.

A similar modulation from a “contractile” to a “synthetic” phenotype occurs when normal smooth muscle cells are established in culture. Therefore, an *in vitro* model system has been used here to study the alterations of SMC morphology and physiology under $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (*calcitriol*) treatment, especially in the context of atherogenesis. SMC were obtained from the aortas of newborn rats by enzymatic digestion.

The biological importance of calcitriol in behavior of vascular smooth muscle cells is highlighted by the facts that these cells possess the vitamin D receptor and are able to synthesize $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The pluripotent active metabolite of vitamin D initiates genomic responses through the VDR or rapid non-genomic effects through a membrane receptor and second messengers.

A combination of microscopic, immunocytochemical and biochemical methods was applied to study the effect of calcitriol on SMC. Based on the previously obtained results, the supra-physiological (1–100 nmol/l) concentrations of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were chosen in experiments. Concentrations of calcitriol are comparable with the physiological level of total circulating $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Furthermore, much higher local concentrations of calcitriol could be reached under pathophysiological conditions.

A few days after seeding at moderate density, most of the SMC in culture systems spontaneously modulated toward the “synthetic” phenotype. Phenotypic transition of cells involved not only quantitative changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins but also changes in their organization. Thereafter, cells began to proliferate and logarithmically up to the 10–11 day of the culture.

Microscopical analysis of SMCs in culture revealed marked morphological differences between SMC performed in control culture and these exposed to supraphysiological concentration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Characteristic growth pattern with “hills and valleys” was observed in control culture. In multilayered nodular region the closely arranged cells became elongated and spindle shaped, with elevation of myofilament density and required contraction. Basement

membrane was partially rebuilt after maturation of cells. In control culture the differentiation of SMCs was observed more frequently in comparison to calcitriol-treated cells.

Calcitriol in concentration of 10 nmol/l dramatically changed smooth muscle layer composition and subcellular architecture of SMCs. The cells formed highly abundant, three-dimensional culture system with flattened configuration. Most of the cells exhibited evident synthetic phenotype characterized by loss of myofilaments, formation of highly abundant rough endoplasmic reticulum and a prominent Golgi complex.

It is well established that excessive proliferation of vascular smooth muscle cells is a prototypical response to vascular injury and is also a feature of early-stage atherogenesis. The growth kinetics of asynchronously divided SMC from both cultures was estimated by flow cytometry using CFSE. Generation time calculated for SMC exposed to calcitriol was shortened, therefore increased number of cell division was noted in comparison to control. Simultaneously, calcitriol-treated cells incorporated the [3H]-thymidine and produced protein more readily than did control cells. The results clearly showed that after calcitriol treatment proliferation of SMCs is enhanced, whereas differentiation is compromised.

Migration of vascular SMCs was here investigated due to its importance in the formation of vascular lesions. Marked changes of adhesion and spreading in calcitriol-treated SMC culture observed under electron microscopy well correlated with intensity of cell migration. Stress fibers assembly and focal adhesions formation was reduced. Down-regulation of the β_1 -integrin in SMC exposed to calcitriol determined their phenotypes; therefore these cells displayed several hallmarks of the synthetic state. The results from these comparative investigations demonstrate that inhibited expression of surface β_1 -integrin most likely altered binding of SMCs to the matrix and markedly stimulated migration.

SMC death by apoptosis has been intensively studied problem in context to atherosclerotic plaque stability. Characteristic apoptotic or necrotic morphology reflecting a drastic destruction of cytoskeleton and organelles was observed. A significant decrease in number of apoptotic and necrotic cells in calcitriol-treated culture versus control one, was identified by flow cytometry using the FITC-annexin V/propidium iodide (PI) – based assay. The obtained results indicate that low concentration of calcitriol plays a protective role against apoptosis and necrosis.

Based on the unique capacity of neonatal aortic smooth muscle cells to formation of elastic fibers in culture, the alteration in this process upon calcitriol-treatment was investigated. In control culture, regular arrangement of matured elastic fibers between the cells was observed. Elastic fibers composed of clearly distinguishable conglomerates of highly stained amorphous material were distributed among the bundles of microfibrillar component. Calcitriol caused a sub-

stantial decrease in the insoluble elastin content and abnormal accumulation of microfibrillar component. Considerable evidence suggests that such modifications in the matrix deposition may be at least partially responsible for an increased rate of SMC proliferation and migration.

In experimental model presented here, calcitriol induced a significant increase in calcium deposition, visualized by immunofluorescence method, compared with cells cultured in medium alone. Observations provided evidence that enhanced mineralization in SMC culture exposed to calcitriol is related to thickening of multilayer culture, phenotype switching and elastic fibers alteration. This finding indicate that calcification of the matrix deposited by SMCs resembles the mineralization observed in atherosclerotic plaques.

It is known that SMCs *in vitro* have the potential to express reactive mediators like cytokines involved in inflammation. After calcitriol stimulation, the ability of SMCs to production such proinflammatory cytokines like INF- γ , TNF- α , IL-2 and IL-6 was diminished, therefore their concentrations in supernatants were significantly reduced in comparison with control culture.

Based on the results, it may be concluded that $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – an active form of vitamin D – plays an important role in vascular biology. It has been also suggested that structural and physiological responses of SMCs to calcitriol play a beneficial role in fibrous cap formation as well as protect against atherosclerotic plaque destabilization.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abraham S., Kogata N., Fässler R., Adams R.: Integrin beta1 subunit controls mural cell adhesion, spreading, and blood vessel wall stability. *Circ. Res.* 2008, 102, 562-570.
2. Abrams J.: Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 1997, 79, 2-9.
3. Absher P.M., Schneider D.J., Baldor L.C., Russell J.C., Sobel B.E.: Increased proliferation of explanted vascular smooth muscle cells: a marker presaging atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997, 131, 187-194.
4. Adorini L.: Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int. Immunopharmacol.* 2002, 2, 1017-1028.
5. Aikawa M.: The role of collagenases in the pathogenesis of vulnerable atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 1227-1235.
6. Alpert P.T., Shaikh U.: The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. *Biol. Res. Nurs.* 2007, 9, 117-129.
7. Armas L.A., Hollis B., Heaney R.P.: Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 5387-5391.
8. Armas L.A., Dowell S., Akhter M., Duthuluru S., Huerter C., Hollis B.W., Lund R., Heaney R.P.: Ultraviolet-B radiation increases serum 25-hydroxyvitamin D levels: the effect of UVB dose and skin color. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007, 57, 588-593.
9. Bachschmid M.M., Van der Loo B.: A new sunshine in the vasculature. *Circulation* 2005, 111, 1571-1573.
10. Bendeck M.P., Zempo N., Clowes A.W., Galardy R.E., Reidy M.A.: Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ. Res.* 1994, 75, 539-545.
11. Benditt E.P., Benditt J.M.: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1973, 70, 1753-1756.
12. Bennett M.R., Evan G.I., Schwartz S.M.: Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1995, 95, 2266-2273.

13. Bentzon J.F., Weile C., Sondergaard C.S., Hindkjaer J., Kassem M., Falk E.: Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 2696-2702.
14. Berk B.C.: Vascular smooth muscle growth mechanisms. *Physiol. Rev.* 2001, 81, 999-1030.
15. Betz E., Fallier-Becker P., Wolburg-Buchholz K., Fotev Z.: Proliferation of smooth muscle cells in the inner and outer layers of the tunica media of arteries: an in vitro study. *J. Cell. Physiol.* 1991, 147, 385-395.
16. Bikle D.D., Gee E., Halloran B., Haddad J.G.: Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *J. Clin. Invest.* 1984, 74, 1966-1971.
17. Bischoff-Ferrari H.A., Dietrich T., Orav E., Dawson-Hughes B.: Positive association between 25(OH)D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am. J. Med.* 2004, 116, 634-639.
18. Bischoff-Ferrari H.A., Giovannucci E., Willett W.C., Dietrich T., Dawson-Hughes B.: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84, 18-28.
19. Björkerud S.: Cultivated human arterial smooth muscle displays heterogeneous pattern of growth and phenotypic variation. *Lab. Invest.* 1985, 53, 303-310.
20. Björkerud S. Agglomeration to nodules modulates human arterial smooth muscle cells to distinct postinjury phenotype via foam cell transition. *Am. J. Pathol.* 1987, 127, 485-498.
21. Bobryshev Y.V., Lord R.S, Warren B.A.: Calcified deposit formation in intimal thickenings of the human aorta. *Atherosclerosis* 1995, 118, 9-21.
22. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani F., Ropraz P., Gabbiani G.: Cultured aortic smooth muscle cells from newborn and adult rats show distinct cytoskeletal features. *Differentiation.* 1992, 49,175-185.
23. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani F., Ropraz P., Gabbiani G.: Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1993, 13, 1449-1455.

24. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani F., Redard M., Desmouliere A., Gabbiani G.: Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am. J. Pathol.* 1995, 146, 1059-1064.
25. Bochaton-Piallat M.L., Ropraz P., Gabbiani F., Gabbiani G.: Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones: implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, 16, 815-820.
26. Bonin L.: Generation and characterization of human smooth muscle cell lines derived from atherosclerotic plaque. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 1999, 19, 575-587.
27. Bostrom K., Watson K.E., Horn S.: Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1993, 91, 1800.
28. Boyle J.J., Bowyer D.E., Weissberg P.L., Bennett M.R.: Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas–ligand/Fas interaction. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 1402-1407.
29. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 7, 248-254.
30. Brakebusch C., Fässler R.: The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 2003, 15, 2324-2333.
31. Braun M., Pietsch P., Schrör K., Baumann G., Felix S.B.: Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 395-401.
32. Brooke B.S., Karnik S.K., Li D.Y.: Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease - structure versus signal. *Trends Cell. Biol.* 2003, 13, 51-56.
33. Campbell G., Campbell J.: The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990, 598, 143-158.
34. Campbell J.H., Campbell G.R.: Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth-muscle. *Clin. Sci.* 1993, 85, 501-513.
35. Campbell J.H., Campbell G.R.: The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1994, 5, 323-539.
36. Cannell J.J., Hollis B.W.: Use of vitamin D in clinical practice. *Altern. Med. Rev.* 2008, 13, 6-20.

37. Cantorna M.T., Zhu Y., Froicu M., Wittke A.: Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 8, 1717-1720.
38. Cardus A., Parisi E., Gallego C., Aldea M., Fernandez E., Valdiviego J.M.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEDF-mediated pathway. *Kidney Int.* 2006, 69, 1377-1384.
39. Carlberg C. Molecular basis of the selective activity of vitamin D analogues. *J. Cell. Biochem.* 2003, 88, 274-81.
40. Cashman K.D.: Vitamin D in childhood and adolescence. *Postgrad. Med. J.* 2007, 83, 230-235.
41. Chamley-Campbell G.R., Chamley J.H., Ross R.: Smooth muscle cells in culture. *Physiol. Rev.* 1979, 59, 1-61.
42. Chen T.C., Chimeh F., Lu Z., Mathieu J., Person K.S., Zhang A., Kohn N., Martinello S., Berkowitz R., Holick M.F.: Vitamin D. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 460, 213-217.
43. Clarke M.C., Figg N., Maguire J.J., Davenport A.P., Goddard M., Littlewood T.D., Bennett M.R.: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.* 2006, 12, 1075-1080.
44. Clemens T.L., Adams J.S., Henderson S.L., Holick M.F.: Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. *Lancet* 1982, 9, 74-76.
45. Clowes A.W., Clowes M.M., Fingerle J., Reidy M.A.: Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989, 14, 12-15.
46. Cooke N.E., Haddad J.G.: Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr. Rev.* 1989, 10, 294-307.
47. Cybulsky M.I., Gimbrone M.A.Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991, 251, 788-791.
48. Cybulsky M.I., Iiyama K., Li H., Zhu S., Chen M., Iiyama M., Davis V., Gutierrez-Ramos J.C., Connelly P.W., Milstone D.S.: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 1255-1262.

49. Davies M.J., Bland J.M., Hangartner J.R.W., Angelini A., Thomas A.C.: Factors influencing the presence or absence of acute coronary artery thrombi in sudden ischaemic death. *Eur. Heart J.* 1989, 10, 203-208.
50. Dawson-Hughes B., Harris S.S., Krall E.A., Dallal G.E.: Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N. Engl. J. Med.* 1997, 337, 670-676.
51. Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., Lips P., Meunier P.J., Vieth R.: Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos. Int.* 2005, 16, 713-716.
52. DeLuca H.F., Cantorna M.: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001, 15, 2579-2585.
53. DeLuca H.F.: Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 1689-96.
54. Doherty T.M., Detrano R.C.: Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. *Calcif Tissue.* 1994, 54, 224.
55. Doherty T.M., Fitzpatrick L.A., Inoue D., Qiao J.H., Fishbein M.C., Detrano Robert C., Shah P.K., Rajavashisth T.B.: Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine Rev.* 2004, 25, 629-672.
56. Doran A., Meller N., McNamara C.: Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28, 812-819.
57. Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E.: Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005, 289, F8-F28.
58. Dzau V.J., Dullaes R.C., Sedding D.G.: Vascular proliferation and atherosclerosis; new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 2002, 8, 1249-1258.
59. Falkenstein E., Tillmann H.C., Christ M., Feuring M., Wehling M.: Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 513-556.
60. Foley R.N., Parfrey P.S., Sarnak M.J.: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1998 32, 112-119.
61. Forman J.P., Giovannucci E., Holmes M.D., Bischoff-Ferrari H.A., Tworoger S.S., Willett W.C., Curhan G.C.: Plasma 25-hydroxyvitamin D

- concentrations and risk of incident hypertension. *Hypertension*. 2007, 49, 1063-1069.
62. Fujita H., Shimokado K., Yutani C.H., Takaichi S., Masuda J., Ogata J.: Human neonatal and adult vascular smooth muscle cells in culture. *Exp. Mol. Path.* 1993, 58, 25-39.
 63. Furmaniak-Kazmierczak E., Crawley S.W., Carter R.L., Maurice D.H., Cote G.P.: Formation of extracellular matrix-digesting invadopodia by primary aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2007, 100, 1328-1336.
 64. Gabbiani G., Schmid E., Winter S., Chaponnier C., De Chastonay C., Vandekerckhove J., Weber K., Franke W.: Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific-type actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981, 78, 298-302.
 65. Gabbiani G.: Control of smooth muscle cell activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 804-805.
 66. Galis Z., Muszyński M., Sukhova G.: Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* 1994, 75, 181-189.
 67. Galis Z.S., Khatri J.J.: Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 2002, 90, 251-262.
 68. Garland C.F., Garland F.C., Gorham E.D., Grant W., Garland F.: The role of vitamin D in cancer prevention. *Am. J. Public Health*. 2006, 96, 252-261.
 69. Garland C.F., Gorham E.D., Mohr S., Grant W., Giovannucci E., Lipkin M., Newmark H., Holick M., Garland F.: Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007, 103, 708-711.
 70. Geng Y.J., Wu Q., Muszynski M., Hansson G.K., Libby P.: Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, 16, 19-27.
 71. Geng Y.J., Libby P.: Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1370-1380
 72. Gerthoffer W.T., Singer C.A.: Secretory Functions of Smooth Muscle: Cytokines and Growth Factors. *Mol. Interv.* 2002, 2, 447-.

-
73. Gerthoffer W.T.: Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 2007, 100, 607-621.
 74. Giachelli C.M., Bae N., Almeida M., Denhardt D.T., Alpers C.E., Schwartz S.M.: Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1993, 92, 1686-1696.
 75. Gimbrone M.A. Jr, Topper J.N., Nagel T., Anderson K.R., Garcia-Cardena G.: Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 902, 230-239.
 76. Giovannucci E.: Vitamin D status and cancer incidence and mortality. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 624, 31-42.
 77. Gittenberger-de Groot A.C., DeRuiter M.C., Bergwerff M., Poelmann R.E.: Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19, 1589-1594.
 78. Glerup H., Mikkelsen K., Poulsen L., Hass E., Overbeck S., Thomsen J., Charles P., Eriksen E.F.: Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *J. Intern. Med.* 2000, 247, 260-268.
 79. Gloth F.M., Gundberg C., Hollis B., Haddad J., Tobin J.: Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA.* 1995, 274, 1683-1686.
 80. Goldman J., Zhong L., Liu S.Q.: Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *Am. J. Physiol.* 2007, 292, 928-938.
 81. Gordon D., Reidy M.A., Benditt E.P., Schwartz S.M.: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87, 4600-4604.
 82. Gordon C.M., DePeter K.C., Feldman H.A., Grace E., Emans S.J.: Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2004, 158, 531-537.
 83. Gorenne I., Kavurma M., Scott S., Bennett M.: Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular Res.* 2006, 72, 9-17.
 84. Gorham E.D., Garland C.F., Garland F.C., Grant W.B., Mohr S.B., Lipkin N., Newmark H.L., Giovannucci E., Wei M., Holick M.F.: Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am. J. Prev. Med.* 2007, 32, 210-216.

85. Guevara N.V., Chen K.H., Chan L.: Apoptosis in atherosclerosis: pathological and pharmacological implications. *Pharmacol. Res.* 2001, 44, 59-71.
86. Guillemant J., Le H.T., Maria A., Allemandu A., Peres G., Guillemant S.: Wintertime vitamin D deficiency in male adolescents: effect on parathyroid function and response to vitamin D3 supplements. *Osteoporos. Int.* 2001, 12, 875-879.
87. Gupta S., Pablo A.M., Jiang X., Wang N., Tall A.R., Schindler C.: IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 2752-2761.
88. Häcker G.: The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000, 301, 5-17.
89. Hansson G.K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1685-1695.
90. Hao H., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M.L.: Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 1510-1520.
91. Hao H., Gabbiani G., Camenzind E., Bacchetta M., Virmani R., Bochaton-Piallat M.L.: Phenotypic modulation of intima and medial smooth muscle cells in fatal cases of coronary artery lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 326-332.
92. Harvey E.J., Ramji D.P.: Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or antiatherogenic? *Cardiovasc. Res.* 2005, 67, 11-20.
93. Hathaway D.R., March K.L., Lash J.A., Adam L.P., Wilensky R.L.: Vascular smooth muscle. A review of the molecular basis of contractility. *Circulation.* 1991, 83, 382-390.
94. Hathcock J.N., Shao A., Vieth R., Heaney R.: Risk assessment for vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85, 6-18.
95. Haussler M.R., Norman A.: Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *PNAS.* 1969, 62, 155-162.
96. Haussler M.R., Jurutka P.W., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Haussler C.A., Whitfield G.K.: New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 1995, 17, 33-38.
97. Haussler M.R., Whitfield G.K., Haussler C., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Dominguez C.E., Jurutka P.W.: The nuclear vitamin D

- receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 1998, 13, 325-349.
98. Heaney R.P., Davies K., Chen T., Holick M.F., Barger-Lux M.: Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 204-210.
 99. Heaney R.P.: The Vitamin D requirement in health and disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005, 97, 13-19.
 100. Hedin U., Roy J., Tran P.K., Lundmark K., Rahman A.: Control of smooth muscle cell proliferation - the role of the basement membrane. *Thromb. Haemost.* 1999, 82, 23-26.
 101. Hedin U., Roy J., Tran P.K.: Control of smooth muscle cell proliferation in vascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2004, 15, 559-65.
 102. Hegele R.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 1996, 146, 21-38.
 103. Hewison M., Zehnder D., Chakraverty R., Adams J.S.: Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004, 215, 31-38.
 104. Hillebrands J.L., Klatter F.A., Rozing J.: Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 380-387.
 105. Hinek A., Botney M., Mecham R., Parks W.: Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroksyvitamin D3. *Connect. Tissue Res.* 1991, 26, 155-166.
 106. Hinek A., Wilson S.E.: Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastin-binding protein and elastic fiber assembly. *Am. J. Pathol.* 2000;156:925-938.
 107. Holick M.F.: Vitamin D: a millenium perspective. *J. Cell Biochem.* 2003, 88, 296-307.
 108. Holick M.F.: Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 1678-1688.
 109. Holick M.F.: Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 2062-2072.
 110. Holick M.F.: High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006, 81, 353-373.

111. Holick M.F.: Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007, 357, 266-281.
112. Holick M.F., Chen T.C.: Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am. J. Clinical Nutrition.* 2008, 87, 1080-1096.
113. Hollis B.W.: Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J. Nutr.* 2005, 135, 317-322.
114. Hypponen E., Laara E., Reunanen A., Jarvelin M.R., Virtanen S.M.: Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001, 358, 1500-1503.
115. Inoue T., Kawashima H.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates Ca²⁺-uptake by cultured vascular smooth muscle cells derived from rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 152, 1388-1394.
116. Insull W.: The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am. J. Med.* 2009, 122, 3-14.
117. Iymiere V.P., Proudfoot D., Weissberg P.L., Shanahan C.M.: Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Int. Med.* 2006, 260, 192-210.
118. Jablonski N.G., Chaplin G.: The evolution of human skin coloration. *J Hum. Evol.* 2000, 39, 57-106.
119. Jang Y., Lincoff M., Plow E.F., Topol E.J.: Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J. Am. Cardiol.* 1994, 24, 1591-1601.
120. Jasinghe V.J., Perera C.O., Barlow P.J.: Bioavailability of vitamin D₂ from irradiated mushrooms: an in vivo study. *Br. J. Nutr.* 2005, 93, 951-955.
121. Johnson C., Galis Z.S.: Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24, 54-60.
122. Johnson J.L.: Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2007, 5, 265-282.
123. Jones G.: Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin. Dial.* 2007, 20, 316-324.
124. Jones G.: Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Natur.* 2008, 88, 582-586.

125. Jono S., Nishizawa Y., Shioi A., Morii H.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*. 1998, 98, 1302-1306.
126. Jovinge S., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Nilsson J.: Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17, 490-497.
127. Karnik S.K., Brooke B.S., Bayes-Genis A., Sorensen L., Wythe J.D., Schwartz R.S., Keating M.T., Li D.Y.: A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 2003, 130, 411-423.
128. Katoh Y., Periasamy M.: Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* 1996, 6, 100-114.
129. Katsuda S., Okada Y., Nakanishi I.: Abnormal accumulation of elastin-associated microfibrils during elastolysis in the arterial wall. *Exp. Mol. Path.* 1990, 52, 13-24.
130. Katsuda S., Kaji T.: Atherosclerosis and extracellular matrix. *J. Atheroscler. Tromb.* 2003, 10, 267-274.
131. Kawai-Kowase K., Owens G.K.: Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Cell Physiol.* 2007, 292, 59-69.
132. Kavurma M.M., Bhindi R., Lowe H.C., Chesterman C., Khachigian L.M.: Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb. Haemost* 2005, 3, 465-472.
133. Kim S., Yamazaki M., Zella L.A., N. Shevde K., Pike J. W.: Activation of receptor activator of NF- κ B ligand gene expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is mediated through multiple long-range enhancers. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 6469-6486.
134. Kleemann R., Zadelaar S., Kooistra T.: Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice *Cardiovasc. Res.* 2008, 79, 360-376.
135. Kocher O., Gabbiani G.: Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum. Pathol.* 1986, 17, 875-880.
136. Kockx M.M., Herman A.G.: Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* 2000, 45, 736-746.

137. Koh E., Morimoto S., Fukuo K., Itoh K., Hironaka T., Shiraishi T., Onishi T., Kumahara Y.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulate their proliferation in vitro. *Life Sci.* 1988, 42, 315-323.
138. Koh E., Morimoto S., Nabata T., Takamoto S., Kitano S., Ogihara T.: Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the synthesis of DNA and glycosaminoglycans by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Life Sci.* 1990, 46, 1545-1551.
139. Kordowska J., Hetrick T., Adam L.P., Wang C.L.: Phosphorylated I-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading. *Exp. Cell Res.* 2006, 312, 95-110.
140. Kristal-Boneh E., Fromm P., Harari G., Ribak J.: Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 1997, 30, 1289-1284.
141. Kumar M.S., Owens G.K.: Combinatorial control of smooth muscle specific gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 737-747.
142. Lamon B.D., Hajjar D.P.: Inflammation at the molecular interface of atherogenesis: An anthropological journey. *Am. J. Pathol.* 2008, 173, 1253-1254.
143. Lappe J.M., Travers-Gustafson D., Davies K.M., Recker R.P., Heaney R.P.: Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85, 1586-1594.
144. Lee J.M., Smith J.R., Philipp B.L., Chen T.C., Mathieu J., Holick M.F.: Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants. *Clin. Pediatr (Phila).* 2007, 46, 42-44.
145. Lee JS., Basalyga D.M., Simionescu A.J., Isenburg C., Simionescu D.T., Vyavahare N.R.: Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *Am. J. Pathol.* 2006;168, 490-498.
146. Lee R.T., Berditchevski F., Cheng G.C., Hemler M.E.: Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995, 76, 209-214.
147. Lee R.T., Libby P.: The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17, 1859-1867.

148. Lemire J.M., Archer D.C., Beck L., Spiegelberg H.I.: Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th₁ functions. *J. Nutr.* 1995, 125, 1704-1708.
149. Leon M.L., Zuckerman S.H.: Gamma INF: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm. Res.* 2005, 54, 395-411.
150. Levin A.: Cardiac disease in chronic kidney disease: current understanding and oportunities for change. *Blood Purif.* 2004, 22, 21-27.
151. Li D.Y., Brooke B., Davis E.C., Mecham R.P., Sorensen L.K., Boak B.B., Eichwald E., and Keating M.T.: Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998, 393, 276-280.
152. Li H., Freeman M.W, and Libby P.: Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest.* 1995, 95, 122-133.
153. Li S., Sims S., Jiao Y., Chow L.H., Pickering J.G.: Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes. *Circ. Res.* 1999, 85, 338-348.
154. Li Y.C., Kong J., Wei M., Chen Z.F., Liu S.Q., Cao L.P.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002, 110, 229-238.
155. Libby P., Geng Y.J., Sukhova G.K., Simon D.I., Lee R.T.: Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997, 811, 134-142.
156. Libby P., Aikawa M.: Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat. Med.* 2002, 8, 1257-1262.
157. Libby P., Ridker P.M., Maseri A.: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002, 105, 1135-1143.
158. Libby P.: Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 456-460.
159. Lin R., White J.H.: The pleiotropic actions of vitamin. *Bioessays.* 2004, 26, 21-28.
160. Lips P.: Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001, 22, 477-501.
161. Lips P., Hosking D., Lippuner K., Norgquist J.M., Wehren L., Maalouf G., Ragi-Eris S., Chandler J.: The prevalence of vitamin D inadequacy

- amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J. Intern. Med.* 2006, 260, 245-54.
162. Lips P.: Vitamin D physiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2006, 92, 4-8.
 163. Liu B., Itoh H., Louie O., Kubota K., Kent K.C.: The role of phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *J. Surg. Res.* 2004, 120, 256-265.
 164. Losel R.M., Falkenstein E., Fuering M., Schultz A., Tillmann H., Rossol-Haseroth K., Wehling M.: Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol. Rev.* 2003, 83, 965-1016.
 165. Lutgens E., van Suylen R.J., Faber B.C., Gijbels M.J., Eurlings P.M., Bijns A.P.: Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 2123-2130.
 166. Lyons A.B.: Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurements of CFSE dilution. *J. Immunol. Meth.* 2000, 243, 147-154.
 167. MacLaughlin J.A., Anderson R.R., Holick M.F.: Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 1982, 216, 1001-1004.
 168. Majesky M.W.: Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, 27, 1248-1258.
 169. Mallat Z., Gojova A., Marchiol-Fournigault C., Esposito B., Kamate C., Merval R., Fradelizi D., Tedgui A.: Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* 2001, 89, 930-934.
 170. Marcinkowska E.: A run for a membrane vitamin D receptor. *Biol. Signals Recept.* 2001, 10, 341-349.
 171. Mathieu C., Adorini L.: The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *Trends. Mol. Med.* 2002, 8, 174-79.
 172. Matsuoka L.Y., Ide L., Wortsman J., MacLaughlin J., Holick M.F.: Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1987, 64, 1165-1168.
 173. Matsuoka L.Y., Wortsman J., Haddad J.G., Hollis B.W.: In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D₃. *J. Lab. Clin. Med.* 1989, 114, 301-305.

174. McCarthy E.P., Yamashita W., Hsu A., Ooi B.S.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1989, 13, 954-959.
175. McCollum E.F., Simmonds, N., Becker, J.E., Shipley, P.G.: Studies on experimental rickets; and experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J. Biol. Chem.* 1922, 53, 293-312.
176. McDonald O.G., Owens G.K.: Programming Smooth Muscle Plasticity With Chromatin Dynamics. *Circ. Res.* 2007, 100, 1428-1441.
177. McGrath J., Selten J.P., Chant D.: Long term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration – data from Australia and the Netherlands. *Schizophr. Res.* 2002, 54, 199-212.
178. Mellanby T.: The part played by an "accessory factor" in the production of experimental rickets. *J. Physiol.* 1918, 52, 11-14.
179. Merke J., Hofmann W., Goldschmidt D., Ritz E.: Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 1987, 41, 112-114.
180. Merke J., Milde P., Lewicka S., Hügel U., Klaus G., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R., Rauterberg E.W, Ritz E.: Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J. Clin. Invest.* 1989, 83, 1903-1915.
181. Michos E.D., Blumenthal R.S.: Vitamin D supplementation and cardiovascular disease risk. *Circulation* 2007, 115, 827-828.
182. Michos E.D., Melamed M.L.: Vitamin D and cardiovascular disease risk. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2008, 11, 7-12.
183. Miller D.T., Ridker P.M., Libby P., Kwiatkowski D.J.: Atherosclerosis: the path from genomics to therapeutics. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007, 49, 1589-1599.
184. Mitsuhashi T., Morris R.C. Jr, Ives H.E.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1991, 87, 1889-1895.
185. Mohr S.B., Garland C.F., Gorham E.D., Grant W.B., Garland F.C.: Could ultraviolet B irradiance and vitamin D be associated with lower incidence rates of lung cancer? *J. Epidemiol. Community Health.* 2008, 62, 69-74.

186. Mohtai M., Yamamoto T.: Smooth muscle cell proliferation in the rat coronary artery induced by vitamin D. *Atherosclerosis*. 1987, 63, 193-202.
187. Moon J., Bandy B., Davison A.J.: Hypothesis: etiology of atherosclerosis and osteoporosis: are imbalances in the calciferol endocrine system implicated? *J. Am. Coll. Nutr.* 1992, 11, 567-563.
188. Moore K.J., Freeman M.W.: Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 1702-1711.
189. Mozolowski W.: Sniadecki J. (1768–1838) on the cure of rickets. *Nature*. 1939, 143, 121-124.
190. Mulvihill E.R., Jaeger J., Sengupta R., Ruzzo W.L., Reimer C., Lukito S., Schwartz S.M.: Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 1283-1289.
191. Murray C.H., Clarke T., Littlewood T.D., Figg N., Maguire J.J., Davenport A.P., Goddard M., Bennett M.R.: Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.* 2008, 102, 1529-1538.
192. Murry C.E., Gipaya C.T., Bartosek T., Benditt E.P., Schwartz S.M.: Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1997, 151, 697-705.
193. Nagpal S., Na S., Rathnachalam R.: Noncalcemic action of vitamin D receptor ligands. *Endocr. Rev.* 2005, 26, 662-687.
194. Nemere I., Yoshimoto Y., Norman A.W.: Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1984, 115, 1476-1483.
195. Newby A.C., Zaltsman A.B.: Fibrous cap formation or destruction: the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 345-360.
196. Newby A.C.: Dual Role of Matrix Metalloproteinases (Matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic Plaque Rupture. *Physiol. Rev.* 2005, 85, 1-31.
197. Newby A.C.: Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 2006, 69, 614-624.

198. Niederhoffer N., Bobryshev Y., Larttaud-Idjouadiene I., Guimmelly P., Atkinson J.: Aortic calcification produced by vitamin D₃ plus nicotine. *J. Vasc. Res.* 1997, 34, 386-398.
199. Nikkari S.T., Kostinaho J., Jaakkola O.: Changes in the composition of cytoskeletal and cytocontractile proteins of rat aortic smooth muscle cells during aging. *Differentiation* 1990, 44, 216-221.
200. Norman A.W.: Evidence for a new kidney-produced hormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol, the proposed biologically active form of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 1971, 24, 1346-1351.
201. Norman A.W., Collins E.D.: Vitamin D receptor structure, expression, and nongenomic effects. *Princ Bone Biol.* 1996,30, 419-434.
202. Norman A.W.: Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006, 147, 5542-5548.
203. Norman A.W.: From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 88, 491-499.
204. Norman P., Moss I., Sian M., Gosling M., Powell J.: Maternal and postnatal vitamin D ingestion influences rat aortic structure, function and elastin content. *Cardiovasc. Res.* 2002, 55, 169-174.
205. Norman P.E., Powell J.T.: Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 39-46.
206. Orlandi A., Ehrlich H.P., Ropraz P., Spagnoli L.G., Gabbiani G.: Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994, 14, 982-989.
207. Owens G.K., Geisterfer A.A., Yang Y.W., Komoriya A.: Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 1988, 107, 771-80.
208. Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R.: Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 2004, 84, 767-801.
209. Packard R.R., Libby P.: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.* 2008 54, 24-38.

210. Patel A., Fine B., Sandig M., Mequanint K.: Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res.* 2006, 71, 40-49.
211. Pellegrin S., Mellor H.: Actin stress fibers. *J. Cell. Sci.* 2007, 120, 3491-3499.
212. Pełczyńska K., Jaroszewicz I., Switalska M., Opolski A.: Biological activity of calcitriol and its new analogues - potential therapeutic applications. *PHMD.* 2005, 59, 129-139.
213. Peng S.H., Bruce T.C., Tham P., Mikkelsen B.: Role of vitamin D₃ in arteriosclerosis. A study in squirrel monkeys. *Arterial Wall.* 1978, 4, 229-240.
214. Peng S.H., Taylor C.B.: Probable role of excesses of vitamin D in genesis of arteriosclerosis. *Arterial Wall VI.* 1980, 63-68.
215. Peterlik M., Cross H.S.: Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *J. Clin. Invest.* 2005, 35, 290-304.
216. Pichon S., Bryckaert M., Berrou E.: Control of actin dynamics by p38 MAP kinase – Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J. Cell. Sci.* 2004, 117, 2569-2577.
217. Pidkovka N.A., Cherepanova O.A., Yoshida T., Alexander M.R., Deaton R.A., Thomas J.A., Leitinger N., Owens G.K.: Oxidized Phospholipids Induce Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells In Vivo and In Vitro. *Circ Res.* 2007, 101, 792-801.
218. Pierce R., Kołodziej M., Parks W.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ represses tropoelastin expression by a post-transcriptional mechanism. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 11593-11599.
219. Pike J.W.: Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Annu. Rev Nutr.* 1991, 11, 189-216.
220. Plotnikoff G.A., Quingley J.W.: Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo. Clin. Proc.* 2003, 78, 1463-70.
221. Pols H.A.P., Birkenhager J.C., Foekens J.A., van Leeuwen J.P.T.M.: Vitamin D: a modulator of cell proliferation and differentiation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990, 37, 873-876.
222. Ponsonby A.L., McMichael A., van der Mei I.: Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research. *Toxicology.* 2002, 181, 71-78.

-
223. Poole K.E., Loveridge N., Barker P.J., Halsall D.J., Rose C., Reeve J., Warburton E.A.: Reduced vitamin D in acute stroke. *Stroke*. 2006 37, 1, 243-245.
 224. Popa C, Netea M.G., van Riel P.L., van der Meer J.W., Stalenhoef A.F.: The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid. Res.* 2007, 48, 751-562.
 225. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Weissberg P.L.: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro. Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ. Res.* 2000, 87, 1055-1062.
 226. Prosser D.E., Jones G.: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* 2004, 29, 664-673.
 227. Raines E.W.: The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival - relationships to vascular disease. *J. Exp. Pathol.* 2000, 81, 173-182.
 228. Raines E.W., Ferri N.: Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J. Lipid. Res.* 2005, 46, 1081-1092.
 229. Rajasree S., Umashankar P.R., Lal A.V., Sarma P.S., Kartha C.C.: D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life Sci.* 2002, 70, 1777-1788.
 230. Rakesh K., Agrawal D.K.: Cytokines and growth factors involved in apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cell. *Int. Immunopharmacol.* 2005, 10, 1487-1506.
 231. Read S.M., Northcote D.H.: Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 1981, 116, 53-64.
 232. Rebsamen M.C., Sun J., Norman A.W., Liao J.K.: 1α 25-Dihydrovitamin D₃ induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ. Res.* 2002, 91, 17-24.
 233. Regan C.P., Adam P.J., Madsen C.S., Owens G.K.: Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 1139-1147.
 234. Reichel H., Koeffler H.P., Norman A.W.: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 980-990.

-
235. Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.R.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003, 302, 1704-1709.
 236. Risinger G.M. Jr., Hunt T.S., Updike D.L., Bullen E.C., Howard-Matrix E.W.: Metalloproteinase-2 Expression by Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated by Both Stimulatory and Inhibitory Signals in Response to Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 25915-25925.
 237. Rock M.J., Cain S.A., Freeman L.J., Morgan A., Mellody K., Marson A., Shuttleworth C.A., Weiss A.S., Kielty C.M.: Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 23748-23758.
 238. Rodgers U.R., Weiss A.S.: Cellular interactions with elastin. *Pathol. Biol.* 2005, 53, 390-398.
 239. Rong J.X., Shapiro M., Trogan E., Fisher E.A.: Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003, 100, 13531-1336.
 240. Ross R., Glomset J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973, 180, 1332-1339.
 241. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362, 801-809.
 242. Ross R.: Mechanisms of disease. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 115-116.
 243. Rostand S.G.: Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences. *Hypertension* 1997, 30, 150-156.
 244. Rzucidlo E.M., Martin K.A., Powell R.J.: Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Vasc. Surg.* 2007, 45, 25-32.
 245. Schleithoff S.S., Zittermann A., Tenderich G., Berthold H.K., Stehle P., Koerfer R.: Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 754-759.
 246. Schwartz S.M., Campbell G.R., Campbell J.H.: Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.* 1986, 58, 427-444.
 247. Schwartz S.M., Majesky M.W., Murry C.E.: The intima: development and monoclonal responses to injury. *Atherosclerosis* 1995, 118, 125-140.

-
248. Schwartz S.M.: Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 2814.-2817
 249. Schwartz S.M., Murry C.E.: Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. *Annu. Rev. Med.* 1998, 49, 437-460.
 250. Schwartz S.M., Virmani R., Rosenfeld M.E.: The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2000, 2, 422-429.
 251. Scragg R., Jackson R., Holdaway I.M., Lim T., Beaglehole R.: Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 concentrations: a community-based study. *Int. J. Epidemiol.* 1990, 19, 559-563.
 252. Shanahan C.M., Weissberg P.L.: Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18, 333-338.
 253. Shimada T., Hasegawa H., Yamazaki Y., Muto T., Hino R., Fuita T., Nakahara K., Fukumoto S., Yamashita T.: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 2004, 19, 429-435.
 254. Singer Ch.A., Salinthon S., Baker K.J., Gerthofer W.T.: Synthesis of immune modulators by smooth muscles. *BioEssay.* 2004, 26, 646-655.
 255. Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzouana G., Gillesse D., Gabbiani G.: A monoclonal antibody against -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 1986, 103, 2787-2786.
 256. Skalli O., Bloom W.S., Ropraz P., Azzarone B., Gabbiani G.: Cytoskeletal remodeling of rat aortic smooth muscle cells in vitro: relationships to culture conditions and analogies to in vivo situations. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1986, 18, 481-493.
 257. Smoleński R.T., Lachno D.R., Ledingham S.J., Yacoub M.H.: Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J. Chromatogr.* 1990, 527, 414-420.
 258. Somjen D., Weisman Y., Kohen F., Gayer B., Limor R., Sharon O., Jacard N., Knoll E., Stern N.: 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is up regulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation.* 2005, 111, 1666-1672.
 259. Song J., Rolfe B.E., Campbell J.H., Campbell G.R.: Changes in three-dimensional architecture of microfilaments in cultured vascular smooth

- muscle cells during phenotypic modulation. *Tissue Cell*. 1998, 30, 324-333.
260. Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr, Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W.: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1995, 15, 1512-1531.
261. Stegemann J.P., Hong H., Nerem R.M.: Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J. Appl. Physiol*. 2005, 98, 2321-2327.
262. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.: Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med*. 1989, 320, 915-924.
263. Steitz S.A., Speer M.Y., Curinga G., Yang H.Y., Haynes P., Aebbersold R., Schinke T., Karsenty G., Giachelli C.M.: Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and down-regulation of smooth muscle lineage markers. *Circ. Res*. 2001, 89, 1147-1154.
264. Stumpf W.E., Sar M., Reid F.A., Tanaka Y., DeLuca H.F.: Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979, 206, 1188-1190.
265. Swindland A., Torvik A.: Atherosclerotic carotid disease in asymptomatic individuals: a histological study of 53 cases. *Acta Neurol. Scand*. 1988, 78, 506-517.
266. Takeo S., Anan M., Fujioka K., Kajihara T., Hiraga S., Miyake K., Tanonaka K., Minematsu R., Mori H., Taniguchi Y.: Functional changes of aorta with massive accumulation of calcium. *Atherosclerosis* 1989, 77, 175-181.
267. Tangpricha V., Turner A., Spina C., Decastro S., Chen T.C., Holick M.F.: Tanning is associated with optimal vitamin D status (serum 25-hydroxyvitamin D concentration) and higher bone mineral density. *Am. J. Clin. Nutr*. 2004, 80, 1645-1649.
268. Taskapan H., Wei M., Oreopoulos DG.: 25(OH) vitamin D₃ in patients with chronic kidney disease and those on dialysis: rediscovering its importance. *Int. Urol. Nephrol*. 2006; 38, 323-329.

-
269. Tedgui A., Mallat Z.: Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006, 86, 515-581.
270. Thomas A.C., Campbell J.H.: Smooth muscle cells of injured rat and rabbit arteries in culture: contractile and cytoskeletal proteins. *Atherosclerosis* 2001, 154, 291-299.
271. Thyberg J., Palmberg L., Nilsson J., Ksiazek T., Sjolund M.: Phenotypic modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells: on the role of platelet-derived growth factor. *Differentiation* 1983, 25, 156-167.
272. Thyberg J., Hultgardh-Nilsson A.: Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res.* 1994, 276, 263-271.
273. Thyberg J., Blomgren K., Hedin U., Dryjski M.: Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res.* 1995, 281, 421-433.
274. Thyberg J., Blomgren K., Roy J., Tran P.K., Hedin U.: Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J. Histochem. Cytochem.* 1997, 45, 837-846.
275. Trion A., van der Laarse A.: Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am. Heart J.* 2004, 147, 808-814.
276. Trion A., Schutte-Bart C., Bax W.H., Jukema J.W., van der Laarse A.: Modulation of calcification of vascular smooth muscle cells in culture by calcium antagonists, statins, and their combination. *Mol. Cell. Biochem.* 2008, 308, 25-33.
277. Tukaj C., Wrzołkowa T.: Effects of vitamin D on aortic smooth muscle cells in culture. *Toxicol. in vitro.* 1996, 10, 701-711.
278. Tukaj C., Wrzołkowa T.: 1,25(OH)₂D₃ stimulates phenotypical changes and proliferation of vascular smooth muscle cells in culture. (ed.): A. W. Norman. In: *Vitamin D chemistry, biology and clinical application of the steroid hormone.* Riverside (Calif) 1997, 787-788.
279. Tukaj C., Kubasik-Juraniec J., Kraszpułski M.: Morphological changes of aortal smooth muscle cells exposed to calcitriol in culture. *Med. Sci. Monit.* 2000, 6, 668-674.
280. Tukaj C., Bohdanowicz J., Kubasik-Juraniec J.: Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on cytoskeleton organisation of aortal smooth

- muscle cells in primary culture. (ed.): Norman A. W. In: Vitamin D Endocrine System: structural, biological, genetic and clinical aspects. Riverside (Calif). 2000, 431-434.
281. Tukaj C., Bohdanowicz J., Chmielewski M., Rudzińska-Kisiel T., Kubasik-Juraniec J.: Scanning electron microscopic study of the aortal smooth muscle cells phenotypic modulation after calcitriol treatment in primary culture. *Proceedings of 5th Multinational Congress on Electron Microscopy*. Rinton Press Inc. 2001, 283-284.
282. Tukaj C., Bohdanowicz J., Kubasik-Juraniec J.: A scanning electron microscopic study of phenotypic plasticity and surface structural changes of aortal smooth muscle cells in primary culture. *Folia Morph.* 2002, 61, 191-198.
283. Tukaj C., Bohdanowicz J., Kubasik-Juraniec J.: Growth and differentiation of aortal smooth muscle cells after calcitriol treatment are associated with microtubule reorganisation – an in vitro study. *Folia Morph.* 2004, 63, 51-57.
284. Tukaj C., Trzonkowski P., Kubasik-Juraniec J., Myśliwski A.: Quantifying division of aortal smooth muscle cell in culture stimulated by 1,25(OH)₂D₃. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007, 103, 525-528.
285. Tukaj C.: Enhanced proliferation of aortal smooth muscle cells treated by 1,25(OH)₂D₃ in vitro coincides with impaired formation of elastic fibers. *Int. J. Exp. Path.* 2008, 89, 117-124.
286. Tukaj C.: Adequate level of vitamin D is essential for the maintenance of good health. *PHMD.* 2008, 62, 502-510.
287. Tukaj C.: Role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Post. N. Med.* W druku.
288. Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E., Ziada K.M., Hobbs R.E., McCarthy P.M., Young J.B., Nissen S.E.: High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001, 103, 2705-2710.
289. Wada T., McKee M.D., Steitz S., Giachelli C.M.: Calcification of vascular smooth muscle cell cultures. Inhibition by osteopontin. *Circ. Res.* 1999, 84, 166-178.
290. Walters M.R., Wicker D.C., Riggle P.C.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors identified in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1986, 18, 67-72.

-
291. Wang Z., Newman W.H.: Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J. Surg. Res.* 2003, 111, 261-266.
 292. Wang T.J., Pencina M.J., Booth S.L., Jacques P.F., Ingelsson E., Lanier K., Benjamin E.J., D'Agostino R.B., Wolf M., Vasan R.S.: Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008, 117, 503-511.
 293. Watanabe T., Haraoka S., Shimokama T.: Inflammatory and immunological nature of atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* 1996, 54, 25-34.
 294. Watson K.E., Abrolat M.L., Malone L.L., Hoeg J.M., Doherty T., Detrano R., Demer L.L.: Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation.* 1997, 96, 1755-1760.
 295. Webb A.R., Kline L., Holick M.F.: Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃ synthesis in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988, 67, 373-378.
 296. Webb A.R., DeCosta B.R., Holick M.F.: Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989, 68, 882-887.
 297. Wehrle-Haller B.: Analysis of integrin dynamics by fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol. Biol.* 2007, 370, 173-202.
 298. Weishaar R.E., Simpson R.U.: Involvement of vitamin D₃ with cardiovascular function, II: direct and indirect effects. *Am. J. Physiol.* 1987, 253, 675-683.
 299. Weishaar R., Kim S., Saunders D., Simpson R.: Involvement of vitamin D₃ with cardiovascular function. Effects on physical and morphological properties. *Am. J. Physiol.* 1990, 258, 134-142.
 300. Weissberg P.L.: Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart* 2000, 83, 247-252.
 301. Whiting S.J., Calvo M.S.: Dietary recommendations for vitamin D: a critical need for functional end points to establish an estimated average requirement. *J. Nutr.* 2005, 135, 304-309.
 302. Wiesner S., Legate K.R., Fässler R.: Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci.* 2005, 62, 1081-1099.
 303. Wilson E.: $\alpha_7\beta_1$ Integrin: Putting the Brakes on Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circ. Res.* 2007, 101, 651-.

304. Wolf G.: The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J. Nutr.* 2004, 134, 1299-1302.
305. Worth N.F., Rolfe B.E., Song J., Campbell G.R.: Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 2001, 49, 130-145.
306. Wortsman J., Matsuoka L.Y., Chen T.C., Lu Z., Holick M.F.: Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000, 72, 690-693.
307. Wrzołkowa T., Żydowo M.: Ultrastructural studies on the vitamin D induced heart lesions in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1980, 2, 1117-1133.
308. Vieth R.: Vitamin D ingestion and changes to rat aorta *Cardiovasc. Res.* 2002, 56, 323-324.
309. Vieth R., Ladak Y., Walfish P.G.: Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88, 185-191.
310. Vieth R.: Why the optimal requirement for vitamin D₃ is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004, 89, 575-579.
311. Vieth R.: Critique of the considerations for establishing tolerable upper intake levels for vitamin D: critical need for revision upwards. *J. Nutr.* 2006, 136, 1117-1122.
312. Yamamoto M., Yamamoto K.: Growth regulation in primary culture of rabbit arterial smooth muscle cells by platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor-I, and epidermal growth factor. *Exp. Cell Res.* 1994, 212, 62-68.
313. Yoshida T., Owens G.K.: Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ. Res.* 2005, 96, 280-291.
314. Zalewski A., Shi Y., Johnson A.G.: Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ. Res.* 2002, 91, 652-655.
315. Zamir E., Geiger B.: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001, 114, 3583-3590.
316. Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M., Hewison M.: Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, 86, 888-894.

-
317. Zittermann A.: Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br. J. Nutr.* 2003, 89, 552-572.
 318. Zittermann A., Schulze Schleithoff S., Tenderich G., Berthold H.K., Körfel R., Stehle P.: Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 41, 105-112.
 319. Zittermann A., Schleithoff S., Koerfer R.: Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br. J. Nutr.* 2005, 94, 483-492.
 320. Zittermann A.: Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2006, 92, 39-48.