

# Assessment of some of the factors involved in collagen metabolism in the abdominal aortic aneurysm wall

## Ocena wybranych czynników wpływających na metabolizm kolagenu w ścianie tętniaka aorty brzusznej

Radosław Kowalewski<sup>1</sup>, Bogusław Panek<sup>1</sup>, Jerzy Pałka<sup>3</sup>, Krzysztof Sobolewski<sup>2</sup>, Andrzej Małkowski<sup>2</sup>, Marek Gacko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Vascular Surgery and Transplantology, Medical University, Białystok, Poland (Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji Akademii Medycznej w Białymstoku)

<sup>2</sup>Department of Medical Biochemistry, Medical University, Białystok, Poland (Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej w Białymstoku)

<sup>3</sup>Department of Medicinal Chemistry, Medical University, Białystok, Poland (Zakład Chemii i Analizy Leków Akademii Medycznej w Białymstoku)

### Abstract

**Background.** Extracellular matrix remodelling of the aortic wall plays an important role in abdominal aortic aneurysm (AAA) pathogenesis. With progress of the disease, elastin content decreases and the contents of collagen precursor forms increase in the AAA wall; however, total collagen content does not show any significant changes. The aim of the study was to evaluate the following factors involved in collagen metabolism: insulin-like growth factor I (IGF-I) and its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), as well as metalloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta.

**Material and methods.** The studied material consisted of AAA walls that were collected during elective surgical treatment of 30 patients in the age range  $65 \pm 10$  years. The AAA diameter was  $80 \pm 20$  mm. Normal abdominal aortas from 10 organ donors in the age range  $34 \pm 5$  years were the control material. Contents of IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 were evaluated according to radioimmunochemical methods. Expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 was also assessed.

**Results.** It was demonstrated that IGF-I content was decreased, whereas content of IGFBP-1 and IGFBP-3 were increased in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta. Furthermore, increased intensity of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 expression was found in the AAA wall in comparison with the wall of normal aorta.

**Conclusions.** Insulin-like growth factor I content and its bioavailability are decreased in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta in young subjects. This may impede regeneration of collagen degraded by metalloproteinases (collagenase, gelatinases), increased expression of which is present in the AAA wall.

**Key words:** IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-3, MMP-1, MMP-2, MMP-9, abdominal aortic aneurysm

### Streszczenie

**Wstęp.** Przebudowa macierzy pozakomórkowej ściany aorty odgrywa istotną rolę w patogenezie tętniaka aorty brzusznej (AAA). Wraz z postępem choroby w jego ścianie zmniejsza się zawartość elastyny i zwiększa się zawartość prekursorowych form kolagenu, podczas gdy całkowita zawartość tego białka nie ulega istotnym

### Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Radosław Kowalewski, Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji AM  
ul. M. Curie Skłodowskiej 24 A, 15–276 Białystok, Poland  
tel: +48 (85) 746 82 77, fax: +48 (85) 746 88 96  
e-mail: [korado@2com.pl](mailto:korado@2com.pl)

zmianom. Celem pracy była ocena następujących czynników regulujących metabolizm kolagenu: insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-I) i jego białek wiążących (IGFBP-1 i IGFBP-3) oraz metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2, MMP-9) w ścianie TAB w porównaniu ze ścianą aorty prawidłowej.

**Materiał i metody.** Materiał do badań stanowiły ściany AAA o średnicy  $80 \pm 20$  mm pobrane od 30 chorych w wieku  $65 \pm 10$  lat podczas planowych zabiegów operacyjnych. Materiałem kontrolnym były prawidłowe aorty brzuszne 10 dawców narządów w wieku  $34 \pm 5$  lat. Metodami radioimmunologicznymi oznaczono stężenie IGF-I, IGFBP-1 i IGFBP-3. Oceniono również ekspresję MMP-1, MMP-2 oraz MMP-9.

**Wyniki.** Wykazano, że zawartość IGF-I zmniejsza się, natomiast zawartość IGFBP-1 oraz IGFBP-3 zwiększa się w ścianie AAA w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej. Ponadto stwierdzono większą intensywność ekspresji MMP-1, MMP-2 oraz MMP-9 w ścianie AAA w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej.

**Wnioski.** W ścianie AAA zmniejsza się zawartość oraz biodostępność IGF-I w porównaniu ze ścianą aorty prawidłowej u osób młodych. Proces ten może utrudniać odtwarzanie kolagenu degradowanego przez metaloproteinazy (kolagenazę, żelatynazy), których zwiększona ekspresja występuje w ścianie AAA.

**Słowa kluczowe:** IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-3, MMP-1, MMP-2, MMP-9, tętniak aorty brzusznej

## Introduction

In spite of increasing incidence of abdominal aortic aneurysm (AAA) in developed countries, the particularly complex pathogenesis of the disease has still not been fully explained [1–3]. One of the key steps in AAA development is extracellular matrix remodelling of the aortic wall that diminishes its elasticity and resistance [4, 5]. The mechanical properties of arteries are determined by main extracellular proteins, namely elastin and collagen [6]. Decreased elastin content with a changed architecture of its fibres was demonstrated in the AAA wall [7, 8]. The process, which is unfavourable from a mechanical point of view, is compensated by a disturbed collagen metabolism [9–11]. Consequently, increased content of collagen type I and III precursor forms, as well as impairment of collagen fibre integration, are present in the AAA wall [10, 12].

The exact recognition of the mechanisms leading to the disturbed collagen metabolism in the AAA wall is quite hard because the tissue content of the protein results from coexisting processes of biosynthesis and degradation, which are further controlled by many factors [13]. The strongest known stimulator of collagen biosynthesis is insulin-like growth factor I (IGF-I) [14]. It is synthesized mainly in the liver; however, demonstration of its synthesis in other organs have extended the concept of its action from endocrine to paracrine and autocrine [15, 16]. Insulin-like growth factor I through membrane receptors activates gene replication and transcription, as well as protein synthesis (collagen, among others) [17]. It is present in its free form and in complexes with binding proteins (IGFBPs); however, their role has still not been clearly explained [18].

## Wstęp

Mimo stałego wzrostu zapadalności na tętniaki aorty brzusznej (AAA) w społeczeństwach krajów rozwiniętych, nie wyjaśniono w pełni złożonej patogenezy choroby [1–3]. Jednym z kluczowych etapów w rozwoju AAA jest przebudowa macierzy pozakomórkowej ściany aorty, która wiąże się z utratą jej sprężystości i wytrzymałości [4, 5]. Właściwości mechaniczne tętnic warunkują główne białka pozakomórkowe — elastyna i kolagen [6]. W ścianie AAA stwierdzono zmniejszoną zawartość elastyny o zmienionym układzie architektonicznym jej włókien [7, 8]. Ten niekorzystny pod względem mechaniki proces jest kompensowany zaburzonym metabolizmem kolagenu [9–11]. Jego następstwem jest zwiększona zawartość prekursorowych form kolagenów typu I i III oraz zaburzony proces fibrogenyzy kolagenu w ścianie AAA [10, 12].

Poznanie mechanizmów leżących u podstaw zaburzonego metabolizmu kolagenu w ścianie AAA jest trudne, ponieważ zawartość tego białka w tkankach jest wypadkową współistniejących procesów biosyntezy i degradacji, pozostających pod kontrolą wielu czynników [13]. Najsilniejszym stymulatorem biosyntezy kolagenu jest insulinopodobny czynnik wzrostu typu I (IGF-I) [14]. Jest on syntetyzowany przede wszystkim w wątrobie, ale również w innych narządach, a wykazanie jego syntezy w tkankach pozawątrobowych poszerzyło koncepcję działania IGF-I z pierwotnie endokrynej do parakrynej oraz autokrynej [15, 16]. Czynnikiem wzrostu działa za pomocą komórkowych receptorów błonowych, aktywując procesy replikacji i transkrypcji genów oraz syntezy białka (m.in. kolagenu) [17]. Insulinopodobny czynnik wzrostu typu I występuje w formie wolnej

IGFBP-1 is believed to act as an IGF-I inhibitor, whereas IGFBP-3 is thought to play the role of growth factor reservoir [19].

Collagen degradation under physiological conditions proceeds in two phases: extracellular and intracellular. Specific matrix metalloproteinases (MMP) are the enzymes which are responsible for the extracellular phase of protein degradation. One of these is interstitial collagenase (MMP-1). It degrades collagen to tropocollagen A and tropocollagen B, which undergo denaturation at body temperature and become susceptible to the action of nonspecific proteases. Furthermore, gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9) also play an important role in collagen degradation [20, 21].

The aim of the study was to evaluate some factors involved in the regulation of collagen metabolism: anabolic ones — insulin-like growth factor I (IGF-I) and its binding proteins (IGFBP-1 and IGFBP-3), as well as catabolic ones — metalloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) in the AAA wall, when compared to the wall of normal aorta.

### Material and methods

The research was conducted after protocol approval by the Committee for Ethics and Supervision of Human and Animal Research of the Medical University of Białystok. The studied material consisted of AAA walls obtained from 30 patients undergoing elective surgery, including 22 men and 8 women, aged  $65 \pm 10$  years. The mean AAA diameter was  $80 \pm 20$  mm. Segments of abdominal aorta without macroscopically observable pathological lesions of 10 young organ donors (aged  $34 \pm 5$  years) were the control material. After mural thrombus and surrounding tissue removal, the collected material was washed with ice-cold 0.15 M NaCl solution, dried and stored at  $-70^\circ\text{C}$  [22]. 20% w/v tissue homogenates were prepared in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) with a knife (20,000 rpm,  $2 \times 30$  s,  $4^\circ\text{C}$ ) and an ultrasound (20 kHz,  $3 \times 15$  s,  $4^\circ\text{C}$ ) homogeniser, respectively. After centrifugation ( $10,000 \times g$ , 30 min.,  $4^\circ\text{C}$ ), the supernatants were used for further measurements. The protein content was determined according to Bradford's method [23].

#### Insulin-like growth factor I and its binding protein content assessment

500  $\mu\text{l}$  of tissue homogenate was submitted to gel filtration on Bio-gel P-60 and eluted with 1 M acetic acid. Fractions of 1 ml were collected. To determine the position of IGF-I in eluate, the growth factor was labelled with  $J^{125}$ . Fractions containing IGF-I were pooled and evaporated to dry mass in vacuum conditions at

i w kompleksach z białkami wiążącymi (IGFBPs) [18]. Dotychczas nie wyjaśniono ostatecznie ich roli. Przypuszcza się, iż IGFBP-1 jest inhibitorem działania IGF-I, natomiast IGFBP-3 jest białkiem pełniącym funkcję rezerwuaru czynnika wzrostu [19].

W warunkach fizjologicznych degradacja kolagenu przebiega w dwóch etapach: pozakomórkowym i wewnątrzkomórkowym. Enzymy odpowiedzialne za degradację pozakomórkową tego białka są specyficznymi metalloproteinazami macierzy (MMP). Jedną z nich jest kolagenaza fibroblastów (MMP-1), która trawi kolagen do tropokolagenów A i B. Powstające produkty degradacji ulegają denaturacji w temperaturze ciała i stają się podatne na działanie nieswoistych proteinaz. W degradacji kolagenu istotne znaczenie mają również żelatynazy A (MMP-2) i B (MMP-9) [20, 21].

Celem pracy jest ocena wybranych czynników regulujących metabolizm kolagenu: anabolicznych — IGF-I i jego białek wiążących (IGFBP-1 i IGFBP-3) oraz katabolicznych — metalloproteinaz (MMP-1, MMP-2, MMP-9) w ścianie tętniaka aorty brzusznej w porównaniu ze ścianą aorty prawidłowej.

### Material i metody

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Białymstoku. Materiał do badań stanowiły ściany AAA pobrane podczas planowych operacji od 30 chorych, w tym 22 mężczyzn i 8 kobiet (wiek  $65 \pm 10$  lat). Średnica tętniaków wynosiła  $80 \pm 20$  mm. Materiał kontrolny stanowiły aorty brzuszne bez makroskopowych zmian patologicznych pobrane od 10 młodych dawców narządów (wiek  $34 \pm 5$  lat). Po usunięciu skrzepliny przyściennej oraz tkanek otaczających materiał badany i kontrolny płukano w 0,15 M oziębionym roztworze NaCl, osuszano i przechowywano w temperaturze  $-70^\circ\text{C}$  [22]. Do badań sporządzono 20-procentowy (w/v) homogenat w oziębionym 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 7,6 za pomocą homogenizatora nożowego (20 000 rpm,  $2 \times 30$  s,  $4^\circ\text{C}$ ), a następnie ultradźwiękowego (20 kHz,  $3 \times 15$  s,  $4^\circ\text{C}$ ). Po odwirowaniu ( $10\,000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) supernatant wykorzystywano do kolejnych oznaczeń. Zawartość białka oznaczano według metody Bradforda [23].

#### Ocena stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu I i jego białek wiążących

Kwasem octowym (1 M) eluowano 500  $\mu\text{l}$  homogenatu naniesionego na kolumnę chromatograficzną wypełnioną Bio-gelem P-60, zbierając 1 ml frakcje. W celu określenia pozycji IGF-I w zbieranych frakcjach czynnik wzrostu znakowano jodem  $J^{125}$ . Frakcje zawierające IGF-I łączono i zagęszczano poprzez odparowanie.

room temperature. The obtained material was used for radioimmunometric measurements. The following commercially available kits were used for evaluation: IGF-I content (catalogue number IS 53065; Incstar Corporation, Stillwater, MN, USA), IGFBP-I content (catalogue number DSL-7800; Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX, USA) and IGFBP-3 content (catalogue number DSL-6600; Diagnostic System Laboratories Inc.). The obtained results were expressed in ng per g of tissue.

### Matrix metalloproteinases expression assessment

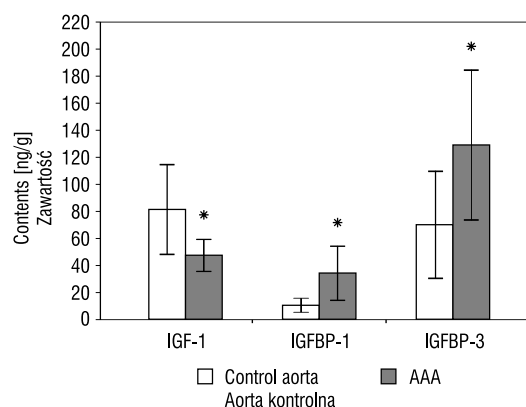
Sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) was performed according to the method described by Laemmli [24]. Samples of tissue supernatants containing 20  $\mu$ g of protein were subjected to electrophoresis. The following molecular mass standards were used: 208.8 kDa, 119.8 kDa, 99.1 kDa, 52.8 kDa, 37.6 kDa and 28.8 kDa (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). After SDS / PAGE, the gels were allowed to equilibrate in 25 mM Tris, 0.2 M L-glycine, 20% (v/v) methanol for 5 minutes, and the proteins were transferred to 0.2  $\mu$ m pore diameter nitrocellulose membranes (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 100 mA with Semi-Dry Blotter (Sigma Aldrich Chemie GmbH). Nitrocellulose membranes were then incubated with one of the following primary monoclonal antibodies: against MMP-1 (catalogue number MAB901; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), against MMP-2 (catalogue number MAB9021; R&D Systems Inc.), or against MMP-9 (catalogue number MAB9091; R&D Systems Inc.) at 1:1000 dilutions in 5% dried defatted milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.05% (v/v) Tween 20) for 1 hour. To evaluate MMP expression, species-specific secondary antibodies were added at 1:5000 dilutions. Incubation was continued for 30 minutes with continuous shaking. After that, nitrocellulose membranes were washed with TBS-T (5 times for 5 minutes) and stained with Sigma-Fast BCIP/NBT reagent (Sigma Aldrich Chemie GmbH).

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Student's *t*-test, accepting  $p < 0.05$  as significant, after verification of the data with Shapiro-Wilka and Lillieforsa tests. Mean values  $\pm$  standard deviations are presented.

### Results

Contents of IGF-I and its binding proteins (IGFBP-I, IGFBP-3) in investigated tissues are shown in Figure 1.



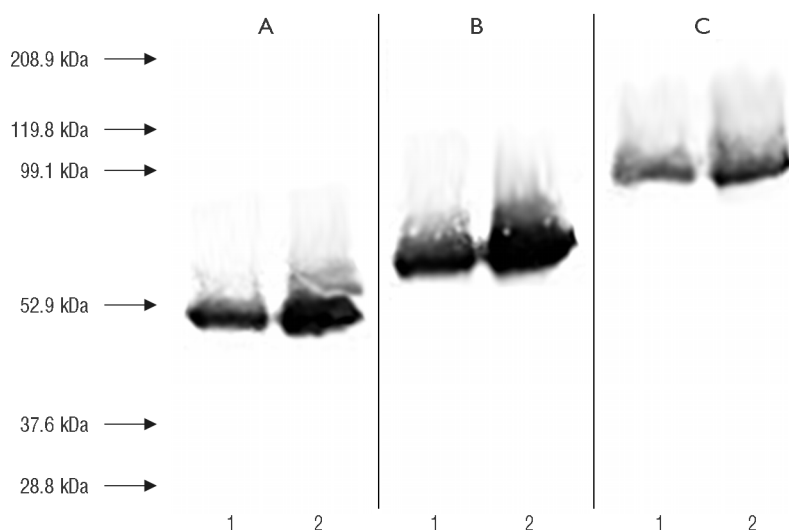
**Figure 1.** Contents of IGF-I, IGFBP-I and IGFBP-3 in the walls of control aorta and abdominal aortic aneurysm (AAA). Differences are statistically significant when compared to the wall of control aorta (\* $p < 0.05$ )

**Rycina 1.** Zawartość IGF-I, IGFBP-I i IGFBP-3 w ścianach aorty kontrolnej i tętniaka aorty brzusznej (AAA). Różnice statystycznie w porównaniu z aortą kontrolną (\* $p < 0,05$ )

wanie w próżni w temperaturze pokojowej. Uzyskany materiał zastosowano do badań radioimmunologicznych. W ocenie stężenia wykorzystano następujące komercyjne zestawy: IGF-I (nr kat. IS 53065; Incstar Corporation, Stillwater, MN, Stany Zjednoczone), IGFBP-I (nr kat. DSL-7800; Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX, Stany Zjednoczone) oraz IGFBP-3 (nr kat. DSL-6600; Diagnostic System Laboratories Inc.). Uzyskane wyniki wyrażono w ng w przeliczeniu na g tkanki.

### Ocena ekspresji metaloproteinaz macierzy

Elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących (SDS-PAGE) przeprowadzono według metody opisanej przez Laemmli'ego [24]. Elektroforezie poddano próbki płynu nadosadowego zawierającego 20  $\mu$ g białka. Zastosowano następujące standardy mas cząsteczkowych: 208,8 kDa, 119,8 kDa, 99,1 kDa, 52,8 kDa, 37,6 kDa i 28,8 kDa (Bio-Rad; Hercules, CA, Stany Zjednoczone). Po zakończeniu elektroforezy żele płukano przez 5 minut w buforze zawierającym 25 mM Tris, 0,2 M L-glicynę i 20-procentowy (v/v) metanol. Następnie przeprowadzono elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową o średnicy porów 0,2  $\mu$ m (Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) przy stałym natężeniu prądu 100 mA za pomocą Semi-Dry Blottera (Sigma Aldrich Chemie GmbH). Membrany nitrocelulozowe po zakończeniu transferu inkubowano przez godzinę z jednym z następujących przeciwciał pierwotnych: anty MMP-1 (nr kat. MAB901; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Stany



**Figure 2.** Expression of MMP-1 (A), MMP-2 (B) and MMP-9 (C) in the walls of control aorta (lane 1) and abdominal aortic aneurysm (lane 2). The supernatant containing 20  $\mu$ g of protein was run in each lane. The analysis was performed on pooled homogenates from the walls of 30 AAA and 10 control aortas. The positions of molecular mass standards are indicated on the left side

**Rycina 2.** Ekspresja MMP-1 (A), MMP-2 (B) i MMP-9 (C) w ścianach aorty kontrolnej (linia 1) i tętniaka aorty brzusznej (linia 2). Elektroforezie poddano próbki płynu nadosadowego zawierającego 20  $\mu$ g białka, które uzyskano z połączonych homogenatów ścian 30 AAA i 10 aort kontrolnych. Po lewej stronie zaznaczono pozycje standardów mas cząsteczkowych

Insulin-like growth factor I content in the AAA wall ( $48 \pm 10.4$  ng/g of tissue) was decreased ( $p < 0.05$ ) when compared to the wall of normal aorta ( $82 \pm 32.4$  ng/g of tissue). In contrast, IGFBP-1 content in the AAA wall ( $32 \pm 17.5$  ng/g of tissue) was increased ( $p < 0.05$ ) in comparison with the wall of normal aorta ( $11 \pm 5.4$  ng/g of tissue). Similarly, IGFBP-3 content in the AAA wall ( $132 \pm 56.4$  ng/g of tissue) was also increased ( $p < 0.05$ ) when compared to the wall of normal aorta ( $70 \pm 39.7$  ng/g of tissue).

Matrix metalloproteinases expression in the investigated tissues is shown in Figure 2. The presence of MMP-1 (Figure 2A), MMP-2 (Figure 2B) and MMP-9 (Figure 2C) was demonstrated in the wall of AAA, as well as in the wall of normal aorta. The expression intensity of all investigated MMPs was increased in the AAA wall (lane 2), when compared to the wall of normal aorta (lane 1).

## Discussion

Extracellular matrix remodelling of the aortic wall plays an important role in AAA pathogenesis. With progress of the disease, elastin content decreases and the contents of collagen type I and III precursor forms increase in the AAA wall [3, 10].

One of the strongest factors stimulating collagen biosynthesis is IGF-I [14, 15]. Its activity depends on the availability of its free form, in which tissue content is estimated at less than 1% of total IGF-I. The remaining growth factor is bound to one of its binding proteins,

Zjednoczone), anty MMP-2 (nr kat. MAB9021; R&D Systems Inc.) lub anty MMP-9 (nr kat. MAB9091; R&D Systems Inc.) rozcieńczonych w stosunku 1:1000 w roztworze 5-procentowego odtłuszczonego mleka w TBS-T (20 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20). W ocenie ekspresji MMPs zastosowano gatunkowo swoiste przeciwciała drugorzędowe w rozcieńczeniu 1:5000. Inkubację przeprowadzano przez 30 minut z ciągłym mieszaniem. Następnie membrany nitrocelulozowe przepłukano TBS-T (5  $\times$  po 5 min) i barwiono za pomocą Sigma-Fast BCIP/NBT (Sigma Aldrich Chemie GmbH).

## Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta, po ich wcześniejszej weryfikacji przy użyciu testów Shapiro-Wilka i Lillieforsa. Za znamienne statystycznie przyjmowano różnice przy  $p < 0,05$ . Przedstawiono wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe.

## Wyniki

Zawartość IGF-I oraz jego białek wiążących (IGFBP-1, IGFBP-3) w badanych tkankach przedstawiono na rycinie 1. Zawartość IGF-I w ścianie AAA ( $48 \pm 10,4$  ng/g tkanki) w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej ( $82 \pm 32,4$  ng/g tkanki) jest mniejsza ( $p < 0,05$ ). Natomiast zawartość IGFBP-1 w ścianie AAA ( $32 \pm 17,5$  ng/g tkanki) w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej ( $11 \pm 5,4$  ng/g

which compete with cell receptors for IGF-I and in this way determine growth factor bioavailability [18, 25]. Performed studies have demonstrated decreased IGF-I content and increased contents of its binding proteins (IGFBP-1, IGFBP-3) in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta. Decreased IGF-I content may diminish collagen biosynthesis in the AAA wall, and the process is further accelerated by decreased IGF-I bioavailability for cell receptors which is a result of increased contents of IGFBP-1 and IGFBP-3.

It can be supposed that other mechanisms should be responsible for increased synthesis of collagen precursor forms in the AAA wall. It was found that heparan sulphate modifies the phenotype of smooth muscle cells (SMC) in the arterial wall. Its decreased content in extracellular compartments diminishes the contractile properties of these cells on the one hand and on the other, stimulates them to synthesis of extracellular matrix components [26]. Thus, decreased content of heparan sulphate and its accelerated degradation, which were demonstrated in the AAA wall in previous studies, may explain the increased synthesis of collagen precursor forms [11, 27].

Total collagen content in the AAA wall does not show any significant changes in comparison with the wall of control aorta, in spite of increased contents of its precursor forms [10, 11, 28]. Furthermore, increased content of collagen degradation products was demonstrated in the AAA wall [28]. These observations suggest increased collagen degradation. Enzymes that play a key role in this process are matrix metalloproteinases [29, 30].

The results of our studies demonstrated increased expression of MMP-1 in the AAA wall. The enzyme role in the disease pathogenesis was confirmed previously by other authors [31, 32]. It seems particularly important because breakdown products of MMP-1 are capable of feedback enzyme activation, and the process is not inhibited by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) [33].

It was shown in transgenic murine models that complementary action of MMP-2 and MMP-9 is required for AAA development [34]. It is supposed that AAA expansion is associated with increased levels of MMP-2; whereas, its rupture is linked to increased levels of MMP-9 [30].

Our results demonstrated increased expression of MMP-2 in the AAA wall. The enzyme is mainly derived from SMC of media and adventitia. The changed phenotype of these cells, which was shown in the AAA wall, is associated with the loss of their contractile properties but simultaneously enhances MMP-2 synthesis by these cells [35]. The phenomenon is confirmed by increased

tkanki) jest większa ( $p < 0,05$ ). Również zawartość IGFBP-3 w ścianie AAA ( $132 \pm 56,4$  ng/g tkanki) w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej ( $70 \pm 39,7$  ng/g tkanki) jest większa ( $p < 0,05$ ).

Ekspresję MMPs w badanych tkankach przedstawiono na rycinie 2. W ścianie AAA oraz aorty kontrolnej występuje ekspresja MMP-1 (ryc. 2A), MMP-2 (ryc. 2B) i MMP-9 (ryc. 2C). Intensywność ekspresji wszystkich ocenianych metaloproteinaz jest większa w ścianie AAA (linia 2) w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej (linia 1).

## Omówienie wyników

Przebudowa macierzy pozakomórkowej ściany aorty odgrywa istotną rolę w patogenezie AAA. Wraz z postępem choroby w jego ścianie zmniejsza się zawartość elastyny i zwiększa się zawartość prekursorowych form kolagenu typu I i III [3, 10].

Jednym z najsilniejszych czynników stymulujących biosyntezę kolagenu jest IGF-I [14, 15]. Jego działanie zależy od dostępności wolnej postaci czynnika wzrostu, której zawartość w tkankach ocenia się na mniej niż 1% całkowitego stężenia IGF-I. Pozostały czynnik wzrostu związany jest z jednym z białek wiążących, które konkurując o IGF-I z jego receptorami komórkowymi, decydują o jego biodostępności [18, 25]. W przeprowadzonych badaniach wykazano mniejszą zawartość IGF-I i większą zawartość białek wiążących (IGFBP-1 oraz IGFBP-3) w ścianie AAA w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej. Zmniejszona zawartość IGF-I sprzyja zmniejszeniu biosyntezy kolagenu w ścianie AAA. Zjawisko to pogłębia zmniejszona biodostępność IGF-I dla receptorów komórkowych, która jest następstwem zwiększonej zawartości IGFBP-1 i IGFBP-3.

Można zatem przypuszczać, że za zwiększoną syntezę prekursorowych form kolagenu w ścianie AAA odpowiada inny mechanizm. Stwierdzono, że czynnikiem modyfikującym fenotyp komórek mięśni gładkich ściany tętnic jest siarczan heparanu. Zmniejszenie jego zawartości w przestrzeni pozakomórkowej powoduje utratę właściwości kurczliwych przez te komórki i jednocześnie pobudza je do syntezy składników macierzy pozakomórkowej [26]. W związku z tym za zwiększoną syntezę prekursorowych form kolagenu może odpowiadać zmniejszona zawartość siarczanu heparanu i jego nasiloną degradacja wykazana w ścianie AAA we wcześniejszych badaniach [11, 27].

Mimo zwiększenia zawartości prekursorowych form kolagenu całkowita zawartość tego białka w ścianie AAA nie ulega istotnym zmianom w porównaniu ze ścianą aorty kontrolnej [10, 11, 28]. Ponadto w ścianie AAA wykazano zwiększoną zawartość produktów degradacji kolagenu [28]. Powyższe spostrzeżenia sugerują nasiloną de-

MMP-2 mRNA levels in the AAA wall [36]. It should also be emphasized that a systemic overproduction of MMP-2 in the vascular system was found in patients with AAA [37]. Furthermore, there is a positive correlation between MMP-2 levels in the AAA wall and its size. Thus, the enzyme concentration is higher in the wall of large aneurysms than in small or moderate ones [30].

An increased MMP-9 expression in the AAA wall was also found in our study. It can result from increased levels of MMP-9 mRNA in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta [38, 39]. Increased levels of MMP-9 mRNA are typical for moderate AAA with a diameter of 5–7 cm where they are higher than in small or large AAA [40]. Furthermore, MMP-9 concentration is also highest in the walls of moderate AAA [30].

The demonstrated increased MMP expression in the AAA wall predisposes to enhanced collagen degradation that plays a role in the disease pathogenesis and may favour AAA rupture [3]. However, according to our results, we cannot exclude the possibility of different MMP expressions, as well as IGF-I and its binding protein concentrations at an earlier stage of AAA formation or in the wall of ruptured AAA because the studied material was obtained from patients undergoing elective surgical interventions. Furthermore, in the performed studies, we compared the AAA wall from patients aged 65 years to the normal aortic wall from young organ donors. The age mismatch between the studied and control groups may lead to physiological differences in the expression of factors involved in the regulation of the extracellular matrix metabolism in the vascular wall [41]. However, the selection of studied and control groups in the same age would result in a comparison between the walls of AAA and abdominal aorta with an atherosclerotic process, which is commonly present in this age bracket. Whereas control aortas from young subjects were free of atherosclerotic lesions, in which decreased IGF-I expression [42], as well as increased expressions of IGFBP-1, IGFBP-3, MMP-2 and MMP-9, were demonstrated [43–45]. Thus, age matched groups would not allow for completely unbiased assessment of investigated factors involved in collagen metabolism in the AAA wall.

## Conclusions

Insulin-like growth factor I content and bioavailability are decreased in the AAA wall when compared to the wall of normal aorta in young subjects. This may impede regeneration of collagen degraded by metalloproteinases (collagenase, gelatinases), increased expression of which is present in the AAA wall.

gradację kolagenu, a enzymami odgrywającymi kluczową rolę w tym procesie są metaloproteiny [29, 30].

W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wykazano zwiększoną ekspresję MMP-1 w ścianie AAA. Znaczenie enzymu w patogenezie choroby potwierdzają dotychczasowe badania innych autorów [31, 32]. Prawdopodobnie jest ona szczególnie istotna, ponieważ produkty degradacji kolagenu powstające pod wpływem MMP-1 aktywują zwrótnie enzym, a proces ten nie jest hamowany przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) [33].

W badaniach doświadczalnych przeprowadzanych na myszach transgenicznym stwierdzono, że do powstawania AAA niezbędne jest synergistyczne działanie MMP-2 i MMP-9 [34]. Przypuszcza się, że powiększenie się średnicy AAA wiąże się z podwyższonym stężeniem MMP-2, natomiast pęknięcie AAA ma związek ze zwiększonym stężeniem MMP-9 [30].

Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wykazały zwiększoną ekspresję MMP-2 w ścianie AAA. Źródłem enzymu są przede wszystkim komórki mięśni gładkich warstwy środkowej i przydanki. Zmiana fenotypu tych komórek, którą zaobserwowano w ścianie AAA, wiąże się z utratą ich właściwości kurczliwych, a jednocześnie prowadzi do nasilenia syntezy MMP-2 w tych komórkach [35]. Zjawisko to potwierdza zwiększona zawartość MMP-2 mRNA w ścianie AAA [36]. Należy również podkreślić, że u pacjentów z AAA stwierdzono uogólniony wzrost syntezy MMP-2 w układzie naczyniowym [37]. Ponadto zawartość MMP-2 w ścianie AAA ulega podwyższeniu wraz z powiększaniem się jego średnicy, a stężenie enzymu jest wyższe w ścianie dużych niż w średnich i małych AAA [30].

Autorzy pracy stwierdzili także zwiększoną ekspresję MMP-9 w ścianie AAA. Może ona wynikać ze zwiększonej zawartości MMP-9 mRNA w ścianie AAA w porównaniu ze ścianą aorty prawidłowej [38, 39]. Zwiększona zawartość MMP-9 mRNA jest typowa dla AAA o średnicy 5–7 cm, w których jest ona większa niż w małych i dużych AAA [40]. Również stężenie MMP-9 jest najwyższe w ścianie średnich AAA [30].

Wykazana zwiększona ekspresja MMPs w ścianie AAA predysponuje do nasilonej degradacji kolagenu, co jest istotne w patogenezie choroby i może sprzyjać pęknięciu AAA [3]. Jednak na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy nie można wykluczyć innej ekspresji MMPs oraz stężenia IGF-I i jego białek wiążących na wcześniejszym etapie rozwoju choroby lub w ścianie pękniętego AAA, ponieważ badany materiał pochodził od pacjentów poddawanych planowym zabiegom chirurgicznym. Ponadto w wykonanych badaniach autorzy porównali

## References

- Collin J, Araujo L, Lindsell D (1987) Screening for abdominal aortic aneurysms. *Lancet*, 2: 736–737.
- Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der Does E et al (1995) Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol*, 142: 1291–1299.
- Alexander JJ (2004) The pathobiology of aortic aneurysms. *J Surg Res*, 117: 163–175.
- Dobrin PB, Mrkvicka R (1994) Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg*, 2: 484–488.
- Tilson MD (1988) Histochemistry of aortic elastin in patients with nonspecific abdominal aortic aneurysmal disease. *Arch Surg*, 123: 503–505.
- Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev*, 58: 397–460.
- Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT (1987) Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*, 65: 13–21.
- White JV, Haas K, Phillips S, Comerota AJ (1993) Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J Vasc Surg*, 17: 371–380.
- Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN et al (1989) Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 10: 365–373.
- Mesh CL, Baxter BT, Pearce WH, Chisholm RL, McGee GS, Yao JS (1992) Collagen and elastin gene expression in aortic aneurysms. *Surgery*, 112: 256–261.
- Sobolewski K, Wolańska M, Bańkowski E, Gacko M, Głowiński S (1995) Collagen, elastin and glycosaminoglycans in aortic aneurysms. *Acta Biochim Pol*, 42: 301–307.
- Fessler JH, Fessler LI (1978) Biosynthesis of procollagen. *Annu Rev Biochem*, 47: 129–162.
- Pałka J, Bańkowski E (1991) Regulacja metabolizmu kolagenu. *Postępy Osteoartrologii*, 3: 46–64.
- Marek B, Buntner B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B, Ostrowska Z, Świętochowska E (1996) Insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins (IGFBPs) in physiologic and pathologic states. *Pol Arch Med Wewn*, 96: 290–296.
- Daughaday WH (1990) The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology*, 127: 1–4.
- Hall K, Tally M (1989) The somatomedin-insulin-like growth factors. *J Intern Med*, 225: 47–54.
- Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE (2000) The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*, 21: 215–244.
- Clemmons DR (1998) Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol*, 140: 19–24.
- Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H et al (2001) Function of the growth hormone axis-insulin-like growth factors-insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver diseases. *Pol Merkur Lekarski*, 10: 185–190.
- Gacko M (1997) Metaloproteazy macierzy międzykomórkowej (MMPs). *Post Hig Med Dośw*, 51: 577–589.
- ścianę AAA chorych w wieku 65 lat ze ścianą aorty prawidłowej młodych dawców narządów. Dysproporcja wieku pomiędzy grupą badaną i kontrolną może powodować fizjologiczne różnice w ekspresji czynników regulujących metabolizm macierzy pozakomórkowej ściany naczyniowej [41]. Jednocześnie dobór grupy badanej i kontrolnej w tym samym wieku doprowadziłby przede wszystkim do porównania ściany AAA ze ścianą aorty brzusznej objętej procesem miażdżycowym, który jest powszechny w tej grupie wiekowej. Natomiast aorty kontrolne osób młodych pozbawione były zmian miażdżycowych, w których stwierdzono zmniejszoną ekspresję IGF-1 [42] oraz zwiększoną ekspresję IGFBP-1, IGFBP-3, MMP-2 i MMP-9 [43–45]. W związku z tym dobór grup pod względem wieku nie pozwoliłby na w pełni obiektywną ocenę badanych czynników regulujących metabolizm kolagenu w ścianie AAA.

## Wnioski

W ścianie AAA zmniejsza się zawartości oraz biodostępność IGF-1 w porównaniu ze ścianą aorty prawidłowej osób młodych. Może to utrudniać odtwarzanie kolagenu degradowanego przez metaloproteinazy (kolagenazę, żelatynazę), których zwiększona ekspresja występuje w ścianie AAA.

- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 14: 455–463.
- Kowalewski R, Sobolewski K, Małkowski A, Wolańska M, Gacko M (2005) Aktywność enzymów degradujących glikoaminoglikany w ścianie tętniaka aorty brzusznej. *Pol Przegl Chir* 2005, 77: 244–253.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, Rosenfeld RG (1997) Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12981–12986.
- Campbell JH, Campbell GR (1991) The macrophage as an initiator of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 18: 81–84.
- Kowalewski R, Sobolewski K, Małkowski A, Wolańska M, Gacko M (2006) Evaluation of enzymes involved in proteoglycan degradation in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Res*, 43: 95–100.
- Panek B, Gacko M, Pałka J (2004) Metalloproteinases, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in aortic



- aneurysm. *Int J Exp Pathol*, 85: 159–164.
29. Kadoglou NP, Liapis CD (2004) Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin*, 20: 419–432.
  30. Petersen E, Wagberg F, Angquist KA (2002) Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23: 153–157.
  31. Zarins CK, Runyon-Hass A, Zatina MA, Lu CT, Glagov S (1986) Increased collagenase activity in early aneurysmal dilatation. *J Vasc Surg*, 3: 238–248.
  32. Irizarry E, Newman KM, Gandhi RH et al (1993) Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res*, 54: 571–574.
  33. Clark IM, Cawston TE (1989) Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J*, 263: 201–206.
  34. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 110: 625–632.
  35. Goodall S, Porter KE, Bell PR, Thompson MM (2002) Enhanced invasive properties exhibited by smooth muscle cells are associated with elevated production of MMP-2 in patients with aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 24: 72–80.
  36. Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM (2000) Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 32: 575–583.
  37. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM (2001) Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation*, 104: 304–309.
  38. Yamashita A, Noma T, Nakazawa A et al (2001) Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 in abdominal aortic aneurysms. *World J Surg*, 25: 259–265.
  39. Elmore JR, Keister BF, Franklin DP, Youkey JR, Carey DJ (1998) Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*, 12: 221–228.
  40. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH (1997) Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*, 96: 2228–2232.
  41. Tovar A, Cesar DCF, Leta GC, Mourao PAS (1998) Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 604–614.
  42. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P (2001) Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 1777–1789.
  43. Chen F, Eriksson P, Hansson GK et al (2005) Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Int J Mol Med*, 15: 57–65.
  44. Grant MB, Wargovich TJ, Ellis EA et al (1996) Expression of IGF-I, IGF-I receptor and IGF binding proteins-1, -2, -3, -4 and -5 in human atherectomy specimens. *Regul Pept*, 67: 137–144.
  45. Li Z, Li L, Zielke HR et al (1996) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 148: 121–128.