

Streszczenie

TYTUŁ: WPLYW DŁUGOTRWALEJ TERAPII IMMUNOSUPRESYJNEJ NA KOMÓRKI NABLONKA JELIT U SZCZURA

WSTĘP

W ostatnich latach wzrasta liczba pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne, nie tylko po przeszczepieniu narządów, ale też w celu leczenia autoimmunologicznych chorób zapalnych, jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, nieswoiste choroby zapalne jelit, układowe zapalenie naczyń. Oprócz wymaganego i oczekiwanego efektu leczenia, stosowanie immunosupresji upośledza układ immunologiczny, zwiększając często ryzyko wystąpienia infekcji, nowotworów złośliwych, chorób układu krążenia, czy zahamowania czynności szpiku kostnego.

Główną rolą immunosupresantów przyjmowanych przez pacjentów jest obniżenie odporności organizmu, jako działanie prewencyjne, zapobiegające odrzuceniu przeszczepionego narządu. Mają one natomiast wiele udokumentowanych skutków ubocznych, w tym działanie nefrotoksyczne, czy hepatotoksyczne.

Jednym ze skutków immunoterapii jest indukcja szlaku zewnątrzpochodnego apoptozy, czyli w myśl definicji - zaprogramowanej i kontrolowanej genetycznie śmierci komórki. Zaburzenia procesu apoptozy komórek stanowią podłoże stanów patologicznych i mogą być ściśle związane z przewlekłą dysfunkcją narządów i / lub przyczyniają się do zmian morfologicznych.

Dane dotyczące wpływu leków immunosupresyjnych na morfologię wielu narządów, a także na apoptozę są ogólnie dostępne. Niewiele jednak wiadomo o efekcie włączenia schematów lekowych immunosupresji na integralność bariery nabłonkowej jelita, zwłaszcza cienkiego, gdzie następuje kontynuacja procesów trawienia oraz wchłanianie składników pokarmowych.

CEL

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu przewlekłego podawania szczurom leków immunosupresyjnych z grupy inhibitorów kalcyneuryny – cyklosporyny i takrolimusu,

skojarzonych z rapamycyną i glikokortykostteroidem, na morfologię i funkcję błony śluzowej jelita cienkiego.

Powyższy cel został zrealizowany poprzez:

1. Ocenę morfologiczną błony śluzowej, ze szczególnym uwzględnieniem nabłonka kosmków jelitowych;
2. Ocenę histomorfometryczną parametrów nabłonka kosmków jelitowych;
3. Ilościową analizę cyfrową dotyczącą:
 - (i) Oceny procesu apoptozy komórek nabłonkowych kosmków;
 - (ii) Immunoekspresji białek połączeń pomiędzy komórkami nabłonkowymi kosmka;
 - (iii) Oceny zawartości włókien kolagenowych typu I w kosmkach jelitowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzone zostały na materiale archiwalnym, przechowywanym w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w postaci bloczków parafinowych z zatopionymi fragmentami jelita cienkiego, pobranymi od 18. dojrzałych płciowo samców szczurów (14. tygodniowych) podczas doświadczenia, przeprowadzonego wcześniej.

Przed rozpoczęciem doświadczenia, wszystkie szczury zważono, a następnie podzielono na grupy – grupę kontrolną i 2 grupy doświadczalne, po 6 osobników w każdej grupie.

W czasie 6. miesięcy trwania doświadczenia, zwierzętom z grup doświadczalnych podawano panele złożone z trzech leków immunosupresyjnych według schematu, opartego na inhibitorach kalcyneuryny: TRG- takrolimus+rapamycyna+glikokortykosteroid oraz CRG- cyklosporyna A+rapamycyna+glikokortykosteroid, w poniżej wymienionych dawkach: (i) cyklosporyna A (Sandimmun-Neoral); C – 5 mg/kg m.c./dobę; (ii) takrolimus (Prograf); T – 4 mg/kg m.c./dobę; (iii) rapamycyna (Rapamune); R – 0,5 mg/kg m.c./dobę; (iv) prednizon (Encorton); G – 4 mg/kg m.c./dobę. Szczurom grupy kontrolnej nie podawano leków.

Z pozyskanych bloczków parafinowych skrojono skrawki o grubości 3-4 μm , które, wykorzystano do wykonania barwień histochemicznych, jak H-E, Mallory trichrome (barwnik trichromowy Mallory'ego), impregnacja srebrem oraz immunohistochemicznych – immunoekspresja aneksyny V i białek połączeń międzykomórkowych.

WYNIKI

1. W barwieniu przeglądowym H-E nie odnotowano uchwytanych zmian w ogólnej

- morfologii jelita pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi.
2. Wykazano zwiększoną zawartość włókien kolagenowych typu I w błonie śluzowej kosmków i blaszki właściwej jelita szczurów doświadczalnych, w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak akumulacja kolagenu typu I była wyższa w grupie CRG, niż w TRG.
 3. Największą zawartość kolagenu typu III (włókna retikulinowe srebrochłonne) odnotowano w błonie śluzowej jelita szczurów z grupy CRG, w porównaniu z grupami TRG i kontrolną.
 4. W ocenie histomorfometrycznej wykazano natomiast, że wysokość nabłonka jelita w obu grupach doświadczalnych uległa obniżeniu, w porównaniu z grupą kontrolną:
 5. Analiza immunоекспresji aneksyny V, wczesnego markera apoptozy komórek nabłonkowych, z wykorzystaniem cyfrowej analizy obrazu wykazała, że wartości wszystkich określanych parametrów (obwód, obszar zajęty przez produkt reakcji immunohistochemicznej, intensywność zabarwienia) różniły się pomiędzy grupami badanymi a kontrolną, a także pomiędzy grupami. Były najwyższe w komórkach nabłonka jelitowego szczurów grupy TRG. Różnice w intensywności zabarwienia zostały potwierdzone statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a CRG oraz pomiędzy grupami: TRG a CRG oraz TRG a grupą kontrolną.
 6. Analiza immunоекспresji białek uczestniczących w tworzeniu połączeń pomiędzy walcowatymi komórkami nabłonka jelitowego, wykazała różnice pomiędzy grupą kontrolną a badanymi grupami doświadczalnymi:
 - (1) Analiza immunоекспresji okludyny, białka połączeń zamykających wskazała różnice pomiędzy grupami we wszystkich trzech określanych parametrach. Różnice w intensywności zabarwienia zostały potwierdzone statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a CRG oraz pomiędzy grupami: TRG a CRG oraz TRG a grupą kontrolną.
 - (2) W analizie immunоекспresji E-kadheryny odnotowano najniższą intensywność zabarwienia produktu pozytywnej reakcji immunohistochemicznej w nabłonku jelitowym szczurów z grupy TRG, w porównaniu tego parametru z grupą CRG i kontrolną. Potwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą CRG i kontrolną oraz pomiędzy grupą TRG a CRG i TRG i kontrolną.
 - (3) Podobnie, w ocenie immunоекспresji winkuliny wykazano różnice w określanych parametrach. Potwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy intensywnością zabarwienia pomiędzy grupami: CRG i kontrolną oraz TRG a CRG i TRG a kontrolną.

WNIOSKI

1. Inhibitory kalcyneuryny wpływają negatywnie na wysokość nabłonka jelitowego;
2. Takrolimus w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidem wywiera proapoptotyczny efekt na komórki nabłonka błony śluzowej jelita.
3. Takrolimus w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidem wpływa destrukcyjnie na połączenia międzykomórkowe w nabłonku jelit;
4. Zwiększona zawartość włókien kolagenowych w błonie śluzowej jelita szczurów w grupach doświadczalnych, może wskazywać stymulację procesu włóknienia. Cyklosporyna, w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidem, powoduje największe zmiany zwłóknieniowe w obrębie błony śluzowej jelita szczurów.