

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE**



**Lek. Piotr Wiśniewski**

**WPLYW DŁUGOTRWAŁEJ TERAPII IMMUNOSUPRESYJNEJ  
NA KOMÓRKI NABŁONKA JELIT U SZCZURA**

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu*

*Dyscyplina nauki medyczne*

*Promotor: dr hab. n. med. Karolina Kędzierska-Kapuza*

*Promotor pomocniczy: dr n. med. Kamila Szumilas*

**Szczecin 2023 r.**

## Spis treści

1	Wstęp.....	5
1.1	Budowa morfologiczna jelita .....	5
1.1.1	Nabłonek.....	7
1.1.2	Komórki krypt jelitowych.....	9
1.1.3	Błaszka właściwa błony śluzowej .....	12
1.1.4	Błona podśluzowa, mięśniowa i surowicza .....	12
1.2	Połączenia pomiędzy komórkami nabłonka jelitowego.....	13
1.2.1	Połączenia zamykające lub ścisłe (TJ - Tight junctions; Occluding junctions).....	13
1.2.2	Połączenia zwierające (AJ; adherent/anchoring junctions) .....	14
1.2.3	Połączenia komunikacyjne lub jonowo-metaboliczne (GJ - Gap junctions, nexuses).....	15
1.3	Leki immunosupresyjne .....	17
1.3.1	Inhibitory kalcyneuryny (CNI) .....	18
1.3.2	Inhibitory rapamycyny (mTOR inhibitory) .....	19
1.3.3	Antymetaboliety: Inhibitory dehydrogenazy monofosforanu inozyny (IMPDH;IMDH) Inhibitory IMDH .....	20
1.3.4	Glikokortykosteroidy .....	20
2	Cel pracy .....	21
3	Materiał i metody .....	21
3.1	Przeprowadzenie doświadczenia.....	22
3.2	Badania morfologiczne .....	23
3.2.1	Przygotowanie preparatów do oceny morfologicznej .....	23
3.2.2	Histochemia .....	23
3.2.3	Analiza histomorfometryczna.....	24
3.2.4	Immunohistochemia (IHC).....	24
3.2.5	Opis procedury przeprowadzenia reakcji IHC .....	25
3.2.6	Analiza cyfrowa obrazu .....	26
3.2.7	Analiza statystyczna .....	26
4	Wyniki .....	26
4.1	Analiza preparatów barwionych technikami histochemicznymi .....	26
4.2	Ocena histomorfometryczna .....	29
4.3	Ilościowa analiza cyfrowa obrazu.....	30
4.3.1	Immunohistochemia .....	30
5	Dyskusja .....	41
6	Wnioski .....	47
7	Streszczenie .....	48
8	Piśmiennictwo .....	52

## WYKAZ STOSOWANYCH SKROTÓW / LIST OF ABBREVIATIONS

ISC	Komórki macierzyste jelita (ang. <i>Intestinal Stem Cells</i> )
EGF	Naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>Epidermal Growth Factor</i> )
APUD	Komórki neuroendokrynne przewodu pokarmowego (ang. <i>Amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i> )
DNES	Rozproszony układ neuroendokryny (ang. <i>Diffuse Neuroendocrine System</i> )
TJ	Połączenia ścisłe lub zamykające (ang. <i>Tight junctions / Occluding junctions</i> )
AJ	Połączenia zwierające lub przylegania (ang. <i>Adherens ;Aanchoring Jjunctions</i> )
GJ	Połączenia komunikacyjne lub jonowo-metaboliczne (ang. <i>Gap junctions</i> )
JAM	Cząsteczka adhezyjna połączeń (ang. <i>Junctional Adhesion Molecule</i> )
ZO	Białka ZO (ang. <i>zonula occludens</i> )
ZA	Obwódka przylegania / obwódka zwierająca ( <i>Zonula adherens / zonulae adherentes</i> )
MD	Plamka zwierająca / desmosom (ang. <i>Macula adherens / Desmosome</i> )
CAMs	Cząsteczki adhezji komórkowej (ang. <i>Cell Adhesion Molecules</i> )
E-kadheryna	Kadheryna nabłonkowa (and. <i>Epithelial cadherin</i> )
Dsg	Desmogleina (ang. <i>Desmoglein</i> )
Dsc	Desmokolina (ang. <i>Desmocollin</i> )
Cx	Koneksyna (ang. <i>Connexin</i> )
HD	Hemidesmosom (HD; ang. <i>Hemidesmosomes</i> )
FA	Przyczep ogniskowy (ang. <i>Focal adhesion</i> )
FC	Ognisko przylegania (ang. <i>Focal contact</i> )
CNI	Inhibitor kalcyneuryny (ang. <i>Calcineurin inhibitor</i> )
mTOR	ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i> )
CsA	Cyklosporyna A (ang. <i>Cyclosporine A</i> )
EGF	Naskórkowy Czynniki Wzrostu (ang. <i>Epidermal Growth Factor</i> )
IMPDH	Inhibitory dehydrogenazy monofosforanu inozyny (ang. <i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors</i> )
MMF	Mykofenolan mofetylu (ang. <i>Mycophenolate mofetil</i> )
TAC	Takrolimus (ang. <i>Tacrolimus</i> )
H-E	Hematoksylina-eozyna (ang. <i>Hematoxylin-eosin</i> )
PBS	Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. <i>Phosphate buffered saline</i> )
TBS	Sól fizjologiczna buforowana tris (ang. <i>Tris buffered saline</i> )
TRIS	Trisaminometan (ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> )

IHC Immunohistochemia (ang. *Immunohistochemistry*)  
CRG Cyklosporyna + Rapamycyna + Glikokortykosteroid (prednizon)  
TRG Takrolimus + Rapamycyna + Glikokortykosteroid (prednizon)

# 1 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 [1,2,3]. 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 [4].

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 [5,6], czy hepatotoksyczne [7,8,9].

Jednym ze skutków immunoterapii jest indukcja szlaku zewnątrzpochodnego apoptozy, czyli w myśl definicji - zaprogramowanej i kontrolowanej genetycznie śmierci komórki. Apoptoza jest procesem fizjologicznym i stanowi podstawę wielu procesów, między innymi odnowy populacji komórek, jest też istotnie ważna podczas rozwoju embrionalnego, w tym procesie organogenezy, ale także w późniejszych stadiach rozwoju organizmu [9]. Zaburzenia procesu apoptozy komórek stanowią podłoże stanów patologicznych i mogą być ściśle związane z przewlekłą dysfunkcją narządów i / lub przyczyniają się do zmian morfologicznych [9].

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. Ponadto, układ jelitowy jest jednym z większych skupień rozproszonej tkanki limfoidalnej, związanej z błoną śluzową jelita GALT (GALT ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) [10], który obejmuje grudki chłonne izolowane oraz kępki Peyera, limfocyty B, T w błonie śluzowej oraz limfocyty śród nabłonkowe. Skutki immunosupresji na układ jelitowy mogą obejmować m.in. upośledzenie funkcji regeneracyjnej, upośledzenie odpowiedzi immunologicznej oraz zmniejszenie integralności błony śluzowej [11].

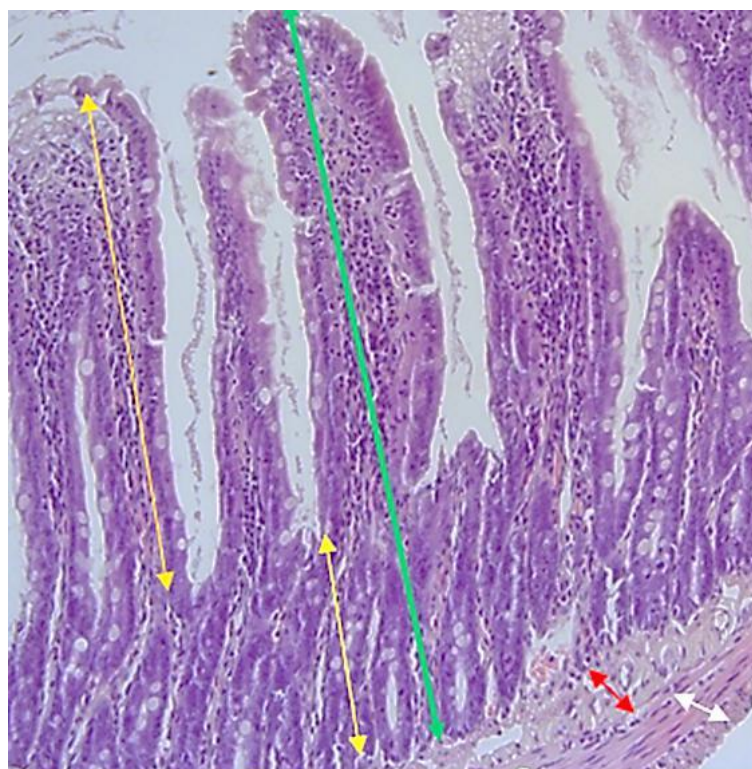
## 1.1 Budowa morfologiczna jelita

Na układ jelitowy składają się jelito cienkie, które anatomicznie dzieli się na trzy odcinki: dwunastnica, jelito czcze i jelito kręte oraz jelito grube, które dzieli się na części, jak kątnica

(obejmująca zastawkę krętniczno-kątniczą i wyrostek robaczkowy), okrężnica i odbytnica.

Ogólny schemat budowy ściany, w każdym odcinku jelita, jest podobny i obejmuje błonę śluzową, błonę podśluzową, błonę mięśniową. Największe zróżnicowanie dotyczy morfologii błony śluzowej.

Najbardziej wewnętrzną błoną jest błona śluzowa, na którą składa się nabłonek jednowarstwowy walcowaty, blaszka właściwa błony śluzowej oraz blaszka mięśniowa błony śluzowej. Ta ostatnia utworzona jest przez dwie warstwy komórek mięśniowych gładkich – wewnętrzną okrężną i zewnętrzną podłużną, oddzielające błonę śluzową od podśluzowej. Błona podśluzowa zbudowana jest z tkanki łącznej właściwej, bogatej we włókna kolagenowe oraz mniej liczne włókna elastyczne. Najbardziej zewnętrzną błoną jest błona mięśniowa, otoczona od zewnątrz błoną surowiczą bądź przydanką, w zależności od lokalizacji wewnątrz- lub pozaotrzewnowej jelita. Błonę mięśniową tworzą mięśnie gładkie, ułożone w zewnętrzną warstwę podłużną i wewnętrzną warstwę okrężną, pomiędzy którymi znajdują się ciała komórek zwojowych i pnie nerwowe splotu Auerbacha [12].



Rycina 1. Ściana jelita cienkiego (materiał własny). Zielona strzałka – błona śluzowa; pomarańczowa strzałka – kosmek jelitowy; żółta strzałka – blaszka właściwa błony śluzowej z kryptami jelitowymi; strzałka czerwona – błona podśluzowa; strzałka biała – błona mięśniowa.

W jelicie istnieją regionalne różnice, w przedstawionym powyżej, schemacie budowy ściany jelita. W jelicie cienkim, w celu zwiększenia powierzchni wchłaniania, tworzone są fałdy okrężne zarówno błony śluzowej, jak i podśluzowej, a błona śluzowa pokrywająca je zawiera

liczne kosmki jelitowe, natomiast blaszka właściwa - krypty jelitowe. W błonie podśluzowej dwunastnicy występują dodatkowo gruczoły cewkowo-pęcherzykowe (Brunnera). W jelicie grubym brak jest fałdów okrężnych oraz kosmków jelitowych, na całej długości błony śluzowej występują bardzo dobrze rozbudowane krypty jelitowe [13].

### 1.1.1 Nabłonek

Nabłonek pokrywający błonę śluzową jelita cienkiego, postrzegany jako jej fizyczna bariera ochronna, to nabłonek jednowarstwowy walcowaty, zbudowany z komórek regulujących wchłanianie składników odżywczych i płynów. Komórki tego nabłonka syntetyzują i uwalniają szereg substancji biologicznie czynnych i przeciwbakteryjnych [14].

Główną populację komórek stanowią enterocyty z licznymi mikrokosmkami, układającymi się w rąbek prążkowy. Pomędzy enterocytami występują komórki kubkowe oraz dendrytyczne komórki M. W nabłonku tym obecne są również śród nabłonkowe limfocyty T gamma / delta (Ryc.2). W dolnych partiach krypt jelitowych występują ponadto komórki macierzyste, komórki Panetha oraz komórki enteroendokrynne, uwalniające hormony tkankowe [15].



Rycina 2. Nabłonek kosmka jelitowego (materiał własny). Pomarańczowa strzałka – enterocyt; zielona strzałka – rąbek prążkowy; niebieska strzałka – komórka kubkowa; czerwona strzałka – limfocyt śród nabłonkowy

Enterocyty stanowią najliczniejszą (80 do 90% komórek nabłonka) populację komórek, a ze względu na swą funkcję, zwane też komórkami absorpcyjnymi. Są to wysoko wyspecjalizowane komórki kształtu walcowatego, z jądrem położonym bliżej podstawy

komórki. Ich cytoplazma wyposażona jest w organelle wewnątrzkomórkowe, takie jak aparat Golgiego, mitochondria, lizosomy i siateczka śródplazmatyczna, a w apikalnej części komórki występują liczne pęcherzyki pinocytarne. Apikalna powierzchnia enterocyta wyposażona jest natomiast w rąbek prążkowany, utworzony przez ściśle upakowane, zwykle tej samej wysokości mikrokosmki, a każdy enterocyt zawiera ich około 3000. Mikrokosmki zanurzone są w grubej warstwie glikokaliksu, który zawiera białka związane z błoną oraz enzymy uczestniczące w końcowych procesach trawienia niektórych cząsteczek. Mikrokosmki, wraz z kosmkami jelitowymi oraz fałdami okrężnymi, znacznie zwiększają powierzchnię wchłaniania [15].

Walcowatego kształtu komórki kubkowe są rozproszone pomiędzy enterocytami, a ich liczba wzrasta w kierunku dystalnym. Są to śródnabłonkowe gruczoły jednokomórkowe, produkujące i wydzielające śluz. Wykazują charakterystyczną morfologię. Część szczytowa komórki jest silnie rozszerzona (kształt kielicha), a na jej apikalnej powierzchni występują nieliczne i nieregularne pod względem wielkości i kształtu mikrokosmki. Część podstawna jest natomiast silnie zwężona i spoczywa na błonie podstawnej. W cytoplazmie tej części komórki zlokalizowane jest silnie spłaszczone jądro i inne organelle komórkowe, jak siateczka śródplazmatyczna, wolne rybosomy, aparat Golgiego, mitochondria, lizosomy. W rozszerzonej części komórki obecne są licznie zgromadzone pęcherzyki wydzielnicze, wypełnione śluzem / glikoproteinami [16]. Śluz stanowiący zawartość tych pęcherzyków zostaje uwolniony na powierzchnię nabłonka błony śluzowej jelita, tworząc grubą wyściółkę śluzową. Bierze ona udział w tworzeniu bariery śluzowej i odgrywa ważną rolę w ochronie nabłonka [17]. Śluz ten tworzą wydzielnicza mucyna 2 (MUC2), woda oraz sole nieorganiczne. Ponadto, powierzchnię apikalną pokrywa glikokaliks, w którym „zanurzone są” transbłonowe mucyny, jak MUC1 i MUC3, MUC12, MUC13 i MUC17 [16]. W jelicie cienkim śluz i peptydy / białka antybakteryjne pełnią fizyczną rolę ochronną, a także tworzą „zapórę” ograniczającą interakcje z drobnoustrojami, zmniejszając liczbę bakterii, które mogą dotrzeć do komórek nabłonka [18,16].

Komórki M różnią się morfologicznie oraz czynnościowo od enterocytów, a ich prekursorami, podobnie jak enterocytów, są komórki macierzyste zlokalizowane w kryptach jelitowych [19]. Występują w nabłonku jelita cienkiego, wyrostka robaczkowego, kątnicy, okrężnicy i odbytnicy, pokrywającym grudki chłonne skupione i samotne. Po raz pierwszy zidentyfikowano je w nabłonku wyrostka robaczkowego królika, w 1965 roku [20]. Dzięki obecności mikrofałdów na powierzchni apikalnej nazwano je od nazwy angielskiej komórkami M (ang. *Microfold cells*). Komórki te są wyspecjalizowanymi komórkami do ciągłego pobierania i przenoszenia ze światła jelita patogenów i drobnoustrojów, drogą transcytozy przez nabłonek do tkanki limfoidalnej - GALT; inicjując obronę

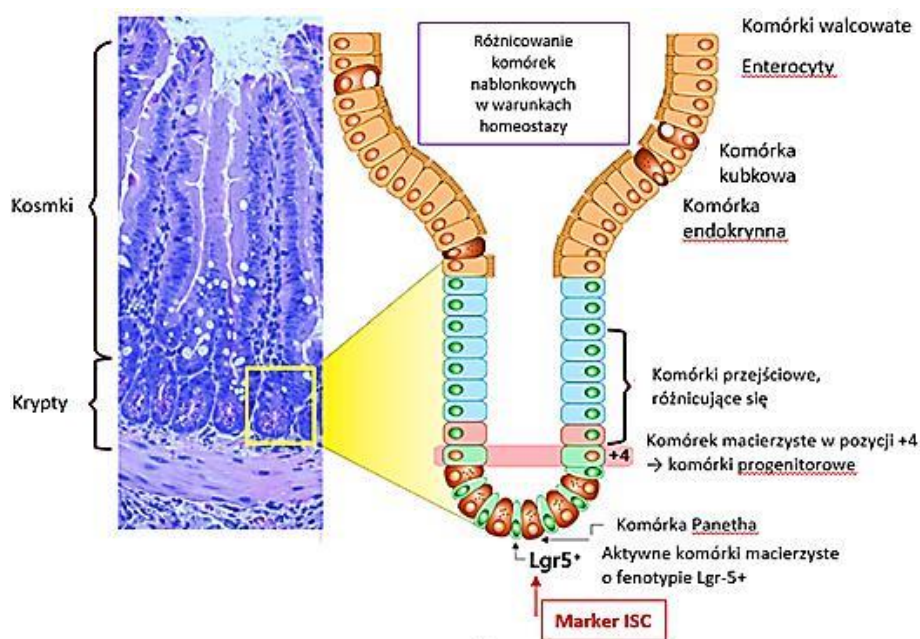


immunologiczną błony śluzowej jelita [21]. Komórki M nabłonka jelitowego uważa się za unikalne i nie powinno się ich postrzegać jako klasycznych komórek dendrytycznych prezentujących antygen, ale jako komórki dostarczające antygen, wykorzystując wyspecjalizowane mechanizmy, umożliwiające transcytozę. Anatomia komórek M jest optymalna do wychwytywania inwazyjnych drobnoustrojów tam, gdzie stanowią one największe zagrożenie. Przy deficycie komórek M, z braku skutecznego monitorowania antygenów w świetle jelita, odpowiedź immunologiczna błony śluzowej byłaby zdecydowanie osłabiona [22].

Limfocyty T gamma / delta ( $T\gamma\delta$ ) rezydujące w nabłonku jelita, należą do subpopulacji limfocytów T, które stanowią od 1 do 5% wszystkich krążących limfocytów [23]. Jak wspomniano powyżej, zwane są też limfocytami śródnabłonkowymi ( $\gamma\delta$  *intraepithelial lymphocytes*) [24]. Ich obecność pomiędzy komórkami nabłonka stanowi pierwszą linię obrony przed antygenami środowiskowymi [25,26].

### 1.1.2 Komórki krypt jelitowych

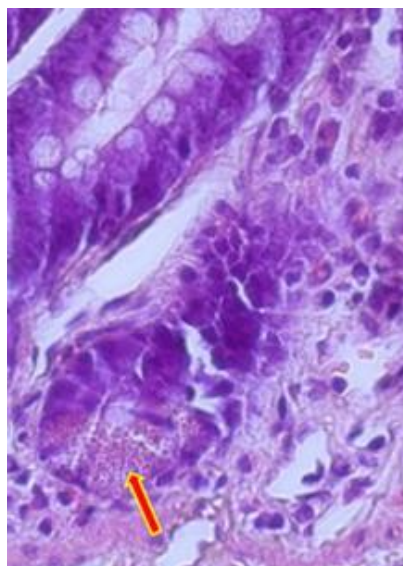
Komórki macierzyste jelita (ISC; *Intestinal Stem Cells*) zlokalizowane są w dolnej części krypt jelitowych, a do ich identyfikacji wykorzystuje się właściwości tych komórek oraz ich specyficzne markery powierzchniowe. Komórki te określa się mianem walcowate komórki Lgr5+ dolnej części krypt, ze względu na ich lokalizację oraz swoistą ekspresję receptora Lgr5 (bogaty w leucynę receptor 5 sprzężony z białkiem G). Jest on receptorem dla R-spondyny, białka odgrywającego ważną rolę w proliferacji, różnicowaniu i śmierci komórek [27]. Dzięki licznym podziałom mitotycznym ISC (komórki Lgr5+ pozostają w ciągłym cyklu i dzielą się średnio co 21 i pół godziny) powstają komórki progenitorowe, które różnicują się w komórki krypt oraz komórki nabłonka kosmków, utrzymując ich homeostazę. Komórki nabłonka ulegają bowiem odbudowie co 3–5 dni [28], dlatego konieczne jest zachowanie równowagi pomiędzy proliferacją a różnicowaniem komórek, w celu utrzymania właściwych proporcji pomiędzy wszystkimi typami komórek zróżnicowanych [29].



Schemat 1. Nisza komórek macierzystych jelita cienkiego (Hong SN, Dunn JC, Stelzner M, Martín MG. Concise 2017 – zmieniony)

Komórki macierzyste leżą wciśnięte pomiędzy komórkami Panetha, które uwalniają szereg czynników, stymulujących proliferację i ich utrzymanie. Należą do nich między innymi naskórkowy czynnik wzrostu (EGF; *Epidermal Growth Factor*), który jest niezbędnym czynnikiem proliferacji komórek macierzystych, czy Wnt - białka, odgrywającego rolę w regulacji ekspresji Lgr w komórkach macierzystych [30].

Piramidalnego kształtu komórki Panetha zlokalizowane są w pobliżu dna oraz w dnie krypt jelitowych jelita cienkiego i stanowią od 3 do 7% komórek nabłonka [31]. Charakteryzują się obecnością kwasochłonnych ziarnistości, produktów sekrecyjnych komórek, w których obecne są białka antybakteryjne, jak lizozym, białka z grupy defensyn oraz kryptydyn [32]. Komórki te odgrywają bardzo ważną rolę w utrzymaniu homeostazy immunologicznej, jak regulacja składu mikrobiomu jelita, obrona przed patogenami jelitowymi [33]. Ponadto, komórki Panetha wspierają funkcję komórek macierzystych nabłonka krypt, stanowiąc ważny element niszy komórek macierzystych [34]. Badania ostatnich lat wskazały, że w warunkach patologicznych, jak uszkodzenie nabłonka jelitowego, komórki Panetha mogą ulec odróżnicowaniu i nabyć cech charakterystycznych dla komórek macierzystych, zdolnych do proliferacji. Plastyczność komórek Panetha, pozwala tym komórkom na udział w procesach regeneracji jelita [35].



Rycina 3. Komórki Panetha w dnie krypty jelitowej

Komórki enteroendokrynne są rozproszone w przewodzie pokarmowym, a w jelicie cienkim stanowią około 1% populacji komórek nabłonkowych [36]. Nie są widoczne w mikroskopie świetlnym w preparatach przeglądowych (H-E), ale można je uwidocznic po zastosowaniu metod immunohistochemicznych, z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciw produktom sekrecyjnym tych komórek. Stąd, ich nazwy pochodzą najczęściej od pierwszej litery hormonu przez nie produkowanego (komórki S – sekretyna; komórki Mo – motylina; komórki N – neurotensyna; komórki D - somatostatyna). W transmisyjnym mikroskopie elektronowym widoczne są w tkance poddanej działaniu soli chromu lub srebra. Podobnie jak inne komórki nabłonka, wywodzą się one z jelitowych komórek macierzystych, zlokalizowanych w dnie krypt jelitowych. Należą w przewodzie do „typu otwartego” komórek enteroendokrynych, nie mają kontaktu ze światłem jelita i nie są aktywowane przez bodźce pochodzenia zewnętrznego. Są to komórki kształtu piramidalnego, na wolnej powierzchni zawierające mikrokosmki, natomiast w części przypoławnej liczne ziarna wydzielnicze. Na powierzchni apikalnej ekspresji podlegają receptory, dzięki którym komórki rozpoznają składniki odżywcze i metabolity, a w odpowiedzi na te bodźce wydzielają hormony tkankowe oddziaływania parakrynnego, endokrynnego lub nerwowego [37]. Komórki enteroendokrynne zaliczane są do dużej grupy komórek układu APUD (ang. *Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*), rozsianych po całym organizmie, stąd też ich inna nomenklatura – DNES (ang. *Diffuse Neuroendocrine System*). Komórki enteroendokrynne produkują co najmniej 20 różnych hormonów peptydowych, a ich ekspresja wykazuje lokalne i regionalne różnice na całej długości przewodu pokarmowego, co podkreśla znaczną ich heterogenność [38]. Komórki enteroendokrynne spełniają bardzo ważną rolę w przewodzie pokarmowym. Poprzez produkcję i uwalnianie hormonów jelitowych, odgrywają kluczową rolę

w kontroli funkcji jelit, koordynacji trawienia i wchłaniania pokarmu, regulują również motorykę jelit [39].

Pomimo obecności różnych typów komórek, główną funkcją krypt jelitowych jest ciągła produkcja i odnowa komórek nabłonkowych błony śluzowej jelita.

### 1.1.3 **Błaszka właściwa błony śluzowej**

Powierzchnia błony śluzowej każdego odcinka jelita cienkiego, formuje palczaste struktury zwane kosmkami jelitowymi, które - jak wspomniane powyżej - zwiększają powierzchnię wchłaniania. Zrąb kosmków jelitowych tworzy tkanka łączna luźna, z licznymi elementami tkanki limfoidalnej rozproszonej, która jest tkanką blaszki właściwej błony śluzowej. Występują tu pojedyncze miocyty gładkie, naczynia włosowate, a w centrum kosmka znajduje się naczynie limfatyczne. Pomędzy kosmkami znajdują się ujścia gruczołów jelitowych, zwanych też kryptami jelitowymi (Lieberkühna), obecnymi w blaszce właściwej błony śluzowej. Zrąb blaszki właściwej buduje tkanka łączna luźna oraz limfoidalna z grudkami chłonnymi izolowanymi lub skupionymi (kępki Peyera), obecnymi w jelicie krętym. Krypty jelitowe, oprócz komórek obecnych w nabłonku pokrywającym – enterocyty, komórki kubkowe, zawierają jeszcze inne komórki, w tym komórki macierzyste. Błonę śluzową od podśluzowej oddziela blaszka mięśniowa błony śluzowej, utworzona z dwóch cienkich pokładów komórek mięśniowych gładkich, o przebiegu okrężnym (wewnętrzna) i podłużnym (zewnętrzna).

### 1.1.4 **Błona podśluzowa, mięśniowa i surowicza**

Zrąb błony podśluzowej tworzy tkanka łączna zwarta, z agregatami komórek tłuszczowych, a jak wspomniano powyżej, w dwunastnicy występują gruczoły cewkowo-pęcherzykowe zwane gruczołami Brunnera. Gruczoły te produkują śluz o odczynie zasadowym, zobojętniającym treść pokarmową, przesuwaną z części odźwiernikowej żołądka [40].

Błona mięśniowa jest dobrze rozwinięta i zbudowana z dwóch warstw mięśni gładkich – warstwy wewnętrznej o przebiegu okrężnym i warstwy zewnętrznej mięśni o przebiegu podłużnym.

Błona surowicza jest wyścielona nabłonkiem jednowarstwowym płaskim (mezotelium), pokrywa od zewnątrz ścianę jelita cienkiego, położonego wewnątrzotrzewnowo.

Podstawową funkcją jelita cienkiego jest przeprowadzenie procesu wchłaniania oraz pasażu strawionego pokarmu do dalszych odcinków przewodu pokarmowego. Cechy morfologiczne, jak obecność licznych naczyń krwionośnych oraz limfatycznych, umożliwiają aktywny transport rozpuszczalnych związków do krążenia, lipidów natomiast bezpośrednio

do naczyń limfatycznych. Unerwienie ściany jelita cienkiego oraz obecność komórek enteroendokrynych układu DNES, regulują perystaltykę, umożliwiając pasaż pokarmu [40].

## 1.2 Połączenia pomiędzy komórkami nabłonka jelitowego

Nabłonek jednowarstwowy walcowaty z rąbkami prążkowanym, wyściełający błonę śluzową jelita, stanowi barierę oddzielającą zawartość jego światła od leżących poniżej tkanek [41,42].

Strukturalna spójność nabłonka oraz jego właściwości barierowe utrzymywane są przez przyleganie do siebie komórek nabłonkowych, uszczelniające przestrzeń międzykomórkową oraz ich przyłączanie do błony podstawnej. Komórki nabłonka jelitowego tworzą kompleksy połączeń międzykomórkowych, które obejmują: połączenia ścisłe lub zamykające (TJ - *Tight junctions* / *Occluding junctions*), połączenia zwierające lub przylegania (AJ - *Adherens junction*): obwódka zwierająca, desmosom i hemidesmosom oraz połączenia komunikacyjne lub jonowo-metaboliczne (GJ - *Gap junctions*) [41,43].

### 1.2.1 Połączenia zamykające lub ścisłe (TJ - *Tight junctions*; *Occluding junctions*)

Za tworzenie i utrzymanie nieprzepuszczalnej bariery odpowiedzialne są połączenia zamykające tworzone poprzez fuzję białek integralnych błon komórkowych na szczytowo-bocznych powierzchniach dwóch sąsiadujących ze sobą enterocytów, obejmując cały obwód, tworząc tzw. obwódkę zamykającą (*zonula occludens*). Połączenia ścisłe nie są widoczne w mikroskopie świetlnym ani ich budowa nie uwidacznia się w mikroskopie elektronowym transmisyjnym. Dopiero zastosowanie mikroskopii elektronowej z wykorzystaniem metody zamrażania i łamania pozwoliło na uwidocznienie złożonej trójwymiarowej struktury połączenia. W tworzeniu połączenia zamykającego uczestniczą kompleksy białek przezbłonowych - okludyn i kładyn, należących do grupy białek adhezyjnych zwanych kadherynami [43,44].

Dodatkowo, w stabilizacji tego połączenia współuczestniczą jeszcze inne białka, jak cząsteczka adhezyjna połączeń (JAM; *Junctional Adhesion Molecule*), białka ZO (*zonula occludens*) [45]. Okludyny i kładyny tworzą kompleksy kładyna-kładyna i okludyna-okludyna pomiędzy sąsiadującymi ze sobą komórkami, układające się w trzy pasma [46]. Białka JAM, należące do nadrodziny immunoglobulin, dzięki domenom zewnątrzkomórkowym pośredniczą w adhezji komórka-komórka. Ich domeny cytoplazmatyczne łączą się natomiast z zestawem cząsteczek adaptorowych, ZO-1, ZO-2 i ZO-3. Białka *zonula occludens* (ZO-1, 2 i 3), działają jako mostki łączące integralne białka błonowe z filamentami aktynowymi



(F aktyną) cytoszkieletu enterocytów [47,48].

Dzięki swojej złożonej strukturze, połączenia zamykające przyczyniają się do uszczelnienia bariery nabłonkowej, zapewniają właściwą funkcję błony komórkowej, uniemożliwiając przemieszczanie się białek błonowych. Regulują też procesy proliferacji oraz migracji komórek.

### 1.2.2 Połączenia zwierające (AJ; adherent/anchoring junctions)

Połączenia zwierające inicjują i utrzymują adhezję pomiędzy komórkami sąsiadującymi ze sobą, wykorzystując białka, które wiążą się z cytoszkieletem komórki, utrzymując jego organizację, stanowią też „centrum” sygnalizacji komórkowej i regulacji transkrypcji genów [49]. Wyróżnia się dwa typy połączeń zwierających komórka-komórka, zlokalizowane na ich powierzchni lateralnej:

- (i) Obwódka przylegania / obwódka zwierająca (ZA; *zonula adherens* / *zonulae adherentes*), której białka wchodzi w interakcję z filamentami aktynowymi;
- (ii) Plamka zwierająca / desmosom (MD; *macula adherens* / *desmosome*), gdzie białka wchodzi w interakcję z filamentami pośrednimi.

W nabłonku jelitowym obwódka zwierająca leży bezpośrednio pod obwódką zamykającą, a w tym typie połączenia adhezję zapewniają transbłonowe białka, znane jako cząsteczki adhezji komórkowej (CAMs: *cell adhesion molecules*). W tworzeniu połączeń zwierających uczestniczą kadheryny, których aktywność zależna jest od jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Ze względu na występowanie, kadherynę tę określa się mianem nabłonkowej: E-kadheryna (*Epithelial cadherin*). Cząsteczka kadheryny zbudowana jest z domeny wewnątrzkomórkowej, wewnątrzbłonowej oraz z 5. powtarzających się domen pozakomórkowych. Te domeny wiążą się z domenami pozakomórkowymi E-kadheryny sąsiadującej komórki [47]. Domena cytoplazmatyczna E-kadheryny łączy się natomiast z białkami cytoplazmatycznymi –  $\alpha$ -kateniną i  $\beta$ -kateniną, tworząc trójskładnikowy kompleks, przy czym  $\alpha$ -katenina łączy ten kompleks z F-aktyną filamentów aktynowych [13,47]. Dodatkowo,  $\alpha$ -katenina rekrutuje inne jeszcze białka wiążące aktynę w tym połączeniu takie, jak winkulina,  $\alpha$ -aktynina, formina 1 i afadyna [50]. To mechaniczne połączenie wzmacniane jest dodatkowo przez nektynę, transbłonową,  $\text{Ca}^{2+}$ -niezależną immunoglobulino-podobną CAM. Nektyna, poprzez afadynę wiążącą  $\alpha$ -kateninę oraz ZO-1, przyłącza się również do filamentów aktynowych [51,47].

Plamka zwierająca / desmosom jest połączeniem o kształcie zbliżonym do dysku, często przyrównywane do „spawu punktowego”, który łączy się z identyczną strukturą na powierzchni bocznej sąsiadujące komórki. Nie tworzy zatem pasma wokół komórki nabłonkowej. W tworzeniu połączeń typu desmosom uczestniczą podobnie, jak w AJ, transbłonowe białka

należące do kadheryn, są jednak większe i wykazują jednak cechy różniące je od klasycznych kadheryn [52]. Występują dwie podklasy kadheryn desmosomalnych, desmogleina (Dsgs; ang. *desmoglein*) oraz desmokolina (Dscs; ang. *desmocollin*), z których obie są niezbędne dla prawidłowej struktury i funkcji desmosomów [53].

Zarówno desmogleina, jak i desmokolina podobnie, jak inne kadheryny, zawierają pięć powtórzeń pozakomórkowych domen kadheryn. Domeny cytoplazmatyczne desmogleiny i desmoplakiny łączą się z białkami plakoglobina i plakofilina, białkami podobnymi do katenin. Plakoglobina wiąże się bezpośrednio z Dsg i Dsc, co stabilizuje je w błonie komórkowej, desmoplakina natomiast wiąże się z białkami filamentów pośrednich keratynowych (cytokeratynowych; tonofilamentów). Z kolei plakofilina, reguluje siłę oddziaływań pomiędzy desmoplakiną a filamentami pośrednimi. Obecność w desmosomach filamentów keratynowych nadaje wytrzymałość mechaniczną, stąd połączenia typu desmosom zapewniają trwałe przyleganie komórek i tym samym utrzymują integralność nabłonka [47,53].

### 1.2.3 Połączenia komunikacyjne lub jonowo-metaboliczne (*GJ - Gap junctions, nexuses*)

Połączenia komunikacyjne są jedynymi strukturami pomiędzy komórkami nabłonkowymi, nie uczestniczącymi w ich połączeniu, ale których funkcją jest umożliwienie bezpośredniej selektywnej wymiany jonów i cząsteczek o małej masie oraz ułatwienie wzajemnego kontaktowania się komórek pomiędzy sobą. Połączenia te mają kluczowe znaczenie dla koordynacji funkcji komórek, umożliwiając synchroniczną odpowiedź na ligand [54]. Połączenia szczelinowe są przy udziale przezbłonowych białek należących do rodziny koneksyn (Cxs; *connexins*), a w komórkach człowieka ekspresji podlega 21 różnych koneksyn, przy czym każda jest kodowana przez inny gen. Najlepiej zbadaną, ze względu na jej powszechną ekspresję w wielu typach komórek, w tym nabłonkowych, jest koneksyna-43 (Cx43) [55,56]. Koneksyny połączeń komunikacyjnych, tworzą kompleksy o heksagonalnym układzie zwane koneksonami, a każdy z nich zawiera hydrofilowy por o średnicy 1,5 nm. Koneksyny błony komórkowej jednej komórki nabłonkowej, łączą się z koneksonami błony komórki przylegającej, zatem każde takie połączenie utworzone jest przez 12 podjednostek koneksyn. Każde z połączeń typu nekusus składa się z bardzo wielu dziesiątek bądź setek par koneksonów [55].

Komórki nabłonkowe przyłączają się do błony podstawnej i elementów substancji międzykomórkowej (tkanki łącznej, leżącej poniżej nabłonka), dzięki połączeniom zwierającym, co jest niezbędne dla zapewnienia morfologicznej integralności i funkcji wielu tkanek [57]. Funkcję tę pełnią hemidesmosomy (HD; ang. *Hemidesmosomes*) oraz przyczepy ogniskowe (FA; ang. *Focal adhesion*) lub ogniska przylegania (FC; ang. *Focal contact*), obecne przy powierzchni przypodstawnej błony komórkowej. Hemidesmosomy jednowarstwowego nabłonka jelitowego

zaliczane są typu II, gdzie białkami transbłonowymi są integryna  $\alpha 6\beta 4$  i plektyna [58]. Integryna  $\alpha 6\beta 4$ , główne białko tego połączenia, zapoczątkowuje tworzenie hemidesmosomu, poprzez interakcję z plektyną, łączącą się z cytoplazmatycznymi filamentami keratynowymi [59]. Od strony błony podstawnej, integryna  $\alpha 6\beta 4$  wiąże się z lamininami, głównie z lamininą-332 oraz z kolagenem typu IV [60,61,62].

Przyczepy ogniskowe są bardziej liczne niż desmosomy i podobnie jak te ostatnie zawierają transbłonowe integryny, które łączą długie wiązki filamentów aktynowych, tzw. *stress fibers* komórki nabłonkowej do błony podstawnej [63]. Integryny tworzące to połączenie skupiają się w obszarach, gdzie tworzy się połączenie. Od strony cytoplazmatycznej wchodzi w interakcję z białkami wiążącymi aktynę -  $\alpha$ -aktynina, winkulina, talina, paksylina oraz z innymi białkami, jak kinaza ogniskowo-adhezyjna (ang. *focal adhesion kinase*) lub kinaza tyrozynowa (ang. *tyrosine kinase*). Od strony pozakomórkowej integryny wiążą się z glikoproteinami substancji międzykomórkowej, głównie z lamininą i fibronektyną. FA działają zarówno jako mechanoreceptory, jak i miejsca przenoszenia nacisków. Wyczuwają i reagują zarówno na oddziaływanie wewnętrzne, jak i zewnątrzkomórkowe, a także odgrywają ważną rolę w wielu procesach komórkowych, które są stymulowane przez mechanotransdukcję, w tym adhezję komórek, spolaryzowaną migrację i różnicowanie [64].

Połączenia ZA i MD, jako kontakt adhezyjny, utrzymuje mechaniczną integralność bariery nabłonkowej [65]. Zaburzenia w ekspresji białek, tworzących wszystkie typy połączeń pomiędzy komórkami nabłonka jelitowego, upośledzają funkcję komórek nabłonkowych jelit i prowadzić mogą do zmiany przepuszczalności bariery jelitowej [65].

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że wzrost przepuszczalności jelit odgrywa rolę patogenną w wielu chorobach [13]. Udokumentowano znaczenie połączeń zamykających pomiędzy komórkami nabłonka w chorobach wywoływanych przez różne patogeny [66,67], szczególnie podczas przewlekłych stadiów zakażenia małpim i ludzkim wirusem niedoboru odporności (SIV / HIV) [68]. Dotyczą one też chorób o podłożu immunologicznym takich, jak choroba zapalna jelit (IBD) [69], czy celiakia [70].

W nieswoistym zapaleniu jelit zwiększona przepuszczalność jelit z powodu wadliwego TJ, która przyczynia się między innymi do biegunki [71]. Pomimo licznych badań, podstawowe mechanizmy patofizjologiczne są nadal niejasne. W przypadku zakażenia SIV / HIV, jako związek przyczynowy z przewlekłą aktywacją immunologiczną związaną z postępem choroby zaproponowano translokację produktów drobnoustrojowych z przewodu pokarmowego do krążenia wrotnego i ogólnoustrojowego [72]. Translokacja drobnoustrojów jest wynikiem serii zdarzeń immunopatologicznych w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, w tym wczesnego i ciężkiego ubytku limfocytów T CD4; hiperaktywacja immunologiczna błony



śluzowej; uszkodzenie bariery nabłonkowej jelit z apoptozą enterocytów i przerwaniem TJ oraz osłabieniem jakości mikrobiomu jelitowego [72]. Ponadto, wznowiono zainteresowanie rolą przepuszczalności jelitowej i TJ w patogenezie toksyczności jelitowej, indukowanej chemioterapią [73]. Jak wspomniano wcześniej, skutki immunoterapii mogą obejmować zaburzenia integralności nabłonka jelitowego, poprzez upośledzenie połączeń zamykających [74].

### 1.3 Leki immunosupresyjne

Osoby po przeszczepieniu ukrwionego narządu mięszowego, w celu utrzymania graftu, ratowania i przedłużenia życia, zostają poddane przewlekłemu leczeniu z wykorzystaniem leków immunosupresyjnych.

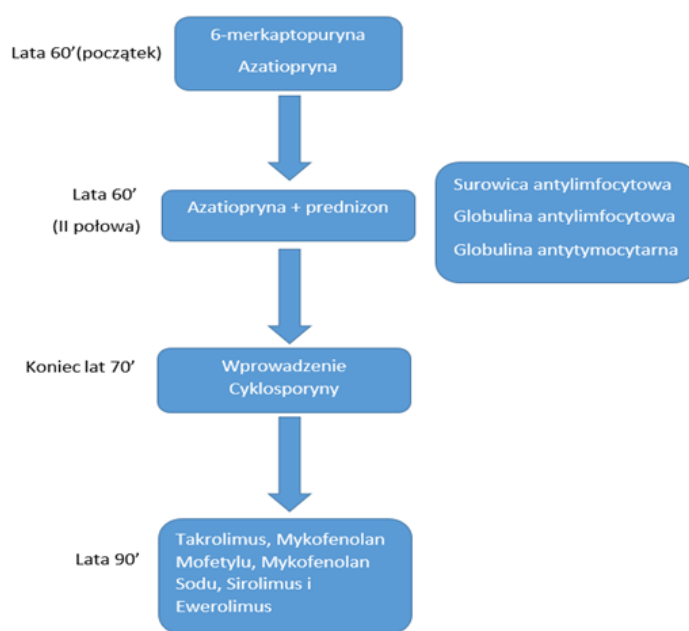
Definiując immunosupresję mówimy o stosowanych lekach lub schematach ich podawania, które zmniejszają aktywność układu odpornościowego. Dlatego, celowo indukowana immunosupresja jest wykonywana w celu zapobiegania odrzuceniu przez organizm przeszczepionego narządu [75].

Dodatkowo, jest ona stosowana do leczenia choroby przeszczep przeciw gospodarzowi, po przeszczepieniu szpiku kostnego lub do leczenia chorób autoimmunologicznych takich, jak toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów, zespół Sjögrena lub choroba Crohna. Zwykle odbywa się to za pomocą leków, ale może obejmować zabieg (splenektomię), plazmaferezę lub radioterapię [76].

Historycznie, początkowo procedurę przeszczepienia przeprowadzano bez immunosupresji. Z uwagi na brak farmakoterpii kończyły się one niepowodzeniem. Dopiero w 1954 r. dokonano pierwszego udanego przeszczepienia między bliźniętami jednojajowymi. Wtedy to dowiedziono wcześniejszej koncepcji istotnego znaczenia odpowiedzi immunologicznej, w odpowiedzi na alloprzeszczep. Wykazano przede wszystkim, że pacjenci umierający z powodu niewydolności nerek mogą zostać przywrócić do normalnego życia po udanym przeszczepieniu narządu. Na początku lat 60. w farmakoterpii immunosupresji stosowano 6-merkaptopurynę, a następnie pokrewny jej związek, azatioprynę [77].

Wprowadzenie tych leków umożliwiło, z niskim odsetkiem powodzenia, przeszczepienia narządowe od nieidentycznych dawców. Wkrótce potem, przez prawie 2 dekady, schemat immunosupresyjny obejmował kombinację dwóch leków - azatiopryny z prednizonem oraz stosowanie wysokich dawek steroidów. W połowie lat 60. zaczęto stosować preparaty poliklonalnych przeciwciał antylimfocytarnych (surowica antylimfocytowa, globulina antylimfocytowa i globulina antytymocytarna), które wykazywały przydatność w zapobieganiu

i hamowaniu odrzucania przeszczepu, co doprowadziło do ich stosowania od tego czasu. Pod koniec lat 70. odkryto, że cyklosporyna jest silnym i skutecznym lekiem immunosupresyjnym. Szybko zastąpiła lub też została dodana do poprzednich schematów farmakologicznych, pozostając podstawą schematów immunosupresyjnych. Opracowano następnie i zastosowano w transplantacji leki, m.in. takrolimus, mykofenolan mofetylu, mykofenolan sodu, sirolimus i ewerolimus, które są stosowane do dziś (rycina 1) [78].



Schemat 2. Schemat przedstawiający historyczne ujęcie wprowadzania leków immunosupresyjnych w terapii pacjentów po przeszczepieniu nerki.

Farmakologiczne środki immunosupresyjne, zaliczane do jednej z klas leków stosowanych u pacjentów wymagających immunosupresji, działają poprzez hamowanie uwalniania cytokin lub hamowanie cyklu komórkowego.

Wśród leków immunosupresyjnych wyróżnia się następujące grupy: (i) glikokortykosteroidy, w tym prednizon; (ii) inhibitory kalcyneuryny (CNI) takie, jak cyklosporyna i takrolimus; (iii) inhibitory rapamycyny (mTOR inhibitory), w tym sirolimus (rapamycyna); (iv) inhibitory enzymu dehydrogenazy monofosforanu inozyne (inhibitory IMDH) takie, jak mykofenolan mofetylu [79,80].

### 1.3.1 Inhibitory kalcyneuryny (CNI)

Do inhibitorów kalcyneuryny należą dwa dostępne leki cyklosporyna A (CsA) i takrolimus (Tac). Działanie cyklosporyny A opiera się na jej silnym działaniu immunomodulującym i immunosupresyjnym, polegającym na blokowaniu aktywacji

limfocytów, szczególnie limfocytów T. W cytozolu limfocytów, CsA wiąże się z białkiem cyklofiliną (zwanym również immunofiliną), a powstanie tego kompleksu skutkuje wiązaniem i hamowaniem aktywności kalcyneuryny, fosfatazy zależnej od jonów wapnia i hamuje jej aktywność. Zahamowanie aktywności kalcyneuryny blokuje transkrypcję genów dla cytokin, w tym IL-2, co zapobiega proliferacji limfocytów T, a także uniemożliwia tym komórkom przeprowadzenie odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo, CsA poprzez oddziaływanie na mitochondria i hamowanie uwalniania cytochromu C, przyspiesza proces apoptozy tych komórek [81].

Takrolimus natomiast, wywiera swoje działanie immunosupresyjne poprzez wiązanie się z cytozolowym białkiem receptorowym wiążącym takrolimus 12 (FKBP12 ; ang. FK506 *binding protein 12*), należącym do rodziny immunofilin. Powstały kompleks wiąże się z kalcyneuryną, hamując jej aktywność enzymatyczną i zapobiega aktywacji i proliferacji limfocytów T, poprzez zablokowanie ekspresji i transkrypcji genów dla wybranych cytokin, m.in. IL-2 [82,81].

Wykazano również, że inhibitory kalcyneuryny nie tylko hamują produkcję cytokin przez limfocyty T CD4+, ale także zapobiegają różnicowaniu się naiwnych komórek T (CD4+) w komórki pamięci immunologicznej, produkujące cytokiny [83].

Odkrycie inhibitorów kalcyneuryny i włączenie ich w schematy leczenia immunosupresyjnego, znacząco poprawiło komfort życia pacjentów, po przeszczepieniu narządu litego. Takrolimus okazał się być lekiem o działaniu 100-krotnie silniejszym, niż cyklosporyna, a przede wszystkim skutecznie zmniejszającym możliwość ostrego odrzucania komórkowego, czy odrzucania steroidoopornego [84,85].

### 1.3.2 Inhibitory rapamycyny (mTOR inhibitory)

Rapamycyna (sirolimus) jest naturalnym antybiotykiem, któremu przypisuje się właściwości antyproliferacyjne, antynowotworowe i immunosupresyjne [86]. Kinaza serynowo/treoninowa mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) uczestniczy w regulacji proliferacji komórek. Do tej grupy leków zalicza się również ewerolimus, ze strukturalnym podobieństwem do takrolimusu. Immunosupresyjny mechanizm działania inhibitorów rapamycyny oparty jest na zdolności wiązania się z cytozolowym białkiem regulatorowym FKBP12. Utworzony kompleks FKBP12-RAPA przyłącza się do domeny wiążącej kinazy mTOR (ang. FRB: *FKBP12-rapamycin binding domain*), hamując ssaczy cel kompleksu rapamycyny, uniemożliwiając przyłączanie się substratów. W szlak mTOR włączone są dwa kompleksy: (i) kompleks 1 kinazy mTOR (mTORC1) oraz (ii) kompleks 2 kinazy mTOR (MTORC2) (ang. *mammalian targed of rapamycin complex 1 and complex 2*). Przez wytworzenie kompleksów z kinazą mTOR blokowane są sygnały odpowiedzialne za aktywację

limfocytów T, hamując w ten sposób proliferację tych komórek, indukowaną przez IL-2 i IL-15. Także wytworzone kompleksy sirolimus / ewerolimus z FKBP-12 hamują aktywność kinazy mTOR, blokując cykl komórkowy w fazie G1, uniemożliwiając przejście komórek z fazy G1 do fazy S. Zarówno inhibitory rapamycyny, jak i kalcyneuryny wiążą się z tym samym białkiem regulatorowym, a ich działanie oparte jest synergii [86,87].

### 1.3.3 Antymetabolity: Inhibitory dehydrogenazy monofosforanu inozyny (IMPDH;IMDH) Inhibitory IMDH

Głównym przedstawicielem tej grupy leków jest mykofenolan mofetylu (MMF), który jest prolekiem, a jego aktywnym metabolitem jest kwas mykofenolowy (MPA), MMF blokuje *de novo* syntezę nukleotydów guanozyny, drogą odwracalnego blokowania dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu (IMPDH), które są niezbędnymi substratami do syntezy DNA i RNA [88,76]. Proces ten przeprowadzany jest preferencyjnie w limfocytach B i T, hamując ich proliferację, poprzez zatrzymanie fazy G1 cyklu komórkowego, jako wynik hamowania aktywności cykliny D3, składnika kinazy zależnej od cyklin (CDK, ang. *cyclin-dependent kinase*), a także jej inhibitora [88,89,90].

Ograniczanie właściwości proliferacyjnych limfocytów B i T powoduje brak zdolności tych komórek do przeprowadzenia odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego, jak i komórkowego. Ponadto, MMF wykorzystuje jeszcze inne mechanizmy zapobiegające odrzucaniu przeszczepu. Kwas mykofenolowy, aktywny metabolit MMF może kierować aktywowane limfocyty T na drogę apoptozy, tym samym zmniejszając ich populację. Dodatkowo, hamuje również glikozylację i ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz rekrutację limfocytów i monocytów w miejsca zapalenia [91].

Od dawna uważa się, że MMF ze względu na swoje właściwości immunosupresyjne, przedstawia udoskonaloną terapię immunosupresyjną po przeszczepieniu nerki i innych narządów mięszzowych. Nie wykazuje toksycznego działania na wątrobę lub nerki, nie wchodzi też w istotne interakcje z innymi powszechnie stosowanymi lekami. Dzięki swym właściwościom, włączony został w schematy leków immunosupresyjnych w transplantologii klinicznej oraz leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym [92,93].

### 1.3.4 Glikokortykosteroidy

Glikokortykoidy były od dawna stosowane jako leki pierwszego rzutu u pacjentów po przeszczepianiu narządów litych, do celów terapii indukcyjnej w momencie przeszczepu, jak również jako terapia podtrzymująca, w celu zapobiegania ostrego odrzucaniu graftu. Glikokortykosteroidy charakteryzują się silnym działaniem przeciwzapalnym, a ich działanie

immunosupresyjne wynika z oddziaływania na komórki układu immunologicznego. Odbywa się to poprzez interakcję z komórkami dendrytycznymi prezentującymi antygen, modulując transkrypcję IL-1, zmniejszając liczbę krążących limfocytów T CD4+ i hamując zależną od IL-1 aktywację limfocytów [81,94]. Wykazują również zdolność do kierowania na drogę apoptozy limfocytów, co prowadzi do limfocytotoksyczności, hamują także odpowiedzi alloimmunologiczne [82].

W ostatnich dekadach w USA i Europie protokoły immunosupresji obejmowały głównie kombinacje wyżej wymienionych leków immunosupresyjnych, z różnymi schematami dawkowania kortykosteroidów lub bez nich. Badania kliniczne wykazały jednak, że oprócz pożądanego efektu, stosowanie leków immunosupresyjnych niesie ze sobą pewne ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Dlatego poszukuje się i wprowadza się do terapii pacjentów nowsze generacje leków immunosupresyjnych, które wywołują mniej działań niepożądanych, co zmniejszyłoby zarówno zachorowalność, jak i śmiertelność oraz zwiększyło możliwości modyfikacji indywidualnej immunosupresji [95].

## 2 Cel pracy

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) Zawartości włókien kolagenowych typu I w kosmkach jelitowych.

## 3 Materiał i metody

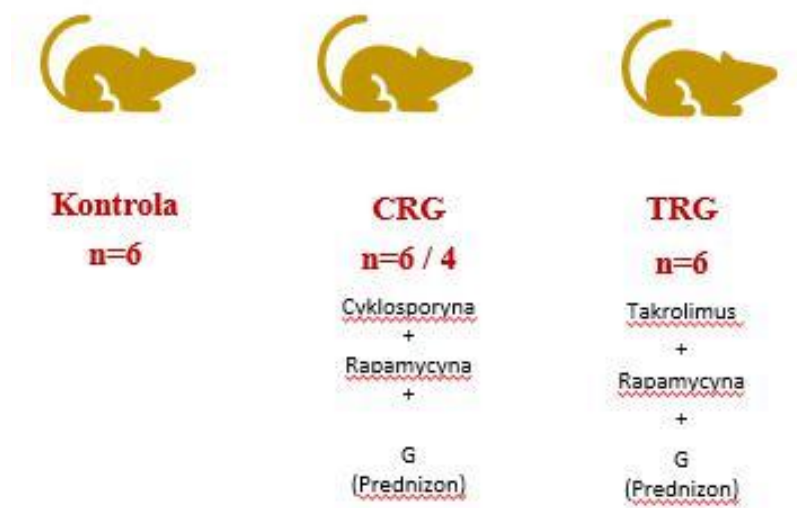
Badania przeprowadzone zostały na materiale archiwalnym, przechowywanym w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego

w Szczecinie, w postaci bloczków parafinowych z zatopionymi fragmentami jelita cienkiego. Materiał pobrano od dojrzałych płciowo samców szczurów (14. tygodniowych) podczas doświadczenia, przeprowadzonego wcześniej [6]. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie nr 06/08 z dn.04.02.2008 oraz nr 24/08 z dn.24.11.2008r. [6].

### 3.1 Przeprowadzenie doświadczenia

Do przeprowadzenia wyżej wymienionego doświadczenia wykorzystano 18 samców szczurów szczepu Wistar, pochodzących z licencjonowanej hodowli Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. Dla każdego ze zwierząt załączono potwierdzenie pochodzenia na podstawie badań DNA oraz świadectwo zdrowia, wystawione przez lekarza weterynarii. Szczury przebywały w zwierzętarni Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w pomieszczeniach o temperaturze  $22 \pm 2$  °C oraz wilgotności powietrza ok. 55%, w systemie 24h /24h. Codziennie podawano im wodę do picia *ad libitum* oraz karmiono granulowaną paszą laboratoryjną LSM. Odnotowano również ilość dobowego spożycia paszy, a dane te posłużyły do ustalenia dawki podawanych leków immunosupresyjnych, w przeliczeniu na masę ciała zwierząt. Przed rozpoczęciem doświadczenia, wszystkie szczury zważono, a następnie podzielono na grupy – grupę kontrolną i 2 grupy doświadczane, po 6 osobników w każdej grupie. W doświadczeniu wykorzystano farmaceutyczne postaci leków immunosupresyjnych, które podawane były *per os* o stałej porze dnia, w postaci kulek uformowanych z pieczywa i stosowanych leków. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały kulki, uformowane tylko z pieczywa.

Do aktualnych badań wykorzystano jelita zwierząt z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, w których zwierzętom podawano panele złożone z trzech leków immunosupresyjnych według schematu, opartego na inhibitorach kalcyneuryny. W doświadczeniu wykorzystano leki immunosupresyjne w następujących 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. Zwierzętom grup doświadczalnych - CRG oraz TRG podawano leki immunosupresyjne przez 6 miesięcy, według trójlekowego schematu przedstawionego poniżej (Schemat 3).



Schemat 3. Schemat podawania szczurom leków immunosupresyjnych w trakcie doświadczenia oraz liczba zwierząt (n) w każdej grupie.

Stężenia leków oznaczano we krwi pełnej szczurów po 4h od dojelitowego podania leków.

Po upływie trzech miesięcy, od rozpoczęcia doświadczenia zwierzęta ponownie zważono, dostosowując dawki leków, w przeliczeniu na masę ciała. W czasie trwania doświadczenia, 2 szczury z grupy CRG nie przeżyły, stąd grupa ta liczyła finalnie 4 zwierzęta [6].

## 3.2 Badania morfologiczne

### 3.2.1 Przygotowanie preparatów do oceny morfologicznej

Po zakończeniu doświadczenia, od każdego zwierzęcia pobrano fragment jelita cienkiego, który utrwalono w 4% formalinie. Po przeprowadzeniu procedury odwadniania w rozworach etanolu o wzrastającym stężeniu, przepajania w mieszaninie parafiny i ksyłenu, a następnie w ciekłej parafinie, pobrane tkanki zatopiono w parafinowe bloczki. Z bloczków tych wykonano seryjne skrawki, o grubości 3-4  $\mu\text{m}$ . Skrawki te umieszczano na adhezyjnych mikroskopowych szkiełkach podstawowych.

### 3.2.2 Histochemia

Po odparafinowaniu i nawodnieniu, skrawki jelita wybarwiono hematoksyliną-eozyną (H-E; z wykorzystaniem świeżo przygotowanych odczynników), najczęściej stosowaną metodą barwienia przeglądowego, w celu oceny morfologicznej badanej tkanki.

Do wybarwienia włókien kolagenowych typu I w błonie śluzowej jelita cienkiego, wykorzystano trójbarwną metodę Mallorego (barwienie trójchromowe Mallorego; metoda



*Mallory Trichrome*) (komercyjny zestaw firmy Bio OpticaMilano, Milano, Italy), w której włókna kolagenowe wybarwiały się na kolor ciemnoniebieski. Włókna retikulinowe (kolagen typu III) wizualizowano, wykorzystując metodę impregnacji srebrem (komercyjny zestaw firmy Bio OpticaMilano, Milano, Italy). W tej metodzie barwienia włókna retikulinowe wybarwiały się na kolor czarny, kolagen na kolor złocisto-żółty). Po wykonaniu barwień, na powierzchnię skrawków nanoszono medium do zamykania (Entellan™ Sigma-Aldrich, Merck) i zamykano szkiełkiem nakrywkowym.

Wszystkie barwienia histochemiczne przeprowadzono zgodnie z protokołami producenta, dołączonymi do odczynników. Morfologię badanych tkanek oceniano w mikroskopie świetlnym (Leica DM5000B, Wetzlar, Niemcy).

### 3.2.3 Analiza histomorfometryczna

Na przeglądowych preparatach jelita, wybarwionych hematoksyliną i eozyną przeprowadzono pomiary wysokości nabłonka pokrywającego kosmki jelitowe zwierząt zarówno grupy kontrolnej, jak i grup badanych – CRG i TRG. Pomiary przeprowadzone zostały z wykorzystaniem oprogramowania mikroskopu Leica DM5000B (Wetzlar, Niemcy), pod powiększeniem obiektywu x40. Uzyskane z pomiarów wyniki wyrażono w mikrometrach ( $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.4 Immunohistochemia (IHC)

Proces apoptozy komórek nabłonka jelitowego oceniono wykonując reakcję immunohistochemiczną z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego anti-aneksynie V.

- Poliklonalne królicze przeciwciało przeciwko aneksynie 5 (1:500, Abcam, Cat. no. ab14196) Abcam plc; 330 Cambridge, UK).

Dla oceny ekspresji białek połączeń międzykomórkowych pomiędzy komórkami nabłonka jelita cienkiego, przeprowadzone zostały reakcje immunohistochemiczne, z zastosowaniem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko białkom połączeń takim, jak: okludyna, kadheryna E; winkulina.

Wykorzystano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

- Monoklonalne mysie przeciwciało przeciwko okludynie w rozcieńczeniu 1:250 (E-5:sc-133256; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Niemcy);
- Monoklonalne mysie przeciwciało przeciwko E-kadherynie w rozcieńczeniu 1:250 (G-10: sc-8426; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Niemcy);
- Monoklonalne mysie przeciwciało przeciwko winkulinie w rozcieńczeniu 1:300



(V9131 Sigma-Aldrich ; Merck Life Science Sp. z.o.o. Poznań).

Wszystkie przeciwciała wykorzystane w IHC rozcieńczono przy użyciu rozcieńczalnika przeciwciał Diluent (Agilent Dako EnVision, Dania).

### 3.2.5 Opis procedury przeprowadzenia reakcji IHC

Preparaty ze skrawkami jelita cienkiego o grubości 4  $\mu\text{m}$  (pobrane od zwierząt z grupy kontrolnej oraz doświadczanych), przeznaczone do przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznych, umieszczono w naczyniu wypełnionym ksylenem w cieplarni na 2 godziny, w celu ich odparafinowania. Ksylen zmieniano 3 krotnie. Odparafinowane skrawki nawodniono, przeprowadzając je przez szereg alkoholu etylowego o zmniejszającym się stężeniu (96%, 90%, i 70%). Po zakończeniu tego etapu, preparaty umieszczono w 0,01 M buforze cytrynianowym o pH = 6,0 i ogrzewano w mikrofalówce przez 10 min, w celu odsłonięcia antygeny. W kolejnym etapie procedury, blokowano aktywność endogennych peroksydaz, inkubując skrawki w *Dual Endogenous Enzyme Block* (Agilent Dako EnVision, Dania), przez 10 min. Skrawki następnie inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, z przeciwciałami pierwszorzędowymi, wykorzystanymi do wizualizacji ekspresji białek, uczestniczących w tworzeniu połączeń międzykomórkowych oraz kaspazy-3. Uzyskany produkt reakcji immunohistochemicznej identyfikowano z wykorzystaniem zestawu *EnVision+ Dual Link System-HRP*, służący do dwuetapowego barwienia z użyciem polimeru znakowanego peroksydazą chrzanową (*Labelled Polymer HRP; Agilent Dako EnVision, Dania*), skoniugowanego z przeciwciałami wtórnymi. Skrawki inkubowano przez 30 minut, a następnie przeprowadzano 10-minutową inkubację z kompleksem substrat-chromogen z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB+) (Agilent Dako EnVision, Dania), w celu uwidocznienia produktu reakcji o kolorze brązowym, wskazującym miejsce lokalizacji antygeny. Tkanki następnie przepłukano wodą destylowaną i przeprowadzono barwienie kontrastowe hematoksyliną (Sigma-Aldrich). Przed przeprowadzeniem kolejnej inkubacji, tkanki płukano dwukrotnie w PBS przez 5 minut i umieszczano w kąpeli w buforze TBS rozcieńczonym dwukrotnie na 5 minut. Każda inkubacja odbywała się w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Barwienie przeprowadzono zgodnie z protokołem, załączonym przez producenta. Po zakończeniu reakcji na skrawki nałożono żel glicerolowy, a następnie nakryto szkiełkiem nakrywkowym. Kontrole negatywne wykonano przez wyeliminowanie przeciwciał pierwszorzędowych. Preparaty oceniano pod mikroskopem (Leica DM5000B, Wetzlar, Niemcy) (SurówkaA. et al. 2022)

### 3.2.6 Analiza cyfrowa obrazu

Do przeprowadzenia analizy cyfrowej obrazu zeskanowano preparaty przy użyciu skanera 3DHISTECH Panoramic MIDI II (Sysmex Polska Sp. z o.o. Warszawa, Polska), przy powiększeniu obiektywu 20x, uzyskując obrazy o rozdzielczości 0,17  $\mu\text{m}$ /piksel. Analizę cyfrową obrazu przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania *Pattern Quant i Cell Quant* firmy 3DHISTECH (3DHISTECH Kft. Budapeszt, Węgry). Moduł ten umożliwia wstępną segmentację tkanek i identyfikację kilku struktur tkankowych, a także identyfikuje zabarwione elementy tkanki na podstawie struktury, cech koloru i jego intensywności Ryc. X).

Do ilościowej cyfrowej analizy obrazu badanej tkanki, wybrano preparaty jelita wybarwione trójbarwną metodą Mallorego, w celu oceny zawartości włókien kolagenowych typu I oraz preparaty z tkankami uwidaczniającymi immunoekspresję aneksyny V oraz wybranych białek, uczestniczących w tworzeniu połączeń międzykomórkowych.

Określano następujące parametry: pole (*area*), obwód (*perimeter*) zajmowany przez ocenianą tkankę oraz intensywność jej wybarwienia (*intensity*). Uzyskane wyniki analizy wyrażone w pikselach poddano analizie statystycznej i zawarto w tabelach.

### 3.2.7 Analiza statystyczna

Dla przeprowadzenia analizy statystycznej wyników, uzyskanych z ilościowej cyfrowej oceny badanych tkanek, wykorzystano oprogramowanie Statistica 13. Wyniki zawarte w tabelach wyrażono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe oraz mediany. Podobieństwo rozkładu zmiennych do rozkładu normalnego określono przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Z uwagi na to, że dane nie przedstawiały rozkładu normalnego, zastosowano test t-studenta. W ocenie histomorfometrycznej istotne różnice testowano przy użyciu parametrycznej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu Tukeya do danych normalnie rozłożonych. Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy wartość p wynosiła  $< 0,05$ .

## 4 Wyniki

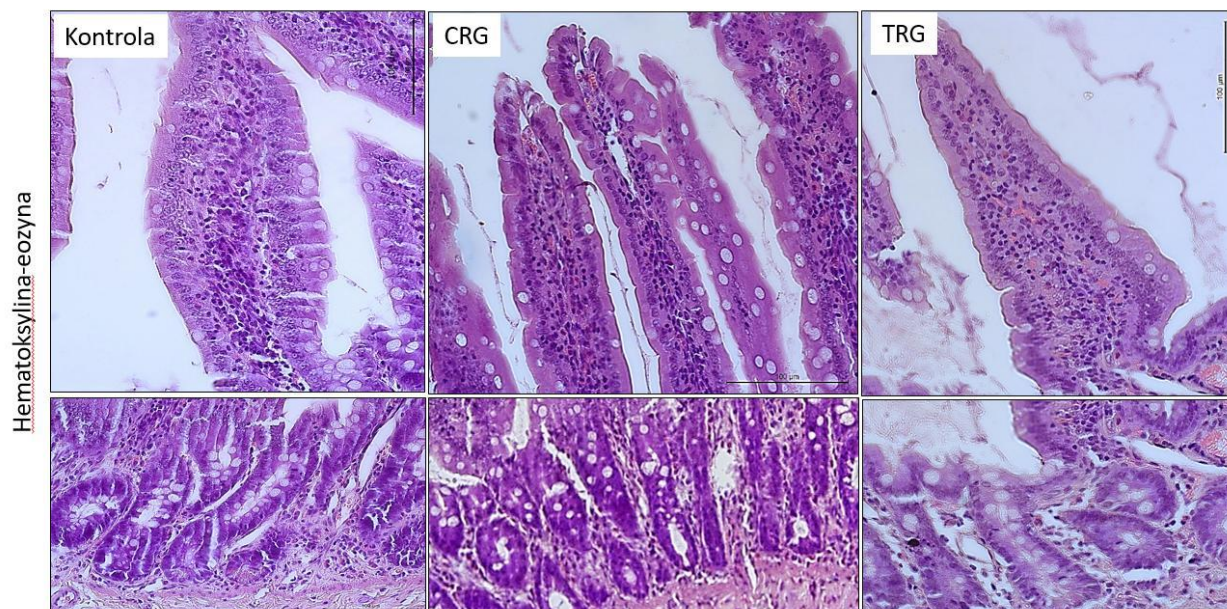
Wybarwione skrawki jelita cienkiego zwierząt z grupy kontrolnej oraz dwóch badanych grup doświadczalnych poddano analizie w mikroskopie świetlnym.

### 4.1 Analiza preparatów barwionych technikami histochemicznymi

#### *Hematoksylina–eozyna*

Na preparatach przeglądowych, barwionych hematoksyliną i eozyną uwidoczniła

została morfologia błony śluzowej jelita cienkiego, zarówno kosmków jelitowych, jak i blaszki właściwej (Ryc. 4). Po wnikliwej analizie błony śluzowej nie odnotowano uchwytanych zmian w ogólnej morfologii jelita pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi, zarówno CRG, jak i TRG. Zawartość rozproszonej tkanki limfoidalnej w kosmkach i blaszce właściwej nie różniła się pomiędzy grupami (Ryc. 4).

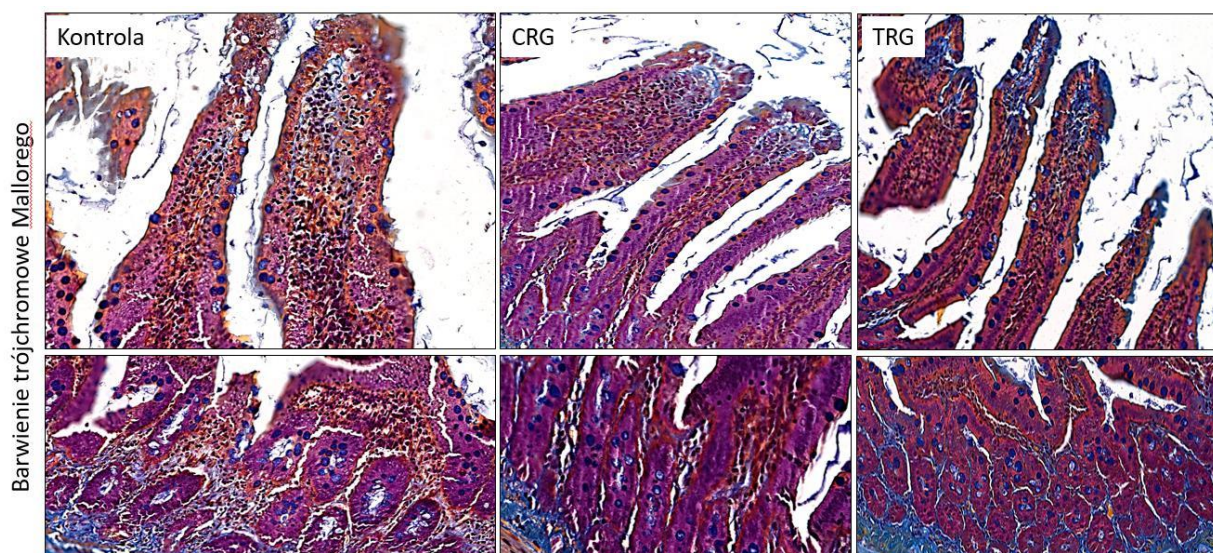


Rycina 4. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny skojarzone z rapamycyną i glikokortykosteroidem (CRG i TRG). Barwienie hematoksylina-eoizyna (H-E); Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu\text{m}$ .

#### *Barwienie trójchromowe Mallorego (Trójbarwna metoda Mallorego: Mallory Trichrome)*

Jak wspomniano powyżej, zastosowana metoda pozwala na uwidocznienie włókien kolagenowych typu I.



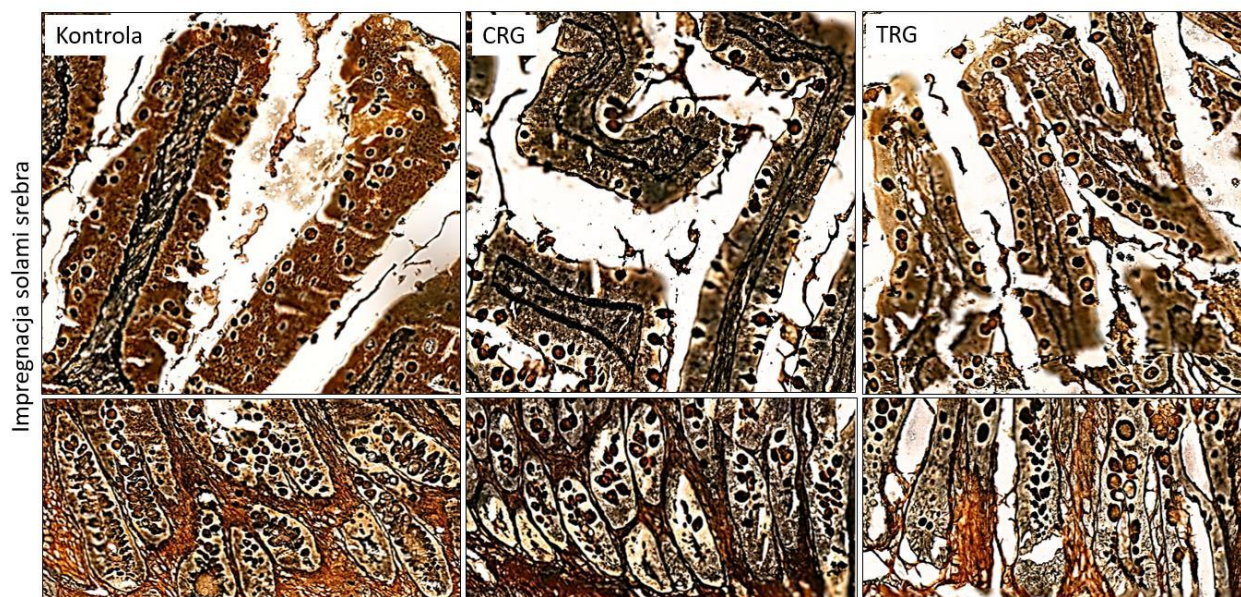


Rycina 5. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny (CRG i TRG). Włókna kolagenowe w błonie śluzowej wybarwione na kolor intensywnie niebieski. Barwienie *Mallory Trichrome*; Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu\text{m}$ .

Ocena morfologiczna z zastosowaniem mikroskopu świetlnego wykazała, że zawartość włókien kolagenowych typu I w błonie śluzowej kosmków i blaszki właściwej jelita szczurów wzrosła w obu grupach doświadczalnych, w porównaniu z grupą kontrolną. Wydaje się, że ich akumulacja jest wyższa w grupie TRG, niż w CRG (Ryc. 5).

#### *Impregnacja srebrem*

Dzięki zastosowaniu tej metody uwidoczniło włókna retikulino (srebrochłonne), tworzone przez kolagen typu III.



Rycina 6. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny (CRG i TRG). Barwienie: Impregnacja srebrem. Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu$ m.

Najintensywniej wybarwione włókna retikulinoe odnotowano w błonie śluzowej jelita cienkiego szczurów z grupy CRG, w porównaniu z grupami TRG i kontrolną (Ryc. 6).

## 4.2 Ocena histomorfometryczna

W ocenie histomorfometrycznej mierzono wysokość nabłonka jelita, począwszy od błony podstawnej, aż do powierzchni zewnętrznej mikrokosmków rąbka prążkowanego.

Tabela 1. Wysokość komórek nabłonka jelit szczurów z grupy kontrolnej oraz grup doświadczalnych – CRG i TRG.

Parametr	Kontrola n=60	CRG n=60	TRG n=60
AM $\pm$ SD	20.17 $\pm$ 2.06	17.16 $\pm$ 1.92*	14.61 $\pm$ 2.43*

AM – średnia arytmetyczna; SD – Odchylenie standardowe; n – liczba wykonanych pomiarów  
Wartości odpowiadają medianie  $\pm$  SD; \*p < 0,05 vs Kontrola

Uzyskane wyniki wskazują, że wysokość nabłonka jelita w obu grupach doświadczalnych uległa obniżeniu w porównaniu z grupą kontrolną oraz pomiędzy grupami doświadczalnymi (Tab. 1).



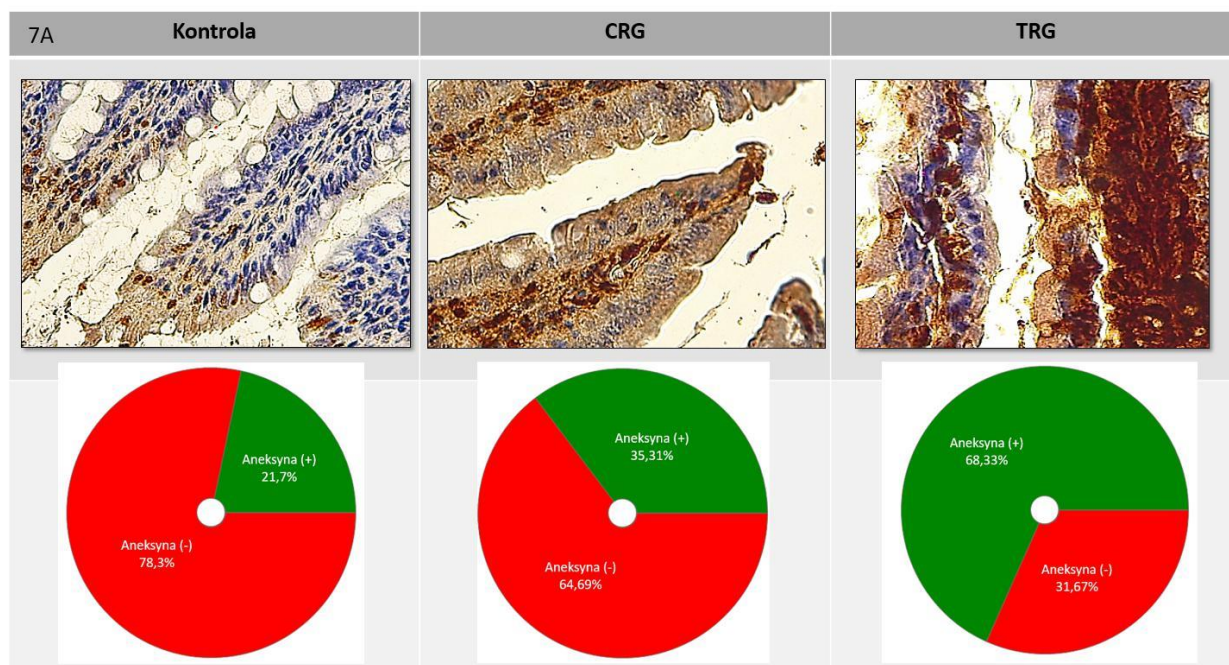
## 4.3 Ilościowa analiza cyfrowa obrazu

### 4.3.1 Immunohistochemia

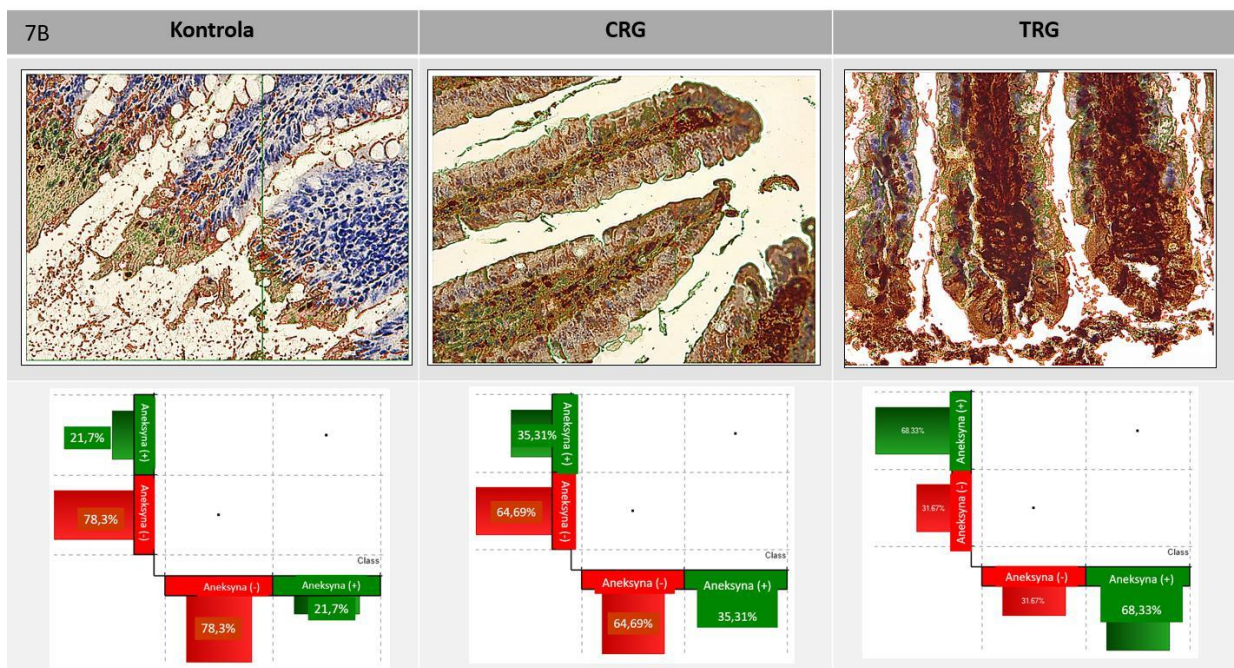
Analizie cyfrowej poddano zeskanowane preparaty przedstawiające ekspresję aneksyny V oraz białek uczestniczących w tworzeniu połączeń zamykających oraz zwierających.

#### *Aneksyna V*

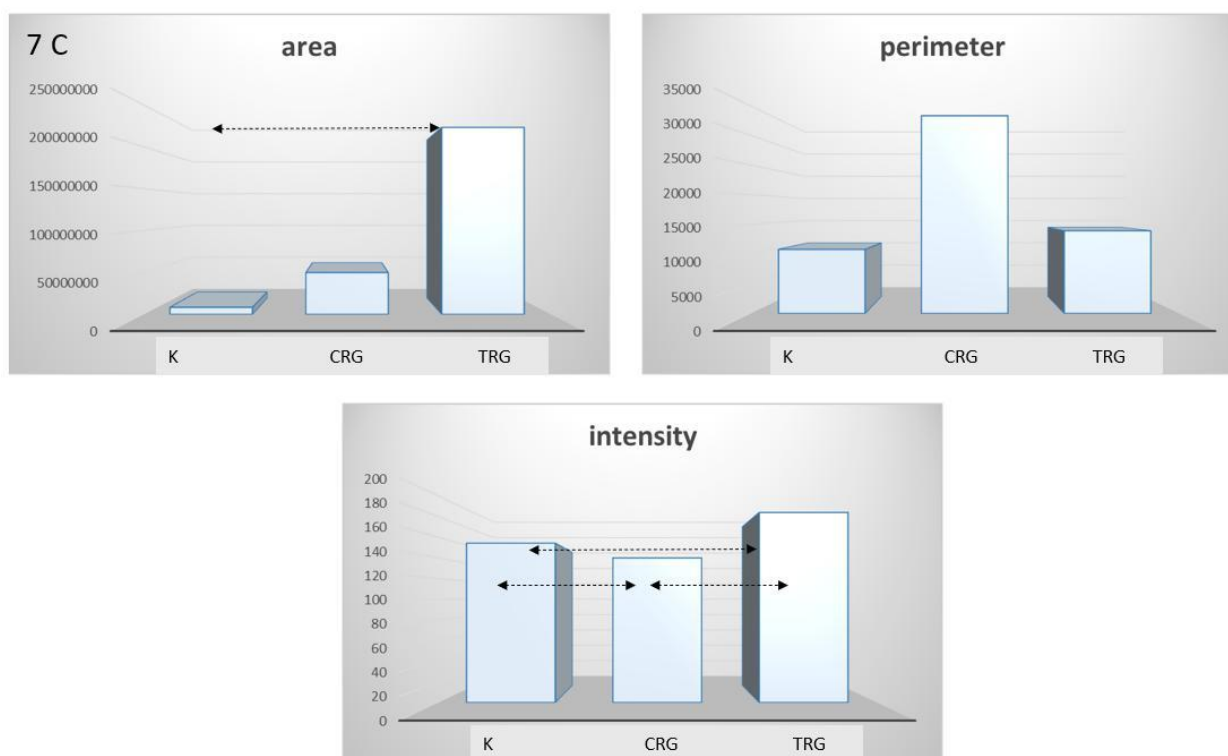
Uzyskane wyniki analizy wykazały, że największy obszar dodatniej reakcji immunohistochemicznej wykazały jelita z grupy TRG, a najmniejszy z grupy kontrolnej, a średnie arytmetyczne wynosiły odpowiednio 223023098 pikseli oraz 8416929 pikseli (Tab.2). Ponadto pomiędzy wspomnianymi grupami jelit różnice zostały potwierdzone statystycznie ( $p < 0.01$ ) (Tabela 2, Ryc. 7A, B, C). Biorąc pod uwagę procentowy obszar immunoekspresji aneksyny V w jelitach, wyniki można uszeregować następująco:  $K > CRG > TRG$  i wynosiły odpowiednio 21,7%, 35,31% oraz 68,33% (Ryc.7A, B). Biorąc pod uwagę intensywność zabarwienia (Ryc. 7C), najbardziej intensywnie wybarwiły się białka w grupie TRG (179 pikseli) a najmniej w grupie CRG (143 piksele). Różnice w intensywności zabarwienia zostały potwierdzone statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a CRG oraz pomiędzy grupami: TRG a CRG oraz TRG a grupą kontrolną (Tab.2)



Ryc.7A



Ryc. 7B



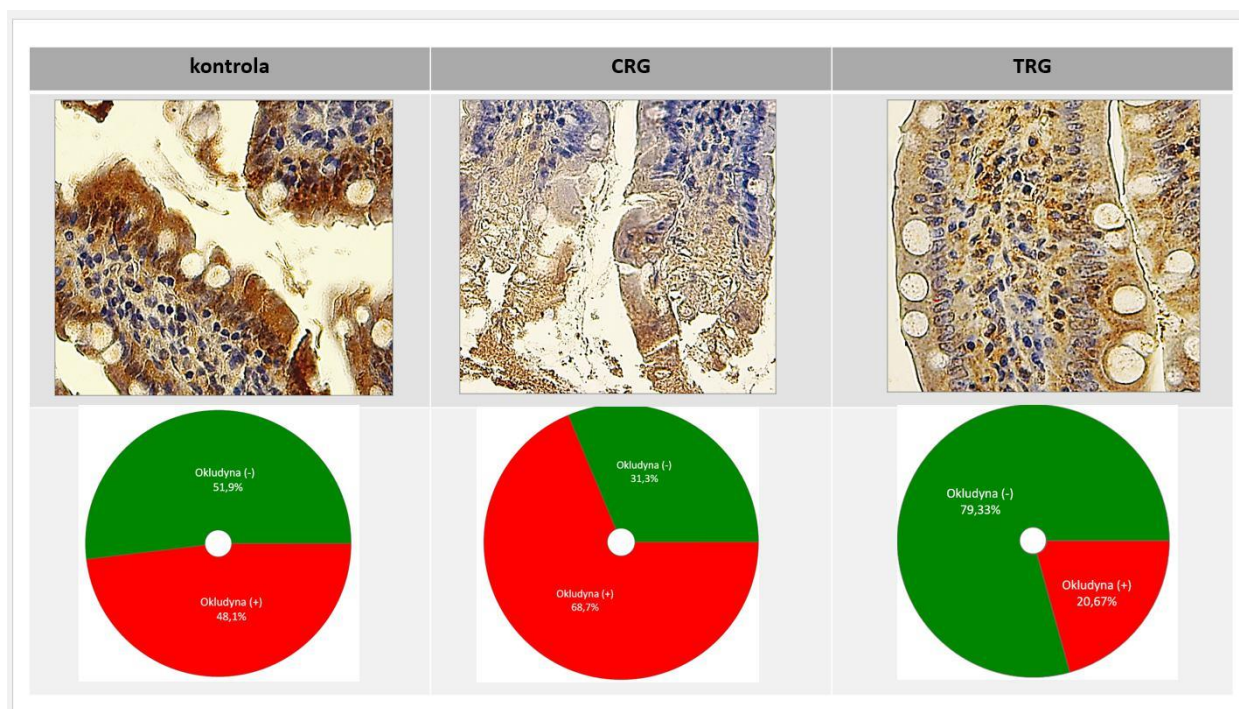
Ryc. 7C

Rycina 7. Ilościowa cyfrowa analiza immunoekspresji aneksyny V, wskazującej apoptozę komórek w jelicie cienkim szczurów z grupy kontrolnej oraz CRG i TRG. (7A i 7B – identyfikacja produktu reakcji immunohistochemicznej i odsetek zajmowanego obszaru; 7C – inne parametry). Różnice istotne statystycznie w ryc. C oznakowano przerywanymi strzałkami.

## Okludyna

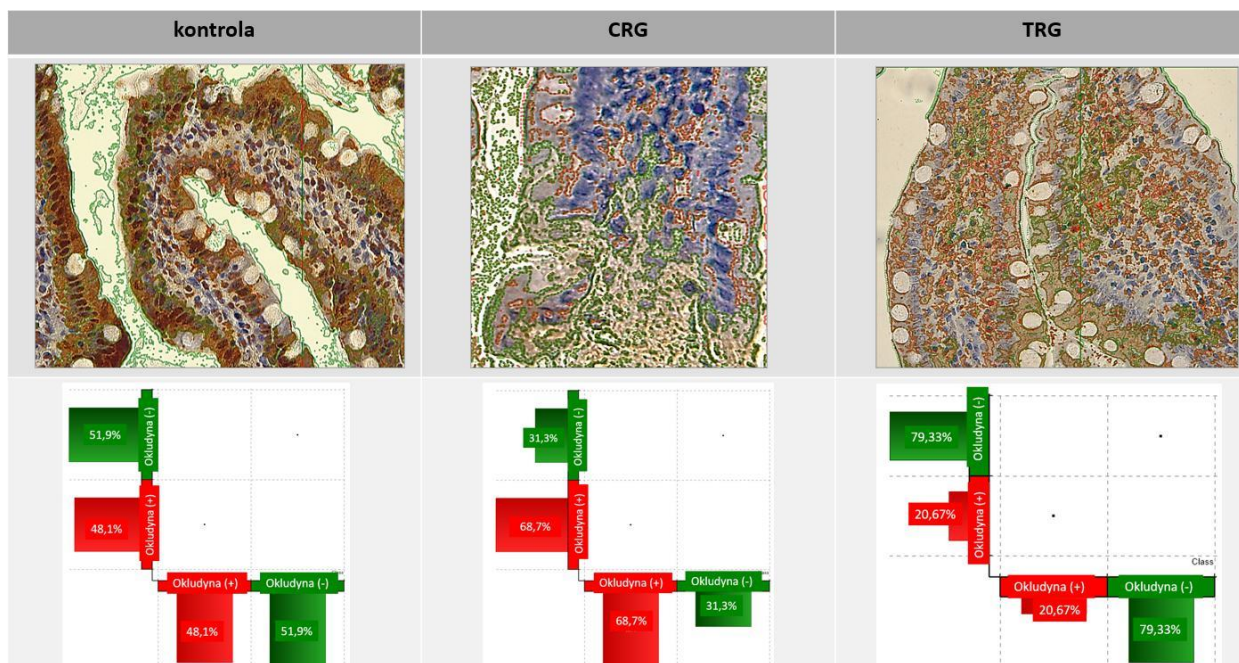
Analiza reakcji IHC, dotyczącej immunоекспресji okludyny wykazała, że największy obszar pozytywnej reakcji widoczny był w jelicie szczurów z grupy CRG (76838159 pikseli), najmniejszy natomiast w grupie TRG (159482599 pikseli). Biorąc pod uwagę intensywność zabarwienia (Ryc. 8C), najbardziej intensywnie wybarwiły się białka w grupie CRG (199 pikseli) a najmniej w grupie kontrolnej (81 pikseli). Różnice w intensywności zabarwienia zostały potwierdzone statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a CRG oraz pomiędzy grupami:

TRG a CRG oraz TRG a grupą kontrolną (Tab.2). Ponadto przeanalizowano stosunek pomiędzy obszarem z pozytywnym i negatywnym wynikiem IHC i wyrażono go w procentach. Wyniki procentowe dotyczące obszaru, gdzie widoczna była immunоекспресja okludyny wykazały następujące wartości: K – 48,1%; CRG – 20,67%, TRG – 68,75% (Ryc. 8A, B).

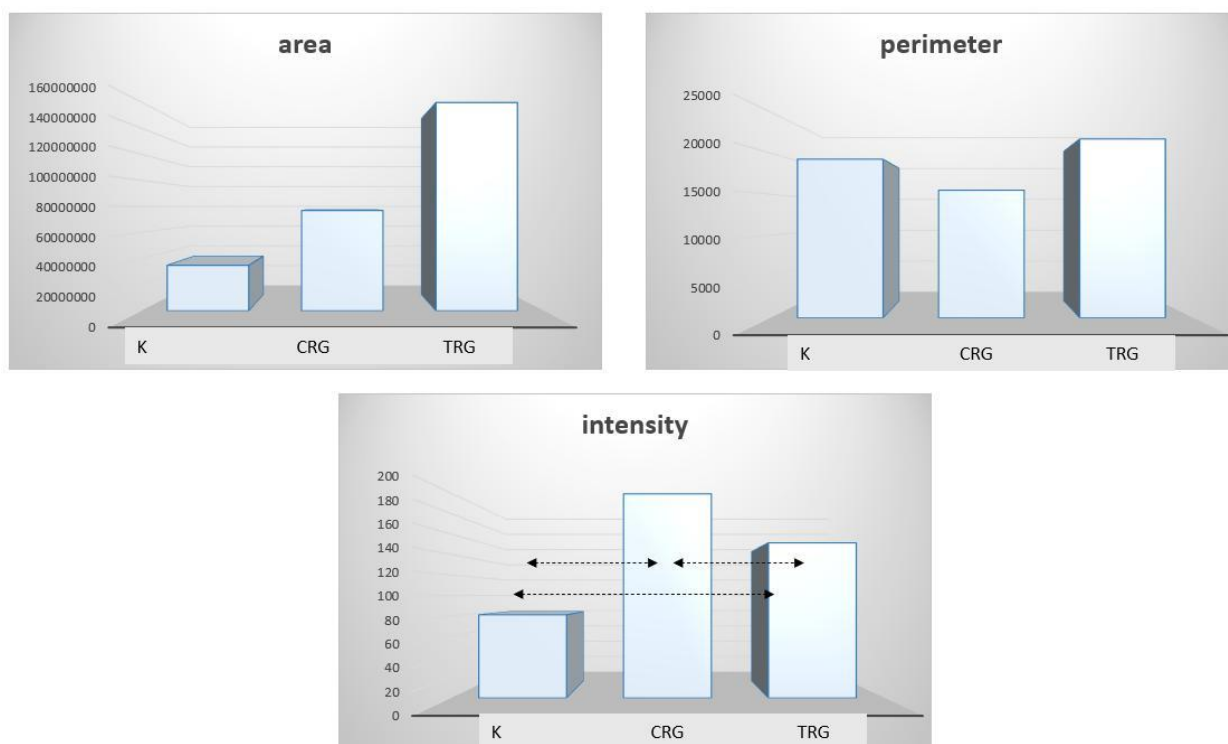


Ryc.8A





Ryc.8B



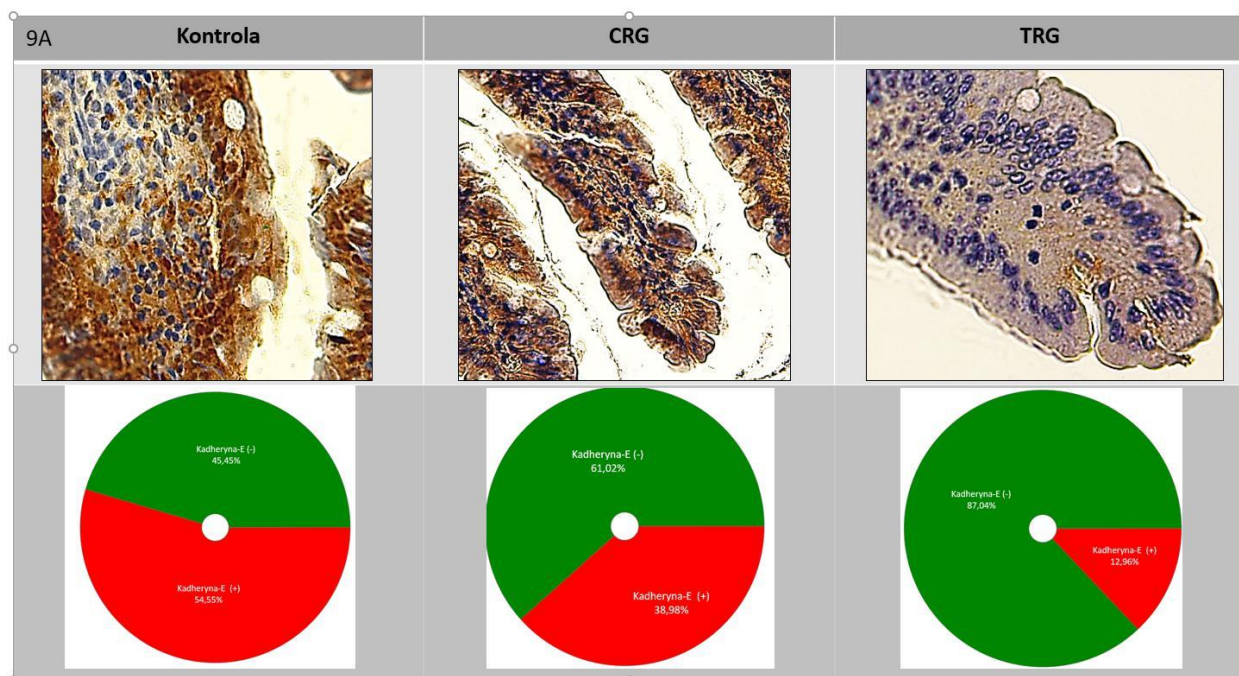
Ryc.8C

Rycina 8. Ilościowa cyfrowa analiza immunoekspresji okludyny, w jelicie cienkim szczurów z grupy kontrolnej oraz z grup doświadczalnych CRG i TRG. (7A i 7B – identyfikacja produktu reakcji immunohistochemicznej i odsetek zajmowanego obszaru; 7C – inne parametry). Różnice istotne statystycznie w ryc. C oznakowano przerywanymi strzałkami.

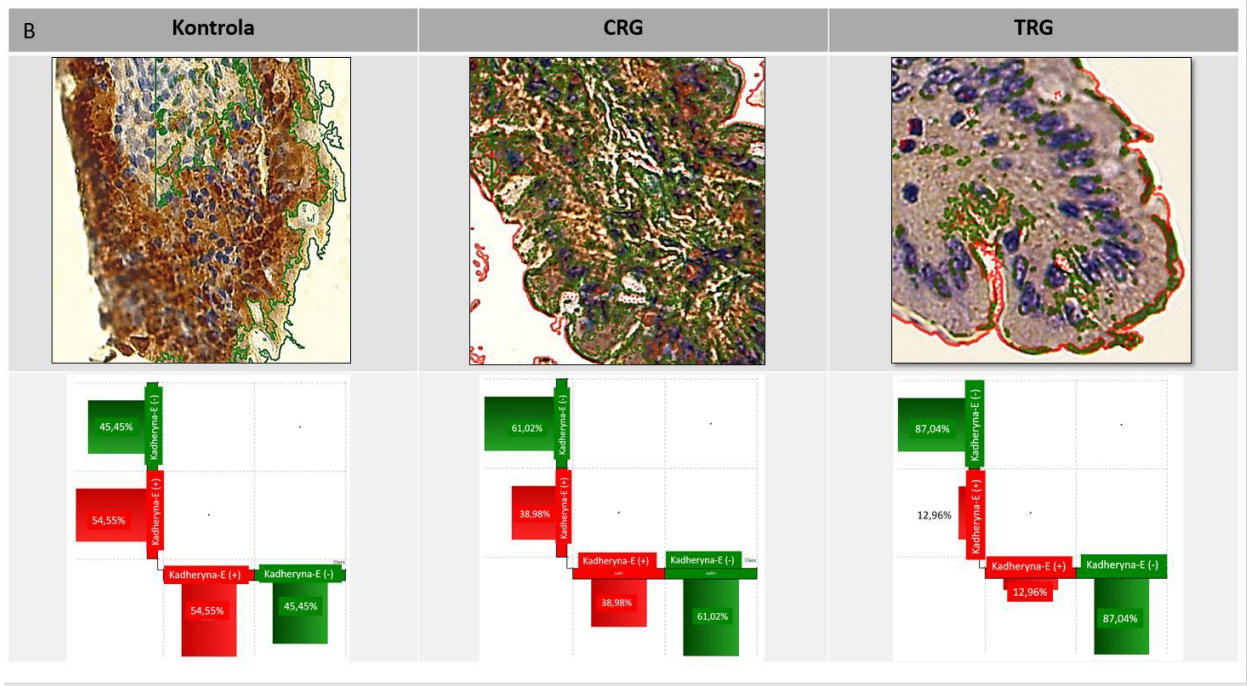
## E-kadheryna

Ocena uzyskanych wyników wskazała, że największy obszar zajęty przez barwny produkt pozytywnej reakcji IHC dotyczył jelit zwierząt grupy kontrolnej, najmniejszy natomiast grupy TRG, gdzie średnie arytmetyczne wynosiły odpowiednio 144228839 i 506628199 pikseli. Potwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą CRG i kontrolną oraz pomiędzy grupą TRG a CRG i TRG i kontrolną (Tab.2). Wynik wyrażony w procentach przedstawiał się następująco: K – 54,55%; CRG – 38,98; TRG – 12,96 % (9A, B).

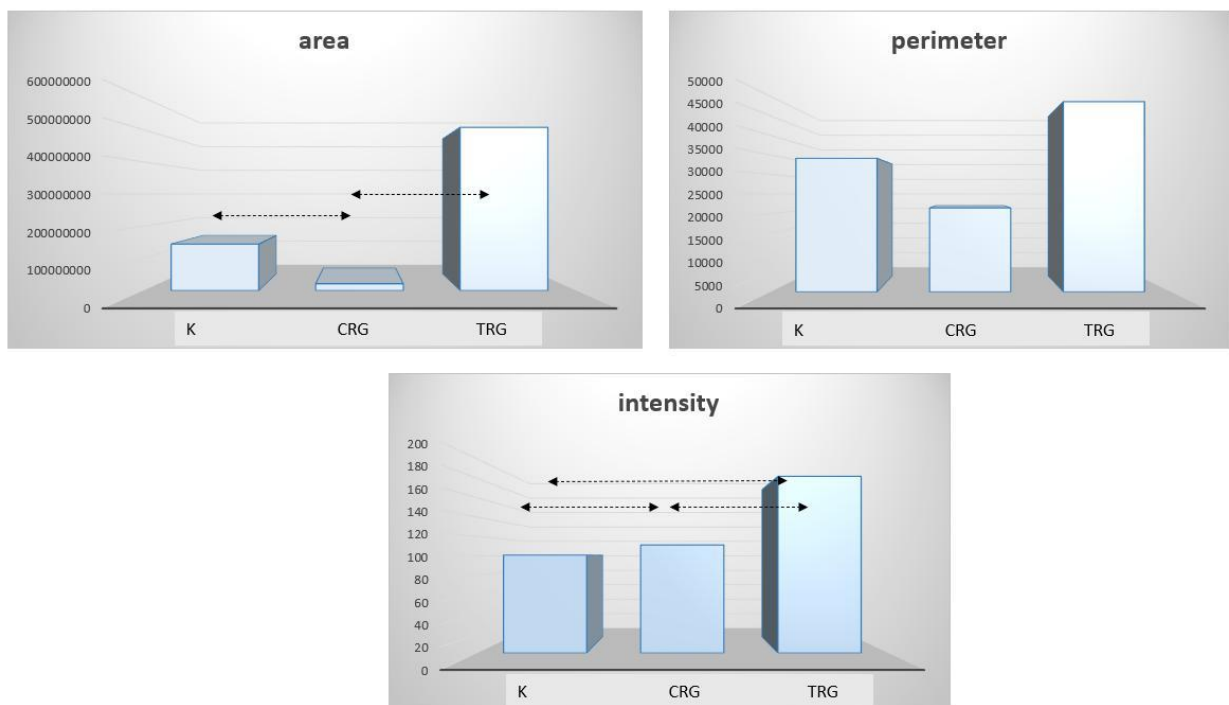
W przypadku intensywności odczynu reakcji – najbardziej intensywny dotyczył jelit z grupy TRG, najniższy natomiast odnotowano w jelitach zwierząt grupy kontrolnej (9C). Średnie wartości wynosiły odpowiednio 182 i 101 pikseli. Potwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą CRG i kontrolną oraz pomiędzy grupą TRG a CRG i kontrolną (Tab.2).



Ryc.9A



Ryc.9B



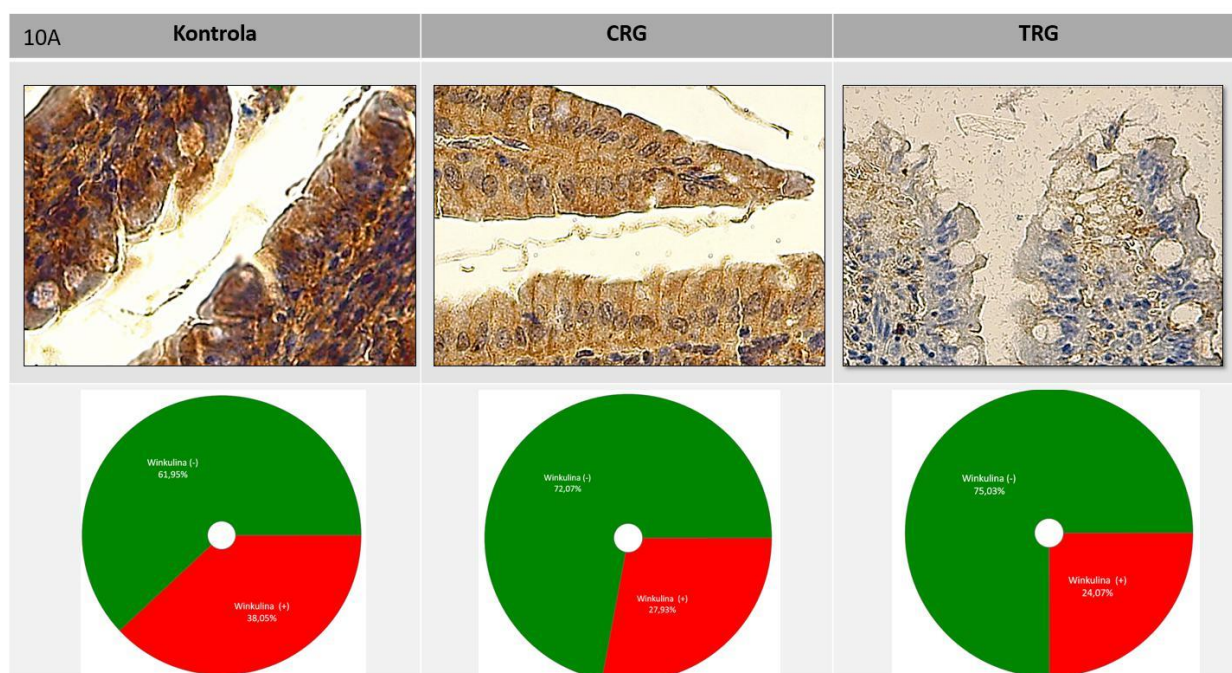
Ryc.9C

Rycina 9. Analiza cyfrowa immunoekspresji E-kadheryny pomiędzy komórkami nabłonka jelit zwierząt grupy kontrolnej oraz otrzymujących trójlekowy schemat immunosupresji: CRG i TRG. Różnice istotne statystycznie w ryc. C oznakowano przerywanymi strzałkami.

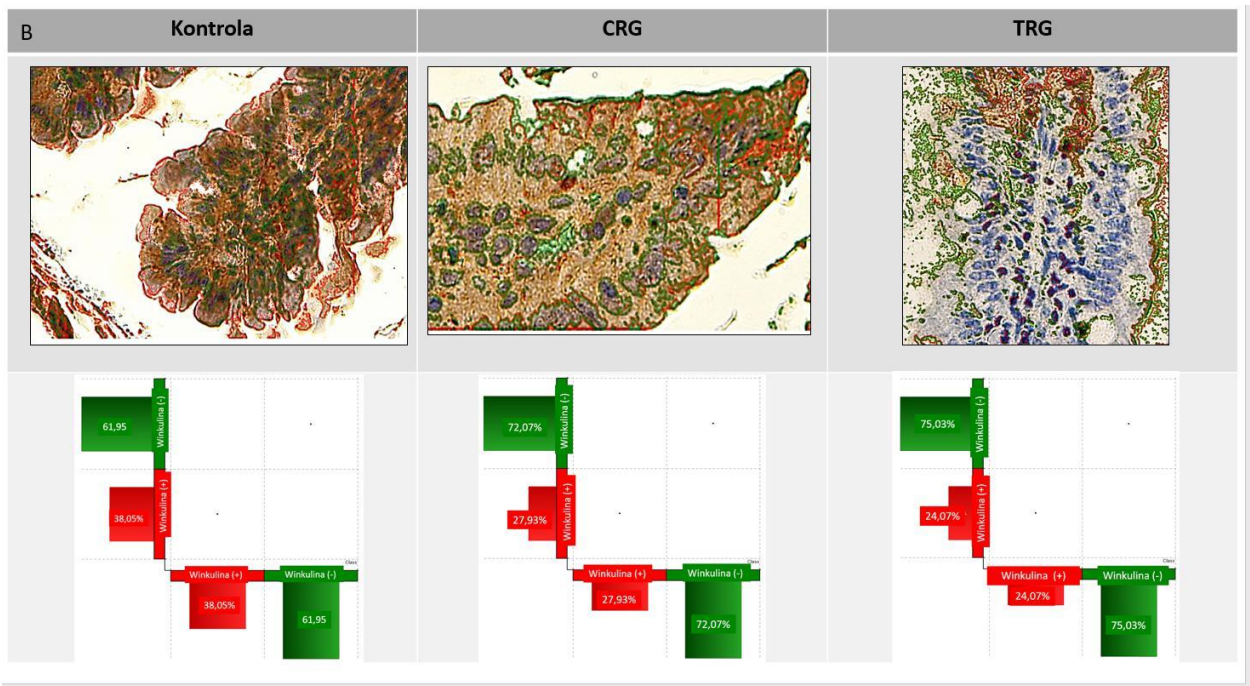


## Winkulina

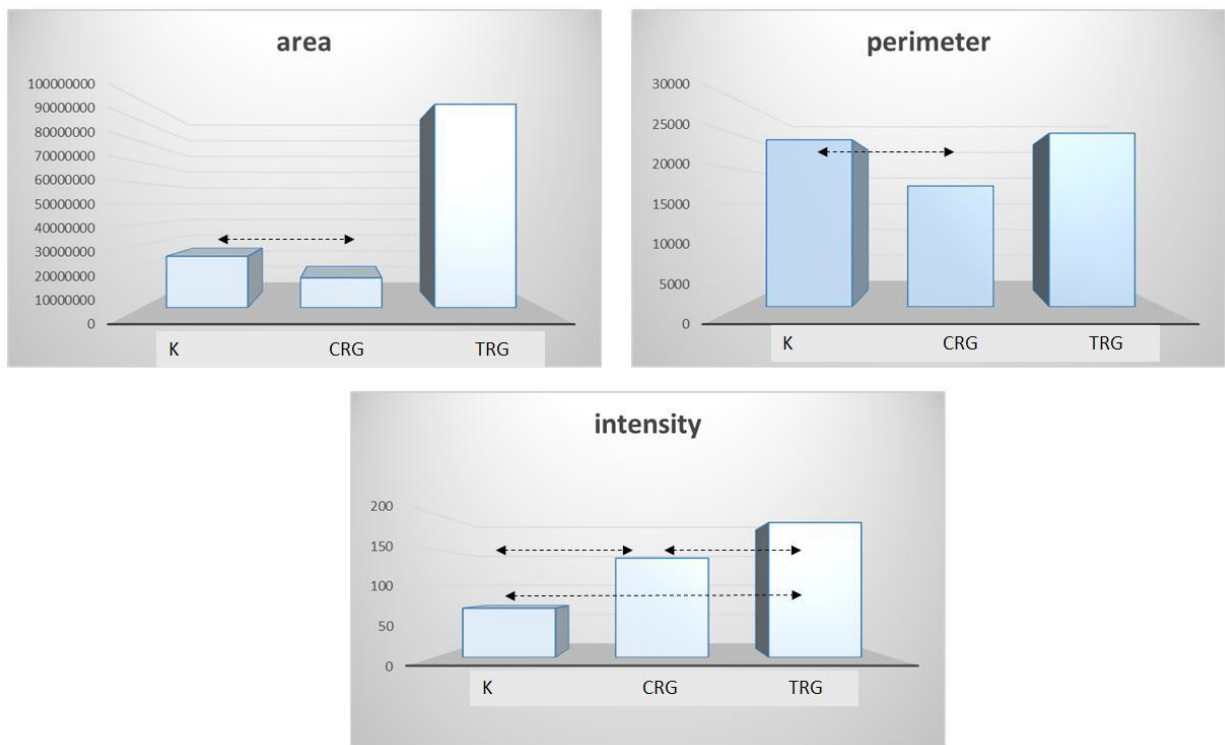
Ocena immunoekspresji winkuliny wykazała natomiast, największy obszar zajęty przez produkt pozytywnej reakcji IHC występował w jelitach szczurów z grupy kontrolnej, najmniejszy natomiast grupy TRG (10C). Średnie arytmetyczne wynosiły odpowiednio 24714774 i 97874255 pikseli. Potwierdzono również różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a CRG. (Tab.2). Odsetek zajmowanego obszaru przez immunopozytywny produkt w poszczególnych grupach kształtował się następująco: K – 54,55%; CRG – 38,98; TRG – 12,96 (10A, B). Istotna statystycznie różnica pomiędzy grupą CRG a grupą kontrolną została również potwierdzona w zakresie obwodu immunopozytywnego obszaru ( $p=0,009$ ), a średnie wartości wynosiły odpowiednio 17585 i 24308 pikseli (Tab. 2). W przypadku intensywności odczynu reakcji – najbardziej intensywny dotyczył jelit z grupy TRG, najniższy natomiast odnotowano w jelitach zwierząt grupy kontrolnej (10C). Średnie wartości wynosiły odpowiednio 187 i 68 pikseli. Potwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy intensywnością zabarwienia pomiędzy grupami: CRG i kontrolną oraz TRG a CRG i TRG a kontrolną (Tab.20).



Ryc.10A



Ryc.10B

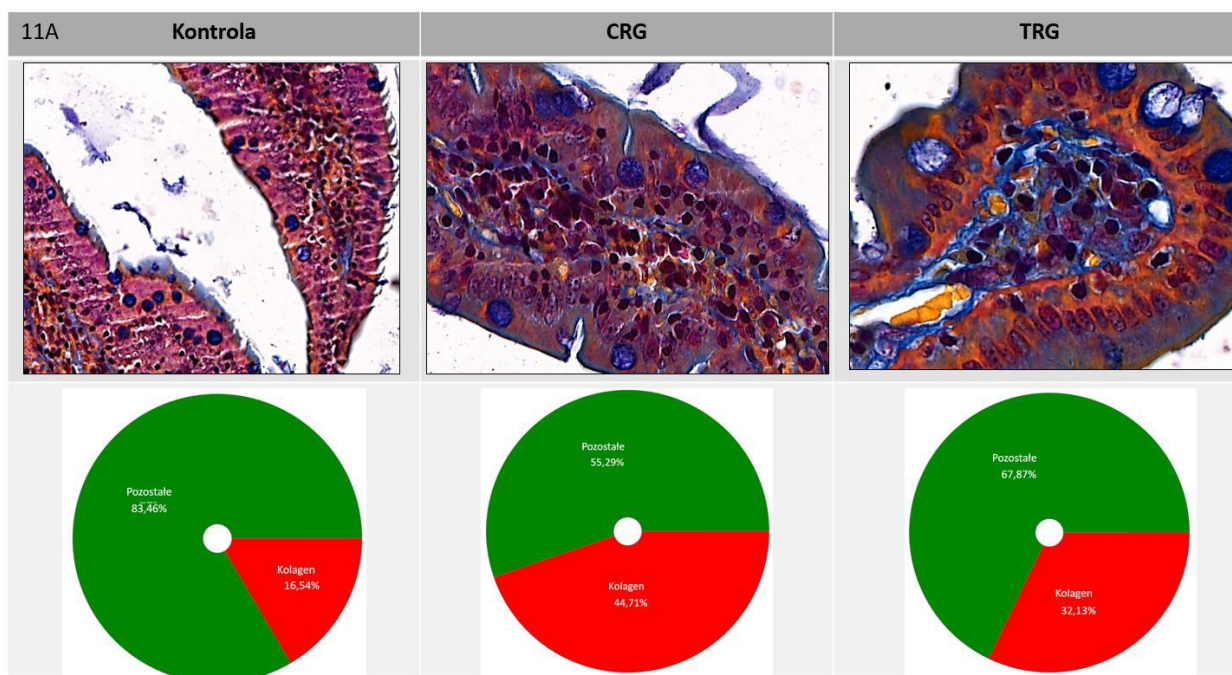


Ryc.10C

Rycina 10. Analiza cyfrowa immunoekspresji winkuliny pomiędzy komórkami nabłonka jelit zwierząt grupy kontrolnej oraz grup doświadczalnych CRG i TRG. Różnice istotne statystycznie w ryc. C oznakowano przerywanymi strzałkami.

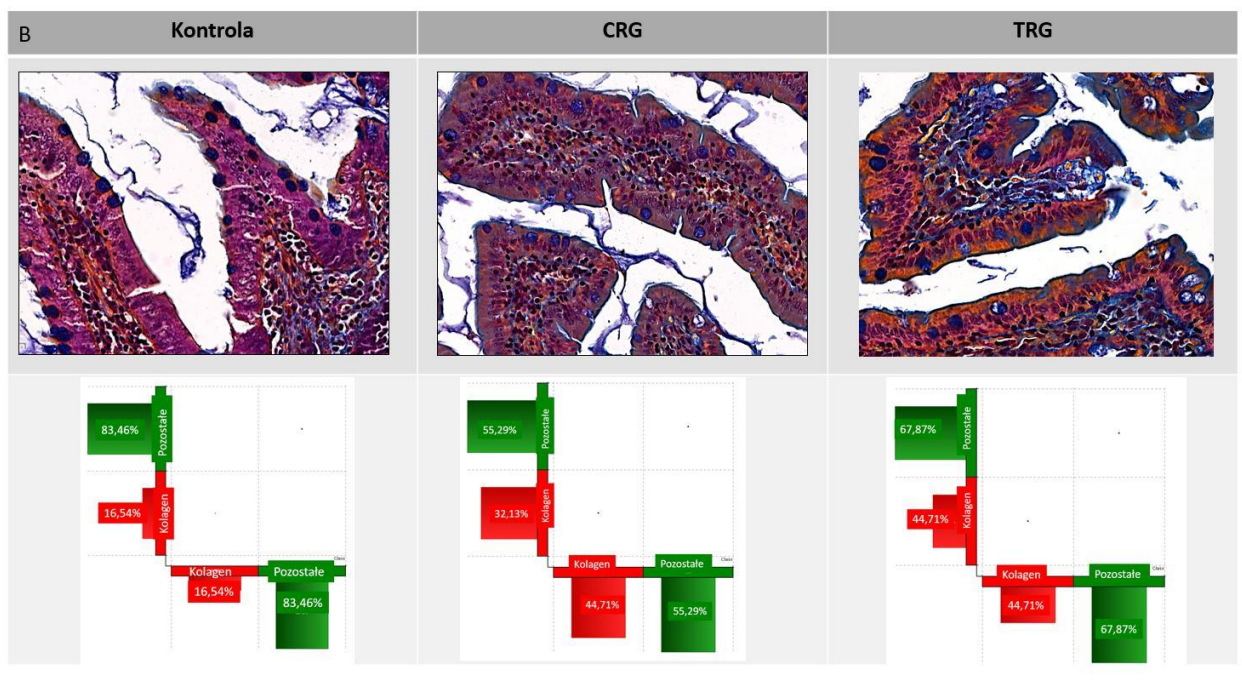
## Zawartość włókien kolagenowych

Jak wykazała zastosowana analiza, największy procentowo obszar zajęty przez włókna kolagenowe odnotowano w grupie CRG, gdzie średnia wartość wynosiła 13,75155 pikseli. Określony odsetek w grupach można uszeregować wzrastająco: CRG >TRG >K, a wartości wynosiły kolejno 44,71%, 32,13%, 16,54% (Ryc. 11A). Najwyższe wartości zajmowanego obwodu zanotowano w grupie TRG, gdzie średnia arytmetyczna wynosiła 19,25273 piksele (Tab.2). Analizując intensywność wybarwienia w reakcji IHC odnotowano, że najbardziej intensywny produkt dotyczył grupy kontrolnej, gdzie średnia wartość wynosiła 127,5942 piksele (Tab.2). Analiza statystyczna wykazała również istotną różnicę pomiędzy grupą kontrolną a CRG, grupą kontrolną a TRG oraz pomiędzy obydwoma grupami, gdzie stosowane były leki immunosupresyjne (Tab. 2).

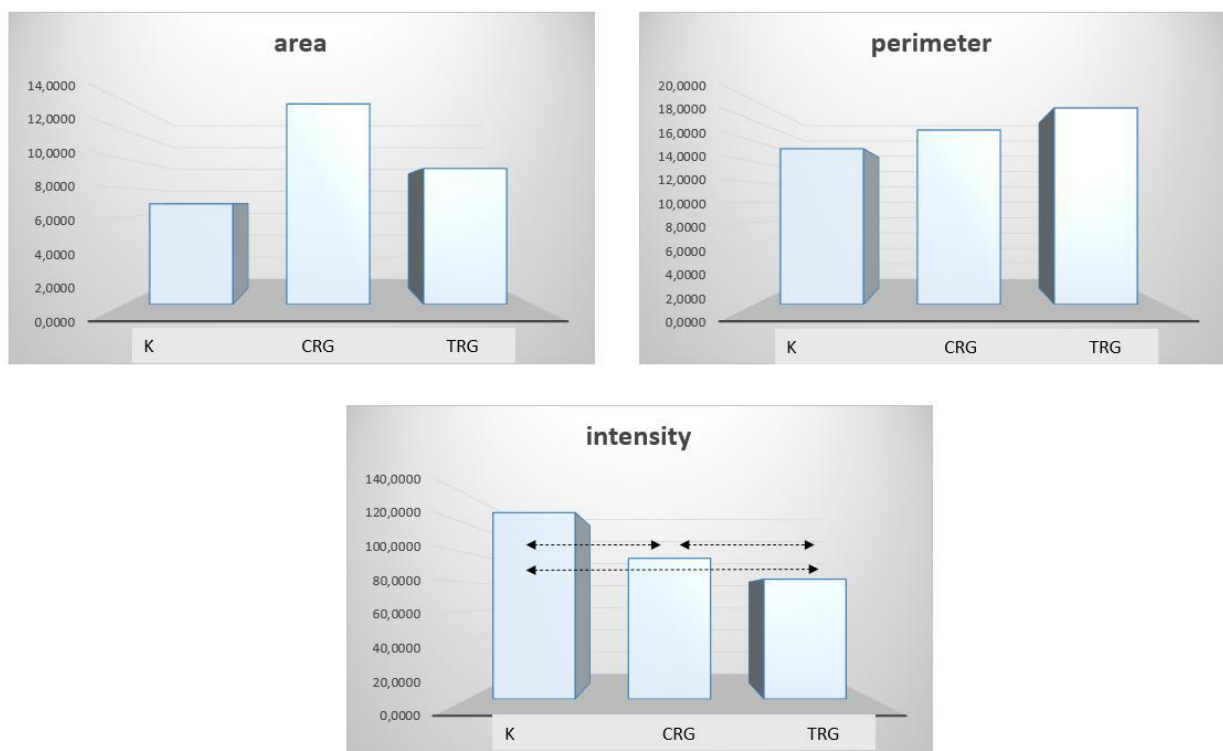


Ryc.11A





Ryc.11B



Ryc.11C

Rycina 11. Analiza cyfrowa preparatów jelita cienkiego szczurów z grupy kontrolnej oraz dwóch grup badanych – CRG i TRG, określająca ilościową zawartość włókien kolagenowych typu I. Różnice istotne statystycznie w ryc. C oznakowano przerywanymi strzałkami.

	Grupa		
	Kontrola	CRG	TRG
parametr	<b>ANEKSYNA V</b>		
	<b>Area</b>		
n	1232	167	437
AM±SD	8416929±77901469	49782747±333212828	223023098±3272354*K
Med.	5789111	33878666	121009887
	<b>Perimeter</b>		
n	1232	167	437
AM±SD	10771±46245	33303±147079	13910±9,6397
Med.	7896	23987	11345
	<b>Intensity</b>		
n	1232	167	437
AM±SD	154±23	140±20*K,	184±2,6977*K, CRG
Med.	153	143	179
	<b>OKLUDYNA</b>		
	<b>Area</b>		
n	964	872	352
AM±SD	34819275±356217696	76838159±1608703665	159482599±2,878957
Med.	546875	625000	437500
	<b>Perimeter</b>		
n	964	872	352
AM±SD	19233±106350	15476±150637	21685±2,17926
Med.	4420,6	4118	4118
	<b>Intensity</b>		
n	964	872	352
AM±SD	81±12	199±3,13884*K	151±2,1454*K, CRG
Med.	80,0	194	156,0
	<b>E- KADHERYNA</b>		
	<b>Area</b>		
n	127	1482	127
AM±SD	144228839±1,131116439	21200721±245983525*K	506628199±3,067268*CRG
Med.	1031250	437500	1750000
	<b>Perimeter</b>		
n	127	1482	127
AM±SD	34081±1,6973556	21429±150607	48527±1,584005
Med.	5121	4119,7	6988
	<b>Intensity</b>		
n	127	1482	127
AM±SD	101±1,14288	111±29*K	182±3,219179*K, CRG
Med.	100	122,0	199
	<b>WINKULINA</b>		
	<b>Area</b>		
n	731	1543	797
AM±SD	24714774±121485536	14324469±75986522*K	97874255±2,41044
Med.	1000000	343750	718750



	<b>Perimeter</b>		
n	731	1543	797
AM±SD	24308±69512	17585±51053*K	25260±3,422329
Med.	6364	4341,3	4678,7
	<b>Intensity</b>		
n	731	1543	797
AM±SD	68±14	138±37*K	187±2,211526*K, CRG
Med.	65	125,0	193,0
<b>WŁÓKNA KOLAGENOWE</b>			
	<b>Area</b>		
n	345	176	133
AM±SD	6,9006±26,24620	13,75155 ±61,80194	9,32591±72,88700
Med.	0,3390	0,21738	0,154745
	<b>Perimeter</b>		
n	345	176	133
AM±SD	15,2506±39,33537	17,08634±68,88106	19,25273±76,57249
Med.	3,1858	2,72279	2,55800
	<b>Intensity</b>		
n	345	176	133
AM±SD	127,5942±25,62471	96,3125±6,71232*K	82,015±13,38814*K,CRG
Med.	131	96	84

\* p < 0,05

Tabela 2. Analiza statystyczna wyników, uzyskanych z ilościowej cyfrowej oceny badanych tkanek.

## 5 Dyskusja

W ostatnich latach publikowanych jest wiele badań dotyczących wpływu mikrośrodowiska jelitowego oraz dysbiozy jelitowej na zdrowie człowieka. Stąd też, dużą uwagę poświęca się roli jelit – jako najważniejszego organu, odpowiedzialnego za utrzymanie ogólnej homeostazy nad rozwojem różnych chorób wynikających z zaburzeń mikrobioty, w tym autoimmunologicznych. Leki immunosupresyjne stosowane w tych chorobach, są czynnikiem istotnie modulującym odpowiedź immunologiczną organizmu. Błona śluzowa jelit zawiera dobrze rozbudowaną rozproszoną tkankę limfoidalną GALT i MALT, dlatego można wnioskować o niekorzystnym wpływie immunoterapii na morfologię i funkcję jelit. Wyniki badań nad stosowaniem terapii immunosupresyjnej i jej wpływ na integralność bariery jelitowej niewątpliwie pomogą lepiej poznać patomechanizm odrzucania narządu przeszczepionego, ułatwią monitorowanie przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym, być może również pozwolą wpłynąć na wprowadzenie zmian, w dotychczas stosowanych schematach leczenia.

Biorcy narządów unaczynionych, u których występują dolegliwości żołądkowo-jelitowe,

mogą mieć objawy związane z podstawową chorobą, która doprowadziła do schyłkowej niewydolności narządu lub wtórne do stosowanego schematu leczenia immunosupresyjnego. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań, dotyczących wpływu przewlekłego traktowania samców szczurów lekami immunosupresyjnymi opartymi na inhibitorach kalcyneuryny – cyklosporyny A i takrolimusu - na błonę śluzową jelita cienkiego, ze szczególnym uwzględnieniem nabłonka jednowarstwowego walcowatego.

Cyklosporyna A jest jednym z podstawowych leków stosowanych w immunoterapii, a jak wspomniano już we wstępie, jej działanie polega głównie na hamowaniu aktywności kalcyneuryny. Parametry farmakokinetyczne tego leku wskazują, że cyklosporyna ulega biotransformacji głównie w obrębie wątroby, przy udziale enzymów cytochromalnych P(CYP)450A3. W wyniku tej biotransformacji powstaje około 15 metabolitów, z których część wykazuje słabą aktywność [96,97].

Takrolimus jest powszechnie stosowanym lekiem immunosupresyjnym u biorców narządów mięsaszowych. Chociaż u większości pacjentów występują objawy pod postacią biegunki, dane dotyczące zmian zachodzących w błonie śluzowej jelita u pacjentów przyjmujących takrolimus są ograniczone. Biodostępność takrolimusu nie jest wysoka, a szybkość wchłaniania zmniejsza się w obecności pokarmu. Takrolimus podobnie, jak cyklosporyna A jest metabolizowany głównie w wątrobie, przy udziale izoenzymów cytochromu P450 (CYP 3A4 i 3A5) oraz glikoproteiny P, białka transportowego odgrywającego istotną rolę we wchłanianiu i dystrybucji leków. Glikoproteina ta, oprócz wątroby, ulega ekspresji również w ścianie jelita. Ze światła jelita lek ten transportowany jest do cytoplazmy enterocytów, gdzie jest metabolizowany przy udziale CYP3AP, a następnie dzięki glikoproteinie P, ponownie uwalniany do światła narządu. Ze względu na zróżnicowaną ekspresję CYP3A5 oraz glikoproteiny P, takrolimus najintensywniej wchłaniany jest w dystalnych odcinkach układu jelitowego. Odzwierciedleniem tej zależności jest wystąpienie biegunki u pacjentów, spowodowanej przyspieszonym pasażem jelitowym i zwiększonym stężeniem leku we krwi [98].

Stąd też, badanie wpływu inhibitorów kalcyneuryny na ścianę jelita ma duże znaczenie poznawcze. Uzyskane wyniki badań morfologicznych wskazują bowiem, że stosowane leki immunosupresyjne wpływają negatywnie na wysokość nabłonka jelitowego. W ocenie histomorfometrycznej mierzono wysokość nabłonka jelita, począwszy od błony podstawnej, aż do powierzchni zewnętrznej mikrokosmków rąbka prążkowanego. Uzyskane wyniki wskazują, że wysokość nabłonka jelita w obu grupach doświadczalnych uległa obniżeniu, w porównaniu z grupą kontrolną oraz pomiędzy grupami doświadczalnymi ( $p < 0,05$  vs Kontrola). Oddziaływanie leków immunosupresyjnych z grupy inhibitorów kalcyneuryny znalazło potwierdzenie w badaniach, dotyczących nabłonka dróg

przeprowadzających powietrze. W pracy Neuringer I.P. i wsp. przedstawili również wpływ leków z grupy inhibitorów kalcyneuryny, ale na nabłonek dróg oddechowych. W badaniach tych wykazano, że długotrwałe ekspozycje dobrze zróżnicowanych hTBEC (*human tracheobronchial epithelial cell*) na granicy faz powietrze-ciecz (ALI), na działanie cyklosporyny w dawce 1000 ng/mL, znacząco zmniejszyło nienaruszony wielorzędowy nabłonek śluzowo-rzęskowy ( $p = 0,009$ ). Hamowanie wzrostu hTBEC poprzez stymulację produkcji IL-8 i długotrwały wpływ na fenotyp śluzowo-rzęskowy oraz nienaruszony nabłonek wielorzędowy sugerują, że cyklosporyna może mieć bezpośredni toksyczny wpływ na nabłonek dróg oddechowych po przeszczepieniu [99].

W niniejszych badaniach, przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wykazano, że takrolimus w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidem wykazuje działanie proapoptotyczne na komórki błony śluzowej jelita, włączając komórki nabłonka. Zostało to udokumentowane, po przeprowadzonej komputerowej analizie immunolokalizacji oraz immunoekspresji aneksyny V, która pozwoliła określić jej intensywność wybarwienia i pozostałe badane parametry. Aneksyna V uważana jest za wczesny marker apoptozy, stąd jej wybór do wizualizacji tego procesu w enterocytach. Apoptoza, chociaż jest procesem fizjologicznym, może być wywołana przez szereg różnych czynników nie tylko pochodzenia wewnętrznego, ale również zewnętrznego, jak np. chemiczne uszkodzenia. Istotnym sygnałem, że komórka podlega procesowi apoptozy są zmiany w błonie komórkowej, obejmujące translokacje składników błony komórkowej. Otóż, fosfatydyloseryna zostaje przemieszczona z warstwy wewnętrznej fosfolipidów do zewnętrznej warstwy fosfolipidów błony komórkowej. Aneksyna wiąże się z wysokim powinowactwem właśnie z fosfatydyloseryną komórki apoptotycznej, utrudniając w ten sposób ich interakcję z komórkami odpornościowymi. Aneksyna wiążąc się z fosfatydyloseryną przemieszcza się do zewnętrznej warstwy błony komórkowej podczas apoptozy [100].

Uzyskane wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że największy obszar zajęty przez dodatnią reakcję immunohistochemiczną odnotowano w nabłonku jelita zwierząt grupy TRG, a najmniejszy z grupy kontrolnej, a pomiędzy wspomnianymi grupami jelit różnice zostały potwierdzone statystycznie ( $p < 0,01$ ). Biorąc pod uwagę procentowy obszar immunoekspresji aneksyny V w jelitach, wyniki można uszeregować następująco: K > CRG > TRG i wynosiły odpowiednio 21,7%, 35,31% oraz 68,33%. Biorąc pod uwagę intensywność zabarwienia, najbardziej intensywnie wybarwiły się białka w grupie TRG (179 pikseli). Hissong E. i wsp. w swoim badaniu również odnieśli się do wpływu takrolimusu na jelita. Zidentyfikowali oni retrospektywnie próbki okrężnicy od 20 pacjentów otrzymujących monoterapię takrolimusem. Dokonali przeglądu zapisów pod kątem objawów, wyników badań

endoskopowych, innych leków i infekcji. Osiemnastu (90%) pacjentów było biorcami przeszczepów narządów mięszzowych. Siedemnastu (85%) miało objawy żołądkowo-jelitowe, zwłaszcza biegunkę (75%). Ponad 50% miało endoskopowe zapalenie jelita grubego, a 15% miało owrzodzenia i/lub nadżerki. Większość (90%) przypadków wykazała regeneracyjne zmiany nabłonkowe; komórki krypt apoptotycznych były obecne w 55%, a liczne w 10% przypadków. Neutrofilowe zapalenie krypt występowało w 60% przypadków; 35% wykazało zniszczenie krypty. Zapalenie blaszki właściwej bogatej w komórki plazmatyczne i zniekształcenie krypt obserwowano odpowiednio w 40% i 25% przypadków. Badacze ci nie stwierdzili korelacji między czasem trwania terapii a cechami przewlekłego uszkodzenia, stwierdzili natomiast w oparciu o uzyskane dane, że takrolimus może powodować objawowe zapalenie jelita grubego, nieprawidłowości histologiczne są często łagodne, obejmują krypty regeneracyjne i rozproszone pozostałości apoptozy. W innym badaniu Meredith E Pittman i wsp. również potwierdzili negatywny wpływ immunosupresji na możliwe zapalenie w obrębie jelita grubego. W ciągu 15 lat obserwacji podlegało 51 pacjentów po przeszczepieniu. Jedenastu (22%) pacjentów miało zakaźne zapalenie jelita grubego, a u 10 z nich ostre zapalenie jelita grubego potwierdzone biopsją. U kolejnych 17 (33%) pacjentów stwierdzono uszkodzenie związane z lekami na podstawie ustąpienia objawów po odstawieniu leku. Większość (53%) tych biopsji okrężnicy wykazała apoptozę komórek nabłonka krypt i/lub zniekształcenie architektury, chociaż 41% było histologicznie prawidłowych. U czterech (8%) pacjentów rozpoznano ostatecznie postać nieswoistego zapalenia jelit po wykluczeniu innych etiologii; biopsje od tych pacjentów wykazały przewlekłe aktywne zapalenie okrężnicy lub zapalenie jelit z bogatą w komórki plazmatyczne ekspansją blaszki właściwej i podstawowej limfoplazmocytozy [101].

Po przewlekłym traktowaniu szczurów lekami opartymi na inhibitorach kalcyneuryny wykazano zmiany w immunоекспresji i immunolokalizacji białek uczestniczących w tworzeniu połączeń pomiędzy enterocytami nabłonka jelitowego. Szczegółowa komputerowa analiza wykazała różnice pomiędzy grupą kontrolną a badanymi grupami doświadczalnymi, a także pomiędzy grupami doświadczalnymi. Zmiany te obejmowały zarówno białka tworzące połączenia zamykające – okludynę, jak i przylegania – E-kadherynę oraz winkulinę.

Nie ma wielu badań dotyczących zaburzenia immunоекспresji poszczególnych białek połączeń międzykomórkowych enterocytów, jako wyniku stosowania leków immunosupresyjnych. Szczególną uwagę zwraca się natomiast na zaburzenie funkcji bariery jelitowej obejmującej warstwę śluzu, mikrokosmki i enterocyty oraz transportu przelnabłonkowego, po działaniu leków immunosupresyjnych, między innymi cyklosporyny A i takrolimusu [102,103]. Nadmienić należy, że badania te wymienione powyżej, jak i inne, prowadzone były co prawda na modelu szczurzym, ale w trakcie doświadczenia podawano

zwierzętom pojedyncze leki immunosupresyjne (cyklosporyna A, takrolimus, mykofenolan mofetylu), a nie według trójlekowego schematu, jaki wykorzystano w niniejszych badaniach.

W badaniach przeprowadzonych przez Malinowski i wsp., stosowane leki immunosupresyjne nie wykazywały bezpośredniego wpływu na czynność przewodu pokarmowego szczurów szczepu Wistar, gdy stosowano je w stężeniach terapeutycznych. Prowadzić jednak mogą do zmian w patofizjologii bariery jelita cienkiego i grubego, a także zmian w funkcji transportowej [102,103]. Podobny efekt zaburzenia funkcji transportu przez nabłonkowy w jelicie czczym szczurów odnotowano również w innych badaniach doświadczalnych [104].

Wykazane w niniejszej pracy zmiany w ekspresji białek połączeń międzykomórkowych, spowodowane przewlekłym podawaniem panelu leków immunosupresyjnych, mogłyby być powodem zaburzeń funkcji komórek tkanki łącznej budującej błonę śluzową jelit szczurów z grup doświadczalnych. Stwierdzono bowiem zwiększenie zawartości włókien kolagenowych typu I i typu III, co wskazywać może na proces włóknienia. Szczegółowa analiza wykazała, że cyklosporyna w połączeniu z rapamycyną i glikokortykosteroidem spowodowała największe zmiany zwłóknieniowe w obrębie błony śluzowej jelita szczurów.

Określony odsetek obszaru zajmowanego przez produkt IHC w grupach można uszeregować wzrastająco: CRG >TRG >K, a wartości wynosiły kolejno 44,71%, 32,13%, 16,54%. Wcześniejsze prace prowadzone w warunkach *in vitro* sugerują, że takrolimus, który jest związany ze zmniejszeniem produkcji TGF-beta, może być mniej podatny na indukowanie zwłóknienia niż cyklosporyna [107].

W badaniu REFINE natomiast nie potwierdzono różnic pomiędzy pacjentami przyjmującymi CsA a takrolimusem. REFINE było 12-miesięcznym, prospektywnym, otwartym badaniem z udziałem 356 pacjentów otrzymujących *de novo* przeszczep wątroby z powodu marskości wątroby wywołanej wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), losowo przydzielonych do grupy otrzymującej cyklosporynę A lub takrolimus bez indukcji przeciwciał i kwas mykofenolowy lub powolne zmniejszanie dawki glikokortykosterydów. Populacja pierwotnej analizy, oparta na dostępności biopsji wątroby, obejmowała 165 pacjentów (88 CsA, 77 takrolimus). Nie było różnicy w pierwszorzędownym punkcie końcowym, stadium zwłóknienia  $\geq 2$  po 12 miesiącach, które wystąpiło u 63/88 pacjentów leczonych CsA (71,6%) i 52/77 pacjentów leczonych takrolimusem (67,5%) (iloraz szans [OR] 1,11 ; 95% CI 0,56; 2,21;  $p = 0,759$ ). Podobnie, nie wystąpiła istotna różnica między grupami w 24. miesiącu (OR 1,15; 95% CI 0,47; 2,80;  $p = 0,767$ ). Wśród pacjentów nieleczonych glikokortykosteroidami zwłóknienie w skali  $\geq 2$  było istotnie rzadsze w przypadku CsA w porównaniu z takrolimusem w 12. miesiącu (7/37 [18,9%] vs. 16/38 [42,1%];  $p = 0,029$ ). Wyniki te nie wykazały różnic

w zwłóknieniu wątroby wywołanym przez HCV po przeszczepieniu pomiędzy pacjentami leczonymi CsA lub takrolimusem w schematach zawierających steroidy, podczas gdy CsA w protokołach bez steroidów wiązało się ze zmniejszoną ciężkością progresji zwłóknienia w 1 rok po przeszczepieniu [105].

W innym doświadczeniu badacze bazujący również na modelu zwierzęcym skupili się głównie na różnicy w potencjale włóknienia i wykazali, że takrolimus ma mniejszy potencjał, niż cyklosporyna. Grupy doświadczalne (sześć zwierząt na grupę) otrzymywały cyklosporynę A w dawce 10 mg/kg dziennie, takrolimus w dawce 0,2 mg/kg dziennie lub nie traktowano ich wcale. Zwierzęta zabijano w wieku 16 tygodni, a ekspresję genów związanych ze zwłóknieniem w korze nerkowej badano za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą. Wnioski jakie płynęły z tej publikacji mówiły, iż zwierzęta leczone takrolimusem miały znacznie mniej białkomoczu i miały niższy poziom kreatyniny w surowicy niż te otrzymujące cyklosporynę. Podawanie takrolimusu również znacząco zmniejszało ekspresję transformującego czynnika wzrostu beta i tkankowego inhibitora metaloproteinaz -1, produktów genów związanych ze zwłóknieniem. Chociaż leczenie cyklosporyną obniżyło poziomy enzymów rozkładających macierz, metaloproteinazy macierzy MMP -2 i MMP-9, nie było to statystycznie istotne. W tym modelu takrolimus ma mniejszą nefrotoksyczność, niż cyklosporyna. Wydaje się również, że ma mniejszy potencjał fibrogenny, co może mieć wpływ na wybór długoterminowego leku immunosupresyjnego w przeszczepieniu nerki [106].

Biorąc pod uwagę zmiany patofizjologiczne zachodzące w nabłonku jelitowym u zwierząt powyższy projekt pozostawia otwartą dyskusję dotyczącą optymalizacji i personalizacji leczenia przy zastosowaniu inhibitorów kalcyneuryny. Na efekt kliniczny inhibitorów kalcyneuryny warunkowany ich właściwościami farmakokinetycznymi, niezbędne jest indywidualne podejście do biorcy narządu przeszczepionego w kwestii doboru schematu immunosupresji, rodzaju CNI, a nawet formulacji leku. Nie można zapominać, że optymalizacja leczenia i jego personalizacja wymagają oceny klinicznej pacjenta, z uwzględnieniem m.in. wieku, współchorobowości, stosowanej farmakoterapii, czynników immunologicznych, w tym jakości przeszczepionego narządu, nawyków behawioralnych-żywnościowych oraz czynników genetycznych.

## 6 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.



## **7 Streszczenie**

### **TYTUŁ: WPŁYW DŁUGOTRWALEJ TERAPII IMMUNOSUPRESYJNEJ NA KOMÓRKI NABŁONKA 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  $\mu\text{m}$ , 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.

## 8 Piśmiennictwo

- [1] Pawłowicz E., Nowicki M.: Modyfikacja leczenia immunosupresyjnego u starszych biorców przeszczepu — obecny stan wiedzy i nadchodzące wyzwania. *Forum Nefrologiczne* 2018; 11(3):205-211.
- [2] de Jong TD, Snoek T, Mantel E, van der Laken CJ, van Vollenhoven RF, Lems WF. Dynamics of the Type I Interferon Response During Immunosuppressive Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2019 Apr 24;10:902. doi: 10.3389/fimmu.2019.00902. PMID: 31068954; PMCID: PMC6491736.
- [3] Bots S, Geese K, Barclay M, D'Haens G. Combination Immunosuppression in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2018 Feb 15;24(3):539-545. doi: 10.1093/ibd/izx065. PMID: 29462391.
- [4] Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M., Wawrocki S., Fol M.: Immunosupresja – wymagający sprzymierzeniec na trudne czasy. *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2015; 69: 1299-1312. e-ISSN 1732-2693
- [5] Rezzani R.: Cyclosporine a and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog. Histochem. Cytochem.* 2004; 39: 85-128.
- [6] Kędzierska K, Sporniak-Tutak K, Kolasa A, Domański L, Domański M, Sindrewicz K, Smektała T, Bober J, Safranow K, Osekowska B, Kabat-Koperska J, Baranowska-Bosiacka I, Parafiniuk M, Urasińska E, Ciechanowski K.: The effect of immunosuppressive therapy on renal cell apoptosis in native rat kidneys. *Histol Histopathol.* 2015; 30(1):105-116.
- [7] Durak I., Ozbek H., Elgun S. Cyclosporine reduces hepatic antioxidant capacity: protective roles of antioxidants. *Int. Immunopharmacol.* 2004; 4(3): 469-473
- [8] Wolf A., Clemann N., Frieauff W., Ryffel B., Cordier A.: Role of reactive oxygen formation in the cyclosporin A-mediated impairment of renal function . *Transplant. Proc.* 1994; 26(5): 2902-2907.
- [9] Neuberger J., Developments in liver transplantation, *Gut* 2004; 53(3): 759-768.
- [10] Działo J., Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A., Deptuła W.: Charakterystyka tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego. *Alergia Astma Immunologia* 2010, 15 (4): 197-202.
- [11] Aggrawal V, Williams MD, Beath SV: Gastrointestinal problems in the immunosuppressed patient. *Archives of Disease in Childhood* 1998;78:5-8.
- [12] Carr K.E., Toner P.G.: Morphology of the Intestinal Mucosa. W: *Pharmacology of Intestinal Permeation I*, Editor T. Z. Csaky Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo 1984: 1-46.
- [13] Buckley A, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Jan 2;10(1):a029314. doi: 10.1101/cshperspect.a029314. PMID: 28507021; PMCID: PMC5749156.
- [14] Kagnoff MF. The intestinal epithelium is an integral component of a communications

- network. *J Clin Invest*. 2014 Jul;124(7):2841-3. doi: 10.1172/JCI75225. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24983425; PMCID: PMC4071395.
- [15] Madara, J.L. (2011). Functional Morphology of Epithelium of the Small Intestine. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung (Ed.). <https://doi.org/10.1002/cphy.cp060403>
- [16] Zhang, M., & Wu, C. (2020). The relationship between intestinal goblet cells and the immune response. *Bioscience reports*, 40(10), BSR20201471. <https://doi.org/10.1042/BSR20201471>
- [17] Liu Y., Ding Y. et al. . (2017) Research progress of intestinal goblet cells and their functions. *World Chin. J. Digestion* 25, 1279–1286 10.11569/wcjd.v25.i14.1279
- [18] Yang W., Lai L. et al. . (2018) Research progress on the role of intestinal goblet cells in intestinal immune regulation. *J. Cell Mol. Immunol.* 34, 1046–1050
- [19] Lelouard H, Sahuquet A, Reggio H, Montcourrier P. Rabbit M cells and dome enterocytes are distinct cell lineages. *J Cell Sci.* 2001 Jun;114(Pt 11):2077-83. doi: 10.1242/jcs.114.11.2077. PMID: 11493643
- [20] Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*. 1974 Feb;66(2):189-203. PMID: 4810912.
- [21] Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Jan;52(1):2-12. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x. Epub 2007 Dec 10. PMID: 18081850.
- [22] Dillon A, Lo DD. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Front Immunol.* 2019;10:1499. Published 2019 Jul 2. doi:10.3389/fimmu.2019.01499
- [23] Jameson JM, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. *Front Biosci.* 2004; 9:2640–2651.
- [24] Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL.  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol.* 2017 Dec;17(12):733-745. doi: 10.1038/nri.2017.101. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28920588; PMCID: PMC5771804.
- [25] Ismail, A. S., Severson, K. M., Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Yu, X., Benjamin, J. L., Ruhn, K. A., Hou, B., DeFranco, A. L., Yarovinsky, F., & Hooper, L. V. (2011). Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), 8743–8748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019574108>
- [26] Olivares-Villagómez D, Van Kaer L (2018) Intestinal intraepithelial lymphocytes: sentinels of the mucosal barrier. *Trends Immunol* 39:264–275
- [27] Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*. 2005 Aug 19;309(5738):1256-9. doi: 10.1126/science.1112521. PMID: 16109882.

- [28] Kurokawa K, Hayakawa Y, Koike K. Plasticity of Intestinal Epithelium: Stem Cell Niches and Regulatory Signals. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 31;22(1):357. doi: 10.3390/ijms22010357. PMID: 33396437; PMCID: PMC7795504.
- [29] Bankaitis ED, Ha A, Kuo CJ, Magness ST. Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury. *Gastroenterology.* 2018 Nov;155(5):1348-1361. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.016. Epub 2018 Aug 15. PMID: 30118745; PMCID: PMC7493459.
- [30] Baulies A, Angelis N, Li VSW. Hallmarks of intestinal stem cells. *Development.* 2020 Aug 3;147(15):dev182675. doi: 10.1242/dev.182675. PMID: 32747330.
- [31] Gerbe F, Legraverend C, Jay P. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Sep;69(17):2907-17. Doi: 10.1007/s00018-012-0984-7. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22527717; PMCID: PMC3417095.
- [32] Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jan;59(1):156-70. doi: 10.1007/s00018-002-8412-z. PMID: 11846026.
- [33] Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011 May;9(5):356-68. doi: 10.1038/nrmicro2546. Epub 2011 Mar 22. PMID: 21423246.
- [34] Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):415-8. doi: 10.1038/nature09637. Epub 2010 Nov 28. PMID: 21113151; PMCID: PMC3547360.
- [35] Mei X, Gu M, Li M. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Aug 12;11(1):349. doi: 10.1186/s13287-020-01857-7. PMID: 32787930; PMCID: PMC7425583.
- [36] Sternini C, Anselmi L, Rozengurt E. Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008 Feb;15(1):73-8. doi: 10.1097/MED.0b013e3282f43a73. PMID: 18185066; PMCID: PMC2943060.
- [37] Osinski C, Moret D, Clément K, Serradas P, Ribeiro A. Enteroendocrine System and Gut Barrier in Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 29;23(7):3732. doi: 10.3390/ijms23073732. PMID: 35409092; PMCID: PMC8998765.
- [38] Guo X, Lv J, Xi R. The specification and function of enteroendocrine cells in *Drosophila* and mammals: a comparative review. *FEBS J.* 2021 Jun 11. doi: 10.1111/febs.16067. Epub ahead of print. PMID: 34115929.
- [39] Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Apr;15(4):226-237. doi: 10.1038/s41574-019-0168-8. PMID: 30760847.
- [40] Pawlina W., Ross M.H. Small intestine. In: *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology 8th Edition*, Copyright© Wolters Kluwer 2020: 626-635.
- [41] Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2. doi:



10.1016/j.jaci.2009.05.038. PMID: 19560575; PMCID: PMC4266989.

[42] Buckley CD, Tan J, Anderson KL, Hanein D, Volkmann N, Weis WI, Nelson WJ, Dunn AR. Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*. 2014 Oct 31;346(6209):1254211. doi: 10.1126/science.1254211. PMID: 25359979; PMCID: PMC4364042.

[43] Węgrzyn D., Adamek K., Łoniewska B.: Budowa bariery jelitowej Structure of the intestinal barrier. *Pomeranian J Life Sci* 2017;63(3):6-9

[44] Koch S, Nusrat A. The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. *Annual review of pathology*. 2012;7:35–60.

[45] Heinemann U, Schuetz A. Structural Features of Tight-Junction Proteins. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 29;20(23):6020. doi: 10.3390/ijms20236020. PMID: 31795346; PMCID: PMC6928914.

[46] Scalise AA, Kakogiannos N, Zanardi F, Iannelli F, Giannotta M. The blood-brain and gut-vascular barriers: from the perspective of claudins. *Tissue Barriers*. 2021 Jul 3;9(3):1926190. doi: 10.1080/21688370.2021.1926190. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34152937; PMCID: PMC8489939.

[47] Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Apr 2;10(4):a029181. doi: 10.1101/cshperspect.a029181. PMID: 28600395; PMCID: PMC5773398.

[48] Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res*. 2018 Dec 16;2018:2645465. doi: 10.1155/2018/2645465. PMID: 30648119; PMCID: PMC6311762.

[49] Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jun;15(6):397-410. doi: 10.1038/nrm3802. Epub 2014 May 14. PMID: 24824068.

[50] Pinheiro D, Bellaïche Y. Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Dev Cell*. 2018 Oct 8;47(1):3-19. doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.014. Erratum in: *Dev Cell*. 2018 Nov 5;47(3):391. PMID: 30300588.

[51] Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281(47):35593-7. doi: 10.1074/jbc.R600027200. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17005550; PMCID: PMC3368706.

[52] Tariq H, Bella J, Jowitt TA, Holmes DF, Rouhi M, Nie Z, Baldock C, Garrod D, Tabernero L. Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):5395-400. doi: 10.1073/pnas.1420508112. Epub 2015 Apr 8. PMID: 25855637; PMCID: PMC4418904.

[53] Green KJ, Jaiganesh A, Broussard JA. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Res*. 2019 Dec 30;8:F1000 Faculty Rev-2150. doi: 10.12688/f1000research.20942.1. PMID: 31942240; PMCID: PMC6944264.

[54] Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018 Jan;1860(1):5-8. doi:

- 10.1016/j.bbamem.2017.05.016. Epub 2017 May 27. PMID: 28559187; PMCID: PMC5704981.
- [55] Gumber S, Nusrat A, Villinger F. Immunohistological characterization of intercellular junction proteins in rhesus macaque intestine. *Exp Toxicol Pathol.* 2014 Dec;66(9-10):437-44. doi: 10.1016/j.etp.2014.07.004. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25153024; PMCID: PMC4327848.
- [56] Bai D, Yue B, Aoyama H. Crucial motifs and residues in the extracellular loops influence the formation and specificity of connexin docking. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 9–21, 2018. doi:10.1016/j.bbamem.2017.07.003.
- [57] Michelson PH, Tigue M, Jones JC. Human bronchial epithelial cells secrete laminin 5, express hemidesmosomal proteins, and assemble hemidesmosomes. *J Histochem Cytochem.* 2000 Apr;48(4):535-44. doi: 10.1177/002215540004800411. PMID: 10727295.
- [58] Fontao L, Stutzmann J, Gendry P, Launay JF. Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1999 Aug 1;250(2):298-312. doi: 10.1006/excr.1999.4549. PMID: 10413585.
- [59] Geerts D, Fontao L, Nievers MG, Schaapveld RQ, Purkis PE, Wheeler GN, Lane EB, Leigh IM, Sonnenberg A. Binding of integrin  $\alpha 6\beta 4$  to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol.* 1999 Oct 18;147(2):417-34. doi: 10.1083/jcb.147.2.417. PMID: 10525545; PMCID: PMC2174221.
- [60] Walko G, Castañón MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* 2015 Jun;360(3):529-44. doi: 10.1007/s00441-015-2216-6. Epub 2015 May 29. PMID: 26017636; PMCID: PMC4452579.
- [61] Wang W, Zuidema A, Te Molder L, Nahidiazar L, Hoekman L, Schmidt T, Coppola S, Sonnenberg A. Hemidesmosomes modulate force generation via focal adhesions. *J Cell Biol.* 2020 Feb 3;219(2):e201904137. doi: 10.1083/jcb.201904137. PMID: 31914171; PMCID: PMC7041674.
- [62] Te Molder L, de Pereda JM, Sonnenberg A. Regulation of hemidesmosome dynamics and cell signaling by integrin  $\alpha 6\beta 4$ . *J Cell Sci.* 2021 Sep 15;134(18):jcs259004. doi: 10.1242/jcs.259004. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34523678.
- [63] Burridge K, Guilluy C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 2016 Apr 10;343(1):14-20. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.029. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26519907; PMCID: PMC4891215.
- [64] Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Nov;71:75-83. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.027. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28754442.
- [65] Capaldo CT, Farkas AE, Nusrat A. Epithelial adhesive junctions. *F1000prime Rep* 2014;6:1.
- [66] Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2004;6:783-793.
- [67] Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral

membrane protein. *FEBS Lett.* 2000;476:258-261.

[68] Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, et al. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut.* 2009;58:220-227.

[69] Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 2000;14:1749-1753.

[70] Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res.* 1998;43:435-441.

[71] Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am J Pathol.* 2010;177:512-524.

[72] Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:2-18.

[73] Wardill HR, Bowen JM, Gibson RJ. Chemotherapy-induced gut toxicity: are alterations to intestinal tight junctions pivotal? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;70:627-635.

[74] Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66:1031-1038.

[75] Chisholm, M. A., Mulloy, L. L., Jagadeesan, M. & DiPiro, J. T. Impact of clinical pharmacy services on renal transplant patients' compliance with immunosuppressive medications. *Clin. Transplant.* **15**, 330-336 (2001).

[76] Allison, A. C. & Eugui, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118 (2000).

[77] Elion, G. B. Historical background of 6-mercaptopurine. *Toxicol. Ind. Health* **2**, 1-9 (1986)

[78] Fernberg, P. *et al.* Time trends in risk and risk determinants of non-Hodgkin lymphoma in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 2472-2482 (2011).

[79] Bush W.W. Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression. *AACN Clin Issues.* 1999 May; 10: 253-269

[80] Wiesner R.H.Fung J.J. Present state of immunosuppressive therapy in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 2011 Nov; 17: S1-S9

[81] Pillai A.A., Levitsky J.: Overview of immunosuppression in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009 Sep 14; 15: 4225-4233

[82] Karam S, Wali RK. Current State of Immunosuppression: Past, Present, and Future. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2015;25(2):113-34. doi: 0.1615/critreveukaryotgeneexpr.2015011421. PMID: 26080606.

- [83] Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, Akeda T, Naka M, Niwa K, Nakanishi T, Kakeda M, Gabazza EC, Mizutani H. Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naïve T cells into cytokine-producing mature T cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e31465. doi: 10.1371/journal.pone.0031465. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22359594; PMCID: PMC3281079.
- [84] Wiesner R.H.A long-term comparison of tacrolimus (FK506) versus cyclosporine in liver transplantation: a report of the United States FK506 Study Group. *Transplantation*. 1998; 66: 493-499
- [85] O'Grady JG, Hardy P, Burroughs AK, Elbourne D; UK and Ireland Liver Transplant Study Group. Randomized controlled trial of tacrolimus versus microemulsified cyclosporin (TMC) in liver transplantation: poststudy surveillance to 3 years. *Am J Transplant*. 2007 Jan;7(1):137-41. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01576.x. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17109723.
- [86] Law BK. Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Oct;56(1):47-60. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.09.009. PMID: 16039868.
- [87] Yang L, Miao L, Liang F, Huang H, Teng X, Li S, Nuriddinov J, Selzer ME, Hu Y. The mTORC1 effectors S6K1 and 4E-BP play different roles in CNS axon regeneration. *Nat Commun*. 2014 Nov 10;5:5416. doi: 10.1038/ncomms6416. PMID: 25382660; PMCID: PMC4228696.
- [88] Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005;14 Suppl 1:s2-8. doi: 10.1191/0961203305lu2109oa. PMID: 15803924.
- [89] Laliberté J, Yee A, Xiong Y, Mitchell BS. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2896-904. PMID: 9531600.
- [90] Kaltenborn A, Schrem H. Mycophenolate mofetil in liver transplantation: a review. *Ann Transplant*. 2013 Dec 18;18:685-96. doi: 10.12659/AOT.889299. PMID: 24346057
- [91] Staats C.E., Tett S.E. Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: an update. *Arch Toxicol*. 2014; 88: 1351-1389
- [92] Behrend M. Mycophenolate mofetil: suggested guidelines for use in kidney transplantation. *BioDrugs*. 2001;15(1):37-53. doi: 10.2165/00063030-200115010-00004. PMID: 11437674.
- [93] Zwerner J, Fiorentino D. Mycophenolate mofetil. *Dermatol Ther*. 2007 Jul-Aug;20(4):229-38. doi: 10.1111/j.1529-8019.2007.00136.x. PMID: 17970888.
- [94] Panackel C, Mathew JF, Fawas N M, Jacob M. Immunosuppressive Drugs in Liver Transplant: An Insight. *J Clin Exp Hepatol*. 2022 Nov-Dec;12(6):1557-1571. doi: 10.1016/j.jceh.2022.06.007. Epub 2022 Jun 22. PMID: 36340316; PMCID: PMC9630030.
- [95] Sobotková M, Bartůňková J. Current trends in immunosuppressive treatment. *Vnitr Lek*. 2019 Winter;65(2):163-142. English. PMID: 30909704.
- [96] Dunn, C. J., Wagstaff, A. J., Perry, C. M., Plosker, G. L. & Goa, K. L. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)<sup>1</sup> in organ transplantation. *Drugs* 61, 1957–2016 (2001).
- [97] Woron J.: Interakcje leków immunosupresyjnych - dlaczego są tak istotne w praktyce

klinicznej. Forum Nefrologiczne 2019, tom 12, nr 2, 106–113 Copyright © 2019 Via Medica ISSN 1899–333.

[98] Kurnatowska I. Optymalizacja leczenia takrolimusem po przeszczepieniu nerki. Forum Nefrologiczne 2020, tom 13, nr 3, 128–137. ISSN 1899–3338

[99] Neuringer, I. P. et al. Calcineurin inhibitor effects on growth and phenotype of human airway epithelial cells in vitro. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2660–2670 (2005).

[100] Kang, T. H. et al. Annexin A5 as an immune checkpoint inhibitor and tumor-homing molecule for cancer treatment. *Nat. Commun.* 11, 1137 (2020).

[101] Pittman, M. E., Jessurun, J. & Yantiss, R. K. Differentiating Posttransplant Inflammatory Bowel Disease and Other Colitides in Renal Transplant Patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 41, 1666–1674 (2017).

[102] Malinowski M, Martus P, Neuhaus P, Stockmann M. The influence of commonly used immunosuppressive drugs on the small bowel functions - a comparative experimental study. *Ann Transplant.* 2009 Apr-Jun;14(2):38-44. PMID: 19487793.

[103] Malinowski M, Martus P, Lock JF, Neuhaus P, Stockmann M. Systemic influence of immunosuppressive drugs on small and large bowel transport and barrier function. *Transpl Int.* 2011 Feb;24(2):184-93. doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01167.x. Epub 2010 Sep 24. PMID: 21208295.

[104] Stockmann M, Engelmann BE, Langrehr JM, Neuhaus P. Influence of immunosuppressive drugs on intestinal epithelial transport function. *Transplant Proc.* 2002 Aug;34(5):1449-50. doi: 10.1016/s0041-1345(02)02924-x. PMID: 12176434.

[105] Levy, G. et al. REFINE: a randomized trial comparing cyclosporine A and tacrolimus on fibrosis after liver transplantation for hepatitis C. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 635–646 (2014)

[106] Jain, S., Bicknell, G. R. & Nicholson, M. L. Tacrolimus has less fibrogenic potential than cyclosporin A in a model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 87, 1563–1568 (2000).

[107] Hong SN, Dunn JC, Stelzner M, Martín MG. Concise Review: The Potential Use of Intestinal Stem Cells to Treat Patients with Intestinal Failure. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Feb;6(2):666-676. doi: 10.5966/sctm.2016-0153. Epub 2016 Sep 16. PMID: 28191783; PMCID: PMC5442796.



## **Spis tabel, rycin, schematów**

Rycina 1. Ściana jelita cienkiego (materiał własny).

Rycina 2. Nabłonek kosmka jelitowego (materiał własny).

Rycina 3. Komórki Panetha w dnie krypty jelitowej

Rycina 4. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny skojarzone z rapamycyną i glikokortykosteroidem (CRG i TRG). Barwienie hematoksylina-eozyna (H-E); Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu\text{m}$ .

Rycina 5. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny (CRG i TRG). Włókna kolagenowe w błonie śluzowej wybarwione na kolor intensywnie niebieski. Barwienie *Mallory Trichrome*; Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu\text{m}$ .

Rycina 6. Kosmki jelitowe oraz krypty jelitowe w blaszce właściwej błony śluzowej szczurów z grupy kontrolnej oraz z dwóch grup doświadczalnych, którym podawano leki immunosupresyjne, zaliczane do inhibitorów kalcyneuryny (CRG i TRG). Barwienie: Impregnacja srebrem. Powiększenie obiektywu x 40; bar 100  $\mu\text{m}$ .

Rycina 7. Ilościowa cyfrowa analiza immunoekspresji aneksyny V, wskazującej apoptozę komórek w jelicie cienkim szczurów z grupy kontrolnej oraz CRG i TRG.

Rycina 8. Ilościowa cyfrowa analiza immunoekspresji okludyny, w jelicie cienkim szczurów z grupy kontrolnej oraz z grup doświadczalnych CRG i TRG.

Rycina 9. Analiza cyfrowa immunoekspresji E-kadheryny pomiędzy komórkami nabłonka jelit zwierząt grupy kontrolnej oraz otrzymujących trójlekowy schemat immunosupresji: CRG i TRG.

Rycina 10. Analiza cyfrowa immunoekspresji winkuliny pomiędzy komórkami nabłonka jelit zwierząt grupy kontrolnej oraz grup doświadczalnych CRG i TRG.

Rycina 11. Analiza cyfrowa preparatów jelita cienkiego szczurów z grupy kontrolnej oraz dwóch grup badanych – CRG i TRG, określająca ilościową zawartość włókien kolagenowych typu I.

Schemat 1. Nisza komórek macierzystych jelita cienkiego.

Schemat 2. Schemat przedstawiający historyczne ujęcie wprowadzania leków immunosupresyjnych w terapii pacjentów po przeszczepieniu nerki.

Schemat 3. Schemat podawania szczurom leków immunosupresyjnych w trakcie doświadczenia oraz liczba zwierząt (n) w każdej grupie.

Tabela 1. Wysokość komórek nabłonka jelit szczurów z grupy kontrolnej oraz grup doświadczalnych – CRG i TRG.

Tabela 2. Analiza statystyczna wyników, uzyskanych z ilościowej cyfrowej oceny badanych tkanek.