

Tytuł

Wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na rozwój miażdżycy w aorcie brzusznej szczurów.

Wstęp

Obecnie w piśmiennictwie brakuje badań wykazujących wpływ poszczególnych trójlekowych schematów przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na zmiany morfologiczne w naczyniach czy ekspresję MMP-2, MMP-9 i TIMP-1, TIMP-2. Uzyskanie takiej wiedzy wydaje się niezwykle ważne ze względu na możliwość wyeliminowania niektórych czynników ryzyka takich jak rozwarstwienie ściany aorty, jako przykład przewlekłego stosowania kortykosteroidów. Tym bardziej że w terapii pacjentów dobiera się kombinację leków immunosupresyjnych najbardziej optymalnych dla pacjenta, gwarantujących jak najdłuższe przeżycie po transplantacji. Przewlekła dysfunkcja graftu stanowi przyczynę utraty 50% przeszczepionych narządów, a duża część pacjentów umiera z powodu chorób układu krążenia, infekcji lub nowotworów. Dlatego bardzo ważne jest poznanie działań niepożądanych, które leki te mogą wywierać na morfologię i funkcję narządów biorcy.

Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie, czy przewlekłe leczenie immunosupresyjne, według najczęściej stosowanych trójlekowych schematów leczenia immunosupresyjnego u biorców narządów miało wpływ na morfologię aorty brzusznej szczurów oraz ekspresję MMPs i ich inhibitorów.

Cele szczegółowe:

1. Analiza zmian morfologicznych w ścianie aort: wizualizacja włókien kolagenowych, włókien elastycznych, włókien retikulinowych oraz komórek mięśni gładkich naczyń.
2. Ilościowa ocena obszaru zajmowanego przez włókna kolagenowe w środkowej warstwie ściany naczyń.
3. Analiza morfometryczna środkowej warstwy naczyń: grubość błony, odległość pomiędzy blaszkami sprężystymi, liczba jąder komórek mięśni gładkich.

4. Immunoekspresja MMP-2, MMP-9 oraz TIMP-1, TIMP-2 w ścianie aorty brzusznej szczurów.
5. Półilościowa ocena immunoekspresji i immunolokalizacji MMP-1, MMP-2 oraz TIMP-1, TIMP-2 w błonie środkowej aorty.

Materiały i metody

Materiałem biologicznym badania były fragmenty aort szczurów, które stanowiły materiał archiwalny zgromadzony w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Materiał tkankowy został pozyskany z eksperymentu przeprowadzonego na 14-tygodniowych szczurach, samcach rasy Wistar. Zwierzęta podzielono na 6 grup, po 6 osobników w każdej: grupa kontrolna (C) i 5 grup eksperymentalnych. Zwierzęta z grupy kontrolnej nie otrzymywały żadnych leków, podczas gdy szczurom z poszczególnych grup eksperymentalnych podawano różne schematy leczenia immunosupresyjnego. Po upływie 6 miesięcy zwierzęta poddano eutanazji. W trakcie sekcji pobrano fragmenty aorty od każdego szczura. Materiał tkankowy został zabezpieczony w formie bloczków parafinowych.

Zastosowane schematy leczenia immunosupresyjnego:

TRG- takrolimus+rapamycyna+glikokortykosteroid

CRG- cyklosporyna A+rapamycyna+glikokortykosteroid

CMG- cyklosporyna A+mykofenolan mofetylu+glikokortykosteroid

TMG- takrolimus+mykofenolan mofetylu+glikokortykosteroid

MRG- mykofenolan mofetylu+rapamycyna+glikokortykosteroid

Z aort zatopionych w bloczkach parafinowych skrojono skrawki grubości 3-4 μm . Do analizy morfologicznej wykonano barwienia: hematoksylina+eozyna, Mallory trichrome, Picro Sirius Red, impregnacja solami srebra, orceina. W badaniach morfometrycznych wykonano pomiary szerokości błony środkowej, odległości pomiędzy blaszkami sprężystymi oraz liczbę jąder komórek mięśni gładkich naczyń medii. Oceniono zawartość kolagenu w medii wykorzystując oprogramowanie ImageJ. W celu immunoekspresji i immunolokalizacji MMP-2, MMP-9 oraz TIMP-1, TIMP-2 w medii aorty wykonano reakcje immunohistochemiczne z zastosowaniem swoistych przeciwciał. Półilościowe określenie immunoekspresji MMPs i TIMPs przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ Fiji.

Wyniki

1. Najbardziej wyraźne zmiany w budowie ściany naczynia zauważono w grupach CRG i TMG.
2. Zmiany w budowie włókien elastycznych zaobserwowano w grupie TMG i CRG.
3. U szczurów TRG, CRG i TMG zawartość włókien kolagenowych w tunica media, w porównaniu do grupy kontrolnej, była widocznie zwiększona.
4. Zwiększoną zawartość kolagenu typu III zaobserwowano w tunica media szczurów TRG, natomiast zwiększoną ilość włókien kolagenu typu I odnotowano w aorcie szczurów TMG.
5. Wizualizacja kolagenu typu III z zastosowaniem soli srebra wykazała najwyższą zawartość tego białka w tunica media szczurów TRG i CRG.
6. Pomiar szerokości warstwy środkowej naczynia wykazały największe pogrubienie w grupie TMG oraz ścieńczenie tunica media w grupie CRG. Największe odległości między blaszkami sprężystymi zostały zmierzone w grupie TMG, a wartości były ponad 50% większe niż w grupie CMG. Grupa CMG posiadała najkrótsze odległości pomiędzy blaszkami sprężystymi. W grupie TMG liczba jąder komórkowych była największa, trzykrotnie większa niż w grupie MRG.
7. Analiza statystyczna wykazała, że grupy zwierząt traktowane schematami leczenia immunosupresyjnego opartymi na takrolimusie (TRG, TMG) miały największy procent obszaru zajmowanego przez włókna kolagenowe.
8. Ekspresję MMP-2 zaobserwowano w macierzy zewnątrzkomórkowej tunica szczurów TRG, CRG, MRG i CMG. Szczury z grupy kontrolnej oraz TMG nie wykazywały ekspresji MMP-2. Najbardziej wyraźną ekspresję odnotowano w ECM szczurów CRG i MRG. Zastosowane schematy leczenia immunosupresyjnego nie wpływały na ekspresję MMP-9. Ekspresję TIMP-2 zidentyfikowano tylko w tunica media szczurów TRG, podczas gdy ekspresję TIMP-1 wykazano w warstwie środkowej naczynia szczurów TRG, CRG, MRG i CMG. Ekspresji TIMP-1 nie stwierdzono jedynie w ścianie aorty szczurów kontrolnych i TMG

9. Grupa kontrolna TRG, CRG i CMG wykazały zwiększoną ekspresję MMP-2 w stosunku do TIMP-2. Wzrost ekspresji TIMP-2 w porównaniu do MMP-2 zauważono w dwóch grupach, MRG i TMG. Równowaga ekspresji MMP-9/TIMP-1 była przesunięta na korzyść TIMP-1 w grupach TRG, CRG, MRG. Grupa TMG wykazywała zwiększoną ekspresję MMP-9 w porównaniu z ekspresją TIMP-1. Równowaga obszaru ekspresji MMP-9 oraz TIMP-1 była zachowana w grupie kontrolnej oraz w grupie CMG.

Wnioski

1. Przewlekłe leczenie immunosupresyjne zaburza równowagę ekspresji MMP/TIMP, a w konsekwencji wpływa na zmiany morfologiczne, morfometryczne i funkcję ściany aorty.
2. Schematy lecznicze immunosupresyjnego zawierające w swym składzie inhibitory kalcyneuryny wywierały najbardziej niekorzystny wpływ na budowę ściany naczynia.
3. Leki immunosupresyjne na bazie takrolimusy stymulowały proces włóknienia medii aorty szczurów. W przeciwieństwie do cyklosporyny takrolimus nie zwiększał ekspresji MMPs
4. Takrolimus niwelował ochronne, antyproliferacyjne działanie mykofenolanu mofetylu.
5. Połączenie mykofenolanu mofetylu z rapamycyną nie powodowało wystąpienia istotnych zmian morfologicznych oraz morfometrycznych w ścianie aorty. Zdolność antyproliferacyjna MMF została zachowana.