

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



Lek. Anna Surówka

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

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. Kamilia Szumilas

Szczecin 2022 r.

Podziękowania

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor,
Pani dr hab. n. med. Karolinie Kędzierskiej-Kapuzie oraz mojej Promotor pomocniczej,
Pani dr n. med. Kamili Szumilas za poświęcony czas,
wsparcie merytoryczne i życzliwość okazaną podczas
pisania niniejszej rozprawy*

Część niniejszej rozprawy doktorskiej została zawarta w następującej publikacji:

Surówka A, Wilk A, Szumilas K, Kędzierska-Kapuza K. The Effect of Immunosuppressive Drugs on MMPs Activity in The Walls of Blood Vessels - A Systematic Review. *Int J Med Sci.* 2021;18(6):1502-1509. Published 2021 Jan 30. doi:10.7150/ijms.54423

IF 3.738 70 pkt MEiN

Spis treści

I.	Wykaz skrótów stosowanych w pracy	6
II.	Wstęp	11
1.	Wprowadzenie	11
2.	Budowa ściany aorty	12
3.	Metaloproteinazy	14
4.	Leki immunosupresyjne	17
4.1	Inhibitory kalcyneuryny	18
4.2	Inhibitory szlaku mTOR	19
4.3	Antymetabolity.....	20
4.4	Glikokortykosteroidy	20
III.	Cel pracy	22
IV.	Materiał i Metody.....	23
1.	Materiał	23
2.	Analiza morfologiczna	25
3.	Analiza morfometryczna	25
4.	Półilościowa ocena powierzchni zajętej przez włókna kolagenowe w błonie środkowej aorty.	26
5.	Badanie immunohistochemiczne	26
6.	Półilościowe analizy immunoekspresji i immunolkalizacji MMPs i TIMPs w błonie środkowej ściany aorty.....	28
7.	Analiza statystyczna.....	28
V.	Wyniki.....	29
1.	Analiza morfologiczna	29
2.	Analiza morfometryczna	34
3.	Półilościowa ocena powierzchni zajmowanej przez włókna kolagenowe w błonie środkowej aorty.....	35
4.	Badanie immunohistochemiczne	36

5. Ilościowa ocena obszaru ekspresji MMP-2, MMP-9 oraz TIMP-1, TIMP-2 w środkowej warstwie ściany tętnicy	40
VI. Dyskusja.....	42
VII. Wnioski	49
VIII. Streszczenie.....	50
IX. Abstract	54
X. Piśmiennictwo	58
XI. Spis tabel, rycin i rysunków	67

I. Wykaz skrótów stosowanych w pracy

AD	ang. <i>aortic dissection</i> – rozwarstwienie aorty
AngII	ang. <i>angiotensin II</i> – angiotenstyna II
BAPN	ang. β -aminopropionitrile – β -aminopropionitryl
CD40	ang. <i>cluster of differentiation 40</i> – białko występujące na powierzchni komórek prezentujących antygen
CNI	ang. <i>calcineurin inhibitor</i> – inhibitor kalcyneuryn
CsA	ang. <i>cyclosporine A</i> – cyklosporyna A
DAB +	ang. <i>3,3'-diaminobenzidine</i> – 3,3'-diaminobenzzydina
DNA	ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> – kwas dezoksyrybonukleinow
ECM	ang. <i>extracellular matrix</i> – macierz pozakomórkowa
EGF	ang. <i>epidermal growth factor</i> – naskórkowy czynnik wzrostu
FGF	ang. <i>fibroblast growth factor</i> – czynnik wzrostu fibroblastów
FKBP	ang. <i>FK506 binding proteins</i> – białka wiążące FK506
FKPB 12	ang. <i>FK506 binding protein-12</i> – białka wiążące FK506-12
GAG	glikozoaminoglikan
GKS	glikokortykosteroidy
H-E	ang. <i>hematoxylin and eosin</i> – hematoksylina i eozyna
HGF	ang. <i>hepatocyte growth factor</i> – czynniki wzrostu hepatocytów
IHC	ang. <i>immunohistochemistry</i> – immunohistochemia
HLA	ang. <i>human leukocyte antigen</i> – układ zgodności tkankowej człowieka

HRP	ang. <i>horseradish peroxidase</i> – peroksydaza chrzanowa
IL-1	ang. <i>interleukin-1</i> – interleukina 1
IL-2	ang. <i>interleukin-2</i> – interleukina 2
IL-3	ang. <i>interleukin-3</i> – interleukina 3
IL-4	ang. <i>interleukin-4</i> – interleukina 4
IL-6	ang. <i>interleukin-6</i> – interleukina 6
MMF	ang. <i>mycophenolate mofetil</i> – mykofenolan mofetylu
MMPs	ang. <i>matrix metalloproteinases</i> – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
MMP-1	ang. <i>matrix metalloproteinase-1</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-1
MMP-2	ang. <i>matrix metalloproteinase-2</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-2
MMP-3	ang. <i>matrix metalloproteinase-3</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-3
MMP-7	ang. <i>matrix metalloproteinase-7</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-7
MMP-8	ang. <i>matrix metalloproteinase-8</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-8
MMP-9	ang. <i>matrix metalloproteinase-9</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-9
MMP-10	ang. <i>matrix metalloproteinase-10</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-10
MMP-11	ang. <i>matrix metalloproteinase-11</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-11

MMP-12	ang. <i>matrix metalloproteinase-12</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-12
MMP-13	ang. <i>matrix metalloproteinase-13</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-13
MMP-14	ang. <i>matrix metalloproteinase-14</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-14
MMP-15	ang. <i>matrix metalloproteinase-15</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-15
MMP-16	ang. <i>matrix metalloproteinase-16</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-16
MMP-17	ang. <i>matrix metalloproteinase-17</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-17
MMP-19	ang. <i>matrix metalloproteinase-19</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-19
MMP-20	ang. <i>matrix metalloproteinase-20</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-20
MMP-21	ang. <i>matrix metalloproteinase-21</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-21
MMP-22	ang. <i>matrix metalloproteinase-22</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-22
MMP-24	ang. <i>matrix metalloproteinase-24</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-24
MMP-25	ang. <i>matrix metalloproteinase-25</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-25
MMP-26	ang. <i>matrix metalloproteinase-26</i> – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-26

NFATc	ang. <i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic</i> – cytoplazmatyczny czynnik jądrowy aktywowanych komórek T
PBS	ang. <i>phosphate buffered saline</i> – sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PDGF	ang. <i>platelet-derived growth factor</i> – płytkopochodny czynnik wzrostu
Pro-MMP	ang. <i>pro-matrix metalloproteinase</i> – propeptyd metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
TAAD	ang. <i>thoracic aortic aneurysms and aortic dissections</i> – tętniak i rozwarstwienie aorty piersiowej
TAC	ang. <i>tacrolimus</i> – takrolimus
TBS	ang. <i>tris buffered saline</i> – sól fizjologiczna buforowana tris
TIMPs	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> – tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy
TIMP-1	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinase-1</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy-1
TIMP-2	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinase-2</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy-2
TIMP-3	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinase-3</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy-3
TIMP-4	ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinase-4</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy-4
TNF- α	ang. <i>tumor necrosis factor-α</i> – czynnik martwicy nowotworów alfa
TNF- β	ang. <i>tumor necrosis factor-β</i> – czynnik martwicy nowotworów beta

mTOR	ang. <i>mammalian target of rapamycin</i> – ssaczy cel rapamycyny
mTORC-1	ang. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> – ssaczy cel kompleksu rapamycyny 1
mTORC-2	ang. <i>mammalian target of rapamycin complex 2</i> – ssaczy cel kompleksu rapamycyny 2
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
vSCMs	ang. <i>vascular smooth muscle cells</i> – naczyniowe komórki mięśni gładkich

II. Wstęp

1. Wprowadzenie

Ciągle wzrasta liczba potencjalnych biorców narządów, a wraz z nią powszechne staje się stosowanie leczenia immunosupresyjnego. Terapia immunosupresyjna jest niezbędna u wszystkich pacjentów otrzymujących przeszczep narządu, a jej głównym zadaniem jest stłumienie odpowiedzi immunologicznej organizmu biorcy. Jest to jedyna skuteczna metoda wykorzystywana w transplantologii, zapobiegająca odrzuceniu i umożliwiająca długoterminowe przeżycie przeszczepu. Oczekiwany efekt terapeutyczny leków immunosupresyjnych niesie ze sobą również poważne skutki uboczne takie jak toksyczne działanie na różne narządy wewnętrzne, w tym wątrobę (hepatotoksyczność) czy nerki (nefrotoksyczność) [1–3]. Dlatego też prowadzi się szereg badań dotyczących negatywnego wpływu długoterminowej terapii immunosupresyjnej na wiele narządów, w tym na układ sercowo-naczyniowy [4–7]. Przewlekła dysfunkcja graftu stanowi przyczynę utraty 50% przeszczepionych narządów, natomiast przyczyną śmierci pacjentów po przeszczepieniu są choroby narządów układu krążenia, infekcji lub nowotworów [8–10].

Jak wspomniano powyżej, stosowanie leków immunomodulujących przez biorców jest niezbędne, ich przyjmowanie bowiem zmniejsza częstość ostrego odrzucania narządu oraz determinuje czas prawidłowego funkcjonowania graftu. Z drugiej strony pacjent poddany leczeniu jest narażony na ich toksyczne działanie, co prowadzi do wielu dysfunkcji [11]. Leczenie pacjentów po przeszczepieniu narządu jest leczeniem skojarzonym, w którym łączy się ze sobą określone grupy leków o różnym efekcie działania na komórki.

Aktualnie w piśmiennictwie brakuje badań wskazujących wpływ poszczególnych trójlekowych schematów leczenia immunosupresyjnego na zmiany morfologiczne w ścianie naczyń czy ekspresję MMP-2, MMP-9 i TIMP-1, TIMP-2. Uzyskanie takiej wiedzy wydaje się niezwykle ważne ze względu na możliwość monitorowania niektórych czynników ryzyka takich jak

rozwarstwienie ściany aorty spowodowane przez przewlekłe stosowanie kortykosteroidów [12].

2. Budowa ściany aorty

Aorta jest jednym z największych naczyń krwionośnych budującym układ sercowo-naczyniowy człowieka i jest sklasyfikowana jako duża tętnica typu elastycznego. Kluczowym elementem ściany aorty jest macierz zewnątrzkomórkowa (ECM; *extracellular matrix*), a jej skład i organizacja przestrzenna są niezbędne do zachowania wyjątkowej fizjologicznej funkcji aorty. Ściana aorty zbudowana jest z trzech warstw: błona wewnętrzna (*tunica intima*), błona środkowa (*tunica media*) i błona zewnętrzna (*tunica adventitia*) [13].

Tunica intima, najbardziej wewnętrzna warstwa ściany aorty, wyścielona jest śródbłonkiem - nabłonkiem jednowarstwowym płaskim, spoczywającym na błonie podstawnej. Błona podstawna zawiera typowe dla tej struktur elementy ECM takie jak laminina, kolagen typu IV, fibronektyna, perlekan i glikozaminoglikan – siarczan heparanu, które umożliwiają regulację procesów proliferacji, migracji i przeżycia komórek śródbłonka. Blaszką (błona) sprężystą wewnętrzną oddziela błonę wewnętrzną od błony środkowej [14,15].

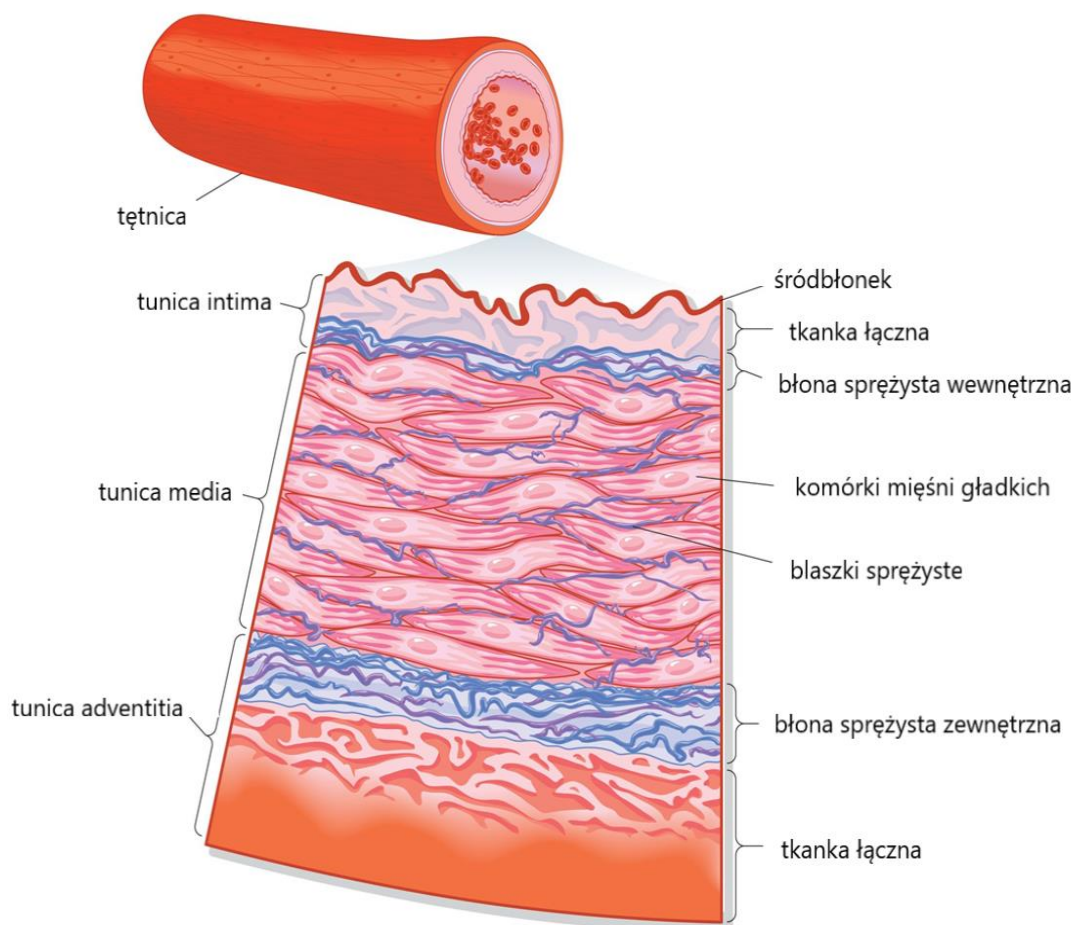
Błona środkowa (*media*) aorty składa się z wielu warstw blaszek sprężystych, o okienkowej budowie, pomiędzy którymi znajdują się komórki mięśni gładkich naczyń (vascular Smooth Muscle Cells: vSMCs), odpowiedzialne za ich syntezę. Wyróżnia się dwie populacje tych komórek, różniących się kształtem i funkcją. Komórki o kształcie wydłużonym, wrzecionowatym oraz o kształcie nabłonkowo/romboidalnym odpowiadają kolejno fenotypowi komórek zróżnicowanych i proliferacyjnych. W warunkach fizjologicznych vSMC o kształcie wrzecionowatym charakteryzują się fenotypem „kurczliwym”, czyli zdolnością do kurczenia się. Kształt komórek zależy od organizacji elementów substancji międzykomórkowej tej warstwy [16,17].

Media aorty oprócz blaszek sprężystych zawiera liczne inne elementy ECM, w tym glikozaminoglikany (GAG), proteoglikany i glikoproteiny, a także kolagen typu I i włókna siateczkowe utworzone z kolagenu typu III [18]. Miocyty gładkie

wraz z włóknami elastycznymi tworzą w medii jednostki elastynowo-kurczliwe, natomiast kolagen fibrylarny odpowiada za wytrzymałość na rozciąganie [19].

Błona sprężysta zewnętrzna jest strukturą odgraniczającą medię od najbardziej zewnętrznej warstwy ściany aorty, tunica adventitia - przydanki. Błona zewnętrzna składa się z tkanki łącznej bogatej w fibroblasty, kolagen oraz włókna elastyczne. Zawiera również naczynioruchowe włókna nerwowe, naczynia krwionośne – vasa vasorum oraz naczynia limfatyczne [13].

Rysunek 1. Budowa ściany aorty [20].



Macierz zewnątrzkomórkowa, w zależności od jej lokalizacji, jest wytwarzana przez vSMCs (tunica media) i fibroblasty (tunica adventitia). Właściwości mechaniczne macierzy zewnątrzkomórkowej determinowane są przez jej skład oraz stopień integralności ze ścianą aorty. Macierz zewnątrzkomórkowa naczyń ulega

ciągłej fizjologicznej przebudowie, a zdegradowane białka są syntetyzowane *de novo* [13].

Nieprawidłowości w procesie przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą prowadzić do rozwoju patologicznych zmian naczyniowych takich jak miażdżyca, tętniaki czy przewlekła niewydolność żylna [21,22]. Integralność naczyń i homeostaza są utrzymywane dzięki dynamice, z jaką komórki oddziałują z elementami ECM. Struktura ECM oraz interakcje zachodzące pomiędzy jej komponentami kontrolowane są przez enzymy z rodziny metaloproteinaz [23,24].

3. Metaloproteinazy

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs) to grupa kilkunastu endopeptydaz o zbliżonej budowie strukturalnej oraz podobnej aktywności wpływającej na składowe ECM oraz otaczającej tkanki łącznej. Działalność proteolityczna MMPs odgrywa znaczącą rolę zarówno w bezpośredniej przebudowie elementów pozakomórkowych, jak i oddziałuje na receptory powierzchniowe komórek czy mediatory znajdujące się w tkance. Celem ich działania jest zachowanie równowagi tkankowej w procesach degradacji i syntezy elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest bardzo istotne w wielu fizjologicznych procesach m.in. w angiogenezie, embriogenezie, gojeniu ran. Niekontrolowany wzrost ekspresji i aktywności MMPs jest charakterystycznym komponentem toczących się zmian o podłożu patologicznym [25–28].

Ze względu na swoistość substratów metaloproteinazy podzielone zostały na pięć głównych grup: kolagenazy: MMP-1, MMP-8, MMP-13; żelatynazy: MMP-2, MMP-9; stromielizyny: MMP-3, MMP-10, MMP-11; matrilizyny: MMP-7, MMP-26; metaloproteinazy typu błonowego: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25; oraz niesklasyfikowane metaloproteinazy: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23. Proteinazy mogą występować w formie wolnej lub przyłączonej do błony komórkowej, jako metaloproteinazy typu błonowego. Pomimo w/w podziałów ogólna struktura budowy endopeptydaz oraz funkcje czynnościowe w dużej mierze są jednorodne dla wszystkich białek [29–31].

W większości każda cząsteczka enzymu składa się z trzech domen: domeny katalitycznej, domeny hemopeksyny oraz prodomeny. Domena katalityczna

zbudowana jest m.in. z jonów cynku i wapnia oraz posiada na swojej powierzchni miejsce aktywne, które nadaje białku funkcję proteolityczną. Struktura miejsca aktywnego determinuje powinowactwo substratowe poszczególnych enzymów. Domena hemopeksyny dzięki zdolności wiązania z inhibitorami metaloproteinaz reguluje aktywność MMPs. Dodatkowo może pomagać w procesie rozpoznawania substratów. Obie domeny połączone są ze sobą elastycznym łącznikiem zbudowanym z 15-65 aminokwasów, którego głównym zadaniem jest stabilizacja cząsteczki. Prodomena dzięki propeptydowi zakrywającemu miejsce aktywne enzymu utrzymuje białko w formie nieaktywnej- proMMP [28,32].

Metaloproteinazy wydzielane są w postaci nieaktywnego proenzymu przez większość komórek tkanki łącznej, w tym komórki śródbłonna, fibroblasty, miocyty, leukocyty [33]. Synteza endopeptydaz pobudzana jest m.in. przez: cytokiny (IL-1, IL-6), czynniki wzrostu (EGF, FGF, VEGF, PDGF, HGF), czynniki martwicy nowotworów (TNF- α , TNF- β), antygeny (CD40), wolne rodniki, plazminę, trombinę, urokinazę, tlenki azotu. Aktywacja metaloproteinaz jest etapem wielokierunkowym, kontrolowanym na poziomie transkrypcji genów, wydzielania zymogenów oraz samej aktywacji proenzymów. Odsłonięcie miejsca aktywnego świadczy o gotowości enzymu do działania proteolitycznego. Obecność jonów wapnia oraz lekko zasadowy / obojętny odczyn środowiska warunkuje aktywność metaloproteinaz [34–36].

Hamowanie aktywnych enzymów odbywa się za pomocą niespecyficznych (α 2-makroglobulina, α 1-antytrypsyna) oraz specyficznych inhibitorów metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (TIMPs). Znane są cztery endogenne inhibitory metaloproteinaz- TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, swoiste względem różnych enzymów. Stosunek natężenia ekspresji MMPs do poziomu ekspresji TIMPs stanowi podstawowy parametr w procesie regulacji aktywności endopeptydaz. Inhibitory tkankowe łączą się z metaloproteinazami w stosunku 1:1. Zerwanie kompleksu skutkuje ponowną aktywacją enzymu [37–39].

Jak wspomniano powyżej metaloproteinazy są sklasyfikowane w obrębie pięciu głównych grup. MMP-2 oraz MMP-9 są enzymami powszechnie uznanymi za przebudowę ścian naczyń krwionośnych. Należą do żelatynaz charakteryzujących

się zdolnością do hydrolizy białek, takich jak kolagen typu III, kolagen typu IV, kolagen typu V, elastyna, laminina, fibronektyna [38,40,41]. Ponadto mają zdolność tworzenia receptorów błonowych, MMP-2 wytwarza receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów, MMP-9 dla IL-2 na limfocytach T [31,33]. Swoistymi inhibitorami dla MMP-2 oraz MMP-9 są odpowiednio TIMP-2 i TIMP-1 [42]. W warunkach fizjologicznych komórki śródbłonna i mięśni gładkich kontrolują wydzielanie MMPs i ich inhibitorów na stałym poziomie [43]. Pozwala to na zachowanie równowagi pomiędzy degradacją a syntezą elementów składowych ściany naczynia krwionośnego. Pod wpływem czynników stresowych, a w konsekwencji w odpowiedzi na toczący się stan zapalny, dochodzi do znacznego wzrostu ekspresji metaloproteinaz [44–47]. Aktywność endopeptydaz jest dodatkowo nasilana przez ciągły przyrost cytokin prozapalnych oraz czynników martwicy nowotworów. Aktywowane metaloproteinazy hydrolizują białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz stymulują do migracji i proliferacji komórki mięśni gładkich naczyń [21,43]. Integralność i homeostaza naczynia są utrzymywane dzięki równowadze i dynamice, z jaką ECM oddziałuje z komórkami. Zaburzenia w tym procesie mogą prowadzić do rozwoju patologicznych zmian naczyniowych takich jak tętniaki, przewlekła niewydolność żylna czy miażdżycy [48].

Powstawanie blaszki miażdżycowej jest procesem dynamicznym, współistniejącym ze zwiększoną ekspresją MMPs, w tym MMP-2 i MMP-9. Wydzielanie enzymów przypisuje się głównie napływającym makrofagom i powstającym komórkom piankowatym. Elementy ECM podlegają zmianom ilościowym i jakościowym. Zwiększona ekspresja MMP-9 i naciek makrofagów są markerami niestabilności blaszki miażdżycowej [49,50]. Blankenberg i wsp. (2003) oraz Ferroni i wsp. (2003) opisali pozytywną korelację pomiędzy zwiększonym stężeniem MMP-9 w surowicy krwi, a występowaniem ostrego zespołu wieńcowego u pacjentów [51,52]. Niekontrolowana aktywność MMPs nie tylko sprzyja procesowi miażdżycy naczyń, ale także rozwojowi nadciśnienia tętniczego, organizacji tętniaków czy występowaniu epizodów niestabilności blaszki miażdżycowej [38]. Nadaktywności poszczególnych peptydaz w surowicy krwi może korelować ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi pacjenta (Tabela 1).

Podsumowując należy podkreślić, że stały poziom ekspresji i aktywności enzymów degradujących białka ECM odgrywa kluczową rolę w prawidłowej morfologii i funkcji naczyń krwionośnych. Utrata kontroli nad tym procesem skutkuje nieprawidłową przebudową ściany naczynia, co ostatecznie przyczynia się do wystąpienia powikłań w postaci chorób sercowo-naczyniowych, a nawet ostrych epizodów niedokrwienia mięśnia sercowego i w konsekwencji śmierci pacjenta.

Tabela 1. Wzrost aktywności poszczególnych MMP w wybranych jednostkach chorobowych.

<i>Jednostka chorobowa</i>	<i>Wzrost aktywności MMP</i>	<i>Referencje</i>
<i>Choroba wieńcowa</i>	MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9	[21,53,54]
<i>Niestabilna choroba wieńcowa</i>	MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-3	[21,53,55,56]
<i>Nadciśnienie tętnicze</i>	MMP-1, MMP-9, TIMP-1	[56–59]
<i>Tętniak aorty</i>	MMP-3, MMP-9	[21,60,61]
<i>Miażdżycy naczyń obwodowych</i>	MMP-2, MMP-9	[38,62]

4. Leki immunosupresyjne

Terapia immunosupresyjna u pacjentów otrzymujących przeszczep najczęściej opiera się na zastosowaniu kombinacji chemioterapeutyków pochodzących z czterech różnych grup lekowych: inhibitorów kalcyneuryny, takich jak cyklosporyna A (CsA) i takrolimus (Tac); inhibitorów mTOR, w tym rapamycyny; antymetabolitów, leków hamujących podziały komórkowe, w tym mykofenolan mofetylu (MMF); glikokortykosteroidów, w tym prednizonu [63]. Schemat leczenia opiera się na jednoczasowym przyjmowaniu trzech różnych leków (Tabela 2).

Tabela 2. Najczęściej stosowane schematy leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

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

4.1 Inhibitory kalcyneuryny

Kalcyneuryna to białko komórkowe o aktywności fosfatazy serynowo-treoninowej i funkcji przekaźnika sygnałów w szlaku prowadzącym do aktywacji limfocytów T [64]. Enzym zbudowany jest z podjednostki katalitycznej, kalcyneuryny A, wiążącej kalmodulinę oraz podjednostki regulacyjnej, kalcyneuryny B, wiążącej wapń. Związanie antygeny z receptorem komórki T prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego wapnia [65]. Jony wapniowe łączą się kalmoduliną i kalcyneuryną B, wytwarzając kompleks kalmodulina-kalcyneuryna-Ca²⁺. Aktywowana w ten sposób fosfataza wpływa na ekspresję odpowiednich genów poprzez defosforylację jądrowych czynników aktywowanych komórek T (NFATc) [66]. Zdefosorylowane formy enzymów przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie przyczyniają się do wzrostu transkrypcji genów dla m.in. IL-2, IL-3, IL-4 oraz czynnika martwicy nowotworów (TNF- α). Powstałe cytokiny pobudzają proliferację i różnicowanie leukocytów. Inhibitory kalcyneuryny wpływają na przebieg opisanego szlaku [67,68].

Immunosupresyjne działanie cyklosporyny opiera się na wiązaniu kalcyneuryny z cyklofiliną. Zapobiega to defosforylacji NFATc, a tym samym aktywacji transkrypcji genów dla m.in. IL-2, IL-3, IL-5 [69,70]. Interleukina-2 jest kluczowym czynnikiem w aktywacji limfocytów T, interferonu gamma oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów [70]. Hamowanie na tym poziomie zapobiega aktywacji komórek T, ale także wpływa na wyciszenie ogólnej, humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej [69]. CsA oprócz właściwości immunomodulujących posiada również wiele działań niepożądanych. Lek ten przyczynia się do powstawiania ostrej i przewlekłej niewydolności nerke oraz nadciśnienia tętniczego. Powikłania te mogą być wynikiem uszkodzenia śródbłonna naczyniowego [69,71].

Struktura cząsteczki Tac jest inna niż CsA, jednakże efekt immunosupresyjny pozostaje podobny do opisanego dla cyklosporyny. Takrolimus tworzy kompleksy z immunofilinami definiowanymi jako białka wiążące FK 506 (FKBP), a połączenie to zatrzymuje defosforylację czynników transkrypcyjnych. Ekspresja cytokin oraz kaskada pobudzająca proliferację i aktywność limfocytów T nie zostaje uruchomiona. Lek nie wpływa na komórki fagocytyjące [71–73]. Takrolimus może wpływać na powstawanie nadciśnienia tętniczego, duszniczy bolesnej oraz kardiomiopatii u dzieci [74].

Ze względu na silne działanie hamujące odpowiedź immunologiczną organizmu oraz wysoką skuteczność w zapobieganiu odrzucenia przeszczepionego narządu inhibitory kalcyneuryny są standardowo stosowane w schematach leczenia immunosupresyjnego [65,66].

4.2 Inhibitory szlaku mTOR

Kinaza serynowo-treoninowa (mTOR) jest białkiem wewnątrzkomórkowym wpływającym na proces transkrypcji i translacji oraz regulującym wzrost, podział i migrację komórek. Kinaza mTOR wchodzi w skład dwóch różnych kompleksów białkowych - mTORC-1 oraz mTORC-2. Rapamycyna, łącząc się z receptorem FKPB-12, hamuje działanie mTORC-1 [75–77]. Powstawały kompleks blokuje wiele swoistych szlaków sygnałowych w komórce m.in. aktywujących limfocyty. Translacja białek zaangażowanych w progresję cyklu komórkowego zostaje

zahamowana, a limfocyty pozostają w fazie G1. Antyproliferacyjny efekt rapaminy odnotowano również w stosunku do komórek mięśni gładkich naczyń. Zaburzenie szlaku mTOR wpływa na rozwój nowotworów oraz chorób sercowo-naczyniowych [75,78,79].

4.3 Antymetabolity

Mykofenolan mofetylu jest inhibitorem dehydrogenazy monofosforanu inozyny, oksydoreduktazy biorącej udział w syntezie puryn. Proliferyjące limfocyty T i B syntezują puryny na drodze de novo, której selektywnym czynnikiem blokującym jest MMF. Zahamowanie syntezy DNA działa w niewielkim stopniu na pozostałe komórki, które w przeciwieństwie do limfocytów mogą syntezować puryny na innym szlaku. Mykofenolan mofetylu znacząco zmniejsza proliferację limfocytów T i B, monocytów, fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich [80,81]. Nie wpływa na działalność neutrofilów oraz nie stymuluje syntezy cytokin [82]. MMF bierze też udział w ograniczaniu stresu oksydacyjnego w przebiegu toczącego się stanu zapalnego oraz ogranicza syntezę tlenku azotu [81]. Nie udowodniono toksycznego działania tego leku na układ sercowo-naczyniowy czy nerki [81–83]. MMF jest skutecznie stosowany w przebiegu zapaleń dużych naczyń krwionośnych [84].

4.4 Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy to grupa leków stworzonych na wzór naturalnie występującego w organizmie człowieka hormonu, kortyzolu. GKS wykazują działanie przeciwzapalne, immunosupresyjne oraz silnie wpływają na wiele szlaków metabolicznych organizmu. Efekt terapeutyczny jest zależny od dawki oraz czasu stosowania leku. W transplantologii wykorzystuje się zdolność GKS m.in. do: hamowania proliferacji limfocytów T, B oraz makrofagów, zmniejszania ekspresji białek układu zdolności tkankowej oraz cząstek adhezyjnych komórki, redukcji syntezy cytokin zapalnych, apoptozy limfocytów [82,83,85]. Ze względu na silne właściwości immunosupresyjne oraz mały wpływ na gospodarkę wodno-elektrolitową w terapii lekowej po przeszczepieniu narządu najczęściej stosuje się prednizon, metyloprednizolon oraz prednizolon. Glikokortykosteroidy indukują wiele chorób metabolicznych takich jak cukrzyca, osteoporoza czy hipercholesterolemia [83,86].

Stosowanie leczenia immunosupresyjnego wiąże się z występowaniem licznych skutków ubocznych. Niekorzystne działanie tej grupy leków zostało potwierdzone w obserwacjach klinicznych pacjentów, a także w wynikach badań prowadzonych na zwierzętach. Zmiany obserwowane były zarówno w obrębie komórek układu immunologicznego, jak i komórek pochodzenia mezenchymalnego, śródbłonkowego i nabłonkowego [87]. Zatem spodziewać się można, że leki immunosupresyjne nie wywierają żadnego efektu wobec komórek śródbłonka naczyń czy komórek mięśni gładkich naczyń. Toksyczność naczyniowa może być również efektem stresu oksydacyjnego wywołanego leczeniem [88]. Miejscowa stymulacja układu immunologicznego oraz napływ komórek zapalnych powoduje wzrost aktywności metaloproteinaz (MMPs), co wiąże się z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej [89].

Poznanie bezpośredniego wpływu najczęściej stosowanych schematów leczenia immunosupresyjnego na morfologię i funkcję ściany naczyń poszerzyłoby wiedzę dotyczącą oddziaływania trójlekowego schematu leczenia, a także być może pozwoliłoby na optymalizację doboru leczenia u każdego pacjenta po przebytej transplantacji.

III. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie, czy przewlekłe stosowanie 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. Półilościowa 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.

IV. Materiał i Metody

1. Materiał

Badania przeprowadzono na aortach brzusznych pozyskanych od samców szczurów szczepu Wistar, materiały zgromadzonym w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Materiał badawczy pobrany został w trakcie realizowania doświadczenia przeprowadzonego wcześniej przez Kędzierska i wsp. (2015) [90]. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja numer 24/2008, data 24 Listopada 2008 rok).

Doświadczenie rozpoczęto na 14-tygodniowych szczurach pozyskanych z licencjonowanej hodowli Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. Do badania zakwalifikowano 36 osobników o średniej masie ciała 305 g. Szczury umieszczono w klatkach po 6 osobników w zwierzętarni Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Pomieszczenie zwierzętarni było klimatyzowane, o stałej temperaturze 22 ± 2 °C i wilgotności powietrza ok. 55 %. Cykl dzień / noc był automatycznie zmieniany co 12 h. Wszystkie szczury przeżyły 2 tygodniowy okres adaptacji. W tym czasie podawano im wodę do picia oraz karmiono specjalistyczną dietą laboratoryjną LSM (1474 kJ/100g, 17,6% białka „Akropol”, Motycz) w celu wyliczenia dobowego zapotrzebowania na pokarm. 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 kombinacje leków odpowiadające trójlekowym schematom leczenia immunosupresyjnego:

T: takrolimus; C: cyklosporyna A; R: rapamycyna; M: mykofenolan mofetylu; G: glikokortykosteroid (Tabela 3).

Zastosowano następujące leki i dawki:

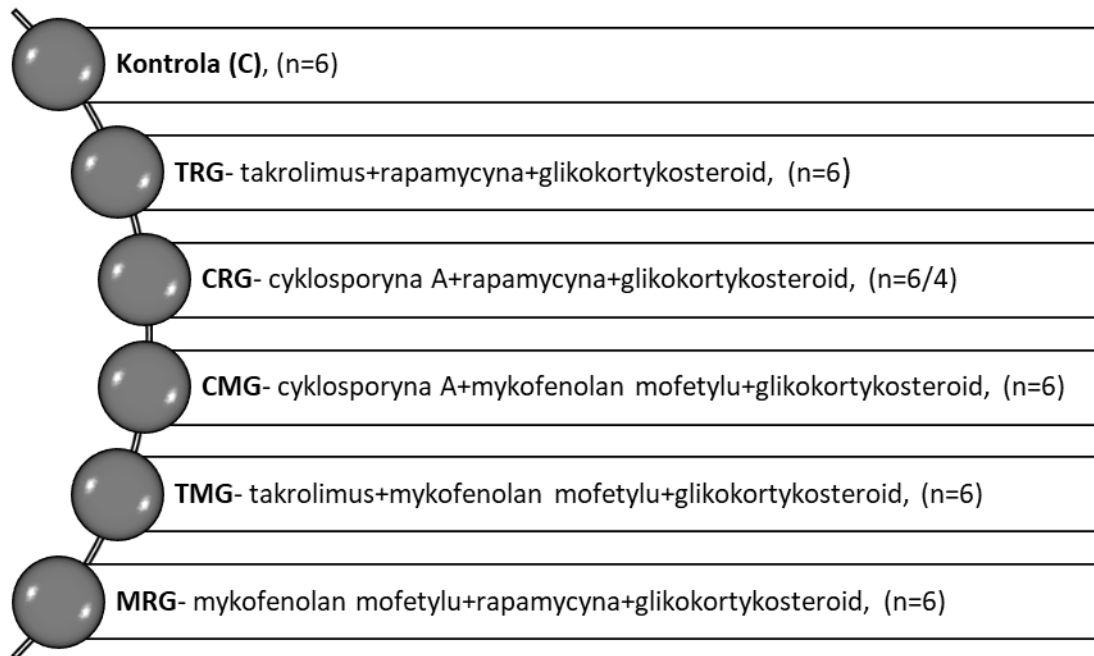
takrolimus (Prograf, Astellas) – 4mg/kg m.c./dobę,

mykofenolan mofetylu (Cellcept, Roche) – 20mg/kg m.c./dobę,

rapamycyna (Rapamune, Wyeth) – 0,5mg/kg m.c./dobę,

cyklosporyna A (Sandimmun – Neoral, Nowartis) – 5mg/kg m.c./dobę,
prednizon (Encorton, Polfa) – 4mg/kg m.c./dobę

Tabela 3. Zastosowane schematy leczenia immunosupresyjnego.



Szczury z każdej grupy doświadczalnej otrzymywały leki co 24 godziny przez 6 miesięcy. Po 3 miesiącach od rozpoczęcia doświadczenia zwierzęta ponownie zważono, a dawki leków dostosowano odpowiednio do wagi zwierzęcia. W trakcie trwania doświadczenia (4. miesiąc) dwa szczury z grupy CRG nie przeżyły i finalnie grupa ta liczyła 4 zwierzęta. Przez czas trwania doświadczenia szczury otrzymywały doustne postaci leków immunosupresyjnych w formie kulek chlebowych. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały kulki bez zawartości leków. Zastosowane dawki leków umożliwiły osiągnięcie stężenia terapeutycznego podawanych substancji w krwi badanych zwierząt. Po 6 miesiącach trwania eksperymentu zwierzęta znieczulono przez dootrzewnowe podanie chlorowodoru ketaminy w dawce 50mg/kg m.c. W badaniu sekcyjnym pobrano fragmenty aorty od każdego szczura, które zarchiwizowano w formie bloczków parafinowych [90].

2. Analiza morfologiczna

Po zakończeniu doświadczenia i wypreparowaniu aorty brzusznej utrwalano w świeżo przygotowanej 4% buforowanej formalinie, kolejni odwadniano poprzez przeprowadzanie tkanek przez szereg odwadniający (alkohol o wzrastającym stężeniu, ksylen), a następnie zatopiono w parafinie [90].

Do oceny morfologicznej z blozków parafinowych aort z każdej grupy zwierząt wykonano 3-4 μm seryjne skrawki aorty, które umieszczano na szkiełkach pokrytych poli-L-lizyną wzmagającą adhezję, a następnie je odparafinowano. Skrawki aorty wybarwiono standardową metodą przeglądową - hematoksyliną i eozyną (H-E). W celu uwidocznienia włókien kolagenowych skrawki barwiono metodą Mallory Trichrome (Bio OpticaMilano, Milano, Italy) oraz czerwienią Syriusza (Picro Sirius Red; Direct Red 80 Sigma Aldrich - 0.1% roztwór Sirius Red in *saturated aqueous picric acid*), zgodnie z metodą opisaną przez Junqueira i wsp. [91]. Do wizualizacji włókien retikulinowych wykorzystano metodę impregnacji srebrem (Bio OpticaMilano, Milano, Italy), natomiast włókna elastyczne identyfikowano po wybarwieniu orceiną (Bio OpticaMilano, Milano, Italy). Po wybarwieniu i nawodnieniu na powierzchnię każdej skrawki naniesiono kroplę medium do zamykania (Entellan™ Sigma-Aldrich, Merck), na którą umieszczono szkiełko nakrywkowe.

Wszystkie powyższe reakcje histochemiczne wykonano zgodnie z załączonymi przez producenta protokołami barwienia. Preparaty ze skrawkami aorty barwionymi czerwienią Syriusza oceniano z wykorzystaniem mikroskopu polaryzacyjnego, pozostałe w mikroskopie świetlnym z polaryzacją (Leica DM5000B, Wetzlar, Niemcy).

3. Analiza morfometryczna

Barwione H-E preparaty aorty posłużyły do przeprowadzenia analizy morfometrycznej, którą wykonano z wykorzystaniem Case Viewer z aplikacją do mikroskopii cyfrowej. Wszystkie pomiary przeprowadzono na preparatach pod powiększeniem obiektywu 40x.

Wykonano pomiary grubości warstwy środkowej ściany aorty, jednak z uwagi na brak wyraźnego rozgraniczenia pomiary wykonano łącznie z warstwą

wewnętrzna. Kolejnym oznaczonym parametrem były pomiary odległości pomiędzy blaszkami sprężystymi w medii aorty. Powyższe pomiary prowadzono w sposób losowy na 6. preparatach aort szczurów z każdej grupy, z wyjątkiem grupy CRG (n= 4). W każdej z grup wykonano 10 pomiarów obu parametrów / preparat aorty jednego szczura. Uzyskane pomiary wyrażono w mikrometrach (μm). Ponadto w aortach szczurów z każdej grupy zwierząt policzono liczbę jąder komórek mięśniowych gładkich (SMCs) zlokalizowanych w warstwie środkowej pomiędzy blaszkami elastycznymi. Jądra wymienionych komórek licząco przy użyciu prostokąta o długości krawędzi: $45,4 \times 60,5\mu\text{m}$. W każdej grupie wykonano po 10 pomiarów dla każdego szczura.

4. Półilościowa ocena powierzchni zajętej przez włókna kolagenowe w błonie środkowej aorty.

W preparatach aorty barwionych metodą Mallory Trichrome (barwienie trójchromowe Mallory'ego) oceniono zawartość kolagenu w medii zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej. W metodzie tej włókna kolagenowe wybarwiają się na głęboki niebieski kolor. Określenia zawartości kolagenu w medii aort szczurów poszczególnych grup zwierząt przeprowadzono na preparatach przy powiększeniu obiektywu 40x z wykorzystaniem oprogramowania wieloplatformowego ImageJ (*ImageJ cross-platform software*). Dla każdego preparatu wybierano losowo 4 obszary dla każdego szczura z każdej grupy, w których mierzono zawartość włókien kolagenowych wyrażoną w procentach.

5. Badanie immunohistochemiczne

W celu immunolokalizacji metaloproteinaz - 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) oraz ich inhibitorów TIMP-2 i TIMP-1 wykorzystano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

- Monoklonalne mysie przeciwciało (2C1) IgG1 przeciw MMP-2 w rozcieńczeniu 1:250 (sc-53630; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA);

- Monoklonalne mysie przeciwciało (3A4) IgG1 przeciw TIMP-2 w rozcieńczeniu 1:250 (sc-21735; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA);
- Monoklonalne mysie przeciwciało (2C3) IgG1 przeciwko MMP-9 w rozcieńczeniu 1:250 (sc-13520; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA);
- Monoklonalne mysie przeciwciało (2A5) IgG1 przeciwko TIMP-1 w rozcieńczeniu 1:250 (sc-21735; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Wszystkie przeciwciała rozcieńczono przy użyciu Diluent (Agilent Dako EnVison, Dania).

Opis procedury:

Skrojone skrawki badanej tkanki o grubości 4 μm , przeznaczone do przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznych (IHC) umieszczono w cieplarni na 2 godziny, zanurzone w naczyniu z ksylenem (trzy zmiany), w celu ich odparafinowania. Skrawki następnie nawodniono, przeprowadzając je przez szereg alkoholu etylowego o zmniejszającym się stężeniu (96%, 90%, i 70%). Tak przygotowane preparaty umieszczano w 0,01 M buforze cytrynianowym o pH = 6,0 i ogrzewano w mikrofalówce przez 10 min celem odsłonięcia antygenu. W celu zablokowania aktywności endogennych peroksydaz skrawki inkubowano w Dual Endogenous Enzyme Block (Agilent Dako EnVison, Dania) przez 10 min. Po zakończeniu tego etapu skrawki inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej z wyżej wymienionymi przeciwciałami pierwszorzędowymi. Do wizualizacji produktu reakcji immunohistochemicznej wykorzystano zestaw EnVision+ Dual Link System-HRP, służący do dwuetapowego barwienia z wykorzystaniem polimeru znakowanego peroksydazą chrzanową (Labelled Polymer HRP; Agilent Dako EnVison, Dania), skoniugowanego z przeciwciałami wtórnymi. Skrawki inkubowano przez 30 minut, a następnie przeprowadzono 10-minutową inkubację z kompleksem substrat-chromogen z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB+) (Agilent Dako EnVison, Dania), co pozwoliło na uwidocznienie brązowego

produktu reakcji w miejscu występowania antygeny. Po zakończeniu tego etapu tkanki przepłukano wodą destylowaną, a następnie przeprowadzono barwienie kontrastowe hematoksyliną (Sigma-Aldrich). Bezpośrednio przed każdą inkubacją tkanki były dwukrotnie płukane w PBS przez 5 minut i umieszczane 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 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) (Wilk i wsp. 2018) [92].

6. Półilościowe analizy immunoekspresji i immunolokalizacji MMPs i TIMPs w błonie środkowej ściany aorty.

Po przeprowadzeniu reakcji immunohistochemicznych oceniano metodą półilościową poziom ekspresji i lokalizację MMP-2 oraz MMP-9, a także ich inhibitorów – kolejno TIMP-2 i TIMP1 w warstwie środkowej aorty zwierząt z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych. Analizę tę przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ Fiji. Stosując powiększenie obiektywu 40x dla każdego preparatu aorty wybierano w medii losowo 4 pola dla szczura z każdej grupy. Uzyskane wyniki analizy półilościowej wyrażano w procentach.

7. Analiza statystyczna

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej wyników uzyskanych w pomiarach morfometrycznych i półilościowych wykorzystano oprogramowanie Statistica 13, a wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne, \pm odchylenie standardowe, mediany oraz wartości minimalne i maksymalne. Podobieństwo rozkładu zmiennych do rozkładu normalnego oceniano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Ponieważ dane nie miały rozkładu normalnego zastosowano test Kruskala-Wallisa, a następnie test post hoc Dunna do porównań między grupami. We wszystkich przypadkach $P < 0,05$ uznawano za istotne statystycznie.

V. Wyniki

1. Analiza morfologiczna

Barwienie H-E

W grupie kontrolnej (C) ściana aorty przedstawiała typową budowę histologiczną. Dobrze rozwinięta błona wewnętrzna wyścielona była śródbłonkiem, z silnie spłaszczonymi jądrami komórkowymi. Nie było wyraźnego odgraniczenia podśródbłonkowej tkanki od błony środkowej. W grubej błonie środkowej widoczne były liczne blaszki sprężyste oraz leżące pomiędzy blaszkami komórki mięśni gładkich z wyraźnymi wydłużonymi jądrami, charakterystycznymi dla komórek o prawidłowej morfologii. Najbardziej zewnętrzna warstwa naczynia, błona zewnętrzna - przydanka, zawierała elementy tkanki łącznej właściwej z widocznymi jądrami komórek w niej obecnych (Rycina 1A). Nie wykazano uchwytanych zmian morfologicznych w ścianie aorty szczurów z grupy MRG (Mykofenolan mofetylu+ Papamycyna+Glikokortykosteroid) oraz CMG (Cyklosporyna+ Mykofenolan mofetylu+ Glikokortykosteroid). Zmiany w morfologii ściany aorty odnotowano u szczurów z trzech grupach badawczych: TRG, CRG i TMG. Różnice te dotyczyły głównie kształtu jąder miocytów gładkich naczyń. Jądra vSMCs z grupy TRG (Rycina 1A, TRG) osiągały kształt owalny z nielicznymi zmianami hipertroficznymi, co w porównaniu z resztą badanych grup oznaczało najmniejszy stopień przebudowy medii aorty. Najbardziej nasilone zmiany dotyczące morfologii vSMC występowały w błonie środkowej aorty szczurów z grupy CRG i TMG (Rycina 1A, CRG i TMG). W medii dominowały owalne komórki hipertroficzne o zaokrąglonym kształcie jąder. Ponadto intima aorty szczurów z grupy CRG była silnie pofałdowana (Rycina 1A, CRG).

Barwienie włókien elastycznych orceiną

Barwienie skrawków orceiną pozwoliło na wizualizację układu blaszek sprężystych w błonie środkowej aorty zwierząt z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych (Ryciny 1B). W barwieniu tym włókna elastyczne przyjmują zabarwienie ciemnobrązowe do różowo-fioletowego. Zmiany w budowie włókien elastycznych odnotowano głównie w grupie CRG i TMG. W błonie środkowej aorty szczurów z grupy CRG układ włókien charakteryzowała wyraźna dezintegracja,

włókna były cienkie i ulegały fragmentacji (Rycina 1B, CRG). W medii aorty szczurów z grupy TMG odnotowano wyraźne pogrubienie blaszek elastycznych (Rycina 1B, TMG).

Barwienie włókien kolagenowych metodą Mallory trichrome

W zastosowanej metodzie barwienia włókna kolagenowe wybarwiają się na kolor ciemnoniebieski, miocyty gładkie – czerwono-buraczkowe, natomiast włókna elastyczne przybierają odcień żółty. W medii aorty szczurów którym podawano tryplety leków według schematu TRG, CRG i TMG zawartość włókien kolagenowych wyraźnie była zwiększona w porównaniu do ich zawartości w medii aort zwierząt z grupy kontrolnej (Rycina 2A).

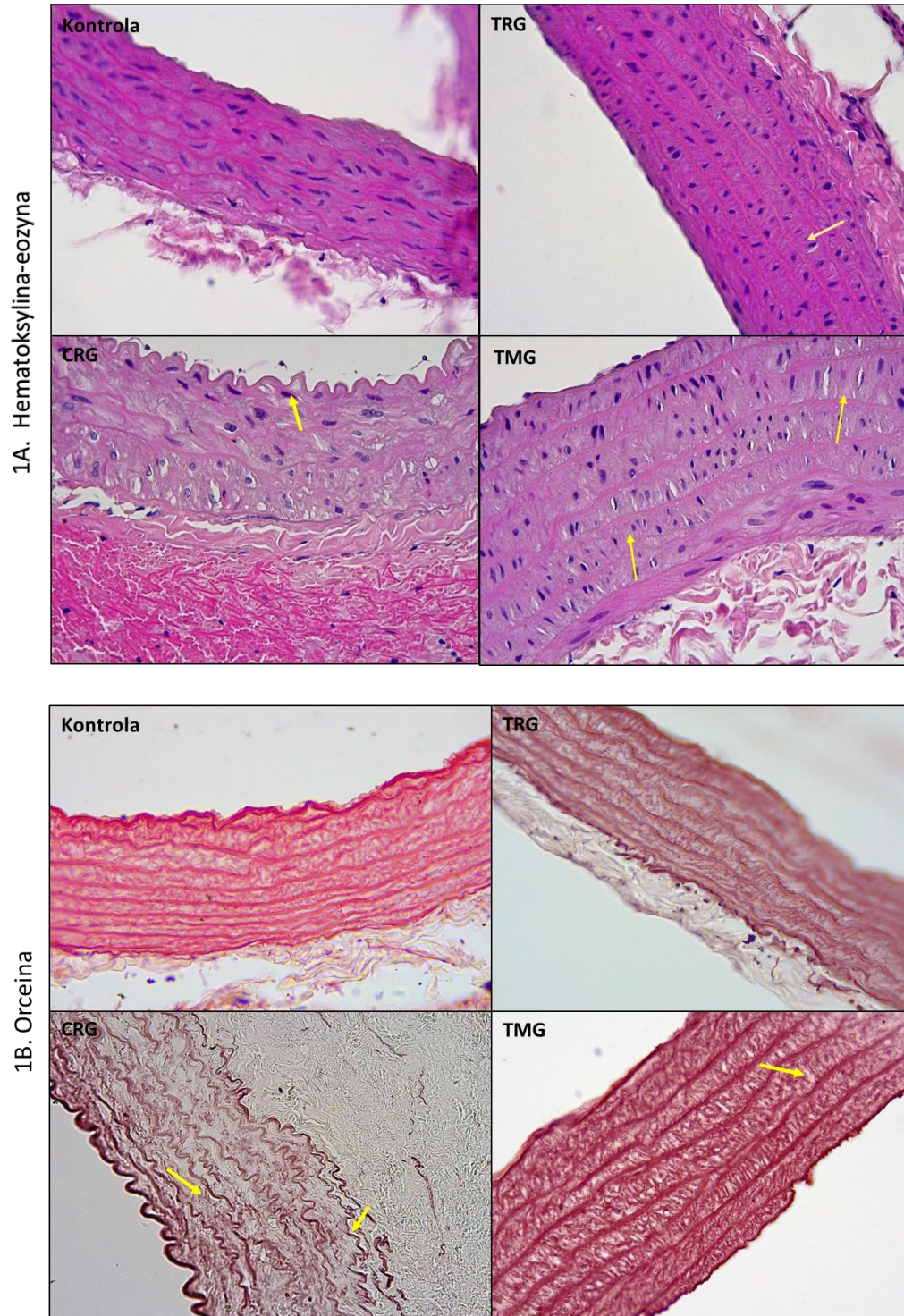
Barwienie włókien kolagenowych przy pomocy Picro Sirius Red

Barwienie skrawków aorty z wykorzystaniem tej metody histochemicznej - dzięki dwójłomności kolagenu - pozwala na uwidocznienie w tkance przebiegu, rozmieszczenia przestrzennego włókien oraz typu kolagenu. W mikroskopie polaryzacyjnym włókna kolagenowe typu I wybarwiają się na intensywny kolor żółty lub żółto-czerwony, natomiast kolagen typu III jest słabo dwójłomny i charakteryzuje się cienkimi włóknami, wybarwiającymi się na kolor zielony. W medii aorty szczurów z grupy kontrolnej dominował kolagen typu III (na rycinach zielone strzałki) i umiarkowana zawartość kolagenu typu I o zabarwieniu żółtym (na rycinach żółte strzałki). Nieznacznie zwiększoną zawartość kolagenu typu III w porównaniu z grupą kontrolną odnotowano w medii aort szczurów z grupy TRG. Wyraźny wzrost ilości kolagenu typu I zaobserwowano w błonie środkowej szczurów z grup CRG i TMG (Rycina 2B).

Barwienie włókien retikulinowych- impregnacja solami srebra

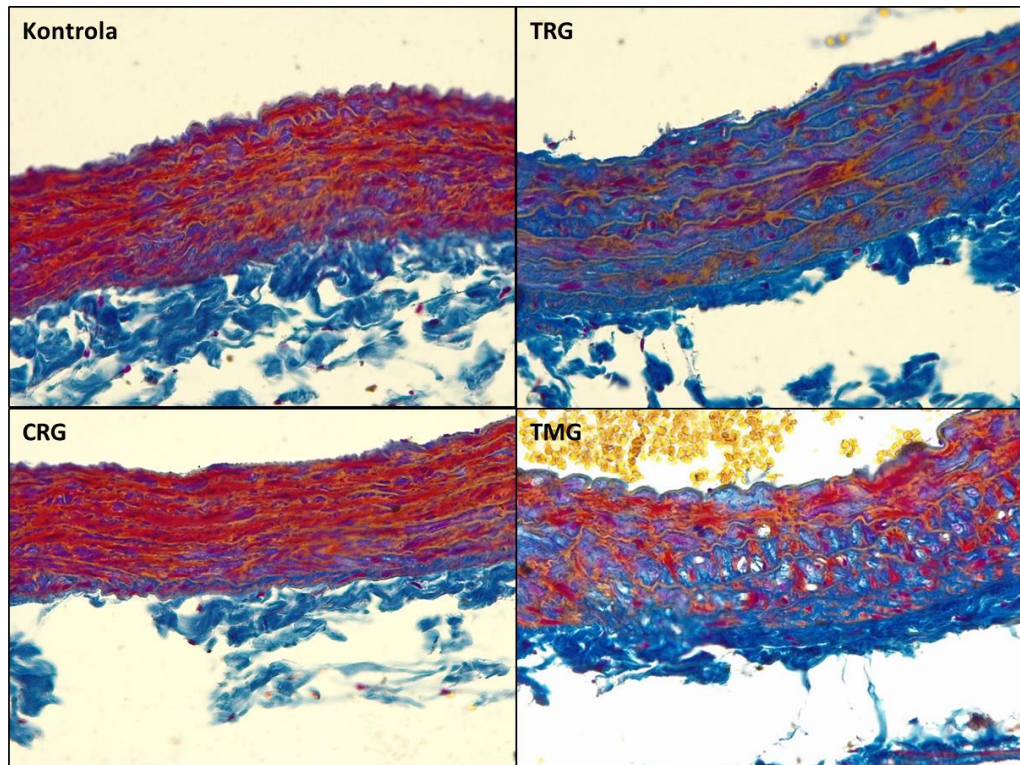
Impregnacja solami srebra pozwoliła zidentyfikować włókna retikulinowe (siateczkowe; argentofilne; srebrochłonne) zbudowane głównie z kolagenu typu III, które nie są widoczne w standardowym barwieniu H-E. Odnotowano podwyższoną zawartość włókien w medii aort szczurów z grup TRG i CRG, a także umiarkowanie podwyższoną ich ilość u szczurów z grupy TMG w odniesieniu do grupy kontrolnej (Rycina 2C).

Rycina 1A, 1B. Aorty szczurów, którym podawano leki immunosupresyjne, według trójleckowego schematu. (A) Barwienie hematoksyliną-eozyną (H-E); (B) Barwienie orceiną. Powiększenie obiektywu x 40; bar 100 μm .

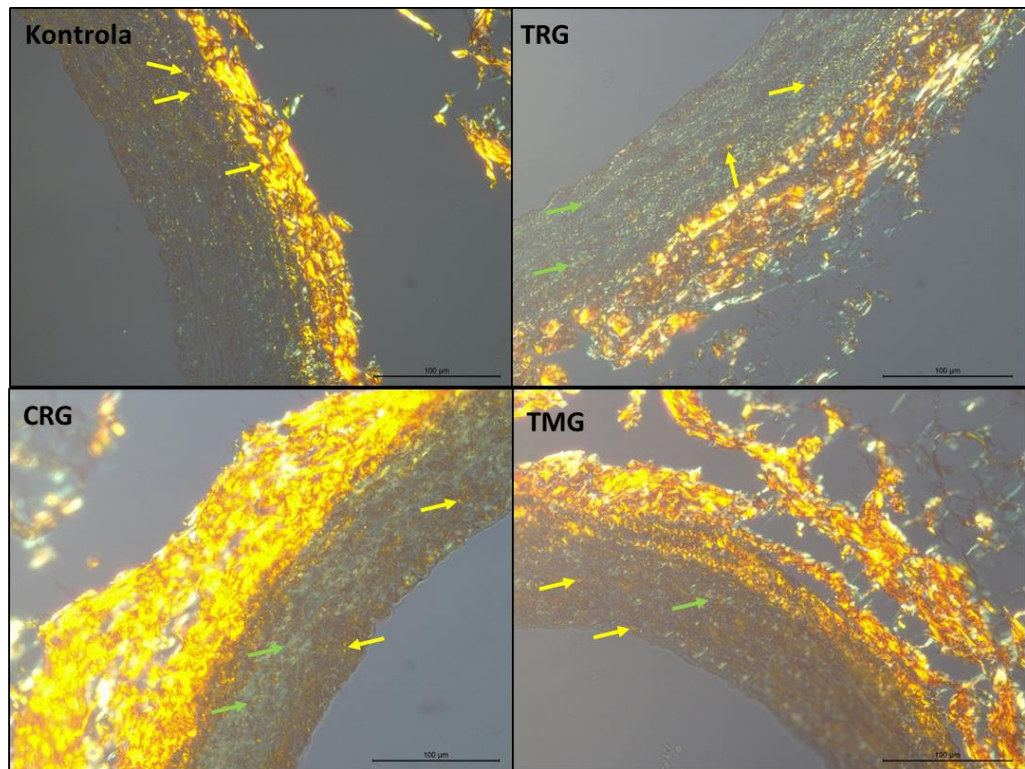


Rycina 2A, 2B, 2C. Wizualizacja włókien kolagenowych (ciemnoniebieski) (A); kolagen typu I o żółtym zabarwieniu i silną dwójłomnością (żółte strzałki); kolagen typu III o zabarwieniu zielonkawym i słabej dwójłomności (zielone strzałki) (B); włókna retikulinowe (kolagen typu III) w ścianie aorty (C).

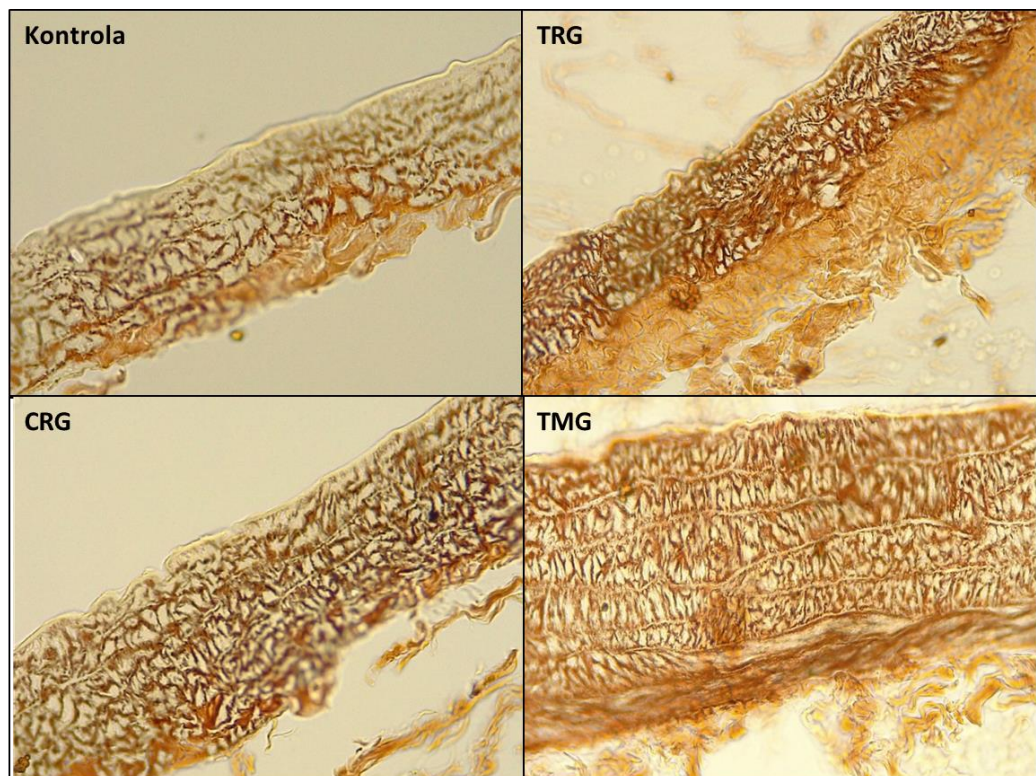
2A. Mallory trichrome



2B. Picro Sirius Red



2C. Impregnacija solami srebra



2. Analiza morfometryczna

Pierwszym parametrem poddanym analizie morfometrycznej była grubość warstwy środkowej aorty szczurów z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych. Najgrubszą medię w odniesieniu do grupy kontrolnej stwierdzono w aorcie szczurów z grupy TMG ($123,81 \pm 6,05$ vs $65,4 \pm 3,09$), natomiast najcieńszą warstwą środkową charakteryzowały się aorty zwierząt z grupy CRG ($49,81 \pm 3,34$ vs $65,4 \pm 3,09$). Analiza statystyczna uzyskanych pomiarów wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grubością medii aort zwierząt z grupy kontrolnej a grubością błony środkowej aorty zwierząt z każdej grupy doświadczalnej. Dodatkowo w tym parametrze występowały różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami: TRG vs CRG oraz TRG vs CMG (Tabela 4).

Pomiary odległości pomiędzy blaszkami sprężystymi błony środkowej wykazały, że najwyższe wartości uzyskano w aorcie zwierząt z grupy TMG ($19,52 \pm 5,41$), a zebrane pomiary były ponad 50% wyższe, niż w grupie CMG ($9,62 \pm 3,11$). W aortach zwierząt z grupy CMG odnotowano bowiem najmniejsze odległości pomiędzy blaszkami sprężystymi medii. Porównując uzyskane wyniki pomiarów w aorcie zwierząt z grupy kontrolnej z grupami MRG i TMG wykazano istotnie statystycznie mniejszą wartość tego parametru w grupie kontrolnej. Występowały również istotne statystycznie różnice w zebranych pomiarach pomiędzy grupami TRG i TMG (Tabela 4).

Największą liczbę jąder miocytów gładkich zawierała błona środkowa aorty szczurów z grupy TMG ($138,66 \pm 8,14$) i była blisko trzykrotnie większa niż w medii zwierząt z grupy MRG ($39,66 \pm 6,12$). Ponadto istotne statystycznie różnice w liczbie jąder miocytów gładkich w medii wykazano pomiędzy grupą kontrolną a grupami badanymi: TRG, MRG, CMG i TMG. Nie wykazano różnic istotnie statystycznych w liczbie jąder w błonie środkowej aorty zwierząt z grupy CRG w porównaniu z grupą kontrolną ($54 \pm 7,48$ vs $53,83 \pm 4,53$) (Tabela 4).

Tabela 4. Parametry morfometryczne uzyskane z pomiarów ściany aorty szczurów traktowanych różnymi schematami leczenia immunosupresyjnego.

	Kontrola (n=6)	TRG (n=6)	CRG (n=4)	MRG (n=6)	CMG (n=6)	TMG (n=6)
<i>Szerokość Tunica Media (µm)</i>						
AM±SD	65.4±3.09	79.83±2.95	49.81±3.34	75.71±5.34	88.06±2.87	123.81±6.05
Mediana	65.3	79.75 *	50.3 ^{*,T}	76.0*	88.15 ^{*,T}	122.3*
Min-max	61.6-70	74.3-84.0	44.7-53.6	69.7-88.1	83.5-93.0	117.1-133.6
<i>Odległość pomiędzy blaszkami sprężystymi w Tunica Media (µm)</i>						
AM±SD	9.26±2.38	10.48±2.82	9.62±3.11	18.54±24.41	10.2±1.98	19.52±5.41
Mediana	9.75	10.65	8.65	14.6*	9.7	17.45 ^{*,T}
Min-max	3.3-14.6	4.8-14.8	2.6-19.1	5.9-143.0	6.6-13.7	11.5-39.0
<i>Liczba jąder komórek mięśni gładkich w Tunica Media</i>						
AM±SD	53.83±4.53	72.33±3.14	54±7.48	39.66±6.12	99.50±10.05	138.66±8.14
Mediana	55.5	72.5*	55.0 ^T	39.0 ^{*,T,C}	98.50 ^{*,T,C,M}	139.0 ^{*,T,C,M}
Min-max	46.0-58.0	68.0-77.0	44.0-62.0	32.0-50.0	89.0-111.0	128.0-151.0

AM: średnia arytmetyczna; SD: odchylenie standardowe; n – liczba mierzonych parametrów; Min-max-minimalna i maksymalna wartość;

*p < 0.05 vs kontrola; ^Tp < 0.05 vs TRG; ^Cp < 0.05 vs CRG; ^Mp < 0.05 vs MRG; ^Δp < 0.05 vs CMG; [^]p < 0.05 vs TMG

3. Półościowa ocena powierzchni zajmowanej przez włókna kolagenowe w błonie środkowej aorty.

Oceniono odsetek powierzchni warstwy środkowej aorty szczurów kontrolnych i doświadczalnych zajmowanej przez włókna kolagenowe. Analiza statystyczna i porównanie uzyskanych wyników wykazała, że w medii aort zwierząt z grup którym podawano leki zgodnie z protokołami opartymi na takrolimusie (TRG i TMG) występował największy odsetek obszaru zajmowanego przez włókna kolagenowe w porównaniu z grupą kontrolną i grupami zwierząt, którym podawano leki zawierające Rapa, CsA i MMF (Tabela 5), ale także z każdą grupą zwierząt otrzymujących tryplety leków (Tabela 6).

Tabela 5. Obszar zajmowany przez włókna kolagenowe w tunica media w poszczególnych grupach szczurów.

Parametr/grupa	Kontrola (n=24)	TRG (n=24)	CRG (n=16)	MRG (n=24)	CMG (n=24)	TMG (n=24)
Obszar zajęty przez włókna kolagenowe w <u>tunica media</u> (%)						
AM ± SD	43.3 ± 19.6	85.25 ± 4.8	70.0 ± 4.06	57.89 ± 11.81	66.81 ± 8.21	92.36 ± 6.21
Mediana	45.56	86.24*	70.0*	58.3 [†]	66.46 [†]	94.02* ^{CMΔ}
Min-Max	10.62-74.65	73.3-92.21	61.84-	27.07-73.97	55.58-85.46	76.06-97.97
						75.32

AM: średnia arytmetyczna; SD: odchylenie standardowe; n – liczba mierzonych obszarów; Min-Max: minimalne i maksymalne wartości;

*p < 0.05 vs kontrola; [†]p < 0.05 vs TRG; [‡]p < 0.05 vs CRG; ^Δp < 0.05 vs MRG; ^Δp < 0.05 vs MRG

Tabela 6. Obszar zajmowany przez włókna kolagenowe w tunica media w poszczególnych protokołach lekowych opartych na takrolimusie, cyklosporynie A, mykofenolanie mofetylu lub rapamycynie.

Parametr/grupa	Kontrola (n=24)	Tac – protokoły (TRG, TMG) (n=48)	CsA – protokoły (CRG, CMG) (n=40)	MMF – protokoły (MRG, CMG, TMG) (n=72)	Rapamycyna – protokoły (TRG, CRG, MRG) (n=64)
Obszar zajęty przez włókna kolagenowe w <u>tunica media</u> (%)					
AM ± SD	43.31 ± 19.6	88.81 ± 6.56	68.08 ± 7.0	72.3 ± 17.2	71.18 ± 14.37
Median	45.56	89.35*	67.28* [†]	68.18* [†]	71.75* [†]
Min-Max	10,62-74,61	73,3-97,97	55,58-85,46	27,07-97,97	26,47-92,21

AM: Średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; n – liczba mierzonych obszarów; Min-Max: minimalne i maksymalne wartości;

*p < 0.05 vs kontrola; [†]p < 0.05 vs Tac –protokoły

4. Badanie immunohistochemiczne

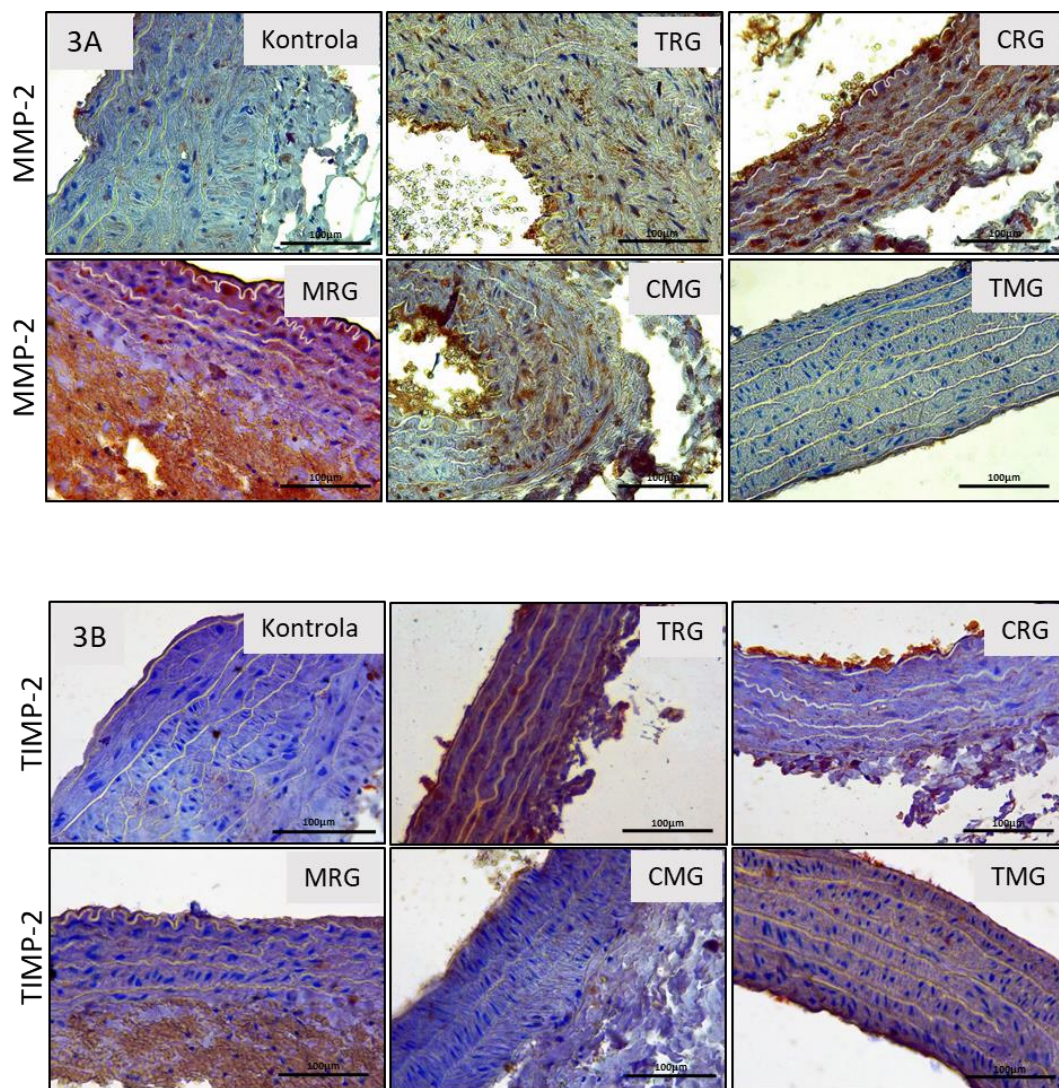
Zaobserwowane zmiany w zawartości włókien kolagenowych w błonie środkowej aorty sugerowały wpływ metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 oraz ich inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 na regulację obrotu (degradacji i syntezy) tego białka w błonie środkowej aorty zwierząt z grupy kontrolnej i grup doświadczalnych.

Immunoekspresję MMP-2 odnotowano w macierzy zewnątrzkomórkowej medii szczurów z grup otrzymujących następujące grupy leków: TRG, CRG, MRG i CMG. W błonie środkowej aorty zwierząt z grupy kontrolnej oraz TMG nie wykazano ekspresji tej metaloproteinazy. Najbardziej wyraźną ekspresję

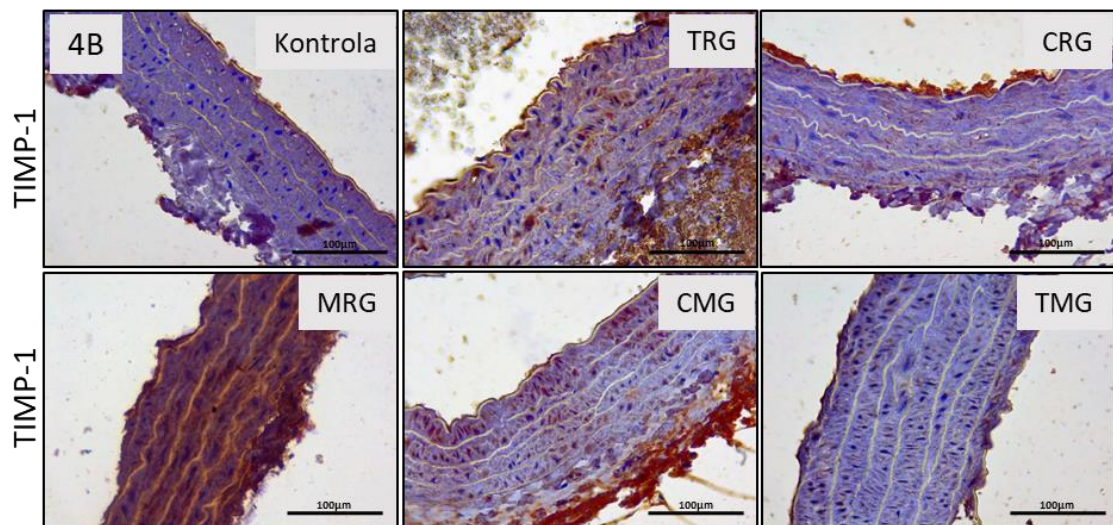
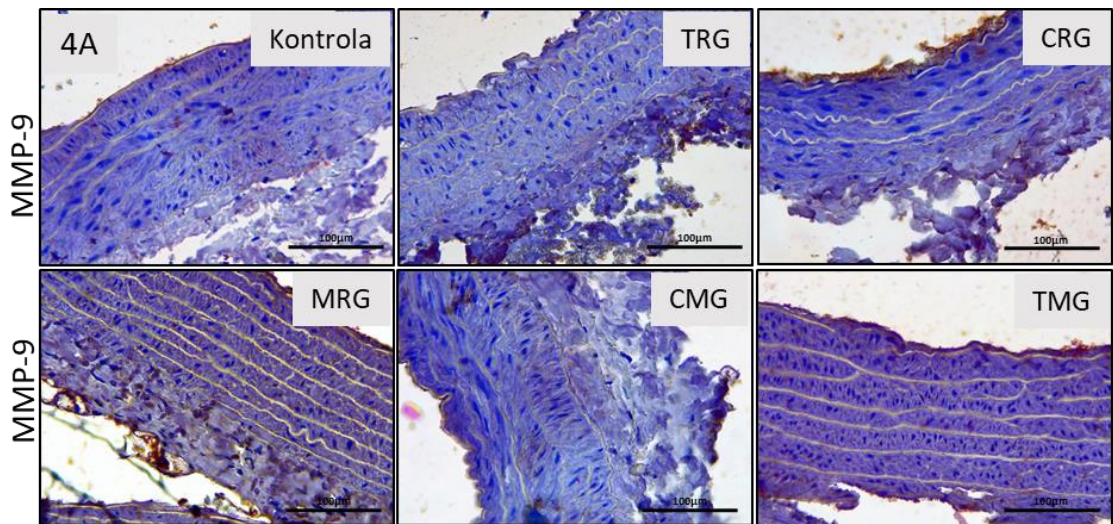
odnotowano w ECM medii aorty szczurów z grup CRG i MRG (Rycina 3A). Nie stwierdzono zmian w immunoekspresji MMP-9 w aorcie szczurów z grup doświadczanych w porównaniu z kontrolą (Rycina 4A). Wskazuje to, że zastosowane schematy leczenia immunosupresyjnego nie wywierały wpływu na ekspresję MMP-9.

Głównym inhibitorem MMP-2 jest TIMP-2, natomiast TIMP-1 hamuje aktywność MMP-9. Ekspresję TIMP-2 zidentyfikowano tylko w medii aorty szczurów z grupy TRG (Rycina 3B), ekspresję TIMP-1 odnotowano natomiast w warstwie środkowej aorty szczurów TRG, CRG, MRG i CMG (Rycina 4B). Ekspresji TIMP-1 nie stwierdzono jedynie w ścianie aorty szczurów z grupy kontrolnej i grupy TMG (Rycina 4B).

Rycina 3A, 3B. Immonolokalizacja MMP-2 i TIMP-2 w aorcie szczurów z grupy kontrolnej i doświadczalnych. IHC A i B. Powiększenie obiektywu x 40; pasek 100 μm .



Rycina 4A, 4B. Immunolokalizacja MMP-9 i TIMP-1 w aorcie szczurów z grupy kontrolnej i doświadczalnych. IHC A i B. Powiększenie obiektywu x 40; pasek 100 μm .



5. Ilościowa ocena obszaru ekspresji MMP-2, MMP-9 oraz TIMP-1, TIMP-2 w środkowej warstwie ściany tętnicy

Analizę uzyskanych wyników oceniano w dwóch aspektach: (i) porównanie poziomu immunoekspresji metaloproteinaz (MMPs) i ich inhibitorów (TIMPs) w grupie kontrolnej z każdą z grup eksperymentalnych; (ii) ocena równowagi ekspresji między MMPs a ich inhibitorami (Tabela 4).

Wyniki dotyczące ekspresji MMPs i ich TIMPs wskazują, że ekspresja MMP-2 znacząco wzrosła w grupie CRG w porównaniu z grupą kontrolną, a poziom ekspresji MMP-2 był prawie 5-krotnie wyższy. Poziom ekspresji MMP-2 w grupie MRG uległ natomiast statystycznie istotnemu zmniejszeniu w porównaniu z grupą kontrolną. Porównanie poziomu ekspresji TIMP-2 (inhibitor MMP-2) wykazało, że w grupach TRG, MRG i CMG występowały istotne zmiany w porównaniu z grupą kontrolną. W odniesieniu do poziomu ekspresji TIMP-1 odnotowano również znaczące różnice w grupach TRG, MRG, TMG w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki wykazały, że grupa kontrolna oraz grupy TRG, CRG i CMG charakteryzowały się zwiększoną ekspresją MMP-2 w porównaniu z ekspresją swego swoistego inhibitora. Porównanie balansu w ekspresji pomiędzy MMP-2 / TIMP-2 wskazało na wzrost poziomu immunoekspresji TIMP-2 tylko w dwóch grupach doświadczanych - MRG i TMG.

Porównanie poziomu ekspresji MMP-9 w medii aorty pomiędzy grupami zwierząt doświadczalnych a grupą kontrolną sugeruje, że ekspresja MMP-9 znacząco wzrosła w grupie TMG. W grupach TRG, MRG i TMG odnotowano natomiast istotnie zmienione poziomy ekspresji TIMP-1 w porównaniu z grupą kontrolną. Ocena balansu w ekspresji MMP-9 a TIMP-1 wykazywała znaczący wzrost poziomu ekspresji TIMP-1 vs MMP-9 aż w trzech grupach zwierząt doświadczalnych - TRG, CRG, MRG. Dodatkowo w medii szczurów z grupy TMG odnotowano zwiększoną ekspresję MMP-9 w porównaniu z ekspresją TIMP-1.

Równowaga w ekspresji metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) jak i ich inhibitorów (TIMP-2 i TIMP-1) była utrzymywana w grupie CMG na takim poziomie jak w grupie kontrolnej. Ponadto poziom immunoekspresji (wyrażony

w procentach) jak i immunolokalizacji MMPs i ich TIMPs różniły się istotnie pomiędzy grupami doświadczalnymi (Tabela 7).

Tabela 7. Ekspresja MMP-2 i MMP-9 oraz ich inhibitorów- TIMP-1 i TIMP-2 w badanych grupach. Zależność pomiędzy ekspresją MMPs i ich inhibitorów w odniesieniu do zachowania równowagi lub braku równowagi.

Parametr/grupa		Kontrola (n=24)	TRG (n=24)	CRG (n=16)	MRG (n=24)	CMG (n=24)	TMG (n=24)
Obszar MMP2 w tunica media aorty (%)	AM ± SD	11.24±4.64	8.3±3.57	47.16±21.04	3.29±1.87	10.39±6.42	7.94±2.42
	Median	9.7 ^{CM}	8.83 ^{CM}	51.78* ^{TMΔ} ^	3.21* ^{TCΔ} ^	9.88 ^{CM}	7.48 ^{CM}
	Min-Max	5,79-21,34	1,75-14,11	8,73-79,98	0,84-8,01	1,05-25,32	4,42-15,02
Obszar TIMP2 w tunica media aorty(%)	AM± SD	2.18±1.09	7.19±4.4	6.71±5.84	13.01±9.08	1.53±1.02	11.75±9.48
	Mediana	2.18 ^{TMΔ}	6.83* ^T ^{CΔ} ^	3.71 ^{MΔ}	11.72* ^C ^	1.34* ^T C	11.03 TM
	Min-Max	4,34-16,19	0,00-0,33	2,22-21,84	0,02-0,61	0,12-4,76	1,12-14,22
	MMP2/ TIMP2	>	>	>	<	>	<
Obszar MMP9 w tunica media aorty (%)	AM ± SD	3.46±2.74	6.57±5.83	1.17±0.7	7.16±5.67	1.63±1.57	20.79±17.85
	Mediana	2.12 [^]	3.18 ^{CΔ} ^	1.17 TM ^	6.9 ^{CΔ}	1.23 TM ^	18.94* ^{TCΔ}
	Min-Max	0,56-11,87	0,81-18,42	0,10-2,64	0,81-18,92	0,21-5,5	2,07-66,2
Obszar TIMP1 w tunica media aorty (%)	AM ± SD	2.18±1.09	7.19±4.4	6.71±5.84	13.01±9.08	1.53±1.02	11.75±9.48
	Mediana	2.18 TM ^	6.83* ^Δ	3.71 ^Δ	11.72* ^Δ	1.34 ^{TCM} ^	11.03* ^Δ
	Min-Max	0,53-4,54	0,41-13,42	2,16-20,98	2,23-30,28	0,16-4,39	0,72-31,58
	MMP9/ TIMP1	=	<	<	<	=	>

AM: średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; n –liczba mierzonych obszarów; Min-Max: minimalne i maksymalne wartości;

*p < 0.05 vs kontrola; ^Tp < 0.05 vs TRG; ^Cp < 0.05 vs CRG; ^Mp < 0.05 vs MRG; ^Δp < 0.05 vs CMG; [^]p < 0.05 vs TMG

VI. Dyskusja

Głównym zadaniem w przeprowadzonym doświadczeniu było ustalenie, czy występują zależności pomiędzy ekspresją MMP-2, MMP-9 oraz TIMP-1, TIMP-2 a zaburzeniami morfologicznymi w ścianie aorty szczurów w przebiegu przewlekłego podawania leków immunosupresyjnych według standardowego schematu trójleckowego. Szczegółowej analizie poddano błonę środkową aorty szczurów z grupy kontrolnej oraz z grup doświadczalnych. W dostępnej literaturze odnaleźć można opisy zmian sercowo-naczyniowych po zastosowaniu pojedynczego leku immunosupresyjnego często w różnych dawkach, dlatego porównanie otrzymanych wyników z innymi danymi jest trudne.

Aorta jest największą tętnicą człowieka i też jedyną, która odprowadza krew bezpośrednio z serca na obwód. Jej budowa jest złożona, a najbardziej rozbudowaną błoną w ścianie aorty jest błona środkowa, bogata w blaszki i włókna elastyczne, włókna kolagenowe oraz elementy istoty podstawowej, jak proteoglikany, produkowane przez komórki mięśniowe gładkie naczyń (vSMC).

Komórki vSMC odgrywają ważną rolę w przebudowie ECM warstwy środkowej naczynia i mogą być zaangażowane w rozwijające się procesy patologiczne. Dezorganizacja elementów macierzy zewnątrzkomórkowej może zmniejszać elastyczność aorty oraz zaburzać prawidłową mechanikę naczynia, a zatem i jej funkcję [93–95].

Dane uzyskane w niniejszym badaniu pozwalają stwierdzić, że przewlekłe traktowanie szczurów najczęstszymi klinicznymi schematami leczenia immunosupresyjnego może przyczynić się do powstawania zaburzeń morfologii i funkcji aorty brzusznej. W rutynowo barwionych preparatach zaobserwowano pewne nieprawidłowości takie jak rozluźnienie struktury warstwy środkowej naczynia, zwiększenie odległości między blaszkami sprężystymi, degradację włókien sprężystych, zwyrodnienia i zmiany kształtu jąder komórek mięśni gładkich oraz ich hipertrofię i hiperplazję.

Szczury traktowane kombinacją leków MRG i CMG nie wykazywały zaburzeń morfologicznych w budowie ściany aorty, a ponadto w żadnej z tych grup nie odnotowano znaczących zmian w grubości warstwy środkowej naczynia. Brak

wyraźnych zmian morfologicznych może być związany z antyproliferacyjną, a w tym wypadku ochronną rolą mykofenolanu mofetylu lub rapamycyny [80,81,96]. Schematy leczenia immunosupresyjnego zawierające w swoim składzie MMF, lek hamujący proliferację limfocytów T i B, monocytów oraz komórek mięśni gładkich, w połączeniu z kortykosteroidem może ograniczać proces włóknienia i zapobiegać przerostowi warstwy wewnętrznej ściany naczynia [97]. Rapamycyna również reguluje metabolizm, migrację oraz czas przeżycia komórek aorty [96]. Wykazano, że inhibitor szlaku mTOR może hamować proliferację i migrację komórek mięśni gładkich w obrębie uszkodzonego naczynia krwionośnego [98]. Badanie przeprowadzone przez Zhou i wsp. na modelu mysim z indukowanym tętniakiem i rozwarstwieniem aorty piersiowej (TAAD) wykazało, że rapamycyna znacząco zmniejszała tworzenie TAAD, niszczenie włókien elastycznych oraz hamowała syntezę, MMP-2 i MMP-9, endopeptydaz odpowiedzialnych za dezintegrację struktury naczynia. Myszy traktowane rapamycyną odznaczały się znacząco mniejszym naciekiem komórek zapalnych w obrębie ściany aorty [99]. Ochronne działanie rapamycyny potwierdzono również w innym badaniu in vivo (myszy) i in vitro (hodowle vSMC) przeprowadzonym przez Hayashi-Hori i wsp. (2020). W doświadczeniu tym podawano myszom środki indukujące rozwój zmian charakterystycznych dla rozwarstwienia aorty (AD). W pierwszym lub siódmym dniu stosowania leków prowokujących przebudowę aorty, w tym wypadku β -aminopropionitrylu (BAPN) i angiotensyny II (AngII), włączono do leczenia rapamycynę. Odnotowano, że zastosowany lek immunosupresyjny wywierał korzystny wpływ związany z hamowaniem proliferacji vSMC poprzez selektywne tłumienie ekspresji genów związanych z cyklem komórkowym i utrzymywał kurczliwy, a nie proliferacyjny fenotyp vSMC w błonie środkowej aorty. Rapamycyna okazała się być skuteczna zarówno w zapobieganiu, jak i w redukcji procesów powstawania AD [100].

Najbardziej wyraźne zmiany morfologiczne tunica media zaobserwowano w aortach szczurów traktowanych trójlekową immunosupresją według protokołów CRG i TMG. Nieprawidłowości morfologiczne wiązały się ze zmienioną morfologią komórek mięśniowych gładkich naczynia. Komórki, jak i jądra komórek grupy kontrolnej miały kształt wrzecionowaty, podczas gdy w wyżej wymienionych

grupach eksperymentalnych komórki i ich jądra przybierały kształt nabłonkowo / romboidalny. Kształt vSMCs zależy od organizacji komponentów ECM, a sam proces odkształcania mechanicznego reguluje zmiany fenotypu i funkcji komórki oraz wpływa na remodeling macierzy. W warunkach fizjologicznych wrzecionowaty kształt vSCMs wykazuje fenotyp kurczliwy [16,101]. Odnotowane zmiany morfologii miocytów gładkich w medii aorty szczurów z grup doświadczalnych świadczyć mogą o zmieniającym się fenotypie komórek i zmianie ich funkcji.

Pomiary szerokości tunica media aorty wykazały istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą kontrolną a wszystkimi grupami doświadczalnymi. Grupa TMG charakteryzowała się najgrubszą warstwą środkową naczynia, podczas gdy grupa CRG najcieńszą. W przypadku inhibitorów kalcyneuryny (CNI) takrolimus jest znany jako lek znacznie bardziej toksyczny w porównaniu z cyklosporyną A. Kolejne badane parametry również uległy zmianie skutkiem podawania leków immunosupresyjnych. W porównaniu z grupą kontrolną odległości między blaszkami sprężystymi były statystycznie większe w grupach MRG i TMG. Zaobserwowano także istotne różnice w liczbie vSMCs pomiędzy grupą kontrolną a grupami TRG, MRG, CMG, TMG.

Zmiany te mogą wskazywać na niekorzystny wpływ CNIs na morfologię aorty, ale także mogą być skutkiem zastosowania nieprawidłowej, zbyt niskiej dawki inhibitorów kalcyneuryny. W badaniu Koskinen i wsp. (1995) szczury z allogenicznym przeszczepem serca traktowano trójlekowym schematem immunosupresji, zawierającym metyloprednizolon, azatioprynę i trzy różne dawki cyklosporyny A. Podawanie cyklosporyny przez trzy miesiące w średniej dawce 10 mg/kg/dobę znacząco hamowało pogrubienie warstwy wewnętrznej tętnic, natomiast dwukrotnie większa dawka CsA spowodowała spadek grubości [102]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach Soukiasian i wsp. (2004) na szczurach, którym przeszczepiono serce. Autorzy stwierdzili, że podawanie szczurom cyklosporyny w wysokich dawkach nie tylko chroni przeszczepiony narząd przed odrzuceniem, ale także hamuje rozwój zmian miażdżycowych w graficie [103].

Zarówno cyklosporyna, jak i takrolimus są w stanie zmniejszyć odsetek odrzucania przeszczepu allogenicznego, jednak ich przewlekłe stosowanie może charakteryzować się szeregiem działań niepożądanych, w tym toksycznością naczyniową [104]. Jedną z postawionych hipotez definiuje potransplantacyjną waskulopatię jako nieskuteczną reakcję nadwrażliwości typu opóźnionego, skierowaną przeciwko komórkom śródbłonna dawcy oraz przeciwko komórkom mięśni gładkich w warstwie środkowej naczynia [105].

Limfocyty T aktywowane przez obce HLA produkują cytokiny mobilizujące makrofagi oraz stymulujące degradację elementów ECM przez komórki mięśniowe naczynia. Inhibitory kalcyneuryny także mogą zwiększać produkcję cytokin prozapalnych oraz markerów aktywacji śródbłonna, a także generować reaktywne formy tlenu (ROS) w komórkach śródbłonna i vSMCs w tkance aorty, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *ex vivo* [104].

W tych warunkach vSMCs mogą być stymulowane do proliferacji i migracji [106]. W niniejszych badaniach nie oznaczano poziomu lub immunoekspresji cytokin prozapalnych, jednakże w grupie TMG wystąpił dwu i półkrotny wzrost liczby jąder vSMCs w porównaniu do grupy kontrolnej.

Jak wspomniano powyżej MMF – lek hamujący proliferację komórek – wspólnie z glikokortykosteroidem może redukować proces włóknienia i zapobiegać hiperplazji intymy, wykazując działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy [97]. W przedstawionych w niniejszej pracy wynikach stwierdzono, że morfologia błony środkowej aorty szczurów w grupie TMG była znacząco zmieniona. Można zatem przypuszczać, że w zastosowanym składzie leków immunosupresyjnych takrolimus mógłby niwelować ochronne działanie mykofenolanu mofetylu i kortykosteroidu. Trzeba również podkreślić, że w medii aorty szczurów otrzymujących leki według protokołu opartego na Tac odnotowano zwiększoną akumulację włókien kolagenowych (TRG, TMG – 89,4% vs Kontrola 45,6% i inne grupy). Proces ten może być związany z aktywnością metaloproteinaz i ekspresją ich inhibitorów, syntetyzowanych przez komórki mięśniowe gładkie medii aorty podczas przewlekłego podawania szczurom leków immunosupresyjnych.

Zaobserwowana podwyższona ekspresja MMP-2 w medii aorty grupy kontrolnej oraz w grupach TRG, CRG i CMG w porównaniu z ekspresją TIMP-2 może sugerować, że wzrost ekspresji tej metaloproteinazy może być formą mechanizmu kompensacyjnego wobec nadmiernej akumulacji kolagenu powstałego w warunkach stresowych takich jak terapia CsA. Podobne właściwości farmakologiczne zbliżone do CsA wykazuje również tacrolimus. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z badaniami Bianchi i wsp., którzy również wykazali, że CsA powodował intensywne zwłóknienie mięśnia sercowego i wzrost MMP-2, podczas gdy poziomy MMP-1 i MMP-9 pozostały niezmienione [107].

Odnotowano również zmiany w poziomie ekspresji inhibitorów metaloproteinaz. I tak w medii aorty zwierząt z grupy MRG i TMG zwiększoną ekspresję TIMP-2 w odniesieniu do poziomu ekspresji MMP-2. Waller i wsp. (2005) wykazali, że stosowanie CNI (cyklosporyny, takrolimusu) lub rapamycyny w połączeniu z MMF zmniejsza syntezę kolagenu III, a tym samym hamuje jego gromadzenie i pogrubienie warstwy wewnętrznej tętnicy. Ponadto opisany schemat leczenia zmniejsza ekspresję MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 w porównaniu z monoterapią wymienionymi lekami. Stosowanie kombinacji leków mykofenolanu mofetylu i rapamycyny wywierało najkorzystniejszy wpływ na ścianę aorty. Zbadano, że MMF zmniejszał ekspresję czynników promujących proliferację i migrację komórek mięśni gładkich naczyń oraz hamował przerost warstwy wewnętrznej [97]. W prezentowanych wynikach badań grupa MRG nie zwiększyła ekspresji MMP-9, ponadto obszar ekspresji MMP-2 był istotnie mniejszy w porównaniu z grupą zwierząt nieotrzymującą leków.

W niniejszych badaniach w grupach szczurów, których protokoły leczenia oparte były na rapamycynie (TRG, CRG i MRG) ekspresja TIMP-1 wyraźnie wzrosła w porównaniu z ekspresją MMP-9. W literaturze dostępnych jest wiele badań potwierdzających zarówno przeciwłóknieniowe, jak i profibrotyczne działanie rapamycyny. Wyniki uzyskane niniejszej pracy są bliższe hipotezie mówiącej o rapamycynie jako czynniku promującym włóknienie. Jednym z wykładników sprzyjających temu procesowi jest zwiększona aktywność inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs), co powoduje hamowanie aktywności enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową. Badania przeprowadzone

przez Osman i wsp. (2011) w których szczurze komórki mezangialne traktowano rapamycyną wykazywały zależny od dawki wzrost wywołanej przez cytokiny ekspresji TIMP-1 i spadek ekspresji MMP-9. Zmiany te współistniały ze wzmożoną ekspresją genów profibrotycznych, co może być wyjaśnieniem przyczyny włóknienia nerek u pacjentów leczonych rapamycyną [108]. Brook i wsp. (2005) stwierdzili natomiast, że odpowiednia kombinacja leków w niższych dawkach - cyklosporyna (7,5 mg/kg/d) + rapamycyna (0,5 mg/kg/d) testowana na modelu szczurzym daje efekt antyproliferacyjny / przeciwwłóknieniowy. Wynika to ze zwiększonej ekspresji MMP-2 oraz zmniejszonej ekspresji TIMP-1 [109]. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy w odniesieniu do grupy CRG, w której ekspresja MMP-2 znacząco wzrosła, przy czym poziom ekspresji TIMP-1 również wzrósł nieznacznie. Nie zauważono jednak znaczących zmian w morfologii medii, a ponadto odsetek powierzchni medii zajmowanej przez włókna kolagenowe u szczurów, którym podawano taką właśnie kombinacją leków, nie był zwiększony. Szerokość warstwy środkowej naczynia również była mniejsza w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzono natomiast znacznie zmienione poziomy TIMP-1 w porównaniu z grupą kontrolną w obu grupach zwierząt otrzymujących trójlekowy schemat zawierający takrolimus, ale tylko w błonie środkowej aorty szczurów grupy TMG odnotowano podwyższony poziom ekspresji MMP-9 vs TIMP-1. Ponadto w obu grupach zwierząt, którym podawano leki według schematu opartego na takrolimucie (TRG i TMG) stwierdzono znaczny wzrost zawartości kolagenu w błonie środkowej aorty (prawie 90%) w porównaniu z grupą kontrolną. Warto też wspomnieć, że w medii aorty zwierząt z każdej grupy doświadczalnej stwierdzono w mniejszym bądź większym odsetku wzrost zawartości kolagenu w porównaniu z grupą kontrolną. W trakcie leczenia cyklosporyną lub takrolimusem opisano zwiększoną zawartość włókien kolagenowych, wskazujących na proces włóknienia, w nerkach pacjentów z rozpoznaną histologiczną nefrotoksycznością. Biopsje nerek ukazały aż 300% większy wzrost ekspresji kolagenu u pacjentów z nefrotoksycznością wywołaną Tac w porównaniu do pacjentów z powikłaniami po zastosowaniu CsA. Ekspresja TIMP-2 była istotnie zwiększona w obu grupach, ale ekspresja MMP-9 była podwyższona tylko w grupie CsA [110]. W badaniach przeprowadzonych przez Waller i wsp. (2004) przedstawiono wpływ pojedynczego leku: cyklosporyny,

takrolimusu lub rapamycyny na proces pogrubienia warstwy wewnętrznej tętnicy szyjnej szczurów. Jak wykazały uzyskane wyniki badań przez tych autorów podawanie każdego z tych leków immunosupresyjnych spowodowało wzmożone gromadzenie się macierzy zewnątrzkomórkowej. Stosowane leki istotnie hamowały ekspresję genów MMP-2, MMP-9 i TIMP-1, jednak tylko cyklosporyna zwiększała ekspresję obu MMPs w porównaniu z ekspresją TIMP-1. Różnica w ekspresji MMPs i TIMPs podczas stosowania leków z grupy CIN może być zatem przyczyną zwiększonego odkładania kolagenu pod wpływem Tac, ale nie CsA [111].

Na podstawie uzyskanych wyników badań w niniejszej pracy można jednoznacznie stwierdzić, że przewlekłe leczenie immunosupresyjne zakłóca równowagę pomiędzy metaloproteinazami (MMP-2, MMP-9) a ich inhibitorami (TIMP-1, TIMP-2) w tkankach ściany aorty brzusznej szczurów, co w konsekwencji zaburza morfologię oraz funkcję naczynia. Mocną stroną tych badań jest to, że ocenę morfologiczną ściany aorty badano aż po sześciu miesiącach trwania doświadczenia, co odzwierciedla około 15 lat życia człowieka. Ponadto, w przeciwieństwie do danych literaturowych, w doświadczeniu tym podawano zwierzętom leki immunosupresyjne według standardowego schematu trójlekowego stosowanego w leczeniu klinicznym pacjentów. Uzyskane wyniki badań mogą też stanowić wstęp do głębszych analiz i dodatkowych badań nad optymalnym doborem leczenia immunosupresyjnego, w kontekście ich korzystnego wpływu na układ sercowo-naczyniowy pacjentów.

VII. Wnioski

Na podstawie wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie sformułowano następujące 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 morfologię i morfometrię ściany naczynia krwionośnego.
3. Leki immunosupresyjne na bazie takrolimusu 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.

VIII. Streszczenie

Tytuł

Wpływ przewlekłego leczenia immunosupresyjnego na rozwój miażdżycy w aorticie 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 naczynia.
2. Ilościowa ocena obszaru zajmowanego przez włókna kolagenowe w środkowej warstwie ściany naczynia.

3. Analiza morfometryczna środkowej warstwy naczynia: 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+eozyjna, 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 takrolimusu 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.

IX. Abstract

Title

The effect of chronic immunosuppressive regimens treatment on the development of atherosclerosis in the abdominal aorta of rats.

Introduction

Currently there is an insufficient number of studies in the literature showing the effect of individual treatment regimens on morphological changes in vessels or the expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-2. Obtaining such knowledge seems to be extremely important due to the possibility of eliminating some risk factors, such as aortic wall dissection, as an example of chronic corticosteroid use. Recently an increased interest in the negative impact of chronic immunosuppressive therapy on the cardiovascular system, including patients after organ transplantation, has been observed. The cause of organ loss in 50% of above mentioned patients is chronic graft dysfunction, diagnosed with cardiovascular diseases, neoplasm or infections. The aim of this study was to determine the effect of chronic immunosuppressive treatment on the immunoexpression of metalloproteinases -2 and 9 and their inhibitors and additionally on the morphology of the tunica media of the abdominal aorta of male rats

Drug protocols used in the current experiment:

TRG- tacrolimus+rapamycin+glucocorticosteroids

CRG- cyclosporine A+rapamycin+glucocorticosteroids

CMG- cyclosporine A+rapamycin+glucocorticosteroids

TMG- tacrolimus+mycophenolate mofetil+glucocorticosteroids

MRG- mycophenolate mofetil+rapamycin+glucocorticosteroids

Objectives

The aim of this study was to investigate, whether chronic immunosuppressive treatment, according to the most commonly used immunosuppressive regimens in organ recipients, had an effect on the morphology of the abdominal aorta in rats.

1. Analysis of morphological changes in the aortic wall: visualization of collagen fibers, elastic fibers, reticulin fibers and vascular smooth muscle cells.
2. The quantitative assessment of the area occupied by collagen fibers in the aortal media.
3. Morphometric analysis of the tunica media: the thickness of the tunica media, the distance between elastic lamellae and the number of vascular smooth muscle cell nuclei.
4. Immunohistochemical study of the expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 in the wall of the abdominal aorta of rats.
5. Quantitative assessment of the area of increased expression of MMP-1, MMP-2 and TIMP-1, TIMP-2 in the aortal media.

Material and Methods

The biological material of the current study was rat aortas, accumulated as archival material in the Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. Tissue material was obtained from an experiment conducted on 14-week-old rats, males of the Wistar breed. The animals were divided into 6 groups: the control group (C) and 5 experimental groups. The animals of the control group did not receive any drugs, while the rats of the individual experimental groups were administered different combinations of immunosuppressants. After 6 months the animals were euthanized. Aortic fragments were taken from each rat. The tissue material was secured in the form of paraffin blocks.

The following stains were performed for morphological analysis: hematoxylin + eosin, Mallory's trichrome, Picro Sirius Red, impregnation with silver salts, orcein. During the morphometric analysis, the thickness of the middle layer of the tunica media, the distance between elastic lamellae and the number of nuclei of the smooth muscle cells of the vessel were measured. The percentage of collagen fibers in the tunica media of the vessel was assessed using ImageJ software. In order to evaluate the expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-2 an immunohistochemical study was performed with the use of murine antibodies.

The area occupied by the individual IHC reaction products was assessed with ImageJ software. The results are expressed as a percentage.

Results

1. The most pronounced changes in the structure of the vessel wall were noticed in groups CRG i TMG.
2. Changes in the structure of elastic fibers were noted in the group TMG i CRG.
3. The collagen fiber content was increased in the tunica media of the aorta in rats treated with TRG, CRG and TMG immunosuppressants.
4. An increased content of type III collagen was observed in the media of rats treated with TRG and an increased content of collagen type I was visible in the aorta of the TMG rat group.
5. The visualization of type III collagen using silver salt showed the highest content of this type of collagen in the tunica media of the aorta in TRG and CRG rats.
6. The morphometry regarding the thickness of the tested aortas indicated that the thickest tunica media was present in the TMG group, whereas the thinnest was found in the CRG group. The largest distance between the elastic lamellae of the tested aortas was observed in the TMG group and it was over 50% larger than in the CMG group, which has the shortest distance between lamellae. The greatest number of nuclei of vSMCs (number of nuclei in morphometry) was observed in the TMG group and it was almost three times more than in the MRG group.
7. A statistical comparison of the treatment groups showed that groups with tacrolimus-based protocol (TRG, TMG) had the largest area with collagen fibers.
8. The expression of MMP-2 was observed in the tunica media extracellular matrix (ECM) of TRG, CRG, MRG and CMG rats. No expression of MMP-2 was observed in the media of control and TMG rats. The most pronounced expression was noted in the media ECM of CRG and MRG rats. MMP-9 expression was not affected by immunosuppressive drug panels. The expression of TIMP-2 was only identified in the tunica media of TRG rats, while expression of TIMP-1 was noted in the tunica

media of TRG, CRG, MRG and CMG rats. TIMP-1 expression was not found in the aortal media of Control and TMG rats.

9. The results showed that control, TRG, CRG and CMG groups indicated an increased MMP-2 expression comparing to its inhibitor. A comparison of the MMP-2/TIMP-2 balance indicated an increase in the area with immunoexpression of TIMP-2 in only two groups, MRG and TMG. In the aspect of balance between MMP-9 and TIMP-1 three groups indicated increased TIMP-1 expression vs MMP-9 expression -TRG, CRG, MRG. The TMG group had a higher expression of MMP-9 vs TIMP-1. Both areas of expressions of enzymes and their inhibitors was visible at the same degree in the control group and CMG group.

Conclusions

1. The results indicate that immunosuppressive treatment affect the MMP/TIMP balance in abdominal aorta which in consequence alters the morphology and function of the vessel.
2. The changes in the CNI-based protocol group were the most profound.
3. The tunica media of tacrolimus-treated rats showed the highest accumulation of collagen fibers. Tacrolimus did not increase the expression of MMPs.
4. Tacrolimus reduced the protective, antiproliferative effects of mycophenolate mofetil.
5. The combination of mycophenolate mofetil with rapamycin did not result in significant morphological or morphometric changes in the aortic wall. The antiproliferative capacity of MMF has been preserved.

X. Piśmiennictwo

- [1] Wilk A, Szypulska-Koziarska D, Kędzierska-Kapuza K, Sieńko J, Kolasa-Wołoskiuk A, Ciechanowski K, et al. The Comparison of Parameters of Oxidative Stress in Native Rat Livers Between Different Immunosuppressive Regimens. *Med Sci Monit* 2019;25:8242–7. <https://doi.org/10.12659/MSM.915230>.
- [2] Zhang W, Egashira N, Masuda S. Recent Topics on The Mechanisms of Immunosuppressive Therapy-Related Neurotoxicities. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20:3210. <https://doi.org/10.3390/ijms20133210>.
- [3] Ograczyk E, Kowalewicz-Kulbat M, Wawrocki S, Fol M. Immunosuppression – tough ally in torrid time. *Postepy Hig Med Dosw* 2015;69:1299–312. <https://doi.org/10.5604/17322693.1184554>.
- [4] Bamoulid J, Staeck O, Halleck F, Khadzhyrov D, Brakemeier S, Dürr M, et al. The need for minimization strategies: current problems of immunosuppression. *Transplant International* 2015;28:891–900. <https://doi.org/10.1111/tri.12553>.
- [5] Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988;84:985–92. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(88\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(88)90302-6).
- [6] Shirali AC, Bia MJ. Management of cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:491–504. <https://doi.org/10.2215/CJN.05081107>.
- [7] Jm D, Z S, Li G, F O-H, M P, R G-C, et al. Risk factors for cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 2003;35. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(03\)00567-0](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(03)00567-0).
- [8] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7:518–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x>.
- [9] Giakoustidis A, Antoniadis N, Giakoustidis D. *Vascular Complications in Kidney Transplantation*. IntechOpen; 2011. <https://doi.org/10.5772/18672>.
- [10] Rangaswami J, Mathew RO, Parasuraman R, Tantisattamo E, Lubetzky M, Rao S, et al. Cardiovascular disease in the kidney transplant recipient: epidemiology, diagnosis and management strategies. *Nephrol Dial Transplant* 2019;34:760–73. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz053>.
- [11] Moudgil A, Dharnidharka VR, Lamb KE, Meier-Kriesche H-U. Best allograft survival from share-35 kidney donors occurs in middle-aged adults and young children-an analysis of OPTN data. *Transplantation* 2013;95:319–25. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182719203>.

- [12] Ohara N, Miyata T, Sato O, Oshiro H, Shigematsu H. Aortic aneurysm in patients with autoimmune diseases treated with corticosteroids. *Int Angiol* 2000;19:270–5.
- [13] Jana S, Hu M, Shen M, Kassiri Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Exp Mol Med* 2019;51:1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0286-3>.
- [14] Martonos CO, Gudea AI, Damian A, Miclăuş V, Rus V, Stan FG. Some segmental morphological and morphometrical features of the intima and media of the aortic wall in *Chinchilla lanigera*. *Folia Morphologica* 2019;78:729–37. <https://doi.org/10.5603/FM.a2019.0023>.
- [15] Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005;85:979–1000. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2004>.
- [16] Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, et al. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1093–9. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000022407.91111.e4>.
- [17] Thakar RG, Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, et al. Cell-Shape Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation. *Biophys J* 2009;96:3423–32. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.074>.
- [18] McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 1980;130:45–55. <https://doi.org/10.1002/path.1711300107>.
- [19] Karimi A, Milewicz DM. Structure of the Elastin-Contractile Units in the Thoracic Aorta and How Genes That Cause Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Disrupt This Structure. *Can J Cardiol* 2016;32:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.11.004>.
- [20] artery | anatomy | Britannica n.d. <https://www.britannica.com/science/artery> (accessed January 30, 2022).
- [21] Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* 2012;20:210–6. <https://doi.org/10.1258/vasc.2011.201202>.
- [22] Lim CS, Shalhoub J, Gohel MS, Shepherd AC, Davies AH. Matrix metalloproteinases in vascular disease--a potential therapeutic target? *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:75–85. <https://doi.org/10.2174/157016110790226697>.
- [23] Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- [24] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

- [25] Lipka D, Boratyński J. [Metalloproteinases. Structure and function]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)* 2008;62:328–36.
- [26] Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, et al. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2010;17:3751–68.
<https://doi.org/10.2174/092986710793213724>.
- [27] Baszczuk A, Kopczyński Z, Thielemann A, Musialik K, Kopczyński J, Bielawska L, et al. Ocena stężenia metaloproteinazy 2 (MMP-2) i metaloproteinazy 9 (MMP-9) w surowicy chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Forum Zaburzeń Metabolicznych* 2015;6:74–84.
- [28] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562–73. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>.
- [29] Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;75:346–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.004>.
- [30] Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:502–11.
<https://doi.org/10.1038/35081571>.
- [31] Dziedzic M, Kuna J, Kuna A, Grafka A, Łopucki M, Pęksa B, et al. The role of matrix metalloproteinases in the mechanisms of organ damage in sepsis. *Journal of Laboratory Diagnostics* 2015;2:131–8.
- [32] Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003;384:863–72. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.097>.
- [33] Prystupa A, Kancik E, Dyczko M, Dzida G, Wójtowicz T, Kurzepa J, et al. Metaloproteinazy macierzy MMP-2 i MMP-9 w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 2. *Family Medicine & Primary Care Review* 2011:229–32.
- [34] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–74. <https://doi.org/10.1038/nrc745>.
- [35] Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases *. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:21491–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21491>.
- [36] Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2009;61:198–223.
<https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>.
- [37] Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267–83.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00279-4).

- [38] Fic P, Zakrocka I, Kurzepa J, Stepulak A. [Matrix metalloproteinases and atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011;65:16–27. <https://doi.org/10.5604/17322693.931536>.
- [39] Li H-C, Cao D-C, Liu Y, Hou Y-F, Wu J, Lu J-S, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88:75–85. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-1200-8>.
- [40] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;147:1–73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.
- [41] Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005;31:599–621. <https://doi.org/10.1080/019021490944232>.
- [42] Morán A, Iniesta P, García-Aranda C, De Juan C, Díaz-López A, Sánchez-Pernaute A, et al. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005;13:115–20.
- [43] Schäfers M, Schober O, Hermann S. Matrix-Metalloproteinases as Imaging Targets for Inflammatory Activity in Atherosclerotic Plaques. *Journal of Nuclear Medicine* 2010;51:663–6. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.065698>.
- [44] Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol* 2018;81:241–330. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>.
- [45] Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2020;21:E9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.
- [46] Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2108–14. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.173898>.
- [47] Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 2002;91:845–51. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000040420.17366.2e>.
- [48] Surówka A, Wilk A, Szumilas K, Kędzierska-Kapuza K. The Effect of Immunosuppressive Drugs on MMPs Activity in The Walls of Blood Vessels - A Systematic Review. *Int J Med Sci* 2021;18:1502–9. <https://doi.org/10.7150/ijms.54423>.
- [49] Zeng B, Prasan A, Fung KC, Solanki V, Bruce D, Freedman SB, et al. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery

disease. *Internal Medicine Journal* 2005;35:331–5. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2005.00822.x>.

[50] Zhou Z, Qiang H, Ma A-Q, Chen H, Zhou P. [Measurement peripheral blood index related to inflammation and ox-LDL, ox-LDLAb in patients with coronary heart disease and its clinical significance]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;31:258–62.

[51] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579–85. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000058700.41738.12>.

[52] Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med* 2003;51:295–300. <https://doi.org/10.1136/jim-51-05-17>.

[53] Inoue T, Kato T, Takayanagi K, Uchida T, Yaguchi I, Kamishirado H, et al. Circulating matrix metalloproteinase-1 and -3 in patients with an acute coronary syndrome. *The American Journal of Cardiology* 2003;92:1461–4. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.08.061>.

[54] Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, et al. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187:161–9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.039>.

[55] Alvarez B, Ruiz C, Chacón P, Alvarez-Sabin J, Matas M. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2004;40:469–75. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.06.023>.

[56] Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology* 1998;32:368–72. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(98\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(98)00250-2).

[57] Yasmin null, Wallace S, McEniery CM, Dakham Z, Pusalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and Serum Elastase Activity Are Associated With Systolic Hypertension and Arterial Stiffness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005;25:372–8. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000151373.33830.41>.

[58] Friese RS, Rao F, Khandrika S, Thomas B, Ziegler MG, Schmid-Schönbein GW, et al. Matrix metalloproteinases: discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. *Clin Exp Hypertens* 2009;31:521–33. <https://doi.org/10.3109/10641960802668730>.

[59] M M, Jp V. Hypertension after kidney transplant. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 2011;57. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.10.048>.

- [60] Skóra J, Pupka A, Barć P, Dawiskiba T. Aktywność metaloproteinaz w ścianie tętniaka aorty brzusznej. *Puls Uczelni* 2012;7–10.
- [61] Tengiz I, Ercan E, Aliyev E, Sekuri C, Duman C, Altuglu I. Elevated levels of matrix metalloprotein-3 in patients with coronary aneurysm: A case control study. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2004;5:10. <https://doi.org/10.1186/1468-6708-5-10>.
- [62] Busti C, Falcinelli E, Momi S, Gresele P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern Emerg Med* 2010;5:13–25. <https://doi.org/10.1007/s11739-009-0283-y>.
- [63] Durlik M, Rowinski W. Zalecenia dotyczace leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu narzadz??w unaczynionych. Warszawa: Fundacja Zjednoczeni dla Transplantacji; 2010.
- [64] Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 1998;273:13367–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13367>.
- [65] Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Zietse R, Unwin RJ, Ellison DH. Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. *J Nephrol* 2012;25:269–75. <https://doi.org/10.5301/jn.5000174>.
- [66] Sakuma K, Yamaguchi A. The Functional Role of Calcineurin in Hypertrophy, Regeneration, and Disorders of Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;2010:e721219. <https://doi.org/10.1155/2010/721219>.
- [67] Parekh K, Trulock E, Patterson GA. Use of cyclosporine in lung transplantation. *Transplant Proc* 2004;36:318S-322S. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.056>.
- [68] Knoop C, Haverich A, Fischer S. Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. *Eur Respir J* 2004;23:159–71. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00039203>.
- [69] Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: A Review. *Journal of Transplantation* 2012;2012:e230386. <https://doi.org/10.1155/2012/230386>.
- [70] Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:925–46; quiz 947–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.02.063>.
- [71] Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011;25:493–504.
- [72] Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 1997;54:925–75. <https://doi.org/10.2165/00003495-199754060-00009>.
- [73] MICHALEWSKA A, BRĘBOROWICZ A. Leczenie systemowe w atopowym zapaleniu skóry 2013.

- [74] Tran QHD, Guay E, Chartier S, Tousignant J. Tacrolimus in Dermatology. *J Cutan Med Surg* 2001;5:329–35. <https://doi.org/10.1177/120347540100500409>.
- [75] Ulińska E, Matysiak M. Aspekty kliniczne znaczenia kinazy mTOR w patogenezie ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. *Journal of Transfusion Medicine* 2015;8:43–8.
- [76] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122:3589–94. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>.
- [77] Zheng XF, Florentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 1995;82:121–30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90058-6).
- [78] Osiecka K, Imko-Walczuk B, Lizakowski S, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Usefulness of m-TOR inhibitors in selected dermatological disorders. *Przegl Dermatol* 2011;98:524–8.
- [79] Marx SO, Marks AR. Bench to Bedside. *Circulation* 2001;104:852–5. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.8.852>.
- [80] Fulton B, Markham A. Mycophenolate Mofetil. *Drugs* 2012. <https://doi.org/10.2165/00003495-199651020-00007>.
- [81] Zwerner J, Fiorentino D. Mycophenolate mofetil. *Dermatologic Therapy* 2007;20:229–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00136.x>.
- [82] Remiszewski P. [Immunosuppressive therapy after human lung transplantation--drugs presentation]. *Pneumonol Alergol Pol* 2005;73:100–7.
- [83] Dominika Klimczak. Leczenie immunosupresyjne po przeszczepieniu nerki. *Pzegląd Urologiczny* 2017.
- [84] Smith R, Kuet K-P, Akil M, Kilding R. FRI0277 Is Mycophenolate Mofetil Effective in the Treatment of Large Vessel Vasculitis? *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015;74:525–525. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-eular.1447>.
- [85] Becker DE. Basic and Clinical Pharmacology of Glucocorticosteroids. *Anesthesia Progress* 2013;60:25–32. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-60.1.25>.
- [86] Boots JMM, Christiaans MHL, van Hooff JP. Effect of immunosuppressive agents on long-term survival of renal transplant recipients: focus on the cardiovascular risk. *Drugs* 2004;64:2047–73. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464180-00004>.
- [87] Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ, Cooper KD. Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G1 phase in human keratinocyte stem cells. *J Clin Invest* 1997;99:2094–9. <https://doi.org/10.1172/JCI119382>.
- [88] Trapp A, Weis M. The Impact of Immunosuppression on Endothelial Function. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2005;45:81–7.

- [89] Olszynski K, Zimowska M. Budowa i funkcja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. *Postępy Biochemii* 2009;55.
- [90] Kedzierska K, Sporniak-Tutak K, Kolasa A, Domański L, Domański M, Sindrewicz K, et al. The effect of immunosuppressive therapy on renal cell apoptosis in native rat kidneys. *Histol Histopathol* 2015;30:105–16. <https://doi.org/10.14670/HH-30.105>.
- [91] Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–55. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>.
- [92] Wilk A, Szypulska-Koziarska D, Kędzierska-Kapuza K, Kolasa-Wołoskiuk A, Misiakiewicz-Has K, Ciechanowski K, et al. Effect of long-term immunosuppressive therapy on native rat liver morphology and hepatocyte- apoptosis. *Transpl Immunol* 2018;50:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.05.001>.
- [93] Jaminon A, Reesink K, Kroon A, Schurgers L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int J Mol Sci* 2019;20:E5694. <https://doi.org/10.3390/ijms20225694>.
- [94] Yanagisawa H, Wagenseil J. Elastic fibers and biomechanics of the aorta: Insights from mouse studies. *Matrix Biol* 2020;85–86:160–72. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.03.001>.
- [95] Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009;89:957–89. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>.
- [96] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, von Der Leyen HE, Morris RE, et al. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1152–8. <https://doi.org/10.1161/hq0701.092104>.
- [97] Waller JR, Brook NR, Bicknell GR, Murphy GJ, Nicholson ML. Mycophenolate mofetil inhibits intimal hyperplasia and attenuates the expression of genes favouring smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplant Proc* 2005;37:164–6. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.01.049>.
- [98] Li G, Qin L, Wang L, Li X, Caulk AW, Zhang J, et al. Inhibition of the mTOR pathway in abdominal aortic aneurysm: implications of smooth muscle cell contractile phenotype, inflammation, and aneurysm expansion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;312:H1110–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00677.2016>.
- [99] Zhou B, Li W, Zhao G, Yu B, Ma B, Liu Z, et al. Rapamycin prevents thoracic aortic aneurysm and dissection in mice. *J Vasc Surg* 2019;69:921-932.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.05.246>.

- [100] Hayashi-Hori M, Aoki H, Matsukuma M, Majima R, Hashimoto Y, Ito S, et al. Therapeutic Effect of Rapamycin on Aortic Dissection in Mice. *Int J Mol Sci* 2020;21:3341. <https://doi.org/10.3390/ijms21093341>.
- [101] Kurpinski K, Park J, Thakar RG, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Mol Cell Biomech* 2006;3:21–34.
- [102] Koskinen PK, Lemström KB, Häyry PJ. How cyclosporine modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. *Am J Pathol* 1995;146:972–80.
- [103] Soukiasian HJ, Czer LSC, Wang H-M, Luthringer D, Wang C, Kamlot A, et al. Inhibition of graft coronary arteriosclerosis after heart transplantation. *Am Surg* 2004;70:833–40.
- [104] Rodrigues-Diez R, González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Rodrigues-Diez RR, Egido J, Ortiz A, et al. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Sci Rep* 2016;6:27915. <https://doi.org/10.1038/srep27915>.
- [105] Libby P, Tanaka H. The pathogenesis of coronary arteriosclerosis (“chronic rejection”) in transplanted hearts. *Clin Transplant* 1994;8:313–8.
- [106] Bacakova L, Travnickova M, Filova E, Matějka R, Stepanovska J, Musilkova J, et al. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. *IntechOpen*; 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77115>.
- [107] Bianchi R, Rodella L, Rezzani R. Cyclosporine A up-regulates expression of matrix metalloproteinase 2 and vascular endothelial growth factor in rat heart. *Int Immunopharmacol* 2003;3:427–33. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00020-1).
- [108] Osman B, Akool E-S, Doller A, Müller R, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Differential modulation of the cytokine-induced MMP-9/TIMP-1 protease-antiprotease system by the mTOR inhibitor rapamycin. *Biochem Pharmacol* 2011;81:134–43. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.09.011>.
- [109] Brook NR, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. Cyclosporine and rapamycin act in a synergistic and dose-dependent manner in a model of immunosuppressant-induced kidney damage. *Transplant Proc* 2005;37:837–8. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.12.147>.
- [110] Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2002;62:2257–63. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00668.x>.
- [111] Waller JR, Brook NR, Bicknell GR, Nicholson ML. Differential effects of modern immunosuppressive agents on the development of intimal hyperplasia. *Transpl Int* 2004;17:9–14. <https://doi.org/10.1007/s00147-003-0653-8>.

XI. Spis tabel, rycin i rysunków

Tabela 1. Wzrost aktywności poszczególnych MMP w wybranych jednostkach chorobowych.	17
Tabela 2. Najczęściej stosowane schematy leczenia immunosupresyjnego u pacjentów po przeszczepieniu nerki.	18
Tabela 3. Zastosowane schematy leczenia immunosupresyjnego.	24
Tabela 4. Parametry morfometryczne uzyskane z pomiarów ściany aorty szczurów traktowanych różnymi schematami leczenia immunosupresyjnego.	35
Tabela 5. Obszar zajmowany przez włókna kolagenowe w tunica media w poszczególnych grupach szczurów.	36
Tabela 6. Obszar zajmowany przez włókna kolagenowe w tunica media w poszczególnych protokołach lekowych opartych na takrolimusie, cyklosporynie A, mykofenolanie mofetylu lub rapamycynie.	36
Tabela 7. Ekspresja MMP-2 i MMP-9 oraz ich inhibitorów- TIMP-1 i TIMP-2 w badanych grupach. Zależność pomiędzy ekspresją MMPs i ich inhibitorów w odniesieniu do zachowania równowagi lub braku równowagi.	41
Rycina 1A, 1B. Aorty szczurów, którym podawano leki immunosupresyjne, według trójlekowego schematu. (A) Barwienie hematoksyliną-eozyną (H-E);	31
Rycina 2A, 2B, 2C. Wizualizacja włókien kolagenowych (ciemnoniebieski) (A); kolagen typu I o żółtym zabarwieniu i silną dwójłomnością (żółte strzałki); kolagen typu III o zabarwieniu zielonkawym i słabej dwójłomności (zielone strzałki) (B); włókna retikulino- we (kolagen typu III) w ścianie aorty (C).	32
Rycina 3A, 3B. Immunolokalizacja MMP-2 i TIMP-2 w aorcie szczurów z grupy kontrolnej i doświadczalnych. IHC A i B. Powiększenie obiektywu x 40;	38
Rycina 4A, 4B. Immunolokalizacja MMP-9 i TIMP-1 w aorcie szczurów z grupy kontrolnej i doświadczalnych. IHC A i B. Powiększenie obiektywu x 40;	39
Rysunek 1. Budowa ściany aorty	13