mgr Ewa Waszkiewicz

temat pracy: *„Wpływ wieku i interleukiny 6 na proces uszkodzenia mięśnia sercowego indukowany lipopolisacharydem bakteryjnym”*

STRESZCZENIE

Jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na oddziałach intensywnej terapii jest niewydolność krążenia wywołana wstrząsem septycznym. Pacjenci przebywający na oddziałach intensywnej opieki medycznej są szczególnie podatni na zakażenia z uwagi na często starszy wiek, obciążenie licznymi schorzeniami i ciężki stan ogólny, które upośledzają odporność oraz procedury inwazyjne naruszające ciągłość fizjologicznych barier ochronnych. Wstrząs septyczny rozwijający się w następstwie zakażenia charakteryzuje się spadkiem oporu naczyniowego oraz kurczliwości mięśnia sercowego. Uszkodzone tkanki oraz komórki układu odpornościowego są źródłem dużych ilości cytokin i mediatorów stanu zapalnego, które odpowiedzialne są za wystąpienie wstrząsu septycznego.

Do silnych czynników indukujących ostrą odpowiedź komórek układu odpornościowego w przebiegu zakażeń bakteryjnych należy lipopolisacharyd bakteryjny (LPS), który jest antygenem zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Wśród cytokin uwalnianych w przebiegu wstrząsu septycznego jest interleukina 6 (IL-6), która pełni rolę zarówno czynnika prozapalnego, jak też immunomodulującego. Nie wiadomo, jak efektywne są mechanizmy protekcyjne zależne od IL-6 u pacjentów w starszym wieku, a więc u chorych najbardziej narażonych na wystąpienie wstrząsu septycznego.

Celem pracy jest ocena wpływu stanu zapalnego indukowanego podaniem lipopolisacharydu ściany bakteryjnej (LPS) na aktywację szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego związanych z uszkodzeniem lub cytoprotekcją w komórkach mięśnia sercowego, w zależności od wieku oraz obecności bądź braku interleukiny 6 u myszy.

Badanie przeprowadzono na 43 samcach myszy szczepu pozbawionego funkcjonalnego genu IL-6 (C57BL6/J$^{IL6-/-TMKopf}$ - IL6KO) oraz na 44 zwierzętach szczepu kontrolnego (C57BL6/J - WT), wytwarzających IL-6 w sposób fizjologiczny. W celu porównania wpływu wieku na badane zjawiska doświadczeniu wykonano na zwierzętach w wieku 3 miesięcy (49 myszy) oraz 24 miesięcy (38 myszy). Grupy kontrolne każdego genotypu stanowiły zwierzęta,

którym podano dootrzewnowo 0,9% roztwór chlorku sodu w dawce 10 ml/kg m.c., natomiast grupy badane obydwu genotypów otrzymywały LPS z Escherichia coli według następującego schematu: grupa „0,1 LPS" otrzymała LPS w niskiej dawce 0,1 mg/ kg m.c; grupa „10 LPS" otrzymała wysoką dawkę LPS (10 mg/ kg m. c.) w celu wywołania objawów wstrząsu septycznego; ostatnie grupy („0,1+10 LPS") otrzymały dwie dawki LPS – najpierw niską (0,1 mg/kg m.c. -„hartującą"), a po 24 godzinach wysoką dawkę (10 mg/kg m.c.). Po 24 godzinach od podania ostatnich dawek LPS myszy uśmiercano przez przerwanie ciągłości rdzenia przedłużonego i pobierano krew oraz serce do dalszych badań. Podstawę serca utrwalano w 10% roztworze buforowanej formaliny, a pozostałe fragmenty lewej komory umieszczano w ciekłym azocie w celu późniejszej analizy metodami biologii molekularnej. Ocenę nasilenia nacieku zapalnego w mięśniu sercowym wykonano w preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną oraz w barwieniu immunohistochemicznym w kierunku powierzchniowego antygenu leukocytarnego CD45. Nasilenie procesu apoptozy oceniono na podstawie ilości jąder komórkowych zabarwionych fluoresceiną w badaniu metodą TUNEL. Zamrożone fragmenty lewej komory posłużyły do oceny ekspresji i fosforylacji białek metodą Western Blotting. Analizowano elementy szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego, biorące udział w odpowiedzi kardiomiocytów na czynniki uszkadzające i regulowanych przez IL-6: STAT3, ERK1/2, Akt1/2/3, a także białka wpływające na apoptozę: Bcl-2 i p53. Ponadto wykonano analizę ekspresji regulatorów przekaźnictwa: białek SOCS1/3 i PIAS.

Wyniki: U zwierząt młodych podanie wysokiej dawki LPS prowadzi do pobudzenia szlaków przekaźnictwa JAK/STAT, MEK/ERK, z jednoczesnym obniżeniem ekspresji białek hamujących (PIAS i SOCS3), bez istotnego wpływu na kaskadę IP3K/Akt, która jest aktywowana niską dawką LPS. Brak IL-6 nie zmienia istotnie odpowiedzi kaskad JAK/STAT, MEK/ERK na podanie LPS, wywołuje natomiast odmienną reakcję inhibitorów białek STAT3, powodując zmniejszenie ekspresji PIAS oraz zniesienie hamowania ekspresji SOCS3 przez LPS. Podanie wysokiej dawki LPS zwierzętom szczepu referencyjnego prowadzi do zmniejszenia ekspresji białek regulujących apoptozę Bcl-2 i p53 oraz nasilenia procesu apoptozy w mięśniu sercowym, natomiast wcześniejsze podanie hartującej dawki LPS jest w stanie częściowo zapobiec indukcji apoptozy wywołanej wstrząsem septycznym. Przy braku IL-6 występuje obniżenie ilości p53 w mięśniu sercowym, natomiast nasileniu ulega depresyjny wpływ podania LPS na poziom Bcl-2. U myszy w podeszłym wieku obserwuje się znacznie mniejszą dynamikę aktywacji szlaków JAK/STAT oraz MEK/ERK w odpowiedzi na LPS. Wysoka dawka LPS nasila aktywację kaskady IP3K/Akt. Podobnie jak u zwierząt w młodym

wieku, brak IL-6 nie wpływa na zmianę odpowiedzi szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego na podanie LPS. U starych myszy szczepu dzikiego podanie LPS zmniejsza ekspresję białka PIAS, a brak IL-6 sprawia, iż efekt ten jest bardziej nasilony. W odróżnieniu od zwierząt młodych, podanie LPS zwierzętom starym nie wpływa istotnie na ekspresję białka SOCS3, niezależnie od obecności IL-6.

Wnioski: Dootrzewnowe podanie LPS wywołuje zmiany aktywności szlaków przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego JAK/STAT, MEK/EKR, związanych z cytoprotekcją i uszkodzeniem komórek oraz nasilenie apoptozy w mięśniu sercowym. W starszym wieku dynamika zmian aktywności tych szlaków jest istotnie mniejsza, inna jest też odpowiedź szlaku IP3K/Akt. IL-6 ma niewielki wpływ na aktywność szlaków przekaźnictwa w odpowiedzi na LPS, który sprowadza się do ograniczenia ekspresji białek antyapoptotycznych, w niewielkim stopniu nasilając proces apoptozy.