

Streszczenie

Tytuł

Ocena miejscowej stymulacji neoangiogenezy po domięśniowym podaniu wybranych czynników proangiogennych u szczurów.

Wstęp

Rozprawa doktorska jest naturalną kontynuacją prowadzonych od 2006 roku w Katedrze i Klinice Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej badań nad eksperymentalną terapią krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych. Największym wyzwaniem stojącym przed angiochirurgią w XXI wieku jest opracowanie terapii działającej na poziomie mikrokrążenia, powodującą tworzenie nowych naczyń niezależnie od głównych pni naczyniowych. Na całym świecie trwają intensywne badania nad wyborem czynników proangiogennych oraz kolejnością i drogami ich podania. Aby wybrać najbardziej optymalną i skuteczną sekwencję podawania czynników proangiogennych, niezbędne są badania doświadczalne na zwierzętach.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena rekrutacji komórek progenitorowych CD 34 (+), które znajdują się w ścianie nowopowstałych naczyń krwionośnych i analiza różnicy w rekrutacji tych komórek w zależności od zastosowanych czynników proangiogennych oraz ocena stopnia transfekcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń u zdrowych zwierząt doświadczalnych. Kolejnym celem pracy jest ocena wystąpienia ewentualnych ogólnoustrojowych i miejscowych działań niepożądanych terapii bądź jej negatywnych skutków, np. stymulacji wzrostu nowotworów u szczurów.

Material i metody

Na podstawie dostępnej literatury dobrano czynniki proangiogenne – angiopoetynę-1 (ANG-1) i czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (ang. VEGF). Skonstruowano plazmid bicistronowy zawierający ANG-1 i VEGF-165 oraz plazmid zawierający ANG-1. W eksperymencie 30 szczurów doświadczalnych rasy Buffalo podzielono na 3 grupy po 10 zwierząt:

- kontrolną, która otrzymała plazmid nie zawierający czynników proangiogennych,
- grupę zwierząt, które otrzymały plazmid bicistronowy zawierający ANG-1 i VEGF-165,
- grupę zwierząt, które otrzymały plazmid zawierający tylko ANG-1.

Zwierzętom podano w/w czynniki w postaci iniekcji domięśniowych, w zakresie tylnej prawej kończyny. Szczury obserwowano przez trzy miesiące, podczas których rozwijały się harmonijnie. Następnie zwierzęta poddano eutanazji i sekcji. Oceniano narządy wewnętrzne makroskopowo i mikroskopowo, celem wychwycenia ewentualnych patologii. Wycinki z serca, nerek, wątroby, płuc i śledzion poddano badaniom histologicznym. Wycinki z mięśni zainfekowanych kończyn dolnych poddano badaniom histologicznym i immunohistochemicznym. Aby ocenić transfekcję VEGF-165, przygotowane skrawki inkubowano z mysim monoklonalnym przeciwciałem anti-VEGF. W pobranych skrawkach bezpośrednio zabarwiono komórki CD 34 (+), aby ocenić ich ilość i gęstość rozmieszczenia, jako komórek będących markerami nowopowstałych naczyń.

Wyniki

Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w aktywacji komórek CD 34 (+) w obu grupach, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami ANG-1 i ANG-1/VEGF-165 w kontekście liczebności nowopowstałych naczyń.

Dowiedziano, że stopień transfekcji VEGF-165 nie różni się pomiędzy badanymi grupami.

Stwierdzono, że zaproponowana terapia nie powoduje skutków ubocznych u zwierząt ani nie stymuluje powstawania nowotworów.

Wnioski

Potwierdzono stymulację neoangiogenezy, analizując gęstość nowopowstałych naczyń. Wyniki pracy pokrywają się z literaturą światową, która uważa eksperymentalną terapię czynnikami proangiogennymi za rozwiązanie bezpieczne i dające nadzieję na przyszłość. Fakt braku statystycznie istotnej różnicy pomiędzy zagęszczeniem nowych naczyń w grupie ANG-1 i ANG-1/VEGF-165 pokrywa się z obserwacjami autorów sugerujących konieczność sekwencyjnego podawania pojedynczych czynników proangiogennych, celem wspierania procesu tworzenia nowych naczyń na każdym etapie neoangiogenezy. Niewątpliwie badania zarówno nad wektorem, jak i różnymi czynnikami proangiogennymi powinny być kontynuowane, aby opracować skuteczną i bezpieczną terapię mającą zastosowanie u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, u których wyczerpano możliwości leczenia angiochirurgicznego.