

Wpływ diety bogatej w adeninę na stężenie metaloproteinazy 9 (MMP-9), tkankowego inhibitora TIMP-1 oraz kalcyfikację w eksperymentalnej przewlekłej chorobie nerek u szczura.

Beata Sieklucka*^a, Tomasz Domaniewski^a, Zabłudowska Magdalena^a, Kopańko Magdalena^a, Katarzyna Chilkiewicz^a, Malgorzata Galazyn-Sidorczuk^b, Pawlak Dariusz^c, Pawlak Krystyna^a

^a Department of Monitored Pharmacotherapy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

^b Department of Toxicology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

^c Department of Pharmacodynamics, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

*beata.sieklucka@umb.edu.pl

Wstęp

Przewlekła choroba nerek (PChN) jest złożonym zespołem chorobowym, który rozwija się w wyniku stopniowego zmniejszania się liczby czynnych nefronów i prowadzi do wystąpienia powikłań sercowo naczyniowych, m.in. do wystąpienia kalcyfikacji naczyń krwionośnych (VC). VC jest wynikiem zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej, nieprawidłowości w stężeniu hormonów kalciotropowych oraz nadmiernym odkładaniem się złogów wapniowo-fosforanowych w ścianie naczyń krwionośnych. Jednym z ważnych białek biorących udział w procesie wapnienia jest metaloproteinaza-9 (MMP-9) oraz jej tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP-1). MMP-9 rozkłada elastynę, której krótsze peptydy wiążą się z receptorami znajdującymi się na powierzchni VSMCs, prowadząc do wapnienia tętnic.

Materiały i metody

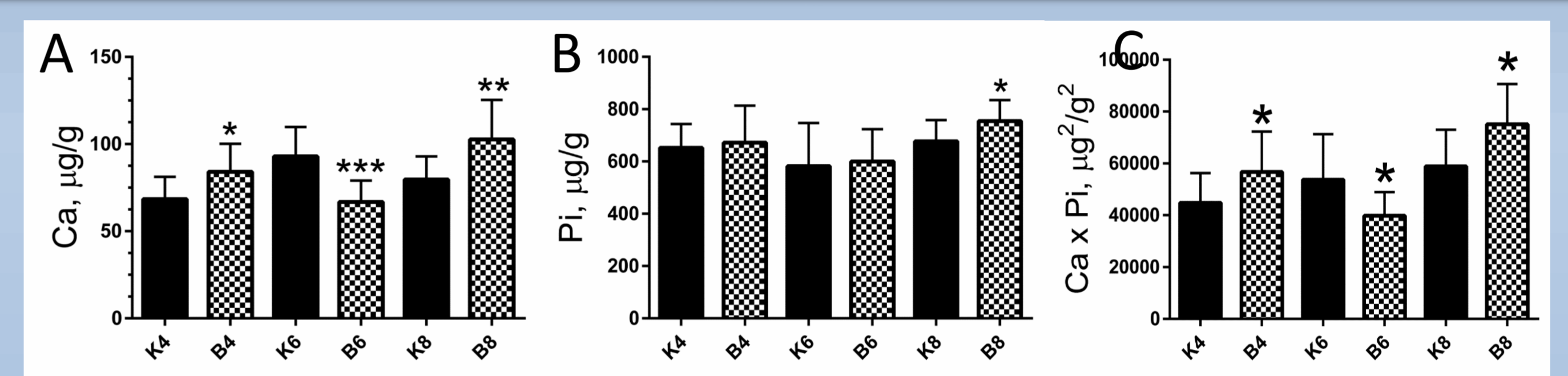
W badaniu wykorzystano 72, 8-tygodniowe szczury rasy Wistar, które zostały podzielone na 6 grup: grupę kontrolną (K4, K6, K8) oraz badaną (B4, B6, B8). Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały standardową paszę, natomiast zwierzęta z grupy badanej dostawały specjalistyczną paszę z dodatkiem 0.3% adeniny, aby wywołać PChN oraz kalcyfikację naczyń krwionośnych. W surowicy oznaczono stężenia klasycznych markerów funkcji nerek: mocznika i kreatyniny, poziom hormonów kalciotropowych: parathormonu oraz 25(OH)D, parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz MMP-9 i TIMP-1. Stopień kalcyfikacji oceniono na podstawie zawartości wapnia, fosforu oraz współczynnika wapniowo-fosforanowego w aorcie stosując atomową spektrometrię absorpcyjną.

Wyniki

	K4	B4	K6	B6	K8	B8
Masa ciała (g)	394,0±28,7	344,0±33,9**	414,0±30,4	344,0±38,3***	458,0±27,0 ^{^^^} ■	351,0±48,6***
Pobór wody (g/dzień)	25,3±7,15	97,5±18,2***	29,4±4,38	54,7±14,5###	30,8±3,03	65,3±14,3***###
Objętość moczu (ml/dzień)	8,45±5,1	26,9±6,83***	7,92±5,47	28,9±6,82***	8,63±3,32	26,0±9,78***
Pobór pokarmu (g/dzień)	22,4±1,58	17,00±0,76**	22,7±1,18	16,8±5,42	22,7±0,47	19,8±2,75*#
Kreatynina (mg/dl)	0,12±0,04	0,38±0,12**	0,11±0,02	0,62±0,22***##	0,12±0,03	1,09±0,35***###
Mocznik (mg/dl)	37,7±5,00	54,8±10,2**	37,2±3,56	71,2±12,6***###	41,5±4,89■	96,9±24,0***###●
PTH (pg/ml)	334,0±109,0	797,0±270,0*	370,0±229,0	1592,0±490,0***###	225,0±115,0^	2105,0±814,0***###
25(OH)D ₃ (ng/ml)	16,2±3,95	11,6±2,9**	16,1±4,2	11,8±2,1**	14,7±3,2	9,42±2,48***
Ca (mg/dl)	5,78±1,85	5,47±0,72	5,69±0,94	5,31±0,82	4,86±0,82■	5,24±0,59
Pi (mg/dl)	4,61±0,77	4,09±0,32*	4,37±0,428	3,84±0,37**	4,03±0,26^■	4,45±0,52*#■
Ca x Pi (mg ² x dl ²)	25,2 (18,2-45,3)	22,5 (16,5-29,8)	25,0 (16,3-34,7)	19,9* (15,9-25,6)	19,7■ (14,0-25,9)	23,4*● (20,2-30,4)

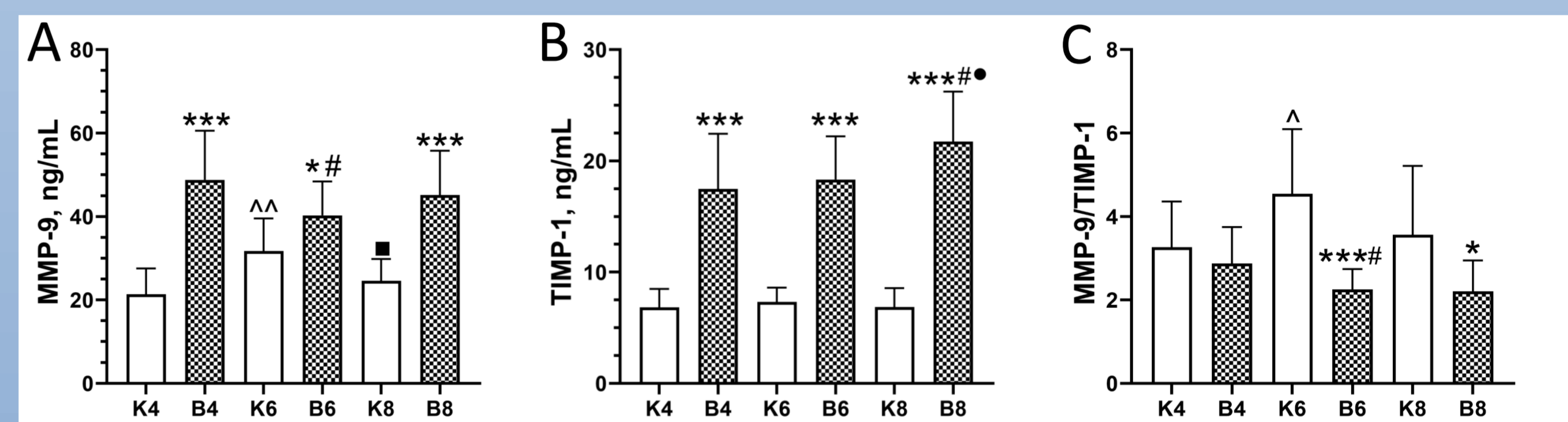
Tabela 1 Ogólna charakterystyka grup kontrolnych (K) i grup z przewlekłą chorobą nerek (B).

Dane przedstawione są jako średnia ± SD (odchylenie standardowe) / mediana (wartość minimalna-maksymalna), n = 12 w każdej grupie. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (K vs odpowiednia grupa B) #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 (B4 vs B6, B8) ●p<0,05; ●●p<0,01, ●●●p<0,001 (B6 vs B8) ■p<0,05; ■■p<0,01 (K6 vs K8) ^p<0,05 (K4 vs K6/K8) Skróty: K – grupa kontrolna; B – grupa badana; PTH – parathormon; 25(OH)D₃ – witamina D₃; Ca – wapń; Pi – fosforany; Ca x Pi – iloczyn wapniowo-fosforanowy



Rycina 1 Zmiany stężenia wapnia (A), fosforu (B), współczynnika wapniowo-fosforanowego (C) w aorcii zwierząt kontrolnych (K) i z przewlekłą chorobą nerek (B).

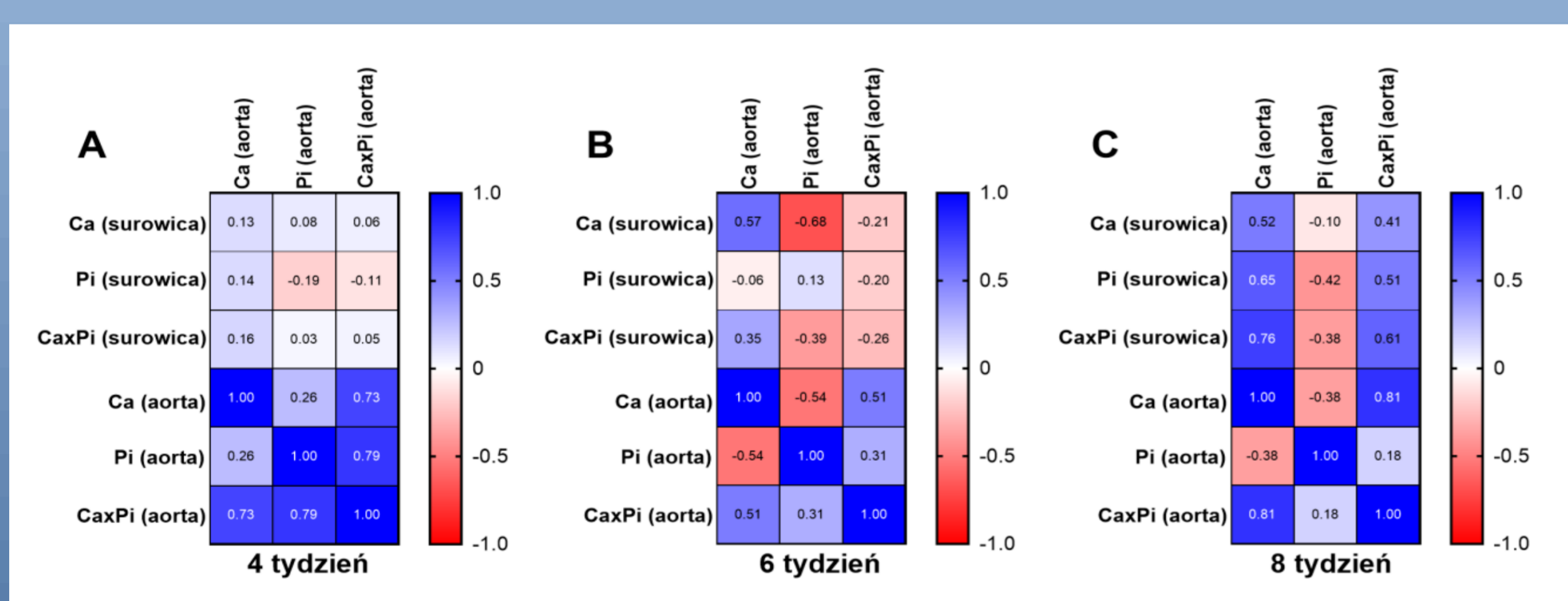
Dane przedstawione są jako średnia ± SD (odchylenie standardowe), n = 12 w każdej grupie. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (K vs odpowiednia grupa B) Skróty: K – grupa kontrolna; B – grupa badana; Ca x Pi – iloczyn wapniowo-fosforanowy, Pi – fosforany, Ca – wapń



Rycina 2. Zmiany stężenia MMP-9 (A), TIMP-1 (B) i współczynnika TIMP-1/MMP-9 w surowicy zwierząt kontrolnych (K) i z przewlekłą chorobą nerek (B)

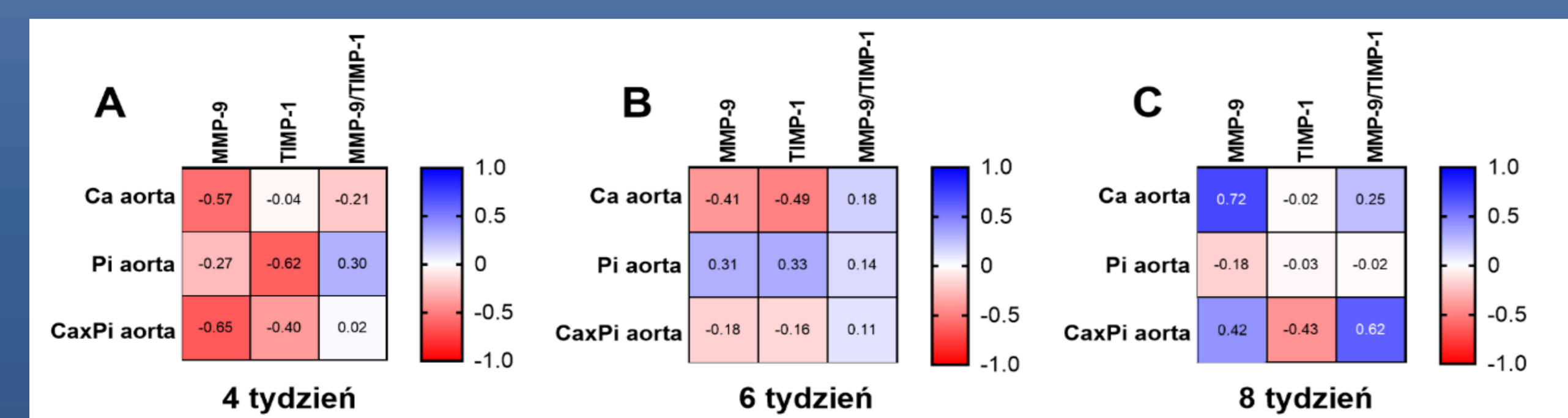
Dane przedstawione są jako średnia ± SD (odchylenie standardowe), n = 12 w każdej grupie. *p<0,05; ***p<0,001 (kontrola vs odpowiednia grupa CKD), #p<0,05 (CKD4 vs CKD6, CKD8), ^p<0,05, ^^p<0,01 (CON4 vs CON6/CON8), ●p<0,05 (CKD6 vs CKD8)

Skróty: CON/K – grupa kontrolna; CKD/B – grupa badana; MMP-9 – metaloproteinaza-9; TIMP-1 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1



Rycina 3. Macierze korelacji przedstawiające zależności między parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej w surowicy, a stężeniem tych pierwiastków w aorcii w grupie zwierząt z przewlekłą chorobą nerek.

Skróty: Ca – wapń; Pi – fosforany; Ca x Pi – iloczyn wapniowo-fosforanowy



Rycina 4 Macierz korelacji pomiędzy stężeniem MMP-9, TIMP-1 oraz MMP-9/TIMP-1 a stopniem kalcyfikacji naczyń krwionośnych w grupie zwierząt z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek.

Skróty: Ca – wapń; Pi – fosforany; Ca x Pi – iloczyn wapniowo-fosforanowy; MMP-9 – metaloproteinaza 9; TIMP-1 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1

	B4	B6	B8			
MMP-9	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1
		R = 0.214		R = 0.582		R = 0.125
		NS		p = 0.03		NS
TIMP-1	R = 0.214		R = 0.582		R = 0.125	
	NS		p = 0.03		NS	
TIMP-1/MMP-9	R = 0.352	R = -0.725	R = 0.323	R = -0.525	R = 0.512	R = -0.578
	NS	p = 0.007	NS	P = 0.05	p = 0.064	p = 0.03

Tabela 2. Zależności pomiędzy stężeniem MMP-9, TIMP-1 a wskaźnikiem MMP-9/TIMP-1 w grupie szczurów z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek.

R = współczynnik korelacji rang Spearmana; p = poziom prawdopodobieństwa; NS – nieistotne statystycznie; pogrubionym drukiem zaznaczono istotną korelację pomiędzy badanymi parametrami; kursywą zaznaczono tendencję do korelacji Skróty: B – grupa badana; MMP-9 – metaloproteinaza 9; TIMP-1 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1

	B4	B6	B8			
MMP-9	Kreatynina	Mocznik	Kreatynina	Mocznik	Kreatynina	Mocznik
	R = 0.652	R = 0.764	R = 0.631	R = 0.338	R = 0.072	R = -0.112
	p = 0.015	p = 0.002	p = 0.01	NS	NS	NS
TIMP-1	R = 0.617	R = 0.561	R = 0.818	R = 0.691	R = 0.466	R = 0.183
	p = 0.02	p = 0.046	p = 0.0003	p = 0.006	NS	NS
MMP-9 /TIMP-1	R = -0.239	R = -0.187	R = -0.288	R = -0.399	R = -0.169	R = 0.033
	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabela 3. Zależności pomiędzy stężeniem MMP-9, TIMP-1, oraz wskaźnikiem MMP-9/TIMP-1 a klasycznymi markerami funkcji nerek w grupie zwierząt z przewlekłą chorobą nerek.

R = współczynnik korelacji rang Spearmana; p = poziom prawdopodobieństwa; NS – nieistotne statystycznie; pogrubionym drukiem zaznaczono istotną korelację pomiędzy badanymi parametrami;

Skróty: B – grupa badana; MMP-9 – metaloproteinaza 9; TIMP-1 – tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1

Wnioski

- PChN prowadzi do wystąpienia nieprawidłowości w gospodarce wapniowo-fosforanowej, wtórnej nadczynności przytarczyc, niedoboru kalcytriolu oraz nasilonej kalcyfikacji w surowicy szczurów z eksperymentalną PChN.
- PChN prowadzi do zaburzenia układu MMP-9/TIMP-1 w surowicy, które przejawia się znacznym wzrostem stężenia MMP-9 oraz TIMP-1 w surowicy zwierząt z PChN w porównaniu do odpowiedniej grupy kontrolnej krwi.
- Obserwowany spadek indeksu MMP-9/TIMP-1 w surowicy zwierząt z PChN związany jest z nadmierną aktywacją TIMP-1, który był odpowiedzią kompensacyjną na nadmierną degradację macierzy przez MMP-9.
- Stężenie MMP-9 i TIMP-1 dodatkowo korelowało z klasycznymi markerami uszkodzenia nerek: kreatyniną i mocznikiem, co wskazuje, że zwiększona aktywność tych enzymów jest ściśle związana ze zwiększonym zwłóknieniem kłębuszków nerkowych oraz postępującym uszkodzeniem nerek.
- W zaawansowanym stadium PChN, podwyższone stężenie MMP-9 dodatkowo koreluje z zawartością wapnia i współczynnikiem wapniowo-fosforanowym, co wskazuje, że MMP-9 może być ważnym czynnikiem biorącym udział w patologicznej przebudowie naczyń krwionośnych, sprzyjając rozwojowi kalcyfikacji.
- Ocena stężenia układu MMP-9/TIMP-1 może stanowić pomocniczy biomarker diagnostyczny służący pośredniej ocenie kalcyfikacji naczyń krwionośnych w przebiegu PChN.