

Piotr Gierej

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Ekspresja rezystyny w wątrobie pacjentów z niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby a morfologiczno-kliniczne wykładniki choroby”

Wstęp

Niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD – *non-alcoholic fatty liver disease*), definiowana jako nagromadzenie lipidów w hepatocytach przekraczające 5% ich objętości, występuje u 17-33% populacji krajów rozwiniętych, a w populacji osób otyłych może sięgać 70-80%. Towarzyszy jej zwiększone ryzyko zgonu z powodu zarówno choroby wątroby, jak i chorób układu krążenia oraz cukrzycy. W rozwoju NAFLD (od stłuszczenia do marskości) szczególne znaczenie wydaje się mieć tkanka tłuszczowa poprzez szereg wydzielanych cytokin, zwanych adipokinami. Prawdopodobnie adipokiny stanowią jeden z najważniejszych elementów łączących otyłość, insulinooporność i NAFLD. Jedną z adipokin jest rezystyna, której rola w rozwoju stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH – *non-alcoholic steatohepatitis*) jest niejednoznaczna.

Założenia i cele pracy

W związku ze sprzecznymi wynikami doniesień (zwykle na niewielkich grupach chorych) istnieje potrzeba dalszych badań celem ustalenia zależności ekspresji rezystyny z występowaniem otyłości, insulinooporności, dyslipidemii i nasileniem stopnia zaawansowania NAFLD. Większość publikacji dotyczy analizy ekspresji rezystyny w surowicy – jedynie pojedyncze – bezpośredniej oceny wątroby jako jednego z głównych narządów docelowych dla rezystyny. Ocena immunohistochemiczna poza oceną ekspresji rezystyny dostarcza informacji o jej lokalizacji w wątrobie.

Cele pracy:

1. Ocena immunohistochemicznej ekspresji rezystyny w wycinkach wątroby pobranych od otyłych chorych, poddanych operacji bariatrycznej.
2. Określenie zależności występowania rezystyny od stopnia zaawansowania NAFLD z porównaniem do grupy otyłych bez NAFLD i grupy kontrolnej.
3. Ocena zależności ekspresji rezystyny od:
 - wybranych parametrów klinicznych (BMI, wiek, płeć)
 - biochemicznych
 - wybranych chorób towarzyszących (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia)
 - przyjmowania metforminy w grupie osób z cukrzycą typu drugiego

Material

Badanie ma charakter retrospektywny. Wykorzystano zostały bloczki parafinowe, wykonywane do rutynowej diagnostyki, zawierające wycinki wątrób pobrane od 214 chorych z otyłością patologiczną. Preparaty oceniano były w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii WUM. Pacjenci byli kwalifikowani do operacji bariatrycznej i operowani w latach 2005-2013 w Klinice Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby SPCSK Banacha 1a w Warszawie. Grupę kontrolną stanowiły wycinki pobrane w trakcie operacji naczyniaków wątroby w latach 2002-2013 od 17 osób z prawidłową masą ciała i prawidłową wątrobą poza naczyniakami.

Metoda

Do barwień immunohistochemicznych użyto monoklonalnego mysiego przeciwciała I-rzędowego dla rezystyny (firmy Acris nr kat. AM01373PU-N).

Stopień zaawansowania NAFLD oceniano był na podstawie punktowej klasyfikacji wg. Kleiner – NAS (NAFLD Activity Score), zgodnie z którą rozpoznanie NASH stawia się przy uzyskaniu wartości powyżej 4pkt.

Ekspresja rezystyny oceniano w sposób półilościowy:

- w zatokowych komórkach histiocytarnych Browicza-Kupffera (0-3pkt)
- w histiocytach położonych wokół hepatocytów ze stłuszczeniem (0-3pkt)
- w makrofagach nacieku zapalnego (0-3pkt).

Ekspresja rezystyny łącznie była sumą punktów ekspresji rezystyny w powyższych lokalizacjach (0-9pkt).

Ocenie statystycznej zostały poddane następujące zależności:

1. Nasilenie zmian histopatologicznych NAFLD (punktacja w skali NAS, nasilenie zapalenia, stłuszczenia i zwyrodnienia wodniczkowego hepatocytów), a ekspresja rezystyny w grupie chorych otyłych.

2. Nasilenie ekspresji rezystyny a:

- wybrane parametry kliniczne (wiek, płeć, BMI),
- wybrane parametry biochemiczne,
- wybrane współistniejące choroby towarzyszące (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia),
- leczenie metforminą w grupie osób z cukrzycą typu 2.

4. Porównanie ekspresji rezystyny w wątrobie grupy kontrolnej z grupą osób otyłych.

Wyniki

I. Oceniając lokalizację ekspresji rezystyny w wątrobie zaobserwowano:

1. Brak ekspresji rezystyny w hepatocytach.
2. Ekspresję rezystyny w każdym przypadku w makrofagach nacieku zapalnego.
3. Ekspresję rezystyny w zatokowych komórkach Browicza-Kupffera, zależną od stopnia NAS.
4. Ekspresję w histiocytach (potwierdzoną barwieniem z CD68+), otaczających hepatocyty ze stłuszczeniem, korelującą dodatnio z zaawansowaniem NAFLD – nie opisywano dotychczas w literaturze.

Wykazano w teście Kruskala-Wallisa silną dodatnią korelację z zaawansowaniem NAFLD w klasyfikacji wg. Kleiner we wszystkich podstawowych parametrach ($p < 0,001$): całkowitą punktacją w skali NAS, stopniem stłuszczenia hepatocytów, nasileniem zapalenia i zwyrodnieniem wodniczkowym hepatocytów. Korelacja ta była widoczna dla każdej analizowanej lokalizacji ekspresji rezystyny: w makrofagach nacieku zapalnego, komórkach Browicza-Kupffera, histiocytach otaczających hepatocyty ze stłuszczeniem oraz łącznej ekspresji rezystyny.

II. Analiza ekspresji rezystyny w makrofagach nacieku zapalnego

Testem Anova na różnicę średnich pomiędzy poziomami rezystyny oceniono zależność z badanymi parametrami biochemicznymi. Wykazano istotną statystycznie zależność z poziomem: glikemii ($p = 0,034$), HbA1c ($p = 0,007$), insuliny ($p = 0,001$), triglicerydów

($p=0,028$), wskaźnika insulinooporności HOMA ($p<0,001$), witaminą B12 ($p=0,021$). Nie wykazano różnicy pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną.

Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie z wiekiem, BMI, płcią, nadciśnieniem tętniczym oraz przyjmowaniem metforminy. W teście Chi-kwadrat wykazano istotną statystycznie zależność z występowaniem cukrzycy. W analizie korelacji z występowaniem dyslipidemii nie osiągnięto istotności statystycznej.

III. Analiza ekspresji rezystyny w komórkach histiocytarnych Browicza-Kupffera

Testem Anova wykazano istotną statystycznie zależność z poziomem: albumin ($p=0,029$), witaminą B12 ($p=0,021$), cholesterolem HDL ($p=0,043$). Dla wskaźnika de Ritisa ($p=0,057$), białka całkowitego ($p=0,064$) i HbA1c ($p=0,092$), nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej.

Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie z wiekiem, BMI, płcią, nadciśnieniem tętniczym, przyjmowaniem metforminy, cukrzycą, dyslipidemią. Wykazano istotną różnicę w ekspresji rezystyny w komórkach Browicza-Kupffera pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną.

IV. Analiza ekspresji rezystyny w komórkach histiocytarnych otaczających hepatocyty ze stłuszczeniem

Testem Anova wykazano istotną statystycznie zależność z poziomem: AST ($p=0,021$), ALT ($p=0,018$), glikemii ($p=0,026$), HbA1c ($p=0,002$), insuliny ($p=0,004$), triglicerydów ($p=0,002$), wskaźnika insulinooporności HOMA ($p<0,001$).

Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie z wiekiem, BMI, płcią, nadciśnieniem tętniczym, przyjmowaniem metforminy. W teście Chi-kwadrat zależność z występowaniem cukrzycy i dyslipidemią była bliska osiągnięcia istotności statystycznej (odpowiednio $p=0,059$ i $p=0,055$). Wykazano istotną różnicę w ekspresji rezystyny pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną.

V. Analiza ekspresji rezystyny łącznie (suma punktów ekspresji w: makrofagach nacieku zapalnego, komórkach Browicza-Kupffera i histiocytach otaczających hepatocyty ze stłuszczeniem)

Badając współczynnik korelacji Spearmana wykazano istotną statystycznie zależność z poziomem: AST ($p=0,006$), ALT ($p=0,001$), LDH ($p=0,040$), GGTP ($p=0,040$), triglicerydów ($p=0,009$), glikemii ($p=0,001$), HbA1c ($p<0,001$), insuliny ($p=0,001$), wskaźnika insulinooporności HOMA ($p<0,001$). Dla TC/HDL ($p=0,065$), kreatyniny ($p=0,059$), C-peptydu ($p=0,082$) i witaminy B12 ($p=0,054$) nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej.

Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie z wiekiem, płcią, nadciśnieniem tętniczym, przyjmowaniem metforminy. Wykazano zależność z występowaniem cukrzycy ($p=0,026$) i dyslipidemią ($p=0,022$) istotną statystycznie w teście Manna-Whitneya, podobnie

jak z BMI ($p=0,013$) w analizie współczynnika korelacji Spearmana. Wykazano również istotną statystycznie różnicę w ekspresji rezystyny pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną ($p=0,002$).

Wnioski

1. Ekspresja rezystyny u chorych otyłych jest silniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej o prawidłowej masie ciała i koreluje dodatnio ze wzrostem BMI.
2. Źródłem rezystyny w wątrobie są komórki histiocytarne.
3. Rezystyna prawdopodobnie wpływa na rozwój zmian histopatologicznych w wątrobie w przebiegu NAFLD takich jak: stłuszczenie i zwyrodnienie wodniczkowe hepatocytów oraz intensywność nacieków zapalnych. Nie stwierdzono związku rezystyny z procesem włóknienia narządu.
4. Nie wykazano zależności pomiędzy stopniem ekspresji rezystyny w wątrobie a:
 1. a.) wiekiem i płcią chorych,
 2. b.) poziomem wskaźników stanu zapalnego w surowicy (leukocytoza, CRP),
 3. c.) występowaniem nadciśnienia tętniczego.
5. Potwierdzenia wymaga związek ekspresji rezystyny w wątrobie z poziomem witaminy B12.
6. Rezystyna może odgrywać rolę w patogenezie insulinooporności wątrobowej oraz ma wpływ na nasilenie zaburzeń gospodarki lipidowej w wątrobie.
7. Rezystyna nie wpływa na ewentualne korzystne działanie metforminy w leczeniu NAFLD.