

Programul: IDEI
Tipul proiectului: Proiecte de cercetare exploratorie
Cod proiect: ID_1325
Valoare totala contract/2009: 86.856,77 lei
Nr. Contract: 1005/2009

**Titlul proiectului: Inflamatiia si stresul oxidativ in ateroscleroza:
mecanisme celulare si moleculare, identificarea si caracterizarea unor
noi biomarkeri ai disfunctiei vasculare**

**Sinteza rezultatelor experimentale obtinute in anul 2009 conform anexei
IIa din actul aditional nr.1 la contractul de finantare 1005/2009**

Director de proiect: Dr. Adrian Manea

Obiective

Realizarea si caracterizarea unui model experimental de investigare in vitro a modificarilor celulare si moleculare induse de factorii pro-aterogeni in celulele peretelui vascular; Identificarea si analiza markerilor de disfunctie endoteliala si a celulelor musculare netede vasculare expuse conditiilor pro-inflamatorii.

Materiale si metode

Materiale

Reactivii folositi in experimente au fost procurati de la Sigma-Aldrich, Gibco-Life Technologies, Promega, Qiagen si Invitrogen. Anticorpii, siRNA si reactivii pentru imunoprecipitarea cromatinei au fost obtinuti de la Santa Cruz Biotechnology.

Culturi celulare

Celulele musculare netede (CMN) au fost izolate prin explantare din tunica media provenita din aorta toracala de fetus uman si caracterizate anterior (Tirziu si colab., 1999). Celulele (pasaj 8-12) au fost cultivate in DMEM ('Dulbecco's modified Eagle's medium') suplimentat cu 5 mM glucoza, aminoacizi esentiali si neesentiali, selenit de sodiu, acid ascorbic, 10 % ser fetal bovin (SFB) (v/v) si antibiotice (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina, 50 µg/ml neomicina).

Linia de celule endoteliale (CE) umane EAhy926 a fost procurata de la ATCC ('American Tissue Culture Collection'). CE au fost mentinute in conditiile descrise anterior.

Evaluarea viabilitatii celulare

Viabilitatea celulara a fost determinata prin metoda colorimetrica MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Celulele endoteliale si musculare netede au fost cultivate pe placi de 24 godeuri la o densitate de 25.000 celule/godeu si mentinute in conditiile descrise anterior. La sfarsitul perioadei de incubare s-a adaugat 10 µl solutie MTT (5 mg/ml) timp de 3 ore. Cristalele de formazan

au fost dizolvate in solutie de izopropanol suplimentata cu 10% Triton x-100 si 0.1 N HCl. Absorbanta a fost masurata spectrofotometric la 540 nm cu referinta la 630 nm.

Evaluarea productiei intracelulare de specii reactive de oxigen

Productia de specii reactive de oxigen in CMN si CE intacte a fost evaluata cu ajutorul indicatorului fluorescent DCF (Li si Shah, 2002). Celulele au fost incarcate cu DCFH-DA (5 μ M) timp de 30 min la 37 °C, detasate si resuspendate in tampon HEPES salin pH 7.4 (HBSS): NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, glucoza 5 mM, HEPES 25 mM. Intensitatea de fluorescena a DCF a fost monitorizata la $\lambda_{em} = 535$ nm si $\lambda_{em} = 485$ nm. Productia de ROS a fost calculata din raportul unitati relative de fluorescena (RFU)/ μ g proteina totala si exprimata in unitati arbitrare.

Determinarea activitatii NADPH oxidazelor

Activitatea NADPH oxidazelor a fost evaluata in omogenate celulare prin chemiluminescena conform protocolului descris anterior (Ungvari si colab., 2003). Amestecul de reactie a constat in: tampon fosfat 50 mM pH 7.0, EGTA 1 mM, lucigenina 5 μ M, NADPH 100 μ M. Reactia a fost initiata prin adaugarea omogenatului celular (100-150 μ g proteina) iar emisia de lumina a fost monitorizata timp de 15 min, 25 °C cu ajutorul unui luminometru (Tecan). Specificitatea reactiei pentru superoxid a fost evaluata cu ajutorul unor agenti de neutralizare O₂⁻ si inhibitori enzimatici: superoxid dismutaza 300 U/ml, tiron 1mM, DPI – iodura de difenilen 100 μ M, alopurinol 100 μ M, L-NAME 50 μ M si rotenona 50 μ M. Productia de O₂⁻ a fost calculata din raportul unitati relative de lumina (RLU)/ μ g proteina totala si exprimata in unitati arbitrare.

Real time PCR

ARN-ul celular total a fost extras din CMN cu ajutorul unui kit Sigma. Sinteza ADN complementar (ADNc) a fost realizata folosind: 1 μ g ARN total, 0.2 mM dNTP mix, 300 ng primeri random, 10 mM DTT, 80 U inhibitor recombinant de RNaze si 200 U M-MLV revers transcriptaza. In volum final de 50 μ l. Reactia de revers transcriptie a fost realizata la 37 °C (50 min) urmata de inactivare la 70 °C (10 min). Cuantificarea expresiei ARNm a fost realizata prin amplificarea ADNc intr-o masina PCR Opticon 2 (MJ

Research) folosind indicatorul fluorescent SYBR Green I. Condițiile de amplificare au fost optimizate la: 0.2 μ M din primeri sens/antisens, 2.5 mM MgCl₂, temperatura de hibridizare 58 °C, temperatura de elongare 72 °C, 40 cicluri. Gena GAPDH a fost folosită pentru normalizarea internă. Cuantificarea relativă a expresiei ARNm a fost realizată prin metoda comparativă C_T descrisă anterior (Pfaffl, 2001). Nivelul ARNm a fost exprimat în unități arbitrare.

Analiza Western-blot

Culturile de celule au fost spălate de 2x cu PBS pH 7.4 (4 °C), resuspendate în tampon de solubilizare (2xLaemmli) și incubate timp de 20 min la 100 °C. Concentrația proteică a fost determinată prin metoda Amido Black. Proteinele (70 μ g) au fost separate prin electroforeza denaturantă de SDS-poliacriamidă (SDS-PAGE): 10%-Nox1, 8% - Nox4 sau 12% - HSP27 și transferate pe membrana de nitroceluloză. Membranele au fost expuse timp de 1 ora la 25 °C în tampon de blocare (TBS Blotto A - Santa Cruz) iar apoi incubate cu anticorpii primari (IgG policlonal de iepure anti-Nox1, anti-Nox4 și anti-HSP27uman) timp de 12 ore (4 °C) și anti-IgG de iepure cuplat cu HRP timp de 1 ora (25 °C). Detectia benzilor proteice a fost realizată cu sistemul de chemiluminiscentă (Pierce) și analizate cu ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech. Cuantificarea expresiei proteice Nox1 și Nox4 a fost realizată prin normalizare la β -actina.

Dozarea activității superoxid dismutazei

Activitatea totală SOD a fost determinată prin metoda reducerii sarurilor de tertrazoliu de către O₂⁻ ('NBT- nitroblue terazolium') utilizând un kit dezvoltat de Fluka. Reacția enzimatică a fost monitorizată la 450 nm cu ajutorul unui spectrofotometru (Tecan). Activitatea totală SOD a fost exprimată ca unități arbitrare.

Evaluarea nivelului de glutatión redus

Nivelul de GSH a fost detectat prin chemiluminiscentă cu ajutorul unui kit dezvoltat de Promga și exprimat în unități arbitrare.

Analiza statistica

Datele experimentale sunt exprimate ca media \pm deviatia standard din cel puțin trei experimente independente. Evaluarea statistica a fost realizata cu ajutorul programului ANOVA[®]. O valoare a lui $p < 0.05$ a fost considerata semnificativa din punct de vedere statistic.

Rezulate

Evaluarea viabilitatii celulare

Rezultatele masuratorilor au aratat ca in conditiile experimentale alese, concentratiile de Ang II (100 nM-1 μ M), TNF α (5-20 nM), IFN γ , LDL-AGE (100 μ g/ml) si LDLox (100 μ g/ml) nu sunt citotoxice pentru celule.

Modularea productiei intracelulare ROS in CMN si CE de catre factorii pro-inflamatori

Pentru a investiga efectul conditiilor pro-inflamatorii asupra productiei intracelulare de ROS, CMN au fost stimulate pana la 24 ore cu diferite doze de Ang II (100 nM-1 μ M) si respectiv TNF α (10-20 nM). Rezultatele experimentale au evidentiat faptul ca atat Ang II cat si TNF α induc o crestere semnificativa a productiei ROS intr-o maniera dependenta de doza si de timp. Un nivel semnificativ crescut de ROS a fost observat pentru 1 μ M Ang II si respectiv 20 nM TNF α (Figura 1).

Pentru a stabili gradul de specificitate al acestui mecanism relativ la tipul celular, au fost intreprinse experimente similare folosind linia de celule endoteliale umane Eahy926. Analiza CE a demonstrat un profil similar cu cel manifestat de catre CMN in urma actiunii sustinute a Ang II sau TNF α (Figura 2).

Reglarea activitatii si expresiei Nox in conditii pro-inflamatorii

Relatia dintre productia de O₂⁻ si nivelul de expresie corespunzator subunitatilor NADPH oxidazelor fost investigata prin tehnica de chemiluminiscenta si real time PCR. Rezultatele experimentale au demonstrat faptul ca atat Ang II cat si TNF α induc o crestere semnificativa a productiei de O₂⁻ intr-o maniera dependenta de concentratia agonistilor si de timp. Nivelele de expresie ARNm Nox1, Nox4, p22phox, p47phox si p67phox au fost

cuantificate in CMN stimulate pana la 24 ore cu Ang II (1 μ M) sau TNF α (20 ng/ml). Stimularea cu Ang II sau TNF α au indus o crestere semnificativa a nivelelor ARNm peste nivelul controlului: Nox1 (~ 5x si respectiv 2x), Nox4 (~ 3x si respectiv 6x), p22phox (~1.5x), p47phox (~ 1x si respectiv 1.5x), p67phox (~ 1x si respectiv 1.5x), atingand valoarea maxima la 6 ore (Figura 3).

Experimente similare au fost intreprinse utilizand drept agenti pro-inflamatori: IFN γ sau lipoproteine modificate pentru a simula conditiile patologice (LDLox- LDL oxidat, LDL-AGE-LDL modificat prin produsi de glicare avansata). Rezultatele experimentale au reliefat faptul ca stimularea CMN cu IFN γ determina cresteri semnificative ale productiei de superoxid ca urmare a activarii NADPH oxidazelor. De asemenea stimularea CMN cu 100 U/ml IFN γ a indus o crestere semnificativa nivelul ARNm si proteic corespunzator subunitatilor catalitice Nox1 si Nox4. Pentru validarea conditiilor experimentale alese si pentru a demonstra relatia biunivoca dintre inflamatie si stresul oxidativ in patogeneza bolilor cardiovasculare nivelele ARNm SOD2 si MMP9 au fos monitorizate in experimente paralele (Figura 4).

In mod asemanator incubarea CMN cu lipoproteine modificate patologic au determinat cresteri semnificative ale productiei de anion superoxid corelate cu nivele crescute de expresie genica si proteica a subunitatilor Nox (Figura 5).

Evaluarea nivelului de expresie ARNm al unor biomarkeri cu caracter predictor al bolilor cardiovasculare

Pentru validarea conditiilor experimentale alese si pentru a demonstra relatia biunivoca dintre inflamatie si stresul oxidativ in patogeneza bolilor cardiovasculare au fost monitorizate in experimente paralele nivelele ARNm ale unor biomarkeri cu rol important in predictia si dezvoltarea leziunilor aterosclerotice (SOD1, SOD2, MMP9, MCP1, VEGF, HSP27). Analiza real time PCR a evidentiat faptul ca stimularea CMN cu agenti pro-inflamatori (1 μ M Ang II, 20 ng/ml TNF α , 100 U/ml IFN γ , 24 h) determina cresteri semnificative a expresiei genice corespunzatoare acestor molecule (Figura 6).

Evaluarea potentialului antioxidant enzimatic si neenzimatic in conditii pro-inflamatorii

Pentru a evidenta efectul conditiilor proinflamatorii asupra starii redox celulare au fost monitorizate activitatea SOD totala si nivelul de GSH in CMN stimulate timp de 24h cu 1 μ M Ang II, 20 ng/ml TNF α sau 100 U/ml IFN γ . Rezultatele experimentale au evidenciat o crestere accentuata a activitatii SOD pe fondul unei diminuari semnificative a nivelului GSH (Figura 7).

Analiza nivelului de expresie si organizare HSP27

Deoarece nivelul de expresie si organizare a proteinelor chaperone au un rol deosebit de important in modularea unor functii celulare au fost intreprinse studii privind influenta factorilor pro-inflamatorii asupra acestor molecule in CMN. Rezultatele experimentale au reliefat faptul ca stimularea CMN cu diferite concentratii de TNF α (5-20 ng/ml) sau IFN γ (100-1000 U/ml) au determinat cresteri semnificative a nivelului proteic (stimulare 24 h), totodata fiind remarcata aparitia unor forme complexe de organizare – agregate (dimeri/multimeri) intre 45 – 27 kDa. De asemenea stimularea de scurta durata (1 h) a indus o crestere evidenta a nivelului de fosforilare (activare) HSP27 (Figura 8).

Concluzii

Experimentele intreprinse au avut drept scop stabilirea conditiilor optime in vederea elucidarii mecanismelor celulare si moleculare implicate in dezvoltarea placii ateromatoase cat si a investigarii relatiei dintre stresul oxidativ si inflamator. Rezultatele stiintifice preliminare obtinute pana in prezent vor contribui la extinderea cunostintelor actuale asupra proceselor fundamentale implicate in procesul de aterogeneza.

Bibliografie

1. Tirziu D, Jinga VV, Serban G, Simionescu M. The effects of low density lipoproteins modified by incubation with chondroitin 6-sulfate on human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1999; 147: 155-166.

2. Li, J.M., Shah, A.M. Intracellular localization preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 19952–19960.
3. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, et al. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia. Role of tumor necrosis factor- α , NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 418-424.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2002-2007.

Figuri

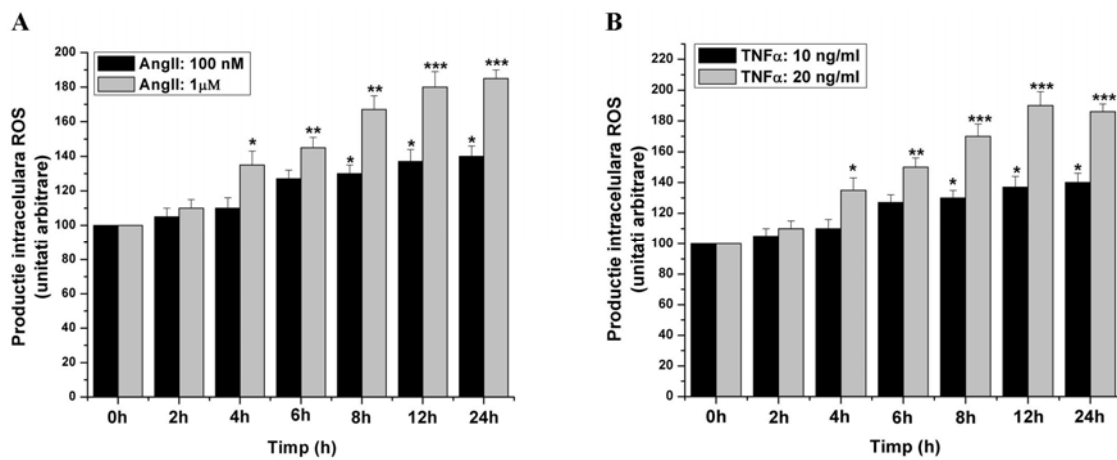


Figura 1: Efectul Ang II (A) și TNF α (B) asupra producției intracelulare de ROS în CMN; n=3, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

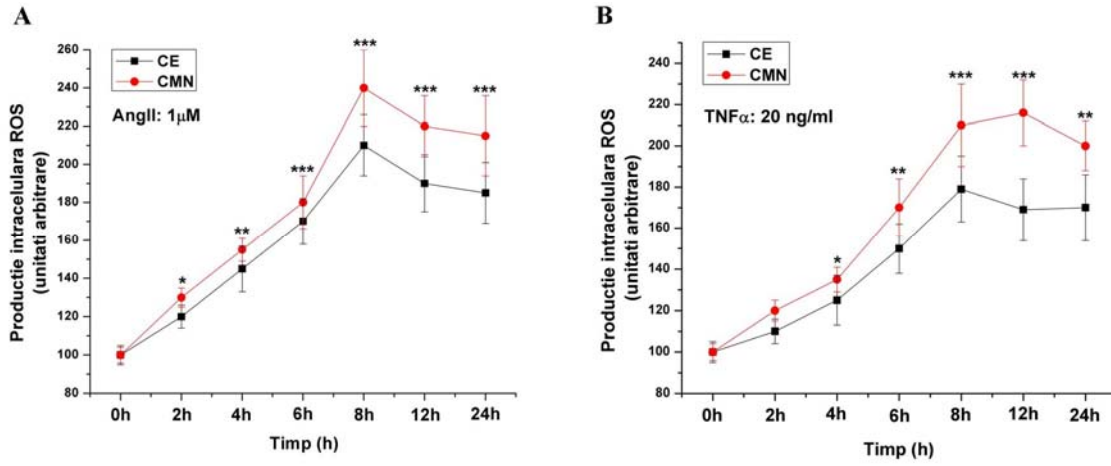


Figura 2: Analiza comparativa a actiunii (in timp) Ang II (A) si TNF α (B) asupra productiei intracelulare de ROS in CMN si CE; n=3, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

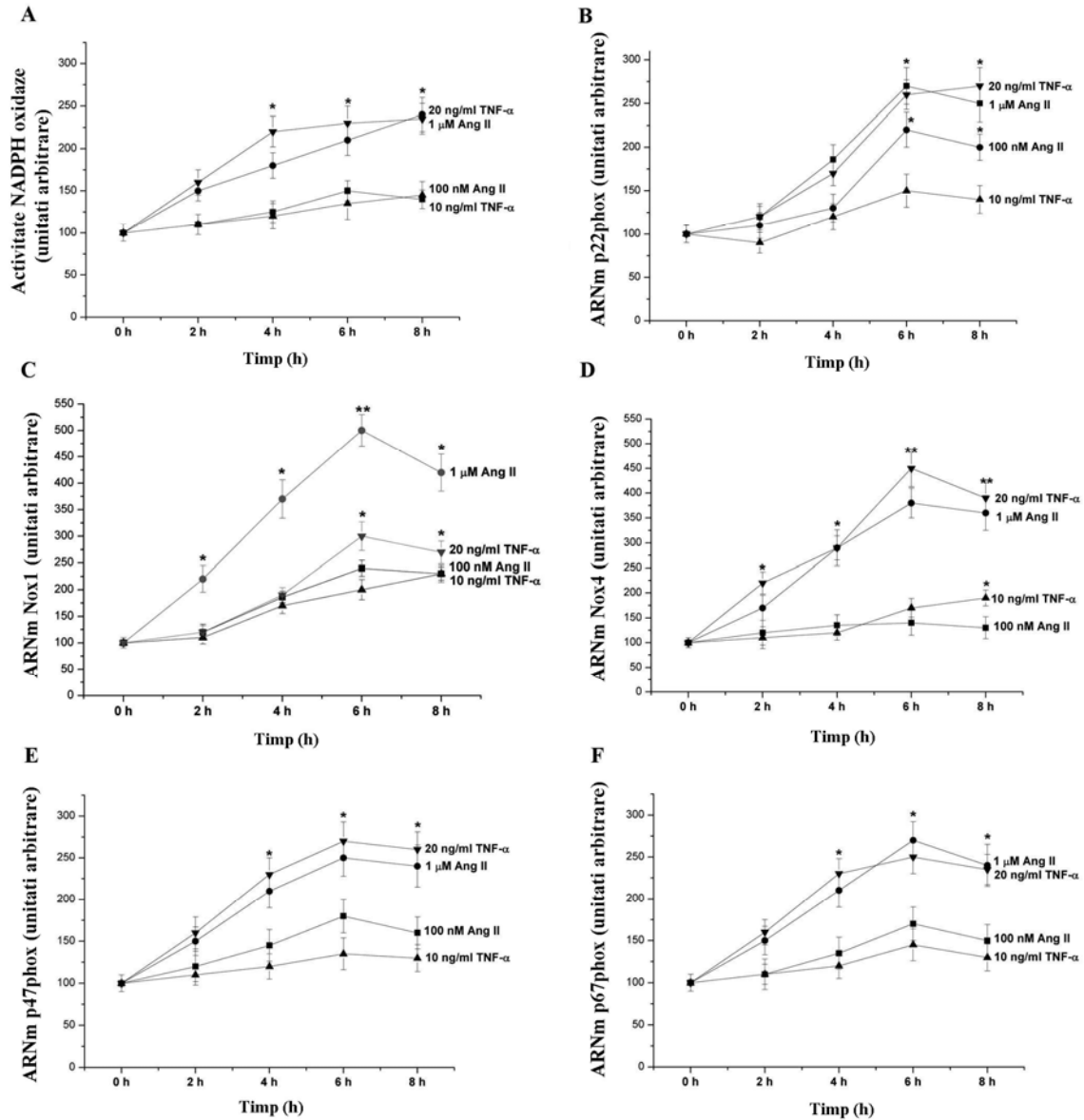


Figura 3: Modularea activitatii NADPH oxidazelor (A) si expresiei genice corespunzatoare subunitatilor p22phox (B), Nox1 (C), Nox4 (D), p47phox (E), p67phox (F) de catre Ang II si TNF α . n=5, * p < 0.05, ** p < 0.01.

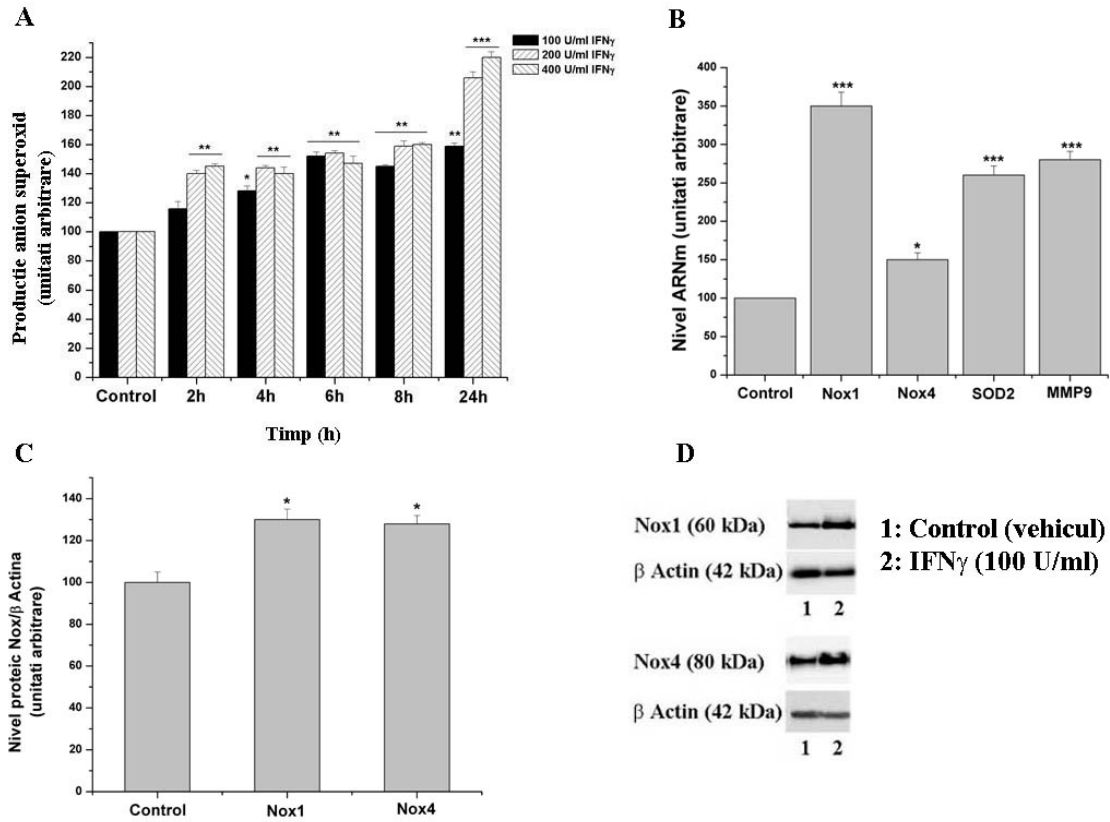


Figura 4: Modularea expresiei si functiei NADPH oxidazelor in CMN stimulate cu IFN γ . Analiza de tip doza-timp a productiei de O $_2^-$ dependenta de NADPH (A); Modularea expresiei genice Nox1, Nox4, SOD2, MMP9 (B) si proteice Nox1, Nox4 (C). Imunoblaturi reprezentative privind reglarea proteica Nox1 si Nox4 (D); n=5, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

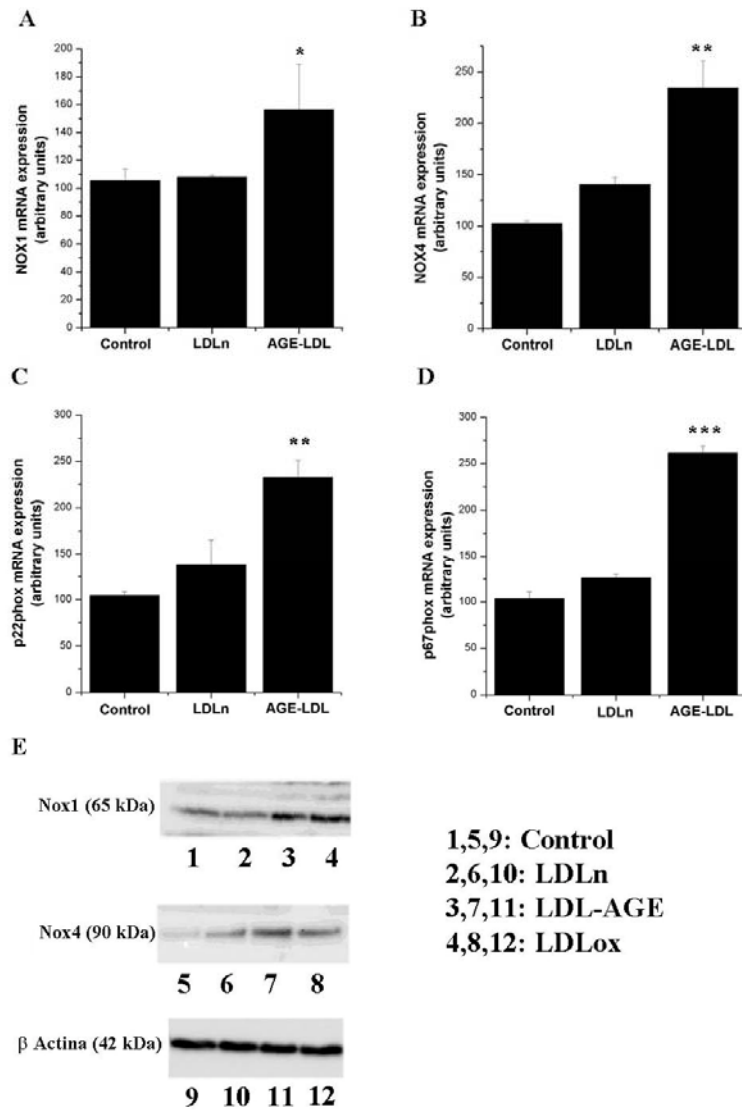


Figura 5: Reglarea nivelului ARNm Nox1 (A), Nox4 (B), p22phox (C), p67phox (D) de care LDL-AGE in CMN; Imunoblaturi reprezentative ilustrand modularea expresiei Nox1 si Nox4; n=3, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

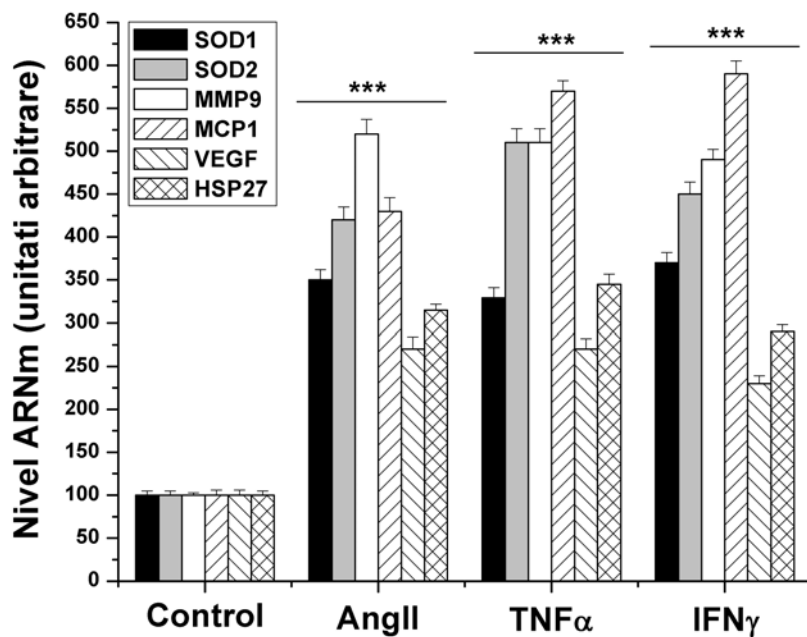


Figura 6: Reglarea expresiei ARNm SOD1, SOD2, MMP9, MCP1, VEGF si HSP27 in CMN de catre AngII, TNF α si IFN γ ; n=3, *** p < 0.001.

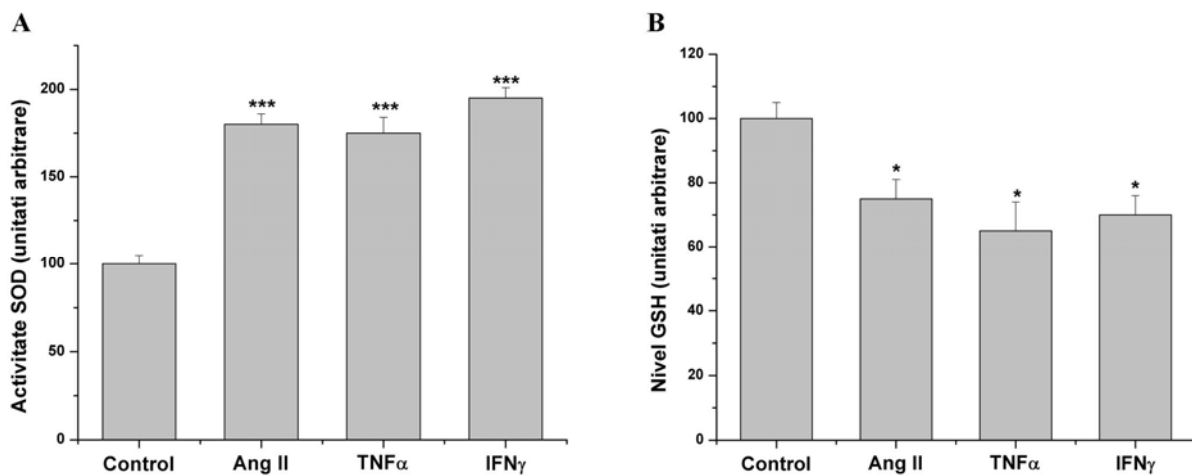


Figura 7: Modularea activitatii SOD totale si a nivelului GSH in CMN de catre AngII, TNF α si IFN γ ; n=3, * p < 0.05, *** p < 0.001.

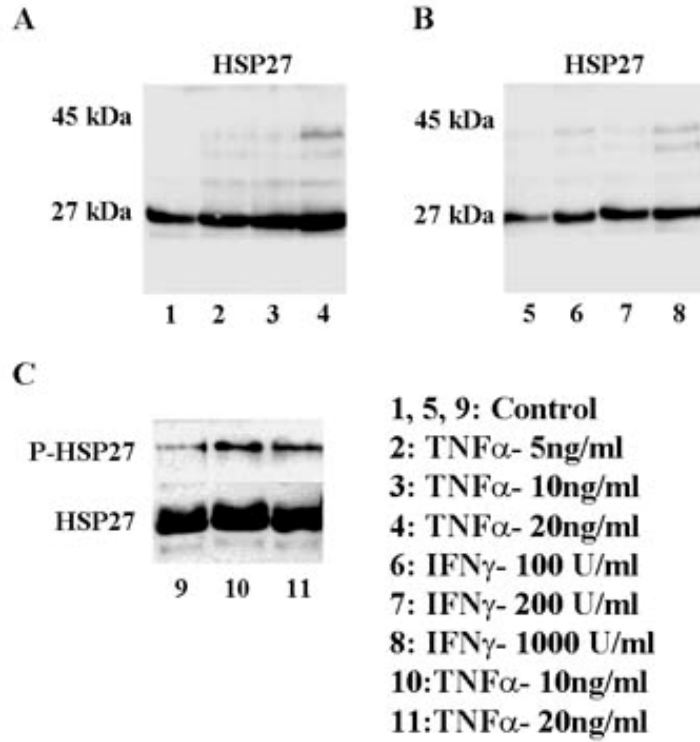


Figura 8: Evaluarea expresiei proteice HSP27 (A), a nivelului de organizare (B) si a gradului de fosforilare in CMN mentinute in conditii pro-inflamatorii.