

## Programul CERES

### Raport Final de Activitate \* Contract nr. 254/02.12.2004

**Denumirea proiectului :** Studii *in vitro* privind mecanismul fibrogenezei induse de citotoxicitatea metalelor

Perioada acoperita: 02.12.2004-10.10.2006      Data prezentarii: 10.10.2006

#### Bugetul proiectului

##### Finanțare de la bugetul de stat

An	Conform contractului de finanțare
2004	20 000
2005	13 500
2006	66 500
Total	100 000

#### Obiective

- Ob.1. Evaluarea citotoxicității unor metale grele asupra fibroblastelor embrionare umane [FE]
- Ob.2. Elaborarea unui model celular de studiu a modificărilor FE în fibrogeneza indusă prin tratamente cu metale tranzitionale și citokine profibrotice
- Ob.3. Studiul implicării speciilor reactive ale oxigenului [SRO] în mecanismul fibrogenezei în modelul celular elaborat
- Ob.4. Remodelarea matricei extracelulare [MEC] în urma fibrogenezei în modelul celular elaborat
- Ob.5. Demonstrarea funcționalității modelului celular de studiu a fibrogenezei

#### Rezultate experimentale

În cadrul primei etape de derulare a proiectului au fost izolate fibroblaste embrionare umane (FE) din embrioni avortați, prin tehnica explantului, care au fost cultivate pe suprafețe aderente, obținându-se culturi în monostrat utilizând un mediu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplimentat cu ser fetal bovin (SFB) 10 %, antibiotice (penicilină 100 U/ml și streptomycină 100 μg/ml) și 1 % L-glutamină, într-o atmosferă umedă de 95 % O<sub>2</sub> și 5% CO<sub>2</sub> la 37°C. S-au realizat tratamente ale FE, aflate în pasajul IV, cu 0,5 – 1 – 2,5 și 5 mM NiCl<sub>2</sub> sau cu 0,2 – 1 – 3 – 10 – 100 și 200 μM Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, timp de 24 ore, după privarea FE de SFB. Pe parcursul tratamentelor celulele au fost monitorizate la un microscop cu inversie Nikon TS 100 F și prin evaluările de viabilitate, citotoxicitate și proliferare a celulelor. Se observă că dozele mici de NiCl<sub>2</sub> (0,5 – 1 mM) nu afectează viabilitatea culturii de celule și nu produc efecte citotoxice. Mai mult doza minimă testată 0,5 mM NiCl<sub>2</sub> facilitează proliferarea FE, în 24 ore activitatea metabolică, deci și numărul celulelor active metabolic, crește de 2,11 ori. În cazul incubării FE cu 5 mM NiCl<sub>2</sub> scade indicele de proliferare (cu 29,1 %) și viabilitatea celulară (cu 72,2 %), evidențiindu-se efecte citotoxice cu deteriorarea membranei plasmatică. În cazul tratamentelor cu cromat de sodiu, dozele < 100 μM n-au efecte citotoxice, incubarea FE cu 100 μM Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> scade viabilitatea, indicele de proliferare (cu ~ 41 %), în timp ce doza maximă (200 μM) distruge în 24 ore practic stratul de FE.

În etapa II studiile au fost realizate pe FE crescute în sistem tri-dimensional (3-D) în gel de collagen, tratate cu  $\text{NiCl}_2$  (0,1 – 20 mM),  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  (10 - 500  $\mu\text{M}$ ) și/sau TGF- $\beta$  (1-5 ng/ml). În evaluarea efectelor acestor tratamente s-au studiat modificări morfologice după marcarea cu hipericină, viabilitatea (testul cu Trypan Blue) și proliferarea celulară (testul MTT), precum și citotoxicitatea acestor doze. Studiul incorporării Ni (II) în FE, realizat conform STAS 7987-67, a arătat că în domeniul 0,1 – 5 mM gradul de incorporare a metalului este relativ constant sugerând o saturare a unui sistem de transport a ionului prin membrana plasmatică. La concentrații de 10 și 20 mM se observă o inhibare a gradului de incorporare a Ni (II), proporțional cu doza aplicată. Este posibilă implicarea în acest proces, cel puțin în parte, a unor canale de Ca (*store operated calcium channel*) și a liganzilor intracelulari ce controlează gradul de sechestrare a Ni (II) în celule. Studii similare, realizate conform STAS 7884-91, au arătat un grad mai mare de incorporare a Cr (VI) decât în cazul Ni (II), independent de doza introdusă în mediu. Preluarea rapidă a Cr (VI), constantă în timp și independentă de cantitatea de efector introdusă în mediu, sugerează o adsorbție superficială a acestuia în celulă. Tratamentul FE cu TGF- $\beta$ 1 au arătat că doze cuprinse între 1 și 5 ng/ml mediu scad viabilitatea celulară proporțional cu timpul de incubare și cu doza aplicată, probabil corelat cu efectul pro-apoptotic al citokinei sau cu inducerea de specii reactive de oxigen, toxice. Incubarea culturii 3-D de FE cu concentrații mai mari de 3 ng/ml are efecte citotoxice crescând conducând la o depreciere evidentă a activității metabolice (testul cu MTT), produce contracția matricei gelului de collagen proporțional cu doza aplicată – ceea ce reflectă activarea collagenazelor și apariția fenotipului contractil al miofibroblastelor caracteristice țesutului fibrotic. TGF- $\beta$ 1 care promovează de regulă apoptoza multor tipuri celulare, inhibă apoptoza miofibroblastelor, întreținând procesul fibrotic. Pentru elaborarea unui model de studiu al fibrogenezei, s-au efectuat tratamentele simple cu 2,5 mM  $\text{NiCl}_2$  (**N**), 10  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  (**C**) și cu 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (**T**), precum și tratamente duble **N+T** și **C+T**, timp de 24 ore. În cazul experiențelor cu Ni (II) viabilitatea celulelor **N+T>N>T**, citotoxicitatea tratamentului variază **T > N+T > N**, iar indicele de proliferare scade în ordinea **N > N+T > T**. În cazul experiențelor cu Cr (VI) viabilitatea celulară și citotoxicitatea tratamentelor scade în urma tuturor tratamentelor, iar indicele de proliferare variază în ordinea **T > C > C+T**. Studiile noastre arată mecanisme diferite de acțiune ale Ni (II) și a Cr (VI) în combinație cu TGF- $\beta$ 1. Dublu tratament **N + T** ameliorează viabilitatea FE compromisă de prezența Ni (II), dar mai ales a TGF- $\beta$ 1, sugerând mecanisme de acțiune concurente. De asemenea tratamentul cu Ni (II) inhibă contracția gelului de collagen, coroborat probabil cu inhibiția activității collagenazelor care modulează ECM. Dublu tratament cu **C + T** arată efecte sinergice deoarece scade viabilitatea și indicele de proliferare a FE și crește citotoxicitatea. De asemenea tratamentul **C** accentuează contracția gelului de collagen, posibil prin stimularea activării MMP.

În etapa III s-au realizat studii pe culturi tridimensionale (3-D) de FE tratate în diferite variante experimentale : cu  $\text{NiCl}_2$  (1 – 20 mM) sau  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  (10 - 500  $\mu\text{M}$ ) - timp de 24 ore, sau cu TGF- $\beta$  (1 – 5 ng/ml), timp de 4 - 20 ore. Tratamentele duble au constat din incubare timp de 24 ore, cu Ni (II) sau Cr (VI), urmat de tratare cu TGF- $\beta$ , 20 ore. Toate tratamentele realizate după privare cu SFB (1 %) au fost monitorizate prin evaluarea speciilor reactive de oxigen (SRO) în spațiul intra- și extracelular (tehnica chemiluminiscentă cu luminol). Eventualele leziuni oxidative au fost evaluate prin determinarea substanțelor TBARS – ca măsură a peroxidării lipidelor. S-a studiat o componentă a sistemului de apărare antioxidantă: superoxid dismutaza (SOD). Studiul activității și expresiei metaloproteinazelor MMP s-a realizat prin gelatin- și cazein-zimografii, prin western blotting și tehnici ELISA. Interleukina pro-inflamatorie IL-8, a cărei nivel este crescut în fibroza pulmonară, a fost studiată în mediul de cultură a FE crescute în sistem 3-D și supusă diferitelor tratamente.

#### **Tratamentele cu TGF- $\beta$ : T1 (2 ng/ml) și T2 (5 ng/ml)**

1. Tratamentul cu TGF- $\beta$  nu produce creșteri în nivelul SRO extracelulare, dar crește producția oxidantă intracelulară cu doza citokinei.
2. Tratamentele **T<sub>1</sub>** și **T<sub>2</sub>** nu produc leziuni peroxidative, nu afectează activitatea enzimei anti-oxidante SOD și nu induc eliberarea citokinei IL-8 în mediu.
3. Numai tratamentul **T<sub>2</sub>** inhibă expresia gelatinazelor MMP-2 și MMP-9.

#### **Tratamentele cu Ni (II): N<sub>1</sub> (2.5 mM) și N<sub>2</sub> (20 mM)**

1. Aceste tratamente nu produc eliberarea SRO în mediul de cultură decât în cazul dozei maxime  $N_2$  ceea ce sugerează distrugerea membranei plasmatică. Producția intracelulară de SRO crește cu doza Ni (II).
2. Nivelul substanțelor TBARS intracelulare crește numai în cazul dozei maxime de 20 mM  $NiCl_2$ .
3. Activitatea SOD crește proporțional cu doza de Ni (II). În cazul dozei  $N_1$  această stimulare este suficientă pentru a nu permite instalarea unei stări de stres oxidativ.
4. Tratamentul  $N_1$  nu afectează semnificativ nivelul enzimelor MMP-1 și MMP-2 și reprezintă nivelul MMP-9, în timp ce doza  $N_2$  reprezintă expresia tuturor enzimelor MMP investigate, ceea ce poate conduce la ideea că doza  $N_2$  poate induce proliferarea matricei extracelulare.

**Tratamentele FE cu Cr (VI):  $C_1$  (10  $\mu M$ ),  $C_2$  (50  $\mu M$ ), și  $C_3$  (500  $\mu M$ )**

1. Producția intracelulară a SRO începe să crească de la doza  $C_1$  și continuă până la  $C_3$  în raport cu experimentul control. Rezultatele pot fi explicate prin faptul că Cr (VI) se încorporează într-un grad mai mare în celulă decât Ni (II), iar Cr (VI) are o capacitate oxidantă net superioară;
2. Tratamentul cu doza  $C_2$  conduce la peroxidări lipidice intracelulare când nivelul substanțelor TBARS crește inducând o creștere a activității specifice SOD sugerând efortul sistemului antioxidant de apărare de a face față stresului oxidativ
3. Tratamentul cu  $C_3$  conduce la creșterea nivelului intra- și extracelular al SRO, producând grave leziuni oxidative care poate afecta și proteina SOD
4. Tratamentul  $C_2$  stimulează expresia MMP-1, inhibă total MMP-9 și nu afectează sensibil nivelul MMP-2. În schimb, doza maximă  $C_3$  inhibă exprimarea tuturor enzimelor MMP investigate, ceea ce sugerează efecte fibrogene.

**Tratamentul dublu Ni (II)+ TGF- $\beta$ :**

1. Tratamentul  $N_1 + T_1$  crește nivelul intracelular al SRO, dar nu produce leziuni oxidative, ca și cum Ni (II) ar anula efectele pro-oxidante ale TGF- $\beta$ . Activitatea SOD crește, datorate funcției activatoare a Ni (II)
2. Tratamentul dublu  $N_1 + T_2$  conduce la inhibiția SOD, când se manifestă efectele inhibitoare ale TGF- $\beta$
3. Tratamentul dublu  $N_2 + T_1$  nu produce leziuni oxidative, deoarece crește activitatea SOD
4. Tratamentul dublu  $N_2 + T_2$  inhibă puțin activitatea enzimei antioxidante a SOD
5. Tratamentul dublu  $N_2 + T_2$  supresează enzimele MMP-1, -2 și -9 demonstrând că TGF- $\beta$  singur nu afectează major expresia enzimelor MMP, dar împreună cu Ni în doză citotoxică – supresează total catabolismul unor componente ale matricei extracelulare favorizând fenomene fibrogenice.
6. Singurul tratament care induce eliberarea citokinei pro-inflamatoare în mediu este  $N_2 + T_2$

**Tratamentul dublu Cr (VI)+ TGF- $\beta$**

$C_2 + T_1$  - crește nivelul intracelular al SRO, nu apar leziuni peroxidative intracelulare datorită creșterii activității SOD în același grad cu cel găsit în varianta tratamentului cu  $C_2$ ;

$C_2 + T_2$  - activitatea SOD nu este afectată

$C_3 + T_1$  - singurul tip de tratament care conduce la eliberarea SRO din celulă în mediul de cultură. Este posibil ca TGF- $\beta$  și doza  $C_3$  să producă SRO pe căi diferite care își însumează efectele conducând la o stare de stres oxidativ. Acest tratament crește nivelul leziunilor oxidative intracelulare, ce inhibă SOD.

$C_3 + T_2$  - activitatea SOD inhibată, probabil datorită eliberării SRO în urma tratamentului cu Cr (VI) care produce leziuni oxidative intracelulare.

$C_3 + T_2$  - activitățile MMP supresate, sugerând efecte fibrogenice.

În etapa IV s-a realizat sinteza datelor experimentale și s-a elaborat un mecanism ipotetic privind fibroza indusă de metale

În cadrul etapei IV a fost prezentat o sinteză a datelor experimentale și s-a elaborat un mecanism ipotetic privind fibroza indusă de Ni (II) și Cr (VI) care implică SRO produse de tranzițiile electronice, citokine și factori de creștere eliberate local de fibroblaste – celule mezenchimale care sintetizează proteinele matricei extracelulare (MEC) și enzimele MMP care

controlează metabolismul MEC. Studiile pe culturi 3-D reprezintă o premieră științifică permițând investigarea relației celule-MEC în cadrul formării profilului fibrogenic.