

Programul VIASAN

Raport Final de Activitate Contract VIASAN nr.300/2004

Denumirea proiectului : Nou model celular de studiu a fibrozei pulmonare indusă de unele noxe profesionale

Perioada acoperita:01.12.2004-15.05.2006

Data prezentarii:15.06.2006

Bugetul proiectului

Finanțare de la bugetul de stat

An	Conform contractului de finantare
2004	150.000.000
2005	250.000.000
2006	300. 000.000
Total	700.000.000

Obiective

Ob1. Realizarea unui model (MOD) de studiu al interacțiilor dintre fibroblastele pulmonare (FB) și leucocitele polimorfonucleare (PMN)

Ob.2. Studiul potențialului pro-fibrogenic al TGF- β și Ni (II)

Ob.3. Evaluarea leziunilor oxidative în MOD tratate cu TGF- β sau/și Ni (II)

Ob.4. Studiul unor citokine proinflamatorii secretate de MOD tratate cu TGF- β sau/și Ni (II)

Ob.5. Investigarea turnoverului proteinelor matricei extracelulare în MOD tratat cu TGF- β sau/și Ni (II)

Activitati derulate

1. Obținerea unei culturi primare de fibroblaste pulmonare (HLF)
2. Obținerea unei culturi tri-dimensionale (3-D) de HLF în gel de collagen
3. Izolarea neutrofilelor polimorfonucleare (PMN) din sângele periferic uman
4. Obținerea unei co-culturi 3-D HLF/PMN în gel de collagen
5. Monitorizarea culturilor (direct, la microscop în contrast de fază Nikon TS 100 F dotat cu o cameră foto automată, testul Trypan Blue pentru determinarea viabilității, studiul proliferării celulare prin testul MTT și prin marcarea fluorescență cu hipericină, testul LDH pentru evaluarea citotoxicității, studii citologice, colorare cu hematoxilin-eozină)
6. Analiza imagistică a culturilor (preluare imagini cu o cameră digitală Nikon Cool Pix 4500, evaluări cu programul SigmaScan, prelucrare statistică MedCalc)
7. Determinarea dozelor citotoxice și fibrogenice a Ni (II) și TGF- β 1 ;
8. Studii a interacțiilor celule-matrice prin evaluarea contracției gelului de collagen în cazul culturilor 3-D supuse diferitelor tratamente

9. Dozarea speciilor reactive de oxigen prin chemiluminiscență (cu 2',7'- diclorofluorescein diacetat și cu luminal)
10. Evidențierea unor leziuni oxidative prin determinarea substanțelor TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) eliberate în mediul de cultură
11. Evidențierea gradului de incorporare a Ni (II) în modele
12. Evaluarea nivelului interleukinei 8 secretate
13. Modularea activității unor MMP (gelatinaze și colagenaze): zimografii, blot și ELISA

Rezultate experimentale

Noul model celular propus în acest proiect pentru studiul FP este o co-cultură fibroblaste pulmonare umane (HLF)-leucocite polimorfonucleare (PMN) în sistem tri-dimensional (3-D) - gel de colagen, tratată cu clorură de nichel \pm TGF- β . Pentru realizarea acestui model s-a realizat o cultură de HLF, care au fost izolate prin tehnica explantului din țesut pulmonar embrionar, și care a fost întreținută timp de nouă pasaje. Celulele polimorfonucleare (PMN) au fost izolate, din sângele venos periferic uman prin tratare cu mediul de separare Histopaque, eritrocitele rămase fiind îndepărtate prin liză hipo-osmotică. Stimularea PMN s-a realizat în mediu RPMI 1640 pre-echilibrat termic (37°C) la care se adaugă fMLP, ionomicină sau PMA, în concentrații finale de 1 μ M, 5 μ M și respectiv 10 nM, și incubate 20 minute la 37°C. S-a realizat modelul MOD 1 – culturi tridimensionale (3-D) de HLF în gel de colagen (tip I, izolat din dermă de vițel), sistemul liber (*floating matrix*) și MOD 2 – o cocultură HLF/PMN în gel de colagen crescută 7 zile.

S-au studiat efectele tratamentelor cu diferite concentrații de clorură de nichel asupra celulelor din culturile 2D de HLF, MOD 1 și MOD 2, evaluând modificări citomorfologice, viabilitatea celulelor (evidențiată prin testul cu MTT), citotoxicitatea tratamentului HLF (prin dozarea activității LDH). Se remarcă că numai tratamentele cu 10 -20 mM NiCl₂ au efecte citotoxice, crescute cu durata expunerii și efectul protector al gelului de colagen, care mimează rolul MEC din țesutul pulmonar.

Tratamentul cu TGF- β 1 și sau Ni (II) a celulelor din MOD 1 și MOD 2 a fost monitorizat prin studii de epifluorescență după marcarea cu hipericină și prin analize citologice după colorație hematoxilin-eozină. Se observă clar efectele hiperproliferante ale tratamentului cu TGF- β 1 și efectul inhibitor al clorurii de nichel în concentrație de 10 mM. După 72 ore, gelul pare mai dens, suferă contracție, sugerând apariția fenotipului contractil a miofibroblastelor responsabil pentru contracția răni în procesul de cicatrizare.

Pentru o evaluare obiectivă a gradului de contracție a gelurilor de colagen (care mimează MEC din țesut) sub acțiunea celulelor, în prezența celor doi efectori externi: NiCl₂ și TGF- β 1, s-a realizat o prelucrare imagistică a fotografiilor cu ajutorul mediului de analiză cantitativă SigmaScan. În urma acestor analize s-a demonstrat că : (i) HLF realizează contracția gelului de colagen numai în prezența serului fetal bovin (SFB), care conține factori de creștere (de exemplu, PDGF) cu acțiune fibrogenică ce contribuie la formarea fenotipului miofibroblastic cu elemente ale citoscheletului diferite (expresia α -SMA) ; (ii) gradul de contracție a gelului de colagen crește cu concentrația SFB din mediu ; (iii) tratamentul cu Ni²⁺ scade gradul de contracție a gelului de colagen într-o manieră proporțională cu doza, ceea ce ar sugera acțiunea fibrogenică a Ni²⁺ ; (iv) introducerea PMN în cultură crește gradul de contracție a gelului probabil datorită acțiunii elastazei NE care acționează asupra matricei extracelulare ; (v) tratamentul cu TGF- β 1 nu afectează gradul de contracție a matricei în modelele MOD 1 și MOD 2, atât în absența cât și în prezența NiCl₂.

Gradul de incorporare a Ni (II) în MOD a fost studiat conform STAS 7987-67. Se observă existența unui comportament descris prin curbe de saturație, în care la concentrații mici (0 \rightarrow 2,5 – 5 mM) nivelul intrării Ni (II) în celulă crește cu mărirea concentrației ionice introdusă în mediul de cultură, în timp ce la concentrații mai mari (\geq 2,5 – 5 mM) conținutul de Ni (II) intrat în celulă este aproape-constant indiferent de cantitatea de sare introdusă în mediu. Pentru această concentrație de saturație – 5 mM NiCl₂ – s-a investigat cinetica pătrunderii Ni (II) pe parcursul a 72 ore. În cazul co-culturii HLF/PMN, nivelul penetrării Ni (II) în celulă este mic și nu crește cu timpul de incubare, probabil datorită faptului că PMN accentuează gradul de contracție a gelului.

S-a investigat nivelul IL-8 secretată în mediu, citokină care activează și atrage celulele PMN, implicate în multe maladii inflamatorii pulmonare, utilizând un ELISA. S-a evidențiat faptul că TGF- β (5 ng/ml, tratament 24 ore) stimulează sinteza și secreția IL-8 într-o co-cultură HLF/PMN și că tratamentul cu 10 mM NiCl₂ nu are un efect semnificativ statistic. Este posibil ca alte doze sau scheme de tratament (timp mai îndelungat) să aiba alte efecte.

Pentru a investiga modularea metabolismului MEC în urma tratamentului modelelor celulare au fost studiate două gelatinaze: MMP-2 și MMP-9 și o colagenază MMP-1, utilizând trei tehnici: gel zimografia, western-blotting și dozarea ELISA. Cercetările noastre au pus în evidență că: (1) prezența în mediul de cultură a MOD 1 a ambelor gelatinaze MMP-2 și MMP-9, în formă activă și latentă, a căror activități scad în ordinea MMP-2 > MMP-9 > proMMP-2 > proMMP-9; (2) Introducerea celulelor PMN în MOD 2 induce mici modificări în conținutul procentual al celor patru benzi de gelatinaze: scade activitatea MMP-2 și crește activitatea MMP-9. Se pare că elastaza PMN induce convertirea formei proMMP-9 în forma activă; (3) incubarea MOD 2 cu 10 mM Ni (II) inhibă activitățile MMP-2 și MMP-9 și blochează activarea formei latente a MMP-9; (4) TGF- β 1 inhibă activitatea principalei metaloproteinaze MMP-2 (cu 42,3 %), dar induce sinteza MMP-9 (benzile formelor activă și latentă se intensifică cu 12 % și respectiv 18,5 %); (5) în MOD 2 tratat cu Ni (II) și TGF- β 1 se observă accentuarea inhibiției activității MMP-2 și intensificarea benzii MMP-9; (6) În mediul de cultură a MOD 1 se observă o slabă activitate MMP-1 secretată; (7) co-cultivarea HLF/PMN în MOD 2 conduce la o ușoară creștere a intensității MMP-1, probabil prin acțiunea elastazei PMN care transformă forma latentă a MMP-1 în forma activă a MMP-1 de 42 kDa; (8) tratamentul cu Ni induce cea mai mare creștere a activității MMP-1 secretată de celulele MOD 2, comportament ce poate fi explicat prin acțiunea speciilor reactive de oxigen (ROS) dezvoltate în urma tratamentului cu NiCl₂ asupra expresiei acestei colagenaze; (9) tratamentul cu TGF- β 1 inhibă activitatea colagenazică (deci are o acțiune pro-fibrinogenă) secretată de celulele MOD 2, chiar în prezența Ni (II).

Verificarea modelului experimental s-a realizat prin studii de microscopie, imagistică și evaluare a nivelului IL-8 secretată, MMP, utilizând fHLF izolate dintr-o biopsie pulmonară a unui pacient diagnosticat cu pneumonie interstițială nespecifică, la care starea inflamatorie și fibroza a debutat și progresat rapid. Fibroza era distală de bronșiile mari și repartizată difuz în structurile pulmonare determinând restricția aerului respirator. Parte din diagnosticul cazului a fost analiza histologică.

Cultura de fHLF se obține mai greu în sensul că celulele ies din explant mai târziu, prezintă o aderență mai mare față de suportul flascăului de cultură și ating confluența mai rapid decât nHLF. De fapt, fHLF au un aspect mai acicular ceea ce permite o împachetare mai strânsă în cultura 2-D.

Cele două culturi de fibroblaste pulmonare au fost însămânțate în gel de colagen,. S-a realizat monitorizarea proliferării celulare, după tratament cu hipericină 1 μ M, timp de 24 și 72 ore, care marchează fluorescent celulele. Aceste studii au arătat că MOD 2 tratat cu TGF- β 1 (5 ng/ml) prezintă proliferări celulare similare cu cele din cultura 3-D de fHLF și că NiCl₂ (10 mM) inhibă proliferarea celulară datorită citotoxicității.

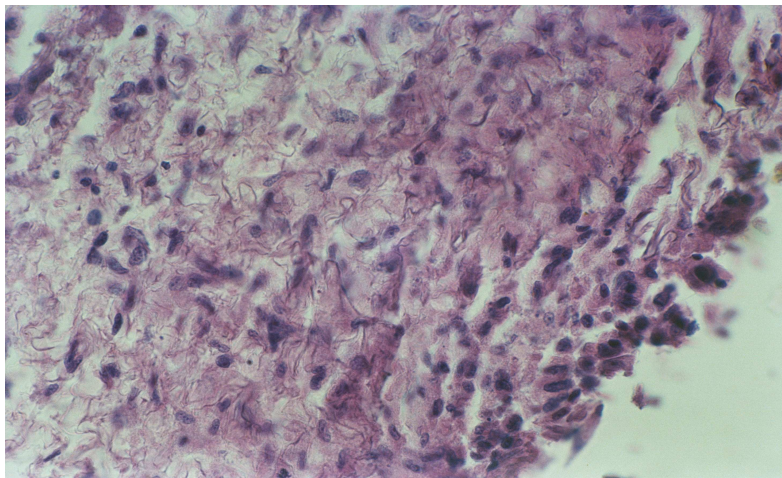
Studiile western blot privind prezența MMP-2, MMP-9 și MMP-1 în mediile de cultură a fHLF din cele cinci pasaje au arătat reducerea progresivă a nivelului MMP-2, o ușoară creștere a cantității MMP-9 și lipsa activității MMP-1, ceea ce confirmă deprecierea catabolismului MEC – tipică procesului fibrogenic. În cazul MOD 2 tratat cu TGF- β 1 realizat cu nHLF pasajul V s-au observat nivele scăzute de MMP-2, ușor crescute de MMP-9 și o intensificare a activității MMP-1 (cu MM 48 kDa).

Dozarea nivelului IL-8 în mediile de cultură a fHLF pe parcursul celor cinci pasaje, realizată cu kituri ELISA a permis să decelăm prezența acestei chemokine pro-inflamatoare numai în mediile de cultură a primelor trei pasaje. Aceasta sugerează că IL-8 poate fi secretată fie de fibroblaste fie PMN, iar în primul caz HLF secretă IL-8 ca rezultat al acțiunii PMN. Pe parcursul pasajelor are loc purificarea HLF și sunt îndepărtate alte celule (sangvine) care le stimulează să sintetizeze și să secretă IL-8.

Modelul celular de studiu al fibrozei pulmonare (FP) se bazează pe următoarele observații: (1) în FP crește activitatea biosintetică a fibroblastelor (activarea) și a numărul acestor celule (proliferarea), responsabile pentru sinteza componentelor matricei extracelulare; (2) implicarea neutrofilelor în FP este neclară, dar prezența persistentă a lor în țesutul pulmonar al pacienților

cu FP, sugerează că aceste celule inflamatorii joacă un rol cheie în modularea procesului fibrotic; (3) TGF- β (*transforming growth factor beta*) este o citokină implicată în debutul și întreținerea procesului fibrogenic; (4) expunerea la pulberi de nichel poate fi asociată cu o puternică reacție fibrotică; (5) în patogenia FP sunt implicate specii reactive de oxigen, produse de neutrofile și/sau Ni (II). Modelul celular de studiu al FP constă dintr-o co-cultură tridimensională de fibroblaste pulmonare/neutrofile în gel de colagen, tratată cu doze fibrogenice de clorură de nichel și TGF- β 1

Modelul celular de studiu al fibrozei pulmonare (FP) se bazează pe următoarele observații: (1) în FP crește activitatea biosintetică a fibroblastelor (activarea) și a numărul acestor celule (proliferarea), responsabile pentru sinteza componentelor matricei extracelulare; (2) implicarea neutrofilelor în FP este neclară, dar prezența persistentă a lor în țesutul pulmonar al pacienților cu FP, sugerează că aceste celule inflamatorii joacă un rol cheie în modularea procesului fibrotic; (3) TGF- β (*transforming growth factor beta*) este o citokină implicată în debutul și întreținerea procesului fibrogenic; (4) expunerea la pulberi de nichel poate fi asociată cu o puternică reacție fibrotică; (5) în patogenia FP sunt implicate specii reactive de oxigen, produse de neutrofile și/sau Ni (II). Modelul celular de studiu al FP constă dintr-o co-cultură tridimensională de fibroblaste pulmonare/neutrofile în gel de colagen, tratată cu doze fibrogenice de clorură de nichel și TGF- β 1



Co-cultură fibroblaste embrionare umane –neutrofile (3 zile).
Colorație cu hematoxiniln eozină ($\times 400$)