

Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” - Timișoara
Departmentul de Științe Funcționale - Fiziopatologie



**PROTECȚIA FAȚĂ DE LEZIUNILE INDUSE DE
ISCHEMIA/REPERFUZIA EXPERIMENTALĂ:
*NOI MECANISME LA NIVEL CARDIAC ȘI RENAL***

REZUMAT

Doctorand: DĂNILĂ MARIA-DANIELA

Coordonatori științifici:

Prof. Univ. Dr. Danina M. MUNTEAN

Prof. Univ. Dr. Denis ANGOULVANT

Timișoara, 2016

CUPRINS

Lista articolelor publicate.....	VII
Lista abrevierilor.....	VIII
Index-ul figurilor.....	X
Index-ul tabelelor.....	XIV
INTRODUCERE	XVI
PARTEA GENERALĂ	1
1. LEZIUNEA CARDIACĂ DE ISCHEMIE/REPERFUZIE.....	1
1.1. CONSECINȚELE LEZIUNII CARDIACE DE I/R.....	1
1.2. PROGRESIA EVENIMENTELOR ÎN LEZIUNEA CARDIACĂ DE I/R.....	2
1.2.1. MECANISMELE INJURIEI CELULARE ÎN CADRUL ISCHEMIEI.....	2
1.2.2. MECANISMELE INJURIEI CELULARE ÎN CADRUL REPERFUZIEI.....	3
1.3. CONTRIBUȚIA STRESULUI OXIDATIV LA LEZIUNEA CARDIACĂ DE I/R.....	7
1.3.1. DEFINIȚII ȘI TIPURI DE RADICALI LIBERI.....	7
1.3.2. MITOCONDRIILE CA SURSE MAJORE DE SRO.....	8
1.3.3. MONOAMINO OXIDAZELE CA SURSE MITOCONDRIALE DE SRO.....	9
1.4. PRECONDIȚIONAREA ISCHEMICĂ, MECANISM MAJOR DE CARDIOPROTECȚIE.....	10
2. LEZIUNEA RENALĂ DE ISCHEMIE/REPERFUZIE.....	13
2.1. LRA ȘI DISFUNCTIA MITOCONDRIALĂ.....	13
2.2. LRA ȘI ELIBERAREA DE SRO.....	15
2.2.1. SURSE RENALE DE SRO.....	15
2.2.2. MAO ȘI SURSELE MITOCONDRIALE DE SRO.....	16
2.3. PRECONDIȚIONAREA ISCHEMICĂ, MECANISM MAJOR DE RENOPROTECȚIE.....	17
3. ROLUL INFLAMAȚIEI ȘI SEMNALIZĂRII PURINERGICE ÎN LEZIUNEA DE I/R.....	19
3.1. TIPURI ȘI ROLURILE RECEPTORILOR PURINERGICI.....	19
PARTEA SPECIALĂ	23
1. STUDIUL 1: EFECTUL INHIBIȚIEI ACUTE A MONOAMINO OXIDAZEI ASUPRA REZULTATULUI PRECONDIȚIONĂRII ISCHEMICE ÎN INIMI IZOLATE DE ȘOBOLAN.....	23
1.1. SCOPUL STUDIULUI.....	23
1.2. MOTIVAȚIA STUDIULUI.....	23
1.3. MATERIALE ȘI METODE.....	24
1.3.1. PREPARATUL DE INIMĂ IZOLATĂ.....	24
1.3.1.1. Principiul tehnicii Langendorff.....	24
1.3.1.2. Descrierea dispozitivului experimental.....	25
1.3.1.3. Descrierea protocolului chirurgical.....	26
1.3.1.4. Tehnica de perfuzie retrogradă.....	27
1.3.1.5. Inserția balonului de presarcină și stabilirea presarcinii optime.....	28
1.3.2. DESCRIEREA PROTOCOLULUI EXPERIMENTAL.....	29
1.3.3. PARAMETRII EVALUAȚI ÎN CURSUL EXPERIMENTELOR.....	30
1.3.3.1. Parametrii funcționali.....	30
1.3.3.2. Parametrii structurali.....	31
1.3.4. REACTIVI.....	32

1.3.5. ANALIZĂ STATISTICĂ.....	32
1.4. REZULTATE.....	32
1.4.1. VALORI HEMO-DINAMICE PRE-ISCHEMICE.....	32
1.4.2. EVALUAREA RECUPERĂRII FUNCȚIONALE.....	32
1.4.2.1. Rezultate pentru grupul de masculi.....	33
1.4.2.2. Rezultate pentru grupul de femele.....	35
1.4.3. EVALUAREA ARIEI DE INFARCT.....	37
1.4.3.1. Mărimea ariei de infarct pentru grupul de masculi.....	37
1.4.3.2. Mărimea ariei de infarct pentru grupul de femele.....	37
1.5. DISCUȚII.....	38
1.6. CONCLUZII.....	41
2. STUDIUL 2: EVALUAREA EFECTULUI INHIBIȚIEI MAO ÎN CONTEXTUL PRECONDIȚIONĂRII ISCHEMICE ASUPRA FUNCȚIEI RESPIRATORII A MITOCONDRIILOR IZOLATE DIN CORTICALA RENALĂ DE ȘOBOLAN	42
2.1. SCOPUL STUDIULUI	42
2.2. MOTIVAȚIA STUDIULUI.....	42
2.3. MATERIALE ȘI METODE.....	43
2.3.1. PROTOCOLUL CHIRURGICAL.....	43
2.3.2. STUDII DE RESPIROMETRIE MITOCONDRIALĂ.....	46
2.3.2.1. Protocolul de izolare a mitocondriilor.....	46
2.3.2.2. Măsurarea ratelor respiratorii mitocondriale.....	49
2.3.3. PRODUCȚIA MITOCONDRIALĂ DE H ₂ O ₂	52
2.3.4. STUDII HISTOLOGICE.....	53
2.3.5. ETAPELE PROTOCOLULUI EXPERIMENTAL DE I/R RENALĂ.....	53
2.3.6. REACTIVI.....	54
2.3.7. ANALIZĂ STATISTICĂ.....	54
2.4. REZULTATE.....	55
2.4.1. STUDIUL PRIVIND GRUPURILE DE CONTROL ȘI I/R.....	55
2.4.1.1. Studii de respirometrie.....	55
2.4.1.2. Studii histologice.....	58
2.4.2. STUDIUL PRIVIND GRUPURILE DE PCI CU SAU FĂRĂ INHIBITORI MAO.....	61
2.4.2.1. Studii de respirometrie.....	61
2.4.2.2. Producția mitocondrială de H ₂ O ₂	64
2.4.2.3. Studii histologice.....	65
2.5. DISCUȚII.....	69
2.5.1. STUDIUL PRIVIND GRUPURILE DE CONTROL ȘI I/R.....	69
2.5.2. STUDIUL PRIVIND GRUPURILE DE PCI CU SAU FĂRĂ INHIBITORI MAO	72
2.6. CONCLUZII.....	76
2.7. ACKNOWLEDGEMENT.....	76
3. STUDIUL 3: EVALUAREA EFECTULUI MODULĂRII RECEPTORILOR PURINERGICI ASUPRA LEZIUNII DE HIPOXIE/REOXIGENARE ÎN CAZUL CARDIOMIOCITELOR AC16... 77	77
3.1. SCOPUL STUDIULUI	77
3.2. MOTIVAȚIA STUDIULUI.....	77
3.3. MATERIALE ȘI METODE.....	77
3.3.1. MODELUL EXPERIMENTAL.....	77
3.3.2. COLORAȚIA MTT.....	81

3.3.3. ANALIZĂ STATISTICĂ.....	81
3.3.4. REACTIVI.....	81
3.4. REZULTATE.....	81
3.5. DISCUȚII.....	83
3.6. CONCLUZII.....	85
4. STUDIUL 4: EFECTUL SEMNALIZĂRII PURINERGICE VIA RECEPTORUL P2Y11 ASUPRA FUNȚIEI VASCULARE ÎNTR-UN MODEL MURIN DE INFLAMAȚIE ACUTĂ	86
4.1. SCOPUL STUDIULUI	86
4.2. MOTIVAȚIA STUDIULUI.....	86
4.3. MATERIALE ȘI METODE.....	87
4.3.1. PROCEDURI ANIMALE.....	87
4.3.1.1. Izolarea aortei de șobolan.....	87
4.3.1.2. Pregătirea inelelor aortice.....	87
4.3.2. PROTOCOLUL EXPERIMENTAL.....	88
4.3.3. MĂSURAREA SRO.....	88
4.3.4. REACTIVI.....	88
4.3.5. ANALIZĂ STATISTICĂ.....	89
4.4. REZULTATE.....	89
4.5. DISCUȚII.....	94
4.6. CONCLUZII.....	96
CONCLUZII FINALE.....	97
CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	98
DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	98
REFERINȚE.....	100

1. INTRODUCERE

Boala coronariană ischemică rămâne o importantă cauză de deces datorată infarctului miocardic acut în țările cu venituri mici și mijlocii și totodată de dizabilitate datorată insuficienței cardiace progresive în țările dezvoltate. Fenomenul central ce stă la baza patogenezei sale este reprezentat de leziunea asociată ischemiei/reperfuziei (I/R) miocardice. Revascularizarea a fost stabilită în mod inechivoc ca singura terapie de rutină capabilă să reducă mărimea infarctului și să îmbunătățească prognosticul pacienților. Cu toate acestea, reperfuzia este considerată o "sabie cu două tăișuri", deoarece induce ea însăși moartea unei populații de cardiomiocite anterior viabile sau așa-numita "leziune letală de reperfuzie". În consecință, descoperirea unor strategii capabile de reducerea leziunii miocardice asociate reperfuziei, în vederea limitării mărimii infarctului reprezintă actualmente "Sfântul Graal" atât pentru cercetătorii din domeniul preclinic cât și pentru clinicieni.

Precondiționarea ischemică (PCI), fenomenul în care episoade scurte de ocluzie coronariană alternate cu reperfuzie protejează miocardul față de o perioadă ulterioară de ischemie prelungită, este unanim considerată drept cea mai eficientă strategie mecanică care reduce mărimea infarctului experimental. La baza protecției oferite de PCI stă generarea minimă de specii reactive ale oxigenului (SRO) în timpul ciclurilor scurte de ischemie și/sau reperfuzie, fără ca sursele de SRO să fie pe deplin elucidate.

I/R acută se întâlnește și în patologia renală iar atenuarea leziunii renale postischemice constituie deopotrivă o direcție prioritară de cercetare. Leziunea renală acută se datorează în principal hipoperfuziei (cauze prerenale) și este totodată o complicație frecventă după by-pass-ul coronarian, fiind favorizată de prezența comorbidităților de tipul diabetului zaharat. Reperfuzia este esențială atât pentru a restabili funcția renală cât și pentru a limita necroza tubulară acută, dar în timpul primelor minute de reperfuzie, asistăm la amplificarea modificărilor ischemice inițiale cât și la apariția de noi leziuni induse, ca și în cazul cordului, direct de reperfuzie.

Cunoștințele în domeniul fiziopatologiei leziunii induse de I/R au fost semnificativ completate în ultimele 3 decenii prin dovezile incontestabile privind rolul esențial pe care mitocondriile îl joacă în acest proces, fapt valabil mai ales pentru inimă și rinichi, organe cu un metabolism aerob crescut. Mitocondriile sunt considerate deopotrivă sursele și țintele leziunilor determinate de I/R, precum și principalii efectori în secvența de semnalizare a strategiilor cardioprotectoare. Prin urmare, susținerea funcției mitocondriale în contextul I/R acute de organ (inimă, ficat, rinichi) reprezintă în prezent una dintre cele mai investigate direcții terapeutice. Disfuncția mitocondrială la reperfuzia post-ischemică este în mare parte datorată supraproduției de radicali liberi ai oxigenului. Lanțul respirator de la nivelul membranei mitocondriale interne este clasic considerat drept sursa majoră de SRO. Cu toate acestea, în ultimii ani, au fost identificate noi surse de SRO, cum este monoamino oxidaza (MAO) de la nivelul membranei mitocondriale externe.

Monoamino oxidazele sunt enzime mitocondriale cu 2 izoforme, MAO-A și B, care generează constant peroxid de hidrogen (H_2O_2) ca produs secundar al degradării aminelor biogene (ex, catecolaminele, crescute în I/R) și respectiv, a neurotransmițătorilor. Pe lângă rolul binecunoscut în sistemul nervos, MAO au fost descrise în ultimul deceniu drept surse importante de SRO care contribuie la leziunile de I/R la nivelul sistemului cardiovascular și al rinichiului, inhibiția lor fiind protectoare în ambele condiții. Important, inhibitorii MAO sunt deja în uzul clinic pentru tratamentul afecțiunilor neuropsihiatrice și ar fi astfel, imediat disponibili pentru tratamentul patologiei cardiovasculare și renale, în condițiile demonstrării eficacității lor la om. Ipoteza potrivit căreia SRO eliberate de către MAO contribuie la protecția tisulară determinată de precondiționare nu a fost investigată până în prezent.

Trebuie însă precizat că strategiile/tratamentele care îmbunătățesc funcția mitocondrială nu au efect asupra inflamației care contribuie și ea semnificativ la leziunile din I/R acută. În acest sens, ATP-ul extracelular și semnalizarea purinergică asociată au fost recent descrise drept noi ținte terapeutice în ischemică acută a mai multor organe, inclusiv inimă și rinichi. Celulele necrotice din zonele ischemiate eliberează cantități mari de ATP, care se leagă ulterior de 2 tipuri majore de receptori de suprafață (P_2X și P_2Y). Studii recente susțin rolul cardioprotector al modulării purinergice. Într-adevăr, în contextul I/R, ATP și UTP care acționează asupra receptorilor P_2Y au indus un efect antiinflamator semnificativ și mai important, au demonstrat capacitatea de a modula direct viabilitatea cardiomiocitelor. Receptorul P_2Y_{11} , implicat în semnalizarea intracelulară a procesului inflamator, a fost mai puțin investigat în ceea ce privește I/R și cardioprotecția. De asemenea, patul vascular în prezența aterosclerozei, prototipul de inflamație cronică cu grad redus, este o altă țintă terapeutică importantă în care modularea receptorilor P_2Y_{11} ar putea fi benefică.

Cuvinte cheie: ischemie/reperfuzie, monoamino oxidaza, preconditionare, disfuncție mitocondrială, specii reactive de oxigen, semnalizare purinergică.

2. SCOPUL CERCETĂRII

Prezentul studiu a urmărit în primul rând caracterizarea contribuției SRO eliberate de către MAO la PCI cardiacă și renală. În conformitate cu paradigma actuală potrivit căreia producția minimă de SRO este esențială pentru declanșarea protecției oferite de PCI, ipoteza de lucru a fost că inhibitorii MAO ar interfera cu efectul protector al acesteia.

În al doilea rând, posibilitatea de a proteja inima și vasele prin modularea purinergică în contextul hipoxiei/reoxigenării și a inflamației a fost investigată ulterior.

Lucrarea și-a propus să descrie noi aspecte cu privire la mecanismele PCI și respectiv, ale modulării purinergice ce vor putea contribui la dezvoltarea unor abordări terapeutice capabile să protejeze inima și rinichii împotriva leziunilor induse de ischemie/reperfuzie.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

1. Evaluarea efectului inhibiției MAO în contextul PCI asupra dimensiunii infarctului și recuperării funcționale a inimilor izolate de șobolan supuse I/R globale.
2. Evaluarea efectului inhibiției MAO în contextul PCI asupra funcției respiratorii și producției de H_2O_2 a mitocondriilor renale izolate precum și a modificărilor morfologice renale după un episod de I/R *in vivo* la șobolan.
3. Caracterizarea efectului modulării receptorilor purinergici asupra cardiomiocitelor AC16 supuse protocoalelor de hipoxie/reoxigenare.
4. Evaluarea contribuției receptorilor purinergici P_2Y_{11} la modularea funcției vasculare pe un model murin de inflamație indusă prin injectarea de lipopolizaharid.

I. Evaluarea efectului inhibiției MAO în contextul PCI asupra dimensiunii infarctului și a recuperării funcționale a inimilor izolate de șobolan supuse unui protocol de I/R globală

Acest studiu a avut ca scop să investigheze dacă H_2O_2 eliberat de MAO contribuie la efectul cardioprotector indus de PCI clasică. În acest scop am evaluat efectul administrării a doi inhibitori MAO (pargilină pentru MAO-B și clorgilină pentru MAO-A) pe durata episoadelor PCI la nivelul inimilor izolate de șobolan (masculi și femele) supuse unui protocol de I/R globală în

prezența vs. absența PCI, cu evaluarea mărimii infarctului experimental și a recuperării funcționale la reperfuzie drept parametri ai cardioprotecției.

În cazul lotului de șobolani masculi am demonstrat că PCI a îmbunătățit semnificativ contractilitatea miocardică și relaxarea, respectiv parametrii LVDP, + dLVP/dt max și - dLVP/dt max. În mod neașteptat, administrarea de pargilină și clorgilină înaintea protocolului PCI a indus o îmbunătățire suplimentară a funcției contractile (dar nu și a relaxării) (Fig. 1).

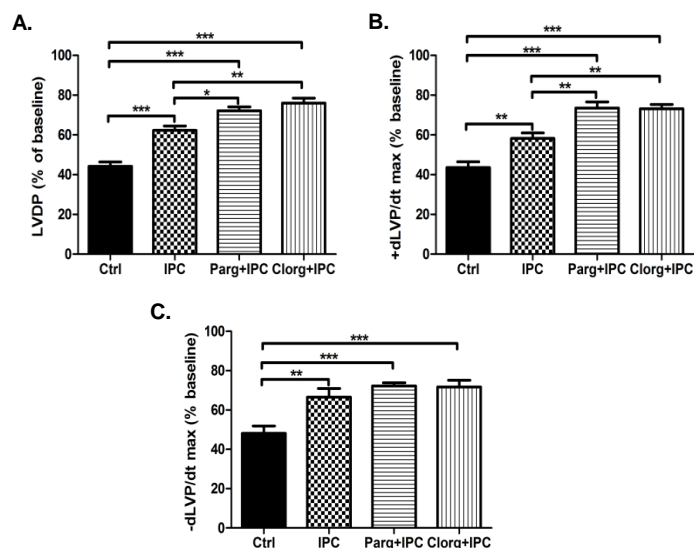


Figura 1. Grafice reprezentând recuperarea postischemică funcțională contractilă la 30 min de reperfuzie pentru inimile șobolanilor masculi. (A) Recuperarea presiunii dezvoltate de ventriculul stâng (left ventricular developed pressure - LVDP). (B) Recuperarea index-ului de contractilitate +dLVP/dt max. (C) Recuperarea index-ului de relaxare -dLVP/dt max. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Rezultate similare au fost obținute și la lotul de femele (Fig. 2). Toți cei trei parametri funcționali au fost îmbunătățiți atunci când pe durata protocolului de PCI a fost asociată pargilina sau respectiv, clorgilina. Spre deosebire de masculi, administrarea de pargilină (dar nu și de clorgilină) împreună cu PCI la femele a îmbunătățit semnificativ și relaxarea miocardică.

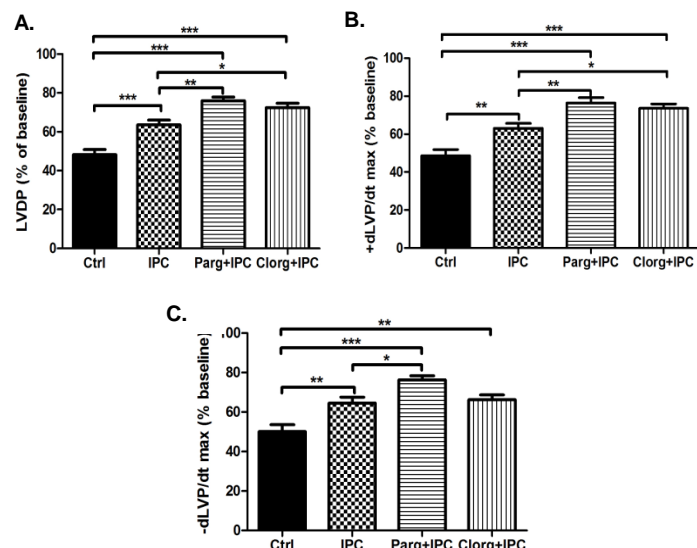


Figura 2. Grafice reprezentând recuperarea postischemică funcțională contractilă la 30 min de reperfuzie pentru inimile șobolanilor femele. (A) Recuperarea presiunii dezvoltate de ventriculul stâng (left ventricular developed pressure - LVDP). (B) Recuperarea index-ului de contractilitate +dLVP/dt max. (C) Recuperarea index-ului de relaxare -dLVP/dt max. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

În ceea ce privește mărimea infarctului, o reducere semnificativă a fost obținută la toate loturile preconditionate comparativ cu cele martor (Fig. 3). Contrar premisei inițiale (abolirea protecției anti-infarct induse de PCI în prezența inhibitorilor MAO), asocierea oricăruia dintre inhibitorii MAO la protocolul de PCI nu a determinat o creștere a ariei de necroză față de inimile

precondiționate, indiferent de sexul animalelor, sugerând că inhibarea MAO nu interferă cu protecția anti-infarct a PCI în cazul inimilor izolate. Totuși, aceste rezultate nu pot fi extrapolate episoadelor mai lungi de ischemie globală sau protocoalelor de I/R *in vivo* (unde trombocitele sunt o sursă importantă de MAO).

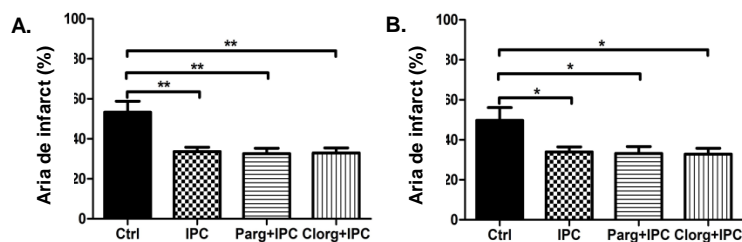


Figura 3. Evaluarea dimensiunii ariei de infarct în protocolul de ischemie/reperfuzie globală pentru grupul de masculi (A) și respectiv femele (B). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Concluzii:

1. Inhibiția MAO asociată preconționării ischemice îmbunătățește recuperarea funcției contractile a inimilor izolate de șobolan la reperfuzia postischemică, probabil prin efectul favorabil al creșterii disponibilității de catecolamine la nivelul miocardului șocat.
2. Inhibiția MAO asociată preconționării ischemice nu a interferat cu protecția antinecrotică a PCI, efect care, împreună cu îmbunătățirea contractilității la reperfuzia postischemică ar putea fi privite drept benefice pentru pacienții în convalescență după episoade de I/R acută.

II. Evaluarea efectului inhibiției MAO în contextul PCI asupra funcției respiratorii și producției de H_2O_2 a mitocondriilor renale izolate precum și a modificărilor morfologice renale după un episod de I/R *in vivo* la șobolan.

Obiectivele acestui studiu au fost de a analiza modificările funcției respiratorii și a producerii de H_2O_2 la nivelul mitocondriilor renale precum și modificările structurale renale după administrarea *in vivo* a celor doi inhibitori de MAO, pargilină și clorgilină, concomitent cu un protocol de PCI pe modelul de I/R renală *in situ* la șobolan.

În acest scop, au fost necesare standardizarea modelului de inducere a leziunii de I/R renală acută *in vivo*, precum și a tehnicii de izolare a mitocondriilor renale, deoarece acestea au fost implementate în premieră în universitatea noastră. Un episod de 40 de minute de ischemie urmat de o reperfuzie cu durata de 15 minute a determinat alterarea importantă a morfologiei renale normale, cu applatizarea epiteliului tubular cortical, distensia lumenului tubular, necroza izolată și parcellară a epiteliului tubular și vacuolizare importantă a celulelor epiteliale tubulare și hiperemia capilarelor peritubulare. În continuare am standardizat tehnica de izolare a mitocondriilor renale la reperfuzia postischemică în vederea studiilor de respirometrie de înaltă rezoluție. Așa cum era de așteptat, protocolul de I/R a determinat o scădere severă a respirației active evaluată ca OXPHOS și a raportului controlului respirator (RCR, Stadiul 3/Stadiul 4) în cazul mitocondriilor energizate cu substratele complexului I și II ale lanțului respirator. Stadiul 4 respirator, un indicator al nivelului respirației decuplate a înregistrat o creștere semnificativă în cazul mitocondriilor ischemiate față de cele martor. De asemenea, integritatea membranei mitocondriale externe a fost alterată la lotul supus I/R, spre deosebire de cel de control.

În continuare am evaluat efectul inhibării MAO în asociere cu un protocol de PCI asupra funcției respiratorii și a producției de H_2O_2 la nivelul mitocondriilor izolate la reperfuzia postischemică, precum și asupra modificărilor histologice renale. Studiile de respirometrie au arătat că în cazul mitocondriilor energizate cu glutamat/malat (substratele complexului I), PCI a

indus o îmbunătățire semnificativă a respirației active față de lotul supus protocolului de I/R, un efect care a fost diminuat în mod semnificativ (reducerea OXPHOS și a RCR) de către tratamentul cu pargilină și clorgilină (Fig. 4). De remarcat este faptul că pargilina a indus o depreciere mai puțin semnificativă a respirației mitocondriale comparativ cu clorgilina.

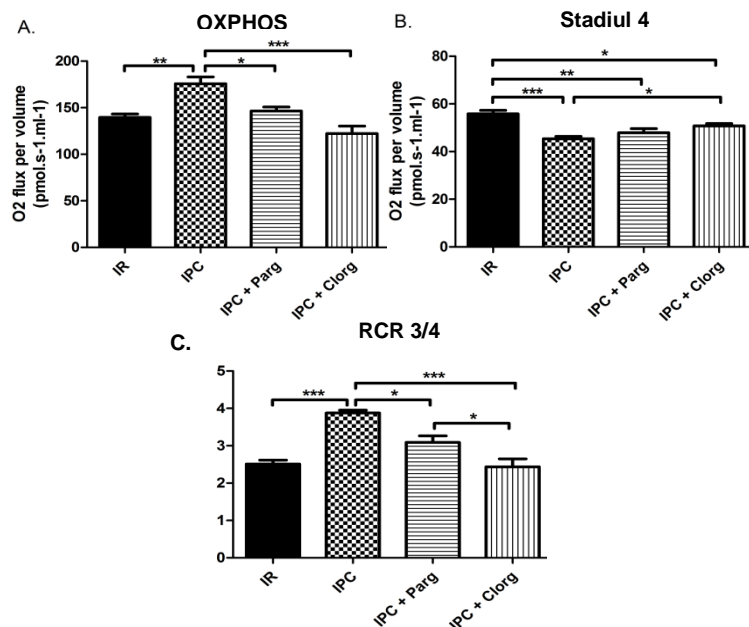


Figura 4. Grafice reprezentând respirația dependentă de complexul I: A. OXPHOS, B. Stadiul 4, C. RCR

Rezultate comparabile au fost obținute pentru mitocondriile energizate cu substratul complexului II (succinat) și anume PCI a cauzat o îmbunătățire semnificativă a OXPHOS și RCR (versus lotul cu I/R), efect diminuat mai ales în prezența pargilinei (dar și a clorgilinei). PCI a atenuat decuplarea mitocondriilor indusă de protocolul de ischemie, atât ca și terapie individuală cât și în prezența pargilinei. Interesant, efectul de decuplare indus de I/R nu a fost modificat atunci când protocolul de PCI a fost asociat cu clorgilina (Fig. 5).

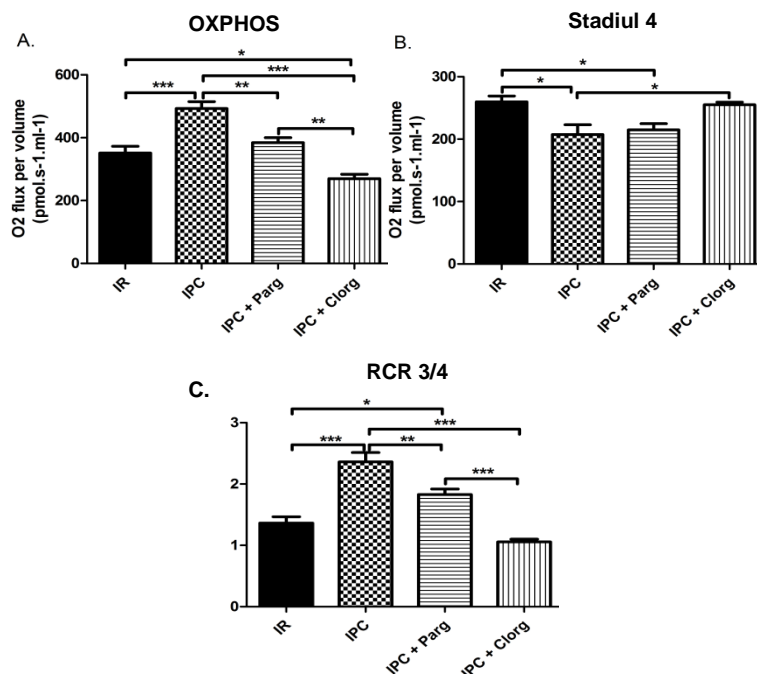


Figura 5. Grafice reprezentând respirația dependentă de complexul II: A. OXPHOS, B. Stadiul 4, C. RCR

PCI a indus o scădere semnificativă a producției mitocondriale de H_2O_2 comparativ cu I/R indiferent de substratul utilizat. Acest efect nu a fost impiedicat când pargilina sau clorgilina au fost administrate in vivo anterior protocolului de PCI. În ciuda faptului că ambii inhibitori MAO au provocat disfuncție respiratorie mitocondrială, se știe că o producție crescută de SRO nu este întotdeauna un efect secundar obligatoriu al alterării funcției lanțului respirator.

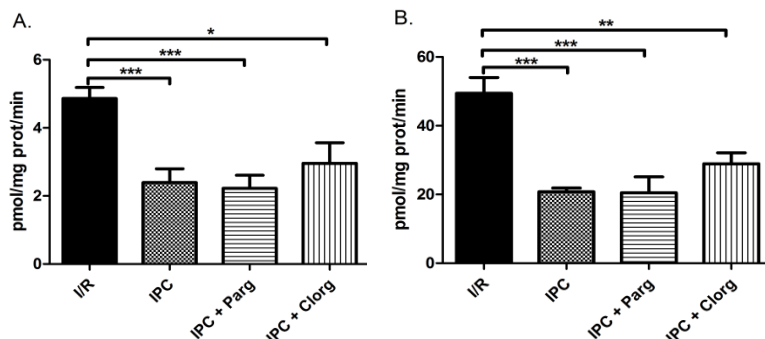


Figura 6. Producția mitocondrială de H_2O_2 în prezența substratelor: A. Complexului I și B. Complexului II.

Protocolul de ischemie prelungită cu durata de 40 de minute a indus, așa cum era de așteptat, modificări structurale ale cortexului și medulei renale. Astfel, s-au observat următoarele modificări histologice: hiperemia intensă a capilarelor glomerulare și peritubulare, applatizarea celulelor epiteliale tubulare cu vacuolizări citoplasmatiche, pierderea marginii în perie, distensie tubulară și necroza izolată a epiteliului tubular. Necroza a fost semnificativ redusă la lotul cu PCI comparativ cu cel cu I/R.

În cazul loturilor tratate cu pargilină sau clorgilină s-a observat, de asemenea, hiperemia intensă a capilarelor peritubulare și vacuolizarea pronunțată a celulelor epiteliale tubulare. Totuși, la aceste 2 loturi tratate cu inhibitori MAO modificările morfologice au fost mai severe. Astfel, descuamarea celulelor epiteliale tubulare, împreună cu prezența cilindrilor hialini sugerează apariția necrozei tubulare acute. Mai mult, s-a constatat și prezența necrozei tubulare epiteliale parcelare la animalele tratate spre deosebire de lotul preconditionat unde s-au observat doar necroza tubulară izolată și o distensie tubulară ușoară. Hiperemia mai pronunțată a capilarelor glomerulare și peritubulare descrisă în rinichii preconditionați este sugestivă pentru o recuperare superioară a perfuziei renale în prezența PCI; aceste aspecte au dispărut după administrarea inhibitorilor MAO. Aceste date sugerează faptul că inhibiția MAO în contextul leziunii acute de I/R renală interferează cu protecția oferită de PCI.

Concluzii:

1. Modelul experimental de ischemie/reperfuzie renală acută in vivo, implementat în premieră, reprezintă un model reproductibil în vederea studierii strategiilor de protecție la nivel preclinic.
2. Izolarea mitocondriilor corticale renale, o tehnică de asemenea pusă la punct în premieră, permite studiul *in vitro* al funcției respiratorii mitocondriale în condiții normale și patologice, de exemplu leziunea de I/R, precum și evaluarea unor intervenții farmacologice.
3. Protocolul de PCI, așa cum era de așteptat, a îmbunătățit funcția respiratorie a mitocondriilor izolate la reperfuzia postischemică, a scăzut producția de H_2O_2 și a atenuat modificările structurale induse de I/R.

4. Administrarea inhibitorilor MAO anterior episodului de PCI a dus la alterarea respirației mitocondriale și la decuplarea acestora la reperfuzie, precum și la modificări importante ale morfologiei renale.

III. Caracterizarea efectului modulării receptorilor purinergici asupra cardiomiocitelor AC16 supuse unui protocol de hipoxie/reoxigenare

Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua efectele modulării purinergice asupra viabilității liniei de cardiomiocite AC16 supuse la două tipuri de protocoale de hipoxie/reoxigenare. Rezultatul principal al acestui studiu a fost că ATP, acționând ca un ligand pentru diferite clase de receptori purinergici, a indus o creștere dependentă de doză a viabilității celulare, efect care a depins totodată și de tipul/severitatea leziunii hipoxice.

Primul obiectiv al studiului a fost de a evalua efectele unor concentrații crescânde de ATP (10 μ M, 100 μ M și 1 mM) asupra celulelor care fuseseră supuse sau nu la hipoxie/reoxigenare în camera hipoxică, în prezența vs. absența a 100 μ M suramină, un inhibitor purinergic cu spectru larg (Fig. 7A). Administrarea a 10 μ M ATP nu a determinat o modificare semnificativă a viabilității relative (VR) a celulelor hipoxiate nici singur nici în co-administrare cu suramina (100 μ M). Cu toate acestea, 100 μ M ATP a crescut considerabil VR a celulelor supuse hipoxiei/reoxigenării, efect complet inhibat de suramină. În cazul aplicării unei concentrații mai mari de ATP (1 mM), o îmbunătățire semnificativă a VR a fost observată atât în cazul celulelor hipoxiate cât și al celor martor; suramina a redus această protecție pentru celulele hipoxiate, dar nu și pentru cele de control.

Pentru a evalua dacă aceste efecte pot fi recapitulate în cazul unui protocol diferit de hipoxie, am utilizat în acest sens stratificarea cu ulei mineral (Fig. 7B). Spre deosebire de rezultatele menționate mai sus, aplicarea primelor două doze de ATP (10 μ M, 100 μ M) nu a îmbunătățit semnificativ VR a celulelor hipoxice sau a celor martor, indiferent de prezența sau absența suraminei. Pe de altă parte, concentrația de 1mM ATP a crescut VR celulară atât a lotului hipoxiat cât și a celui martor. Adăugarea suraminei a diminuat parțial acest efect benefic pentru celulele de control, dar nu și pentru lotul hipoxic.

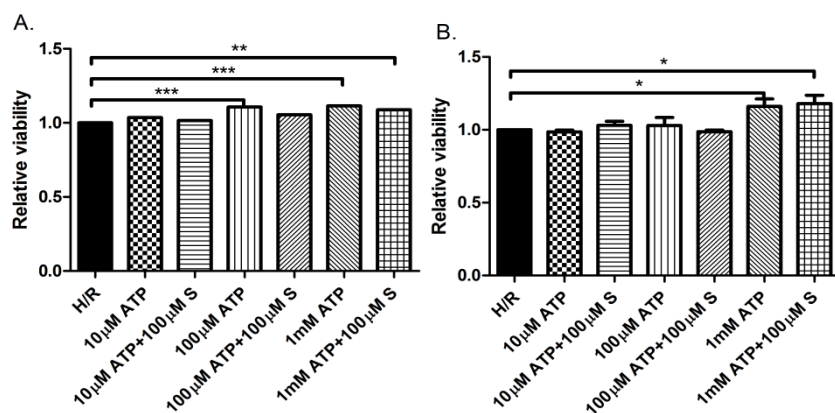


Figura 7. Grafice reprezentând viabilitatea relativă a celulelor supuse hipoxiei/reoxigenării în prezența concentrațiilor crescânde de ATP și 100 μ M suramină: (A) Hipoxie indusă prin intermediul camerei hipoxice; (B) Hipoxie indusă prin stratificare cu ulei mineral

Deoarece administrarea de 100 μ M suramină nu a fost capabilă să elimine complet cardioprotecția indusă de 1 mM ATP, în continuare am recapitulat experimentele folosind o doză mai mare (300 μ M) de inhibitor purinergic în ambele condiții hipoxice. În cazul hipoxiei/reoxigenării induse cu ajutorul camerei hipoxice, rezultatele obținute după adăugarea unei concentrații mai mari de suramină nu au fost diferite față de cele obținute folosind-o pe cea

inferioară, indiferent de concentrația de ATP (Fig. 8A). Pentru hipoxia indusă prin stratificare cu ulei mineral (Fig. 8B) au fost înregistrate rezultate similare cu cele din cazul concentrației de 100μM suramină: nu a existat nici o diferență semnificativă pentru 10 μM și 100 μM ATP, în timp ce 1mM ATP a cauzat o creștere semnificativă a VR care nu a fost influențată de suramină (300 μM).

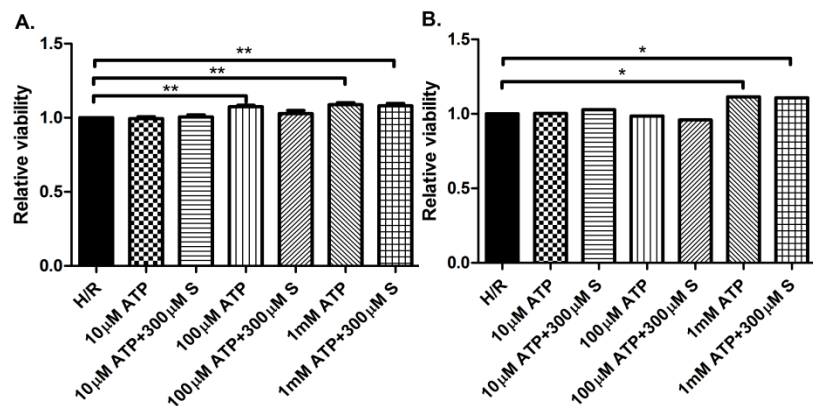


Figura 8. Grafice reprezentând viabilitatea relativă a celulelor supuse hipoxiei/reoxigenării în prezența concentrațiilor crescânde de ATP și 300μM suramină: (A) Hipoxie indusă prin intermediul camerei hipoxice; (B) Hipoxie indusă prin stratificare cu ulei mineral

Concluzie:

Stimularea purinergică crește viabilitatea cardiomiocitelor din linia AC16 supuse leziunii de hipoxie/reoxigenare, efect dependent atât de concentrația de ATP cât și de tipul/severitatea injuriei hipoxice.

IV. Evaluarea contribuției receptorilor purinergici P_2Y_{11} la modularea funcției vasculare pe un model murin de inflamație indusă prin injectarea de lipopolizaharid

Prezentul studiu a avut ca scop evaluarea rolului semnalizării purinergice în protecția vasculară în cazul unui model experimental de disfuncție endotelială acută declanșată de inflamația indusă prin lipopolizaharid (LPS). În acest scop, s-au efectuat experimente de reactivitate vasculară în baie de organ iar producția de H_2O_2 a fost evaluată la nivelul inelelor aortice prelevate de la șobolani tratați sau nu cu o singură injecție de LPS i.p. (8 mg/kg). Tratamentul acut cu LPS a modificat semnificativ reactivitatea segmentelor vasculare, respectiv a crescut contractilitatea și a redus relaxarea vs. controale, după cum reiese din curba contractilității la concentrații cumulative de fenilefrină și respectiv curba relaxării dependente de endotelium la acetilcolină (Fig. 9A, B). Incubarea timp de 30 de minute cu agonistul P_2Y_{11} , NF546, a cauzat o îmbunătățire semnificativă a funcției vasculare. Acest efect a fost abolit de co-tratamentul cu NF340, inhibitorul P_2Y_{11} , cu toate că acest compus în administrare izolată nu a avut nici un efect pe vasele tratate sau cele martor. Pentru a elucida dacă efectele vasculare după stimularea P_2Y_{11} sunt o consecință a îmbunătățirii disponibilității oxidului nitric, am măsurat contractilitatea vasculară după incubare cu NF546, NF340, sau ambele, în prezența inhibitorului eNOS, L-NAME (10 μM/L). Într-adevăr, rezultatele indică faptul că în prezența inhibiției eNOS, incubarea *ex vivo* cu NF546 a inelelor recoltate de la animalele tratate cu LPS a redus semnificativ contractilitatea (Fig. 9C). Acest efect a fost împiedicat prin co-incubarea cu NF340; NF340 în administrare singulară nu a influențat deloc contractilitatea la L-NAME. Aceste date sugerează că activarea P_2Y_{11} îmbunătățește relaxarea dependentă de endotelium după tratamentul cu lipopolizaharid prin creșterea biodisponibilității oxidului nitric.

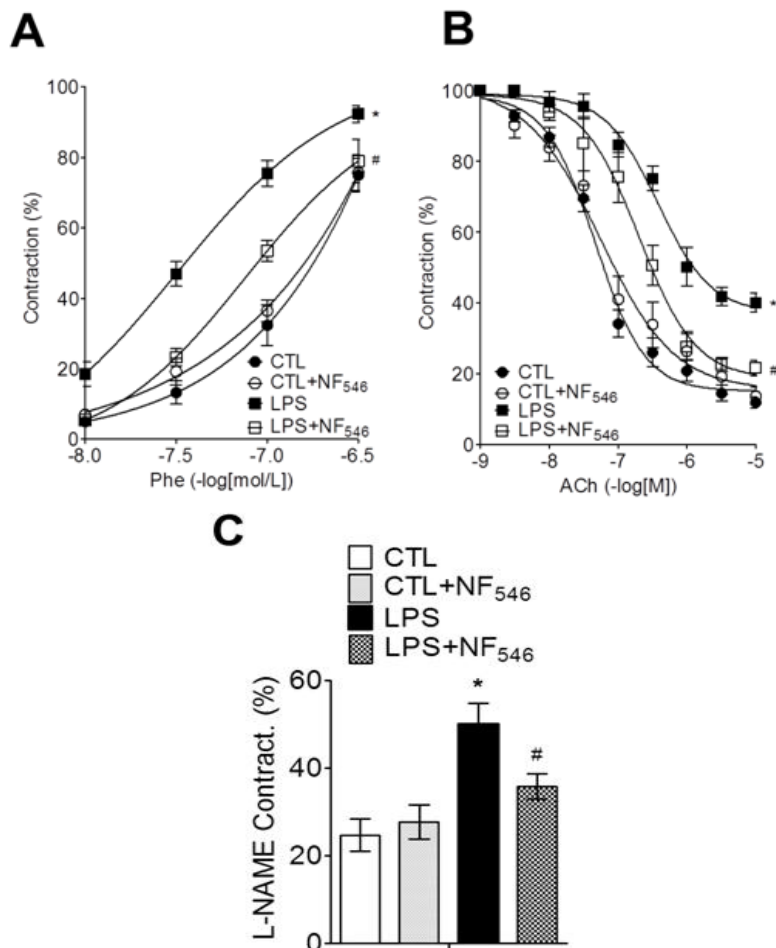


Figura 9. Rolul agonistului P_2Y_{11} , NF546, în protecția vasculară a segmentelor aortice izolate de la șobolani tratați cu LPS. (A) Con tracția indusă de fenilefrină, $n=6$, $*p<0.05$ controale (CTL) vs. șobolani tratați cu LPS, $\#p<0.05$ LPS vs. LPS+NF₅₄₆ (10 $\mu\text{mol/L}$) (B) Relaxarea dependentă de endoteliu indusă de acetilcolină, $n=6$, $*p<0.05$ CTL vs. șobolani tratați cu LPS, $\#p<0.05$ LPS vs. LPS+NF₅₄₆ (C) Con tracția la L-NAME (10 $\mu\text{mol/L}$), $n=6$, $*p<0.05$ CTL vs. șobolani tratați cu LPS, $\#p<0.05$ LPS vs. LPS+NF₅₄₆ (10 $\mu\text{mol/L}$).

În continuare am investigat dacă efectele P_2Y_{11} sunt dependente de endoteliu. Tratamentul *ex vivo* cu NF546 a redus semnificativ contractilitatea și a îmbunătățit relaxarea segmentelor vasculare izolate de la șobolani tratați cu LPS. În schimb, denudarea endotelială cu CHAPS a abolit complet efectele agonistului farmacologic asupra reactivității vasculare, indicând faptul că în contextul inflamației acute declanșate prin LPS, îmbunătățirea reactivității vasculare prin activarea P_2Y_{11} necesită prezența unui endoteliiu indemni.

În scopul de a elucidă dacă ameliorarea funcției vasculare după activarea P_2Y_{11} este legată de o modificare a producției de SRO am evaluat, de asemenea, producția aortică de H_2O_2 . Rezultatele au arătat că eliberarea de H_2O_2 de la nivelul segmentelor vasculare lezate a fost aproape dublă vs. controale. Incubarea timp de 30 de minute cu NF546 a redus semnificativ cantitatea de H_2O_2 (Fig. 10A), ceea ce sugerează că diminuarea stress-ului oxidativ este un alt mecanism posibil care stă la baza efectelor vasculare benefice după stimularea P_2Y_{11} . Mai mult, am demonstrat că agonistul P_2Y_{11} nu acționează ca un scavenger de H_2O_2 prin compararea capacității antioxidante a NF546 cu cea a catalazei, scavenger-ul clasic al H_2O_2 (Fig. 10B).

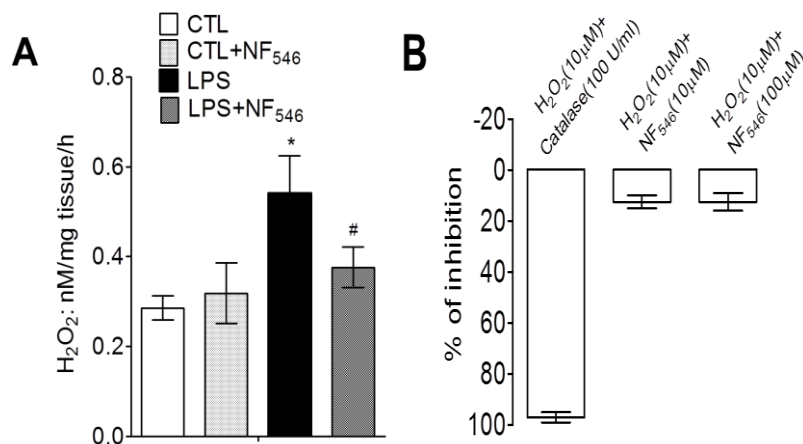


Figura 10. Efectul NF₅₄₆ asupra producției de SRO. (A) FOX Assay pentru măsurarea H₂O₂ în segmente aortice izolate de la șobolani tratați cu LPS (LPS) și controale (CTL) în prezența sau absența NF₅₄₆ (10 μmol/L), n=6, *p<0.05 CTL vs. LPS, #p<0.05 LPS vs. LPS+NF₅₄₆; (B) Activitatea antioxidantă a NF₅₄₆: FOX Assay pentru măsurarea H₂O₂ în prezența unor concentrații crescânde de NF₅₄₆ (10, 100 μmol/L), Catalaza (100 U/mL) a îndeplinit rolul de control pozitiv, n=3.

Concluzii:

1. Activarea receptorilor purinergici P₂Y₁₁ la nivelul inelelor aortice de șobolan îmbunătățește relaxarea endotelial-dependentă alterată de tratamentul cu LPS prin creșterea biodisponibilității oxidului nitric.
2. Efectul benefic al activării P₂Y₁₁ necesită prezența unui endoteliiu indemn.
3. Activarea receptorilor purinergici P₂Y₁₁ atenuează producția de SRO la nivelul segmentelor vasculare modificate de tratamentul cu LPS.
4. Stimularea receptorilor vasculari purinergici P₂Y₁₁ restabilește reactivitatea vasculară normală și reduce stress-ul oxidativ în contextul inflamației sistemice acute experimentale declanșate de administrarea de LPS, sugerând o nouă abordare terapeutică pentru managementul disfuncției endoteliale.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale pot fi rezumate după cum urmează:

1. Caracterizarea interacțiunii inhibitorilor MAO cu cardioprotecția indusă de PCI la nivelul inimilor izolate de șobolan: îmbunătățirea recuperării funcției contractile la reperfuzia postischemică dar fără efect asupra măririi infarctului experimental în prezența inhibitorilor MAO.
2. Caracterizarea interacțiunii inhibitorilor MAO cu protecția renală indusă de PCI pe modelul de I/R acută *in situ*: scăderea respirației mitocondriale și alterarea structurală a parenchimul renal la reperfuzie.
3. Caracterizarea efectelor ATP asupra viabilității cardiomiocitelor supuse hipoxiei/reoxigenării în prezența inhibiției purinergice cu spectru larg.
4. Caracterizarea efectelor modulatorilor receptorului purinergic P₂Y₁₁ asupra disfuncției endoteliale pe un model de inflamație acută sistemică: îmbunătățirea relaxării endotelial-dependente în condițiile stimulării receptorului.

Studiile din această teză au fost finanțate prin bursa doctorală POSDRU/159/1.5/S/136893 – DocMed.Net_2.0 și grant-ul intern universitar PII-C3-TC-2015-15132-06 pentru tineri cercetători.

LISTA ARTICOLELOR PUBLICATE

Teza de doctorat se bazează pe următoarele articole:

1. **Dănilă Maria-Daniela**, Privistirescu Andreea Ionela, Mirica Silvia Nicoleta, Sturza Adrian, Ordodi Valentin, Noveanu Lavinia, Duicu Oana Maria, Muntean Danina Mirela. *Acute inhibition of monoamine oxidase and ischemic preconditioning in isolated rat hearts: interference with postischemic functional recovery but no effect on infarct size reduction*. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** **2015**; 93(9):819-25.

(Revistă ISI, IF: 1.77)

2. **Dănilă Maria Daniela**, Benoist Lauriane, Lefort Claudie, Ivanes Fabrice, Muntean Danina Mirela, Angoulvant Denis, Chadet Stéphanie. *Modulation of purinergic receptors is protective against hypoxia/reoxygenation in AC16 cardiomyocytes*. **Rev Chem (Bucharest)** **2015**; 66(12): 2118-2120.

(Revistă ISI, IF: 0.81)

3. **Dănilă Maria Daniela**, Privistirescu Andreea, Scurtu Ileana, Sturza Adrian, Noveanu Lavinia, Duicu Oana Maria, Muntean Danina Mirela. *Characterization of respiratory function of isolated rat cortical renal mitochondria*. **Revista Română de Medicină Veterinară** **2015**; 25(2):45-50.

(BDI, B+ cod revistă 239)