

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE „GEORGE EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

- REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT -

Titlu: Efectele Antifibrotice și Angiogenice ale Blocării S100A8/A9 în Infarctul Miocardic Acut

Conducător de doctorat: Conf. Dr. Alexandru Șchiopu

Conducător de doctorat în co-tutelă: Prof. Dr. Ovidiu S. Cotoi

Doctorand: Răzvan-Gheorghită Mareș

Introducere:

Infarctul miocardic acut (IMA) este o boală asociată cu morbiditate și mortalitate ridicate. Deși progresele în îngrijirea acută, intervențiile farmacologice și managementul de urgență al IMA prin revascularizarea coronariană percutanată au redus semnificativ mortalitatea acută, supraviețuitorii rămân cu un risc crescut de a dezvolta insuficiență cardiacă. Astfel, există o nevoie urgentă pentru a înțelege mai bine patogeniza necrozei cardiomiocitelor, disfuncției miocardice și a remodelării ventriculare pentru a dezvolta noi terapii la pacienții cu IMA. Tratamentele care vizează răspunsul imun înăscut pot reprezenta o soluție viabilă pentru a reduce leziunile miocardice, a îmbunătăți funcția cardiacă și prognosticul la pacienții cu IMA. Cu toate acestea, abordările imunosupresoare utilizate în studiile clinice anterioare au eșuat și până în prezent nu există strategii terapeutice implementate clinic care să moduleze în mod adecvat echilibrul inflamație/reparare miocardică în faza acută după IMA.

Obiective:

Obiectivele acestui proiect au fost următoarele:

- Implementarea și validarea unei platforme experimentale pentru studiul infarctului miocardic în cadrul Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie “George Emil Palade” din Târgu Mureș, care să permită echipelor de cercetare locale, naționale sau internaționale testarea eficientă a unor noi molecule și compuși farmaceutici pentru tratarea infarctului miocardic;
- Integrarea în cadrul platformei a unui model nou și minim invaziv de inducere a IMA la șoareci, care la momentul de față nu este implementat în nici un centru de cercetare din România, precum și a tehnicilor asociate care să permită caracterizarea modificărilor locale și sistemice provocate de ischemia miocardică;
- Verificarea conceptului și a capacității platformei de a măsura efectele induse de terapii asupra proceselor celulare și modificărilor histologice post-IMA;
- Evaluarea efectelor tratamentului cu ABR-238901, un blocant al proteinei S100A8/A9, asupra dimensiunii infarctului și dezvoltării fibrozei miocardice post-IMA;
- Evaluarea efectelor blocării S100A8/A9 asupra neovascularizației după IMA.

Metodologie generală:

În toate studiile din această lucrare au fost folosiți șoareci nemodificați genetic (engl. wild-type) de tip C57BL6, cu vârste cuprinse între 8-12 săptămâni, greutate corporală între 20-25 grame, cărora le-a fost ligaturată artera descendentă anterioară (ADA) folosind o abordare chirurgicală nouă și minim invazivă. Toate intervențiile chirurgicale au fost efectuate la Stația Experimentală a Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu-Mureș conform protocoalelor locale aprobate de Comisia de Etică a Cercetării Științifice a Universității. Șoarecii au fost repartizați aleatoriu în 3 grupuri: șoareci cu IMA tratați cu soluție salină tamponată cu sulfat (PBS – engl.) (grupul IMA), șoareci cu IMA tratați cu 30 mg/kg de ABR-238901 (ABR), o mică

moleculă ce blochează S100A8/A9 și S100A9 (grupul IMA+ABR), respectiv șoareci operați prin aceeași tehnică ca și cei cu IMA, dar fără păstrarea ligaturii coronariene (grupul Sham – engl.). Am folosit măsurători electrocardiografice pentru a monitoriza inducerea ischemiei miocardice acute și pentru a confirma imediat rata de succes a procedurii. IMA a fost confirmat histologic prin colorațiile cu hematoxilină și eozină (H&E) și Trichrome-Masson. În plus, mărimea injuriei miocardice a fost determinată prin colorația Trichrome-Masson și prin metoda cu clorură de trifenil tetrazoliu (TTC – engl.) pentru a delimita miocardul necrotic de cel viabil în perioada imediată după IMA. Analizele histologice ale secțiunilor miocardice au fost efectuate la 1, 3 și 7 zile după inducerea IMA. Pentru a colecta inima, șoarecele a fost anesteziat prin injectarea intraperitoneală a unei soluții de ketamina-xilazină. Am analizat secțiuni de țesut miocardic colectate de la 5-6 niveluri diferite de-a lungul axei transversale a inimii, începând de la apex și până la nivelul ligaturii coronariene. Colorația H&E a fost utilizată pentru a vizualiza infiltratul inflamator și pierderea cardiomiocitelor secundare ischemiei acute. Colorația Trichrome-Masson a fost utilizată pentru colorarea fibrelor de collagen în vederea evaluării extinderii fibrozei la nivelul miocardului infarctat. Am efectuat colorarea imunohistochimică pentru S100A9, o alarmină proinflamatoare care crește rapid în miocardul infarctat, și pentru antigenul limfocitar 6G (Ly6G – engl.), un marker exprimat în mod specific pe suprafața neutrofilelor de șoarece, pentru a evalua modificările histologice ale inflamației acute în faza precoce post-IMA. În plus, am folosit markerul de celule endoteliale CD31 pentru a vizualiza capilarele din zona de infarct și de la nivelul miocardului la distanță de leziunea ischemică. În experimente separate realizate la Institutul de Biologie și Patologie Celulară „N. Simionescu” din București, am efectuat analiza proteomică a extractelor de ventricul stâng prin spectrometrie de masă calitativă în ziua 7 post-IMA, pentru a evalua mediatorii angiogenici și procesele modulate prin inhibarea S100A9. De asemenea, am analizat prin citometrie în flux dinamica celulelor imunității înăscute (neutrofile, monocite și macrofage) din sânge și inimă la 1, 3 și 7 zile după IMA.

Rezultate:

Durata totală a procedurii chirurgicale de inducere a IMA a fost de până la 3 minute, cu un timp de expunere a inimii pentru ligatura ADA de până la 20 de secunde. Timpul până la recuperarea completă a animalelor după sistarea anesteziei inhalatorii a fost de până la 5 minute. Supraviețuirea postoperatorie pe termen scurt a animalelor a ajuns până la 80%, iar rata de supraviețuire pe termen lung (de la 1 oră după operație până la recoltarea inimii pentru analiză) a fost de până la 95%. Rata generală de supraviețuire a fost de aproximativ 65-75%. După IMA, infiltratul inflamator este reprezentat în principal de neutrofile care au atins vârful în ziua 1 după infarct. Distrugerea miocardică și infiltratul inflamator au fost mult mai pronunțate în ziua 3, dar prezența neutrofilelor a fost mult redusă în comparație cu ziua 1. Capacitatea S100A9 de a reflecta prezența neutrofilelor în miocardul infarctat a fost confirmată de asocierea semnificativă între expresia S100A9 și colorația Ly6G, exprimată ca procent mediu din zona ventriculului stâng, atât în ziua 1, cât și în ziua 3 post-IMA. Blocarea S100A9 a scăzut prezența celulelor inflamatorii și infiltrarea neutrofilelor Ly6G-pozitive, precum și expresia miocardică a S100A9 în zilele 1 și 3. Extinderea fibrozei miocardice a fost redusă semnificativ la șoarecii tratați cu ABR-238901 atât la 3, cât și la 7 zile după IMA. La șoarecii tratați cu ABR, o scădere semnificativă a fibrozei miocardice a fost observată și în miocardul la distanță de leziunea ischemică la 7 zile post-IMA. În plus, am demonstrat că dimensiunea infarctului a fost redusă semnificativ atât la 3, cât și la 7 zile după IMA prin blocarea S100A9 timp de 3 zile. Inhibarea S100A9 nu a influențat semnificativ vascularizația miocardică în zilele 1 și 3 post-IMA. Cu toate acestea, tratamentul ABR a determinat o creștere de 2,5 ori a ariei vasculare din ziua 1 până în ziua 7, comparativ cu o creștere de numai 1,6 ori a șoarecilor martor tratați cu PBS. Dintre cele 25 de proteine modulate semnificativ de tratament, 10 proteine au prezentat diferențe semnificative de cel puțin 4 ori între șoarecii IMA tratați cu ABR și șoarecii de control tratați cu PBS. Tratamentul ABR a contracarat creșterea a 8 din cele 10 proteine în comparație cu grupul IMA tratat cu PBS, inducând o scădere semnificativă a expresiei Anx1 (~16 ori), Anx2 (~5 ori), Fgf1 (~10 ori), Emc10 (~5,5 ori), RhoA (~4,7 ori), Cdc42 (~4,7 ori), Camp (~4,4 ori) și Ngp (~4 ori). În schimb, expresia Flna și Rtn4 a fost crescută semnificativ prin blocarea S100A9 de ~10 ori, respectiv ~5 ori.

Concluzii generale:

Am descris și implementat în cadrul Universității noastre un model experimental nou și minim invaziv de inducere a IMA la șoareci. În plus, am implementat cu succes tehnici histologice și imunohistochimice, precum și de citometrie în flux, care permit o analiză complexă tisulară și celulară a modificărilor locale și sistemice induse de

ischemia miocardică acută. Rezultatele noastre promovează S100A9 ca un potențial biomarker al implicării neutrofilelor în IMA și o țintă terapeutică promițătoare pentru a modula recrutarea și funcția neutrofilelor și, prin urmare, pentru a reduce inflamația excesivă după IMA. În plus, am demonstrat că blocarea S100A9 în timpul fazei inflamatorii acute după IMA reduce dimensiunea infarctului atât la 3, cât și la 7 zile după ocluzia coronariană și scade semnificativ fibroza cardiacă post-ischemică. Datele noastre au arătat că tratamentul promovează neovascularizația atât în zona de infarct, cât și în miocardul la distanță de leziunea ischemică. Mecanismele care stau la baza efectelor pro-angiogenice implică creșterea expresiei Flna și Rtn4 și scăderea RhoA, Ngp și Camp.

Originalitatea tezei:

În acest proiect am implementat un model experimental minim invaziv și eficient de inducere a IMA la șoareci prin ligaturarea permanentă a ADA. După cunoștințele noastre, la momentul de față această intervenție chirurgicală este realizată cu succes în România doar în cadrul Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș. În plus, am integrat și sincronizat pentru prima dată în cadrul Universității noastre tehnici asociate cu procedura chirurgicală, cum sunt electrocardiografia la animalele mici, tratamentul animalelor, recoltarea țesuturilor, procesarea și analiza histologică, precum și izolarea celulară și analiza prin citometrie în flux, care permit studiul modificărilor locale și sistemice induse de ischemia miocardică acută la șoareci. Mai mult, întreaga platformă experimentală reprezintă în prezent un instrument important care sprijină înțelegerea rolului sistemului imun înnăscut și al inflamației în patogeneza IMA, care poate fi utilizat de companiile biotehnologice și farmaceutice și instituțiile de cercetare pentru dezvoltarea și testarea unor noi terapii noi în IMA. Rezultatele prezentei lucrări indică pentru prima dată alarmina proinflamatorie S100A9 drept un potențial biomarker al implicării neutrofilelor în IMA și o țintă terapeutică promițătoare pentru a reduce inflamația excesivă după IMA. O altă noutate a acestui studiu relevă că blocarea S100A9 în primele 3 zile după IMA atenuează fibroza miocardică post-ischemică și reduce semnificativ dimensiunea infarctului miocardic. Important, arătăm pentru prima dată că blocarea S100A9 promovează neovascularizația miocardică post-IMA prin creșterea expresiei Flna și Rtn4 și scăderea expresiei RhoA, Ngp și Camp. Aceste descoperiri promovează blocarea S100A9 ca o terapie imunomodulatoare nouă și promițătoare în IMA și identifică noi proteine cu potențial terapeutic.