



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Proteina C-reactivă monomerică, activarea macrofagelor, și patologia bolilor vasculare

Doctorand: Ylenia Pastorello

Conducător de doctorat: Prof.habil.dr. Claudia Bănescu

Background

Proteina C reactivă (CRP) este o proteină pentamerică de fază acută produsă de ficat ca răspuns la stimuli inflamatori și la creșterea consecutivă a nivelului de IL-6. CRP nativă (nCRP) se disociază în cinci monomeri liberi (mCRP) la locul inflamației, prin interacțiunea cu grupările fosfocolină (PC) prezente pe membranele celulare activate. Principalele proprietăți bioactive asociate cu mCRP sunt inducerea recrutării monocitelor și aderarea lor la endoteliu, activarea fenotipului macrofagelor inflamatorii (M1) și absorbția ox-LDL de către acestea, precum și creșterea MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, IL-8. Prin urmare, consecințele activității biologice a mCRP sunt reprezentate în comportamentul său de modificare a bolilor, în special în componentele vasculare ale bolilor cardiovasculare și neurodegenerative. Inhibitorul de disociere a CRP C10M, recent caracterizat, a prezentat rezultate promițătoare în blocarea efectelor CRP administrat în modelele de șobolani, prin urmare, este considerat o cale terapeutică de abolire a producției de mCRP și a consecințelor nocive ulterioare.

Studiul 1- mCRP a cauzat agregarea monocitelor și polarizarea la M1, într-o modalitate dependentă de FAK, care a fost parțial inhibată de C10M

Acest studiu a urmărit să exploreze modularea mCRP dependentă de FAK a atașării și grupării monocitelor, concomitent cu diferențierea în subpopulații macrofage M1. În plus, a fost investigată capacitatea inhibitorului mCRP C10M de a opri acest proces și, eventual, de a preveni eliberarea de citokine pro-inflamatorii indusă de mCRP. Astfel, linia celulară U937 și PBM umane, extrase de la doi voluntari sănătoși, au fost expuse la mCRP, iar utilizarea unui inhibitor FAK specific și a C10M au fost puse în aplicare pentru a testa variațiile proceselor menționate anterior. Principalele tehnici utilizate au fost microscopia, analiza confocală, analiza FACS, Western blotting și ELISA.

Originalitate:

- mCRP, dar nu nCRP sau LPS, a indus agregarea monocitelor in vitro, într-un interval de timp de 3-24 h. Acest lucru a avut loc concomitent cu creșterea expresiei p-FAK și translocarea perinucleară la nucleară, care a putut fi complet abrogată de inhibitorul C10M. În plus, agregarea monocitelor indusă de mCRP a fost asociată cu polarizarea M1 a PBM-urilor umane și cu creșterea secreției de citokine proinflamatorii IL-8 și IL-1 β . Pre-incubarea cu inhibitorul FAK I înainte de tratamentul cu mCRP a abolit agregarea monocitelor, indicând un mecanism dependent de FAK. Aceasta reprezintă prima lucrare care arată o legătură directă între mCRP, FAK și agregarea monocitelor și derivarea polarizării către fenotipul pro-inflamator. C10M a redus iNOS, expresia FAK celulară medie, blocând în același timp localizarea nucleară, și a redus parțial expresia markerilor asociați cu diferențierea macrofagelor M1.
- Expunerea acută a PBM primare la mCRP a determinat o reducere a fosforilării căilor MAP kinazelor ERK-1 și JNK 1/2. Inhibitorul C10M nu a modulat suplimentar aceste căi de semnalizare a celulelor.



- mCRP a crescut fosforilarea p53. Acest lucru indică potențialul său rol pro-apoptotic. C10M a exacerbat expresia fosfo-p-53, ceea ce ar trebui să fie luat în considerare dacă acest inhibitor de moleculă mică ar fi considerat adecvat pentru utilizare terapeutică.

Studiul 2- C10M a inhibat expresia vasculară cerebrală a mCRP după injecții intraperitoneale, într-un model murin ApoE^{-/-} de dislipidemie

Obiectivul acestui studiu a fost de a investiga capacitatea mCRP injectat intraperitoneal (IP) de a traversa bariera hemato-encefalică (BBB), localizarea sa în parenchimul cerebral și capacitatea C10M de a preveni acumularea sa pentru a înțelege dinamica distribuției vasculare a mCRP legată de posibilele consecințe neurodegenerative. Prin urmare, 24 ApoE^{-/-} pe un protocol bogat în grăsimi au fost clasificate în trei grupuri, și anume control, grup care primește exclusiv mCRP și grup care primește mCRP plus C10M. După eutanasiere, parenchimul cerebral și microvasculatura lor au fost investigate pentru depunerea mCRP și expresia CD105, utilizând analiza histologică și imunohistochimie.

Originalitate:

- Injecții IP multiple de mCRP timp de patru săptămâni la șoareci tineri ApoE^{-/-} (70μg/Kg, de două ori pe săptămână), concomitent cu o dietă bogată în grăsimi, au dus la un transfer semnificativ de mCRP în parenchimul cerebral și la exprimarea sa în microvasele și neuronii din hipocampus, cortexul cerebral, corpul calos, mezencefalul și metatalamusul. mCRP transferat la microvasculatura cerebrală prin inducerea sistemică a inflamației și creșterea ulterioară a permeabilității BBB. În parenchimul cerebral, mCRP depus în microvaselor a dus la întreruperea joncțiunilor celulelor endoteliale (EC), la scurgerea în matricea extracelulară și la absorbția ulterioară de către neuronii locali.
- mCRP a fost puternic co-localizat cu CD105 în lumen și în EC intinale ale microvasele corticale în secțiunile seriale ale șoarecilor care au fost injectați cu mCRP, dar nu și în grupul de control. Acest lucru indică activarea angiogenică a vaselor indusă de mCRP, permeabilitatea lor crescută și susceptibilitatea la insulte inflamatorii, scurgeri și degenerare.
- Inhibitorul C10M a abrogat complet depunerea mCRP în creier, la șoarecii tratați atât cu acest C10M, cât și cu mCRP și, în consecință, expresia CD105. Legătura directă a C10M la mCRP a diminuat capacitatea acestuia de a induce inflamația sistemică necesară pentru întreruperea BBB și, astfel, stoparea intrării sale în parenchimul cerebral.

Concluzii

Protejarea barierei EC împotriva acumulării de agregate de celule imune sau de trombocite asociate mCRP reprezintă o posibilă protecție terapeutică împotriva stenozei și trombozei vasculare, deoarece activitatea inflamatorie focalizată agravează leziunile vasculare, iar penetrarea intimă a EC marchează primele etape ale dezvoltării plăcii aterosclerotice. Prin depunerea sa în microvasele cerebrale, perturbarea arhitecturii EC și răspândirea consecutivă în neuronii cerebrali din jur, mCRP poate provoca disfuncții ale unității neurovasculare. Administrarea noului inhibitor de molecule mici C10M, care în această lucrare a demonstrat eficacitate în abolirea totală a acumulării de mCRP și a expresiei CD105 în parenchimul cerebral și microvasculatura șoarecilor, ar putea contribui la prevenirea acestui proces patologic. Pentru a evalua posibila utilizare a C10M în prevenirea sau blocarea neurodeteriorării, sunt necesare mai multe cercetări, inclusiv studii care implică subiecți umani / studii clinice.