

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ**

Rezumatul tezei de doctorat

**FIBROZA HEPATICA INDUSA DE COLESTAZA LA
SOARECI ESTE ATENUATA PRIN
SUPRAEXPRIMAREA INHIBITORULUI CAII DE
SEMNALIZARE PRIN TGF- β , SMAD7**

**Cond. științific: Prof. CONSTANTIN CRACIUN
Doctorand: LOREDANA CIUCLAN**

**CLUJ-NAPOCA
2011**

Cuprins

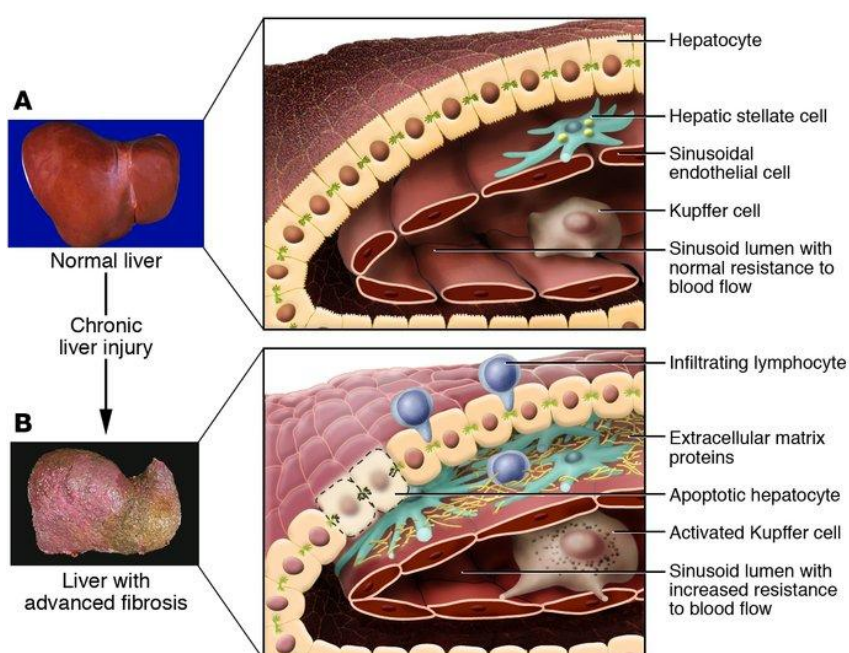
1. Introducere	4
1.1 Fibroza hepatica.....	4
1.2 Importanta si efectele eliberarii de citokine in bolile hepatice cronice	5
1.3 Implicarea TGF- β în procesul de fibroza	5
1.4 Calea de semnalizare prin TGF- β	5
1.5 Modele animale pentru boli hepatice.....	7
2. Obiectivele studiului	7
3. Material și metode	8
3.1 Generarea animalelor transgenice.	8
3.2 Stabilirea colestazei la soarecii	8
3.3 Detectarea expresiei ARNm	8
3.4 Analiza imunohistochimica	9
3.5 Determinarea valorilor bazale ale transaminazelor și a enzimelor de colestază	9
3.6 Analiza statistică.....	9
4. Rezultate	10
4.1 Modelul experimental de ligaturare a ductelor biliare.....	10
4.2 Detectia genei supraexprimate Smad7 in animalele control FVB/ N si transgenice SM22 α -Flag-Smad7 la 2 saptamani dupa legarea ductului biliar.	11
4.3 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs determina scaderea valorilor crescute ale enzimelor hepatice la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.	12
4.4 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce depunerile hepatice de collagen la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.	13
4.5 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs determinascaderea sintezei de α -SMA la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.	14
4.6 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce procesul inflamator la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.....	15
4.7 Efectele moleculare dependente de supraexprimarea Smad7 in HSCs	16

5. Discuții	18
6. Concluzii	20
7. Cuvinte cheie	20
8. Bibliografie selectivă	21
9. Mulțumiri.....	22

1. Introducere

1.1 Fibroza hepatica

Fibroza hepatică este un proces cronic caracterizat prin acumularea progresivă a matricei fibrilare extracelulare la nivel hepatic. În timpul procesului de regenerare tisulară celulele vătămate sunt înlocuite cu celule sanatoase. În cazul fibrozei, tesutul parenchimal normal este substituit cu cel conjunctiv. Acest aspect anormal apare inițial în anumite zone mici din ficat, progresând apoi până la înlocuirea completă a arhitecturii normale cu cea nodular-fibroasă. Rezultatul final al fibrozei netratate este insuficiența hepatică [8] (**Fig. 1**).



(Modificat Brenner, 2007.)

Fig.1 Dezvoltarea fibrozei hepatice. Leziunile hepatocitelor stimulează acumularea celulelor inflamatorii. Factorii eliberați de aceste celule induc transdiferențierea celulelor hepatice stelate (HSCs) în miofibroblaste. HSCs activate duc la acumularea de matrice extracelulară (ECM). Prin urmare, modificarea arhitecturii tesutului hepatic contribuie la insuficiența hepatică.

Etiologia fibrozei hepatice

Principalele cauze ale fibrozei sunt infecția cu virusurile hepatice, colestază și consumul cronic de alcool [10]. Datorită epidemiei actuale de obezitate, s-a evidențiat incidența extrem de crescută a bolilor hepatice non-alcoolice (NASH) recunoscute ca o cauză majoră a fibrozei, deși prevalența sa nu este încă cunoscută.

1.2 Importanta si efectele eliberarii de citokine in bolile hepatice cronice

Fibrogenesa hepatica este mediata de interactiuni complexe intre celulele hepatice parenchimatice si nonparenchimatice si implica cresterea productiei de citokine. Există tot mai multe dovezi ca eliberarea de citokine precum TGF- β , IL1, IL6, IL8, mediaza procesele de inflamatie hepatica, apoptoza si necroza a celulelor hepatice, colestaza, si fibroza [2], [16], (Fig.2).

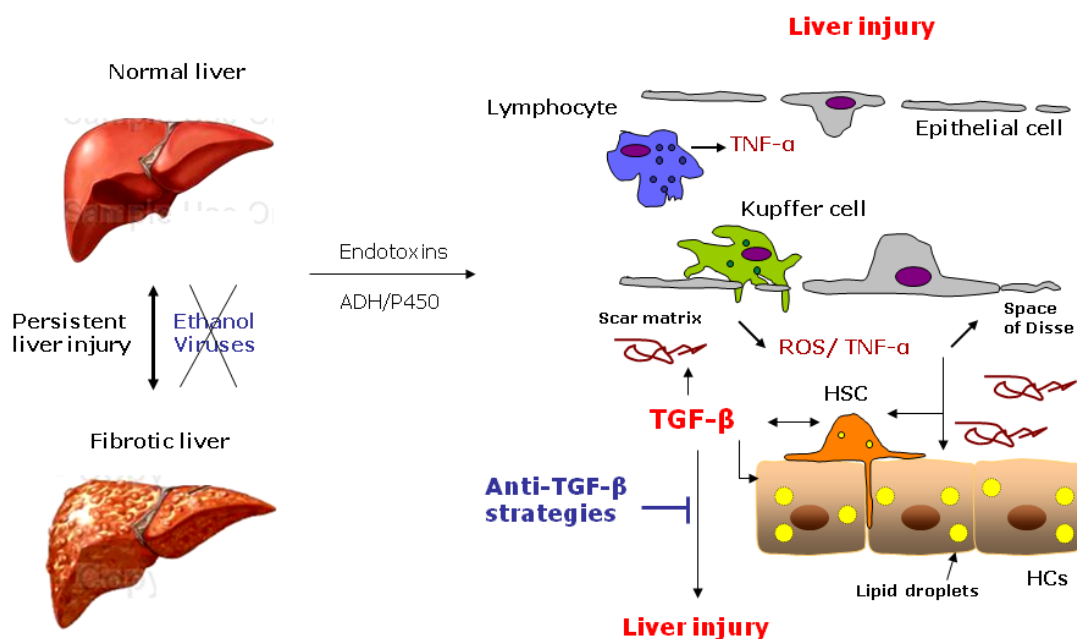


Fig. 2. Relevanta eliberarii de citokine în bolile hepatice cronice.

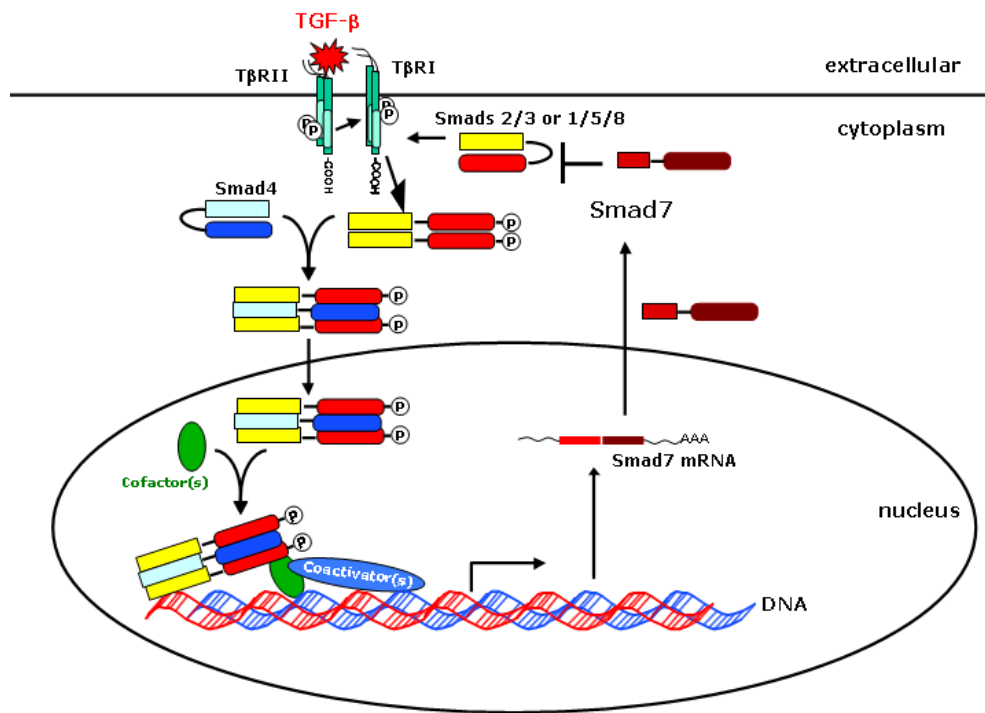
1.3 Implicarea TGF- β în procesul de fibroza

In afecțiunile hepatice acute și cronice, diferite tipuri de celule hepatice cum ar fi celulele Kupfer, celulele hepatice stelate sau limfocitele secreta cantitati semnificative de TGF- β [18]. Activarea caili sale principale de semnalizare în aval de proteinele Smads, promovează transdiferentierea HSCs în miofibroblaste (MFBs) ce ulterior produc matrice extracelulara (ECM). Recent, s-a demonstrat participarea TGF- β in procesul de tranzitie a celulelor epiteliale (hepatocite) in celule mezenchimale (EMT) contribuind astfel la procesul de fibrogenesa hepatica [4], [19].

1.4 Calea de semnalizare prin TGF- β

Din familia de citokine TGF- β 1 fac parte izoformele TGF- β , proteinele activine si morfogenetice osoase (BMP) [57]. Proteinele Smad sunt mediatori de semnalizare intracelulara ai superfamiliei TGF-beta care regleaza o vasta varietate de procese biologice.

Cuplarea TGF-beta la receptorul sau induce fosforilarea proteinelor smad-2 si smad-3 care ulterior migreaza în nucleu unde functioneaza ca un factor de transcriere a genelor tinta [12]. Familia de receptori care raspunde activarii prin TGF-β include 12 tipuri de receptori: cinci receptori de tip II și șapte receptori de tip I, care declanșeaza o diversitate de răspunsuri celulare si care diferă prin afinitățile fata de diferite tipuri de liganzi, precum și prin alegerea de molecule intracelulare Smads [9]. (Fig. 3).



(Modificat, Dooley et al, 2006.) **Fig. 3:** Reprezentarea schematică a cascadei de semnalizare prin TGF-β și proteinele intracelulare Smads. Smad7 blochează calea de semnalizare TGF-β acționând la nivelul unde proteinele Smad sunt fosforilate.

Terminarea semnalelor mediate de TGF-β este coordonată de mai multe mecanisme cum ar fi legarea competitivă a proteinelor inhibitoare I-Smads (Smad6 sau Smad7) la nivelul receptorilor activați și cuplați cu Smads. Această interacțiune duce la ubiquitinarea și degradarea receptorilor cuplați cu R-Smads [12]. În stare neactivată, proteinele I-Smads sunt localizate în nucleu de unde sunt translocate în citoplasmă în urma activării căii de semnalizare, prin legarea TGF-β de receptori. Expresia Smad7 este indusă ca răspuns la stimularea cu TGF-β, creând astfel o buclă de feedback negativă care determină întreruperea semnalizării prin Smads urmata de degradarea receptorilor TGF-β I, (mediată de enzimele E3 ubiquitin ligaze (Smurfs) [7], [12].

1.5 Modele animale pentru boli hepatice

Pana in prezent au fost publicate mai multe modele animale pentru a studia dezvoltarea si tratamentul fibrozi hepatice. (ce survin ligaturii canalului coledoc) Ligatura de duct biliar (BDL) este un model in vivo utilizat pentru a genera fibrogeneza hepatica bazat pe colestaza [5]. Noțiunea de colestază extrahepatică este cuprinsă în cadrul nosologic al afecțiunilor în care producții de secreție și excreție ai hepatocitului sunt împiedicați în curgerea lor liberă spre intestin. Procesul este urmat de acumularea bilirubinei, a acizilor și sărurilor biliare în hepatocit și regurgitarea lor în sânge. Efectele acestei inversări a polarității biliare se manifestă atât la nivel local, hepatocitar, cât și general. Metabolismul celulei hepatice este caracterizat de reacții de oxidoreducere foarte intense, cu producerea de cantități crescute de radicali liberi deoxigen. In momentul cand activitatea radicalilor liberi de oxigen nu mai poate fi contracarată de antioxidanții proprii, este declanșat stresul oxidativ. Acțiunea radicalilor liberi se manifesta prin alterări ale tuturor structurilor celulare, până la nivel de ADN, rezultatul fiind accelerarea apoptozei hepatice. Acestora li se adaugă declanșarea unui răspuns inflamator, cu actiune la nivelul spațiilor porte, produs și întreținut de fenomenele de stres oxidativ. Cumularea consecințelor distructive ale celor două fenomene, stresul oxidativ și infiltratul inflamator, se manifestă în timp prin alterarea funcției hepatice, apoptoză și necroză celulară, apariția fibrozei celulare.

2. Obiectivele studiului

Studiul prezent se bazează pe o publicatie anterioara [5], în care s-a reușit ameliorarea procesului de fibroza hepatica la șobolani prin injectarea prin vena porta a adenovirusului AdSmad7.

În studiul de față, am fost interesati in a investiga efectele supraexprimării genei Smad7 specific in celulele hepatice stelate activate in urma procesului de legare a ductului biliar. In acest scop am generat soarecii transgenici SM22 α -Flag-Smad7 care exprima Smad7 sub controlul promotorului SM22 α . După doua săptămâni de la operatia de legare a ductului biliar, țesuturile au fost colectate pentru a analiza in scopul determinării expresiei mai multor markeri fibrotici iar in serul colectat a fost masurata activitatea enzimelor hepatice.

Depunerile de collagen au fost masurate prin imunocolorarea cu PSR (colorarea Picro Sirius). Modificarile in expresie a α -SMA si acumularea celulelor inflamatoare au fost cuantificate prin imunohistochimie. Pentru a evalua functia hepatica s-a recoltat sânge de la fiecare individ, pentru determinarea valorilor bazale ale transaminazelor și a enzimelor de colestază.

Mai mult decât atât, am analizat în detaliu, folosind analiza microarray, influenta supraexprimării Smad7 asupra celulelor hepatice stelate cultivate pentru 3 si 7 zile.

În concluzie, am demonstrat că supraexprimarea genei Smad7 inhibă transdiferențierea celulelor hepatice stelate și atenuează procesul de fibroza sugerând dezvoltarea posibila a unui tratament antifibrotic de care pacientii pot beneficia.

3. Material și metode

3.1 Generarea animalelor transgenice.

Toate studiile experimentale au primit acordul Comisiei de Etică a Universității.

Generarea soarecilor transgenici SM22 α -Flag-Smad7: gena vector integrată în genomul animalelor a conținut promotorul SM22 α pentru soarece (1,6 kb), urmată de o secvență de nucleotide Flag-Tag, un fragment (1,3 kb) care conține secvența de codificare a genei Smad7 și PGKneobpA, precum și o casetă de exprimare a β -lactamazei. Soareci cu vârste cuprinse între 2 și 4 luni au fost utilizați în experimentele *in vivo*. Supraexprimarea genei Smad7 în soarecii transgenici a fost confirmată prin PCR prin măsurarea expresiei genice a Flag-Smad7 ARNm.

3.2 Stabilirea colestazei la soarecii

Legarea ductului biliar a fost efectuat folosind o tehnică standard [5]. Pe scurt, soarecii din grupul de control (FVB/ N) și soarecii transgenici (SM22 α -Flag-Smad7) ($n = 4$ fiecare grup) au fost anesteziați de ketamină-kylazină. După deschiderea cavității abdominale canalului biliar comun a fost expus și legat de două ori cu o ata de matase 6-0. Acest model pentru studiile fibrozei *in vivo*, este bazat pe dezvoltarea colestazei. Operația din grupul de control pentru BDL a fost realizată doar prin atingerea ușoară a duct biliar. În faza ulterioară, abdomenul a fost închis în straturi, iar animalele au fost lăsate să se recupereze pe o pătură încălzită. 2 săptămâni de la declansarea colestazei animalele au fost sacrificate și tesuturile colectate pentru determinările biologice.

3.3 Detectarea expresiei ARNm

ARN-ul total a fost colectat de la celulele hepatice stelate cultivate pentru trei (3d-) sau șapte zile (7d-) HSCs. În prealabil HSCs au fost infectate cu adenovirusul control AdLacZ sau AdSmad7. ARN-ul a fost izolat utilizând kitul RNeasy (Qiagen, Hilden, Germania), în conformitate cu manualul de instrucțiuni. ARN-ul total a fost purificat din țesutul hepatic după homogenizare în TRIZOL (BRL GIBCO, Eggenstein, Germania, 1 țesut ml/50mg) folosind homogenizatorul UltraTurrax (IKA, Staufen, Germania). Probele de ARN au fost normalizate prin măsurători spectrofotometrice (260/280 nm) și calitatea ARN a fost determinată prin gel de electroforeză. În etapa următoare ARN-ul a fost revers transcris în ADN complementar utilizând kitul One RT-PCR de la Qiagen (Hilden, Germania). Pentru a identifica răspunsurile dependente de supraexprimarea genei Smad7 în HSCs am utilizat tehnica de analiză microarray. ARN colectat a fost utilizat pentru generarea ARN biotinitat complementar în conformitate cu manualul tehnic GeneChip Affymetrix® Analiza Expression (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). ADN complementar purificat a fost hibridizat cu o placă Affymetrix, Genome Affymetrix RG-U34A microarray, (8799 seturi de probe) pentru 16h la 45°C. Nivelul de exprimare a fiecărui set de probe a fost determinat în

grupul celulelor infectate cu Smad7 si LacZ control folosind Affymetrix Microarray Suite 5.0. Genele ale căror nivel de exprimare a fost multiplicat de 2 ori sau mai mult ($p < 0,001$) au fost considerate a fi în mod semnificativ regulate de către Smad7. Aceste gene au fost investigate pe baza proceselor biologice în care sunt implicate. [<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>], PathwayArchitect, Stratagene).

3.4 Analiza imunohistochimica

Tesutul hepatic a fost fixat în 10% formaldehidă și încorporat în parafină. Secțiuni de cate patru-micrometri au fost colorate cu Hematoxilina și Eozina (H & E) pentru examinarea de rutină sau cu picro-Sirius roșu pentru vizualizarea depunerilor de colagen hepatic. Imunocolorarea s-a realizat pe țesuturi fixate în formaldehidă, incluse la parafină, iar markerii convenționali de prognostic au fost evaluați pe secțiuni colorate cu H&E. Analiza imunomarcajului realizat cu ajutorul anticorpilor monoclonali anti- α -SMA (diluție 1:300) și anti- CD68 (diluție 1:75) a evidențiat prezența celulelor pozitive în cazuri studiate. Peroxidaza endogenă a fost blocată prin aditia reactivului de blocare (Dako) timp de 30 minute. Cuantificarea histologică a fost efectuată, fie prin analiza morfometrică cu ajutorul programului Leica QWIN. Valorile prezentate au reprezentat o medie a 10 câmpuri (100X) măsurate în 5 secțiuni pentru fiecare soarece (5 animale în fiecare grup).

3.5 Determinarea valorilor bazale ale transaminazelor și a enzimelor de colestază

500 μ L sânge a fost colectat de la soareci anesteziati pentru a determina valorile serice ale enzimelor hepatice. Aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), și fosfataza alcalină (AP), au fost analizate cu ajutorul kitului Calibrator Kit3 (VITROS Systems; Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, Anglia). Concentrația bilirubinei totale a fost determinată cu ajutorul unui kit de testare (Corgenix, CO), la o lungime de undă de 450 nm, și folosind un spectrometru 1420 Victor Counter Multilable (Wallac, Wellesley, MA).

3.6 Analiza statistică

Rezultatele sunt exprimate ca valori medii SEM și au fost analizate utilizând testul Mann-Whitney, urmat de comparația perechilor atunci când a fost cazul. Analiza statistică a datelor PCR a fost efectuată cu ajutorul testului t-Student pentru datele asociate. O valoare a $P < 0,05$ a fost considerată semnificativă.

4. Rezultate

4.1 Modelul experimental de ligaturare a ductelor biliare

Ligatura de duct biliar (BDL) este un model in vivo utilizat pentru a genera fibrogena hepatica bazat pe colestaza [5]. Soarecii de tip salbatic (FVB / N) și cei transgenici (SM22 α -Flag-Smad7) (n = 4 fiecare grup) au fost anesteziați utilizand ketamină-kylazină. Urmarind linia mediana abdominala, abdomenul a fost deschis si canalul biliar comun expus a fost legat de două ori cu ata de matase 6-0. Operatia control (sham) a fost efectuată prin atingerea ușoară a ductului biliar. Ulterior, abdomenul a fost închis în straturi, iar animalelor li s-a permis recuperarea pe o patura incalzita. Dupa 2 saptamani de la operatie animalele au fost sacrificate si abnormalitatile hepatice au fost masurate.(Fig. 4A).

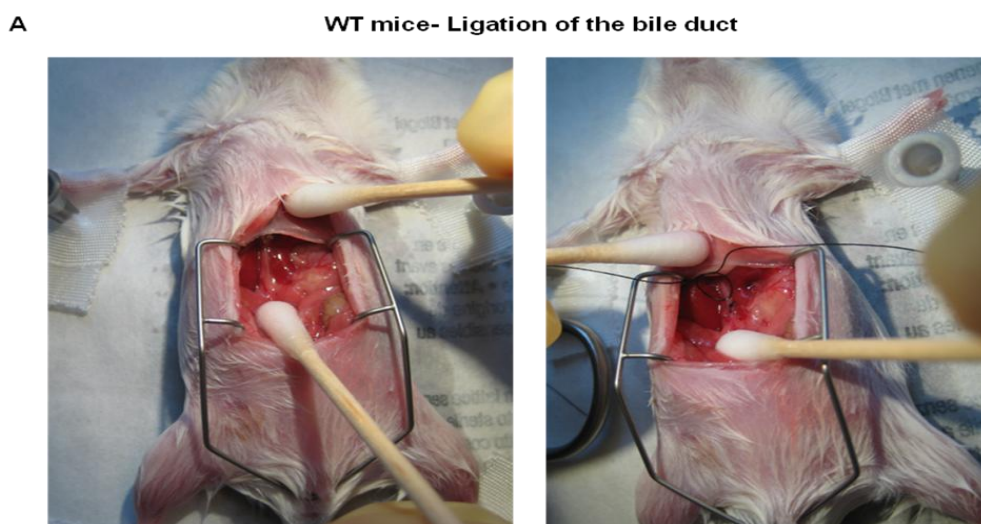


Fig. 4. (A) Operatia chirurgicala de stabilirea a leziunilor hepatice prin legarea ductului biliar.

Anomaliile morfologice hepatice au fost examinate la șoareci a căror bilă conducte au fost ireversibil legated timp de 14 zile (Fig. 4B).

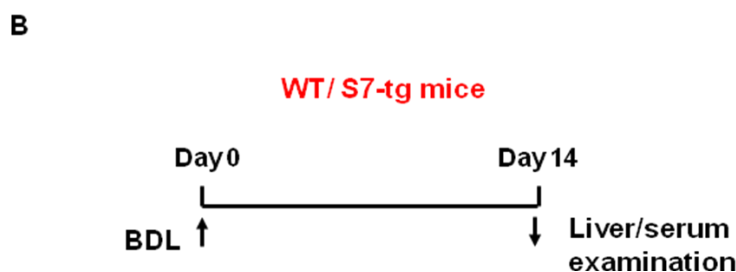


Fig. 4. (B) Design-ul experimental.

4.2 Detectia genei supraexprimate Smad7 in animalele control FVB/ N si trangenice SM22 α -Flag-Smad7 la 2 saptamani dupa legarea ductului biliar.

Nivelul de exprimare a genei Smad7 in animalele trangenice (expresie specifica pentru HSCs activate) a fost determinat utilizand tehnica PCR. Datele obtinute au evidentiat o expresie ridicata a ARNm pentru Smad7 in grupul de soareci control carora li s-a legat ductul biliar pentru 2 saptamani, comparativ grupului trangenice SM22 α -Flag Smad7. Deasemenea in soarecii FVB/N s-au evidentiat diferente majore privind activarea caii de semnalizare TGF- β . Expresia genelor pro-fibrotice Smad7, Col1 α 2 si α -SMA a fost ridicata semnificativ in grupul FVB/N in urma BDL. Expresia indicatorilor fibrotici de mai sus a fost redusa semnificativ in grupul SM22 α -Flag Smad7 care a fost expus legarii ductului biliar (**Fig.5**).

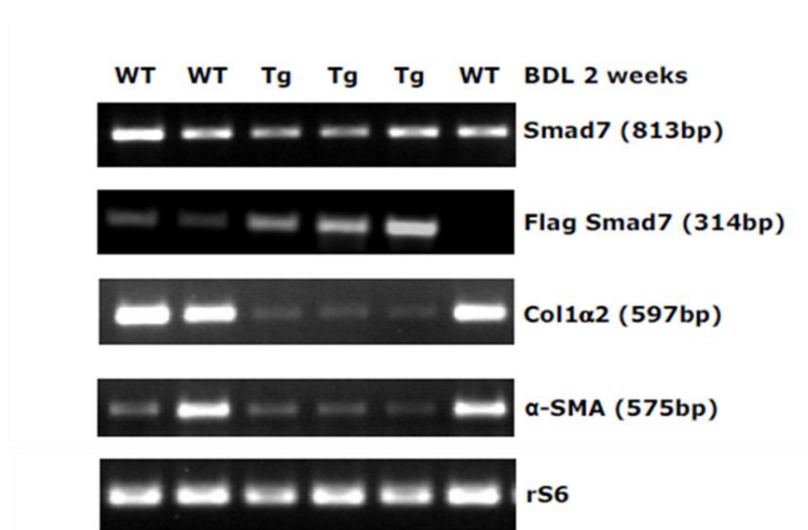


Fig. 5. Analiza PCR pentru detectia expresiei genelor Flag Smad7, Smad7, col1 α 2, și α -SMA în țesuturile hepatice colectate de la soareci in urma operatiei de BDL.

4.3 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs determina scaderea valorilor crescute ale enzimelor hepatice la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.

La sfarsitul perioadei de 2 saptamani au fost colectate 500 μ l de sange de fiecare soarece pentru analiza nivelurilor enzimelor hepatice. S-au analizat modificarile in concentratia sanguina a urmatoarelor enzime hepatice: ALT, AST, AP precum si nivelurile de bilirubina totala. S-a demonstrat ca nivelurile enzimelor hepatice sunt crescute direct proportional cu stadiul fibrozei hepatice in pacienti. Analiza serologica a arătat că valorile ALT au fost crescute in grupul FVB/N expus la BDL (570 ± 6.7 U / L) comparativ cu soarecii transgenici expusi la BDL (220 ± 3.7 U / L) care au prezentat valori apropiate de nivelurile enzimatic normale ($p < 0,05$) (**Fig. 6A**). In mod similar nivelurile de ALT masurate in plasma soarecilor transgenici au fost reduse comparativ cu valorile inregistrate in plasma grupului FVB/N expus la BDL (620 ± 6.1 U / L vs 200 ± 2.5 U / L) ($p < 0,05$) (**Fig. 6B**). Nivelurile de fosfataza alcalina măsurate, au fost in jurul valorii de 2400 ± 9.8 U / L in grupul FVB/N expus la BDL tratament. In urma supraexprimarii Smad7 in grupul de animale transgenice expuse la BDL, s-a constatat o reducere in AP de pana la 181.5 ± 11.5 (U / L) (**Fig 6C**). Analiza nivelurilor de bilirubină totală a demonstrat o creștere majora in grupul FVB/N expus la BDL (adică 10 mg / dl), care a fost inhibata in animalele SM22 α -Flag Smad7 expuse aceluiasi tratament (0.510 mg / dl) ($p < 0,05$) (**Fig 6D**).

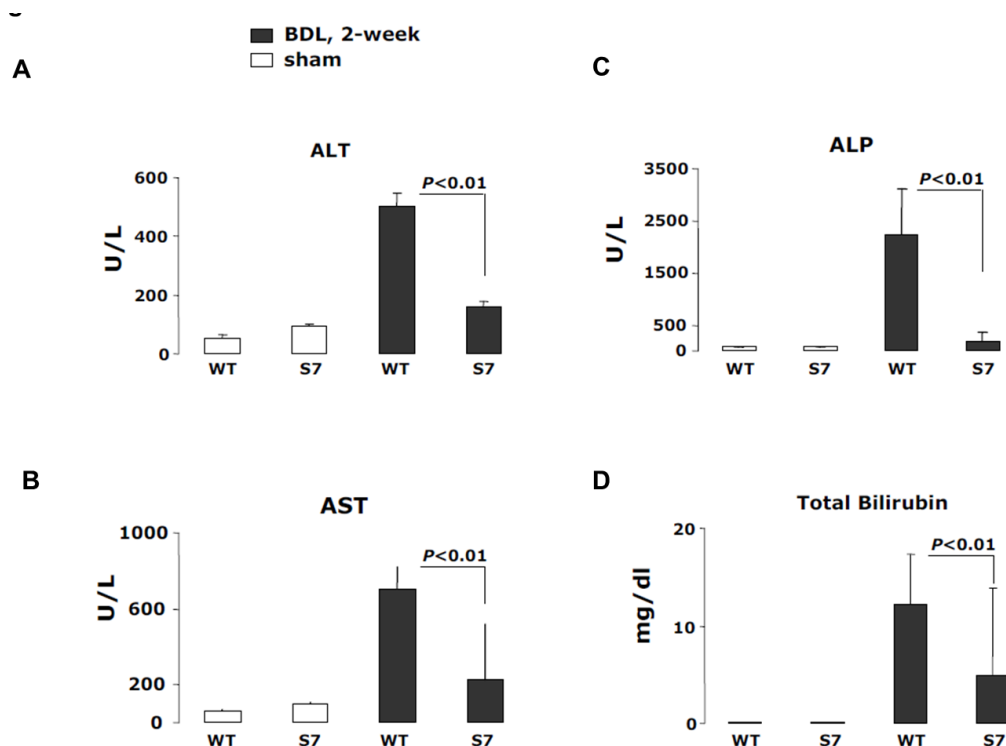


Fig. 6. Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce valorile ridicate ale enzimelor hepatice la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar. Markerii utilizati pentru masurarea funcției hepatice in plasma, (A) ALT, (B) AST, (C) ALP, și (D) bilirubina totala. Concentrațiile serice au fost măsurate la 400 nm utilizand kitul VITROS; n, numărul de animale investigate în trei măsurători consecutive (n = 4).

4.4 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce depunerile hepatice de colagen la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.

Ca prin pas în înțelegerea modificărilor morfologice induse de BDL am analizat depunerea fibrelor de colagen în țesutul hepatic din grupurile FVB/N și SM22 α -Flag Smad7. Colorarea cu Picro sirius roșu a demonstrat prezența fibrozei perisinusoidale, periportale, și peribiliara, ca rezultat al formării de septe fibrotice în grupul FVB/N expus la BDL comparativ cu grupul placebo operat (**Fig. 7A**). Analiza cantitativă a conținutului de colagen în secțiunile de la ficat la șoarecii SM22 α -Flag-Smad7 Tg a demonstrat rezoluția parțială a septelor fibrotice. Cu toate acestea, depunerea de ECM a rămas observată într-o mică măsură în zona periportală și peribiliara (**Fig. 7B**). Nu s-a observat nici o diferență în expresia de colagen între grupurile placebo de șoareci FVB/N și SM22 α -Flag-Smad7.

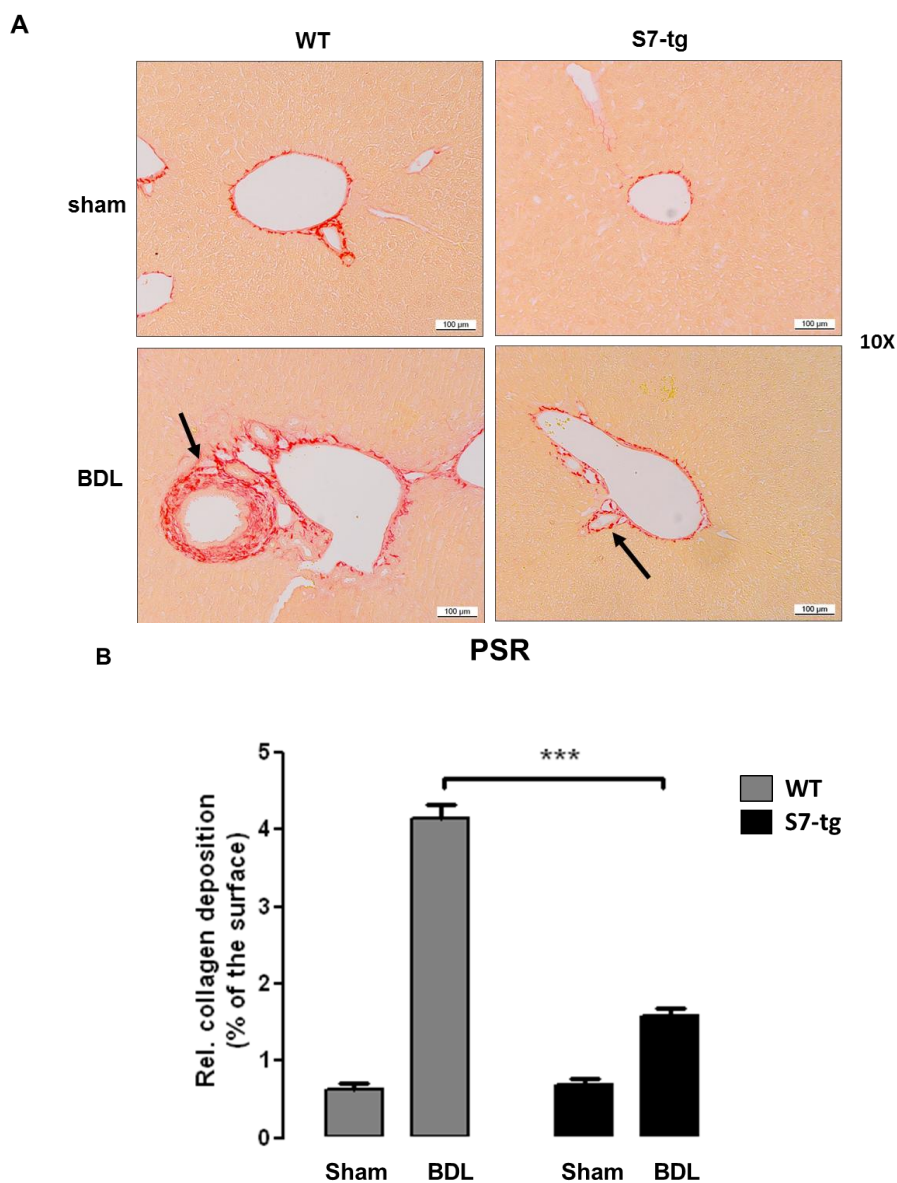


Fig. 7.(A) Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce depunerile hepatice de colagen la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar. Tehnica de colorare cu Picro Sirius roșu a fost efectuată în scopul determinării

depunerilor de colagen; (mărire x 15). **(B)** Pentru cuantificarea morfometrică a depunerilor de colagen in tesutul hepatic (n = 4/ grup) a fost utilizat programul LEICA QWIN (Germania).

4.5 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs determină scăderea sintezei de α -SMA la șoarecii transgenici cărora li s-a legat ductul biliar.

Celulele miofibroblaste sunt caracterizate de expresia ridicată a α -SMA, principalul component al matricei extracelulare. Nivelurile de α -SMA au fost demonstrate a fi crescute indirect proporțional cu afectarea hepatică. Pentru a delinea efectul supraexprimării protei Smad7 asupra sintezei de α -SMA secțiunile de țesut hepatic aparținând grupurilor FVB/N și SM22 α -Flag-Smad7 au fost supuse analizei histochimice. Numărul celulelor pozitive pentru α -SMA, au fost semnificativ scăzut în șoarecii SM22 α -Flag-Smad7 expusi la BDL comparativ cu grupul control FVB/N la 2 săptămâni după BDL (**Fig.8A**). În concluzie, analiza morfometrică a demonstrat că reducerea sintezei de α -SMA este atribuită inhibării activării HSCs, ca urmare a supraexprimării Smad7 (**Fig.8B**).

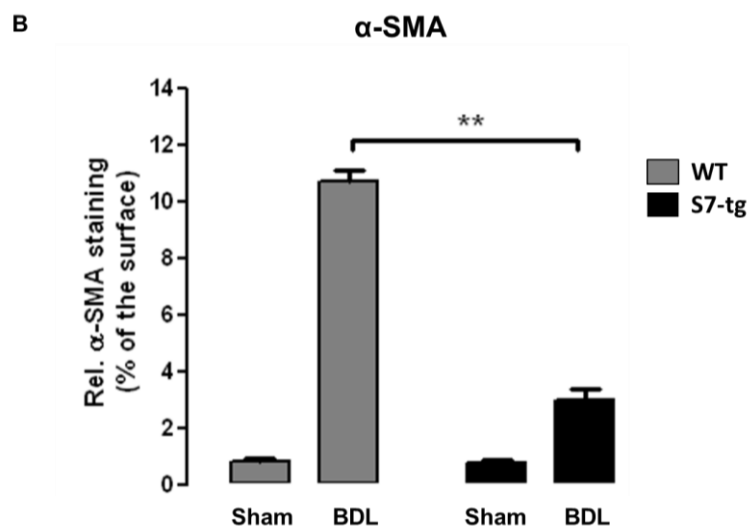
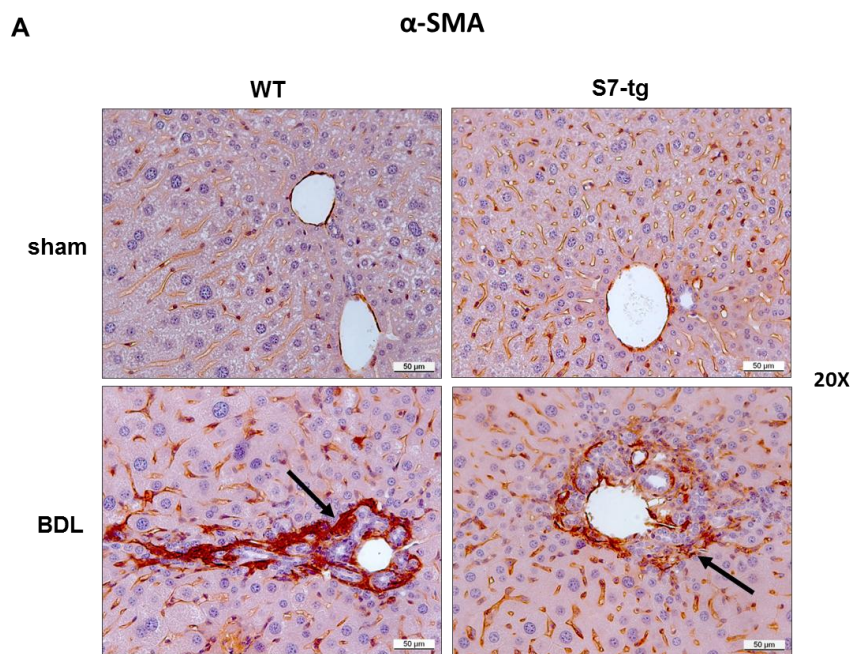


Fig. 8. Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs determina scăderea sintezei de α -SMA la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar. (A) colorare imunohistochimică pentru α -SMA ca un marker pentru HSCs activate. (B) Pentru cuantificarea morfometrică de colorare imunohistochimică a α -SMA zece domenii au fost selectate aleator din fiecare secțiune a diferitelor grupuri (n = 4 / grup) a fost folosit programul LEICA QWIN (Germania).

4.6 Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce procesul inflamator la șoarecii transgenici carora li s-a legat ductul biliar.

Majoritatea celulelor inflamatoare care se acumulează și populează ficatul în bolile hepatice sunt reprezentate de macrofage care pot fi colorate imunohistochimic cu ajutorul anticorpilor față de markerul CD68. Analiza țesutului hepatic a arătat infiltrarea celulelor pozitive pentru CD68 în grupul FVB/N expus la BDL comparativ cu grupul operat placebo. Concomitent cu scăderea expresiei de α -SMA în grupul animalelor transgenice expuse la BDL, s-a observat și o reducere a infiltratelor inflamatoare în șoarecii transgenici Smad7, după 2 săptămâni de BDL (**Fig.9A**). Analiza morfometrică confirmă faptul că supraexprimarea Smad7 HSCs inhibă procesul hepatic inflamator indus de BDL (**Fig.9B**).

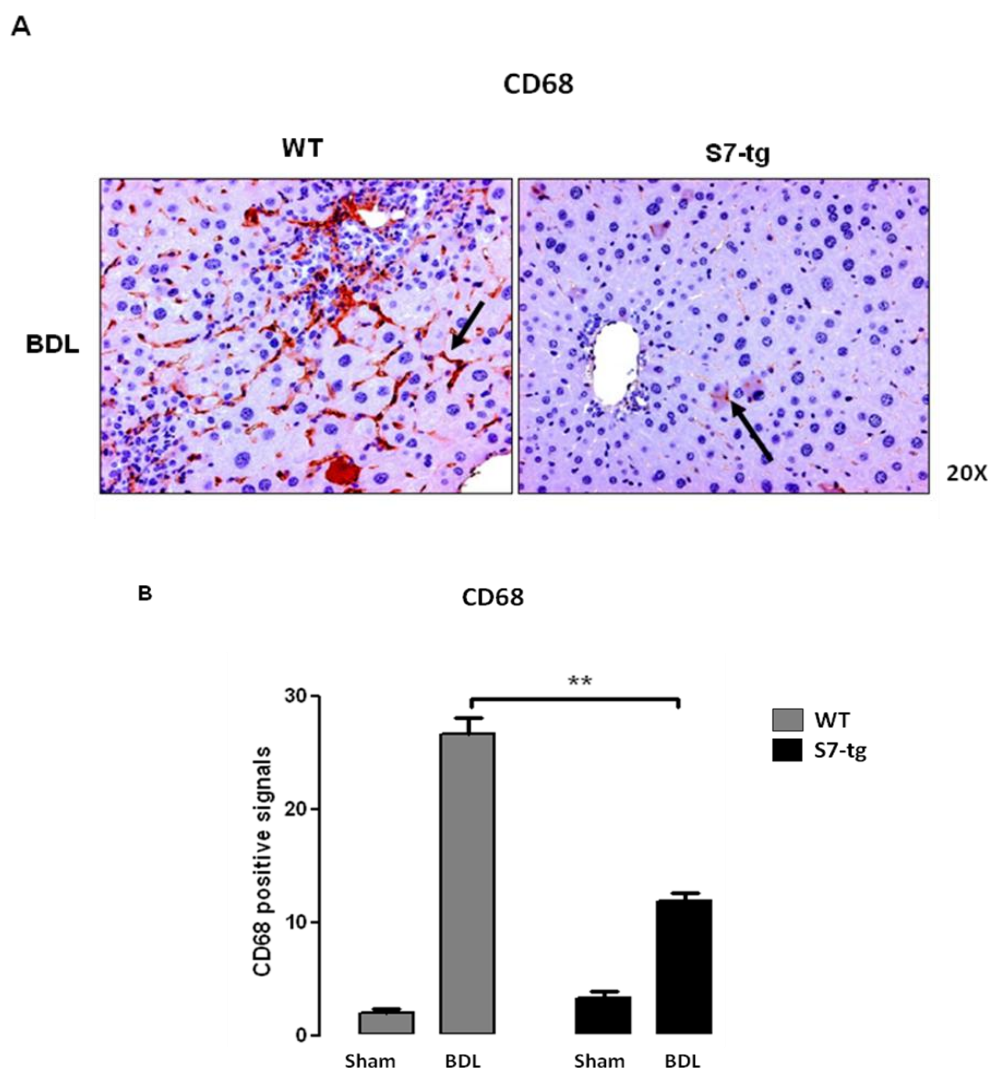


Fig. 9. Supraexprimarea genei Smad7 în HSCs reduce procesul inflamator la șoarecii transgenici cărora li s-a legat ductul biliar. **(A)** colorare imunohistochimică pentru CD68 ca marker pentru macrofagele activate. **(B)** Pentru cuantificarea morfometrică a CD68 au fost selectate aleator 10 campuri vizuale din 5 secțiuni pentru fiecare animal (n = 4 / grup).

4.7 Efectele moleculare dependente de supraexprimarea Smad7 in HSCs

Pentru a intelege in detaliu efectele moleculare ale supraexprimării Smad7 in celulele hepatice stelate am utilizat tehnica microarray. HSCs au fost infectate cu AdSmad7 sau AdLacZ (control) iar lizatele celulare au fost colectate la 3 si 7 zile de la punerea in cultura. Pe baza proceselor biologice in care sunt implicate, genele a caror expresie a fost afectata de supraexprimarea Smad7, au fost grupate in asa numitele grupuri GO. Supraexprimarea genei Smad7 afecteaza o mare varietate de procese biologice cum ar fi semnalizarea si diferentierea celulara, procesele de dezvoltare sau procesele metabolice. Pentru validarea datelor microarray prin qPCR, am selectat 12 gene a caror exprimare a fost semnificativ afectata de Smad7.

Expresia ARNm pentru receptorul 1 TGF- β nu a fost modificata în timpul transdiferentierii HSCs in miofibroblaste. Analiza qPCR in celulele infectate cu AdSmad7 a confirmat expresia ridicata a genelor Cyp4B1, BMP2, SGIII, Zfp423, Pla2g2a și reducerea in expresie a genelor EST189231, Olr1 ID1 aceste modificari fiind independente de timpul in care HSCs au fost cultivate. Expresia genei HK2 a fost redusa in HSCs infectate cu Smad7 si cultivate pentru 3 zile, in contrast cu expresia ridicata a aceleiasi gene la 7 zile in cultura (**Fig.10A, B**).

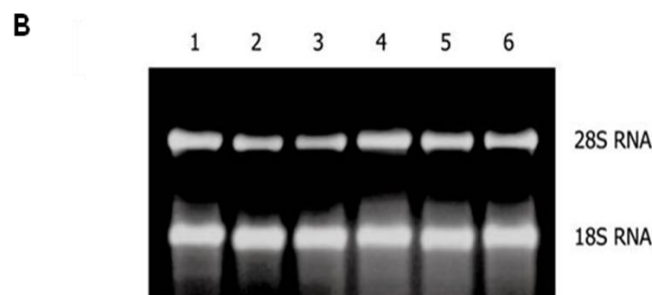
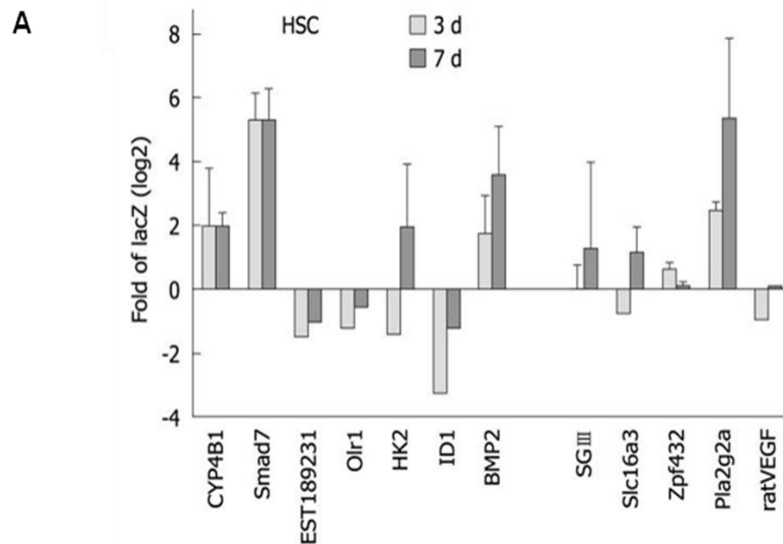


Fig. 10. Validarea rezultatelor microarray folosind analiza PCR cuantitativa. **(A):** Analiza SYBR Green PCR a fost utilizata pentru a compara nivelurile de exprimare a ARNm in 12 gene selectate, si care au fost infectate, fie cu AdLacZ sau AdSmad7. Rezultatele sunt prezentate ca nivel de exprimare relativa in log2. HSCs cultivate pentru 3 zile (coloanele gri deschis) sau 7 zile (coloanele gri închis) după infecția adenovirală. Valorile obtinute sunt o medie a trei măsurători efectuate în duplicat **(B):** puritatea și integritatea ARN-ului total a fost verificată prin electroforeză pe gel de agaroză/formaldehidă. Linia 1: LacZ, 7 d, Linia 2: LacZ, 3 d; Linia 3: Smad7, 7 d, Linia 4: Smad 7, 3 d; Linia 5: celule control netratate, 7 d, Linia 6: celule control netratate, 3 d .

Gena pentru HK2 controleaza expresia enzimei hexokinaza 2, cunoscuta ca una din enzimele principale implicate in procesul de glicoliza si procesul de diviziune celulara. Potrivit rezultatelor analizei microarray si qPCR, expresia HK2 este redusa semnificativ in urma supraexprimarii Smad7. In general, TGF- β are efecte inhibitoare asupra proliferarii HSCs comparativ cu efectele stimulative observate in miofibroblaste. Expresia HK2 ar putea fi indusa de TGF- β in timpul activarii HSCs, stimulând, ulterior, proliferarea si transdiferentierea HSCs in miofibroblaste. Celulele hepatice stelate au nevoie de energie suplimentara in cursul procesului de transdiferentiere si astfel TGF- β actioneaza prin inducerea procesului de glicoliza prin intermediul HK2. Aceste rezultate indică o legătură directă între procesul de fibroza modulată de TGF- β și nivelul ridicat de glicoliza hepatica **(Fig.11).**

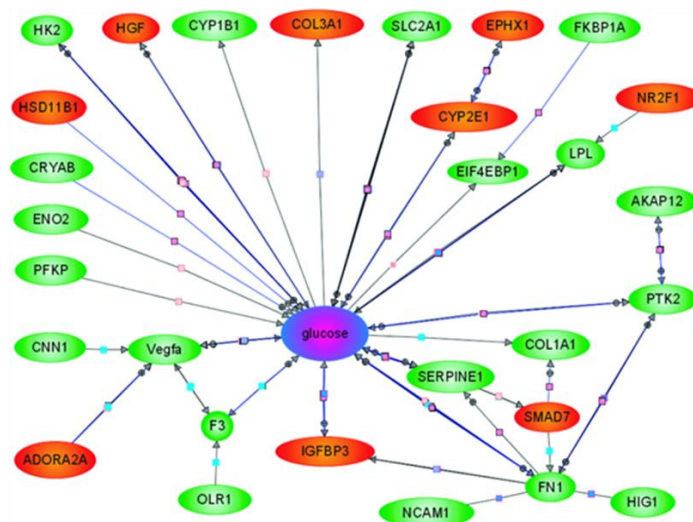


Fig. 11 Interacțiunea biologică între procesul de glicoliza hepatică și genele a căror expresie este regulată de supraexprimarea Smad7 în HSCs. Gene a căror expresie a fost indusă de Smad7 (culoare roșie); Gene a căror expresie a fost suprimată de Smad7 (culoare verde). Datele au fost analizate utilizând programul Arhitect Pathway (Stratagene).

5. Discuții

Celulele miofibroblaste hepatice sunt considerate o tinta principala in terapia anti-fibrotica. În ficatul fibrotic, celulele hepatice stelate (HSCs) activate contribuie in proportie de 80% la productia de colagen [1]. Desi HSCs sunt considerate ca o sursa majora de miofibroblaste, nu sunt unica sursa de celule producatoare de colagen in ficatul fibrotic [1]. Recent au fost publicate studii demonstrand participarea hepatocitelor in procesul de fibrogeneza [4]. Activarea caili de semnalizare prin TGF- β este recunoscuta ca o forta majora in generarea si sustinerea procesului fibrotic. Strategiile de blocare ale acestei caili de semnalizare au fost folosite cu succes in tratarea sau rezolutia partiala a procesului fibrotic in diferite modele experimentale [3]. Smad7 este un inhibitor al superfamiliei de citokine TGF- β , iar studiile recente au demonstrat ca Smad7 joaca un rol important in modularea activitatii acestei caili de semnalizare atat in pacienti cat și experimental. Doua abordări recente au utilizat infectia adenovirala cu Smad7 ca si cale de inhibare a caili de semnalizare TGF- β , cu scopul evidentierii rezolutiei fibrozei pulmonare experimentale la soarecii indusa de tratamentul cu bleomicina [9]. AdSmad7 administrat intratraheal la soarecii tratati cu beomicina a redus fosforilarea Smad2, ARNm pentru colagen I, si conținutul de hidroxiprolină. Aceste rezultate sugereaza faptul ca Smad7 ar avea un potential crescut de a trata fibroza pulmonara.

Rezultatele noastre indică faptul că HSCs au rămas într-o fază statică datorata supraexprimării Smad7 confirmand astfel rolul important al TGF- β în faza initiala de activare a HSCs. Soarecii transgenici SM22 α -Flag-Smad7 in care gena pentru Smad7 este sub controlul promotorului SM22 α au fost generati pentru a demonstra ideea de mai sus. Supraexprimarea Smad7 a fost indusă de activarea HSCs datorata ligării ductului biliar la soareci. Fibroza hepatica experimentală a fost prin urmare rezultatul procesului de colestaza. Ca si control au fost utilizati soarecii FVB/N. Canalului biliar comun a fost legat de două ori sau doar atins in grupul control iar animalele au fost lasate sa se recupereze. 2 saptamani de la declansarea colestazei animalele au fost sacrificate si tesaturile colectate pentru determinarile enzimatice si histologice.

Datele prezentate demonstreaza o expresie ridicata a ARNm pentru Smad7 in grupul de soarecii control carora li s-a legat ductul biliar, comparativ grupului transgenic SM22 α -Flag Smad7. Deasemenea in soarecii FVB/N s-au evidentiat diferente majore privind activarea caili de semnalizare TGF- β . Expresia genelor pro-fibrotice Smad7, Coll α 2 si α -SMA a fost semnificativ crescuta in grupul FVB/N datorata BDL. Expresia indicatorilor fibrotici de mai sus a fost redusa semnificativ în grupul SM22 α -Flag Smad7 expus legării ductului biliar. Nivelurile enzimelor hepatice a fost demonstrat a fi crescute direct proportional cu stadiul fibrozei hepatice in pacienti [13]. Cum era de așteptat in conditiile experimentale prezente, concentrațiile serice ale AST, ALT, bilirubina totală și fosfataza alcalina au fost reduse semnificativ în soarecii transgenici SM22 α -Flag-Smad7 expusi la BDL comparativ cu grupul operat FVB/N. Acest rezultat poate fi explicat prin proprietatile antifibrotice ale Smad7 datorate inhibării caili de semnalizare TGF- β in HSCs.

Colagenul produs de HSCs activate este unul din componentele principale ale matricei extracelulare in ficatul fibrotic [10]. Colorarea cu Picro sirius roșu a demonstrat prezenta fibrozei perisinusoidale, periportale, și peribiliara, rezultând în formarea de septe fibrotice in grupul FVB/N expus la BDL comparativ cu grupul placebo operat. Analiza cantitativă a conținutului de colagen în secțiunile de la ficat la soareci SM22 α -Flag-Smad7 Tg a demonstrat rezolutia partiala a septelor fibrotice. Celulele miofibroblaste sunt caracterizate de expresia ridicata a α -SMA, principalul component al matricei extracelulare. Nivelurile de α -SMA au fost demonstrate a fi crescute indirect proportional cu afectarea hepatica [5]. In experimentul prezent numarul celulelor pozitive pentru α -SMA, au fost semnificativ redus in soarecii SM22 α -Flag-Smad7 expusi la BDL comparativ cu grupul control FVB/N, ceea ce a demonstrat faptul ca reducerea sintezei de α -SMA este atribuită inhibării activării HSCs, ca urmare a supraexprimării Smad7.

În cele din urmă, am examinat rata inflamatoare, care însoțește de obicei, fibroza hepatica, în functie de exprimarea specifica a Smad7 in HSCs. Analiza tesutului hepatic a aratat infiltrarea celulelor pozitive pentru CD68 in grupul FVB/N expus la BDL comparativ cu grupul operat placebo. Concomitent cu scaderea expresiei de α -SMA in grupul animalelor transgenice expuse la BDL, s-a observat si o reducere a infiltratelor inflamatoare în soarecii transgenici Smad7, dupa 2 săptămâni de BDL. În mod similar, supraexprimarea Smad7 în rinichi a inhibat procesul de inflamație si fibroza renală [6].

Pentru a intelege in detaliu efectele moleculare ale supraexprimării Smad7 in celulele hepatice stelate am utilizat tehnica microarray. Modificarile in expresia genica ca urmare a supraexprimării Smad7 in HSCs ar putea fi considerate puncte de plecare cu potențial de a caracteriza in detaliu procesul de fibrogeneza hepatica. Supraexprimarea genei Smad7 afecteaza o mare varietate de procese biologice cum ar fi semnalizarea si diferentierea celulara, procesele de dezvoltare sau procesele metabolice.

Gena pentru HK2 controleaza expresia enzime hexokinaza 2, cunoscuta ca una din enzimele principale implicate in procesul de glicoliza si procesul de diviziune celulara [11]. Potrivit rezultatelor analizei microarray si qPCR, expresia HK2 este redusa semnificativ in urma supraexprimării Smad7. In general, TGF- β demonstreaza efecte inhibitoare asupra proliferării HSCs comparativ cu efectele stimulative observate in miofibroblaste. Expresia HK2 ar putea fi indusa de TGF- β in timpul activării HSCs, stimulând, ulterior, proliferarea si transdiferentierea HSCs in miofibroblaste.

Efectele fiziologice ale metabolismului glucozei în ficat sunt atribuite în mod tradițional hepatocitelor care in timpul procesului de fibroza actioneaza prin activarea procesului de hiperglicemie si rezistenta la insulina [14]. Cu toate acestea se poate specula ca in timpul procesului de fibrogeneza, HSCs activate au nevoie de energie suplimentara pentru a prolifera si astfel glicoliza este stimulata in aceste celule prin activarea cailor de semnalizare TGF- β .

Aceste rezultate indică o legătură directă între procesul de fibroza modulată de TGF- β și nivelul ridicat de glicoliza in HSCs activate.

6. Concluzii

In concluzie datele prezentate subliniază importanța căii de semnalizare TGF- β în dezvoltarea fibrozei hepatice, datorată activării în HSCs. Mai mult decât atât, blocarea căii de semnalizare prin TGF- β datorată supraexprimării Smad7 în celulele hepatice stelate este suficientă pentru a obține un rezultat benefic. Datele in vivo evidențiază că supraexprimarea genei Smad7 inhibă transdiferențierea HSCs în miofibroblaste și atenuează gradul de fibroză sugerând posibilitatea dezvoltării unui tratament antifibrotic de care pacienții pot beneficia.

7. Cuvinte cheie

TGF- β , Smad7, fibroză, colestață, ficat

8. Bibliografie selectivă

1. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209–218
2. De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132:1937–1946
3. Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM (2001b) Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 283:554–562
4. Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Dijke ten P, Gressner AM (2003) Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 125:178–191
5. Dooley S, Hamzavi J, Ciuculan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR (2008) Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF- β -mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 135:642–659
6. Dooley S, Weng H, Mertens PR (2009) Hypotheses on the role of transforming growth factor- β in the onset and progression of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 27:93–101
7. Friedman SL (2010) Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:425–436
8. Iredale JP (2007) Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Investig* 117:539–548
9. Iyer S, Wang ZG, Akhtari M, Zhao W, Seth P (2005) Targeting TGF β signaling for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 4:261–266
10. George J, Roulot D, Kotliansky VE, Bissell DM (1999) In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor β type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12719–12724
11. Giannelli G, Mazzocca A, Fransvea E, Lahn M, Antonaci S (2011) Inhibiting TGF- β signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1815:214–223
12. Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG (2003) Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- β (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 278:11721–11728

13. Michalopoulos GK (2011) Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 43:173–179
14. Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2007;132:2191–2207.
15. Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, Tsuruta S, Fukushima M, Iwao M, Sonta T, Kotoh K, Inoguchi T, Nakamuta M. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase. *Liver Int*. 2005;25:1018–1026.
16. Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K (2002) Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 35:49–61
17. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA (2010) Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51:1027–1036
18. Wynn TA (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:583–594
19. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol*. 2003;4:R2

9. Multumiri

Multumesc Prof. Dr. Constantin Craciun, Conf. Dr. Corina Rosioru si Prof. Dr. Steven Dooley pentru sustinerea profesionala si intelegerea acordata in timpul studiilor doctorale. Multumesc parintilor si prietenilor pentru sprijinul si dragostea oferita de-a lungul anilor.