

Reducerea disfuncției renale prin modularea farmacologică a mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor în diabetul experimental

Diabetul este o maladie care afectează ~9,3% din populația adultă la nivel mondial. Această boală metabolică complexă reprezintă un factor de risc major pentru dezvoltarea anumitor afecțiuni micro- și macrovasculare care scad calitatea vieții și cresc riscul evenimentelor cardiovasculare majore. Conform statisticilor, aproximativ 48% din totalul pacienților diabetici au vârsta mai mică de 70 de ani. Diabetul este clasificat în diabet de tip 1 sau insulino-dependent caracterizat prin producția insuficientă de insulină, care poate apărea încă din copilărie și diabet de tip 2, sau non-insulino dependent datorat modului ineficient al celulelor de a utiliza insulină, acesta reprezintă 95% din cazurile de diabet globale și apare, în general, la adulți. Diabetul gestational, poate apărea în timpul sarcinii și este caracterizat prin valori hiperglicemice, peste normal dar sub valorile patologiei diagnosticabile. Una dintre complicațiile cronice ale diabetului este **nefropatia diabetică**, care se caracterizează prin alterarea funcției renale, conducând, în fazele avansate ale bolii la dializă sau transplant renal. Pacienții cu nefropatie diabetică au un risc crescut de a dezvolta boli cardiovasculare și un risc major de deces. [1]

Principalele caracteristici ale **nefropatiei diabetice** sunt micro-/macro-albuminuria, proteinuria, îngroșarea membranei bazale glomerulare, hipertrofia podocitelor, hiperplazia și hipertrofia celulelor mezangiale, infiltrarea celulelor sistemului imunitar și creșterea nivelului de specii reactive de oxigen. Răspunsul inflamator este menținut la un nivel crescut prin activarea unor factori de transcriere pro-inflamatori, cum ar fi factorul nuclear kappa β (NF- κ B), factorul de transcripție AP-1, C/EBP, și STAT1 care determină creșterea stresului oxidativ [2].

Modificările epigenetice determină creșterea expresiei de molecule care au un rol important în patofiziologia complicațiilor vasculare asociate diabetului zaharat, cum ar fi complexul NADPH oxidaza, mediatori pro-inflamatori (citokine, chemokine) și pro-fibrotici (elemente

de matrice extracelulara, factori de creștere), agenți vasoactivi (endotelina-1), metaloproteinaza matriceală 9, moleculele de adeziune celulară vasculară (VCAM-1), molecule intracelulare de adeziune-1 (ICAM-1), E-selectina (E-sel). Așadar, este foarte important să fie investigate noi mecanisme moleculare pentru a avea la dispoziție alte abordări terapeutice în tratarea nefropatiei diabetice.

În această lucrare au fost investigate rolurile mecanismelor epigenetice implicate în acetilarea histonelor nucleozomale în instalarea stresului oxidativ, a inflamației și a fibrozei renale în diabetul experimental în vederea dezvoltării de noi terapii pentru tratamentul bolii renale diabetice.

Ipoteza acestei lucrări constă în faptul că hiperglicemia induce dezechilibrul mecanismelor epigenetice dependente de acetilarea histonelor, o condiție patologică care determină o creștere a nivelurilor de exprimare specifice unor sisteme enzimatic implicate în producția de specii reactive de oxigen și a unor mediatori pro-inflamatori și pro-fibrotici la nivel renal.

Obiectivele acestei teze au fost:

Obiectivul 1. Investigarea rolului căilor de semnalizare dependente de histon acetiltransferaza p300/CBP în instalarea stresului oxidativ, inflamației și fibrozei renale în diabetul experimental.

Obiectiv 2. Dezvoltarea unei strategii farmacologice inovatoare bazată pe triterpene pentru reducerea disfuncției renale în diabetul experimental.

Obiectivul 3. Dezvoltarea unei metode de detecție a speciilor reactive de oxigen în ateroscleroza experimentală prin imagistică moleculară de înaltă rezoluție în domeniul spectral infraroșu apropiat utilizând lipozomi funcționalizați

Prima parte a tezei, intitulată stadiul actual al cunoașterii bolilor rinichiului diabetic, oferă informații cu privire la mecanismele patologice care stau la baza instalării bolii renale diabetice sau nefropatiei diabetice.

În capitolul II, sunt prezentate contribuțiile științifice originale care vizează implicarea histon-acetiltransferazei p300/CBP în patologia nefropatiei diabetice punându-se un

accent deosebit pe sistemul enzimatic ce produce NADPH oxidaze (surse vasculare generatoare de specii reactive de oxigen și stres oxidativ) și pe moleculele pro-inflamatorii și pro-fibrotice. De asemenea au fost investigate potențialele efecte terapeutice ale acidului ursolic și a unui complex bioactiv standardizat format din Acid ursolic (90.7%) și Acid oleanolic (5.8%) în modularea unor procese patofiziologice asociate disfuncției renale în diabetul experimental. Producția crescută de specii reactive de oxigen și creșterea stresului oxidativ reprezintă o caracteristică a bolilor cardiovasculare. În acest context, au fost realizate studii care stau la baza dezvoltării unei metode inovatoare pentru derminarea producției de specii reactive de oxigen *in vivo* pe modele animale cu ateroscleroză utilizând lipozomi funcționalizați pentru încapsularea unui compus redox sensibil, ROS Brite™ 700, care prin oxidarea sa emite un semnal fluorescent specific în domeniul spectral infraroșu apropiat.

Concluzii

- **I. Analiza rolului căilor de semnalizare dependente de histon acetiltransferaza p300/CBP în instalarea stresului oxidativ, a inflamației și a fibrozei renale a șoarecilor diabetici în diabetul experimental.**

În concluzie, în rinichii diabetici, activarea histon acetiltransferazei p300 / CBP duce la creșterea producției de ROS (cel mai probabil generate de proteinele Nox), a inflamației și a producției de proteine ale matricei extracelulare. Pe baza faptului că p300 / CBP este un important activator co-transcripțional care reglează expresia unei game largi de gene pro-oxidante, pro-inflamatorii și pro-fibrotice, putem afirma că modularea farmacologică a p300 / CBP ar putea deveni o tentantă opțiune terapeutică în nefropatia diabetică.

- **II. Conceperea unei strategii farmacologice inovatoare bazată pe triterpene pentru reducerea disfuncției renale in diabetul experimental.**

Probele de extract de *Salvia officinalis* obținute au un conținut ridicat de acizi triterpenici, majoritar acid ursolic.

La concentrații de 1-10 μM , acizii triterpenici, anume ursolic, oleanolic, betulinic și complexul bioactiv standardizat format din acizii triterpenici AU

(90.7%) și AO (5.8%) determină reducerea nivelelor de exprimare ARNm specifice unor molecule pro-oxidante și pro-inflamatorii cu rol important în patofiziologia complicațiilor cardiovasculare asociate diabetului zaharat.

Tratamentul șoarecilor diabetici cu acid ursolic sau complexul bioactiv standardizat format din AU (90.7%) și AO (5.8%) a determinat scăderi semnificative ale hipertrofiei glomerulare și a nivelelor de exprimare genică sau proteică specifice unor molecule (de stres oxidativ, inflamație și fibroză) cu rol important în patofiziologia nefropatiei diabetice.

Acidul ursolic (UA) determină reducerea nivelelor de exprimare genică specifice unor molecule asociate fenotipului pro-inflamator (M1) al macrofagelor în cultură.

- **III. Detectarea speciilor reactive de oxigen vasculare produse *in vivo* în ateroscleroza experimentală prin imagistică cu spectrul de emisie în domeniul infraroșu apropiat de înaltă rezoluție utilizând lipozomi funcționalizați.**

Datele obținute indică faptul că încapsularea RB700 în Lp stabilizați steric ce țintesc endoteliul ar putea deveni o metodă fiabilă pentru a cuantifica și vizualiza direct locurile de formare a ROS în sistemul vascular și organe la modelele animale . Această metodă ar putea fi aplicată nu numai în ateroscleroza experimentală, ci și pentru cancer, diabet, obezitate și boli neurodegenerative, deoarece toate aceste boli sunt caracterizate de formarea crescută a ROS. Mai mult, această nouă configurație pentru detectarea moleculară a ROS bazată pe RB700-Lp ce vizează endoteliul activat este de o importanță deosebită pentru a sublinia intensitatea și mecanismul (mecanismele) de producere a stresului oxidativ indus de factorii de risc asociați cu diferite patologii, precum și ceea ce privește dezvoltarea și testarea preclinică a noi medicamente și strategii terapeutice.

Rezultatele originale obținute în cadrul acestei teze demonstrează că:

1. Activarea căilor de semnalizare legate de histon acetiltransferaza p300/CBP mediază hipertrofia glomerulară și acumularea proteinelor matricei extracelulare în rinichii șoarecilor diabetici.
2. Inhibarea farmacologică a histonei acetiltransferazei p300/CBP reduce nivelul de acetilare al histonei 3 la restul de lizină 27 (H3K27ac) în rinichii șoarecilor diabetici comparativ cu animalele diabetice.
3. Histon acetiltransferaza p300/CBP mediază creșterea nivelurilor de exprimare genică și proteică specifice subunităților Nox1, Nox2 și Nox4 în rinichii șoarecilor diabetici.
4. Inhibarea farmacologică a histon acetiltransferazei p300/CBP reduce formarea de specii reactive de oxigen în rinichii șoarecilor diabetici.
5. Tratamentul șoarecilor diabetici cu C646, un inhibitor specific al p300/CBP, reduce semnificativ nivelurile proteice specifice subtipurilor Nox1 și Nox4 la nivel glomerular.
6. Inhibarea farmacologică a coactivatorului p300/CBP reduce semnificativ activitatea factorilor de transcriere NF-kB și STAT.
7. Activarea histon acetiltransferazei p300/CBP mediază creșterea nivelurilor genice ale unor mediatori pro-inflamatori (MCP-1, TNF α , NOS2, ICAM-1, VCAM-1, E-selectină) și pro-fibrotici (colagen IV, fibronectina, laminina).
8. Tratamentul șoarecilor diabetici cu acid ursolic sau cu complexul bioactiv standardizat format din acid ursolic (90.7%) și acid oleanolic (5.8%) determină scăderi semnificative ale hipertrofiei glomerulare și a nivelurilor de exprimare genică/proteică specifice unor molecule asociate stresului oxidativ, inflamației și fibrozei cu rol important în patofiziologia nefropatiei diabetice.
9. Acidul ursolic reduce nivelurile genice specifice subunităților catalitice Nox1, Nox2, Nox4 și Nox5 și a mediatorilor pro-inflamatori MCP-1, TNF α și NOS2 în Mac cu fenotip pro-inflamator (M1-Mac) și a moleculelor de adeziune ICAM-1, VCAM-1 și E-selectina.
10. Tratamentul șoarecilor diabetici cu acid ursolic sau cu complexul bioactiv standardizat obținut din frunze de *Salvia officinalis* ce conține acid ursolic (90.7%) și acid oleanolic (5.8%) determină o scădere semnificativă a expresiei

proteice a Nox1, Nox2 și Nox4, și a producției de specii reactive de oxigen la nivel glomerular, precum și formării produșilor precum 4-HNE și a expresiei de VCAM-1 la nivel glomerular în rinichii șoarecilor diabetici.

11. Lipozomii stabilizați steric și direcționați către molecula de adeziune pro-inflamatoare VCAM-1 reprezintă un sistem de transport eficient de concentrare a indicatorului redox RB700 la nivelul leziunilor aterosclerotice la șoareci ApoE^{-/-}.

Bibliografie

[1]. Saeedi Pouya, Inga Petersohn, Paraskevi Salpea, Belma Malanda, Suvi Karuranga, Nigel Unwin, Stephen Colagiuri, et al. "Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition." *Diabetes Research and Clinical Practice* 157 (2019): 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.

[2]. Vlad Mihaela-Loredana, Simona-Adriana Manea, Alexandra-Gela Lazar, Monica Raicu, Horia Muresian, Maya Simionescu, and Adrian Manea. "Histone Acetyltransferase-Dependent Pathways Mediate Upregulation of NADPH Oxidase 5 in Human Macrophages under Inflammatory Conditions: A Potential Mechanism of Reactive Oxygen Species Overproduction in Atherosclerosis." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (2019): 3201062. <https://doi.org/10.1155/2019/3201062>.