



**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**Școala de Studii Avansate a Academiei Române**  
**Institutul de Biologie și Patologie Celulară “N. Simionescu”**

## **REZUMAT**

**MECANISME CELULARE ȘI MOLECULARE IMPLICATE ÎN  
REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE ASOCIATĂ  
BOLILOR CARDIOVASCULARE**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:  
ACAD. ILEANA MÂNDUȚEANU**

**DOCTORAND:  
RĂZVAN DANIEL MACARIE**

**2023**

## CUPRINS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>11</b>
<b>II.</b>	<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>17</b>
1.	<b>ANATOMIA SISTEMULUI CARDIOVASCULAR ȘI A VALVEI AORTICE</b>	18
	1.1. <i>Anatomia arterelor mari .....</i>	20
	1.2. <i>Anatomia valvei aortice.....</i>	22
2.	<b>MATRICEA EXTRACELULARĂ</b>	26
	2.1. <i>Membrana bazală.....</i>	31
	2.1.1. <i>Colagenul de tip IV .....</i>	31
	2.1.2. <i>Lamininele.....</i>	32
	2.2. <i>Matricea extracelulară interstițială .....</i>	33
	2.2.1. <i>Colagenii .....</i>	33
	2.2.1.1. <i>Clasificarea colagenilor.....</i>	35
	2.2.2. <i>Proteoglicanii și glicozaminoglicanii.....</i>	41
	2.2.2.1. <i>Proteoglicanii .....</i>	41
	2.2.2.2. <i>Glicozaminoglicanii .....</i>	42
	2.2.3. <i>Elastina .....</i>	43
	2.2.4. <i>Receptori celulari pentru moleculele de MEC – integrinele .....</i>	45
3.	<b>REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE</b>	48
	3.1. <i>Metaloproteinazele matriceale.....</i>	48
	3.1.1. <i>Catepsinele .....</i>	54
	3.1.2. <i>Inhibitori ai MMP.....</i>	54
4.	<b>ATEROSCLEROZA</b>	57
	4.1. <i>Aspecte generale .....</i>	57
	4.2. <i>Etapetele aterosclerozei.....</i>	58
	4.2.1. <i>Inițierea aterosclerozei.....</i>	58
	4.2.2. <i>Progresia aterosclerozei.....</i>	60
	4.2.3. <i>Complicațiile aterosclerozei .....</i>	64
5.	<b>BOALA VALVEI AORTICE</b>	67
	5.1. <i>Aspecte generale .....</i>	67
	5.2. <i>Etapetele evoluției bolii.....</i>	68
	5.3. <i>Rolul și modificările MEC în BVA .....</i>	71
6.	<b>DIABETUL</b>	76
	6.1. <i>Aspecte generale .....</i>	76
	6.2. <i>Rolul diabetului în progresia bolilor cardiovasculare.....</i>	78
	6.2.1. <i>Inflamația în DZ.....</i>	78
	6.2.2. <i>Formarea de AGE.....</i>	79
	6.2.3. <i>Rolul PKC .....</i>	80
	6.2.4. <i>Hipertensiunea.....</i>	81
<b>III.</b>	<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE .....</b>	<b>82</b>

<b>1.</b>	<b>COMUNICAREA DINTRE CELULELE MUSCULARE NETEDE ȘI MACROFAGE ACCELEREAZĂ EVOLUȚIA PLĂCII ATEROSCLEROTICE CĂTRE PLACĂ VULNERABILĂ ȘI RUPEREA PLĂCII PRIN INDUCEREA MEDIATORILOR INFLAMATORI</b>	<b>83</b>
1.1.	<i>Introducere</i> .....	83
1.2.	<i>Materiale și metode</i> .....	85
1.2.1.	Culturi celulare.....	85
1.2.2.	Design experimental.....	85
1.2.3.	Array de proteine.....	86
1.2.4.	Izolarea ARN și qPCR.....	86
1.2.5.	ELISA.....	88
1.2.6.	Western Blot.....	88
1.2.7.	Analiza statistică.....	89
1.3.	<i>Rezultate și discuții</i> .....	90
1.3.1.	Interacția CMN-MØ induce secreția de mediatori inflamatori.....	90
1.3.2.	Modificări ale fenotipului celulelor musculare netede induse de interacția cu macrofage.....	92
1.3.2.1.	Interacția CMN-MØ reduce expresia de $\alpha$ -SMA, osteopontină și CD36 în CMN.....	92
1.3.2.2.	Interacția CMN-MØ crește expresia și secreția de IL-6 în CMN.....	93
1.3.2.3.	Interacția CMN-MØ crește expresia și secreția de CCL5 în CMN.....	94
1.3.3.	Căi de semnalizare implicate în interacția CMN-MØ.....	96
1.3.3.1.	Calea de semnalizare ERK1/2 este activată în CMN în urma interacției cu MØ.....	96
1.3.3.2.	Investigarea activării inflamazomului în CMN în urma interacției cu macrofagele.....	97
1.3.4.	Modificări moleculare induse în MØ după interacția cu CMN.....	98
1.3.4.1.	Interacția cu CMN crește expresia de MIP-1 $\beta$ în macrofage.....	98
1.3.5.	Căi de semnalizare activate în macrofage în urma interacției cu CMN.....	99
1.4.	<i>Concluzii</i> .....	101
<b>2.</b>	<b>DIABETUL ACCENTUEAZĂ REMODELAREA MATRICEI EXTRACELULARE INDUSĂ DE COMUNICAREA CELULELOR MUSCULARE NETEDE CU MACROFAGELE</b>	<b>102</b>
2.1.	<i>Introducere</i> .....	102
2.2.	<i>Materiale și metode</i> .....	104
2.2.1.	Culturi de celule.....	104
2.2.2.	Design experimental.....	105
2.2.3.	Western Blot.....	105
2.2.4.	Transfecția cu ARN mic de interferență.....	106
2.2.5.	Evaluarea asamblării colagenului mediată de CMN.....	106
2.3.	<i>Rezultate și discuții</i> .....	107
2.3.1.	ADAMTS1, MMP-1, MMP-3, MMP-9 și urokinaza sunt eliberate în mediul condiționat ca urmare a interacției dintre CMN-MØ.....	107
2.3.2.	Evaluarea expresiei MMP în interacția CMN cu MØ în condiții diabetice.....	109
2.3.3.	Expresia de MMP-1 și MMP-9 este reglată prin CCR2 și NF-kB în CMN interacționate cu macrofage în condiții de glucoză crescută.....	110
2.3.4.	PKC $\alpha$ reglează expresia MMP-1 și MMP-9 în CMN interacționate cu macrofage în condiții de glucoză crescută.....	112
2.3.5.	Evaluarea funcțională a capacității CMN de a forma fibre de colagen în condiții de glucoză crescută.....	113

2.4.	<i>Concluzii</i> .....	115
3.	<b>DIABETUL TIMPURIU INDUCE REMODELAREA MATRICEI ȘI MODIFICĂRI FUNCȚIONALE ÎN VALVA AORTICĂ ÎNTR-UN MODEL MURIN DE ATEROSCLEROZĂ ȘI ÎNTR-UN MODEL DE CULTURĂ CELULARĂ TRIDIMENSIONALĂ</b>	117
3.1.	<i>Introducere</i> .....	117
3.2.	<i>Materiale și metode</i> .....	120
3.2.1.	Model șoarece diabetic hiperlipemic ApoE <sup>-/-</sup> .....	120
3.2.2.	Colorații histochimice .....	121
3.2.3.	Măsurarea parametrilor plasmatici .....	122
3.2.4.	Imunofluorescență .....	123
3.2.5.	Cuantificarea semi-cantitativă a imaginilor de imunofluorescență .....	124
3.2.6.	Obținerea celulelor primare valvulare .....	124
3.2.7.	Model de Cultură Celulară Tridimensională .....	125
3.2.8.	qPCR .....	125
3.2.9.	Western Blot .....	126
3.2.10.	Analiza statistică .....	127
3.3.	<i>Rezultate și discuții</i> .....	128
3.3.1.	Șoarecii menținuți pe dietă hiperlipemică prezintă nivele crescute ale glicemiei, prezintă modificări ale țesutului conjunctiv și dezvoltă depozite lipidice la nivelul valvei aortice .....	128
3.3.2.	Hiperglicemia modifică fenotipul celulelor valvulare, inducând expresia markerilor de activare valvulari .....	132
3.3.3.	Expresia moleculelor țesutului conjunctiv valvular nu este modificată în valva aortică a șoarecilor ApoE <sup>-/-</sup> hiperlipemici cu diabet timpuriu .....	134
3.3.4.	Expresia moleculelor care reglează homeostazia și remodelarea matricei extracelulare dar și a motilității celulare .....	136
3.3.5.	Expresia moleculelor implicate în remodelarea tisulară se corelează cu markerii de remodelare și calcificare, indicii plasmatici și hemodinamici .....	138
3.3.6.	Dezvoltarea unui model 3D de foiță valvulară .....	140
3.3.7.	Expunerea modelului 3D la concentrație crescută de glucoză modulează moleculele de matrice extracelulară exprimate de VIC .....	141
3.3.8.	În modelul 3D de foiță valvulară, MMP-1 și MMP-13 sunt induse semnificativ de concentrația crescută de glucoză în VIC .....	144
3.3.9.	Subunitățile integrinice $\alpha$ și $\beta$ sunt modulate de concentrația crescută de glucoză în ambele tipuri de celule valvulare din modelul 3D .....	145
3.4.	<i>Concluzii</i> .....	148
4.	<b>ANALIZA BIOINFORMATICĂ A COMUNICĂRII DINTRE CELULELE VALVULARE ÎNTR-UN MODEL DE ȘOARECE DEFICIENT ÎN APOE</b>	149
4.1.	<i>Introducere</i> .....	149
4.2.	<i>Metode</i> .....	150
4.2.1.	Procesarea și analiza datelor de sc-RNAseq .....	150
4.2.1.1.	Controlul calității datelor .....	151
4.2.1.2.	Normalizarea datelor .....	154
4.2.1.3.	Integrarea datelor .....	154
4.2.1.4.	Vizualizarea datelor – analiza de tip PCA și proiecția UMAP .....	155

4.2.1.5. Gruparea celulelor .....	158
4.2.2. Analiza de expresie genică diferențială .....	158
4.2.3. Analiza îmbogățirii setului de gene - GSEA.....	159
4.2.4. Analiza NicheNet pentru modelarea comunicației intercelulare.....	160
4.2.4.1. Definirea unui set de gene de interes și a unei populații receptor.....	160
4.2.4.2. Definirea genelor exprimate în populațiile expeditor .....	161
4.2.4.3. Definirea unor potențiali liganzi și calcularea activității liganzilor în setul de gene de interes.....	161
4.2.4.4. Determinarea genelor țintă și a receptorilor pentru liganzii de top clasificați în analiza NicheNet .....	162
4.2.4.5. Calcularea expresiei diferențiale a liganzilor în celulele expeditor în condiția Apoe <sup>-/-</sup> vs control.....	162
4.3. Rezultate și discuții.....	163
4.3.1. Analiza sc-RNaseq a celulelor valvulare în șoarecele control și în șoarecele Apoe <sup>-/-</sup> .....	163
4.3.1.1. Analiza sc-RNaseq arată existența a 14 grupuri de celule valvulare atât în șoarecele control cât și în cel Apoe <sup>-/-</sup> .....	163
4.3.1.2. Determinarea genelor care definesc grupurile celulare identificate la nivelul valvei aortice murine .....	165
4.3.1.3. Determinarea genelor definitorii pentru grupurile de macrofage .....	170
4.3.1.4. Determinarea genelor definitorii pentru celulele valvulare interstițiale.....	176
4.3.2. Analiza diferențială a expresiei genice în grupurile de VIC și macrofage în condiția Apoe <sup>-/-</sup> versus control (C57BL/6J) .....	186
4.3.2.1. Expresia diferențială a genelor din grupul Mac Lyve1 <sup>+</sup> în șoarecele hiperlipidemic...	186
4.3.2.2. Expresia diferențială a genelor din grupul Mac CD11c <sup>+</sup> în șoarecele hiperlipidemic .	188
4.3.2.3. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Meox1 <sup>+</sup> în șoarecele hiperlipidemic..	192
4.3.2.4. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Clec3b <sup>+</sup> în șoarecele hiperlipidemic..	195
4.3.2.5. Expresia diferențială a genelor din grupul VIC Spp1 <sup>+</sup> în șoarecele hiperlipidemic.....	197
4.3.3. Analiza îmbogățirii setului de gene (GSEA) pentru genele modificate în grupul VIC Spp1 <sup>+</sup> sugerează că hiperlipidemia induce în principal modificări ale matricei extracelulare și a genelor implicate în formarea de fibre de colagen .....	202
4.3.4. Modelarea comunicării inter-celulare în valva aortică murină și efectul acesteia asupra genelor clusterului VIC Spp1 <sup>+</sup> modificate în condiția hiperlipidemică .....	205
4.3.4.1. Determinarea liganzilor potențiali care pot să explice modificările observate în VIC Spp1 <sup>+</sup> .....	206
4.3.4.2. Determinarea potențialului reglator al liganzilor preziși în analiza NicheNet .....	206
4.3.4.3. Nivelul expresiei genice a liganzilor preziși de analiza NicheNet în clusterelor de celule valvulare .....	211
4.3.4.4. Modificarea expresiei genice a liganzilor cu potențial de reglare a VIC Spp1 <sup>+</sup> în condiția Apoe <sup>-/-</sup> .....	213
4.3.4.5. Determinarea principalilor receptori exprimați pe suprafața VIC care pot interacționa cu liganzii identificați de analiza NicheNet .....	214
4.4. Concluzii .....	216
<b>IV. CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>218</b>
<b>V. BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>223</b>

## Introducere

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate în țările dezvoltate (Organization, 9 December 2020) acestea se mențin în topul acestei statistici datorită expunerii tot mai frecvente a omului modern la factorii de risc pentru bolile cardiovasculare. Acești factori de risc includ: fumatul, dieta nesănătoasă, lipsa activității fizice, hiperlipidemia, hipertensiunea, expunerea la poluare, consumul de alcool, obezitatea și nu în ultimul rând diabetul. Diabetul zaharat este cel mai răspândit sindrom metabolic și complicațiile asociate cu acesta sunt majoritar macro- și micro-vasculare conducând la nefropatie, retinopatie și neuropatie ca urmare a accelerării procesului aterosclerotic.

Bolile cardiovasculare cuprind un număr mare de patologii printre care: insuficiența cardiacă, valvulopatiile cardiace și aritmiile, boala cardiacă reumatică (leziuni ale miocardului și valvelor cardiace cauzate de infecția cu *Streptococcus pyogenes*), malformațiile cardiace congenitale, tromboza venoasă profundă cu propria sa complicație, embolia pulmonară și nu în ultimul rând ateroscleroza care prezintă două complicații majore, infarctul miocardic și accidentul vascular cerebral ischemic (Thiriet, 2018).

**Ateroscleroza** este cea mai importantă patologie subiacentă bolii arteriale coronare, bolii arteriale periferice și a bolilor cerebrovasculare. Fiind o boală a arterelor mari și medii, ateroscleroza presupune acumularea în spațiul subendotelial a lipoproteinelor, în special a lipoproteinelor de densitate mică (LDL), a celulelor imune, dar și a celulelor musculare netede (CMN), acumulare care în timp formează plăci ocluzive care la rândul lor determină stenoza arterială. CMN pe parcursul dezvoltării aterosclerozei produc o serie de proteine de matrice extracelulare (MEC) cum ar fi colagen, elastină, dar și proteoglicani și glicozamino glicani, care contribuie la îngroșarea spațiului sub-intimal dar și la menținerea unui cap fibros. Pe măsură ce placa avansează CMN pot suferi o metaplazie în celule spumoase care înglobează LDL, suferă apoptoză, iar acest conglomerat de resturi celulare împreună cu deficiența a eferocitozei de către macrofage (MØ), conduce la formarea unui miez necrotic. Toți acești factori determină în același timp și creșterea și cronicizarea inflamației și astfel a recrutării macrofagelor care secretă o serie de metaloproteinaze matriceale (MMP) cu rol în degradarea MEC, ceea ce determină o subțiere a capului fibros și determină o predispoziție la rupere a acestuia. Astfel, dacă acumularea inițială de LDL și formarea capului fibros duc la îngustarea arterelor care restricționează fluxul sangvin determinând ischemie și hipoxie tisulară (Wolf and Ley, 2019), ruperea capului fibros determină formarea de trombi care pot

bloca complet arterele determinând în cazul arterelor coronare, infarctul de miocard, iar în cazul arterelor cerebrale, atacul vascular cerebral.

O altă boală cardiovasculară care afectează un număr tot mai însemnat de oameni este **boala valvei aortice (BVA)** (Coffey et al., 2021). Valva aortică este una dintre cele 4 valve care controlează fluxul sangvin în inimă, ea separă ventriculul stâng de aortă. Bolile care afectează această valvă afectează circulația sângelui și se împart în două categorii: stenoza aortică - boală care îngustează orificiul valvular, îngreunând fluxul sangvin și insuficiența (regurgitarea aortică) – boală care determină o închidere incompletă a valvei în diastolă. Cea mai frecventă afecțiune a valvei aortice este stenoza aortică determinată de calcificarea valvei, afecțiune denumită în continuare boala valvei aortice (BVA). Ea este caracterizată de îngroșarea, fibroza și mineralizarea cuspidelor aortice. Analiza foițelor aortice a arătat că mineralizarea distrofică și tranziția osteogenică a celulelor valvulare interstițiale (VIC) apar concomitent cu neovascularizarea, microhemoragia și producția anormală de matrice extracelulară (Moncla et al., 2023). Factorii de risc pentru BVA pot fi împărțiți în două categorii, factori de risc care nu pot fi modificați, și anume: vârsta și morfologia bicuspidă congenitală a valvei aortice și factori de risc care pot fi ameliorați ca: tensiunea arterială crescută, nivelul de colesterol din plasmă și prezența obezității și a diabetului zaharat. Interacțiuni complexe între celulele endoteliale și interstițiale ale valvei și celulele imune promovează remodelarea valvei aortice și dezvoltarea BVA. Deoarece, până în prezent nici un tratament medical nu a fost eficient în reducerea sau prevenirea progresiei BVA, studiile care au ca scop identificarea unor posibile ținte terapeutice sunt deosebit de importante.

Impactul bolilor cardiovasculare este în creștere și datorită ratei de creștere a obezității și a diabetului. **Diabetul** este cea mai răspândită boala metabolică, iar povara sa medicală și socio-economică este dată de complicațiile asociate, în special la nivel macrovascular și microvascular. Acestea conduc la retinopatie, neuropatie și nefropatie, ca urmare a accelerării aterogenezei. S-a demonstrat anterior că ambele tipuri de diabet zaharat pot induce dezvoltarea aterosclerozei sau accelerează și mai mult progresia acesteia (Katakami, 2018). Nivelul crescut de glucoză, dislipidemia dar și alte modificări metabolice care însoțesc diabetul sunt strâns legate de patogeneza aterosclerozei. Iar inflamația cronică este prezentă încă de la primele stadii ale inițierii diabetului și este considerată în prezent ca unul dintre factorii cheie în dezvoltarea aterosclerozei (Wolf and Ley, 2019).

În patologia aterosclerozei și a BVA apar transformări semnificative ale **matricei extracelulare**. Matricea extracelulară asigură un cadru vital pentru țesutul vascular și

valvular, având rolul unui schelet ce susține organizarea și homeostazia celulelor. MEC este un ansamblu complex de macromolecule, având impact asupra comportamentului celulelor, promovând diferențierea, migrarea și proliferarea prin intermediul interacțiunilor specifice dintre celule și matrice. Mai mult, MEC ajută și la comunicarea intercelulară, are un rol important în motilitatea, dezvoltarea celulară și repararea țesuturilor lezate, de asemenea acționează și ca un depozit de factori de creștere și molecule bio-active care pot fi eliberate (Silva et al., 2020).

În acest context, studiu de față pornește de la **ipoteza** că inflamația și comunicarea dintre celulele imune și celulele rezidente vasculare (CMN) și valvulare (VIC) poate conduce la modificări patologice ale MEC prin mecanisme celulare și moleculare specifice, iar această remodelare patologică este accelerată în ateroscleroza în condiții de diabet.

Lucrarea de față a fost structurată în două părți principale, o primă secțiune denumită „Stadiul actual al cunoașterii” care explorează literatura existentă privind ateroscleroza, boala valvulară aortică, diabet și impactul acestor patologii asupra matricei extracelulare.

**Obiectivul principal** al tezei a fost reprezentat de investigarea mecanismelor celulare și moleculare a remodelării MEC în ateroscleroză și a BVA în contextul diabetului. Rezultatele originale obținute sunt prezentate în a doua secțiune a lucrării, denumită „Contribuții originale” care este structurată în 4 capitole.

## **Contribuții originale**

**Capitolul 1 - “Comunicarea dintre celulele musculare netede și macrofage accelerează evoluția plăcii aterosclerotice către placă vulnerabilă și ruperea plăcii prin inducerea mediatorilor inflamatorii”** - a vizat investigarea comunicării patologice dintre CMN și MØ în contextul aterosclerozei.

Contextul patologic al aterosclerozei surprinde o interacțiune între CMN și macrofage care nu este de obicei întâlnită în condiții de homeostazie vasculară. CMN sunt rare în intima arterială și sunt prezente în principal în media arterelor mari de unde migrează către zone unde există infiltrări de LDL și inflamație locală. În aceste zone, ele interacționează cu macrofagele recrutate din circulație în spațiul sub-endotelial și suferă modificări fenotipice care favorizează evoluția aterosclerozei. Ca răspuns la semnalele din micromediul vascular, MØ suferă un proces de polarizare spre macrofage proinflamatoare



(M1) sau anti-inflamatoare (M2) și induc un fenotip pro-aterogenic în CMN vasculare (Butoi et al., 2011). De asemenea, fenotipul CMN poate influența balanța dintre populațiile de macrofage M1 sau M2, determinând astfel progresia plăcii aterosclerotice. În placa aterosclerotică, MØ și CMN pot interacționa direct - prin molecule exprimate pe suprafața celulară (ICAM-1, VCAM-1 și CX3CL1) și receptorii lor - sau indirect, prin factori solubili (chemokine și citokine), care pot modifica fenotipul ambelor tipuri celulare, influențând astfel evoluția leziunii aterosclerotice (Manduteanu and Simionescu, 2012).

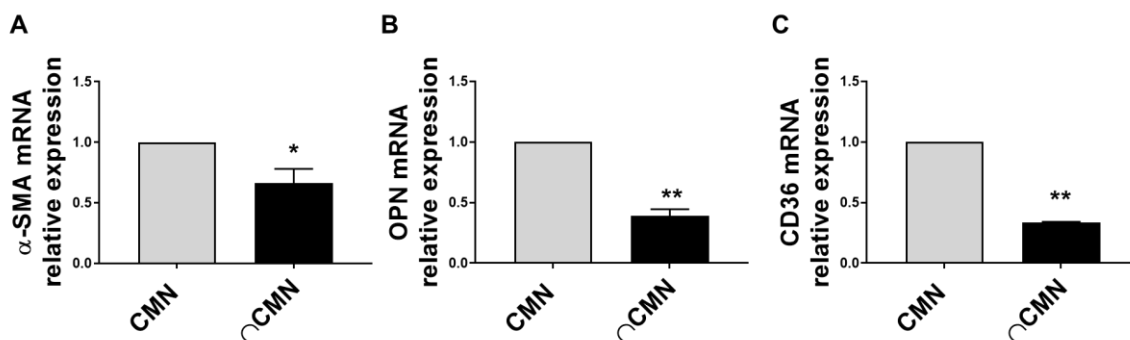
Anterior, grupul nostru a demonstrat inducerea expresiei unui număr mare de citokine și chemokine în macrofage în urma interacției cu CMN, acești mediatori inflamatori amplificând chemotaxia monocitelor (Tucureanu et al., 2016). De asemenea, grupul nostru a arătat că interacția dintre MØ și CMN afectează expresia colagenului I și III, crește sinteza metaloproteazei MMP-9 și promovează angiogeneza, caracteristici care pot contribui la vulnerabilitatea plăcii (Butoi et al., 2016).

În studiul de față, pentru a investiga contribuția comunicării dintre macrofage și CMN în agravarea leziunii aterosclerotice, am investigat mediatorii inflamatori induși de interacția CMN-MØ, modificarea fenotipică a CMN în urma interacției celulare și căile de semnalizare implicate în comunicarea dintre CMN-MØ.

Modelul experimental folosit în acest capitol a fost un model *in vitro* care presupus o cameră dublă Boyden cu macrofage diferențiate, în camera superioară, pe un insert cu pori de 4 μm și CMN însămânțate în camera de jos. Metodele de studiu au inclus tehnici de western blot (WB), teste imunosorbent legat de enzime (ELISA), protein array și reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (qPCR).

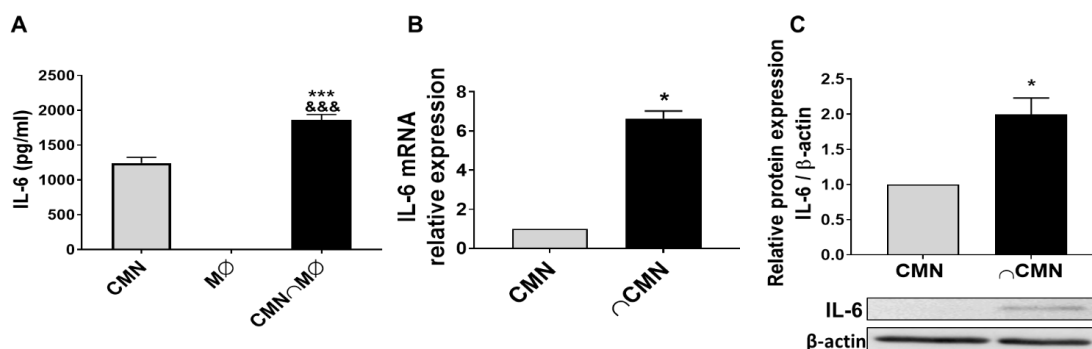
Rezultatele acestui capitol au arătat că interacția indirectă a CMN cu macrofagele induce secreția de mediatori inflamatori precum: G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IL-6, CCL5.

Interacția dintre CMN-MØ modifică fenotipul normal al CMN (Figura 1) prin scăderea α-SMA, ceea ce poate determina o scădere a capacității contractile. Totuși fenotipul CMN nu este unul pro-osteoblastic deoarece nivelul de osteopontină este și el scăzut în interacție.



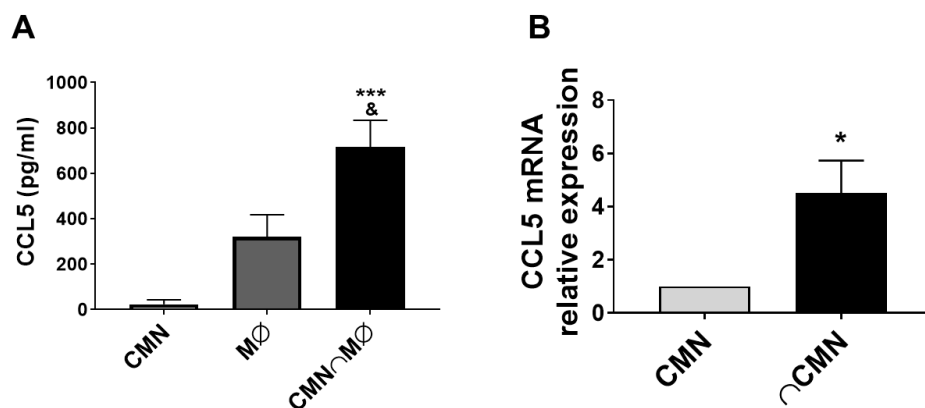
**Figura 1** Expresia genică a markerilor fenotipici ai CMN este scăzută în urma interacției cu M $\emptyset$ . Expresia genică a  $\alpha$ SMA (A), osteopontinei (OPN) (B) și CD36 (C) a fost determinată prin RealTime PCR în CMN interacționate cu M $\emptyset$  ( $\Omega$ CMN) sau CMN control.

Interacția CMN-M $\emptyset$  induce expresia citokinei IL-6 (Figura 2) și a chemokinei CCL5 (Figura 3) în CMN, molecule cu rol important în progresia plăcii aterosclerotice.



**Figura 2** Secreția și expresia IL-6 este crescută în CMN în urma interacției cu macrofagele.

Se cunoaște faptul că migrarea CMN în intima peretelui vascular este ghidată de chemokinele secretate de celulele imune și rezidente în placa aterosclerotică (Tedgui and Mallat, 2006). CCL5 (RANTES) este o chemokină cu rol esențial în procesul inflamator, prin recrutarea celulelor imune la locul inflamației. Expresia CCL5 este crescută în celulele peretelui vascular iar blocarea legării CCL5 la receptorul său (CCR5) a arătat o reducere a formării plăcii aterosclerotice și prevenirea progresiei leziunilor aterosclerotice la șoareci (Liu et al., 2012).

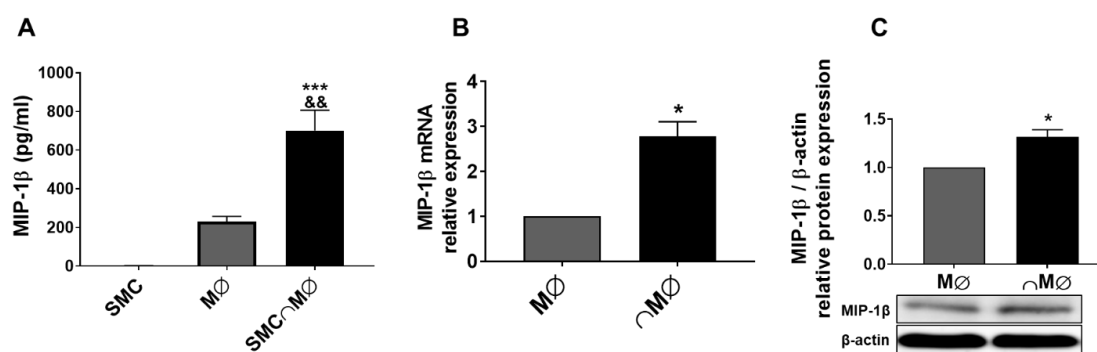


**Figura 3** Secreția și expresia CCL5 este crescută în CMN în urma interacției cu macrofagele.

Activarea căilor de semnalizare MAPK (protein kinaze activate de mitogen) a fost demonstrată în ateroscleroză, fiind cunoscut faptul că ERK1/2, JNK și p38 MAPK sunt activate în CMN implicate în procesul patologic (Pan et al., 2023). Astfel, în CMN interacționate cu MØ, am analizat activarea căilor MAPK prin detecția formelor fosforilate ale ERK1/2, JNK și p38 prin tehnica Western Blot. Datele noastre au arătat că interacția CMN-MØ induce activarea căii ERK1/2 în CMN după 6 ore de interacție, demonstrată prin creșterea semnificativă (de 2,7 ori) a proteinei fosfo-ERK1/2, raportată la proteina totală ERK1/2; după 24 ore de interacție cu macrofagele, calea ERK nu mai este activată în CMN.

Caspaza-1 este proteina efector a inflamazomului NLRP3, care clivează proforma citokinelor inflamatoare, generând forma lor activată, care este eliberată. În condițiile noastre experimentale, NLRP3 nu este exprimat în CMN control sau interacționate cu macrofage, deși expresia proteică a IL-1 $\beta$  este semnificativ crescută, ceea ce confirmă datele noastre anterioare (Butoi et al., 2016). În schimb, expresia proteică a caspazei-1 este semnificativ crescută în CMN interacționate timp de 24 ore cu macrofage.

Rezultatele obținute pe MØ în interacția cu CMN au arătat o creștere a expresiei de MIP-1 $\beta$  (Figura 4) care se cunoaște că are un rol important în progresia bolii aterosclerotice și vulnerabilitatea plăcii (Chang and Chen, 2016).



**Figura 4** Secreția și expresia MIP-1 $\beta$  este crescută în macrofage în urma interacției cu CMN.

Ținând cont de faptul că MIP-1 $\beta$  se găsește la un nivel crescut în serul pacienților cu plăci aterosclerotice avansate și este un predictor independent al evenimentelor cardiovasculare majore (Chang and Chen, 2016), datele noastre sugerează contribuția importantă a comunicării dintre macrofage și CMN în agravarea leziunii prin creșterea expresiei și secreției de MIP-1 $\beta$ .

Căile de semnalizare activate în MØ în urma comunicării cu CMN sunt reprezentate de calea ERK1/2, însă nu se observă și activarea p38 și JNK MAPK. În plus a fost observată activarea inflamazomului NLRP3.

Aceste date contribuie la înțelegerea modului în care comunicarea între CMN și macrofage amplifică procesul inflamator în placa aterosclerotică.

**Al doilea capitol** intitulat - **Diabetul accentuează remodelarea matricei extracelulare indusă de comunicarea celulelor musculare netede cu macrofagele** - evidențiază modularea enzimelor de remodelare a MEC – MMP – induse de comunicarea dintre CMN și MØ în condiții de glucoză crescută.

Rolul CMN în progresia aterosclerozei este complex, însă acesta este considerat în principal benefic, prin secreția de elemente de matrice, și în special de colagen de tip I, care poate stabiliza placa aterosclerotică formând un cap fibros. Pe de altă parte macrofagele au un efect opus, ele secretând o serie de enzime de remodelare a matricei care au un efect pro-trombotic prin subțierea acestui cap fibros.

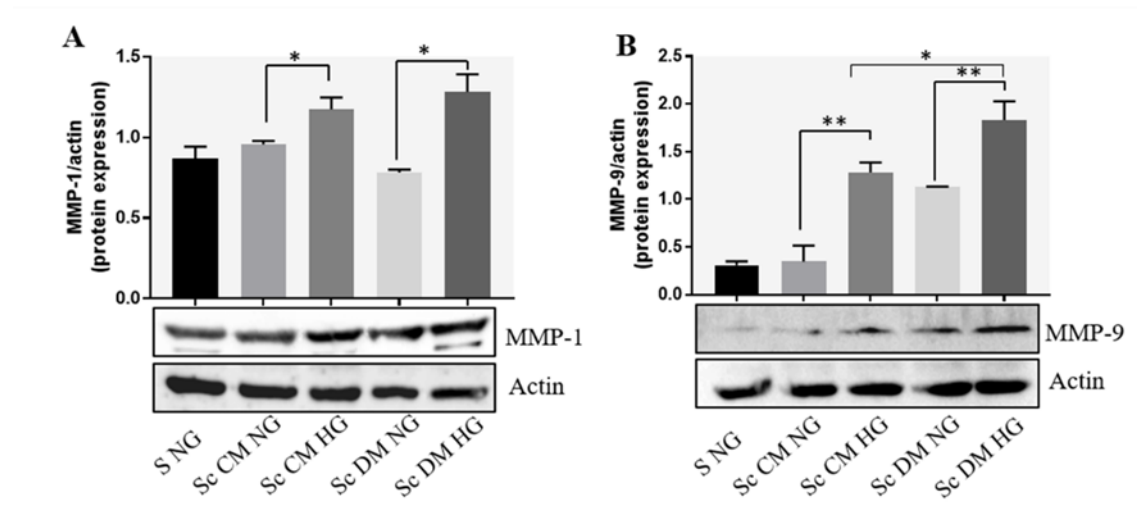
Date obținute pe modele experimentale animale prin analiza histologică a regiunilor predispuse la rupere ale plăcii aterosclerotice, au arătat niveluri crescute de MMP-1, MMP-3 și MMP-9 (Newby, 2005). Pierderea fibrelor de colagen și a altor componente ale MEC se

produce în regiunile cu o inflamație crescută în capul fibros. Studii recente au sugerat că plăcile aterosclerotice ale pacienților cu diabet de tip II sunt mai predispuse la rupere datorită creșterii inflamației vasculare și a răspunsului reparator ineficient (van Diepen et al., 2016, Edsfeldt et al., 2014). Totuși, moleculele cheie implicate în progresia plăcii spre o placă vulnerabilă la pacienții diabetici nu sunt cunoscute.

Datele din prezenta lucrare continuă studiile anterioare ale grupului nostru, unde am arătat că interacția dintre CMN și MØ produce o serie de molecule inflamatorii cum sunt MCP-1 și IL-1 $\beta$ , molecule care determină activarea macrofagelor și o modificare fenotipică a CMN caracterizată de expresia crescută a MMP-1, -2 și -9 și scăderea expresiei colagenului de tip I și III (Butoi et al., 2016). Silențierea CX3CR1, receptorul pentru fractalkină, a indus scăderea nivelului de MMP-9, sugerând implicarea acestuia în comunicarea celulară patologică (Butoi et al., 2011).

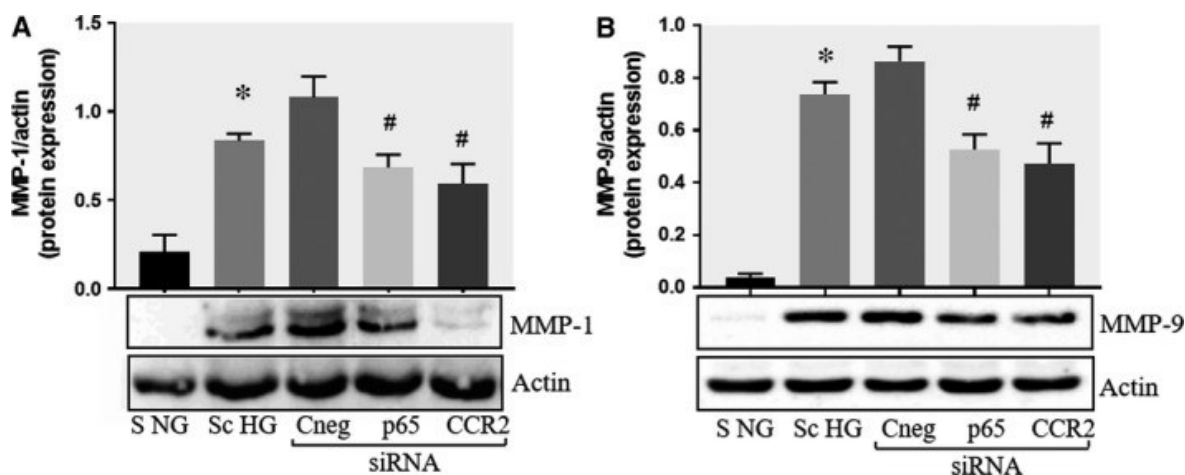
Folosind modelul *in vitro* de co-cultură stabilit anterior, am utilizat metode clasice de WB, protein array, qPCR, o metodă de vizualizare a asamblării de colagen dar și inhibitori farmacologici sau acid ribonucleic (ARN) de interferență pentru a determina contribuția comunicării dintre macrofage și CMN în progresia bolii aterosclerotice spre o placă vulnerabilă predispusă la ruptură.

Astfel, rezultatele prezentate în acest capitol au arătat că interacția CMN și MØ induce eliberarea în mediul condiționat a unor proteaze cum sunt: ADAMTS1, MMP-1, MMP-3, MMP-9 și urokinaza. Expresia proteică a MMP-1 și -9 este semnificativ crescută în CMN după co-cultură cu MAC umane derivate din monocite proaspăt izolate de la pacienți diabetici (ScDM) comparativ cu MAC control (ScCM). Pentru a determina efectul co-cultivării CMN cu MAC diabetice sau al concentrațiilor crescute de glucoză (HG) asupra MMP-urilor produse de CMN în urma interacției, ambele tipuri de MAC derivate de la donatori sănătoși (CM) sau de la pacienți diabetici (DM), au fost co-cultivate în condiții normale (NG) sau HG cu CMN. Se observă că MMP-9 a fost exprimat în CMN interacționate cu CM în HG comparativ cu NG și de asemenea în CMN co-cultivate cu DM în HG comparativ cu NG, sugerând efectul glucozei crescute asupra expresiei MMP-9 (**Error! Reference source not found.**A). În plus, expresia MMP-9 este mai mare în CMN care au fost co-cultivate în HG cu DM comparativ cu CM, indicând faptul că MAC diabetice sunt responsabile pentru creșterea expresiei MMP-9. În cazul MMP-1, principala cauză a creșterii expresiei este concentrația crescută de glucoză, deoarece nu au fost obținute diferențe semnificative între expresia MMP-1 în CMN co-cultivate cu CM sau DM atunci când au fost expuse la condiții HG (Figura 5).



**Figura 5** Expresia proteică a MMP-1 (A) și MMP-9 (B) în CMN în mediu cu concentrații normale (NG) sau crescute (HG) de glucoză, neinteracționate (S) sau interacționate (Sc) cu macrofage diferențiate din monocite izolate de la pacienți control (CM) sau pacienți diabetici (DM). Expresia proteică a MMP-1 și MMP-9 a fost normalizată la expresia de  $\beta$ -actină, (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med).

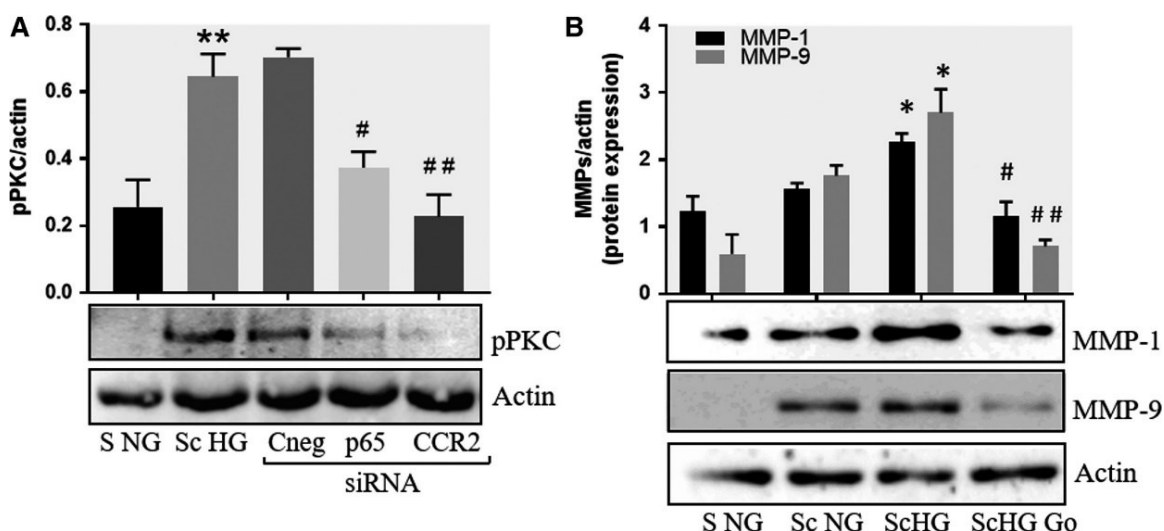
Pentru a evidenția căile de semnalizare implicate în această creștere a enzimelor de remodelarea a MEC am realizat silențierea receptorului pentru MCP-1 – Ccr2 și a sub-unității p65 a NF-kB prin transfectarea CMN cu ARN de interferență înainte de co-cultivarea cu MØ. Aceste experimente (Figura 6) au arătat că expresia proteică a MMP-1 și MMP-9 a fost semnificativ redusă în CMN în care CCR2 și p65 au fost silențiate. Nu a fost detectat niciun efect asupra expresiei MMP-urilor în CMN transfectate cu siRNA nespecific (control negativ).



**Figura 6** Efectul silențierii CCR2 și p65 în reglarea expresiei MMP-1 și MMP-9 în CMN. Expresia MMP-1 (A) și MMP-9 (B) a fost determinată prin Western Blot în CMN control (S NG), CMN co-cultivate cu MØ în condiții de glucoză crescută (Sc HG) și CMN silențiate pentru CCR2 și p65, interacționate cu MØ în condiții de glucoză crescută (Cneg, p65, CCR2 siRNA). (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med)

Activarea protein kinazei C (PKC) este unul dintre evenimentele principale de semnalizare induse de concentrația crescută de glucoză. Pentru a examina posibila implicare a PKC în creșterea expresiei de MMP-1 și MMP-9, am evaluat activarea PKC $\alpha$  în CMN. După cum rezultă din experimentele de Western Blot, co-cultura CMN-MØ în condiții de glucoză crescută a indus o creștere semnificativă a fosforilării PKC $\alpha$  în CMN. Interesant, silențierea p65 sau CCR2 cu siRNA specific a împiedicat activarea PKC $\alpha$ .

Pentru a evalua dacă PKC $\alpha$  este implicată direct în expresia de MMP-1 și MMP-9, co-cultura dintre CMN-MØ a fost realizată în prezența inhibitorului de PKC $\alpha$ , Go 6976 (1  $\mu$ mol/L). În acest caz, expresia proteică a ambelor proteaze, MMP-1 și MMP-9, a fost semnificativ redusă, sugerând că activarea PKC $\alpha$  este implicată în suprapresia MMP-1 și MMP-9 (Figura 7).

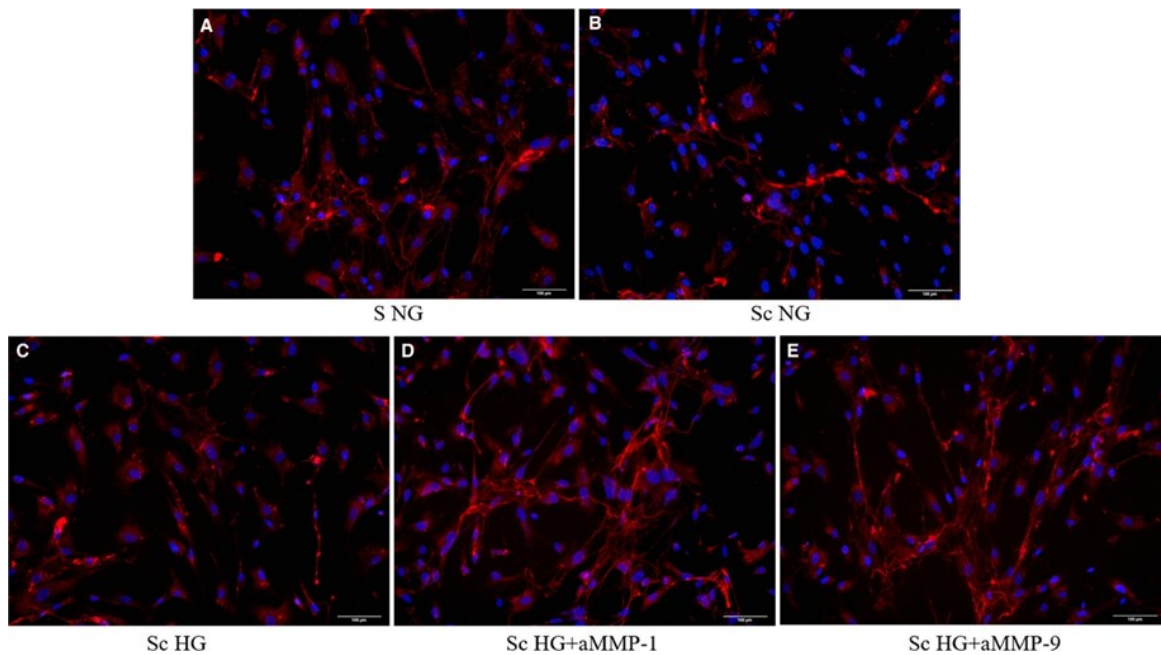


**Figura 7** Inhibarea PKC $\alpha$  scade expresia proteică a MMP-1 și MMP-9 indusă de interacția CMN cu MØ. **(A)** Evaluarea activării PKC $\alpha$  în CMN control (S NG) comparativ cu CMN co-cultivate cu MØ în condiții de glucoză crescută (Sc HG). Forma fosforilată a PKC $\alpha$  este semnificativ crescută în Sc HG. Silențierea CCR2 sau p65 scade activarea PKC $\alpha$  la nivelul controlului. **(B)** Efectul inhibitorului PKC $\alpha$  (Go 6976) asupra expresiei proteice de MMP-1 și MMP-9 indusă de comunicarea CMN-MØ. (Macarie et al., 2018, J.Cel.Mol.Med)

În continuare, am investigat dacă CMN activate de interacția cu macrofagele își păstrează capacitatea de a forma fibrile de colagen, o caracteristică importantă în stabilitatea vasculară (Li et al., 2003). Pentru aceasta, colagenul solubilizat și marcat cu Texas Red a fost adăugat în cultura de CMN control sau CMN după interacția lor cu macrofage în condiții de glucoză normală (NG) sau glucoză crescută (HG). Asamblarea fibrilelor de colagen a fost urmărită prin microscopie de fluorescență.

Rezultatele au aratat (Figura 8) că după interacția cu MØ în condiții normale sau crescute de glucoză, CMN își scad capacitatea de a asambla monomerii de colagen în fibre, comparativ cu CMN neinteracționate, menținute în mediu cu concentrație normală de glucoză. Atunci când CMN interacționate cu MØ în condiții de glucoză crescută au fost preincubate pentru 3 minute cu anticorpi de blocare anti-MMP-1 sau anti-MMP-9, acestea și-au recăpătat capacitatea de a asambla monomerii de colagen.





**Figura 8** Formarea fibrelor de colagen de către CMN, din colagen solubil marcat cu Texas Red. (Macarie et al, 2018, J.Cel.Mol.Med)

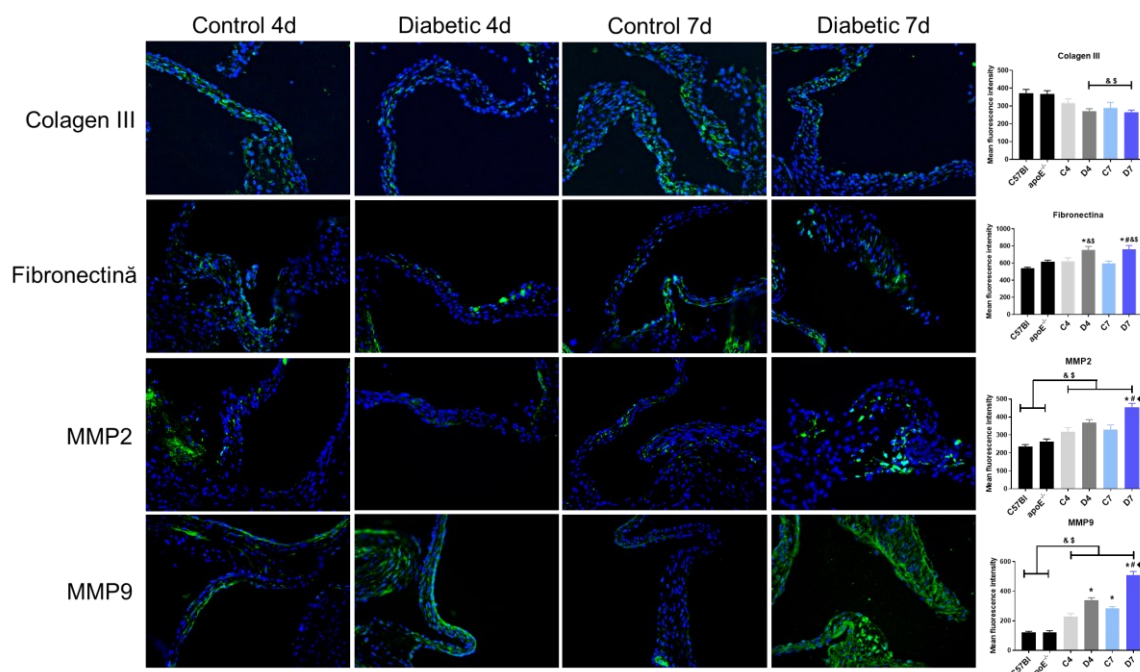
Rezultatele acestor două capitole au vizat în principal ateroscleroza și au accentuat relevanța comunicării intercelulare în procesele biologice, dar mai ales în condițiile patologice, unde echilibrul acestor interacțiuni poate fi complet dereglat. Astfel, am arătat că, macrofagele au un efect pro-inflamator și că CMN pot deveni la rândul lor mediatori ai inflamației locale conducând la cronicizarea inflamației. Totodată, concentrațiile crescute de glucoză modulează această interacțiune, determinând o secreție crescută a proteazelor matriceale și anomalii în procesul de asamblare a colagenului, modificări ce pot favoriza dezvoltarea unei plăci aterosclerotice susceptibilă la rupere.

**Capitolul 3 - Diabetul timpuriu induce remodelarea matricei și modificări funcționale în valva aortică într-un model murin de ateroscleroză și într-un model de cultură celulară tridimensională** - a avut ca obiectiv principal studiul bolii valvei aortice și a modificărilor MEC induse de diabetul timpuriu.

Integritatea structurală a MEC este esențială pentru funcția normală a valvei aortice, iar modificări ale acesteia au fost observate în toate stadiile patogenezei BVA. Diabetul accelerează evoluția BVA și poate induce modificări ale MEC. Totuși, modificările MEC induse de diabet în etapele timpurii ale evoluției BVA nu au fost studiate.

Acest capitol a abordat două modele experimentale de studiu, unul *in vivo* reprezentat de un șoarece deficient în apolipoproteina E (ApoE), căruia i-a fost indus diabetul prin injecții cu streptozotocină și care a fost apoi menținut pe o dietă bogată în colesterol pentru inducerea aterosclerozei și a modificărilor la nivelul valvei aortice; și un model *in vitro*, reprezentat de un model tridimensional de co-cultură bazat pe un hidrogel din gelatină metacrilată în care au fost înglobate celule valvulare umane și care a fost expus la concentrații crescute de glucoză. Metodele folosite în acest capitol au inclus: imunofluorescența, izolarea de celule primare valvulare umane, WB și qPCR.

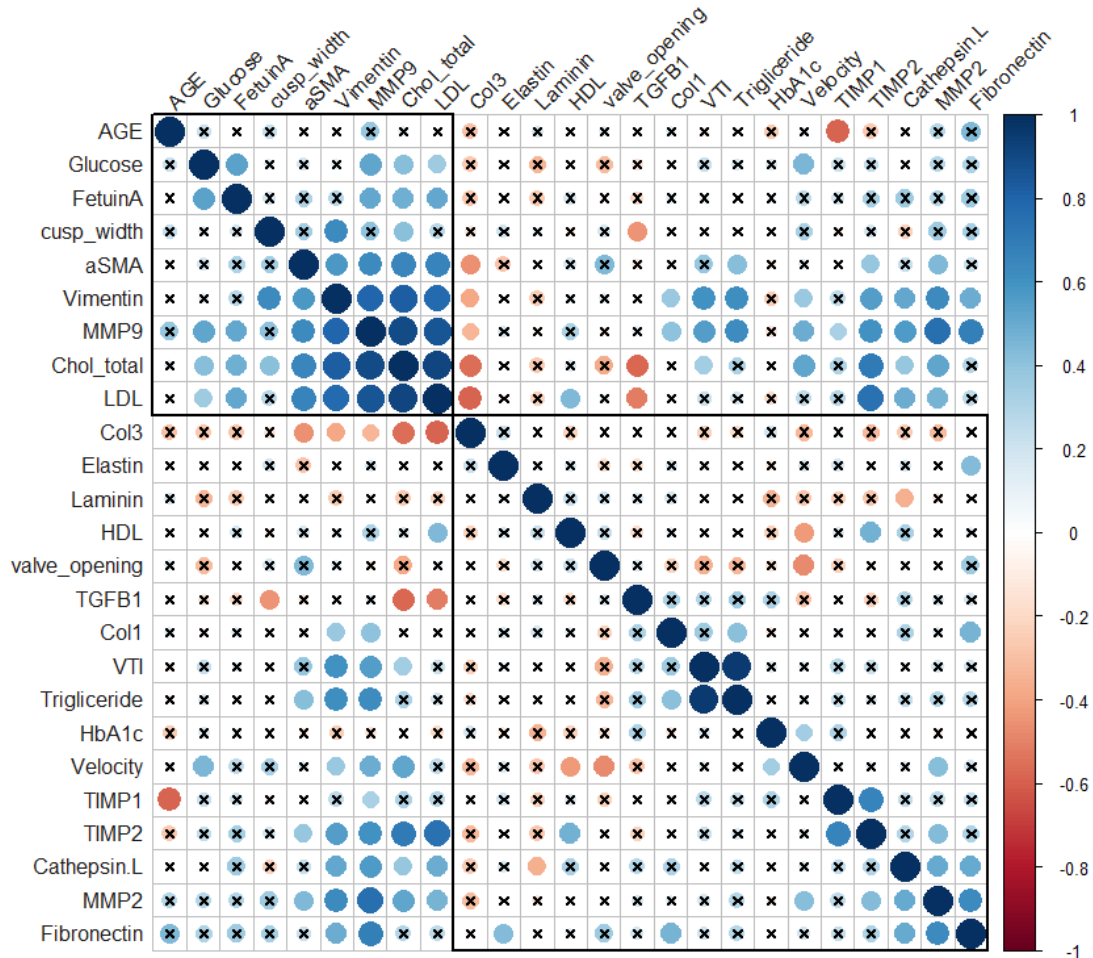
Rezultatele acestui capitol 3 au arătat că *in vivo* diabetul experimental induce modificări ale elementelor de matrice și a enzimelor de remodelare cum ar fi colagenul 3, fibronectina, MMP-2 și MMP-9 (Figura 9).



**Figura 9** Expresia proteică a proteinelor de matrice extracelulară: colagen III și fibronectină și a gelatinazelor MMP-2 și MMP-9. În dreapta imaginilor de imunofluorescență este analiza statistică a expresiei de MMP-2, -9, colagen III și fibronectină în grupurile de șoareci control și diabetici.

Aceste modificări sunt corelate cu parametrii plasmatici și funcționali ai valvei aortice (Figura 10) astfel: nivelul crescut al MMP-9 se corelează pozitiv puternic cu parametrii plasmatici precum fetuina, trigliceride, colesterolul total și LDL, cu expresia markerului de miofibroblaste –  $\alpha$ SMA, cu expresia unei alte metaloproteaze matriceale - MMP2 dar și cu parametrii funcționali ai valvei - viteza și VTI; fibronectina se asociază

pozitiv cu MMP-2 și MMP-9 și negativ cu colagenul III iar colagenul de tip III este corelat negativ cu  $\alpha$ SMA, vimentina, MMP9, LDL și colesterolul total.

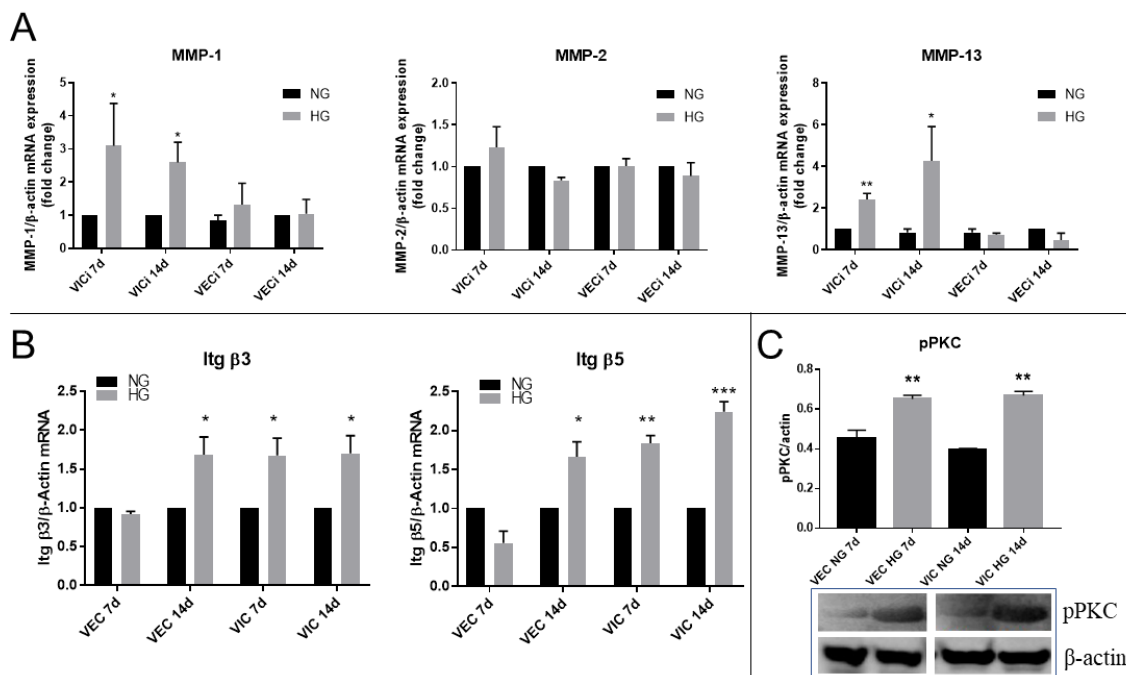


**Figura 10** Matricea corelațiilor Pearson dintre proteinele de matrice extracelulară, markerii de remodelare și parametrii funcționali și plasmatici ai valvei aortice. Valorile medii măsurate pentru fiecare grup experimental au fost utilizate pentru realizarea de corelații Pearson. Corelațiile pozitive sunt reprezentate prin culoarea albastru, corelațiile negative prin culoarea roșu iar paleta de culori din legendă indică coeficientul Pearson ( $r$ ). Corelațiile care nu ating pragul de semnificație statistică ( $p > 0,05$ ) sunt marcate cu un  $x$  (modificat după Țucureanu, et al., 2019).

Pentru a identifica tipul celular afectat de condițiile hiperglicemice și pe cel responsabil de modificările observate asupra moleculelor asociate procesului de remodelare, studiul a continuat cu analiza efectelor glucozei asupra VEC și VIC într-un model 3D de foiță valvulară dezvoltat în laboratorul nostru (Vadana et al., 2020) și trimis spre brevetare. Modelul 3D dezvoltat în laboratorul nostru este obținut din hidrogel (gelatină metacrilată) și

are următoarele avantaje: i) respectă structura foiței valvulare native având VEC la exterior și VIC încapsulate în interior, și ii) celulele valvulare crescute în acest model sunt umane, ceea ce îi conferă o relevanță deosebită în ceea ce privește rezultatele obținute cu ajutorul lui.

Rezultatele obținute pe acest model au evidențiat modificări celulare specifice ale enzimelor de remodelare a MEC (Figura 11A) și ale receptorilor transmembranari care realizează legătura dintre celule și MEC (Figura 11B).



**Figura 11 A.** Expresia genică a MMP-1, -2 și -13 în celulele valvulare (VEC și VIC) în modelul 3D expus la concentrații de glucoză normală (NG) sau crescută (HG) timp de 7 și 14 zile. **B.** Expresia genică a subunităților integrinice β3 și β5 în VEC și VIC din modelul 3D expus la concentrații de glucoză normală (NG) sau crescută (HG) timp de 7 și 14 zile. Celulele au fost izolate din construcții 3D după 7 și 14 zile și investigate prin reacția qPCR. **C.** Expresia formelor fosforilate ale PKC în VEC și VIC izolate din modelul 3D de valvă aortică. Western blot a fost realizat pe lizatul de celule valvulare izolate din constructul 3D după 7 și 14 zile de expunere la glucoză. În comparație cu NG (coloane negre), celulele din HG (coloane gri) prezintă o expresie crescută a pPKC-a.  $N = 3$ ,  $** p < 0,01$ .

Studii anterioare au arătat că PKC reglează expresia MMP-1, în acest capitol, am arătat că forma activă, fosforilată a acesteia este crescută în VIC și VEC din condițiile hiperglicemice (Figura 11C).

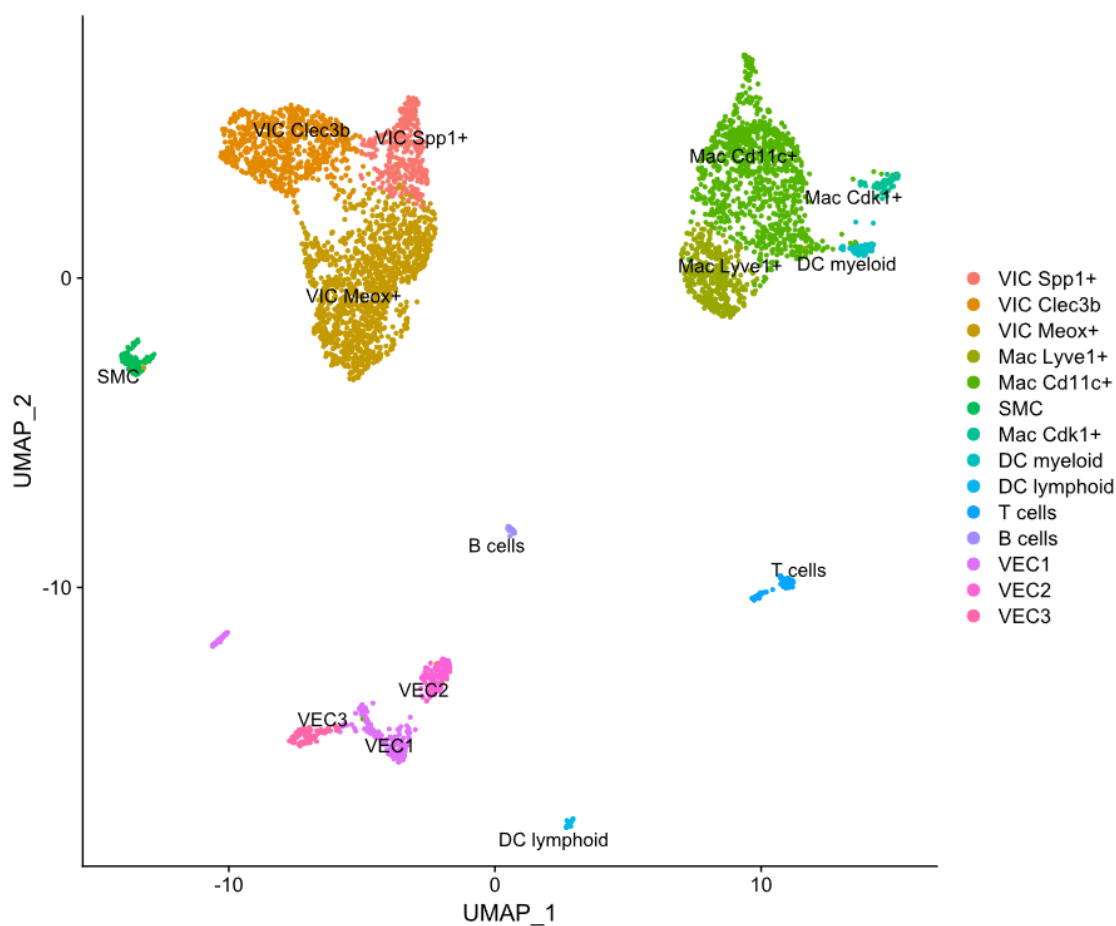
Rezultatele din acest capitol contribuie la înțelegerea patologiilor valvulare în condiții de diabet timpuriu și pot deschide căi de cercetare pentru dezvoltarea de terapii țintite pentru prevenirea sau atenuarea progresiei BVA.

**Capitolul 4** numit - **Analiza bioinformatică a comunicării dintre celulele valvulare într-un model de șoarece deficient în ApoE** - a avut ca obiectiv principal determinarea unor mediatori ai comunicării intercelulare care pot să inducă modificarea elementelor de MEC observate în celulele interstițiale valvulare, celulele predominante în țesutul valvular, într-un model de șoarece ApoE<sup>-/-</sup>.

Acest capitol abordează metode de analiză bioinformatică a unor date de secvențiere de nouă generație la nivel unicelular (scRNA-seq) obținute și publicate în 2021 (Lee et al., 2022). Acest tip de secvențiere permite observarea heterogenității celulare și totodată permite explorarea interacțiunilor funcționale dintre sub-populațiile celulare din valvă.

Metodele bioinformatică au presupus procesarea și analiza datelor de sc-RNAseq utilizând pachetul informatic Seurat v4 (Hao et al., 2021) în limbajul de programare R. Urmată de o analiză de expresie genică diferențială, pentru sub-populațiile de celule identificate, între populațiile control și cele provenite de la șoareci ApoE<sup>-/-</sup>.

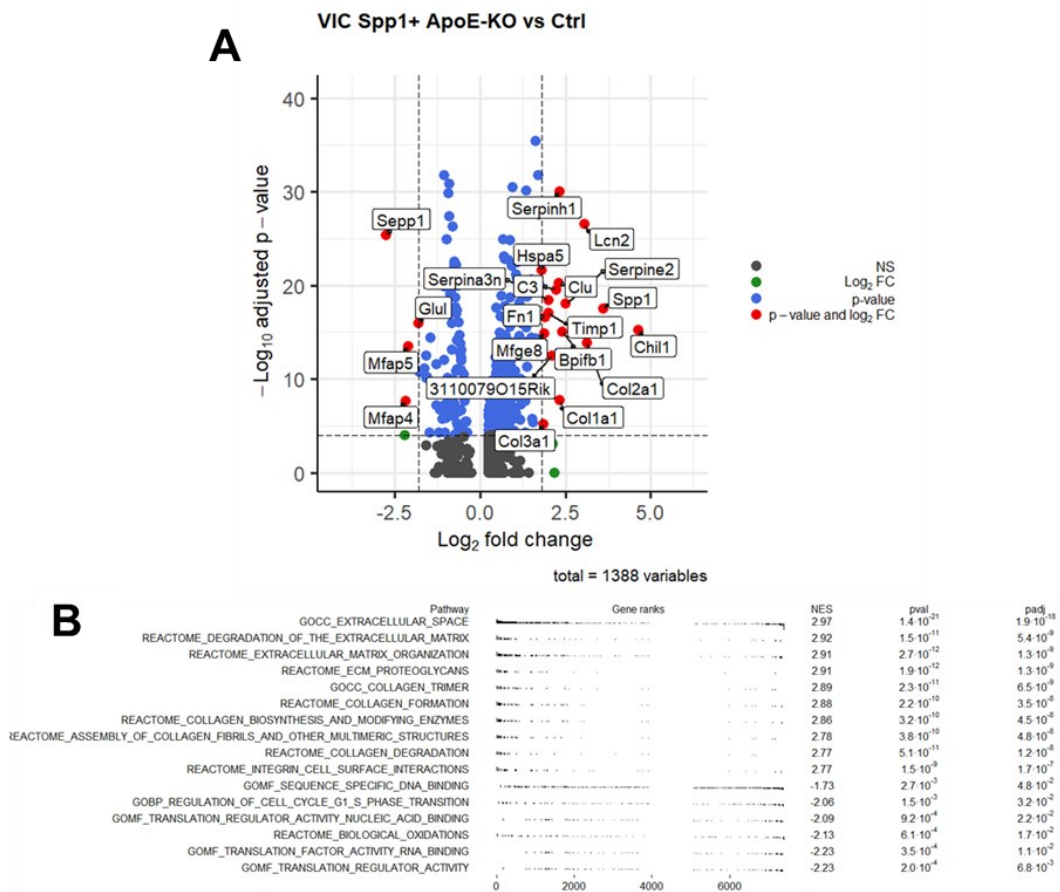
Analiza datelor de scRNA-seq a demonstrat existența a 14 populații de celule valvulare din care 3 sub-populații reprezintă celule valvulare interstițiale (Figura 12).



**Figura 12** Proiecția UMAP care surprinde structura datelor de sc-RNAseq și relația dintre cele 14 grupuri de celule valvulare.

Dintre aceste grupuri de VIC, o sub-populație caracterizată printr-o expresie crescută a osteopontinei, prezintă modificări importante ale genelor de MEC în hiperlipidemie, fiind observată creșterea genelor *Col1a1*, *Col2a1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Spp1* și a inhibitorului de MMP – *Timp1* (Figura 13A). O analiză de tip GSEA a tuturor genelor modificate semnificativ în acest grup (Figura 13B) a arătat că majoritatea genelor modificate în hiperlipidemie sunt gene prezente în spațiul extracelular și sunt implicate în organizarea fibrelor de collagen sau a matricei extracelulare.





**Figura 13 A.** Analiza diferențială a expresiei genelor din VIC Spp1<sup>+</sup> între condiția ApoE<sup>-/-</sup> și control. În volcano plot, gri definește genele nemodificate; albastru - genele care trec de pragul valorii p; verde – genele care trec pragul Log2FC dar nu și pe cel al valorii p; iar genele roșii sunt genele semnificativ modificate care îndeplinesc ambele condiții. Pragul de semnificație a fost de  $p \leq 10^{-5}$  și  $\text{Log}_2\text{FC} = 1,8$ ; iar testul statistic folosit a fost Wilcoxon rank sum. **B.** Cele mai îmbogățite seturi de gene pentru VIC Spp1<sup>+</sup> modificate semnificativ în condiția ApoE<sup>-/-</sup>, ordonate după scorul normalizat de îmbogățire (NES).

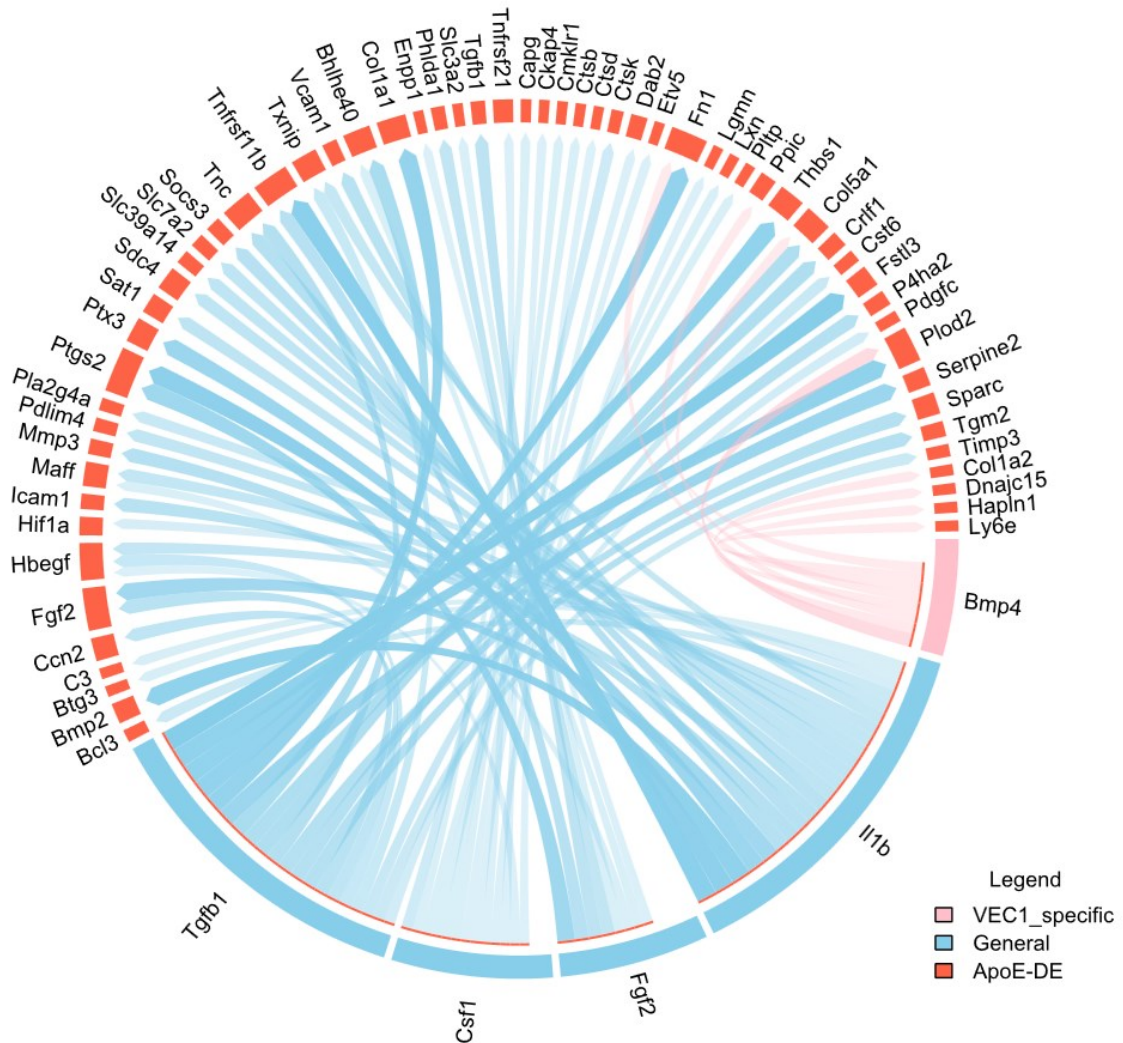
Pentru a observa ce mediatori ai comunicării intercelulare valvulare pot determina modificările observate în grupul de VIC Spp1<sup>+</sup> am utilizat o metodă computațională de modelare a comunicării intercelulare utilizând pachetul informatic NicheNet (Browaeys et al., 2020). Acest pachet integrează informațiile experimentale de sc-RNAseq cu baze de date care conțin informații despre interacțiunile ligand-receptor, semnalizare intracelulară și reglarea transcrierii, ceea ce permite evidențierea unor noi mediatori ai semnalizării și a comunicării inter-celulare în procesele patologice.

Această analiză sumarizată în Figura 14 a stabilit o serie de potențiali liganzi cu potențial reglator pentru acest cluster VIC Spp1<sup>+</sup>.





Liganzii cu cel mai mare potențial reglator sunt reprezentați de IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF- $\beta$ 1, BMP-4 și CSF2 (Figura 15). Dintre liganzii identificați, TGF- $\beta$ 1 este exprimat în principal de VIC dar și de macrofagele CD11c+, BMP-4 este exprimat în principal de celulele valvulare endoteliale, iar IL-1 $\beta$  este exprimat de celulele dendritice și macrofagele Cd11c+, iar macrofagele proinflamatoare pot comunica și induce modificări în VIC Spp1+ prin secreția de Il1b, Lgals3, Tgf- $\beta$ 1. Dintre acestea atât Lgals3 cât și Il1b prezintă o creștere a expresiei în hiperlipidemie.



**Figura 15** Reprezentarea grafică circulară a liganzilor cu cel mai puternic potențial reglator și genele lor țintă. În partea de jos marcați cu albastru sunt liganzii (Tgfb1, Csf1, Fgf2 și Il1b) care nu sunt exprimați doar de un singur tip celular specific; cu roz este marcat Bmp4 care este exprimat doar în grupul VEC; iar în partea de sus a graficului și marcat cu portocaliu sunt reprezentate genele țintă pentru fiecare ligand.

**În concluzie**, această lucrare aduce contribuții semnificative pentru înțelegerea modificărilor patologice ale matricei extracelulare, care survin în contextul aterosclerozei și a BVA, utilizând tehnici de cercetare complexe.

În primul capitol am evidențiat noi mecanisme prin care comunicarea dintre celulele musculare netede și macrofage poate influența evoluția ateromului către o placă vulnerabilă prin amplificarea inflamației determinată de creșterea mediatorilor inflamatorii: G-CSF, GM-CSF, ICAM-1, IL-6, CCL5 și MIP-1 $\beta$ . Am arătat și că această inflamație este dependentă de activarea inflamazomului NLRP3 și a căii de semnalizare ERK/MAPK.

În cel de-al doilea capitol am urmărit efectul glucozei crescute în amplificarea remodelării matriceale și am demonstrat că expresia și activitatea enzimelor de remodelare a matricei extracelulare: MMP-3, -8, -1 și -9 este crescută în condiții de glucoză crescută iar aceste modificări sunt modulate de semnalizarea prin PKC $\alpha$  și de semnalizarea prin receptorul CCR2.

În cel de-al treilea capitol am identificat modificări ale matricei extracelulare valvulare într-un model de șoarece Apoe<sup>-/-</sup> diabetic la o perioadă scurtă de 4 și 7 zile de la declanșarea diabetului, înainte de fibroza și calcificarea valvei. Utilizând acest model experimental am arătat că expresia fibronectinei și a metaloproteazelor MMP-2 și -9 este crescută la acești șoareci iar aceste modificări se corelează pozitiv cu parametrii plasmatici și funcționali ai valvei. Dorind să investighez modificările induse de diabet la nivel celular, experimentele din capitolul 3 au fost continuate pe un model de studiu *in vitro* tri-dimensional cu VIC la interior și VEC la exterior care a fost menținut în glucoză crescută timp de 7 și 14 zile. Rezultatele obținute pe acest model au arătat că glucoza crescută determină modificări ale expresiei genice de laminină gamma, collagen de tip III, a enzimelor MMP-1 și MMP-13 și a subunităților integrinice  $\beta$ 3 și  $\beta$ 5 în VIC, iar în VEC crește expresia genică a subunităților integrinice  $\alpha$ 4,  $\alpha$ V și  $\beta$ .

Cel de-al patrulea capitol a presupus o analiză complexă a unor date de secvențiere a ARN la nivel unicelular a valvei aortice provenite de la șoareci C57BL/6J și Apoe<sup>-/-</sup>. Prin această analiză am identificat existența unei sub-populații de VIC care suferă modificări semnificative ale genelor MEC în hiperlipidemie. Modelarea bioinformatică a comunicării intercelulare în valvă a arătat că aceste modificări pot fi mediate de: IL-1 $\beta$ , FGF-2, TGF- $\beta$ 1, BMP-4 și CSF2.

Investigarea modificărilor MEC induse și de efectul diabetului, surprinde un domeniu de studiu în care contribuțiile științifice sunt încă reduse.

Datele prezentului studiu reprezintă un avans important în acest domeniu furnizând perspective noi privind modalitatea prin care remodelarea MEC afectează progresia BVA și a leziunilor aterosclerotice. În plus, aceste date pot ajuta la dezvoltarea de abordări terapeutice noi, centrate pe țintirea comunicării intercelulare și ameliorarea remodelării patologice a MEC.

# Bibliografie

- BROWAEYS, R., SAELENS, W. & SAEYS, Y. 2020. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods*, 17, 159-162.
- BUTOI, E., GAN, A. M., TUCUREANU, M. M., STAN, D., MACARIE, R. D., CONSTANTINESCU, C., CALIN, M., SIMIONESCU, M. & MANDUTEANU, I. 2016. Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 1568-78.
- BUTOI, E. D., GAN, A. M., MANDUTEANU, I., STAN, D., CALIN, M., PIRVULESCU, M., KOENEN, R. R., WEBER, C. & SIMIONESCU, M. 2011. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 2026-35.
- CHANG, T. T. & CHEN, J. W. 2016. Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends or foes? *Cardiovasc Diabetol*, 15, 117.
- COFFEY, S., ROBERTS-THOMSON, R., BROWN, A., CARAPETIS, J., CHEN, M., ENRIQUEZ-SARANO, M., ZUHLKE, L. & PRENDERGAST, B. D. 2021. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol*, 18, 853-864.
- EDSFELDT, A., GONCALVES, I., GRUFMAN, H., NITULESCU, M., DUNER, P., BENGTSOON, E., MOLLET, I. G., PERSSON, A., NILSSON, M., ORHO-MELANDER, M., MELANDER, O., BJORKBACKA, H. & NILSSON, J. 2014. Impaired fibrous repair: a possible contributor to atherosclerotic plaque vulnerability in patients with type II diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 2143-50.
- HAO, Y., HAO, S., ANDERSEN-NISSEN, E., MAUCK, W. M., 3RD, ZHENG, S., BUTLER, A., LEE, M. J., WILK, A. J., DARBY, C., ZAGER, M., HOFFMAN, P., STOECKIUS, M., PAPALEXI, E., MIMITOU, E. P., JAIN, J., SRIVASTAVA, A., STUART, T., FLEMING, L. M., YEUNG, B., ROGERS, A. J., MCELRATH, J. M., BLISH, C. A., GOTTARDO, R., SMIBERT, P. & SATIJA, R. 2021. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184, 3573-3587 e29.
- KATAKAMI, N. 2018. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25, 27-39.
- LEE, S. H., KIM, N., KIM, M., WOO, S.-H., HAN, I., PARK, J., KIM, K., PARK, K. S., KIM, K., SHIM, D., PARK, S.-E., ZHANG, J. Y., GO, D.-M., KIM, D.-Y., YOON, W. K., LEE, S.-P., CHUNG, J., KIM, K.-W., PARK, J. H., LEE, S. H., LEE, S., ANN, S.-J., LEE, S.-H., AHN, H.-S., JEONG, S. C., KIM, T. K., OH, G. T., PARK, W.-Y., LEE, H.-O. & CHOI, J.-H. 2022. Single-cell transcriptomics reveal cellular diversity of aortic valve and the immunomodulation by PPAR $\gamma$  during hyperlipidemia. *Nature Communications*, 13, 5461.
- LI, S., VAN DEN DIEPSTRATEN, C., D'SOUZA, S. J., CHAN, B. M. & PICKERING, J. G. 2003. Vascular smooth muscle cells orchestrate the assembly of type I collagen via  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin, RhoA, and fibronectin polymerization. *Am J Pathol*, 163, 1045-56.
- LIU, H., NING, H., MEN, H., HOU, R., FU, M., ZHANG, H. & LIU, J. 2012. Regulation of CCL5 expression in smooth muscle cells following arterial injury. *PLoS One*, 7, e30873.
- MANDUTEANU, I. & SIMIONESCU, M. 2012. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med*, 16, 1978-90.
- MONCLA, L.-H. M., BRIEND, M., BOSSÉ, Y. & MATHIEU, P. 2023. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nature Reviews Cardiology*, 20, 546-559.
- NEWBY, A. C. 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 85, 1-31.
- ORGANIZATION, W. H. 9 December 2020. *The top 10 causes of death* [Online]. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>: WHO. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Accessed 2022].

- PAN, H., HO, S. E., XUE, C., CUI, J., ROSS, L. S., LI, F., SOLOMON, R. A., CONNOLLY, E. S. & REILLY, M. P. 2023. Atherosclerosis is a smooth muscle cell-driven tumor-like disease. *bioRxiv*.
- SILVA, A. C., PEREIRA, C., FONSECA, A., PINTO-DO, O. P. & NASCIMENTO, D. S. 2020. Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response. *Front Cell Dev Biol*, 8, 621644.
- TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86, 515-81.
- THIRIET, M. 2018. Cardiovascular Disease: An Introduction. In: THIRIET, M. (ed.) *Vasculopathies: Behavioral, Chemical, Environmental, and Genetic Factors*. Cham: Springer International Publishing.
- TUCUREANU, M. M., BUTOI, E., GAN, A. M., STAN, D., CONSTANTINESCU, C. A., CALIN, M., SIMIONESCU, M. & MANDUTEANU, I. 2016. Amendment of the cytokine profile in macrophages subsequent to their interaction with smooth muscle cells: Differential modulation by fractalkine and resistin. *Cytokine*, 83, 250-261.
- VAN DIEPEN, J. A., THIEM, K., STIENSTRA, R., RIKSEN, N. P., TACK, C. J. & NETEA, M. G. 2016. Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggressive? *Cell Mol Life Sci*, 73, 4675-4684.
- WOLF, D. & LEY, K. 2019. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*, 124, 315-327.