

Autofagia celulară-țintă tratament a procesului de îmbătrânire

Student Doctorand: Fîlfan Mădălina (Aldea)

Cuvinte cheie: autofagie, îmbătrânire, poliamine

Rezumat

Autofagia este un sistem de degradare al proteinelor, un proces catabolic ca un răspuns la stres sau o cale naturală de a distruge și a recicla componentele deteriorate sau inutile. Denumirea provine de la un cuvânt grecesc ce semnifică „autodigerare” și procesul este conservat pe linie evolutivă la toate celulele eucariote. Procesul a fost remarcat pentru prima dată la ficatul de șobolan după administrarea de glucagon, de către K. Porter și T. Ashford în 1962. Procesul a fost denumit după puțîn timp, în 1963, de către biochimistul belgian C. De Duve (Klionsky et al., 2008).

Organitele celulare sunt înglobate în vezicule cu membrane dublă, numite autofagozomi și prezentate lizozomilor pentru a fi degradate de către aceștia.

Autofagia este prezentă în mod normal la un nivel de bazal în cazul mamiferelor, fiind reglată de anumiți factori, cum ar fi stresul oxidativ, înfometarea, hipoxia.

Am pornit de la **ipoteza** că stimularea autofagiei prin metode farmacologice are drept consecință o regenerare parțială a țesuturilor îmbătrânite și ca urmare ar stimula îmbătrânirea sănătoasă din punct de vedere cognitiv și funcțional.

Obiectivele noastre au fost: testarea funcției cognitive și memorie spațială (Water-Maze), testarea funcției motorii (Rotor rod), observarea duratei de supraviețuire, studii celulare și tisulare ale proceselor de autofagie la nivelul creierului și ficatului prin metode de genomică, proteomică și imunohistochimie.

Cu toate ca este un subiect de mare interes în cercetare, până în momentul de față nu s-au făcut studii referitoare la autofagia celulară pe șobolani vârstnici, ci pe *Drosophilla* și drojzii, nereflexând acțiunea și mecanismele autofagiei la mamifere.

Teza este structurată în două părți și șapte capitole – partea întâi cuprinde date generale despre stadiul actual al cercetărilor în domeniul îmbătrânirii și autofagiei și despre mecanismele acestui proces, iar în partea a doua a lucrării sunt expuse contribuțiile personale la studiul manipulării farmacologice a autofagiei, utilizând animalele de laborator- Sprague Dawley batrâni (18-24 luni), împărțiți aleator în două grupuri, grup tratament și control, cu descrierea amănunțită a tehnicilor și protocoalelor de lucru folosite, precum și rezultatele obținute din acest studiu.

Importanța problemei abordate

Îmbătrânirea, un proces normal și inevitabil, are un efect important asupra corpului și asupra minții. Bolile cardiovasculare afectează și celelalte organe, inclusiv creierul. Depresia și accidentul vascular au o incidență crescută la vârstnici. Odată cu creșterea duratei de supraviețuire a populației, există un mare interes pentru prevenirea acestor afecțiuni și multiple studii caută răspunsul pentru o îmbătrânire sanatoasă.

Populația globului îmbătrânește într-un ritm alarmant - în anul 2000, aproximativ 10% din întreaga populație avea peste 60 ani. Se estimează ca în anul 2050, procentul de vârstnici va fi de aproximativ 21%.

Autofagia celulară este un proces de degradare, de protecție celulară, prezent la toate celulele eucariote. În ultimii ani mai multe studii au cercetat aspecte referitoare la autofagia celulară. Acest proces joacă un rol important în citoprotecție și în menținerea homeostaziei celulare prin prevenirea acumulării de proteine toxice și prin eliminarea patogenilor. Studiile plasează autofagia ca fiind conectată cu multiple afecțiuni precum cancer, miopatii, boli neurodegenerative, diabet, boli inflamatorii. Problema principală rămâne faptul că mai multe aspecte referitoare la acest proces sunt încă necunoscute, incluzând mecanismele de reglare și control.

În contextul în care vârstnicii reprezintă un procent semnificativ din întreaga populație, autofagia celulară este privită ca o posibilă soluție pentru o îmbătrânire sanatoasă.

Cadru științific. Mecanisme implicate

Autofagia celulară este procesul prin care organele celulare sunt degradate de către lizozomi, iar produsul de degradare este refolosit (Klionsky et al. 2011).

În prima etapă a procesului se formează fagoporul în situsul preautofagozomal. Al doilea pas este elongarea fagoporului, iar al treilea pas include maturarea autofozomului și asimilarea conținutului celular. Ultimul pas constă în fuzionarea lizozomilor cu autofagozomii maturi, formând un compartiment unic numit autolizozom. (Eskelinen et al. 2009; Ravikumar et al. 2010). De notat este faptul că la mamifere încă nu a fost descoperit un echivalent al situsului preautofagozomal, prezent la drojdii (levuri)(Klionsky et al. 2007). Substratul este înglobat în vezicule cu dublă membrană, numite autofagozomi. Acest substrat include organele lezate, proteine degradate și agenți patogeni invazivi.

La levuri s-au observat anumite proteine (atg) care au funcție de reglare a autofagiei. La mamifere există omologii ai acestor proteine (ATG), având aceleași funcții (Feng et al. 2014; Yang et al. 2010). mTORC1 și AMPK reglează autofagia în caz de înfometare. În prezența nutrienților și a factorilor de creștere, complexul format din ULK1, ATG13, ATG101 și FIP200

este reglat negativ de către MTOR, rezultând supresia autofagiei.(Jung et al., 2010; Mizushima et al., 2010, Chan et al., 2012; Hosokawa et al., 2009; Wong et al., 2013).

În cazul opus, înfometarea inhibă mTORC1, activează AMPK și ULK1, deci autofagia este stimulată și inițiată (Jung et al., 2010; Mihaylova et al., 2011;Kim et al., 2011).

Complexul Beclin1, care include Beclin1, p150, Atg 14L, Ambral, Rubicon, are legatură cu formarea autofagozomului și crește producția de fosfatidil inositol-3-fosfat (PI3P) în prezența factorilor stimulatori ai autofagiei.(He et al.2010; Itakura et al.2008).

În pasul care corespunde elongării sunt implicate doua sisteme ubiquitin-like Atg5-Atg12si LC3-Atg8 (Nagatogawa et al., 2013).

Putem vorbi despre stress oxidativ atunci cand speciile reactive de oxigen depasesc rezerva celulară de antioxidanți, iar celulele suferă diferite modificari. Mai multe studii confirmă că stresul oxidativ stimulează autofagia, ce duce la recuperarea functionalității și protective celulară (Chen et al.2007; Chen et al. 2008).

Alte studii susțin că există o conexiune între stimularea autofagiei și creșterea sau scăderea presiunii ambientale a oxigenului (Tanaka et al.2012, Lee et al.2011).

Unii autori consideră că autofagia celulară poate fi implicată în insuficiența respiratorie acută și în sepsis, doua cauze majore ale mortalității și morbidității în întreaga lume (Ryter et al.2014). Insuficiența respiratorie acută poate fi produsă în cazul ventilației mecanice și al hiperoxigenării. Tanaka și colaboratorii săi au descoperit că expunerea organismului în vivo la hiperoxie (hiperoxigenare), va duce la o creștere a valorilor markerilor autofagiei, atat histologic, cât și biochimic, ceea ce va duce la acumularea de LC3B-II și va da startul procesului de autofagie (Tanaka et al., 2012).

Chen și colaboratorii săi au investigat markerii de autofagie în țesutul pulmonar al pacienților ce sufereau de BPCO. Au desoperit ca acestia erau crescuti, inclusiv LC3-II și alte proteine din grupul ATG. De asemenea au observat o creștere a formării autofagozomilor la expunerea la fumul de țigară (Chen et al 2008).

Prezența unor deficiențe genetice în procesul molecular al autofagiei, sunt implicate în multiple afecțiuni, spre exemplu Atg 7 în cazul Klebsiella pneumoniae, iar Atg 9 în cazul Legionella pneumophila (Tung et al.2010;Ye et al.2014).

Alți autori susțin ca autofagia este implicată în neuroprotecție în bolile Huntington și Alzheimer la modele animale (Menzies et al.2011). În alte studii este confirmată importanța sa și în boala Parkinson (Nixon et al.2012)

Replicarea virusului hepatitic C este condiționată de autofagia celulară, deci o inhibiție a acestui proces ar putea duce la inhibiția replicării virale, reprezentând o nouă tință terapeutică (Ke et

al.2014;Sir et al.2008). Vescovo și colaboratorii săi au făcut puncții hepatice pacienților infectați cu virusul hepatitic C și au remarcat o corelație inversă între activarea autofagiei și steatoza hepatică, deci mecanismul autofagiei duce la eliminarea lipidelor în exces (Vescovo et al.2012;Ke et al.2014).

Materiale și metode. Etape de lucru

Animale și design experimental

Studiul este pe model animal, sobolani Sprague Dawley(N=60; 500-900 g), masculi, în vârsta de 18-20 luni la începutul studiului. Acestia vor fi ținuți în condiții standard de laborator, în Biobaza Universitatii de Medicina și Farmacie Craiova. Studiile au fost aprobate de Comisia de Etica a UMF Craiova.

Randomizarea

Șobolanii au fost împărțiți în două grupuri prin randomizare - control și tratament, în funcție de performanțele de la testele preliminare.

Administrarea tratamentului

Administrarea substanței stimuloare a autofagiei (Spt100) va fi în apa de băut a animalelor de laborator, pentru grupul tratament – 25 mg/kgcorp/zi Spt100 în 0,2% Trehaloza. Grupul control va primi doar vehiculul acestei substanțe - soluție 0,2% Trehaloza, în primul experiment. Un al doilea experiment a fost efectuat cu 25 mg/kgcorp/zi SPT100, fără trehaloză, controlul primind doar apă, iar un al treilea experiment a vizat doza de 5mg/kgcorp/zi.

Teste comportamentale

Testele comportamentale efectuate sunt: Rotor rod sau puntea rotitoare (pentru evaluarea funcției motorii), Water-maze (pentru evaluarea funcției cognitive), Forced-swim (pentru evaluarea funcției motorii, a dorinței de supraviețuire), Latența-curiozitate (pentru evaluarea interesului pentru mediul inconjurator), Elevated plus maze (pentru evaluarea anxietății). Acestea vor fi efectuate la un interval de 14 zile.

Evaluarea funcției vestibulo-motorie prin testul rotarod (puntea rotitoare, rotating pole)

Acest test evaluează funcțiile vestibulară și motorie fină, la animalele tratate și la alte modele animale. Fiecare șobolan a fost testat în ceea ce privește capacitatea de a se adapta la trecerea peste o punte rotitoare, a cărei viteză de rotație poate fi modificată.

Dispozitivul constă într-un cilindru cu o lungime de 160 cm și diametru de 12 cm, acoperit cu o suprafață semidură, pentru a nu permite șobolanilor să alunece. Cilindrul se poate roti, cu ajutorul unui potențiomtru, putând ajusta viteza de la 0 la 6 rotații pe minut.

Șobolanul a fost plasat pe cilindru, măsurându-se timpul necesar pentru a traversa cilindrul și de a ajunge la capătul distal, unde se găsește un grup de șobolani, plasați într-o cușcă, pentru a favoriza deplasarea acestuia.

În același timp a fost efectuată și evaluarea neurologică a șobolanilor tratați, prin cuantificarea comportamentului acestora în timpul traversării punții.

Rezultatele au fost exprimate sub forma a două entități: timpul necesar traversării și scorul acordat de către examinator comportamentului animalului de experiență în timpul traversării, după următoarea schemă:

- 0 - șobolanul cade imediat după plasarea pe cilindru, fără a se putea deplasa;
- 1 - șobolanul rămâne pe rotor, dar nu avansează, menținându-și totuși poziția;
- 2 - șobolanul avansează, dar cade înainte să ajungă la capătul distal al cilindrului;
- 3 - șobolanul traversează cu succes, dar având mici dificultăți în a-și menține echilibrul;
- 4 - șobolanul traversează fără greșală cilindrul, prezentând mișcări simetrice ale membrelor.

Pentru acest test, șobolanii trebuie antrenați cel puțin 10 zile înainte de tratament, inițial fără rotire, dar apoi crescând ușor viteza de rotație a cilindrului, până se ajunge la 6 rotații pe minut.

Morris Water Maze

Testul water-maze, descris de Morris, a fost utilizat pentru a evalua memoria și învățarea în spațiu. Cu o săptămână înainte de începerea tratamentului, șobolanii bătrâni au fost antrenați să găsească o platformă submersată într-o piscină mare (cu diametrul de 180 cm) umplută cu apă (temperatură relativ constantă de 24-26 grade Celsius) până cu 20 cm sub marginea superioară. Piscina este împărțită în patru cadrane (nord, sud, est și vest). Diferiți stimuli vizuali au fost plasați în fiecare dintre cele patru cadrane. Pentru achiziția învățării spațiale, fiecare animal a fost supus unui set de patru încercări pe zi, timp de șapte zile.

Forced swim (Înotul forțat)

Testul se desfășoară într-un vas cu diametrul de 20 cm

1. Se umple vasul 3/4 cu apă. Ideal este ca șobolanul să nu atingă cu ghearele fundul vasului și să nu se sprijine în coadă. Este important ca acesta să nu înoate liber în bazin sau să plutească.
2. Temperatura apei trebuie să aibă între 22-26 grade Celsius.
3. Se plasează camera video astfel încât să se vadă întregul cilindru în imagine.
4. Se pune șobolanul în apă, cu membrele inferioare la început.
5. Se scoate șobolanul din apă când nu-și mai poate ține nasul la suprafața apei. Este posibil ca pe parcursul testului aceștia să caute o cale de scăpare la baza cilindrului. Dacă nu ies singuri în 3-4 secunde la suprafață sau nu înoată, se vor scoate din cilindru.
6. Așteptăm maxim 15 minute înainte de a scoate șobolanul din cilindru.
7. Se măsoară timpul total în secunde- rezistența șobolanului la efort și efortul pentru supraviețuire (menținerea capacității de a respira).
8. Se măsoară timpul de activitate în bazin (în secunde)-perioada în care șobolanul se mișcă, înoată sau se cațără, nu se sprijină pe peretii bazinului- reprezintă dorința de a trăi.
9. Se măsoară timpul în care șobolanul stă imobil în bazin (în secunde)-timpul de resemnare ce sugerează depresia.

Testul pentru evaluarea anxietății, Elevated plus maze

Se folosește un labirint suspendat cu patru brațe: două brațe întunecate și două brațe deschise suspendate la 70 de cm deasupra podului. Șobolanul este așezat la capătul unuia dintre brațele deschise și este filmat timp de 5 minute. Se măsoară, în secunde, timpul pe care animalul îl petrece în brațele deschise (dorința de a explora, lipsa anxietății) și timpul petrecut în brațele închise (starea de anxietate).

După sacrificarea animalelor s-au prelevat probe de țesuturi și s-au efectuat studii de genomică, proteomică și imunohistochimie.

Rezultate

ROTATING POLE (ROTOR ROD, PUNTEA ROTITOARE)

Scor: în pretratament șobolanii traversează roata la viteza de 3 rotații pe minut cu oarecare dificultăți asociate vârstei și primesc scorul 3. La creșterea dificultății (6 rotații pe minut), șobolanii bătrâni au primit scorul 2. Inițial nu au fost remarcate diferențe între animalele atribuite celor două grupuri. După începerea tratamentului cu SPT100 (în concentrație de 25

mg/kgc/zi) în apa de băut, performanțele au scăzut odată cu înaintarea în vârstă a animalelor, pentru ambele grupuri în primele 14 săptămâni. Ulterior, șobolanii tratați au început treptat să obțină rezultate mai bune decât controalele, iar îmbunătățirea a devenit semnificativă la ambele viteze dîn săptămâna 28. Tratatamentul a avut un efect semnificativ asupra scorului ($F=5.57$, $p=0.02$, Two way Anova, pentru 3 rpm, respectiv $F=3.64$, $p=0.06$ pentru 6 rpm), iar scorul s-a modificat semnificativ de-a lungul timpului ($F=2.62$, $p=0.0016$ pentru 3 rpm, respectiv $F=2.10$, $p=0.01$ pentru 6 rpm); rezultând o interacțiune semnificativă tratament X timp ($F=21.17$, $p<0.0001$ pentru 3 rpm, respectiv $F=9.61$, $p<0.0001$, pentru 6 rpm).

Timp: În pretratament șobolanii traversau cilindrul în aproximativ 15 secunde la 3 rotații pe minut. La creșterea dificultății (6 rotații pe minut) șobolanii bătrâni au traversat cilindrul în aproximativ 22-26 secunde. Nu s-au observat diferențe semnificative ale performanțelor animalelor atribuite grupurilor control, respectiv tratament. După administrarea SPT100 (în concentrația 25 mg/kgc/zi) în apa de băut, timpul necesar traversării punții rotitoare la 3 rpm a crescut la 40 secunde pentru animalele din grupul control, respectiv 22 secunde pentru cele dîn grupul tratament. La 6 rotații pe minut șobolanii dîn grupul control au traversat puntea rotitoare în 38 secunde, în timp ce performanțele animalelor tratate nu au scăzut semnificativ, exceptând ultimele zile de tratament. Am observat o îmbunătățire semnificativă a timpul necesar traversării punții rotitoare începând cu săptămâna 18, pentru ambele viteze, fiind tranzitorie pentru creșterea dificultății prîn 6rpm. S-a observat un efect semnificativ al tratamentului asupra timpul necesar traversării punții rotitoare ($F=6.36$, $p=0.017$ pentru 3 rpm, $F=4.75$, $p=0.037$ pentru 6 rpm), iar timpul de traversare s-a modificat semnificativ de- a lungul timpului ($F= 4.69$, $p<0.001$, pentru 3rpm, respectiv $F=2.44$, $p=0.0035$, pentru 6 rpm), rezultând o interacțiune semnificativă tratament X timp ($F=19.66$, $p<0.0001$, pentru 3 rpm, respectiv $F=6.14$, $p<0.0001$, pentru 6 rpm).

WATER MAZE

În perioada de antrenament de două săptămâni șobolanii au învățat să localizeze și să se urce pe platforma ascunsă și performanțele s-au îmbunătățit semnificativ în acest timp. Pentru ambele grupuri calea s-a scurtat dîn ce în ce mai mult, odată cu progresia sesiunilor de antrenamente. Totuși, înainte de începerea tratamentului, timpul necesar pentru găsirea platformei a fost de 24 secunde pentru ambele grupuri. După începerea tratamentului cu SPT100 (concentrația 25 mg/kgc/zi) în apa de băut, timpul necesar descoperirii platformei a crescut abrupt până în săptămâna 28 la ambele grupuri. La grupul tratament s-a observat o îmbunătățire tranzitorie. Am remarcat o îmbunătățire semnificativă a timpul de descoperire a platformei sub tratament ($F=8.93$, $p=0.0066$).

EVOLUȚIA GREUTAȚII PE PERIOADA TRATAMENTULUI

Înainte de începerea tratamentului, la vârsta de 18 luni, șobolanii cântăreau, în medie, 721 g. După inițierea tratamentului, șobolanii bătrâni au scăzut treptat în greutate, dar animalele din grupul tratament au fost considerabil mai grele decât cele din grupul control ($p<0.0001$). Cu toate

acestea, interacțiunea dintre timp și tratament nu a fost semnificativă. La momentul sacrificării, greutatea medie a fost de 454 g pentru animalele control, respectiv 532 g pentru animalele din grupul tratament.

CONSUMUL DE LICHIDE PE PERIOADA TRATAMENTULUI

Înainte de începerea tratamentului, la vârsta de 18 luni, volumul de apă ingerat a fost, în medie, de 35 ml/cap/zi. După inițierea tratamentului volumul a scăzut de-a lungul timpului la 22 ml/cap/zi pentru grupul control și 26.6 ml/cap/zi pentru grupul tratament ($p=0.68$ conform t-test). Nu a existat un efect semnificativ al tratamentului asupra consumului de apă.

O diferență semnificativă a fost observată la măsurarea consumului de lichide din primul experiment (concentrația 25 mg/kgc/zi, cu trehaloză), unde grupul tratament a consumat mai multe lichide decât grupul control (t test, $p=0.0081$). La consumul de mâncare nu s-au observat diferențe semnificative.

TESTUL PENTRU EVALUAREA ANXIETĂȚII (ELEVATED PLUS MAZE)

Testul Elevated plus maze este un test comportamental folosit adesea pentru evaluarea anxietății la rozătoare. Animalele din lotul control au arătat un interes mai scăzut în explorarea mediului înconjurător, petrecând mai mult timp în brațele întunecate, acesta fiind un indicator al anxietății. Tratamentul are un efect pozitiv asupra animalelor, diferența dintre grupuri fiind semnificativă ($F=4.81$, $p=0.03$).

TESTUL LATENȚĂ – CURIOSITATE

Îmbătrânirea se asociază cu scăderea curiozității. Latența de explorare a cilindrului a fost înregistrată timp de 5 minute pentru animalele îmbătrânite și analizată într-o manieră dublu-orb folosind o camera de înregistrare cu funcție slow-motion. Din punctual de vedere al efectului timpului pe perioada tratamentului s-au observat diferențe semnificative ($F=5.26$, $p=0.0007$) între grupul control și grupul tratament. Nu s-au remarcat diferențe semnificative ale tratamentului asupra grupurilor.

TESTUL DE ÎNOT FORȚAT (FORCED SWIM)

Odată cu înaintarea în vârstă forța și rezistența fizică se diminuează. Am măsurat dorința de supraviețuire a animalelor prin calcularea timpului de înot și cățărare (timpul de activitate). Nu s-au observat diferențe semnificative între cele două grupuri din punctul de vedere al interacțiunii tratament X timp, dar trecerea timpului a avut un efect înalt semnificativ ($p<0.0001$).

CURBA DE SUPRAVIEȚUIRE

Nu s-au observat diferențe semnificative la nivelul duratei de supraviețuire între grupurile control și tratament.

ANALIZA EXPRESIEI GENICE PRIN REAL TIME – PCR

Studiile au sugerat că SPT100 ar putea avea efect antiinflamator. În consecință, ne-am întrebat dacă tratamentul pe termen lung cu SPT100 reduce expresia genică pentru mai mulți markeri ai inflamației, incluzând: C11, CR3, Tgfb, Cxcl10, CXCR4, Fcgr3a și Stat1. Activitatea astrogliilor (marker GFAP) a fost de asemenea testată. Am descoperit prin Real time- PCR scăderi semnificative în expresia inflamației și markerilor astrogliali în codul de transcripție pentru mRNA al C11, CR3, CXCR4 și GFAP tratament.

Concluzii

În contextul în care vârstnicii reprezintă un procent semnificativ din întreaga populație, autofagia celulară este privită ca o posibilă soluție pentru o îmbătrânire sănătoasă, deși nu ajută la creșterea duratei de supraviețuire.

Studiul acesta este un studiu preliminar care evidențiază faptul că stimularea autofagiei conferă citoprotecție în procesul de îmbătrânire.

Tratamentul cu SPT100, o substanță stimulatorie a autofagiei, a îmbunătățit funcțiile cognitive și motorii la șobolanii bătrâni.

Această substanță este, de asemenea, promițătoare ca antiinflamator și antiapoptotic la nivel central.

Aceste rezultate oferă o direcție de studiu viitoare în ceea ce privește mecanismele protectoare ale stimulării autofagiei în îmbătrânire.