

mgr Witold Norbert Nowak
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

Promotor: prof. dr hab. Alicja Józkowicz

Wpływ stresu oksydacyjnego na komórki szpikowe – charakterystyka komórek zrębu tkankowego pozbawionych *Hmox1*

Cukrzyca wiąże się z dysfunkcją komórek śródbłonna oraz z obniżeniem liczby i aktywności krążących komórek proangiogennych mobilizowanych ze szpiku. Wcześniejsze badania wykonane u myszy wykazały, że ważnym białkiem ułatwiającym zachowanie żywotności i funkcji zarówno komórek śródbłonna jak i proangiogennych komórek szpikowych jest oksygenaza hemowa-1 (*Hmox1*), enzym katalizujący reakcję rozkładu hemu do biliwerdyny, tlenku węgla (II) i jonów Fe^{2+} . Celem prezentowanej pracy było sprawdzenie na ile czynniki stresowe takie jak stres oksydacyjny, hiperglikemia, powikłania rozwijające się u pacjentów z cukrzycą typu II oraz wysiłek fizyczny u pacjentów z chromaniem przestankowym wpływają na mobilizację i funkcje subpopulacji komórek szpikowych oraz na ile wpływ ten jest modyfikowany przez HMOX1.

Stres związany z wysiłkiem fizycznym i niedotlenieniem mięśni u pacjentów z chromaniem przestankowym, zespołem objawowym towarzyszącym miażdżycy naczyń obwodowych, prowadził do zwiększenia liczby krążących komórek proangiogennych CD45dimCD34+CD133+KDR+ oraz obniżenia ekspresji *HMOX1* w leukocytach i poziomu czynnika nekrozy nowotworów α (TNF α) w osoczu. U pacjentów po trzymiesięcznym treningu na bieżni zaobserwowano natomiast obniżenie poziomu tkankowego inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (tPAI-1). Wysiłek fizyczny zarówno przed i po cyklu treningowym wiązał się ze spadkiem poziomu białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1) i zwiększeniem ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w leukocytach krwi obwodowej.

U pacjentów z cukrzycą typu II bez powikłań stwierdziliśmy obniżoną liczbę krążących komórek o fenotypie komórek proangiogennych, mezenchymalnych i hematopoetycznych oraz zmniejszoną ekspresję *HMOX1* i podniesiony poziom *HMOX2* w leukocytach. Powikłania cukrzycy, w szczególności zespół stopy cukrzycowej, wiązały się z nasileniem ekspresji *HMOX1* oraz zwiększeniem liczby krążących komórek proangiogennych CD45dimCD31+CD133+, mezenchymalnych CD45-CD29+CD90+ i hematopoetycznych Lin-CD45+CD133+. Niezależnie od obecności powikłań, u pacjentów z cukrzycą typu II zaobserwowaliśmy obniżoną ekspresję katalazy w leukocytach i podniesiony poziom TNF α w osoczu.

Mysie szpikowe komórki proangiogenne pozbawione oksygenazy hemowej-1 mają zaburzoną aktywność parakrynną. Postanowiliśmy zatem sprawdzić czy zwiększenie ekspresji *HMOX1* za pomocą stymulacji farmakologicznej może nasilić potencjał angiogeny ludzkich komórek CD34+ mobilizowanych do krwi obwodowej czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF). W tym celu sortowane komórki CD34+, hodowane w zdefiniowanych mediach bezsurowiczych, były stymulowane atorwastatyną, kwasem acetylosalicylowym, sulforafanem, resweratrolem lub metforminą. Jedynie sulforafan, aktywator czynnika transkrypcyjnego Nrf2, podnosił w nich ekspresję oksygenazy hemowej-1. Jednak nasilenie parakrynnnej aktywności angiogennej zaobserwowaliśmy *in vitro* tylko w przypadku mediów z dodatkiem komórek stymulowanych atorwastatyną. Efekt ten nie był widoczny *in vivo* w mysim modelu podskórnych implantów matryzelowych.

Niższa liczba krążących komórek o fenotypie mezenchymalnym oraz obniżona ekspresja oksygenazy hemowej-1 w leukocytach pacjentów z cukrzycą typu II skłoniły nas do sprawdzenia właściwości mysich komórek MSC pozbawionych funkcjonalnego genu *Hmox1*. Komórki te uzyskiwaliśmy poprzez trawienie kolagenazą typu II fragmentów mysich kości udowych i piszczelowych. Komórki MSC były następnie oczyszczane z frakcji hematopoetycznej CD45+ za pomocą metody MACS. Komórki

szpikowe *Hmox1*^{+/+} lub *Hmox1*^{-/-} charakteryzowały się podobną zdolnością do tworzenia kolonii komórek fibroblastoidalnych (CFU-F), co świadczy o porównywalnej liczbie MSC. Komórki MSC *Hmox1*^{+/+} lub *Hmox1*^{-/-} miały taki sam fenotyp tj. wykazywały ekspresję markerów powierzchniowych CD29, CD73, CD90, CD49e, CD105, CD106, CD140a oraz brak markerów hematopoetycznych CD45, CD11b i śródbłonkowych CD31 i CD34. Ponadto, MSC *Hmox1*^{+/+} oraz *Hmox1*^{-/-} charakteryzowała podobna proliferacja zarówno w warunkach kontrolnych jak i w zwiększonym stężeniu glukozy. Niezależnie od poziomu ekspresji *Hmox1*, mysie szpikowe komórki MSC produkowały *in vitro* zbliżoną ilość czynników wzrostu i czynników zapalnych: G-CSF, interleukiny 6, CXCL1 (KC), czynnika hamującego białaczkę (LIF), chemokiny z rodziny CXC indukowanej lipopolisacharydem (LIX), czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) oraz MCP-1. Komórki MSC *Hmox1*^{+/+} i *Hmox1*^{-/-} podobnie różnicowały do adipocytów i osteoblastów. Różnicowanie komórek MSC do komórek śródbłonka prowadziło do otrzymania komórek wykazujących ekspresję niektórych markerów śródbłonka takich jak Kdr i czynnik von Willebranda, czy zwiększenia wiązania acetylowanych LDL, ale nie poprawiało ich właściwości angiogennych *in vitro* i *in vivo*. Nieróżnicowane komórki MSC *Hmox1*^{+/+} i *Hmox1*^{-/-} tworzyły podobną ilość struktur naczyńopodobnych na matryzeli w warunkach niskiego i wysokiego stężenia glukozy.

Wszystkie opisywane w publikacjach komórki pozbawione genu *Hmox1* mają obniżoną żywotność w warunkach stresu oksydacyjnego, zwłaszcza wywołanego obecnością hemu. Nasze badania nieoczekiwanie wykazały, że komórki mezenchymalne zarówno *Hmox1*^{+/+} jak i *Hmox1*^{-/-} nie są wrażliwe na heminę, nawet podaną w stężeniu 50 $\mu\text{mol/l}$, mimo że wzrasta w nich poziom nadtlenu wodoru. Zwiększoną śmiertelność komórek MSC *Hmox1*^{-/-} oraz *Hmox1*^{+/+} występuje dopiero przy stężeniu 200 $\mu\text{mol/l}$. Niska wrażliwość komórek *Hmox1*^{-/-} na heminę nie wynika z zaburzonego transportu hemu, gdyż komórki MSC obu genotypów w równym stopniu pobierają hem z pożywki.

Aby wyjaśnić oporność MSC *Hmox1*^{-/-} sprawdziliśmy ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz transportem i syntezą hemu w MSC i fibroblastach z myszy *Hmox1*^{+/+} lub *Hmox1*^{-/-}. MSC, niezależnie od poziomu oksygenazy hemowej-1 i stymulacji heminą wykazywały wyższy poziom zewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (Sod3) niż fibroblasty. Komórki MSC *Hmox1*^{-/-} w obecności heminy zwiększały ekspresję podjednostki katalitycznej i modyfikującej ligazy glutamyl-cysteinowej (Gclc i Gclm) – enzymu kluczowego dla syntezy glutationu, syntetazy glutationu (Gss) oraz reduktazy glutationowej (Gsr), co może prowadzić do zwiększenia puli zredukowanego glutationu. Ponadto, w komórkach MSC *Hmox1*^{-/-} pod wpływem heminy rosła ekspresja peroksyredoksyny 6 (Prdx6) – jedynej peroksyredoksyny wykorzystującej glutation jako czynnik redukujący, oraz ekspresja eksportera hemu – receptora wirusa kociej białaczki podgrupy C (FLVCR). Zarówno w MSC jak i w fibroblastach stymulacja heminą obniżała ekspresję syntazy δ -aminolewulinianu 1 (Alas1), nie wpływała zaś na geny enzymów syntezy hemu i importerów hemu.

Podsumowując, cukrzyca typu II wiąże się z obniżeniem ekspresji oksygenazy hemowej-1 oraz zmniejszeniem liczby krążących komórek progenitorowych. Powikłania cukrzycy zmieniają profil krążących komórek, co podważa możliwość stosowania ich liczby jako markera postępu choroby. Brak oksygenazy hemowej-1 zaburza parakrynną aktywność komórek szpikowych, ale farmakologiczne zwiększenie jej poziomu w ludzkich komórkach CD34+ nie poprawia ich potencjału proangiogenego. W przeciwieństwie do szpikowych komórek proangiogennych, komórki mezenchymalne pozbawione oksygenazy hemowej-1 nie wykazują zaburzeń funkcji i różnicowania, a ich duża oporność na stres oksydacyjny jest związana z podniesieniem ekspresji genów szlaku glutationu.