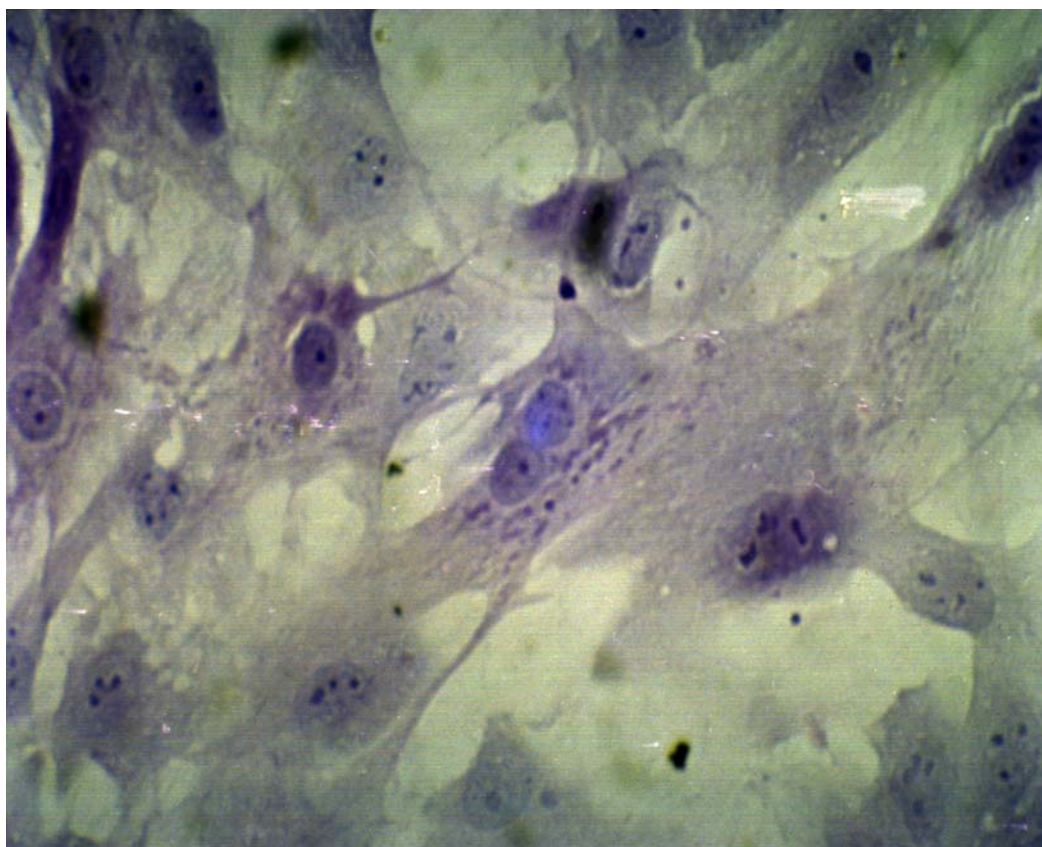


CONSTANTIN MUNTEANU HORIA LAZARESCU DIANA MUNTEANU

ROLUL ESTROGENULUI IN CARDIOPROTECTIE



Editura Balneara
- 2011 -

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

MUNTEANU, CONSTANTIN

Rolul estrogenului în cardioprotecție / Constantin Munteanu,
Horia Lăzărescu, Diana Munteanu. - București : Editura Balneară, 2011

Bibliogr.

Index

ISBN 978-606-92826-7-0

I. Lăzărescu, Horia

II. Munteanu, Diana

612.621.31:612.1



Published by

Editura Balneară - <http://bioclima.ro>

E-mail: secretar@bioclima.ro

B-dul Ion Mihalache, 11A, Sector 1, Bucharest, Romania

CUPRINS

CUPRINS	1
INTRODUCERE	2
CAPITOLUL I	4
Caracterizarea cardiomiocitelor normale si patologice	4
CAPITOLUL II	12
Efecte induse de stressul oxidativ la nivel celular si molecular	12
2.1. Speciile reactive de oxigen	12
2.2. Sisteme de protectie antioxidante	15
2.3. Efectele celulare si metabolice ale ischemiei cardiace	17
CAPITOLUL III	18
Efecte induse de estrogeni la nivel celular si molecular	18
3.1. Originea, structura si functiile 17-estradiolului	18
3.2. Receptorii pentru estrogen	19
3.3. Efectele estradiolului la nivel celular si molecular	22
CAPITOLUL IV	23
Metode de determinare a raspunsului celulelor la tratamentul cu estradiol	23
CAPITOLUL V	24
<i>Elaborarea unei metode terapeutice de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazata pe utilizarea</i> <i>hormonilor estrogeni</i>	24
1. Elaborarea tehnicii de cultura	24
Metode de cultivare a cardiomiocitelor adulte	24
Metode de cultivare a cardiomiocitelor neonatale	27
2. Prepararea 17 β -estradiolului si modul de tratare a culturilor	29
3. Modalitati de inducere a stressului oxidativ	29
4. Metode structurale si biochimice specifice pentru elucidarea la nivel celular si molecular a raspunsului cardiomiocitelor la tratamentul cu estrogeni	29
CAPITOLUL VI	31
<i>Realizarea unei metode terapeutice de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazata pe utilizarea</i> <i>hormonilor estrogeni</i>	31
1. Realizarea culturii de cardiomiocite neonatale	31
Solutii si reactivi	32
2. Determinarea viabilitatii celulare	34
3. Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol	35
4. Realizarea stressului oxidativ	36
CAPITOLUL VII	38
Aspecte morfologice ale cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ, tratate si netratate cu estrogeni	38
1. Realizarea culturii de cardiomiocite neonatale	38
2. Realizarea stressului oxidativ	38
3. Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol	39
CAPITOLUL VIII	39
Evaluarea aspectelor morfologice ale cardiomiocitelor supuse stressului oxidative si tratate cu estrogeni	39
1. Studii de microscopie optica privind caracteristicile cardiomiocitelor normale si supuse stressului oxidativ	39
2. Studiul proteinelor contractile (α -actina si α -tropomiozina)	43
3. Aspecte electronmicroscopice ale actiunii estradiolului asupra cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ	51
4. Discutii	62
CAPITOLUL IX	64
Determinarea viabilitatii celulare	64
Discutii	66
CAPITOLUL X	67
Determinarea diviziunii celulare	67
Discutii	68
CAPITOLUL XI	68
<i>Determinarea cantitatii de proteina celulara</i>	68
CAPITOLUL XII	70
<i>Determinarea apoptozei celulare</i>	70
a. Determinarea proteinei p53	70
b. Activitatea pompei de sodiu si potasiu	71
CONCLUZII	75
BIBLIOGRAFIE	76

INTRODUCERE

În foarte multe țări bolile cardiovasculare sunt o cauză majoră de morbiditate și mortalitate. Mortalitatea prin boli cardiovasculare este net mai crescută la bărbați decât la femei, la care există o creștere rapidă a patologiei ischemice cardiace abia după instalarea menopauzei. Această evoluție naturală a bolilor cardiovasculare este, cel puțin în parte, datorată influenței hormonilor estrogeni, dintre care cel mai important este 17β estradiolul.

Ischemia miocardică inițiază modificări progresive la nivel celular care, în final, duc la moarte celulară și necroză tisulară. S-au încercat o serie de tratamente pentru a reduce leziunile cardiace ca urmare a episodului ischemic. Aceste tratamente sunt esențiale pentru a preveni lipsa oxigenului de la nivelul țesutului pe termen lung dar sunt însoțite de efecte negative și leziuni celulare. Astfel, când sângele oxigenat reîntră în țesutul cardiac hipoxic se inițiază o serie de reacții care conduc la lezarea celulară și tisulară. Acesta distrugere celulară este numită leziune de reperfuzie (45).

În urma proceselor de ischemie/reperfuzie are loc producția masivă și accelerată de factori oxidanți precum și depășirea sistemelor antioxidante conduc la apariția în exces a speciilor reactive ale oxigenului. (54). Această creștere a nivelului intracelular de oxidanți duce la lezarea diferitelor componente celulare și/sau activarea unor cai specifice de semnalizare și implicit la apariția unor stări patologice (13 ; 11).

La mijlocul anilor '50, Denham Harman a elaborat "teoria radicalilor liberi" arătând că radicalii endogeni de oxigen sunt generați în celulă și determină apariția unor leziuni celulare (22). Deși conceptul de oxidanți endogeni a fost controversat, identificarea superoxid dismutazei (SOD), o enzimă a cărei funcție este de a îndepărta ionii superoxid, a venit în sprijinul ipotezei lui Harman (34).

Pentru înțelegerea mecanismelor implicate în funcționarea miocardului normal și patologic precum și pentru a stabili noi metode de cardioprotecție sunt necesare modele experimentale care să corespundă necesităților studiilor efectuate. Modelele experimentale cele mai utilizate în studiile de cardiologie sunt organul (inimă) izolat și cultura de celule (cardiomiocite).

Cultura de cardiomiocite permite observarea efectelor diferitelor agenți chimici și/ sau farmaceutici la nivel celular, efecte declanșate de acestea fără implicarea fluxului sanguin și a sistemului neuro-endocrin. În plus, culturile celulare sunt modele simple și reproductibile ce permit monitorizarea toxicității selective și inducerea morții celulare.

Cultura de cardiomiocite elimină variabilitatea interindividuală și permite studiul metabolismului și a mecanismelor de reglare ale enzimelor ce metabolizează medicamentele, în diferite condiții experimentale.

În plus, culturile primare permit, printre altele, diminuarea utilizării animalelor de laborator care necesită condiții specifice (t^0 , dietă, număr limitat de teste) ceea ce duce la creșterea costurilor studiilor.

Prin studiile *in vitro* se pot urmări morfologia celulară, sinteza proteinelor, metabolismul energetic, interacția cu receptorul și captarea-eliberarea ligandului ca și captarea și eliberarea electrolitilor și neelectrolitilor. Dispersia celulelor în cultură permite accesul la suprafețele membranare pentru studii de electrofiziologie și de asemenea pentru transportul și toxicitatea diferitelor substanțe.

Cultura de cardiomiocite permite evaluarea directă a efectelor compusilor chimici și/sau farmaceutici asupra sistemului cardiac. Diferitele substanțe pot fi administrate culturilor celulare în concentrații farmacologice cunoscute. Se pot elimina astfel interacțiile metabolice cu alte celule sau organe. Moleculele chimice pot fi adăugate și îndepărtate cu ușurință din mediul de cultură putând fi astfel studiate efectele acestora pe termen lung.

Cultura celulară face posibilă studiarea interacțiilor cardiomiocitelor cu alte tipuri celulare (fibroblaste cardiace, celule endoteliale) prin co-cultivarea acestora sub formă de monostraturi separate, în aceeași placă de cultură. Sistemul astfel realizat poate aduce informații despre modul în care răspund cardiomiocitelor la mediul condiționat de alte tipuri celulare și invers precum și despre modul în care este afectată dezvoltarea și funcționarea acestora.

Efectuarea unor studii privind efectele hormonale estrogeni asupra cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ în vederea elaborării, realizării și experimentării unei metode de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazată pe utilizarea hormonilor estrogeni reprezintă subiectul tratat în această carte.

Pentru realizarea acestui obiectiv, în prima etapă din cadrul acestui proiect s-au efectuat cercetări privind caracterizarea structurală și ultrastructurală a cardiomiocitelor *in vivo* și *in vitro* în condiții normale și patologice. În cadrul acestei etape s-au stabilit caracteristicile cardiomiocitelor normale și patologice, efectele induse de stressul oxidativ la nivel celular și molecular, efectele induse de estrogeni la nivel celular și molecular și metodele de determinare a răspunsului celulelor la tratamentul cu estrogeni.

Pornind de la aceste date stabilite anterior, în cadrul acestui proiect s-a elaborat, s-a realizat și experimentat metoda terapeutică de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazată pe utilizarea hormonilor estrogeni, care constituie obiectivul general al proiectului.

CAPITOLUL I

Caracterizarea cardiomiocitelor normale si patologice

Miocitele ocupa 80% din masa cardiaca, restul fiind reprezentat de fibroblaste, neuroni, celule endoteliale, celulele epicardului si endocardului.

Din punct de vedere morfologic, cardiomiocitele sunt celule alungite, ramificate cu unul sau doi nucleii situati in centrul celulei. Celulele vin in contact unele cu altele la nivelul discurilor intercalare, numite si membrane scalariforme sau discuri Eberth. In general, miocitele au 100-150 μm lungime si 20-35 μm latime.

In ventricule, cardiomiocitele sunt organizate in straturi cu orientare uniforma. In atrii celulele musculare tind sa formeze benzi de diferite marimi, care se incruciseaza.

Cu unele exceptii, miocitele atriale sunt asemanatoare ultrastructural cu cele ventriculare. Diametrul miocitelor atriale este mai mic (6-10 μm) si multe celule nu au sistem tubular T. In plus, celulele atriale prezinta granule atriale specifice, care contin factorul natriuretic atrial (51).

Ultrastructural, cardiomiocitele prezinta o serie de particularitati structurale (Fig.1).

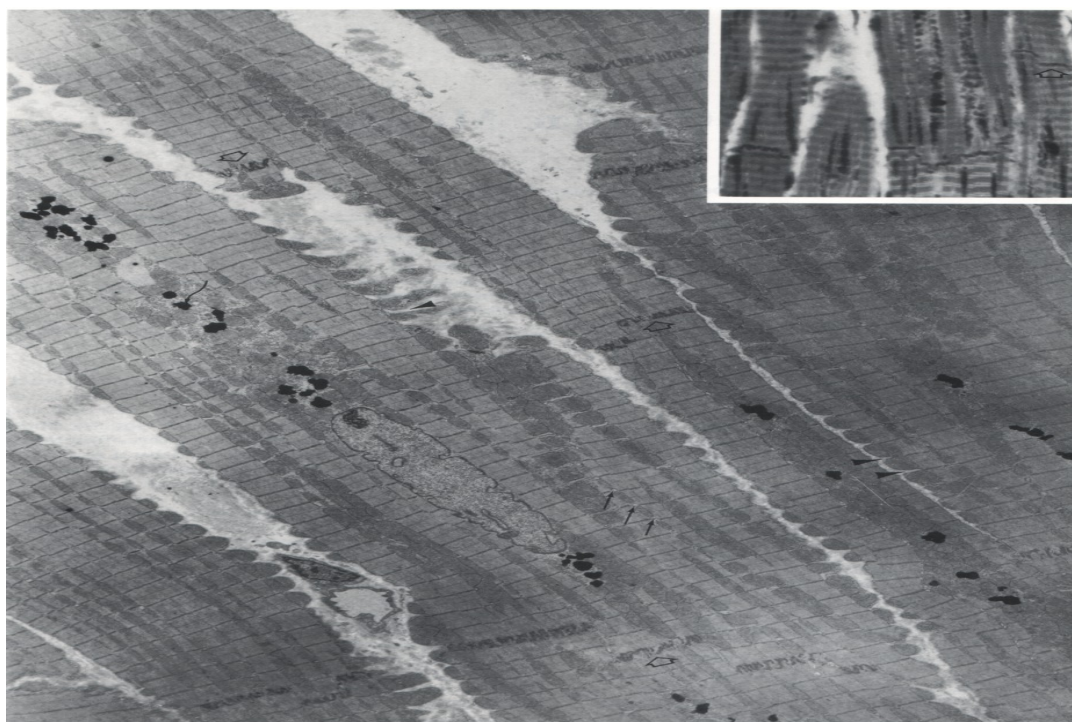


Fig. 1. Imagine electrono-microscopica si optica (insert) a cardiomiocitelor contractate. Discuri intercalare (sageata mare) ; Tubi transversii T (sageti subtiri).

Membrana plasmatica sau sarcolema prezinta o serie de regiuni specializate de tipul discurilor intercalare si a sistemului tubular T. Plasmalema este ancorata la citoscheletul intracelular prin fibre de ancorare de 10 nm diametrul. Aceste fibre de ancorare ataseaza plasmalema la nivelul striilor Z. Sarcolema este acoperita de o lamina bazala de ~50 nm alcatuita din doua straturi, lamina densa si lamina lucida.

Caveolele sunt distribuite difuz sub membrana plasmatica cu o predilectie pentru zonele in care sunt prezente striile Z. Ele sunt de asemenea numeroase in vecinatatea discurilor intercalare si adesea formeaza grupuri in celulele nodului sinoatrial.

Plasmalema prezinta trei tipuri de jonctiuni care de regula sunt combinate in discurile intercalare: (a) desmozomi (macula adherens); (b) jonctiuni intermediare (fascia adherens); (c) jonctiuni comunicante "gap" (Fig.2).

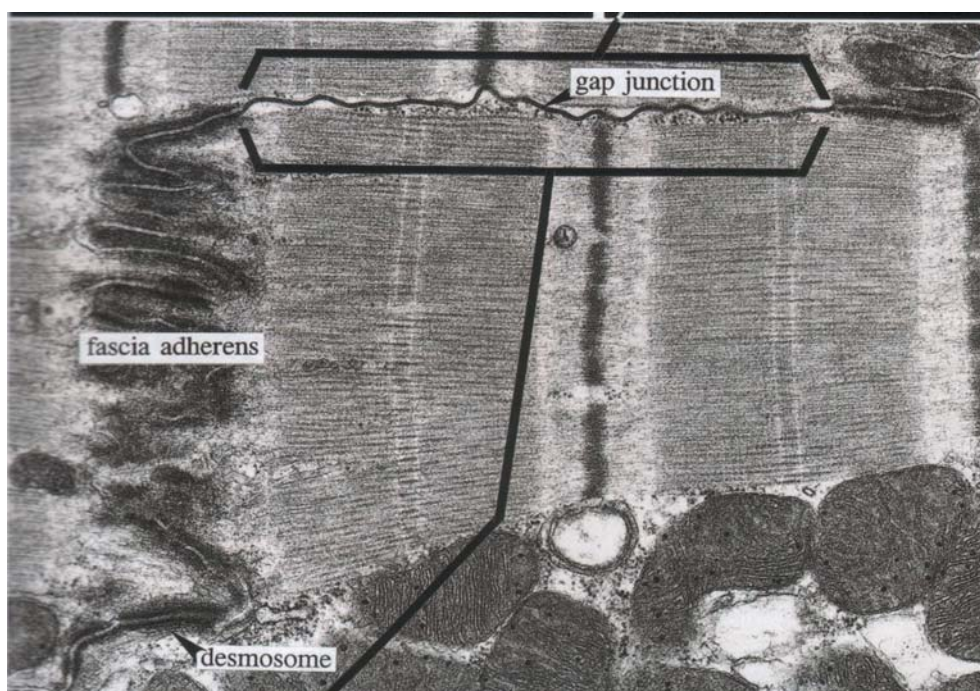


Fig. 2 Imagine electrono-microscopica a celor trei tipuri de jonctiuni celulare de la nivelul discurilor intercalare.

Desmozomii si jonctiunile intermediare au in principal functii adezive. Desmozomii sunt foarte numerosi intre celulele miocardice conducatoare ale excitatiei (celulele Purkinje).

Jonctiunile comunicante "gap" reprezint` substratul anatomic al functionarii muschiului cardiac. Ele sunt dispuse in general paralel cu axa longitudinala a miocitului ca parte a discului intercalar.

Jonctiunile "gap" sunt canale comunicante care joaca un rol important in coordonarea, diferentierea si cresterea celulelor si sunt responsabile pentru sincronizarea activarii electrice si a contractiei cardiomiocitelor (9).

Fiecare jonctiune "gap" este formata dintr-o pereche de hemicanale, cunoscute sub denumirea de conexoni. Conexonul, structura hexamerica este compus din sase molecule de conexine (Cx).

Conexinele sunt proteine integrale de membrana care contin patru domenii transmembranare si ambele capete N- si C-terminal in citoplasma. In inima au fost identificate cel putin trei conexine, Cx37, Cx43 si Cx45. In cardiomiocitele mamaliene principala conexina exprimata este Cx45 (48). In cardiomiocitele din miocardul normal Cx43 este sintetizata in forma nefosforilata si ulterior inserata in membrana plasmatica unde este convertita la forma fosforilata. Cx43 fosforilata reprezinta forma functionala majora.

In boala cardiaca ischemica si in hipertrofia ventriculara se produce o alterare a numarului, organizarii si distributiei jonctiunilor gap cu pierderea conexinei 43 (56 ; 48). In culturile de cardiomiocite neonatale, inhibarea sintezei conexinei 43 determina scaderea cuplarii miocitelor si cresterea numarului de celule apoptotice (38). In cazul conexinei 40 s-a constatat o crestere a cantitatii acesteia in cazul bolii cardiace ischemice (48).

Tubii transversi sunt invaginari ale membranei plasmactice a miocitelor ventriculare la nivelul striilor Z si contin atat elemente transversale cat si longitudinale. Marea majoritate a tubulilor sunt orientati transversal fata de axa longitudinala a cardiomiocitelor. Sistemul tubular T in cardiomiocitele mamiferelor este foarte sinuos si prezinta mari variatii in diametru.

Acest sistem tubular este prezent in tesutul cardiac de la toate speciile de mamifere investigate dar lipseste la amfibieni, reptile si pasari. La multe mamifere, el se formeaza in cursul saptamanilor 6-8 post-natale. La mamifere, tubii T sunt predominanti in miocitele ventriculare si absenti sau foarte putin dezvoltati in cele atriale si cele conducatoare ale excitatiei, desi un studiu recent a sugerat ca ~50% din miocitele atriale prezinta un sistem tubular T difuz (26).

Procentul volumului ocupat de tubii T variaza de la 3,6% in miocitele de sobolan la 0,8% in miocitele de soarece. Tubii T din cardiomiocite au un diametru de ~ 200-300 nm, desi intr-un singur cardiomiocit ventricular de sobolan diametrul tubilor individuali poate varia de la 20 la 450 nm, insa mai mult de jumatate din acestia au diametre cuprinse intre 180 si 280 nm.

Miocitele ventriculare embrionare si de la nou-nascuti, celulele atriale si celulele Purkinje nu au tubi T sau acestia sunt difuzi. In plus, miocitele ventriculare adulte mentinute in cultura pierd sistemul tubular T. In miocitele fara tubi T stimularea electrica determina o crestere a $[Ca^{2+}]_i$ care are loc initial la periferia celulei dupa care se propaga in interiorul celulei in miocitele atriale si miocitele in cultura si prin difuzie in cardiomiocitele de nou-nascut si celulele Purkinje.

Din contra, in miocitele ventriculare adulte eliberarea de Ca^{2+} are loc sincron de-a lungul celulei. In inima umana hipertrofica, tubii T apar cu forme anormale sau sunt dilatati (4).

Reticulul sarcoplasmic este reprezentat de o retea tubulara ce inconjoara miofibrilele si are rolul de a sechestra Ca^{2+} necesar pentru relaxarea muschiului. Reticulul sarcoplasmic are doua componente: (a) reticulul sarcoplasmic jonctional, care exista in trei forme: propriu, extins si corbular (b) reticulul sarcoplasmic liber care formeaza reteaua Z, reteaua M, tubulii Z si segmentele longitudinale ale reticulului sarcoplasmic. Reticulul sarcoplasmic jonctional din muschiul cardiac este reprezentat de un tubul aplatizat, uneori usor dilatat intr-o dimensiune care contine material electronodens. Este sinonim cu cisterna terminala din muschiul scheletic. Reticulul sarcoplasmic liber este reprezentat de o retea de tubuli netezi si este in continuitate cu cel jonctional. Tubulii Z sunt ancorati la nivelul striilor Z. Retele Z si M sunt conectate prin segmente tubulare netede, scurte de reticul sarcoplasmic liber, orientat longitudinal.

Miofibrilele sunt asamblate in unitati repetitive mici numite sarcomere, fiecare intre doua strii Z si reprezentand baza structurala a contractiei. Lungimea sarcomerelor este de $\sim 2\text{-}2,5\ \mu\text{m}$ insa aceasta depinde de starea de contractie. Striatiile sunt produse de filamentele subtiri de actina care formeaza benzile clare I (izotrope in lumina polarizata) si de filamentele groase de miozina care formeaza benzile intunecate A (anizotrope in lumina polarizata). Benzile A au un diametru constant de $1,65\ \mu\text{m}$. Benzile H contin numai filamentele de miozina.

In urma infarctului miocardic apar modificari hialine ale fibrelor si disparitia striilor. Apar numeroase picnoze si cariolize nucleare. Dupa 4-5 ore devine evidenta disparitia striatiilor transversale. Scaderea activitatii enzimatice (succindehidrogenaza, lactat dehidrogenaza) apare evidenta dupa 24 ore de la ischemie .

Mitocondriile cuprind o proportie mare ($\sim 30\%$) din volumul total al cardiomiocitelor. Ele se gasesc frecvent in apropierea jonctiunilor "gap" si uneori se infasoara in jurul lor. Ischemia este asociata cu umflarea mitocondriilor, pierderea cristelor si reducerea volumului matricei. Reperfuzia este asociata fie cu contracararea schimbarilor ultrastructurale asociate cu leziunea reversibila a miocitelor, fie cu acumularea intramitocondriala de calciu, care este caracteristica leziunii ireversibile (1).

Lizozomii, corpii multiveziculari, veziculele autofagice, granulele de lipofuscina si peroxizomii sunt localizate de obicei in spatiul perinuclear. Granulele de glicogen sunt frecvente in cardiomiocite.

Cardiomiocitul contine toate celei trei clase de elemente citoscheletice: (a) microtubuli; (b) microfilamente de actina; (c) filamente intermediare. Microtubulii se gasesc in regiunea perinucleara, in special in vecinatatea centriolilor si intre spatiile interfibrilare. In muschiul cardiac adult, filamentul intermediar principal este desmina care formeaza o retea orientata in directii longitudinale si transversale. Filamentele intermediare se ataseaza la discurile Z. Costamerele reprezinta structuri care contin vinculina si ancoreaza discurile Z ale miofibrilelor periferice la sarcolema.

Studiile *in vitro* au demonstrat ca aceste caracteristici structurale si ultrastructurale ale cardiomiocitelor se mentin si in cultura. Cardiomiocitele adulte au forma de baston cu marginile bine definite si benzi sarcomerice distincte (Fig 3).

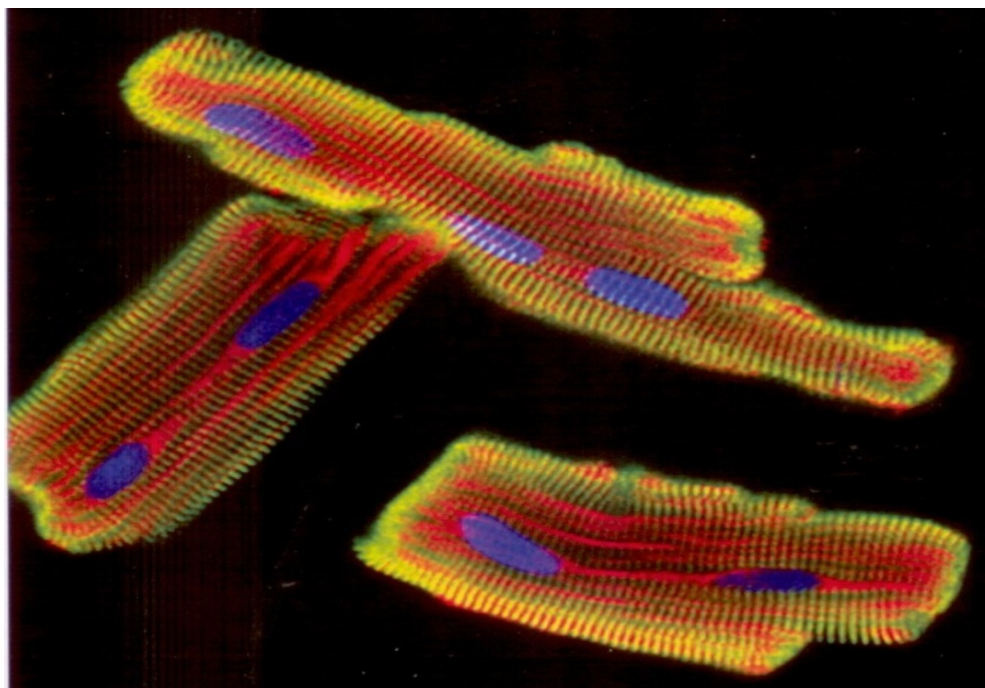


Fig. 3. Imagine de microscopie confocala a cardiomiocitelor adulte - coloratie imunofluorescenta tripla. Verde- actina sarcomerica ; rosu – mitocondrii ; albastru – nucleu.

In urma studiilor de imunocitochimie s-a demonstrat ca aceste benzi contin α -actina, MLC-2 (myosin light chain) si tropomiozina. Benzile A si I ca si striile Z sunt bine definite. Ansamblul sarcomeric are o dimensiune de $\sim 2,8 \mu\text{m}$ similar celui din cardiomiocitele crioconservate (3). Mitocondriile sunt situate intre sarcomere (24).

La 2 zile de cultura, sarcolema cardiomiocitelor adulte este neteda la capete si are un glicocalix continuu. La acest interval capetele majoritatii celulelor se largesc si extind pseudopode. Ultrastructura celulelor pentru primele sapte zile in cultura evidentiaza mentinerea miofibrilelor, sarcomerelor, mitocondriilor, reticulului sarcoplasmic si tubulilor T. Anomaliile in cursul primelor zile sunt reprezentate de internalizarea jonctiunilor gap si dezvoltarea de pseudopode. In ziua a sasea exista semne ale inceputului rarefierii miofibrilelor, asemanatoare atrofiei in muschii scheletici denervati. Dupa sapte zile, celulele se rotunjesc si sunt pierdute odata cu

schimbarea mediului. Celulele care raman, se imprastie in a doua saptamana de cultura.

Miocitele nou izolate cu morfologie alungita *in vivo* capata gradat o forma sferica. Rotunjirea incepe la unul sau ambele capete si progresa central. 50% din celule sufera tranzitia de la alungit la rotund in cinci zile, cu o medie de timp de 1-9 zile (Fig.4). In cursul rotunjirii regiunea discurilor intercalare reprezinta situsul modificarilor celor mai timpurii. Miofibrilele isi pierd organizarea paralela, strans impachetata si are loc alterarea mitocondriilor, reticulului sarcoplasmic si tubulilor T. Dupa 28 de zile celulele au structura miotipica caracteristica.

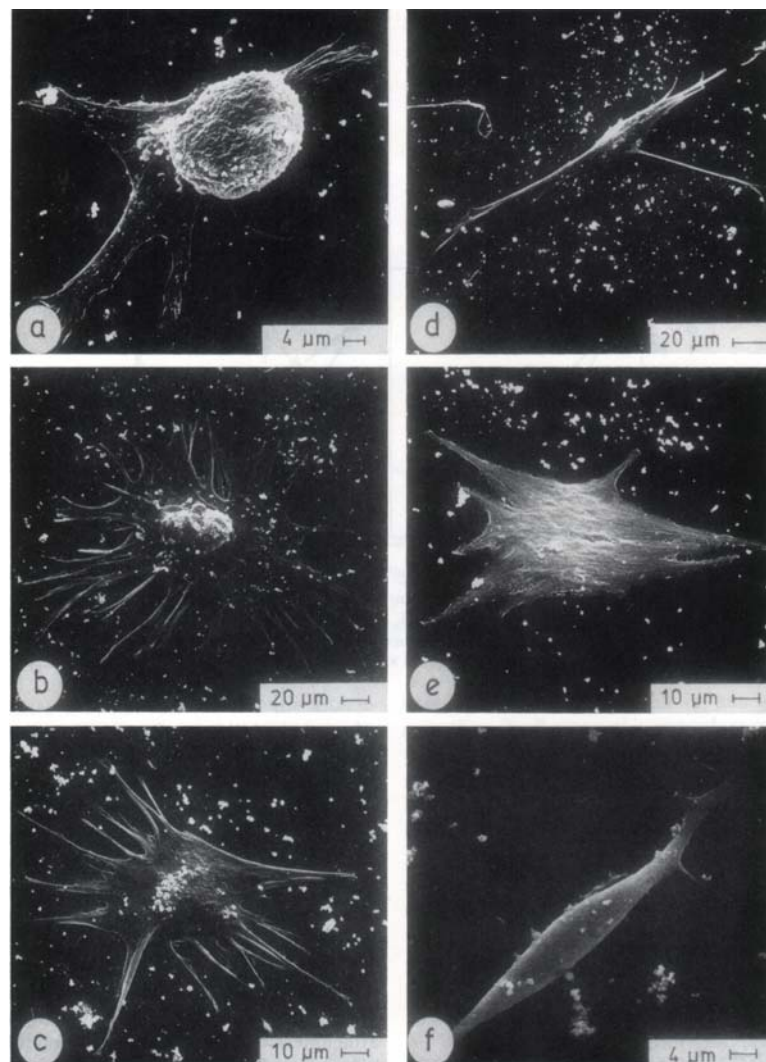


Fig. 4. Imagini de microscopie electronica scanning care evidentiaza fenotipurile cardiomiocitelor dupa 9 zile de cultura.

Studiile realizate de Kato si al., (25) pe culturile pe termen scurt au indicat ca 60% din cardiomiocite mor dupa prima zi de cultura, 81% dupa trei zile si 90% dupa sapte zile. S-au identificat trei tipuri de celule in culturile pe termen scurt: (1) celule alungite cu membrane intacte; (2) celule ne-alungite cu sarcolemma intacta; (3) celule ne-alungite cu membrane alterate (Fig.5).

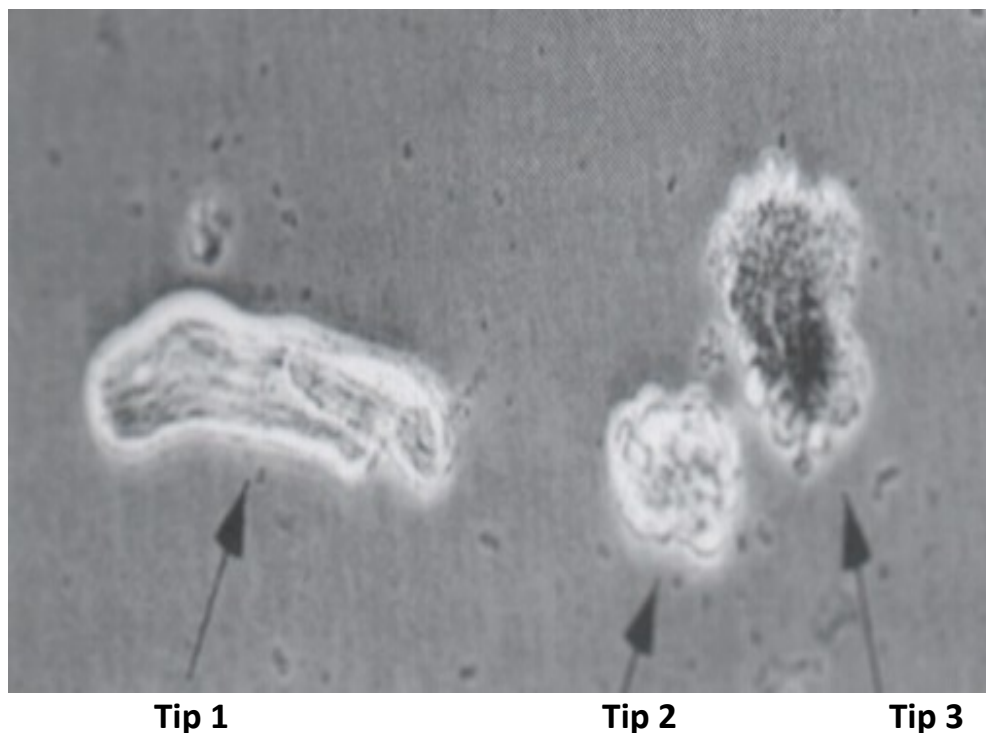


Fig. 5. Tipuri de cardiomiocite observate in culturile pe termen scurt.

Pe parcursul culturii, celulele tip 1 descresc, cele de tip 2 raman constante, in timp ce numarul de celule tip 3 creste initial dupa care ramane constant. Analizele electrono-microscopice au demonstrat ca celulele tip 1 sunt reprezentate de cardiomiocite viabile, tipul 2 cuprinde o populatie mixta de celule viabile si apoptotice in timp ce tipul 3 este format din celule oncotice si necrotice (Fig.6).

Cardiomiocitele apoptotice sunt contractate, cu organite relativ intacte, nuclei heterocromatici si sarcolemma intacta. Unele celule apoptotice au prezentat sarcolemma si mitocondriile degradate insa ele s-au caracterizat prin condensarea apoptotica a cromatinei si formarea de corpi apoptotici. Cardiomiocitele oncotice s-au caracterizat prin dezorganizarea sarcolemei si a organitelor. Mitocondriile au fost umflate si prezentau corpi densi amorfi.

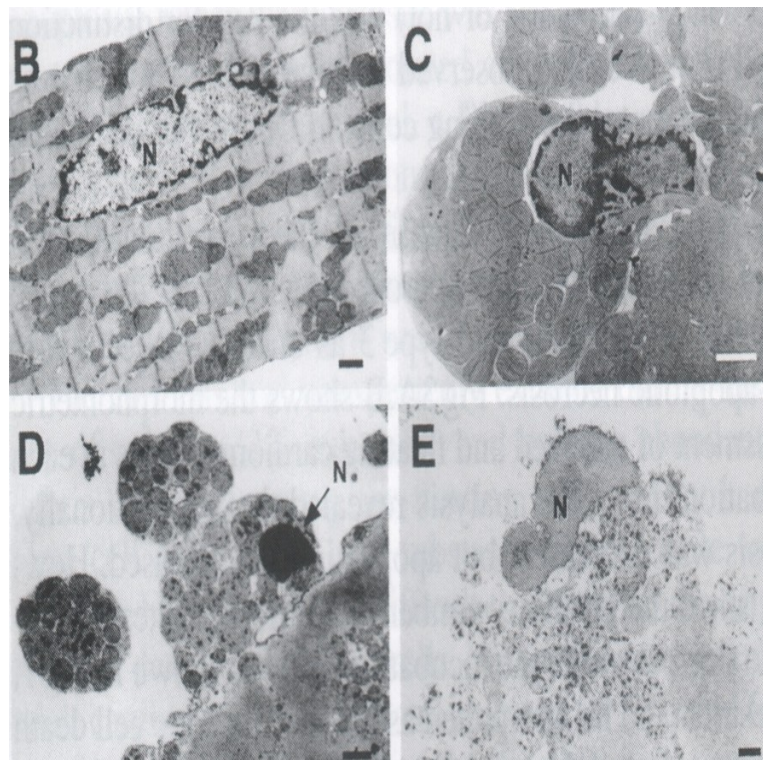


Fig. 6. Imagini electrono-microscopice ale cardiomiocitelor adulte in cultura.
 B-cardiomiocit tip 1 ; C – cardiomiocit tip 2 ; D – cardiomiocit tip 3 ; N –
 nucleu.

CAPITOLUL II

Efecte induse de stressul oxidativ la nivel celular si molecular

2.1. Speciile reactive de oxigen

Oxigenul este esential pentru viata aeroba dar expunerea organismelor aerobe la concentratii ale oxigenului mai mari decat concentratia atmosferica (21%) are efecte toxice.

In organism, toxicitatea oxigenului este generata de superproductia de specii reactive ale oxigenului – ROS (36 ; 11). ROS au multiple situsuri de actiune asupra celulei cardiace si pot avea un efect benefic sau toxic in functie de tipul si concentratia ROS. Mai mult, efectele ROS depind nu numai de concentratia moleculelor pro-oxidante generate ci si de rezervele de antioxidanti ale tesutului. La concentratii fiziologice, ROS pot functiona ca mesageri secundari. ROS influenteaza cresterea si diviziunea normala, stimuleaza sinteza ADN si induce expresia genelor c-fos, c-jun, c-myc precum si activarea kinazelor redox-sensibile si a fosfatazelor care moduleaza transcriptia genelor. In conditii patologice cresterea cantitatii de ROS determina alterari semnificative ale proteinelor celulare si acizilor nucleici (5).

Din categoria ROS fac parte anionul superoxid ($O_2^{\cdot-}$), radicalul hidroxil ($\cdot OH$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) si peroxizii lipidici (31). Superoxidul si radicalul hidroxil sunt instabile, in timp ce peroxidul de hidrogen are capacitate de difuzie si o durata de viata relativ lunga (13).

Anionul superoxid se formeaza prin reducerea moleculei de oxigen. Reducerea ulterioara a acestui anion spontan sau in prezenta superoxid dismutazei (SOD) determina formarea peroxidului de hidrogen (Fig. 7). In timp ce peroxidul de hidrogen este descompus de catalaza sau peroxidaza in apa si oxigen, radicalul hidroxil este generat in cursul reactiei Fenton sau Haber-Weiss (31).

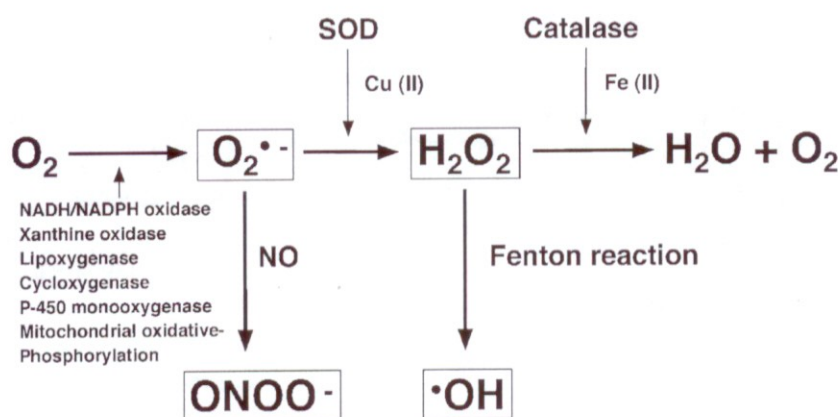


Fig. 7. Sursele de specii reactive de oxigen si caile metabolice ale acestor specii.

a. Sursa majora de ROS o constituie lantul transportor de electroni din mitocondrii. NADH-ul generat in cantitate crescuta in timpul ischemiei accelereaza activitatea lantului respirator in momentul reintroducerii oxigenului. Astfel, o parte din oxigen sufera reduceri parțiale care conduc la formarea anionului superoxid ($O_2^{\cdot -}$). Producerea radicalului superoxid se realizeaza in principal in doua puncte ale lantului transportor de electroni si anume complexul I (NADH dehidrogenaza) si complexul III (ubiquinona- citocrom c reductaza). In conditii metabolice normale, complexul III este principalul loc de formare a ROS. Electronii din complexe I si II sunt transferati la ubiquinona. Forma redusa a ubiquinonei (QH_2) sufera doua reactii de reducere (ciclul Q) care au ca rezultat generarea superoxidului in urma transferului de electroni direct unei molecule de oxigen (Fig. 8). Odata produs, superoxidul poate fi redus de catre SOD cu formare de H_2O_2 care este metabolizat ulterior de catre catalaza si glutatيون reductaza la H_2O si O_2 (13). Generarea superoxidului nu este o reactie enzimatica atfel incat o rata mare a metabolismului determina si o rata ridicata a producerii ROS. Pe de alta parte, distrugerea mitocondriilor afectate determina eliberarea elementelor lantului respirator in citosol ceea ce produce o reducere partiala a oxigenului.

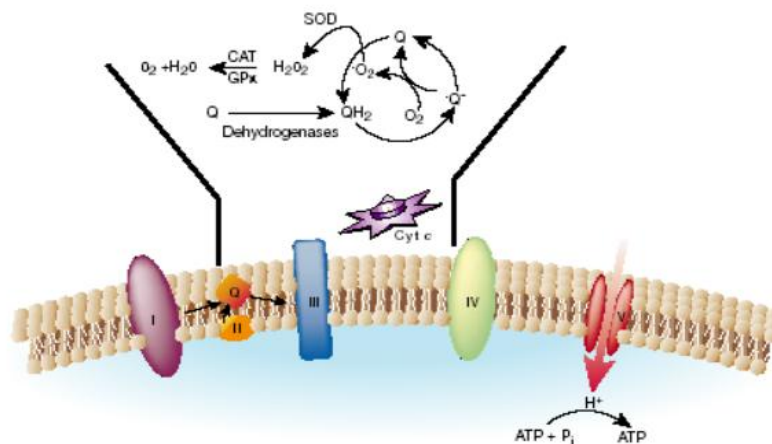
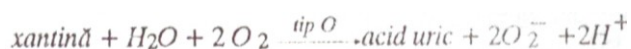


Fig. 8. Producerea radicalilor liberi ai oxigenului la nivelul lantului respirator mitocondrial.

b. O alta cale de producere a anionului superoxid in miocardul postischemic o reprezinta xantinoxidaza (tipul O) (5). In tesutul sanatos aceasta se sintetizeaza in forma D, ca dehidrogenaza, capabila sa reduca NAD^+ si oxidand xantina la acid uric:



În cursul ischemiei se produce conversia tipului D în tipul O, care utilizează oxigen molecular și generează superoxid:



Procesul se inițiază în momentul în care aportul de sânge în țesuturi este scăzut, întrucât cantitatea de oxigen necesară producerii ATP este redusă, dezechilibrând astfel gradientii ionici transmembranari cu redistribuția ionilor de calciu (Fig. 9). Creșterea concentrației de calciu în citosol activează o protează care va transforma xantin oxidaza în dehidrogenază. Concomitent, depleția ATP conduce la acumularea de AMP, care va fi catabolizat în hipoxantina, substrat purinic oxidabil de către xantin oxidaza (61).

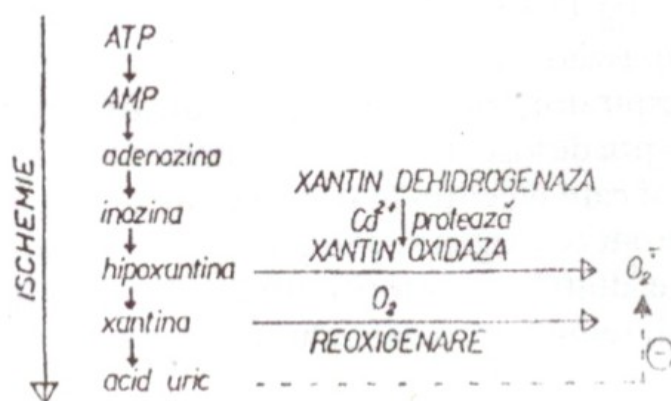


Fig. 9. Mecanismul formării radicalului superoxid pe calea xantin-oxidazei în timpul reperfuziei.

c. Metabolismul acidului arahidonic reprezintă veriga cea mai complexă din mecanismul de producere a morții celulare prin atac radicalic. Acidul arahidonic constituie punctul de pornire a trei cai metabolice deosebit de importante: a prostaglandinelor via ciclooxygenaza, a leucotrienelor via lipooxygenaza și calea lipoxinelor (Fig. 10). Sinteza prostaglandinelor inițiată în cursul agresiunii ischemice se desavârșește în timpul reperfuziei deoarece ciclooxygenaza utilizează oxigen celular și necesită prezența hem-ului pentru acțiunea sa. La trecerea PGG_2 în PGH_2 se eliberează un radical hidroxil care acționează asupra ciclooxygenazei inactivând calea de sinteză a prostaglandinelor (61).

Un alt sistem de protecție este reprezentat de proteinele aparute ca urmare a stresului oxidativ. Astfel, factorul nuclear κB (NF- κB) și AP-1 sunt în cantitate mare în miocardul supus ischemiei-reperfuziei. Când miocardul este adaptat stresului ischemic prin ischemii și reperfuzii repetate, NF- κB rămâne în cantitate mare în timp ce AP-1 legat se află în cantitate mică. NF- κB controlează gena anti-apoptotică Bcl-2 și factorii pro-apoptotici Bax și p53 în miocardul supus ischemiei-reperfuziei. Activarea NF- κB poate fi blocată de antioxidanți precum vitamina E și acidul α -lipoic (10).

Un rol important în cardioprotecție revine proteinelor de șoc termic (Hsp). Astfel, superexpresia Hsp70 stimulează funcțiile miocardice, funcțiile metabolice și reduce mărimea infarctului după ischemie-reperfuzie. În afară de Hsp70, Hsp27 și β -cristalinul pot proteja cardiomiocitele *in vitro* împotriva leziunilor ischemice (2).

De asemenea, genele antiapoptotice Bcl-2 și p53 au un rol important în cardioprotecție. Expresia genei Bcl-2 este inhibată în miocardul ischemic-reperfuzat dar este stimulată în miocardul adaptat. Totodată, se produce o creștere semnificativă a exprimării genei p53 ca urmare a ischemiei.

Antioxidanții nonenzimatici din alimente reprezentați de vitamine și compuși fenolici s-au dovedit a avea efect antioxidant. Acțiunea vitaminei E asupra bolilor cardiovasculare este controversată. Astfel, unele studii au arătat că vitamina E scade incidența evenimentelor cardiovasculare în timp ce altele au arătat că vitaminele E, C și β -carotenii nu au o importanță deosebită în prevenirea bolii coronariene. În Heart Protection Study s-a arătat că tratamentul zilnic timp de 5 ani cu vitaminele E, C și β -carotenii nu reduce rata mortalității sau incidența oricărui tip de boală vasculară. În ceea ce privește peroxidarea lipidică, studiile *in vivo* au arătat că vitamina E nu are efecte semnificative asupra peroxidării lipidice. Alți autori au demonstrat că vitamina E, la fel ca vitamina C, împiedică peroxidarea lipidică *in vivo*. Tratamentul cu vitamina E împiedică creșterea malondialdehidei, reface activitatea schimbătorului $Na^+ - Ca^{2+}$, și atenuează disfuncția cardiacă (6). În Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention Study se arată că suplimentarea cu vitaminele E și C împiedică progresia aterosclerozei (6).

Recent s-a descoperit că în țările mediteraneene cu o dietă bogată în grăsimi și colesterol incidența bolii cardiace coronariene este mai mică decât în țările estice. Acest fenomen denumit "French paradox" pare a fi datorat consumului regulat de vin roșu. Efectul antiaterogen al vinului roșu se datorează polifenolilor. Numeroase studii *in vitro* au arătat că polifenolii inhibă protein kinaza C, lipooxygenaza, eliberarea histaminei, angiogeneza, ACE (enzima de conversie a angiotensinei), modulează ciclul celular, are activitate asemănătoare SOD și antimutagenă (31).

2.3. Efectele celulare si metabolice ale ischemiei cardiace

Ischemia miocardului este un proces patologic initiat in momentul in care aprovizionarea cu sange coronarian a inimii este insuficienta pentru metabolismul oxidativ. Desi restabilirea rapida a fluxului coronarian este strategia clinica fundamentala pentru limitarea necrozei cardiomiocitelor aceasta implica alterarea miocardului cunoscuta sub denumirea de "leziune de reperfuzie". Factorii responsabili pentru alterarea cardiomiocitelor in reperfuzie sunt incomplet elucidati si pot include: alterarea fosfolipazelor, incarcarea cu lipide amfifile, disfunctii mitocondriale, incarcarea cu calciu, formarea/actiunea mediatorilor lipidici, alterarea sarcolemiei (23).

In cursul stresului oxidativ se induc o serie de anomalii celulare de tipul: peroxidarea fosfolipidelor membranare, oxidarea gruparilor thiol, consumarea antiperoxidantului major (α -tocoferol, GSH) si pierderea ATP (54). Nu s-a observat o modificare evidenta a continutului de proteine si fosfolipide din membranele cardiomiocitelor insa exista un turnover crescut al constituintilor membranari. Lezarea letala a cardiomiocitelor nu necesita prezenta continua a H_2O_2 deoarece s-a constatat ca o expunere scurta (5 minute) a fost suficienta pentru alterarea celulelor. Aceasta alterare depinde de transformarea H_2O_2 internalizata in produse capabili de a initia peroxidarea lipidelor (de exemplu radicali hidroxil) (23).

S-a demonstrat ca o serie de proteine de soc termic sunt implicate in ischemia cardiaca. In celulele mamiferelor, ~15-20% din proteinele HSP60 sunt localizate la situsuri extramitocondriale. In celulele normale, legarea proteinei Bax la HSP60 impiedica oligomerizarea Bax si inserarea in membrana mitocondriala. Studiile realizate pe cardiomiocite in cultura au demonstrat ca hipoxia determina disocierea complexului HSP60-Bax cu translocarea HSP60 citosolice la membrana plasmatica si a Bax la mitocondrii (17). Pacientii cu ischemie si cardiomiopatie prezinta anticorpi la HSP60. S-a sugerat ca prezenta pe suprafata cardiomiocitelor a HSP60 impreuna cu anticorpii serici la aceasta proteina poate reprezenta un mecanism care guverneaza insuficienta cardiaca.

Studiile recente au demonstrat ca alterarea citoscheletului, in principal a microtubulilor joaca un rol important in patogeniza ischemiei miocardului (57). Cardiomiocitele cultivate intr-un mediu care stimuleaza ischemia prezinta o dezorganizare a microtubulilor, modificare care este reversibila dupa reoxigenare.

Unele studii au indicat ca si alte proteine citoscheletice sunt alterate ca raspuns la ischemia miocardului. Pierderea vinculinei, α -actininei, desminei, distrofinei si spectrinei a fost raportata in diferite modele de stimulare a ischemiei (43).

CAPITOLUL III

Efecte induse de estrogeni la nivel celular si molecular

La femeie, constelatia hormonală sexuală este reprezentată de hormoni estrogeni, progesteron, hormoni androgeni.

Hormoni estrogeni sunt 17β estradiol (E_2), estrona (E_1) și estriol (E_3). La femeie, 60% din estrogenii circulanți sunt reprezentați de 17β estradiol.

3.1. Originea, structura și funcțiile 17-estradiolului

Estrogenul (ES) este un hormon steroid care reglează creșterea, diferențierea și funcționarea a catorva tipuri de țesuturi. Estradiolul se formează în ovar, în foliculul Graaf. Are drept precursor testosteronul, din care rezultă prin aromatizarea inelului A al nucleului steroidic și pierderea substituentului 19-metil (Fig.11).

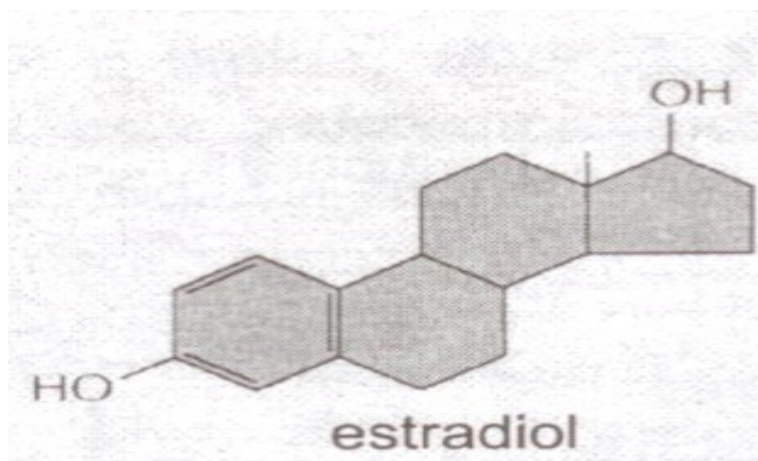


Fig. 11 Formula estradiolului.

Reacția de aromatizare implică intervenția aromatazei, un complex enzimatic monooxygenazic, care folosește drept co-substraturi NADPH și oxigen molecular. Aromataza este localizată în ovar, testicul, placenta, piele (în special în regiunea genitală), creier, țesut adipos și în blastocist. Activarea enzimei este indusă de gonadotropine prin intermediul unor receptori membranari specifici, folosind ca mesager secundar adenilatul ciclic.

Estradiolul începe să fie secretat la pubertate sub influența hormonului adenohipofizar foliculostimulant (folitropina, FSH). Secreția prezintă variații în cursul ciclului menstrual, fiind maximă imediat înaintea zilei a 14-a, atunci când se produce ovulația. Modificările ciclice ale secreției de estrogen sunt determinate de descărcările cu caracter pulsatil ale sistemului reprezentat de gonadorelina (hormon de eliberare a gonadotropinelor, secretat de hipotalamus) și gonadotropinele hipofizare. Acestea sunt răspunzătoare de ciclurile menstruale ovulatorii ca și de modificările corespunzătoare de la nivelul trompelor, uterului și vaginului, menite să

asigure fertilizarea si implantarea oului. Estrogenii si progesteronul exercita un control retroaferent negativ asupra sistemului hipotalamo-hipofizar. In timpul sarcinii estrogenii sunt produsi mai ales de catre placenta, in cantitati progresiv crescande pana la nastere. Dupa menopauza estrogenii se formeaza in tesutul adipos, unde androstendiona si alti steroizi corticosuprarenali sunt transformati in estrona si estradiol (53).

Estrogenii naturali circula in sange ca atare si sub forma de conjugati, legati de o globulina – SHBP (sex hormone-binding protein) – si de albumina. Sunt inactivati predominant in ficat si se elimina prin urina sub forma de glucurono- si sulfoconjugati.

Efectele biologice tipice ale estrogenilor constau in stimularea proliferarii celulelor tractului genital si ale glandei mamare. In plus, ei induc modificari vasculare, cutanate, osoase si exercita actiuni asupra sistemului nervos central si hipofizei, cu modularea activitatii gonadotrope si determinarea comportamentului sexual. In afara interventiei caracteristice in sfera sexuala, estrogenii moduleaza controlul vegetativ simpatic al functiei musculaturii netede, cresc debitul cardiac si fluxul arterial, scad rezistenta periferica, dilata coronarele si favorizeaza vasodilatatia dependenta de oxidul nitric, intretin structura normala a vaselor, scad motilitatea si favorizeaza absorbtia intestinala, inhiba rezorbtia osoasa, intervin in mentinerea structurii normale a pielii la femei. Estrogenii cresc cantitatea de factori ai coagularii II, VII, IX si X in sange si scad cantitatea de antitrombina III, favorizand coagularea sangelui. De asemenea, cresc nivelul fibrinogenului si plasminogenului diminuand adezivitatea plachetara.

3.2. Receptorii pentru estrogen

Estrogenii actioneaza asupra unor receptori specifici de la nivelul celulelor tinta. Se pare ca receptorii estrogenici sunt distribuiti in mod egal atat in citoplasma cat si in nucleu (55).

Receptorii pentru estrogen (ER) apartin superfamiliei receptorilor nucleari din care mai fac parte receptorii pentru vitaminele A si D, retinoizi, hormoni tiroidieni. ER uman este localizat pe cromozomul 6q subbanda 25.1. In absenta ES receptorii se prezinta sub forma de heterocomplexe 9S care contin proteine heat-shok (ex: hsp90, hsp70, p23, p60), imunofiline (ex: CyP40, FKBP52) si alte chaperone (45).

Ca structura, ER sunt formati din sase domenii: un domeniu N-terminal (domeniul A/B), un domeniu pentru legarea AND-ului (domeniul C), regiunea balama (domeniul D) si un domeniu pentru legarea ligandului (domeniul E/F).

Domeniul A/B contine un domeniu cu functie de transactivare ligand-independenta (AF-1) care activeaza genele tinta prin interactia cu componente ale mecanismului transcriptional (alti factori de transcriptie si proteine coreglatoare). Functia AF-1 depinde de tipul celular si de promotor (28).

Domeniul C contine doua motive “zinc finger” si este implicat in legarea AND, dimerizarea receptorului si transactivarea genelor (41).

Domeniul D face legatura intre domeniul pentru legarea AND si cel pentru legarea ligandului si permite schimbarea conformatiei receptorului. Functiile sale nu sunt bine cunoscute. Domeniul E/F contine un domeniu pentru legarea ligandului (LBD). In plus, acest domeniu are rol in dimerizarea receptorului monomer, legarea cofactorului, transactivarea ligand-dependenta si localizarea nucleara dependenta de ligand (45). Tot aici este situat un alt domeniu cu functie activatoare (AF-2) care interactioneaza cu proteinele coreglatoare (35).

Studiile efectuate au demonstrat existenta a trei tipuri de receptori pentru ES. Primul tip de receptor a fost recunoscuta prin anii '60 cand s-a observat ca uterul si vaginul leaga in mod specific estradiolul. Receptorul a fost clonat 25 ani mai tarziu si s-a considerat ca ER este singurul mediator al actiunii ES in tesuturile tinta. Cu toate acestea, soarecii ER knock-out sunt sanatosi cu exceptia problemelor legate de fertilitate. In plus, mutatiile genei ER la barbati nu sunt letale (47).

In 1996 un nou ER a fost clonat si denumit ER β pentru a se deosebi de forma clasica a receptorului care s-a numit ER α . Ambele tipuri de receptori (ER α si ER β) leaga E2 cu afinitate mare si au afinitati similare pentru legarea de elementele de raspuns la estrogen (ERE)(30).

ER β este mai mic decat ER α si prezinta diferente la nivelul domeniului N-terminal al AF-1 si C-terminal al AF-2. In plus, ER β si ER α au functii diferite la situsul AP-1 (40). Studiile efectuate pe celule MDA-MB 231, linie celulara de cancer mamar uman ER-negativa, au aratat ca supraexprimarea ER α inhiba proliferarea celulara hormon-dependenta in timp ce ER β inhiba proliferarea celulara hormon-independenta (33).

La om similitudinea genelor celor doua tipuri de receptori este de 47% (12).

ER α uman este localizat pe cromozomul 6q subbanda 25.1. In general, ER α este exprimat in uter, ovar, vagin, glanda mamara, hipotalamus (37).

Acest receptor este o proteina termolabila, usor degradabila in prezenta proteazelor (45). S-au identificat doua izoforme cu greutate moleculare de cca. 66 kDa si respectiv 46 kDa (16). Aceste izoforme sunt capabile sa formeze homodimeri sau heterodimeri care se leaga de ERE. Complexul heterodimeric dintre ER α -46 si ER α -66 se formeaza preferential si are o afinitate mai mare de legare de ERE decat homodimerul de ER α -66 (16).

ER β este localizat pe cromozomul 14 si prezinta un grad mare de omologie cu ER α . Acest receptor este capabil sa activeze transcriptia ERE care contin promotori independent de ligand (19).

In 1998 a fost izolat si purificat din ficatul de soarece un nou receptor putativ pentru estrogen, pER sau ER γ . Analiza imunohistochimica a permis detectare acestui tip de receptor la nivelul ovarului, organelor nonreproductive (schelet, celule nervoase, vasculare, par, retina), endometru, prostata si tumori mamare. Receptorul este o serin fosfataza cu greutate moleculara de 84 kDa, cu specificitate mare pentru E2, estrona si estriol. Este organizat sub forma de heterodimer. Prezinta aceeasi specificitate pentru estrogeni normali si sintetici, antiestrogeni si bioflavonoizi ca si

ER β si ER α . Imunosupresantii si neurolepticele stimuleaza legarea E2 de pER la concentratie mica si inhiba legarea la concentratie mare. Molecula purificata este termostabila si sedimenteaza ca complexe 4,9S.

pER este implicat in calea de semnalizare estrogenica, participa la carcinogeneza si contribuie la intensificarea actiunii estrogenului in organele nonreproductive (42).

Receptorii pentru estrogen actioneaza ca factori de transcriptie activati de estrogen. In absenta hormonului, receptorii pentru estrogen nu se leaga la AND. Activarea implica difuzia estrogenului in celula tinta si legarea de receptor in citoplasma sau nucleu (Fig 12). Legarea estrogenului de receptor prin inelul aromatic determina desprinderea acestuia de Hsp si induce schimbarea conformatiei ceea ce faciliteaza dimerizarea, translocarea nucleara si legarea complexului format de elemente AND specifice (ex. elementele de raspuns la ES localizate in regiunea promotor a genelor tinta). Ca urmare a acestor procese se produce reglarea transcriptiei genelor prin interactia cu proteine coreglatoare (coactivatoare sau corepresoare) si transcriptia (45). Astfel, activarea receptorilor este influentata de fosforilare (29 ; 8).

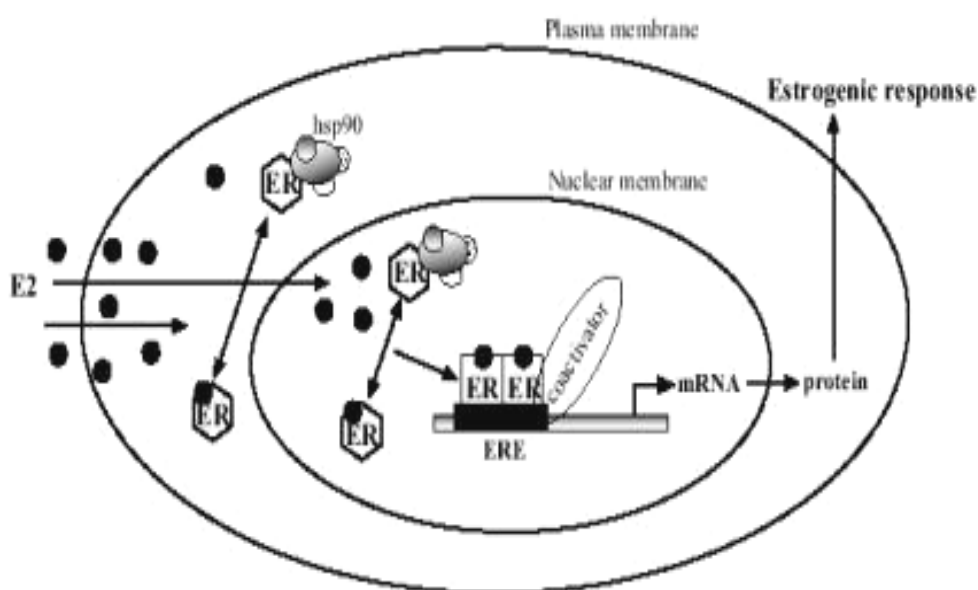


Fig. 12. Calea clasica de actiune a receptorului pentru estrogen in celula.

Intensitatea actiunii estrogenice este dependenta de afinitatea estrogenului fata de receptori si de retinerea, timp suficient, in nucleu, a complexului format. Estradiolul are o afinitate mare pentru receptorul citosolic si o viteza de disociere lenta de receptorul nuclear, avand o actiune intensa. Un alt factor important este variatia numarului de receptori, in functie de concentratia estradiolului: concentratii mari de hormon determina un numar mare de receptori in citosol.

S-a observat ca ER regleaza transcriptia unor gene care nu contin elementele clasice de raspuns. De exemplu, ES stimuleaza cateva gene prin interactia cu alti factori de transcriptie, precum AP-1 sau Sp1, care se leaga de situsurile complementare de legare a AND (46). De asemenea, ES poate inhiba expresia genelor tinta prin reglarea negativa a factorilor de transcriptie, inclusiv NF-kB (15).

Totodata, ER pot fi activati intr-o maniera ligand-independenta prin semnale care vin de pe suprafata celulei. ER pot fi activati in absenta ES de catre activatori ai protein kinazei A, protein kinazei C, dopamina, factori de crestere (EGF si IGF-1)(32).

3.3. Efectele estadiolului la nivel celular si molecular

Dovezile experimentale si clinice au aratat ca imbatranirea si deficienta de estrogeni cresc riscul aparitiei bolilor cardiovasculare.

Infuzia de 17 β -estradiol in artera coronariana inainte de ischemie si in cursul reperfuziei descreste dimensiunea zonei de infarct si aritmiile ventriculare induse de reperfuzie (39). In plus, la femeile tinere de sobolan ovariectomizate supuse ischemiei si reperfuziei, tratamentul cu estrogeni a fost asociat cu imbunatatirea simptomelor (60). Femeile la menopauza care au urmat terapie hormonala au avut o mortalitate mai scazuta datorita infarctului miocardic, comparativ cu femeile care nu au luat estrogeni(50).

Unele observatii sugereaza ca efectele estrogenilor asupra producerii de oxid nitric (NO) ar juca un rol important in modularea raspunsului cardiac la ischemie-reperfuzie(59).

S-a demonstrat ca 17 β -estradiolul creste nivelurile proteinei HSP72 in cardiomiocitele izolate de la sobolani masculi (27). In plus, femeile de sobolan nestresate au o exprimare a HSP72 miocardica mai mare decat cea de la masculi (58). 17 β -estradiolul creste nivelurile de HSP72 si in cardiomiocitele de sobolan in cultura inasa dozele necesare pentru aceasta crestere sunt de zece ori mai mari pentru cardiomiocitele provenite de la femele comparativ cu masculi. In plus, tratamentul cu 17 β -estradiolul determina activarea factorilor transcriptionali NFkB si a HSF1 atenuand alterarile induse de hipoxie. Aceste rezultate sunt sustinute de observatiile care indica o interactie intre subunitatea p65 a NFkB si receptorii pentru estrogeni (14). Aceasta relatie intre receptorii pentru estrogeni si NFkB a fost descrisa initial ca antagonista in culturile de celule, probabil datorita competitiei dintre receptorii pentru estrogeni si subunitatea p65 a NFkB pentru cantitatea limitata de p300 (21).

In afara efectului asupra expresiei genice, exista dovezi ca 17 β -estradiolul are si efecte rapide mediate direct prin legarea de membrana. La concentratii farmacologice (μ M), 17 β -estradiolul are o actiune de relaxare acuta a celulelor musculare netede vasculare precontractate si reduce influxul de Ca²⁺, acest ultim efect fiind atribuit blocarii canalelor de calciu tip L din membrana plasmatica. Studiile recente pe cardiomiocitele de rozatoare sugereaza ca un efect estrogenic rapid, ne-genomic poate fi mediat printr-o actiune anti-oxidanta a 17 β -estradiol sau

a receptorilor membranari, ce conduc la activarea unei cai specifice de semnalizare. Exista dovezi ca 17β -estradiol reduce atat dimensiunea infarctului miocardic cit si aparitia aritmiilor ventriculare induse de ischemie si reperfuzie. Studiile pe culturi de cardiomiocite de sobolan nou-nascut au demonstrat ca 17β -estradiol atenueaza inhibitia determinata de blocarea metabolica indusa prin aplicarea combinata a inhibitorilor fosforilarii oxidative mitocondriale si a inhibitorilor glicolizei anaerobe a comunicarii intercelulare prin jonctiuni "gap" prin impiedicarea defosforilarii Cx43 din jonctiunile gap. Acest efect al 17β -estradiol este asociat cu fosforilarea serinei 368 din capatul C-terminal al Cx43. Efectul 17β -estradiol asupra Cx43 poate fi mediat de activarea unei protein kinaze C (PKC) printr-un mecanism de semnalizare membranar (7).

CAPITOLUL IV

Metode de determinare a raspunsului celulelor la tratamentul cu estradiol

Cultura de cardiomiocite : ventriculele provenind de la pui de sobolan de 2 zile vor fi supuse tratamentului enzimatic pentru obtinerea de cardiomiocite. Pentru realizarea studiului se vor utiliza 4 loturi: martor (M) , lot tratat cu estradiol (E), lot supus stressului oxidativ (I), lot tratat cu estradiol si supus stressului oxidativ (M+I).

Terapia cu estrogen: pentru terapia cu estradiol se vor utiliza celule mentinute in cultura.

Studii de microscopie optica si electronica: pentru observatiile de morfologie celulara culturile vor fi supuse examenului microscopic in urma colorarii cu hematoxilina-eozina (pentru histologie generala). Pentru observatiile privind ultrastructura celulei se vor efectua studii de microscopie electronica.

Determinarea cantitatii de proteina celulara: cantitatea de proteina celulara este un indicator indirect al diviziunii celulare . Determinarea acesteia se va efectua prin metoda Amido-black.

Western Blotting: tehnica Western blotting va fi utilizata pentru identificarea si determinarea cantitativa a proteinelor pro- si antiapoptotice (Bcl-2, Bax, p53, Hsp70).

Testul MTT si coloratia cu Trypan blue pentru determinarea viabilitatii celulare. Viabilitatea celulara este un indicator utilizat in stabilirea citotoxicitatii stressului oxidativ.

CAPITOLUL V

Elaborarea unei metode terapeutice de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazata pe utilizarea hormonilor estrogeni

1. Elaborarea tehnicii de cultura

Cultura de cardiomiocite se poate obtine din tesuturi normale adulte sau din cele neonatale. Celulele obtinute din tesuturi adulte cultiva mai greu, au o crestere relativ inceata, necesita medii de cultura mai complexe iar perioada de latentă este de ordinul zilelor. Aceste celule sunt mai puțin active și pierd rapid capacitatea contractilă.

Celulele obtinute din tesuturi neonatale cultiva ușor și au o creștere rapidă care începe curând după punerea în cultura. Fenotipul cardiomiocitelor neonatale *in vitro* este stabil și capacitatea lor contractilă în timpul hipoxiei-reoxigenării este asemănătoare cu cea a inimii *in situ* în timpul ischemiei-reperfuziei. În plus, aceste celule sunt mult mai rezistente la dezintegrarea celulară decât cele adulte. Un alt avantaj al utilizării celulelor neonatale este reprezentat de cantitatea mare de țesut cardiac furnizată de o femelă sobolan care da naștere la 10-20 pui comparativ cu un adult.

Metode de cultivare a cardiomiocitelor adulte

Pentru cultivarea cardiomiocitelor adulte se folosesc două tipuri de culturi primare:

a) Cultura pe termen scurt, în mediu fără ser, în care celulele se atasează rapid pe placutele de cultura pretratate cu ser fetal. În acest caz, celulele retin morfologia *in vivo* însă pot fi menținute în cultura doar 5-10 zile. Atasarea rapidă permite obținerea și menținerea de populații foarte omogene de cardiomiocite necesare pentru majoritatea studiilor metabolice. Deși celulele se atasează rapid de placile de cultura ele nu se contractă spontan. În schimb, celulele mențin morfologia caracteristică cardiomiocitelor. Dezavantajul acestei metode este acela că numărul de celule care adera descrește rapid prin apoptoză.

b) Cultura pe termen lung în mediu suplimentat cu ser fetal. Acest tip de cultura este cunoscut și sub denumirea de cultura de celule rediferențiate. În acest tip de cultura atasarea celulelor de substrat are loc după tranziția lor gradată (între zilele 2 - 4) de la aspectul fuziform la cel rotund. Celule se contractă spontan, însă pierd structura specifică de miocit în cursul tranziției. Ulterior, celulele adera și pot fi menținute în cultura luni de zile (26).

Progresele în cultivarea cardiomiocitelor adulte au necesitat metode specifice pentru a obține cardiomiocite tolerante la Ca^{2+} . Rolul Ca^{2+} în izolarea celulară este esențial deoarece adeziunea celulară depinde de prezența Ca^{2+} . Astfel, pentru a separa celulele este necesară expunerea țesutului la concentrații scăzute, nefiziologice de Ca^{2+} , de ordinul 10^{-5} - 10^{-4} . În contrast cu miocardul perfuzat, celulele

izolate pot fi incubate 30 min la 37⁰C in prezenta de 1 mM EGTA fara ca acestea sa sufere hipercontractie ireversibila dupa re-expunerea la niveluri normale de Ca²⁺. Concentratiile de Ca²⁺ mai mici de 2-5 x 10⁻⁵ M par a fi necesare pentru obtinerea de cardiomiocite adulte, tolerante la Ca²⁺(17).

Toate metodele de izolare a cardiomiocitelor adulte tolerante la Ca²⁺ necesita tratament enzimatic si mecanic concomitent sau succesiv de tipul triturarii prin pipetare repetata sau agitare. Tratatarea enzimatica a tesutului se realizeaza in doua moduri: (a) perfuzie retrograda a circulatiei coronariene a inimii intacte, prin aorta, cu o solutie enzimatica salina (metoda Langendorff); (b) imersarea fragmentelor mici de tesut cardiac intr-o solutie enzimatica salina.

In primul caz, tesutul este ulterior disociat mecanic pentru a dispersa celulele. In ultimul caz, tratamentul enzimatic si chimic este concomitent. Ambele metode genereaza cardiomiocite corespunzatoare pentru cultura.

Metoda Langendorff permite obtinerea unei cantitati mai mari de celule in timp ce metoda de imersare faciliteaza mentinerea sterilitatii si permite izolarea celulelor din fragmente mici de tesut, de tipul celui uman dupa chirurgia inimii (17).

Pentru izolarea cardiomiocitelor adulte s-au folosit diferite enzime de tipul tripsinei, hialuronidazei, elastazei, collagenazei si a protezelor nespecifice. Doar unele din acestea au fost folosite pentru miocitele adulte in cultura. In metoda Langendorff se foloseste intotdeauna collagenaza fie singura fie impreuna cu alte enzime.

Miocitele atriale au fost izolate prin imersie cu tripsina sau cu tripsina si collagenaza.

Celulele ventriculare s-au izolat cu trpsina si collagenaza. Izolarea celulelor ventriculare prin imersie necesita expunerea atat la tripsina cat si la collagenaza, obtinandu-se astfel foarte putine celule.

Nu exista o tehnica pentru evaluarea conditiilor de cultura sau prezicerea supravietuirii cardiomiocitelor adulte in cultura. Capacitatea celulelor de a exclude coloranti de tipul albastrului tripan reprezinta cel mai simplu test de viabilitate. In cazul cardiomiocitelor adulte acesta nu este relevant. De exemplu, in doua tipuri de experimente, 80-90% din celulele izolate (23) sau 90% din celule dupa 24 de ore (8) preiau albastru tripan, insa in fiecare caz mai mult de 50% supravietuiesc in cultura. Continutul de ATP, capacitatea de a se contracta ca raspuns la stimularea electrica si mentinerea morfologiei alungite, striate reprezinta cele mai corespunzatoare criterii.

Pentru cultivarea cardiomiocitelor adulte se folosesc diferite substrate, de tipul vaselor de cultura de plastic acoperite cu gelatina, collagen din coada de sobolan pentru modificarea sarcinii de suprafata. Cardiomiocitele adulte se ataseaza eficient de laminina si collagen IV si slab la fibronectina. Atasarea celulelor adulte are loc initial la capete, in regiunea discurilor intercalare. In plus, cardiomiocitele adulte adera la suprafete tratate cu collagen IV, ser fetal bovin, laminina si fibronectina.

Dupa doua saptamani in cultura, substratele acoperite cu laminina sau collagen IV retin aproape de 10 ori mai multe celule decat cele tratate cu ser.

Cardiomiocitele adulte pot fi cultivate in diferite medii de tipul MEM, F12K, Mediu 199 (15), mediul Weymouth si mediul William. Fiecare tip de mediu este suplimentat cu 4-20% ser de unul sau mai multe tipuri, ser fetal bovin, ser de vitel sau de cal. In absenta serului miocitele nu se ataseaza de substrat si degeneraza dupa cateva zile. Din contra, celulele care se ataseaza rapid pot fi cultivate pentru cateva zile in Mediu 199 fara ser dupa o perioada initiala de atasare de patru ore cu 4% ser fetal bovin. S-a demonstrat ca diferite loturi de ser fetal de vitel difera in ceea ce priveste capacitatea de a induce atasarea rapida a cardiomiocitelor si din acest motiv eficacitatea serului trebuie testata pe fiecare lot (26).

Unii autori recomanda suplimentarea mediului de baza cu insulina, creatinina, carnitina si taurina pentru imbunatatirea supravietuirii cardiomiocitelor adulte in cultura fara ser (26 ; 15). In acest sens, s-a demonstrat ca insulina impiedica apoptoza cardiomiocitelor in cultura (2; 18).

Tehnicile de izolare a cardiomiocitelor adulte furnizeaza si alte celule. Mitozele in culturile de miocite ventriculare sunt reduse sau absente in timp ce alte celule au o viteza crescuta de diviziune. Daca proliferarea celulelor non-musculare nu este controlata ele devin populatia celulara dominanta in cultura.

Se folosesc patru metode de control a non-miocitelor in culturile de cardiomiocite adulte.

Prima metoda implica sedimentarea in densitate a celulelor izolate inaintea insamantarii. Mediul de sedimentare este reprezentat de 3-6% albumina serica bovina in mediu salin (27). In culturile de celule care se ataseaza rapid, non-miocitele sunt indepartate prin sedimentare inaintea insamantarii, in timp ce spalarea periodica a culturilor cu mediu proaspat furnizeaza o populatie omogena de miocite, deoarece miocitele alterate nu raman atasate de substrat si sunt indepartate prin spalare.

A doua metoda, insamantarea selectiva depinde de faptul ca non-miocitele se ataseaza de substrat mai rapid decat cardiomiocitele. Prin aceasta metoda celulele ne-aderente, predominant miocite sunt decantate intr-un alt vas de cultura (8 ; 23 ; 30).

A treia metoda este adaugarea de citozin-1- β -D-arabinofuranozid (ARA-C) la mediul de cultura pentru 5-7 zile (15 ; 21). Dupa acest tratament se foloseste mediul fara ARA-C. Peste 99% din non-miocite sunt eliminate dupa trei saptamani in cultura.

A patra metoda care consta in omiterea glutaminei din mediu de cultura a fost folosita in culturile de celule obtinute de la animale imature (7). Acesta metoda se foloseste in culturile adulte doar impreuna cu ARA-C sau cu o insamantare selectiva (8).

Celulele adera la placile pretratate cu ser in trei ore de la insamantare. Atasarea este mediata de prelungirile sarcoplasmei care contacteaza substratul la

intervale egale cu lungimea sarcomerelor. La 2 zile, sarcolemma la capetele celulelor este neteda si are un glicocalix continuu. La acest interval capetele majoritatii celulelor se largesc si extind pseudopode.

Metode de cultivare a cardiomiocitelor neonatale

Pentru izolarea si cultivarea cardiomiocitelor neonatale de sobolan sunt descrise mai multe metode. Toate aceste metode aduc modificari la metoda originala a lui Harary si Farley din 1963. Conform acestei metode se recolteaza inimile de la puii de sobolan si se spala pentru a indeparta sangele. Apoi, intreaga inima sau numai ventriculele sunt fragmentate si disociate in celule individuale prin digestie enzimatica. Celulele obtinute sunt numarate si insamantate in mediu de crestere la densitatea dorita. Cultura este mentinuta in incubator cu atmosfera definita.

Acestei metode i-au fost aduse unele modificari. Astfel, pentru obtinerea cardiomiocitelor se utilizeaza pui de sobolan de 1-5 zile. Acestia sunt sacrificati prin decapitare (25.) dar se utilizeaza si anestezia cu eter (14) sau socul cardiac (12).

Pentru digestia enzimatica se utilizeaza de obicei doua enzime : tripsina (6 ; 31) si collagenaza (24). Concentratia tripsinei este cuprinsa intre 0,05-0,25% in timp ce a collagenazei este mai mica (0,05-0,1%). Unele protocoale utilizeaza o combinatie a celor doua enzime (32) sau collagenaza + pancreatina (1; 16; 25). Fragmentele de tesut sunt supuse digestiei enzimatice repetate. Suspensia de celule obtinuta este preluata in mediu in mediu cu ser, pe gheata pentru a stopa activitatea proteolitica si apoi este centrifugata. Celulele sedimentate sunt reluate in mediu cu ser si mentinute in incubator cu atmosfera definita.

Mark si colab. (20) au aratat ca tripsinizarea repetata cu perioade scurte de incubare permite obtinerea unui numar mai mare de celule musculare intacte decat o singura incubare pe durata mare. Numarul incubarilor este cuprins intre 5-15 iar durata unei incubari este de 6-20 min. in functie de capacitatea enzimatica a tripsinei. Prin indepartarea primei suspensii celulare (13) care contine celule moarte sau lezate, hematii, resturi celulare se obtine o cultura primara cu un grad mare de viabilitate celulara. Incubarea enzimatica a fragmentelor se efectueaza la 37°C (12) .

Pentru izolarea si cultivarea cardiomiocitelor neonatale se folosesc trei tipuri de solutii : solutia de spalare, solutia enzimatica si mediul de crestere.

Ca solutii de spalare se utilizeaza : tamponul fosfat Hank's fara Ca^{2+} si Mg^{2+} (12), tampon fosfat salin cu Ca^{2+} sau fara Ca^{2+} si Mg^{2+} (3), solutie salina (28), tampon salin Tyrode fara Ca^{2+} si Mg^{2+} (20), tampon salin HEPES fara Ca^{2+} (4), Eagle's MEM cu tampon salin Earle's (28). Solutia de spalare este utilizata pentru indepartarea eritrocitelor si a fragmentelor tisulare dupa fragmentarea tesutului. Totodata aceasta solutie sta la baza solutiei enzimatice utilizata pentru disocierea tesutului cardiac in celule individuale. Unii autori adauga la aceasta solutie enzimatica antibiotice (28), ser 10% (6), glucoza si DNaza 0,002% (28).

Sedimentul celular este cultivat in mediu de crestere. Mediile de crestere utilizate pentru cardiomiocitele neonatale sunt : Ham F10 (22 ; 25), HAM's – F12, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (9 ; 14), Minimum Essential medium (MEM) (12), M199 (6), MCDB 107 (29), Liebowitz's M3, PC-1 (5) sau combinarea mediilor DMEM cu Ham's F12 (1 ; 32), Hank's cu M199 (28), DMEM cu Mediu 199 (33).

Mediul de cultura este suplimentat cu 4-20% ser de cal (24 ; 32), ser fetal bovin (33), ser de vitel nou-nascut (1) sau ser bovin (12). Se mai utilizeaza amestecul ser de cal cu ser fetal bovin (4 ; 6 ; 25).

Unii autori utilizeaza un mediu de crestere in primele 2 zile si apoi un mediu de mentinere. Cele doua medii difera ca procent de ser au compozitie (1). Mediul este schimbat zilnic sau la 2 zile (11). Experimentele se efectueaza dupa 3-8 zile de la initierea culturii (6).

In afara de ser, in mediu de cultura se adauga antibiotice care protejeaza cultura de bacteriile Gram + si Gram -. Cea mai utilizata combinatie este penicilina (100-400 U/ml mediu) si streptomicina (100-200µg/ml mediu).

Celulele izolate din inima puilor de sobolan sunt un amestec de cardiomiocite si celule non-musculare. Celulele non-musculare se divid mai repede si acopera toate suprafetele libere dar fara a se suprapune peste cardiomiocite (3 ; 20). Cea mai utilizata tehnica de indepartare a celulelor non-musculare este cea descrisa de Blondel (3). Aceasta consta intr-o etapa de pre-plating de 1-3 ore care permite atasarea celulelor non-musculare. Prin aceasta tehnica puritatea culturii este de 97-99%. Alte metode se bazeaza pe inhibarea diviziunii celulelor non-musculare datorita cytosin-β-D-arabinofuranoside (10 µg/ml mediu) sau 5-bromo-2'-deoxyuridina (100 µM) (6 ; 25). O alta metoda de indepartare a celulelor non-musculare este centrifugarea in gradient de Percoll (4 ; 33). Deoarece este o metoda mai complicata si necesita mai mult timp, nu este utilizata prea des. Suspensia celulara este pusa intr-un gradient de densitate Percoll (densitate 1,059/1,082) si centrifugata la turatie mica. Cardiomiocitele migreaza la densitatile de 1,062 si 1,082. Aceasta fractie este reluata cu grija si spalata cu mediu de cultura sau solutie de spalare. Prin aceasta tehnica culturile ajung la confluenta dupa 72 ore. Procentul cardiomiocitelor pulsatile depaseste 95% dupa 3 zile de cultura.

Dupa numarare, cardiomiocitele sunt insamantate la o densitate de 1×10^4 – $2,5 \times 10^5$ celule/cm². Celulele pot fi crescute in placi de cultura pre-tratate cu collagen tip I si III (6), fibronectina (29), laminina (4), gelatina (25) sau in placi de cultura Primaria-coated (Falcon Plastics) si pronectin-coated (Promega).

In prima zi de cultura, cardiomiocitele neonatale adera de suprafata de cultura si se aplatizeaza. Un monostrat de cardiomiocite pulsatile se obtine dupa 2-3 zile.

Culturile sunt mentinute la 37°C in atmosfera de CO₂ (1-10%) si aer sau O₂ (90-99%) (14 ; 32).

2. Prepararea 17 β -estradiolului si modul de tratare a culturilor

Pentru studiul efectelor hormonilor estrogeni asupra cardiomiocitelor s-a utilizat 17 β -estradiolul. Fiind un compus steroid acesta a fost dizolvat in alcool etilic absolut. Concomitent in proba martor s-a adaugat 0,1% alcool etilic absolute (24).

In majoritatea studiilor concentratia estradiolului a avut valori de 1-10nm/l (9 ; 25). Nuedling (24) a utilizat concentratii cu valori mai mari, cuprinse intre 10⁻⁷ si 10⁻¹⁰M.

In ceea ce priveste durata tratamentului acesta a fost de 15 min. (9), 30 min. (9 ; 25), 60 min. (9), 24 ore (24).

3. Modalitati de inducere a stressului oxidativ

Pentru inducerea stressului oxidativ majoritatea cercetatorilor au optat pentru H₂O₂. H₂O₂ este adaugat in tampon fosfat salin cu glutamina si inlocuieste mediul de cultura pentru a putea realiza stressul oxidativ (19).

Concentratia de H₂O₂ utilizata variaza de la 1 μ M/l – 0,5 mM (1 ; 10 ; 15 ; 19 ; 31).

In majoritatea studiilor durata tratamentului a fost de 10 min. (1; 31).

Duranteau (10) a realizat in studiile sale o expunere a cardiomiocitelor neonatale timp de 60 min. la H₂O₂ 25 μ M.

4. Metode structurale si biochimice specifice pentru elucidarea la nivel celular si molecular a raspunsului cardiomiocitelor la tratamentul cu estrogeni

Studii de microscopie optica si electronica: pentru observatiile de morfologie celulara culturile au fost supuse examenului microscopic in urma colorarii cu hematoxilina-eozina (pentru histologie generala). Pentru observatiile privind ultrastructura celulei s-au efectuat studii de microscopie electronica.

Determinarea cantitatii de proteina celulara: cantitatea de proteina celulara este un indicator indirect al diviziunii celulare . Determinarea acesteia se poate efectua prin metoda Amido-black sau BIO-RAD. Metoda BIO-RAD permite determinarea cantitatilor mici de proteina (<1 μ g/ml) in timp ce metoda Amido-black are un grad mai mic de sensibilitate.

Western Blotting: tehnica Western blotting s-a utilizat pentru identificarea si determinarea cantitativa a proteinelor pro- si antiapoptotice (Bcl-2, Bax, p53, Hsp70).

Testul MTT si coloratia cu Trypan blue pentru determinarea viabilitatii celulare. Viabilitatea celulara este un indicator utilizat in stabilirea citotoxicitatii stressului oxidativ.

In cazul coloratiei cu Trypan blue, celulele non-viabile se coloreaza in albastru datorita patrunderii colorantului in celula.

Pulsatilitatea celulara s-a utilizat pentru determinarea capacitatii functionale a cardiomiocitelor. Pulsatilitatea celulara a fost determinata microscopic si este exprimata in numar pulsatii/min.

Lactat dehidrogenaza din mediul de cultura este un indicator de citotoxicitate. Aceasta enzima se gaseste in cantitate mare in urma lizei celulare. Metoda consta in determinarea scaderii absorbantei la 340 nm datorita oxidarii NADH la NAD^+ de catre piruvat sub actiunea catalitica a LDH.

Numarul de celule este un indicator al diviziunii celulare si al mortalitatii celulare. Numararea celulelor s-a realizat prin utilizarea unei camere Burkert-Turk.

CAPITOLUL VI

Realizarea unei metode terapeutice de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazata pe utilizarea hormonilor estrogeni

1. Realizarea culturii de cardiomiocite neonatale

Ținând cont de avantajele și dezavantajele prezentate în Cap. I cu privire la culturile de cardiomiocite obținute din țesut adult sau neonatal, am considerat ca ventriculele puilor de sobolai sunt mai indicate pentru realizarea acestui studiu. În acest sens, entru realizarea culturii de cardiomiocite neonatale se parcurg următoarele etape:

1. Sterilizarea materialelor și a spațiului de lucru

Sterilizarea materialelor utilizate în laborator trebuie să fie astfel făcută încât să asigure nu numai sterilitatea ci să se prevină degradarea unor materiale din cauza caldurii sau eventuala formare de substanțe toxice pentru celule.

Sticlăria de laborator (placi de cultura, sticle, baloane, flacoane) se sterilizează cu căldură uscată la 180°C timp de 30 min. în cuptor Poupinel.

Filtrele cu membrana filtrantă de 0,22μ montată precum și dopurile și tuburile de centrifugă se sterilizează prin autoclavare la 0,9 atm timp de 30 min.

Instrumentele chirurgicale se sterilizează prin fierbere timp de 30 min. în apă distilată.

Soluțiile sterile pot fi realizate și depozitate în diferite moduri în funcție de stabilitatea componentelor din soluții. În general soluțiile se sterilizează prin filtrare utilizând membrane de 0,22 μ.

După sterilizare materialele sunt ținute în dulapuri ferite de praf. În momentul utilizării, acestea sunt șterse cu etanol și deschise doar în aria sterilă (Fig. 1).



Fig.1 – Pastrarea materialelor de laborator

2. Pregatirea hotei si a incubatorului

Lucrul cu celule necesita o hota care este sterila. Inainte de inceperea lucrului cu cel puțin 30 min. se sterge hota si masa de lucru cu alcool 70⁰ sau cloramina si se aprinde lampa de UV.

Incubatorul asigura conditii optime pentru cresterea celulelor: temperature de 37⁰C, umiditate 90%, raportul CO₂/aer de 5/95. Un electrod cuplat cu o electrovalva si un pH-metru asigura un pH constant de 7,2-7,4.

3. Obtinerea culturii de cardiomiocite neonatale

Solutii si reactivi

Tampon fosfat salin (0,13M NaCl + 2,6mM KCl + 8mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O + 1,4mM KH₂PO₄ + 2% D(+)-glucoza); tripsina 0,125% (Sigma); 0,002% DNaza I (Sigma); ser fetal de vitel (Biochrom AG); DMEM/HAM's F-12 (1:1)(Biochrom AG); penicilina (Sicomed SA); streptomicina (Sicomed SA); 100μM 5'-Bromo-2-deoxiuridina (Sigma).

Mod de lucru

Cultura de cardiomiocite neonatale s-a obtinut prin modificarea tehnicii lui Pei-Feng Li (1999).

Pentru realizarea culturii de cardiomiocite s-au utilizat pui de sobolan de 2 zile. Puii au fost decapitati si inimile recoltate in mediu DMEM/HAM's F-12 (1:1) suplimentat cu 5% ser fetal de vitel , 100 UI/ml penicilina si 100μg/ml streptomicina.

S-au recoltat ventriculele (aproximativ ¼ din inima sunt atrilele) in tampon fosfat salin, 100 UI/ml penicilina si 100μg/ml streptomicina. Ventriculele au fost maruntite in fragmente de cca. 1mm³ si spalate cu acelasi tampon fosfat salin.

Dupa spalare fragmentele de tesut au fost supuse digestiei enzimatice cu 0,125% tripsina si 0,002% DNaza I timp de 10 min. la temperatura camerei, cu agitare. Suspensia celulara obtinuta se indeparteaza deoarece contine fragmente de celule si hematii. Se repeta procesul de tripsinizare iar celulele obtinute se recolteaza in mediu de cultura, pe gheata. Tripsinizarea se efectueaza pana la epuizarea tesutului. Intreaga suspensie celulara se centrifugheaza timp de 10 min. la 1000g. Celulele sedimentate sunt reluate in mediu de cultura si numarate pe o camera Burkner-Turk.

Deoarece suspensia celulara cuprinde celule musculare (cardiomiocite) si nonmusculare (fibroblaste cardiace) in vederea obtinerii unei culturi cat mai pure s-a realizat o etapa de preplating de 30 min. In acest interval de timp fibroblastele adera de suprafata de cultura iar suspensia de celule din mediu de cultura a fost formata in proportie de 98% de cardiomiocite.

Cardiomiocitele s-au cultivat la o densitate de 6x10⁵ cel/ml in mediu DMEM / HAM's F-12 (1:1) suplimentat cu 10% ser fetal de vitel, 100 UI/ml penicilina, 100μg/ml streptomicina si 100μM 5'-Bromo-2-deoxiuridina (Fig. 2).

Mediul de cultura a fost schimbat a doua zi si apoi la fiecare trei zile.



Fig. 2 – Cultura de cardiomiocite

Mentinerea cardiomiocitelor in mediu cu ser fetal de vitel asigura exprimarea unui fenotip imatur [1].

In primele 24 de ore, aproximativ jumatate din cardiomiocitele obtinute in urma procesului de tripsinizare adera la suprafata de cultura si se aplatizeaza. Atasarea de suprafata de cultura se realizeaza relativ rapid (cca. 4 ore), urmand apoi procesul de aplatizare. Dupa doua zile de la debutul experimentului, se observa grupuri de cardiomiocite care pulseaza asincron. Celulele sunt dispuse sub forma de agregate pulsatile, cu forma aproximativ circulara, asociate cu un monostrat de celule "fibroblast-like", cu forma alungita. La ambele tipuri, nucleul este sferic, situat central ai inconjurat de citoplasma. In interiorul nucleului se observă 1-2 nucleoli. Membrana plasmatica este bine delimitata (Fig. 3).

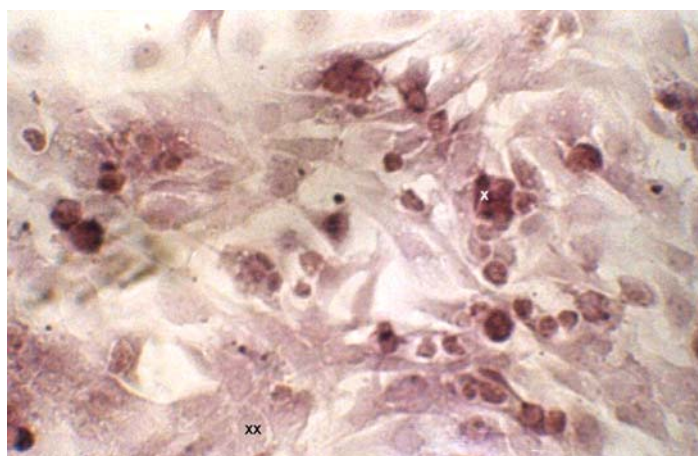
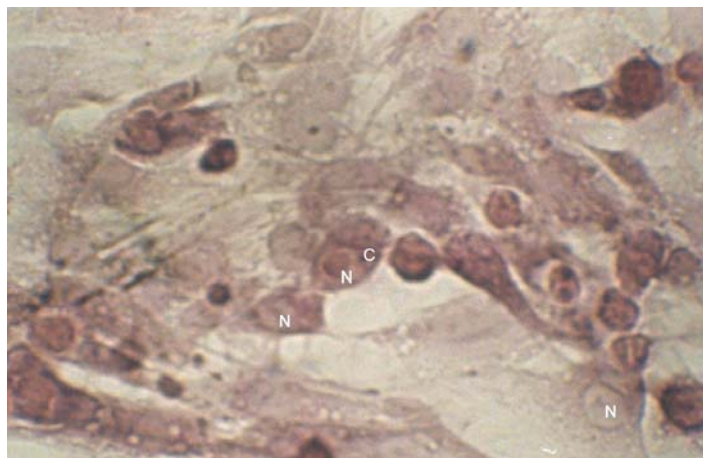


Fig. 3 - Cultura de miocite de 4 zile; coloratie cu hematoxilina-eozina; x20.
(x - agregat pulsatil cu forma aproximativ circulara,



xx - cardiomiocite cu aspect "fibroblast-like").

Fig.4 - Cultura de miocite de 4 zile; coloratie cu hematoxilina-eozina; x40.
(N – nucleu cu un nucleol, C – citoplasma).

După 3-4 zile de cultura (Fig. 4), cardiomiocitele formeaza un monostrat, care pulseaza sincron, cu o frecventa relativ constanta ($94,83 \pm 18,06$ batai/min.).

2. Determinarea viabilitatii celulare

Principiul metodei

Celulele non-viabile se coloreaza cu Trypan blue datorita patrunderii colorantului in celula.

Solutii si reactivi

Trypan blue 0,4% (Sigma); tampon fosfat salin; tripsina 0,125% (Sigma); ser fetal de vitel (Biochrom AG); DMEM-F12 (Biochrom AG).

Mod de lucru

S-a indepartat mediul de cultura de pe placi si s-a spalat cultura cu tampon fosfat salin. S-a adaugat 1ml tripsina 0,125% incalzita la 37°C si s-a mentinut pe placa de cultura pana la desprinderea celulelor. S-au recoltat celulele in mediu DMEM-F12 cu 10% ser fetal, pe gheata. Suspensia celulara este centrifugata 10 min., la 1.000g. Celulele sunt resuspendate in tampon fosfat salin. Pentru studiul viabilitatii celulare se amestecă 0,5 ml Trypan 0,4% cu 0,3 ml tampon fosfat salin si 0,2ml suspensie celulara bine omogenizata. Celulele viabile si non-viabile sunt numarate dupa 5-15 min. utilizand o camera de numarat Burkert - Turk.

Viabilitatea celulara (%) = $100 \times \text{total celule viabile (necolorate)} / \text{total celule (colorate si necolorate)}$.

Studiile au aratat ca viabilitatea cardiomiocitelor obtinute prin aceasta metoda este de 98% (Fig.5 - 6)



Fig. 5 - Cardiomiocite viabile; coloratie cu Trypan-blue; x20.
(celule rotunde necolorate, contur regulat).

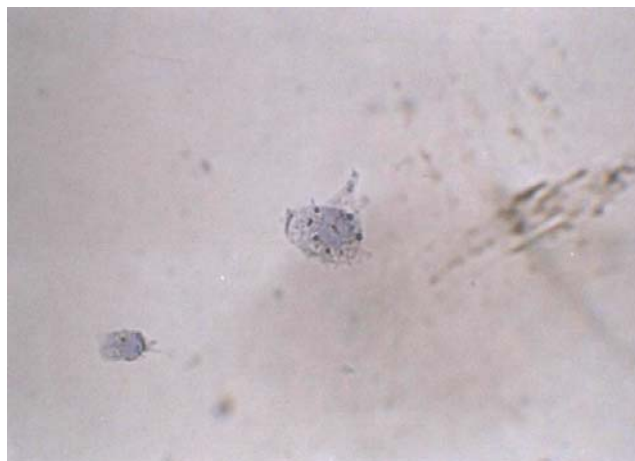


Fig.6 - Cardiomiocite neviabile; coloratie cu Trypan-blue; x40.
(celule colorate, citoplasma vacuolizata cu incluziuni, contur neregulat).

3. Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol

Pentru stabilirea mecanismelor hormonale implicate in protectia cardiomiocitelor impotriva stressului oxidativ s-a utilizat 17 β -estradiol (SC Biofarm SA). Fiind un compus lipidic acesta a fost dizolvat in etanol absolut. Concentratia de

lucru s-au obtinut prin dilutii seriale, ultima dilutie fiind in mediul de cultura. Pentru aceste studii s-a utilizat concentratia de 125 pg/ml mediu de cultura, care corespunde domeniului de valori normale (100-600 pg/ml). Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol s-a realizat dupa trei zile de la initierea culturii si a durat 48 ore.

Fenotipul observat in cazul culturii martor este mentinut si in cazul tratarii cu estrogen (Fig. 7).

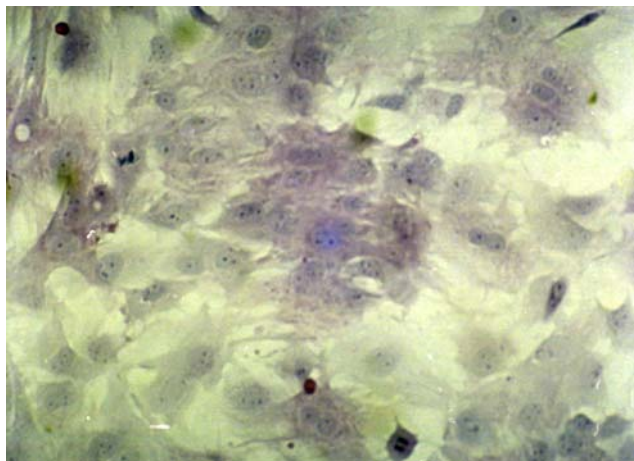


Fig. 7 – Cultura de cardiomiocite tratate cu 125 pg/ml estrogen; coloratie hematoxilina-eozina; x400.

4. Realizarea stressului oxidativ

In vederea realizarii stressului oxidativ s-a utilizat H_2O_2 30%. Peroxidul de hidrogen (perhidrolul) este o molecula omniprezenta, usor miscibila in apa, care traverseaza usor membranele, si devine reactiva in prezenta unor ioni metalici, dintre care cel mai important este fierul.

Impreuna cu acesti ioni metalici formeaza radicalii hidroxil, cu efecte citotoxice [17].

Perhidrolul este un agent oxidant foarte utilizat in laborator deoarece este comercializat cu o puritate ridicata si este usor de dozat.

Concentratiile alese pentru realizarea studiilor au fost de 10, 25 si 50 μM . Aceste concentratii s-au obtinut prin dilutii seriale in tampon fosfat salin, ultima dilutie fiind realizata in mediul de cultura. Mediul de cultura cu concentratia de H_2O_2 stabilita este adaugat peste cultura si mentinut timp de 10 min. Dupa aceasta perioada, se indeparteaza mediul cu H_2O_2 si se readauga mediul de cultura cu sau fara estradiol.

Prelucrarea probelor s-a efectuat la 24 ore de la realizarea stressului oxidativ.

Stressul oxidativ induce modificari morfologice concretizate in aparitia de vacuole si corpi apoptotici (Fig. 8). Tratamentul cu estrogen asigura o protectie partiala impotriva stressului oxidativ (Fig. 9).

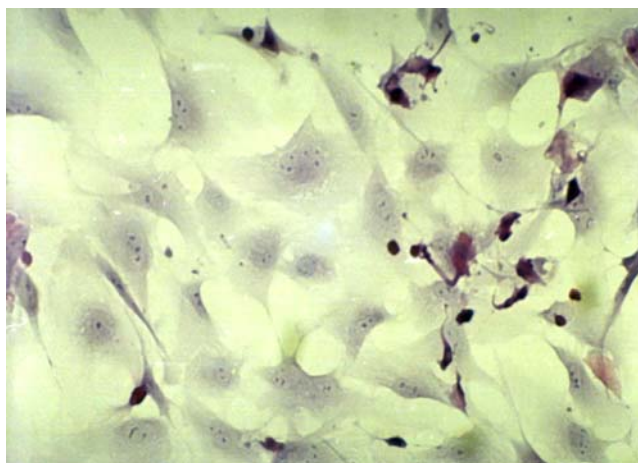


Fig. 8 – Cultura de cardiomiocite tratate cu 25 μM H_2O_2 ; coloratie cu hematoxilina-eozina; x250.

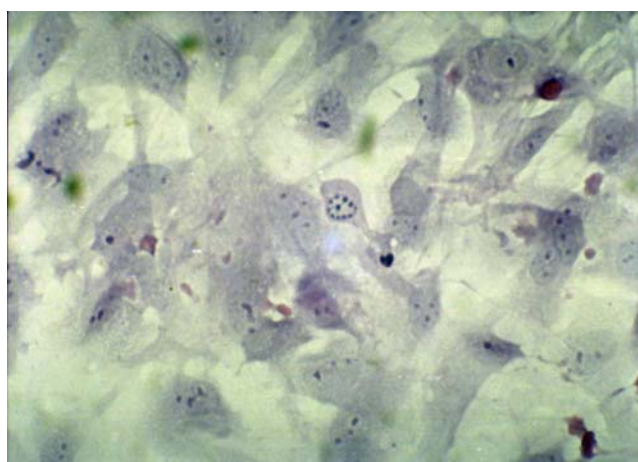


Fig. 9 – Cultura de cardiomiocite tratata cu 125 pg/ml estrogen si supusa stressului oxidativ cu 25 μM H_2O_2 ; coloratie cu hematoxilina-eozina; x400.

CAPITOLUL VII

Aspecte morfologice ale cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ, tratate si netratate cu estrogeni

1. Realizarea culturii de cardiomiocite neonatale

Cultura de cardiomiocite neonatale s-a obtinut prin modificarea tehnicii lui Pei-Feng Li (1999).

Pentru realizarea culturii de cardiomiocite s-au utilizat pui de sobolan de 2 zile. Puii au fost decapitati si inimile recoltate in mediu DMEM/HAM's F-12 (1:1)(Biochrom AG) suplimentat cu 5% ser fetal de vitel (Biochrom AG) , 100 UI/ml penicilina (Sicomed SA) si 100µg/ml streptomicina (Sicomed SA).

S-au recoltat ventriculele (aproximativ ¼ din inima sunt atrile) in tampon fosfat salin, 100 UI/ml penicilina si 100µg/ml streptomicina. Ventriculele au fost maruntite in fragmente de cca. 1mm³ si spalate cu acelasi tampon fosfat salin.

Dupa spalare fragmentele de tesut au fost supuse digestiei enzimatice cu 0,125% tripsina (Sigma) si 0,002% DNaza I (Sigma) timp de 10 min. la temperatura camerei, cu agitare. Suspensia celulara obtinuta se indeparteaza deoarece contine fragmente de celule si hematii. Se repeta procesul de tripsinizare iar celulele obtinute se recolteaza in mediu de cultura, pe gheata. Tripsinizarea se efectueaza pana la epuizarea tesutului. Intreaga suspensie celulara se centrifugheaza timp de 10 min. la 1000g. Celulele sedimentate sunt reluate in mediu de cultura si numarate pe o camera Burkert-Turk.

Deoarece suspensia celulara cuprinde celule musculare (cardiomiocite) si nonmusculare (fibroblaste cardiace) in vederea obtinerii unei culturi cat mai pure s-a realizat o etapa de preplating de 30 min. In acest interval de timp fibroblastele cardiace adera de suprafata de cultura iar suspensia de celule din mediu de cultura este formata in proportie de 98% de cardiomiocite.

Cardiomiocitele s-au cultivat la o densitate de 6x10⁵ cel/ml in mediu DMEM / HAM's F-12 (1:1) suplimentat cu 10% ser fetal de vitel, 100 UI/ml penicilina, 100µg/ml streptomicina si 100µM 5'-Bromo-2-deoxiuridina (Sigma).

Mediul de cultura a fost schimbat a doua zi si apoi la fiecare trei zile.

2. Realizarea stressului oxidativ

In vederea realizarii stressului oxidativ s-a utilizat H₂O₂ 30%. Concentratiile alese pentru realizarea studiilor au fost de 10, 25 si 50 µM. Aceste concentratii s-au obtinut prin dilutii seriale in tampon fosfat salin, ultima dilutie fiind realizata in mediul de cultura. Mediul de cultura cu concentratia de H₂O₂ stabilita este adaugat peste cultura de 5 zile si mentinut timp de 10 min. Dupa aceasta perioada, se indeparteaza mediul cu H₂O₂ si se readauga mediul de cultura cu sau fara estradiol.

Prelucrarea probelor s-a efectuat la 24 ore de la realizarea stressului oxidativ.

3. Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol

Pentru stabilirea mecanismelor hormonale implicate in protectia cardiomiocitelor impotriva stressului oxidativ s-a utilizat 17 β -estradiol (SC Biofarm SA). Fiind un compus lipidic acesta a fost dizolvat in etanol absolut. Concentratia de lucru s-au obtinut prin dilutii seriale, ultima dilutie fiind in mediul de cultura. Pentru aceste studii s-a utilizat concentratia de 125 pg/ml mediu de cultura, care corespunde domeniului de valori normale (100-600 pg/ml). Tratarea cardiomiocitelor cu estradiol s-a realizat dupa trei zile de la initierea culturii si a durat 48 ore.

CAPITOLUL VIII

Evaluarea aspectelor morfologice ale cardiomiocitelor supuse stressului oxidative si tratate cu estrogeni

1. Studii de microscopie optica privind caracteristicile cardiomiocitelor normale si supuse stressului oxidativ

Dupa insamantarea initiala, cardiomiocitele de sobolan nou-nascut adera de suprafata de cultura si se aplatizeaza, cresc gradat in dimensiune si formeaza contacte cu celulele vecine. Dupa 3 zile in cultura, cardiomiocitele izolate si agregate prezinta proprietati contractile. Cardiomiocitele martor sunt mono- sau binucleate, cu nuclei rotunzi, plasati central. Ele au o forma neregulata si citoplasma granulara (Fig.1).

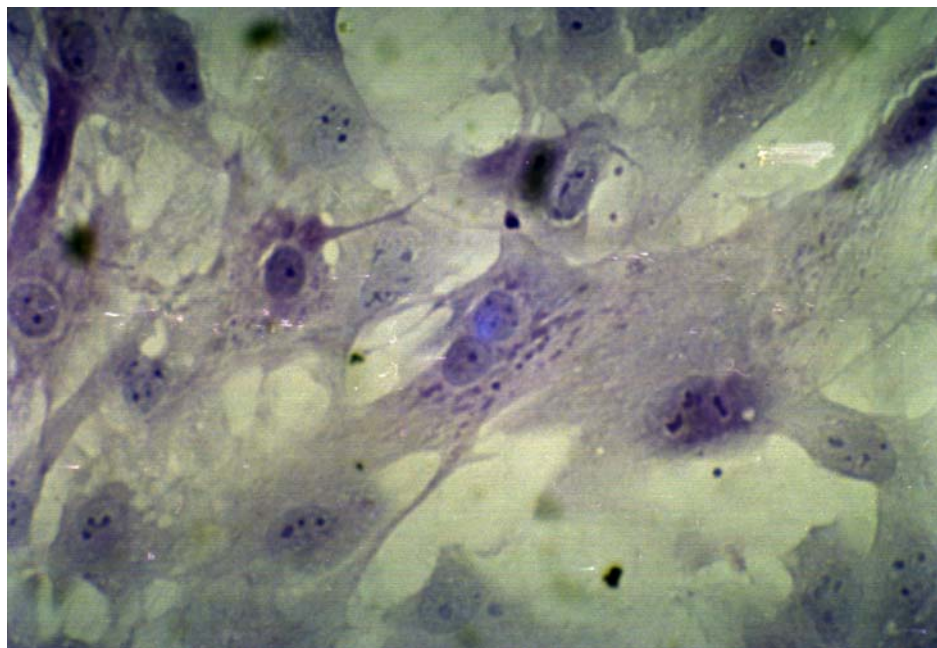


Fig. 1 - Cardiomiocite martor. Coloratie hematoxilina-eozina. X400.

Dupa 5 zile cultura cardiomiocitele au fost expuse la diferite concentratii de H_2O_2 (10, 25 si 50 μM).

Pentru studiile de microscopie optica cardiomiocitele cultivate pe lamele au fost fixate in Bouin si colorate cu hematoxilina - eozina.

Rezultatele noastre arata ca H_2O_2 are un efect citotoxic dependent de doza. Astfel, cardiomiocitele expuse la **10 μM H_2O_2** au o morfologie similara cu cea a matorului. Cu toate acestea, in aceste culture au fost observate unele celule vacuolizate si corpi apoptotici (Fig.2).

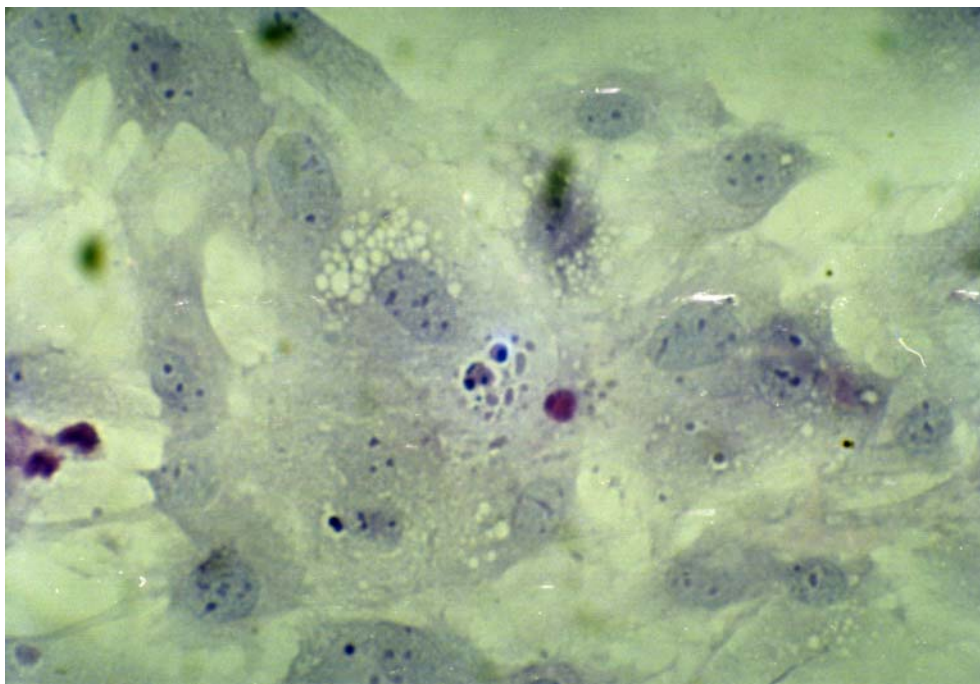


Fig. 2 - Cardiomiocite expuse 10 minute la 10 μM H_2O_2 in care se observa corpi apoptotici (sageata). Coloratie hematoxilina-eozina. X400.

In culturile expuse la **25 μM H_2O_2** au fost observate multe cardiomiocite rotunjite si degenerate (Fig.3).

Culturile de cardiomiocitele tratate cu **50 μM H_2O_2** prezinta foarte multe celule degenerate si citolizate (Fig.4).

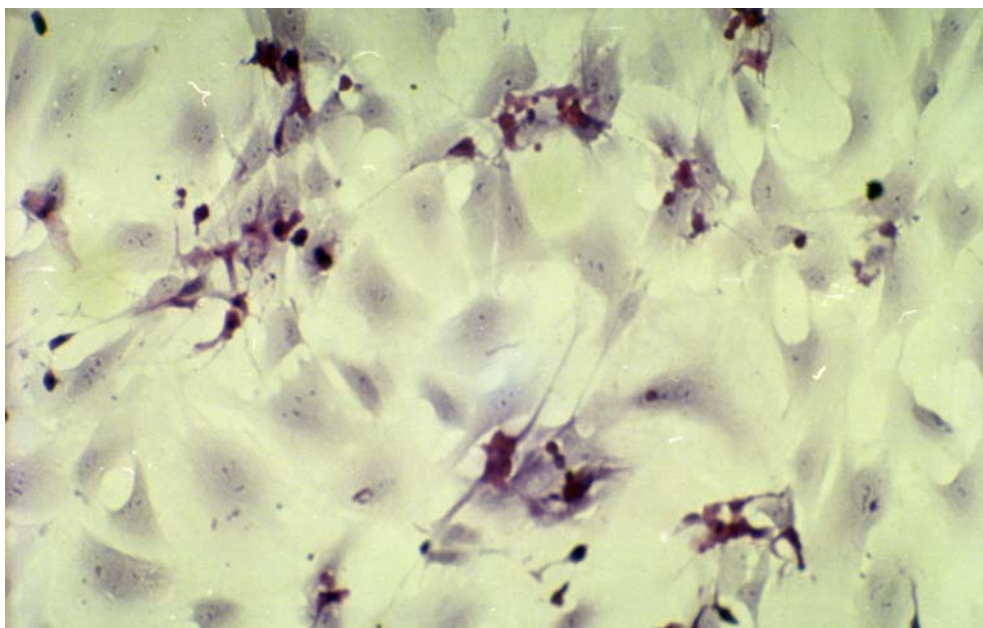


Fig. 3 - Cardiomiocite expuse 10 minute la 25 μM H_2O_2 . Se observa celule degenerate (sageata). Coloratie hematoxilina-eozina. X250.

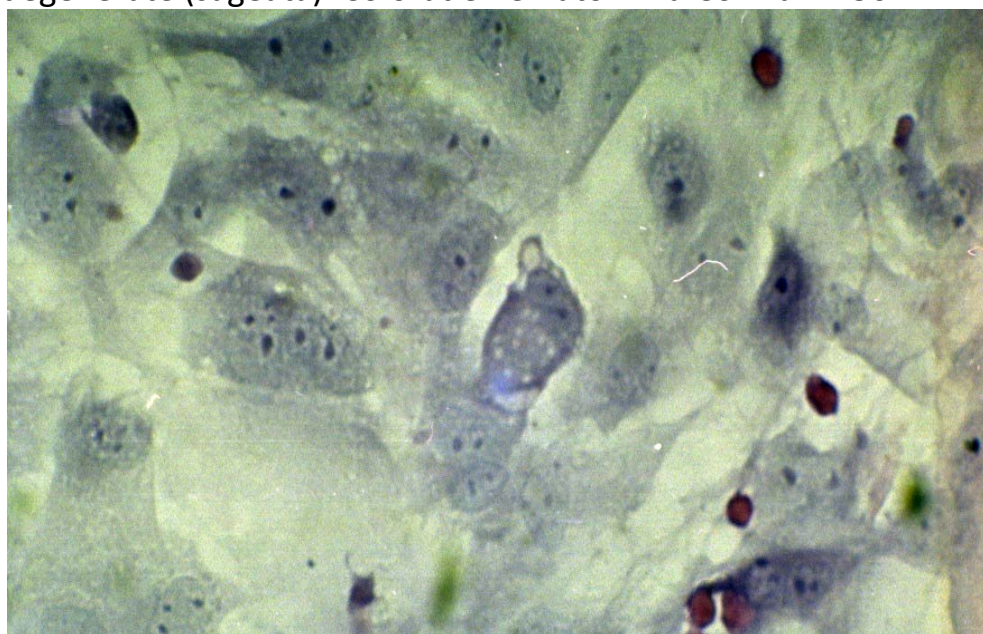


Fig.4 - Cardiomiocite expuse 10 minute la 50 μM H_2O_2 . Proportia de celule degenerate este mare (sageata). Coloratie hematoxilina-eozina. X400.

In urma tratamentului cu estradiol a culturilor expuse la 25 μM H_2O_2 numarul celulelor desprinse de substrat este mai mic iar procentul de celule apoptotice este foarte mic (Fig. 5). Rezultate similare s-au inregistrat si in cazul expunerii la 50 μM H_2O_2 (Fig. 6).

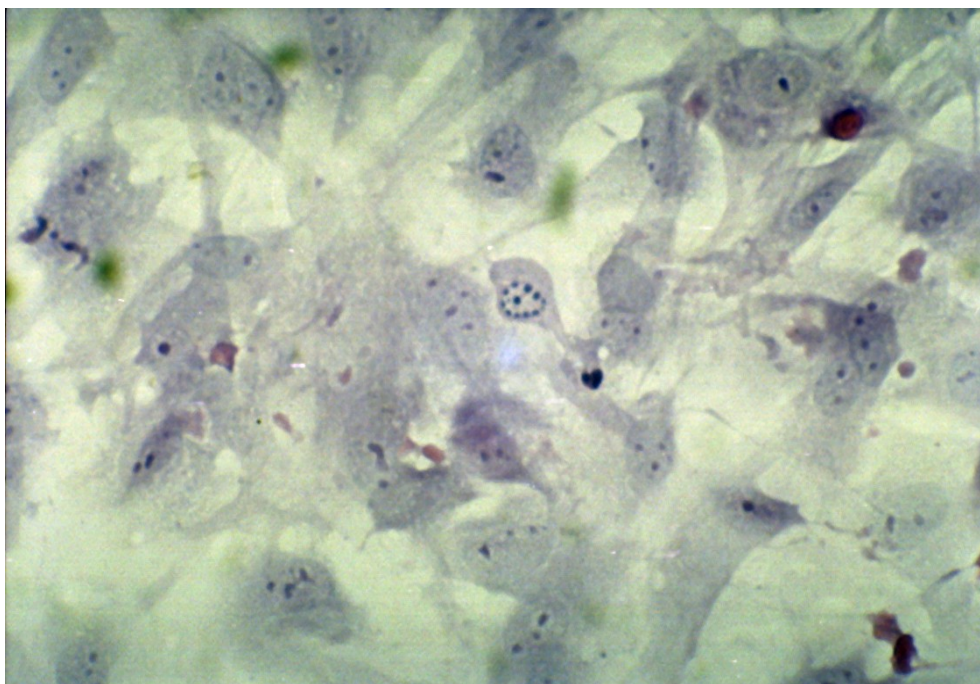


Fig.5 – Cardiomiocite tratate cu estradiol (125 pg/ml) dupa stress oxidativ indus de 25 μ M H₂O₂. Coloratie hematoxilina-eozina. X400

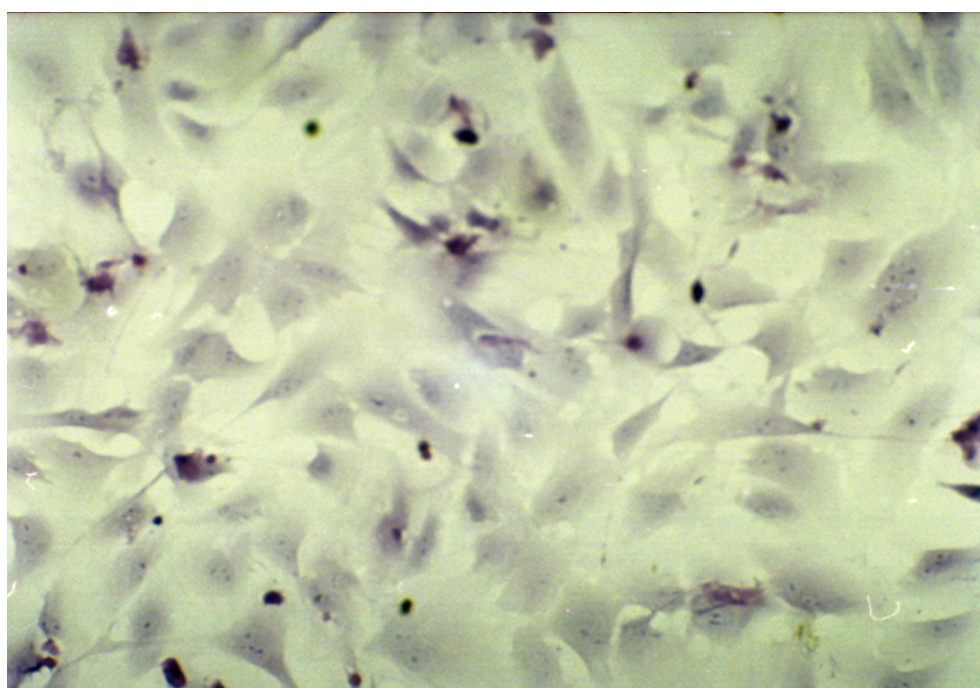


Fig. 6 – Numar mic de celule apoptotice in urma tratarii cu estradiol (125 pg/ml) a cardiomiocitelor supuse stressului oxidative cu 50 μ M H₂O₂. Coloratie hematoxilina-eozina. X250

2. Studiul proteinelor contractile (α -actina si α -tropomiozina)

Cardiomiocitele cultivate pe lamele au fost fixate 10 minute, in fixator Boiun. Dupa spalare cu tampon fosfat salin (TFS) au fost incubate 10 min cu 3% H_2O_2 pentru blocarea peroxidazei endogene, spalate cu TFS si incubate 30 min cu 2% albumina serica bovina (BSA, fractia V) pentru blocarea legarii nespecifice. Cardiomiocitele au fost incubate peste noapte la 4^0C fie cu anticorpi monoclonali de soarece anti α -actina sarcomerica (Sigma), diluati 1:400 sau anticorpi monoclonali de soarece anti tropomiozina sarcomerica (Sigma) diluati 1:50. Dupa incubarea cu anticorpul primar celulele au fost spalate cu TFS si incubate 1 ora, la temperatura camerei cu anticorpul secundar , anticorp de iepure anti IgG de soarece cuplat cu peroxidaza (Sigma), diluat 1:350. Dupa incubarea cu anticorpul secundar celulele au fost spalate cu TFS si incubate 5-15 min cu o solutie de 0,05% 3,3' diaminobenzidin` (DAB) si 0,015% H_2O_2 , in TFS pentru dezvoltarea complexului imun. Nucleii cardiomiocitelor au fost contrastati cu Hematoxilina Harris.

Cardiomiocitele in diferite stadii de diferentiere au fost distinse de fibroblaste prin imunomarcarea cu anticorpi monoclonali anti α -actina sarcomerica si tropomiozina. Deoarece in celulele musculare, tropomiozina este asociata cu miofibrilele ce contin α -actina sarcomerica, distributia celor doua proteine ar trebui sa fie similara. Intradevar, rezultatele noastre au indicat o distributie imunohistochimica similara a celor doua proteine contractile, desi reactia imunohistochimica pentru tropomiozina a fost mai intensa comparativ cu α -actina sarcomerica. Morfologia miofibrilelor din cardiomiocitele martor, care se contracta spontan este prezentata in figura 7. Miofibrilele din cardiomiocitele isolate sau agregate sunt alungite, strans impachetate si distribuite uniform in toata celula, mai abundente la periferia sarcoplasmei (Fig.7).

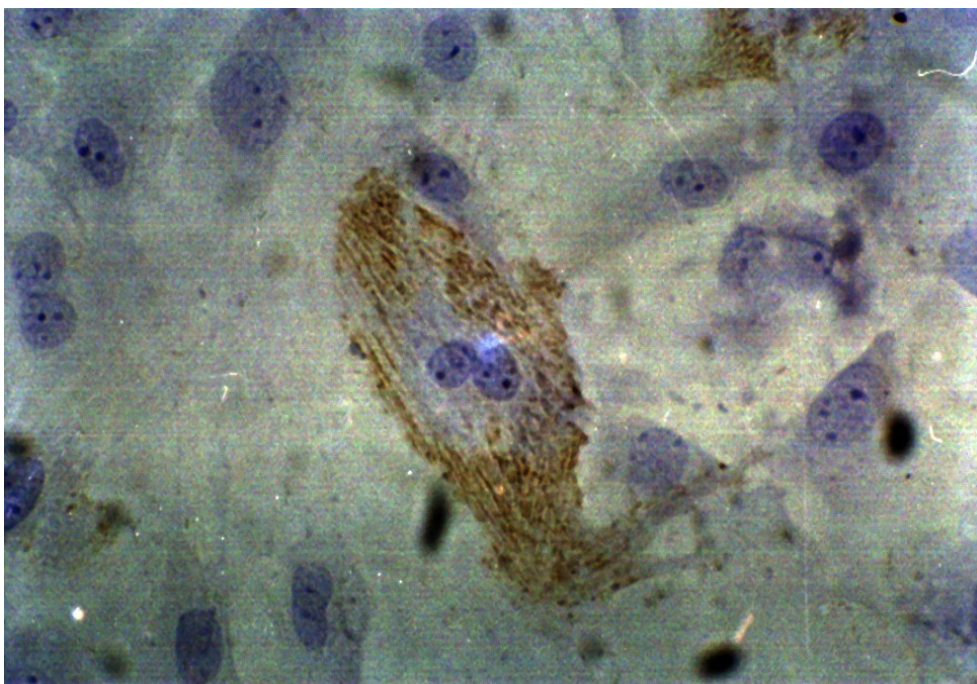


Fig. 7 - Identificarea imunohistochimica a α -actinei sarcomerice in culturile de cardiomiocite neonatale. Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

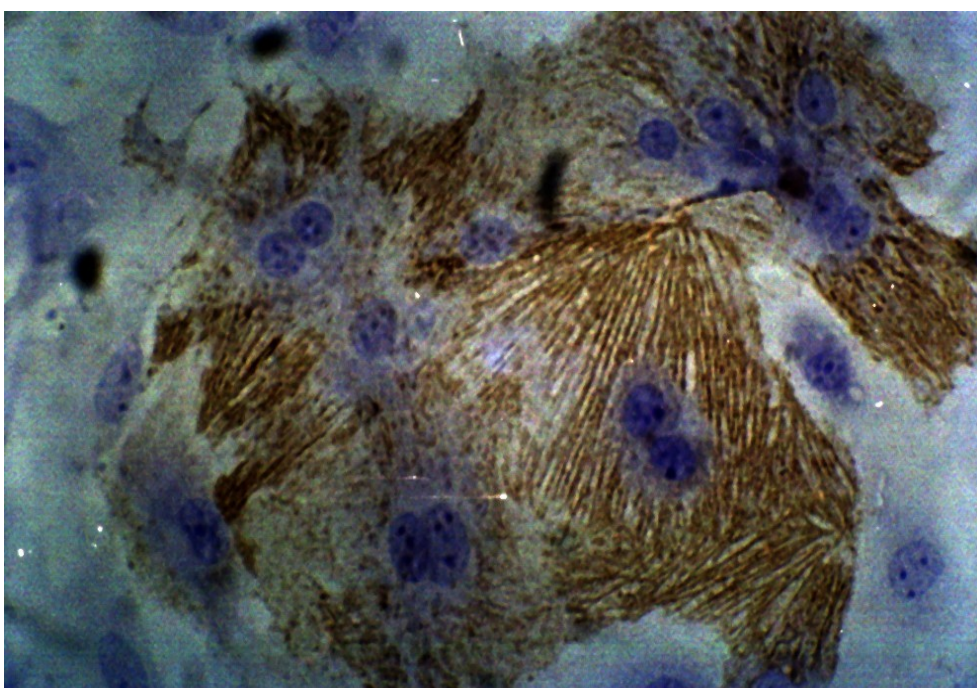


Fig. 8 - Identificarea imunohistochimica a α -actinei sarcomerice in culturile de cardiomiocite supuse stressului oxidativ cu 10 μ M H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

Imunohistochimia proteinelor contractile din cardiomiocitele expuse la H_2O_2 a indicat o alterare progresiva dependenta de concentratie.

Dupa expunerea la **10 μM H_2O_2** (Fig.8) si **25 μM H_2O_2** (Fig.9) reactia imunohistochimica pentru ***α -actina sarcomerica*** a fost neuniforma si redusa. La o concentratie mai mare (50 μM H_2O_2) reactia imunohistochimica pentru α -actina sarcomerica a fost absenta.

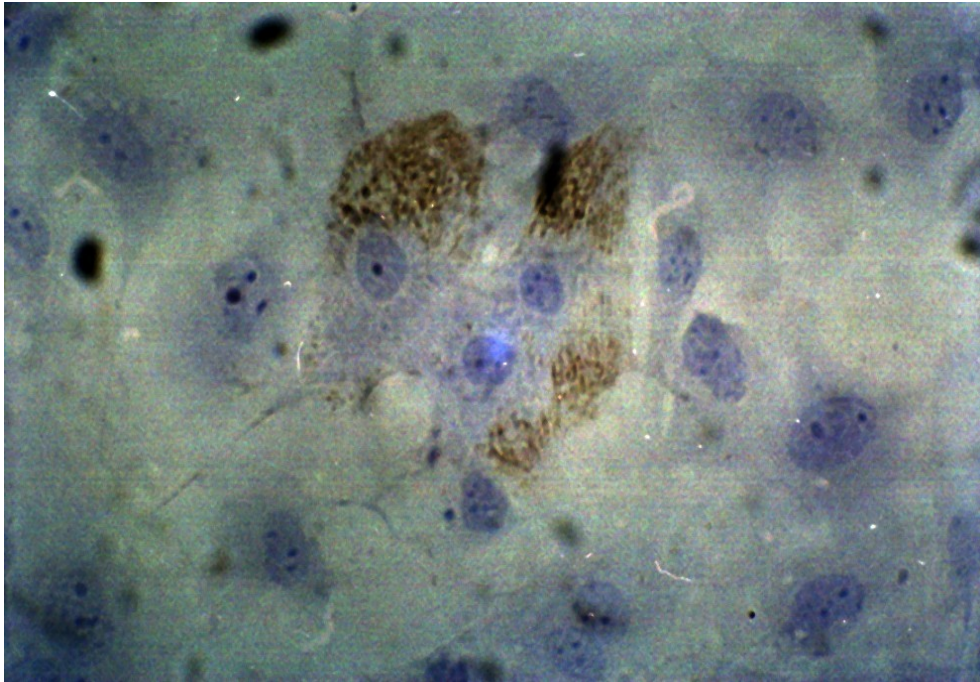


Fig. 9 - Identificarea imunohistochimica a α -actinei sarcomerice in culturile de cardiomiocite expuse la 25 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

In cazul tratamentului cu estradiol, α -actina sarcomerica a fost detectata in toate cele trei variante experimentale (Fig. 10, 11, 12), cu o alterare in cazul concentratiei de 50 μM H_2O_2 (Fig. 12).

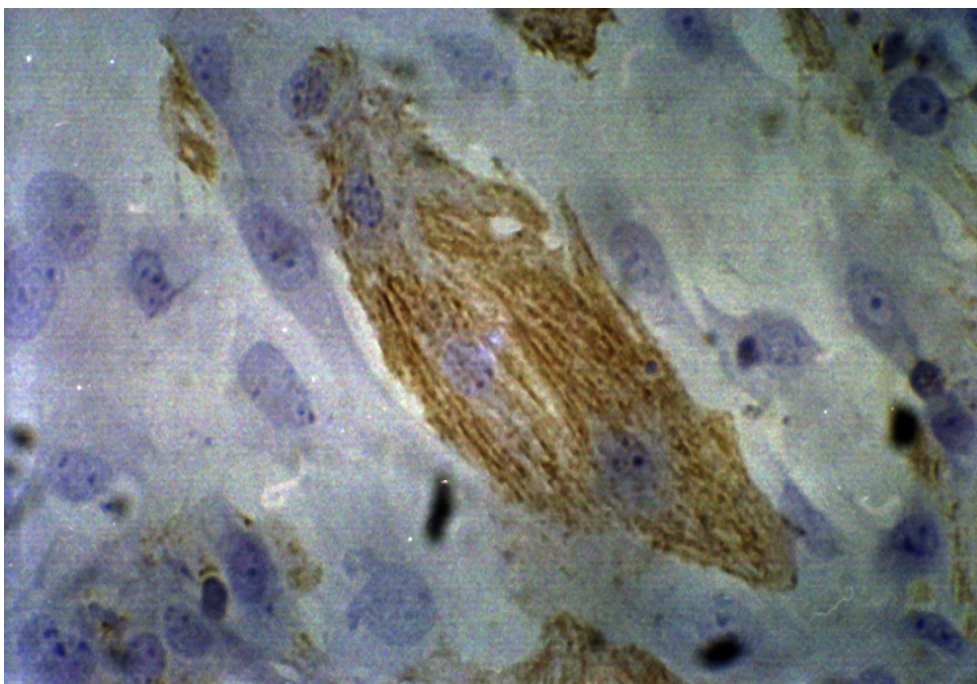


Fig. 10 – Reactie pozitiva pentru actina dupa tratamentul cu estradiol si 10 μ M H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

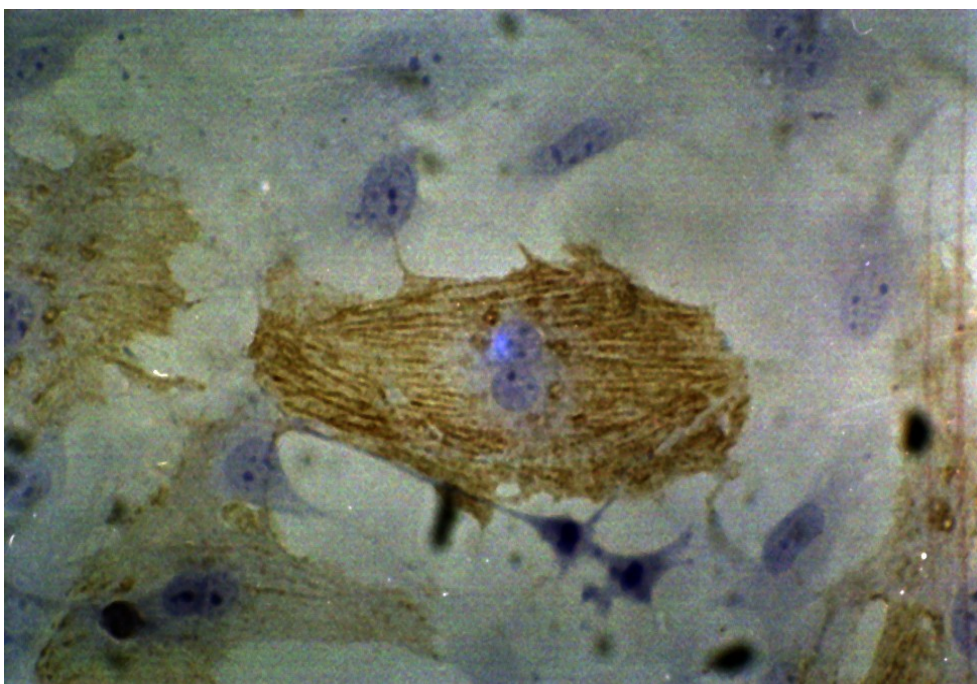


Fig. 11 – Reactie imunohistochimica pentru actina dupa tratamentul cu estradiol si 25 μ M H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

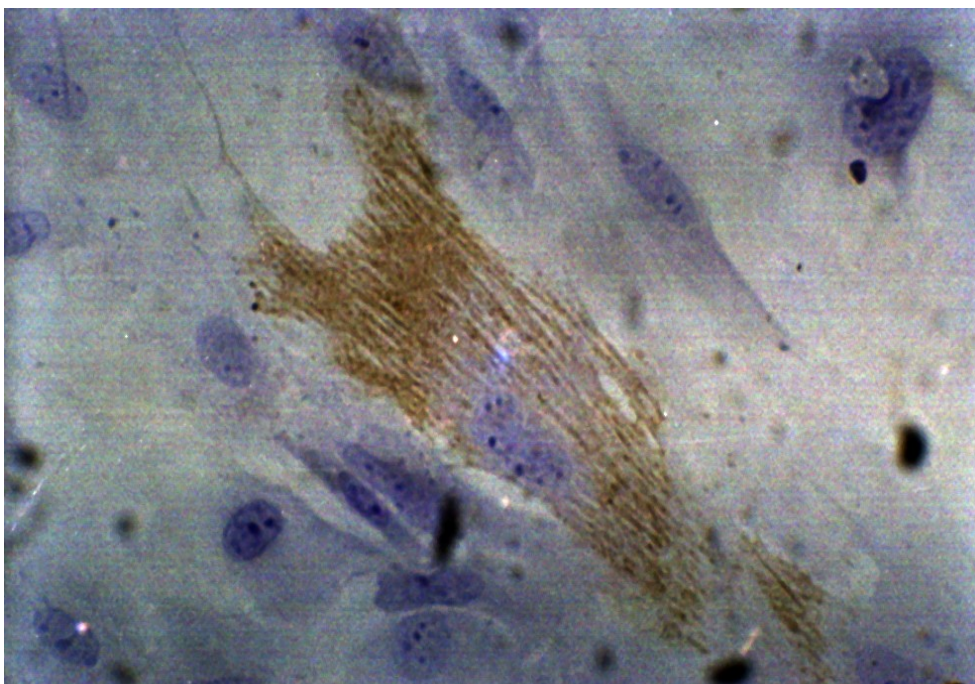


Fig. 12 – Distribuție alterată a actinei după tratamentul cu estradiol și 50 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastați cu hematoxilina Harris. X400.

Imunohistochimia pentru **tropomiozina** a indicat că această proteină contractilă a fost mult mai rezistentă la tratamentul cu H_2O_2 deoarece are o distribuție redusă sau alterată comparativ cu miocitele cardiace martor (Fig. 13), reacția imunohistochimică a fost prezentă la toate concentrațiile de H_2O_2 folosite în experiment (Fig.14, 15, 16). Cu toate acestea, reacția imunohistochimică pentru tropomiozina în cardiomiocitele expuse la 50 μM H_2O_2 a indicat o distribuție amorfă (Fig.16) spre deosebire de concentrațiile mai scăzute unde tropomiozina își menține organizarea fibrilară (Fig.14 și Fig.15).

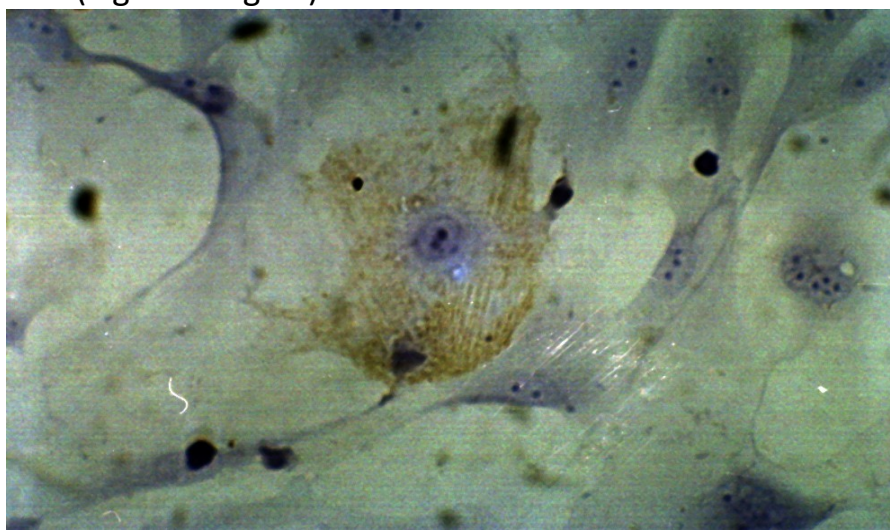


Fig. 13 - Identificarea imunohistochimică a tropomiozinei sarcomerice în culturile de cardiomiocite neonatale. Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastați cu hematoxilina Harris. X400.

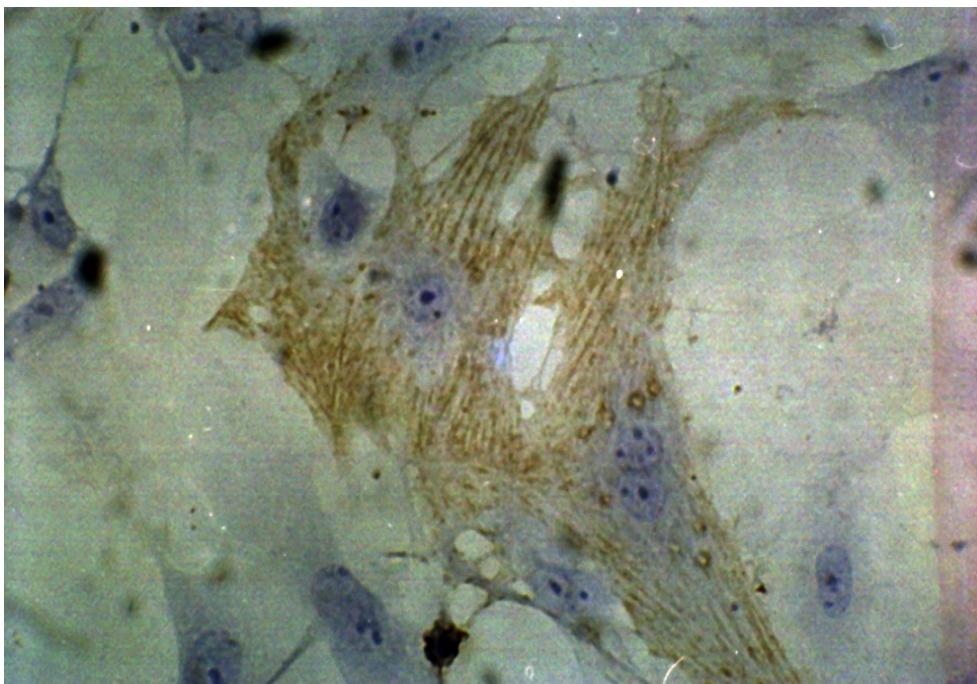


Fig. 14 - Identificarea imunohistochimica a tropomiozinei sarcomerice in culturile de cardiomiocite supuse stressului oxidativ cu 10 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

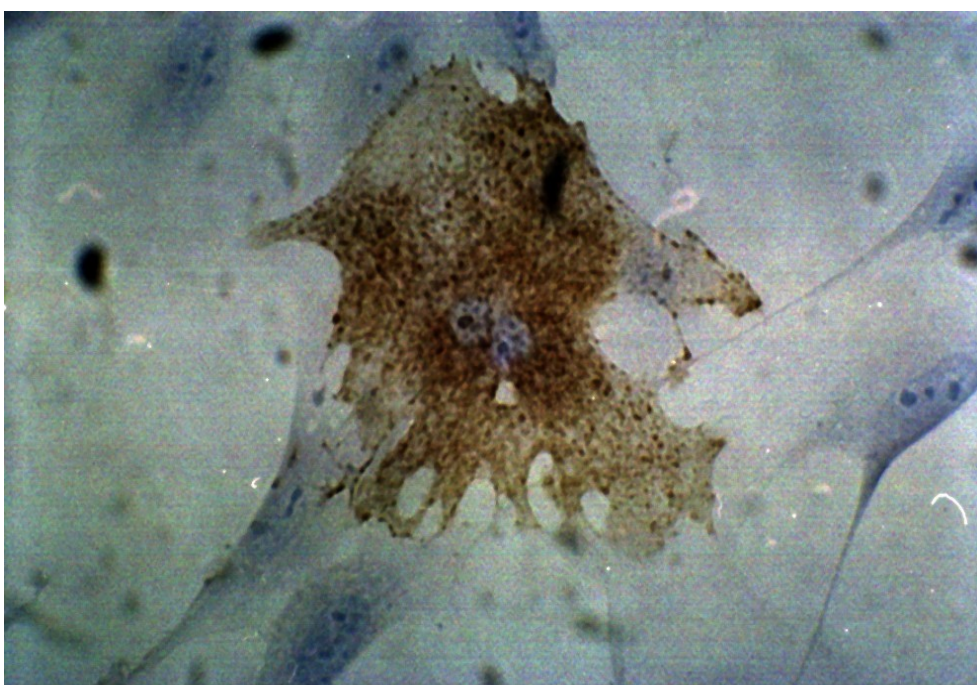


Fig. 15 - Identificarea imunohistochimica a tropomiozinei sarcomerice in culturile de cardiomiocite expuse la 25 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

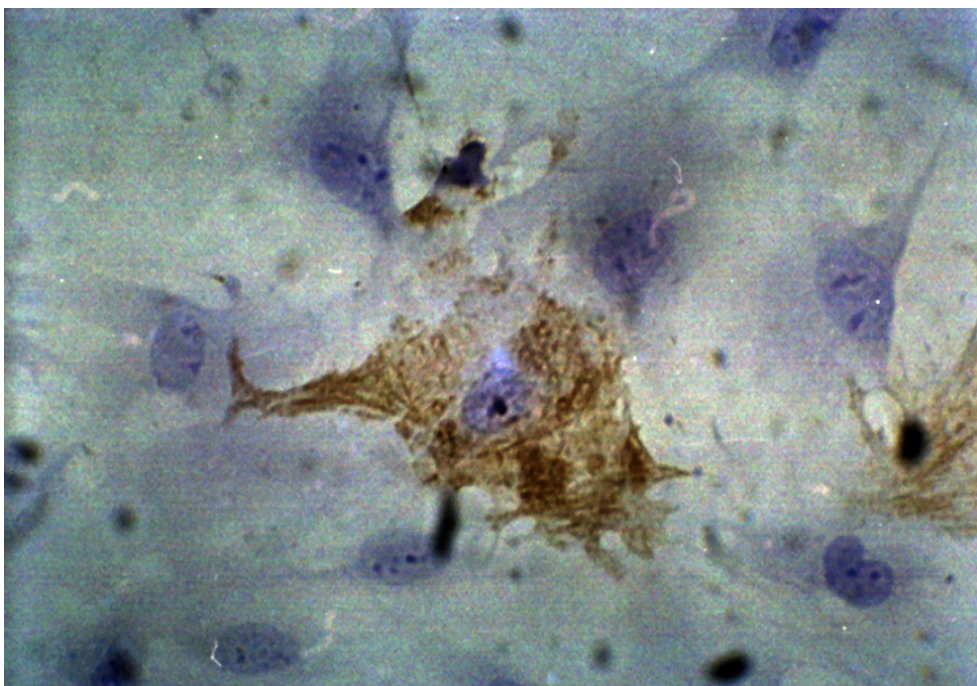


Fig. 16 – Distribuție alterată a tropomiozinei în urma tratamentului cu 50 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastați cu hematoxilina Harris. X400

Distribuția tropomiozinei în toate cele trei variante experimentale care au suferit pretratament cu estradiol înaintea celui cu H_2O_2 a fost foarte asemănătoare cu cea a matorului (Fig. 17, 18, 19).

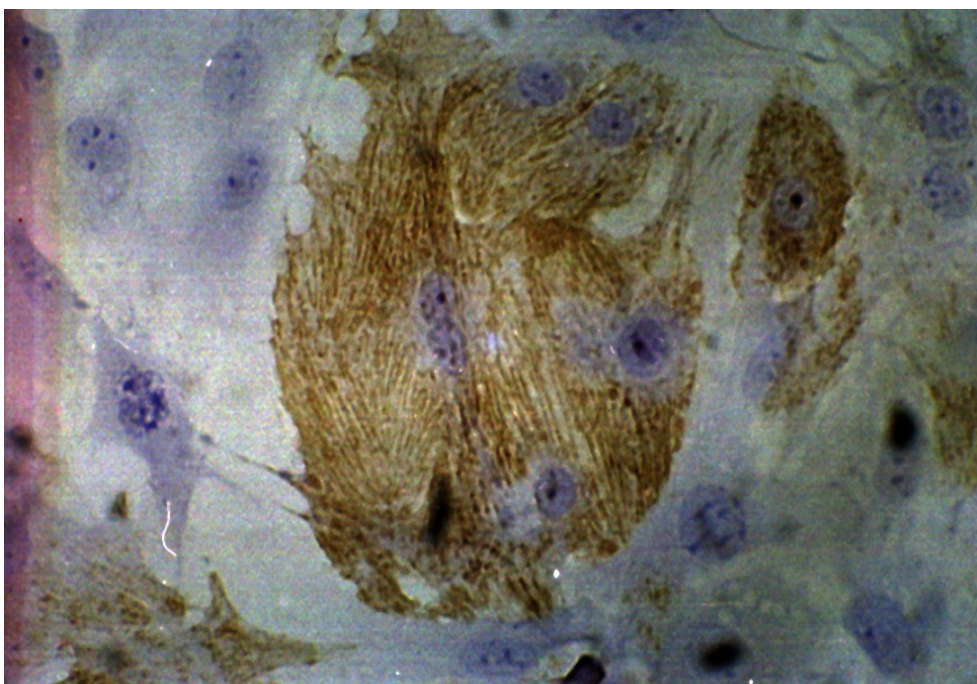


Fig. 17 – Reacție imunohistochimică pozitivă pentru tropomiozină după tratamentul cu estradiol și 10 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastați cu hematoxilina Harris. X400

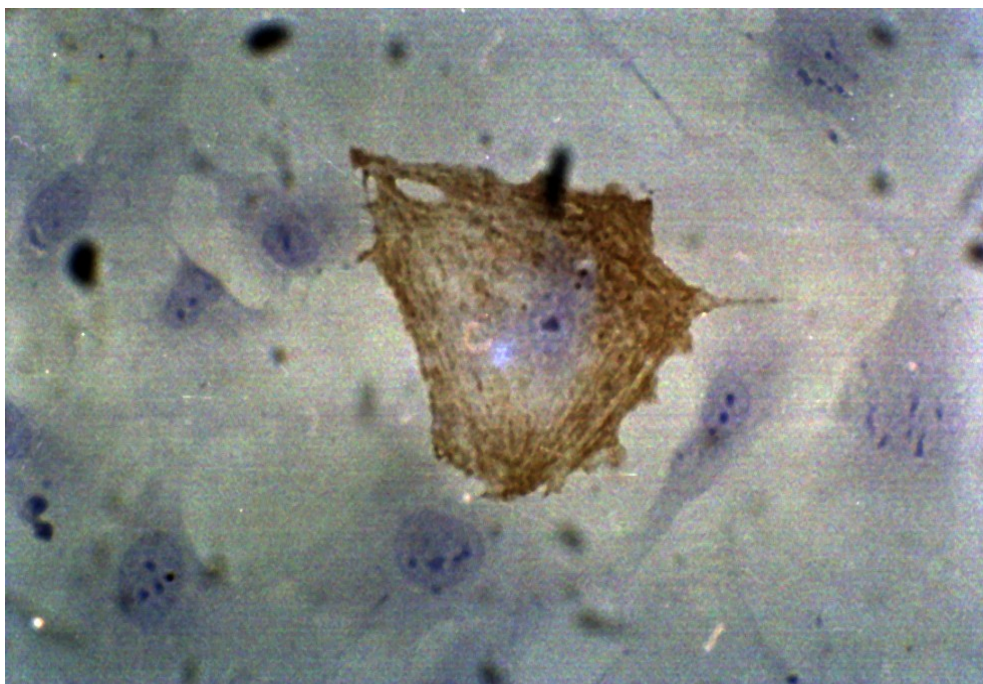


Fig. 18 - Reactie imunohistochimica pozitiva pentru tropomiozina dupa tratamentul cu estradiol si 25 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400

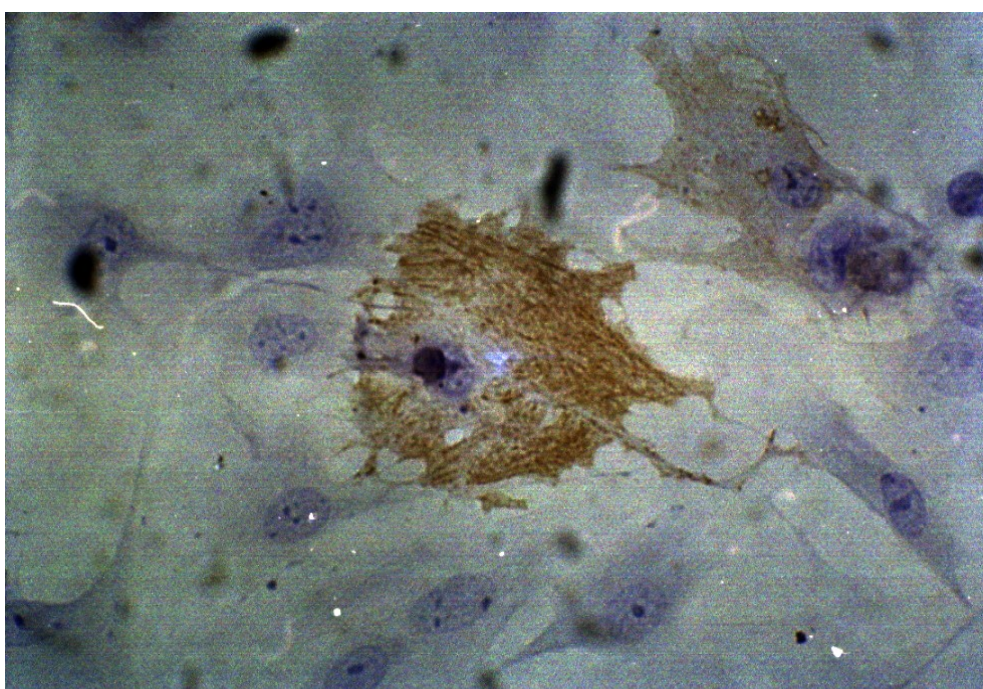


Fig. 19 – Distributie modificata a tropomiozinei dupa tratamentul cu cu estradiol si 50 μM H_2O_2 . Nucleii cardiomiocitelor sunt contrastati cu hematoxilina Harris. X400.

3. Aspecte electronomicroscopice ale actiunii esrtadiolului asupra cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ

Pentru studiile de microscopie electronica celulele au fost fixate 30 minute in 2,5% glutaraldehida in tampon cacodilat de sodiu 0,1 M, pH 7,4, postfixate cu 1% OsO₄ timp de 1 ora, deshidratate prin concentratii crescatoare de etanol si incluse in Epon 812. Sectiunile ultrafine taiate la ultramicrotom au fost colorate cu acetat de uranil si citrate de plumb, si observate la un microscop electronic Phillips 206S, la 80 KV.

Observatiile de microscopie electronica au indicat ca ultrastructura cardiomiocitelor cultivate cinci zile este asemanatoare cu cea a cardiomiocitelor ventriculare *in vivo* (Fig.20). Spre deosebire de cardiomiocitele ventriculare *in vivo*, cele cultivate prezinta mitocondrii mai alungite si o cantitate mai mare de reticul endoplasmatic si granule de glicogen (Fig.21).



Fig. 20 - Imagine electrono-microscopica a unui cardiomiocit neonatal, dupa cinci zile de cultura. In citoplasma se remarca miofibrile, reticul endoplasmatic rugos, mitocondrii alungite si granule de glicogen. X6000.



Fig. 21 - Aspect ultrastructural al mitocondriilor din cardiomiocitele neonatale.
X27400.

Rezultatele de microscopie electronica au indicat ca H_2O_2 induce alterari ultrastructurale in functie de doza utilizata.

Majoritatea cardiomiocitelor expuse la **10 μM H_2O_2** , prezinta o ultrastructura similara cu cea a cardiomiocitelor martor. Cu toate acestea, au fost identificate si celule cu o morfologie alterata (Fig.22). Cardiomiocitele alterate se rotunjesc (Fig.23), granulele de glicogen sunt prezente in numar mai mare iar unele mitocondrii fuzioneaza (Fig.24).

Incubarea cardiomiocitelor cu **25 μM H_2O_2** a evidenciat o crestere a proportiei de celule alterate. In aceste cardiomiocite numarul de granule de glicogen creste considerabil si o proportie mare de mitocondrii sunt hipertrofiate si cu membrane mitocondriale dezorganizate (Fig.25). In plus, unele mitocondrii fuzionate prezinta criste dezorganizate si matrix vacuolizat (Fig.26).

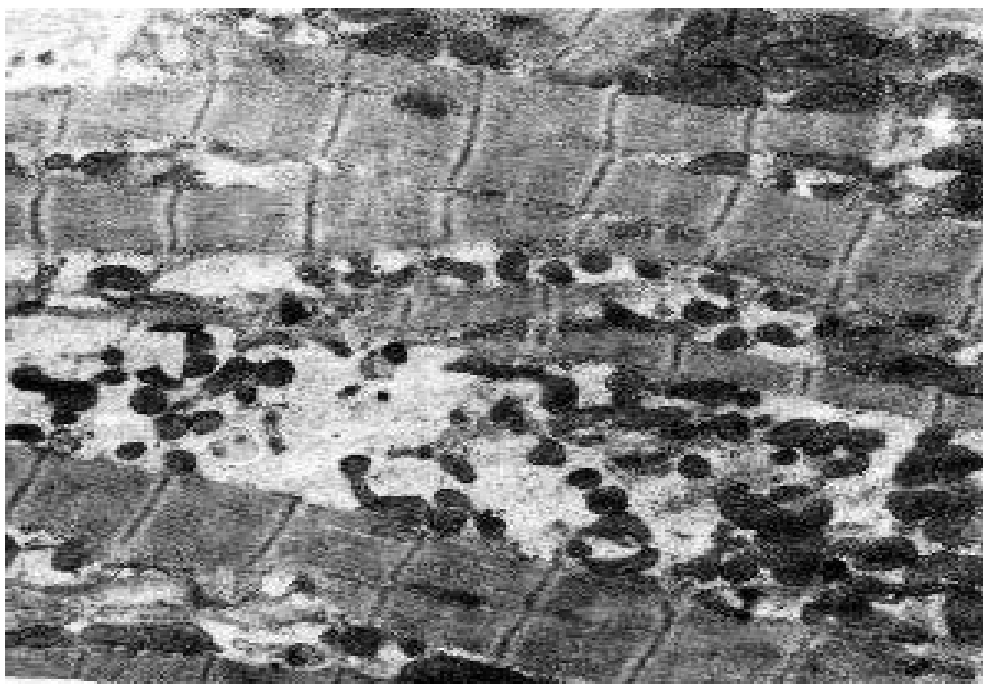


Fig. 22 - Cardiomiocit supus stressului oxidativ cu 10 μM H_2O_2 . Se remarca cresterea numarului de granule de glicogen. X9000.

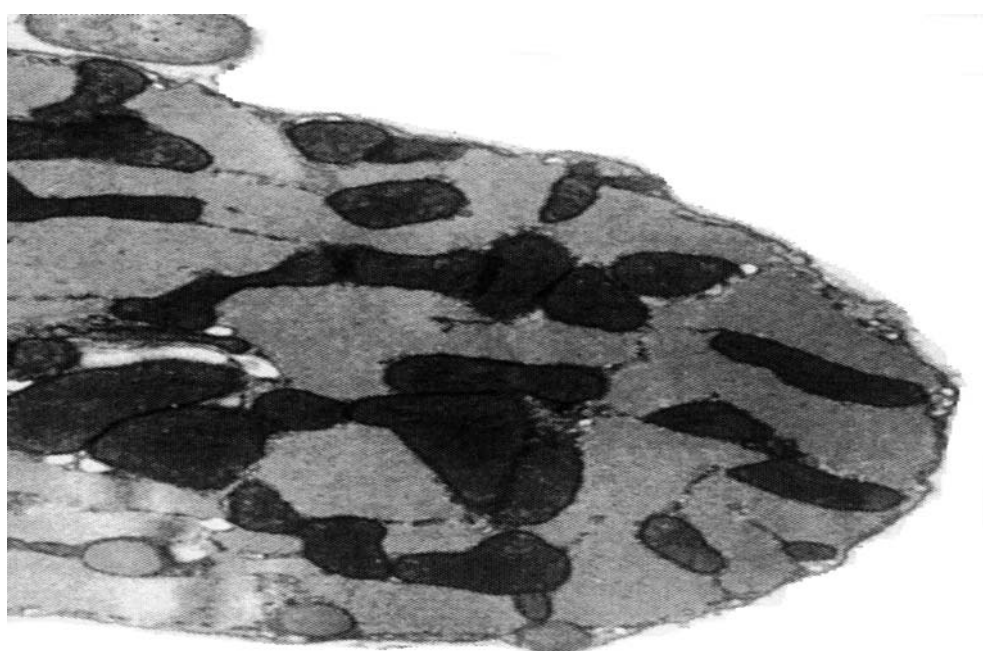


Fig. 23 - Imagine ultrastructurala a unui cardiomiocit rotunjit, expus la 10 μM H_2O_2 . X15.000.

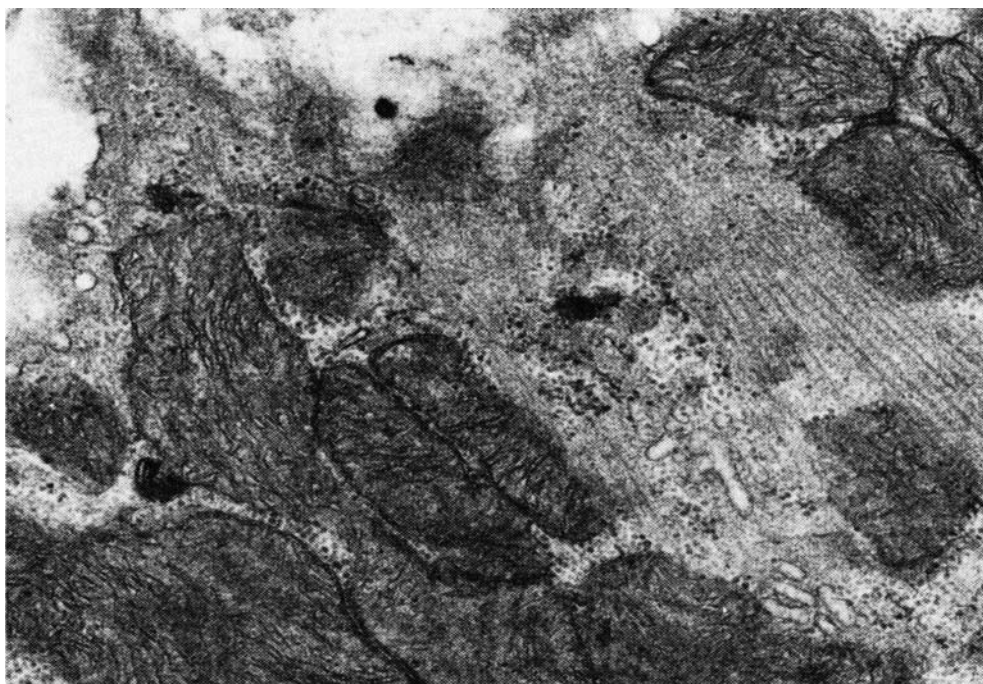


Fig. 24 - Mitocondrii fuzionate in cardiomiocitele expuse la 10 μM H_2O_2 .
X24000.

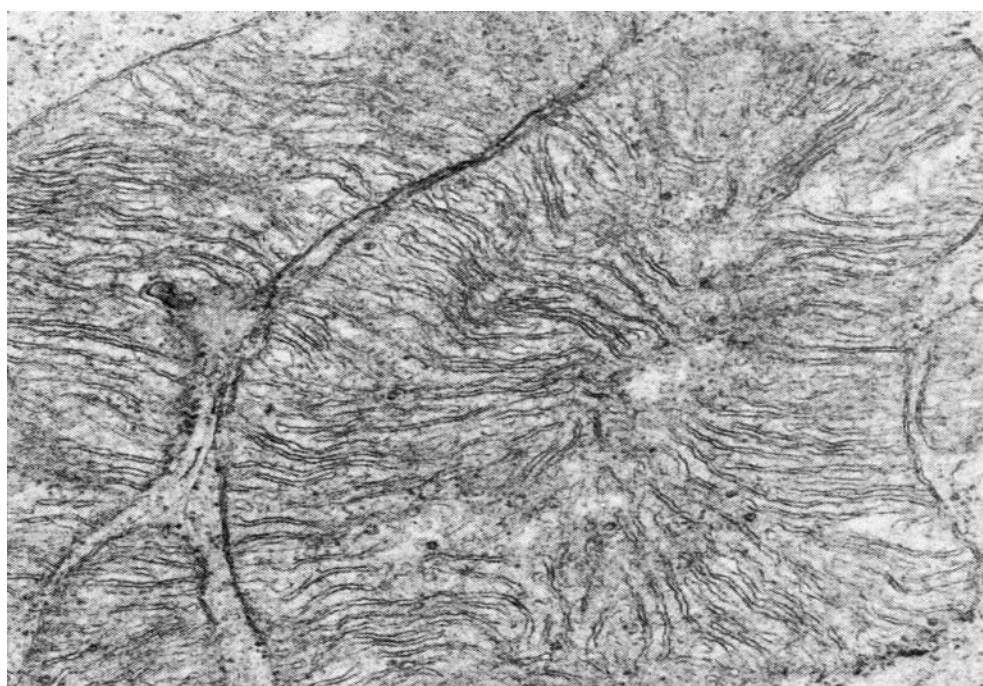


Fig. 25 - Mitocondrii hipertrofiate cu membrana mitocondrială alterată în cardiomiocitele expuse la 25 μM H_2O_2 . X24.000.

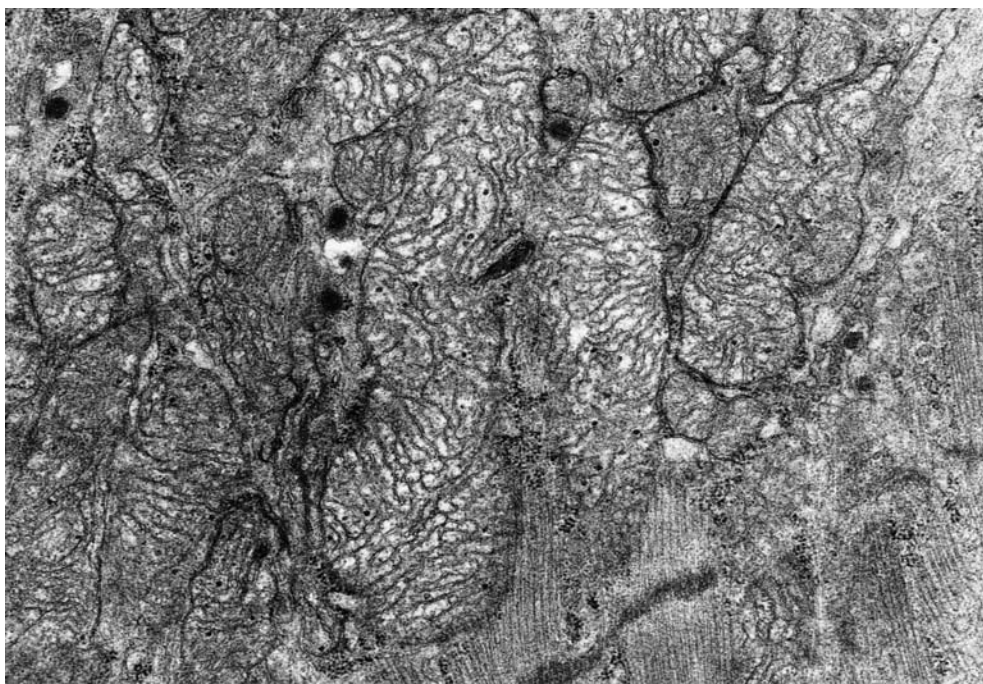


Fig. 26 - Mitocondrii cu cristele dezorganizate in cardiomiocitele expuse la 25 μM H_2O_2 . X20.000.

În prezența a **50 μM H_2O_2** ultrastructura cardiomiocitelor se modifică profund. Un mare număr de cardiomiocite sunt alterate (Fig.27). Acestea prezintă dezorganizarea sarcolemmei și eliberarea agregatelor mitocondriale. În plus, cardiomiocitele apoptotice nu prezintă miofibrile.

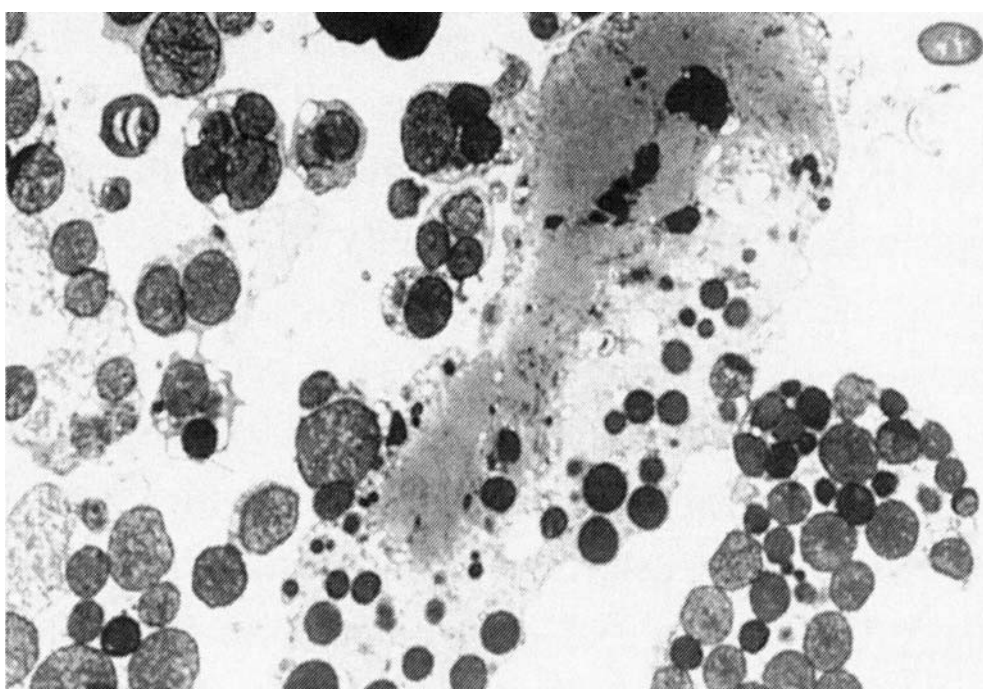


Fig. 27 - Ultrastructura cardiomiocitelor degenerate supuse stressului oxidativ cu 50 μM H_2O_2 . X7500.

Tratamentul cardiomiocitelor cu 125 pg/ml estradiol a indicat ca acesta are un efect protector asupra celulelor. Cardiomiocitele cultivate in prezenta estradiolului prezinta o morfologie similara cu cea a cardiomiocitelor martor (Fig.28.).

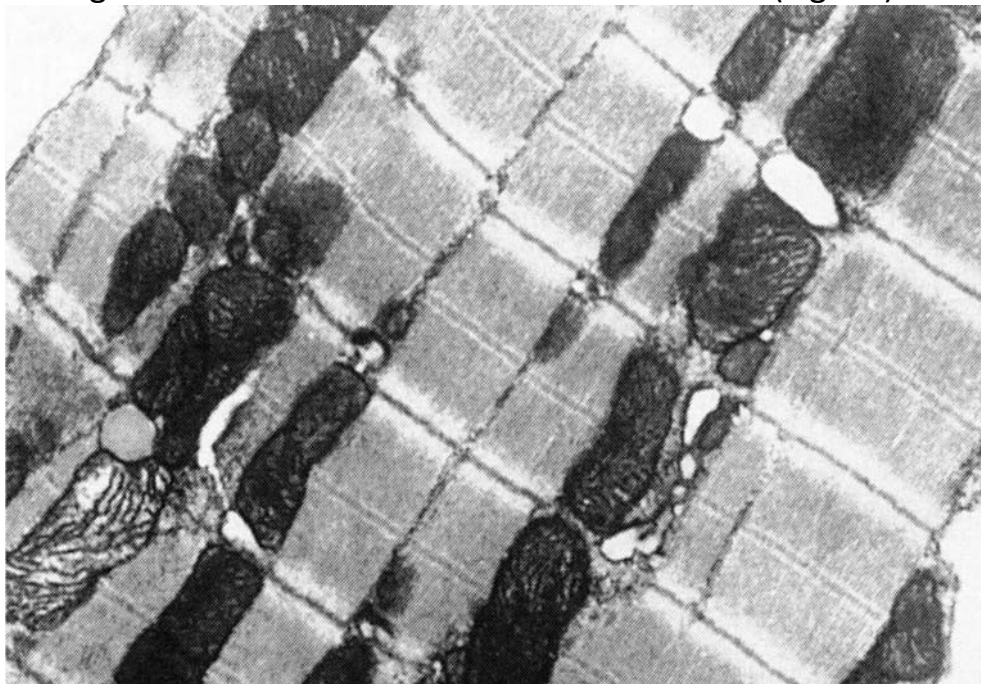


Fig. 28 - Imagine electrono-microscopica a unui cardiomiocit cultivat in prezenta a 125 pg/ml estradiol. X15000.

Spre deosebire de culturile de cardiomiocitele tratate cu 10 μ M H₂O₂, in care s-a identificat o proportie mica de celule cu morfologie alterata, cele pretratate cu estradiol nu prezinta celule cu morfologie alterata (Fig.29).

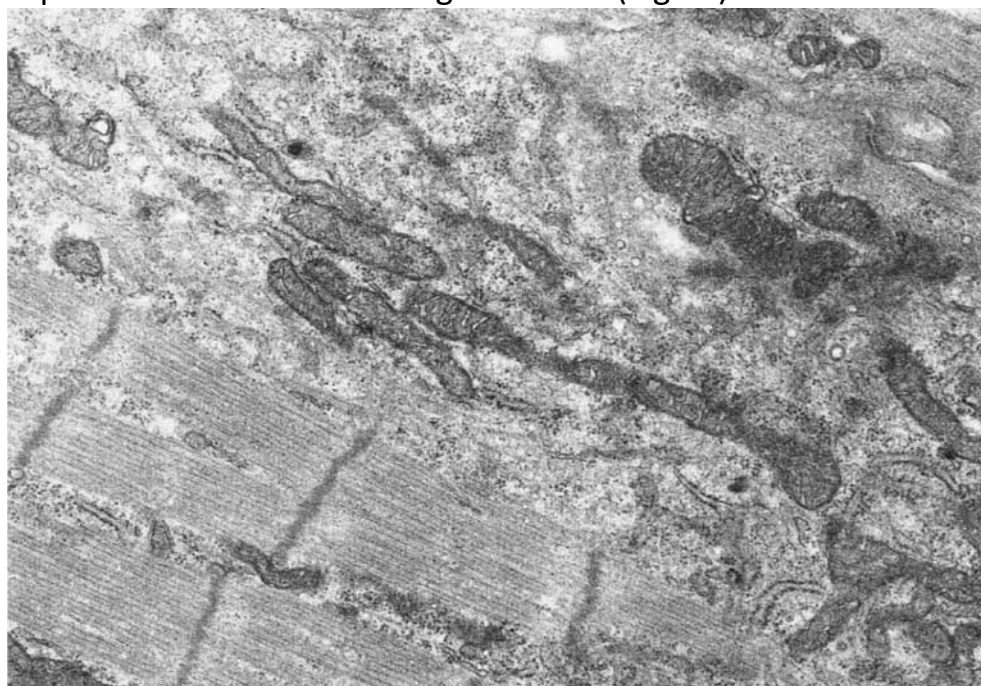


Fig. 29 - Aspect ultrastructural al unui cardiomiocit cultivat in prezenta a 10 μ M H₂O₂ si estradiol. Se remarca distributia normala a miofibrilelor si mitocondriilor. X14000.

Observatiile ultrastructurale ale culturilor de cardiomiocite incubate cu **25 μM H_2O_2 si estradiol** au indicat o morfologie normala a acestora (Fig.30). Un numar relativ scazut de cardiomiocite a prezentat un fenotip rotunjit (Fig.31). In unele cardiomiocite s-au identificat lizozomi si corpi reziduali (Fig.32).

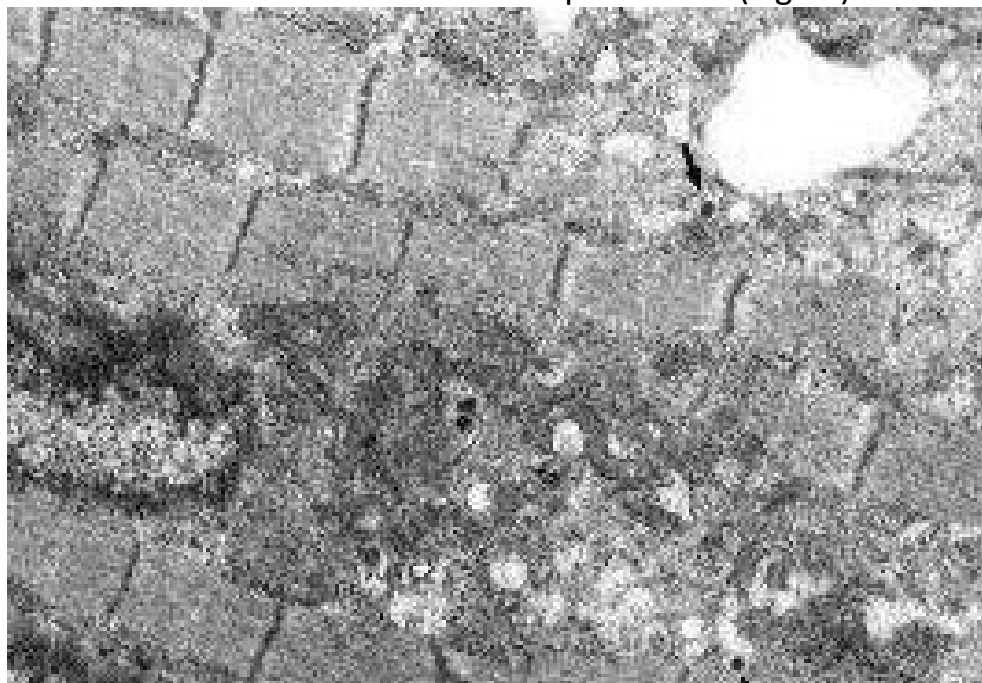


Fig. 30 - Aspect ultrastructural al unui cardiomiocit cultivat in prezenta a 25 μM H_2O_2 si estradiol. X7000.



Fig. 31 - Imagine electrono-microscopica a cardiomiocitelor rotunjite cultivate in prezenta a 25 μM H_2O_2 si estradiol. X4200.

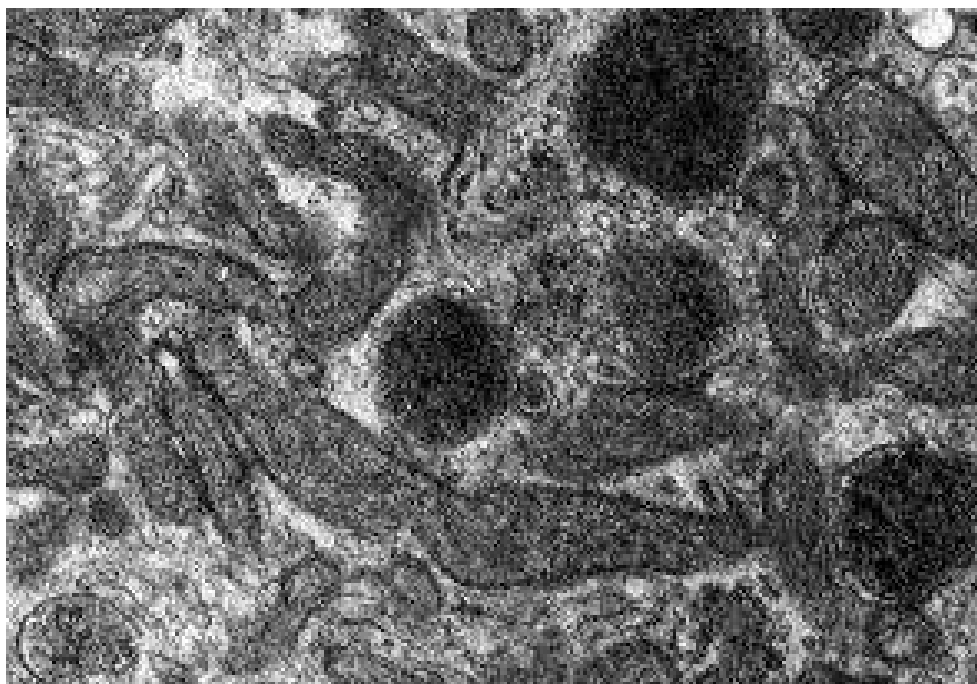


Fig. 32 - Corpi multiveziculari prezenti in sarcoplasma cardiomiocitelor cultivate in prezenta a 25 μM H_2O_2 si estrogen. X21000.

Spre deosebire de culturile de cardiomiocite incubate in prezenta a 50 μM H_2O_2 , care prezentau un mare numar de cardiomiocite degenerate, cele pretratate cu 125 pg/ml estradiol au fost rezistente la stressul oxidativ. Cardiomiocitele din aceasta varianta experimentală prezintă nucleul cu aspect normal, in citoplasma fiind prezente miofibrile si mitocondrii (Fig.33). In aceasta varianta experimentală exista si cardiomiocite degenerate (Fig.34) inșă proporția lor este semnificativ mai redusă comparativ cu cele cultivate numai in rezenta de H_2O_2 . Alterările ultrastructurale observate in aceste cardiomiocite includ, vacuolizări citoplasmatică (Fig.35) si mitocondriale (Fig.36). Fuziunea mitocondriilor deși a fost detectată in unele cardiomiocite (Fig.37) ea implica un număr mai mic de mitocondrii, comparativ cu celulele supuse stressului oxidativ in prezenta a 50 μM H_2O_2 .

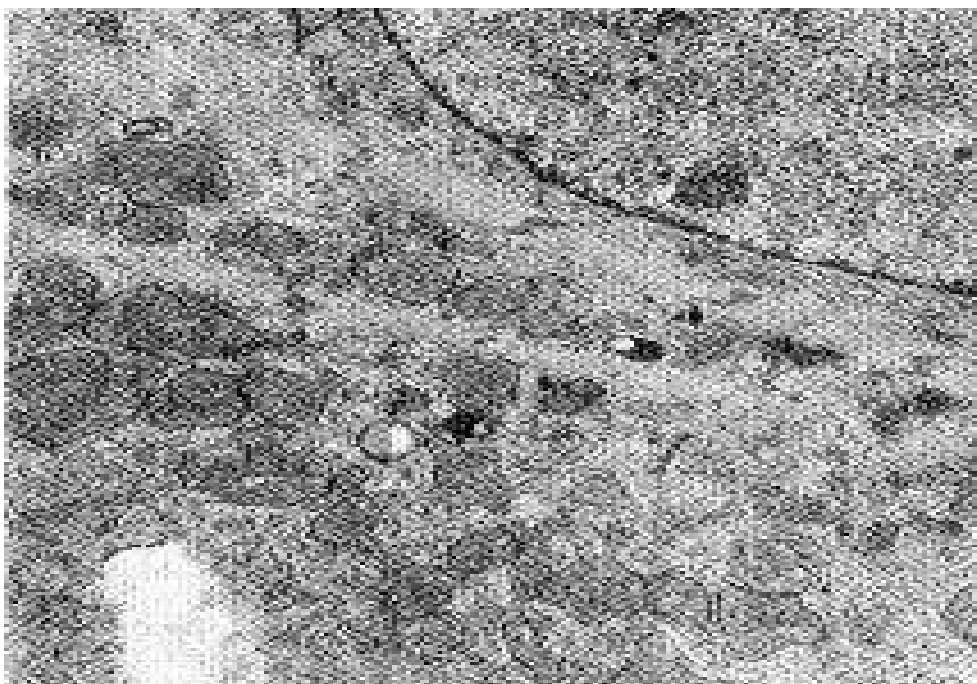


Fig. 33 - Imagine electrono-microscopica a unui cardiomiocit cultivat in prezenta a 50 μM H_2O_2 si estradiol. Se remarca o distributie normala a miofibrilelor si mitocondriilor. X12000.

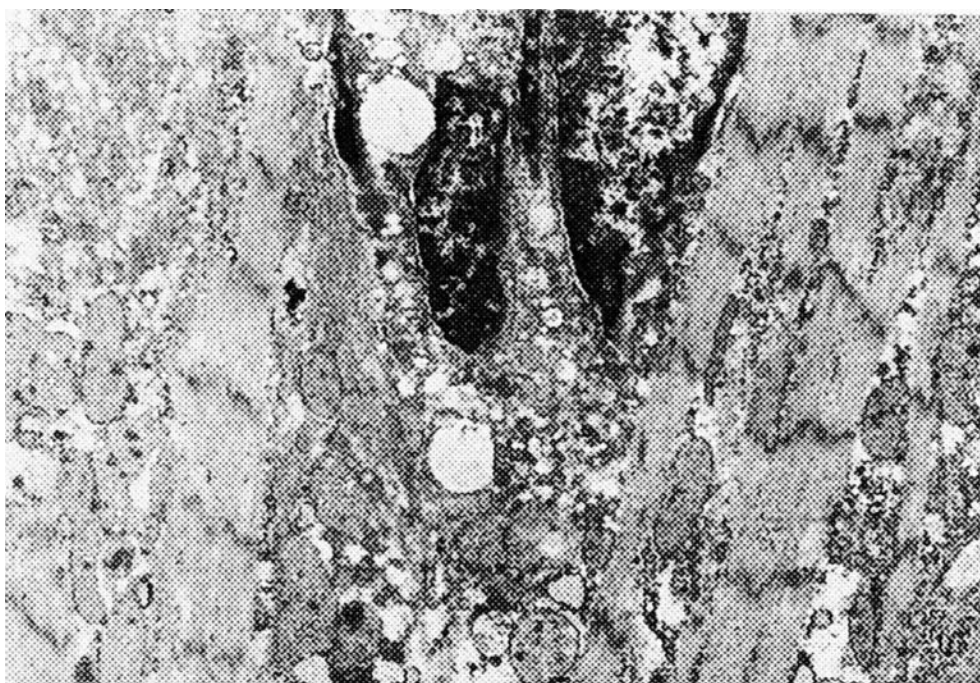


Fig. 34 - Cardiomiocit cu ultrastructura alterata tratat cu 50 μM H_2O_2 si estradiol. X5000.

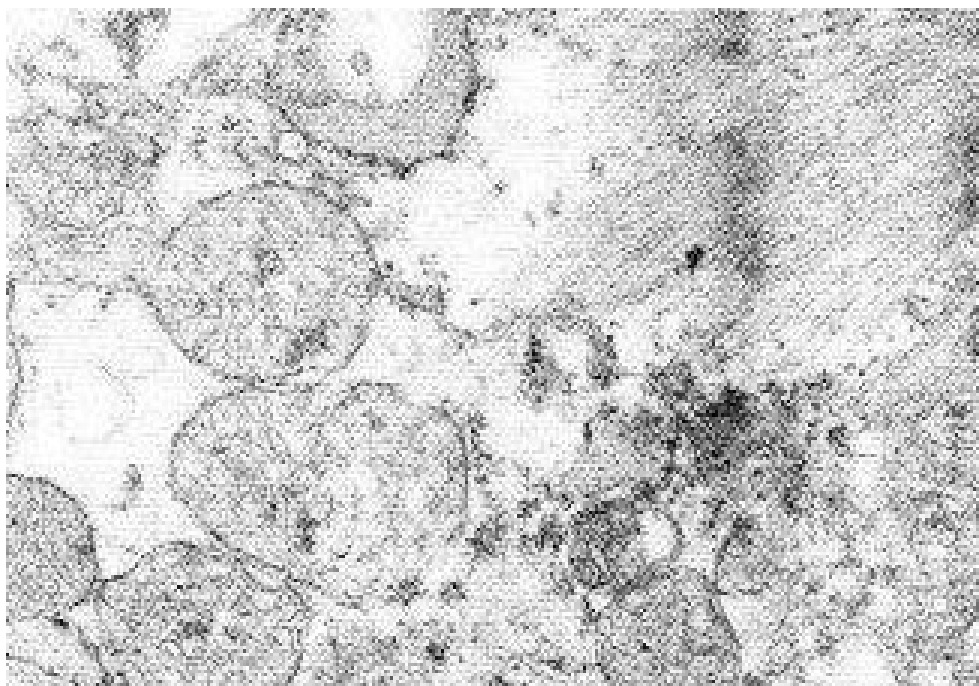


Fig. 35 - Aspect ultrastructural al sarcoplasmei cardiomiocitelor tratate cu 50 μM H_2O_2 si estradiol. Se remarca vacuolizarea sarcoplasmei. X14000.

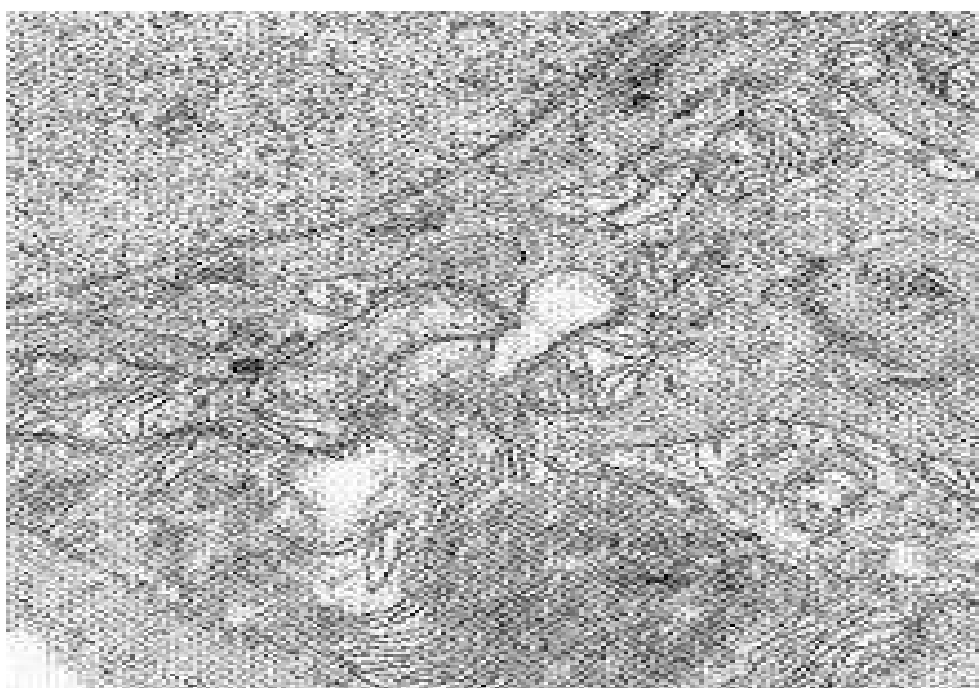


Fig. 36 - Mitocondrii cu o morfologie alterata in cardiomiocitele incubate cu 50 μM H_2O_2 si estradiol. X11800.

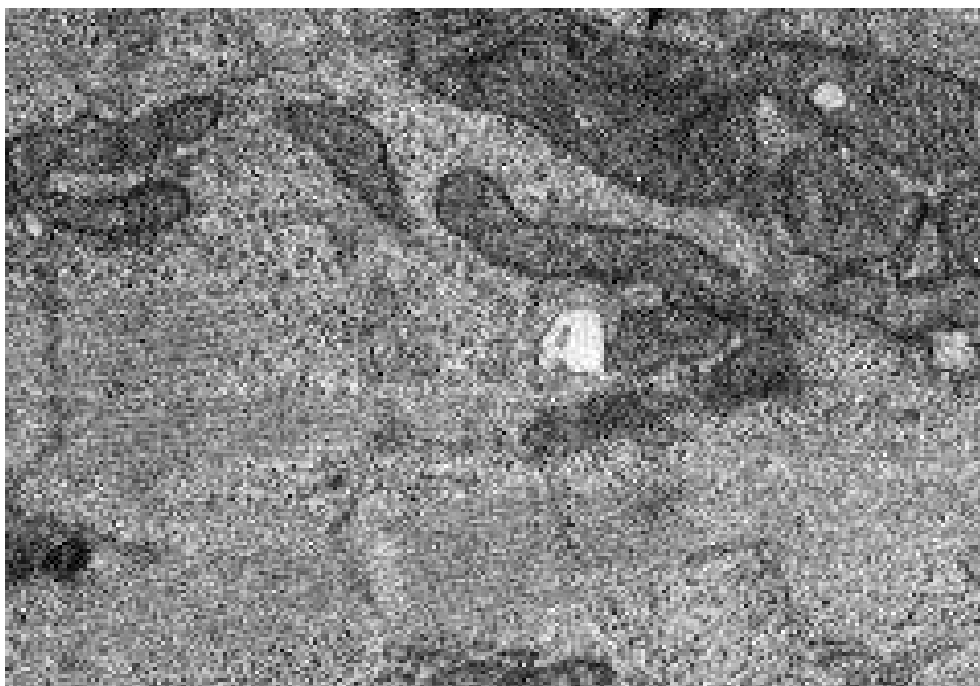


Fig. 37 – Alterarea morfologiei mitocondriilor in urma tratamentului cu 50 μM H₂O₂ si estradiol. X5000.

4. Discutii

Ischemia miocardului apare in momentul in care fluxul de sange coronarian spre miocard este insuficient pentru metabolismul oxidativ al cardiomiocitelor (9). In aceasta situatie strategia clinica pentru limitarea necrozei cardiomiocitelor este reperfuzia, pentru a creste aportul de sange coronarian. Aceasta strategie terapeutica desi esentiala pentru supravietuirea muschiului cardiac poate altera cardiomiocitele prin asa numitul proces de "lezare prin reperfuzie". Studiile realizate pe inima post-ischemica dupa reperfuzie au indicat ca speciile reactive de oxigen (ROS) de tipul superoxid ($O_2^- \bullet$), hidroxil ($\bullet OH$) si peroxidul de hidrogen (H_2O_2) se formeaza in cursul reoxigenarii miocardului ischemic (2, 20). Studiile recente au aratat ca H_2O_2 poate fi folosit ca agent inductor al disfunctiilor cardiace asemanatoare celor induse de ischemie/reperfuzie (16).

Cardiomiocitele ventriculare izolate de la animale nou-nascute au fost utilizate pentru studierea aspectelor celulare si moleculare ale disfunctiilor cardiace induse de stressul oxidativ de tipul ischemiei si reperfuziei (6, 21, 30). Cardiomiocitele de la animale nou-nascute sunt usor de cultivat comparativ cu cardiomiocitele adulte si fenotipul cardiomiocitelor cultivate este foarte stabil. In plus, contractilitatea lor in cursul hipoxiei-reoxigenarii este comparabila cu cea a inimii *in situ* in cursul ischemiei-reperfuziei, in timp ce modificarile fenotipice ale cardiomiocitelor adulte in cultura sunt diferite de inima *in vivo*.

Studiile realizate pana in prezent asupra cardiomiocitelor ischemice in cultura au evaluat efectele cantitative ale H_2O_2 , prin detectarea unor parametrii biochimici sau prin analiza morfologiei celulare la nivelul microscopiei optice (9, 17). In literatura studiata nu am gasit indicatii ultrastructurale despre culturi de cardiomiocite supuse stressului oxidativ cu H_2O_2 .

Observatiile noastre au indicat ca H_2O_2 induce citotoxicitate intr-o maniera dependenta de concentratie. Efectele stressului oxidativ indus asupra cardiomiocitelor de sobolan nou-nascut sunt in concordanta cu studiile altor autori. Janero si colab.(9) au raportat ca H_2O_2 in concentratie de 50-1000 μM determina pierderea semnificativa a LDH, reducerea ATP si moartea cardiomiocitelor. Acesti autori au stabilit concentratia de 50 μM ca o concentratie prag.

Functionarea inimii depinde de contractilitatea muschiului cardiac care este realizata de aparatul contractil reprezentat de miofibrile. In plus, mitocondriile asigura supravietuirea cardiomiocitelor. ROS generate de mitocondrii sau din alte surse din afara sau interiorul celulelor pot determina alterarea componentelor mitocondriale initiind procesele degenerative (3).

In studiul nostru, α -actina sarcomerica a fost mult mai sensibila la H_2O_2 decat tropomiozina. Efectul distructiv al H_2O_2 asupra proteinelor contractile este similar cu cel observat anterior in cardiomiocitele adulte si de nou-nascut (17, 15). Miocardul ischemic uman prezinta dezorganizarea miozinei, actinei, tropomiozinei si

troponinei T la 10 minute de la debutul ischemiei, aceasta alterare fiind completa la 20 de minute (7). In plus, ischemia indusa la sobolani prin ligaturarea arterelor coronare drepte determina pierderea actinei in zonele corespunzatoare situsurilor ischemice (18). Efectul H_2O_2 asupra altor proteine musculare de tipul miozinei, α -actininei, desminei sau tubulinei nu a fost pronuntat. Pe de alta parte unii autori au aratat ca si alte proteine citoscheletice sunt alterate ca raspuns la ischemia cordului. Pierderea vinculinei, α -actininei, desminei, distrofinei, spectrinei si a retelei de microtubuli a fost raportata in diferite modele animale ischemice (23, 29). Studiile anterioare asupra sintezei si degradarii actinei au demonstrat ca degradarea actinei este crescuta ca raspuns la blocarea contractilitatii. In plus, degradarea a fost mai intensa cand blocarea contractilitatii a fost indusa de blocanti ai canalelor de calciu tip L (27).

Mitocondriile joaca un rol foarte important in viabilitatea celulara si in homeostazia Ca^{2+} dupa ischemie. Studiile anterioare au aratat ca miocitele cardiace raspund la stressul oxidativ indus de H_2O_2 printr-o serie de modificari celulare care implica mitocondriile (1). In prima faza, mitocondriile sufera modificari morfologice dependente de calciu, de tipul umflarii si pierderii cristelor, in timp ce potentialul membranal ramane neschimbat. In a doua faza, "de depolarizare", are loc disiparea potentialului mitochondrial de membrana si deschiderea porilor mitocondriali. Aceasta faza este urmata in câteva minute de eliberarea citocromului c din mitocondrii. In faza finala, de fragmentare, cardiomiocitele sufera alterari ale sarcolemei si se dezorganizeaza.

Literatura de specialitate nu prezinta date cu privire la efectele estradiolului asupra proteinelor contractile desi Node si colab. [38] au aratat ca 17β -estradiolul reduce marimea infarctului miocardic si incidenta aritmiilor ventriculare la inimi de caine prin mecanisme care implica NO si canalele de K Ca-dependente.

De asemenea, 17β -estradiolul administrat in doze de 10 μM previne hipercontractura indusa de incarcarea cu calciu din timpul expunerii la solutii cardioplegice, avand astfel efect cardioprotector (11).

Ranki și colab. au aratat ca exprimarea si functionalitatea canalelor de K ATP-dependente sunt influentate de estradiol. Aceiasi autori au aratat ca, varsta determina reducerea semnificativa a numarului acestor canale la animalele femele, dar nu si la cobai masculi (22).

CAPITOLUL IX

Determinarea viabilitatii celulare

Pentru determinarea viabilitatii celulare s-a indepartat mediul de cultura de pe placi si s-a spalat cultura cu tampon fosfat salin. S-a adaugat 1ml tripsina 0,125% incalzita la 37°C si s-a mentinut pe placa de cultura pana la desprinderea celulelor. S-au recoltat celulele in mediu DMEM-F12 cu 10% ser fetal, pe gheata. Suspensia celulara este centrifugata 10 min., la 1.000g. Celulele sunt resuspendate in tampon fosfat salin. Pentru studiul viabilitatii celulare se amestecă 0,5 ml Trypan 0,4% cu 0,3 ml tampon fosfat salin si 0,2ml suspensie celulara bine omogenizata. Celulele viabile si non-viabile sunt numarate dupa 5-15 min. utilizand o camera de numarat Burkner – Turk.

Viabilitatea celulara (%) = $100 \times \text{total celule viabile (necolorate)} / \text{total celule (colorate si necolorate)}$.

In urma studiilor efectuate s-a constatat ca atat culturile martor cat si cele tratate cu estradiol au avut o viabilitate de cca. 98% (Fig. 38).



Fig. 38 – Cardiomiocite viabile ; coloratie cu Trypan-blue ; x20.
(celule rotunde necolorate, contur regulat).

Tratamentul cu H_2O_2 determina o scadere a viabilitatii celulare proportionala cu concentratia. Astfel, la concentratia de $10\ \mu M\ H_2O_2$ viabilitatea celulara este de cca. 95%, la $25\ \mu M\ H_2O_2$ de 87% si la $50\ \mu M\ H_2O_2$ de cca. 70% (Fig. 39).

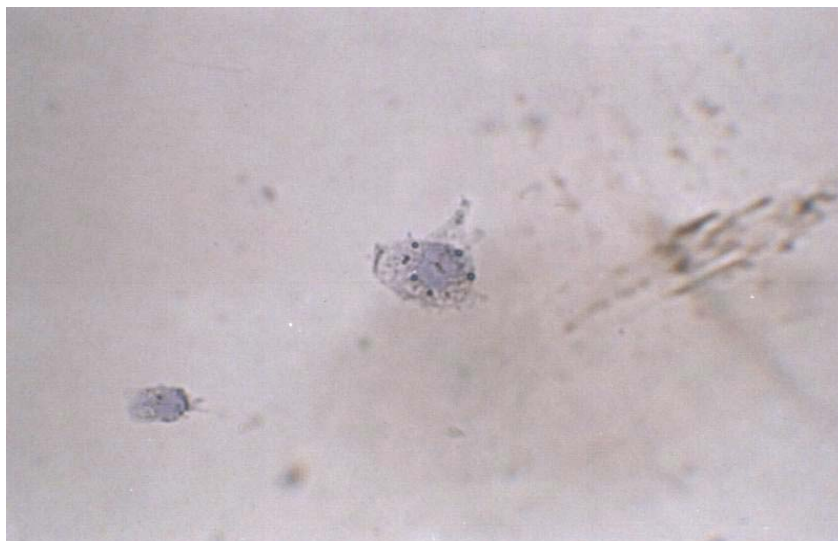


Fig.39 – Cardiomiocite neviabile ; coloratie cu Trypan-blue ; x40.
(celule colorate, citoplasma vacuolizata cu incluziuni, contur neregulat).

Tratamentul cu estradiol asigura protectia cardiomiocitelor impotriva stressului oxidativ asigurand o mai buna viabilitate celulara. Astfel, valorile obtinute sunt de cca. 97% pentru estradiol + $10\ \mu M\ H_2O_2$, 93% pentru $25\ \mu M\ H_2O_2$ si 80% pentru $50\ \mu M\ H_2O_2$ (Fig. 40).

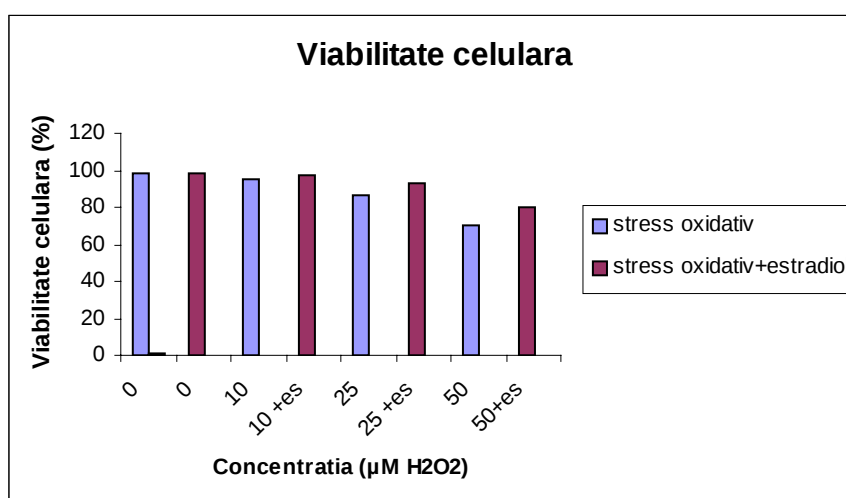


Fig. 40 – Viabilitatea celulara dupa stress oxidativ si estradiol

Discutii

Este cunoscut faptul ca ischemia miocardului este insotita de moarte celulara.

Mecanismele prin care peroxidul de hidrogen contribuie la distrugerea celulelor sunt numeroase. In functie de doza si de timpul de expunere, H_2O_2 induce disfunctie contractila, tulburari in metabolismul calciului, depletie de ATP, vasodilatatie ori disfunctie vasculara, necroza sau apoptoza (28).

Una din cauzele mortii celulare poate fi peroxidarea lipidelor din membrana plasmatica (4, 31). Aceasta peroxidare produce modificarea arhitecturii membranare si reducerea fluiditatii. In plus, sunt introduse grupari peroxi, cu caracter polar, care dezorganizeaza pompa de calciu (12), rezultand cresterea calciului citosolic si implicit o serie de procese de proteoliza in cascada (26) cu deteriorarea citoscheletului si a matricei celulare.

Studiile efectuate de Kaminischi si colab. (12) au aratat ca peroxidul de hidrogen mareste concentratia calciului citosolic, dar nu modifica concentratia de calciu din reticulul sarcoplasmatic.

Kourie și colab. (13) arata ca H_2O_2 inhiba canalele de Ca tip L sensibile la voltaj.

Se pare ca ROS contribuie la disfunctia contractila si prin modificarile in fosforilarea schimbatorului Na^+/H^+ (13, 32).

Alte tinte posibile ale radicalilor liberi ai oxigenului sunt acizii nucleici (induc mutageneza), proteinele (provoaca deteriorare enzimatica), citoscheletul si matricea extracelulara (26).

Rudiger von Harsdorf si colab. (25) au arătat ca celulele cardiace supuse stressului oxidativ cu H_2O_2 au prezentat apoptoza prin cresterea eliberarii de citocrom c si prin modificarea raportului dintre proteinele Bad si Bax – proapoptotice – si cele din familia Bcl-2 – antiapoptotice.

De asemenea, stressul oxidativ si, mai ales, H_2O_2 eliberat in acest proces in mitocondrie sunt implicati in aparitia unor zone de permeabilitate specifica a membranei mitocondriale, foarte importante in initierea apoptozei mitocondriale, unul din mijloacele organismului de a reduce productia interna de ROS (14).

CAPITOLUL X

Determinarea diviziunii celulare

Determinarea diviziunii celulare s-a realizat prin numararea celulelor pe o camera Burkert-Turk la sfarsitul experimentului. In acest sens s-au efectuat urmatoarele activitati: s-a indepartat mediul de cultura de pe placi si s-a spalat cultura cu tampon fosfat salin. S-a adaugat 1ml tripsina 0,125% incalzita la 37°C si s-a mentinut pe placa de cultura pana la desprinderea celulelor. S-au recoltat celulele in mediu DMEM-F12 cu 10% ser fetal, pe gheata. Suspensia celulara este centrifugata 10 min., la 1.000g. Celulele sunt resuspendate in mediu cu ser.

Rezultatele obtinute in urma acestui studiu sunt redade in Tabelul nr. 1.

Table nr. 1

Numarul de celule/ml obtinut in urma stressului oxidativ cu/fara pretratament cu estradiol

	Concentratia ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$)			
	0	10	25	50
Stress oxidativ	220 $\pm$ $16,32 \times 10^3$	180 $\pm$ $8,16 \times 10^3$	150 $\pm$ $12,24 \times 10^3$	100 $\pm$ 0 $\times 10^3$
Estradiol (125 pg/ml)	230 $\pm$ 0 $\times$ 10^3	210 $\pm$ $4,08 \times 10^3$	190 $\pm$ $2,35 \times 10^3$	150 $\pm$ $8,16 \times 10^3$

Pe baza acestor date se poate observa ca estradiolul are un efect usor mitogen asupra cardiomiocitelor nu numai de protectie. Reprezentarea grafica a valorilor este redada in Fig. 41.

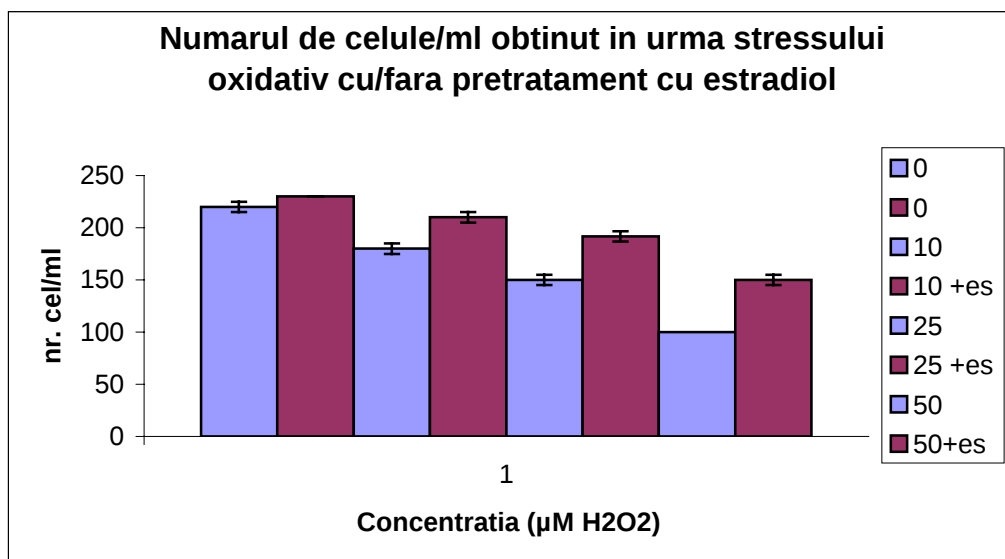


Fig. 41 - Numarul de celule/ml obtinut in urma stressului oxidativ cu/fara pretratament cu estradiol

Discutii

Acest aspect, constant intalnit in toate experimentele noastre, nu este mentionat in literatura de specialitate. Efectul mitogen al estradiolului s-ar putea datora actiunii hormonilor asupra unor factori de crestere.

CAPITOLUL XI

Determinarea cantitatii de proteina celulara

1. Solutii si reactivi

Reactivul Bradford (Sigma), albumina serica bovina (Sigma)

2. Mod de lucru (Bradford, 1976)

Metoda se bazeaza pe interactia proteinei cu un colorant specific, Coomassie Brilliant Blue. Ca standard se foloseste albumina serica bovina. Volume egale de concentratii diferite sunt incubate cu un volum de 1 ml reactiv Bradford (Sigma), timp de 5 minute. Complexul colorat format se colorimetreaza la 595 nm.

3. Rezultate

Determinarea cantitatii de proteina in omogenatul obtinut prin prelucrarea celulelor in cultura a fost folosita ca o metoda de cuantificare a capacitatii de supravietuire a celulelor in conditiile de stress oxidativ.

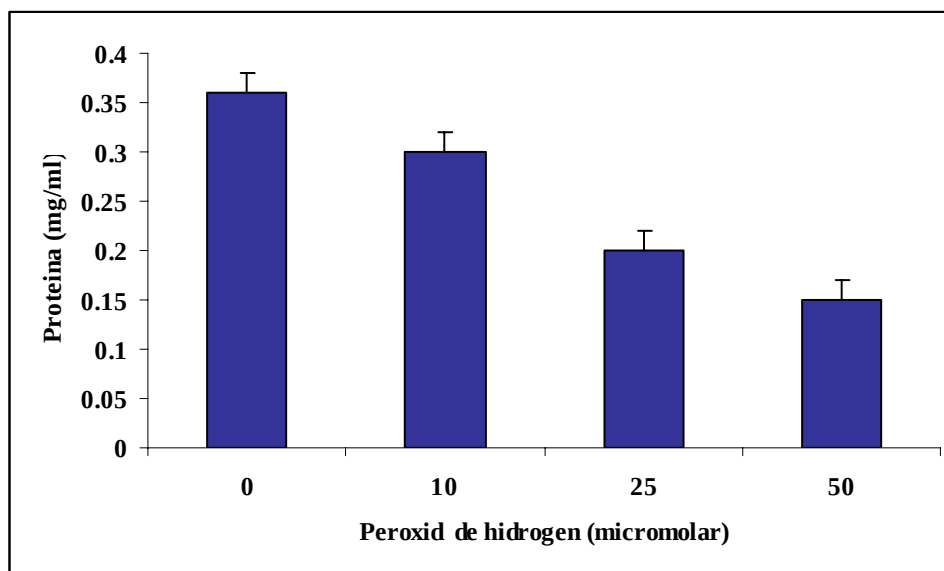


Fig. 1. Efectul stresului oxidativ asupra cantitatii de proteina, in absenta estrogenului

Incubarea cardiomiocitelor cu peroxid de hidrogen 10 μ M a determinat o scadere a cantitatii de proteina cu 17% fata de proba martor. Cresterea concentratiei de peroxid de hidrogen in mediul de incubare la 25 μ M si 50 μ M a

condus la scaderea cantitatii de proteina cu 45% si, respectiv, 58% fata de martor (Figura 1).

In urma tratarii celulelor cu estrogen s-a inregistrat o crestere cu 17% a cantitatii de proteina comparativ cu proba martor, in absenta stresului oxidativ.

In cazul celulelor care au fost incubate in prealabil cu estrogen, incubarea cu peroxid de hidrogen 10 μM a condus la o scadere cu 12% a cantitatii de proteina fata de proba martor. Cresterea concentratiei de peroxid de hidrogen in mediul de incubare la 25 μM si 50 μM a condus la scaderea cantitatii de proteina cu 47% si, respectiv, 59% fata de martor (Figura 2).

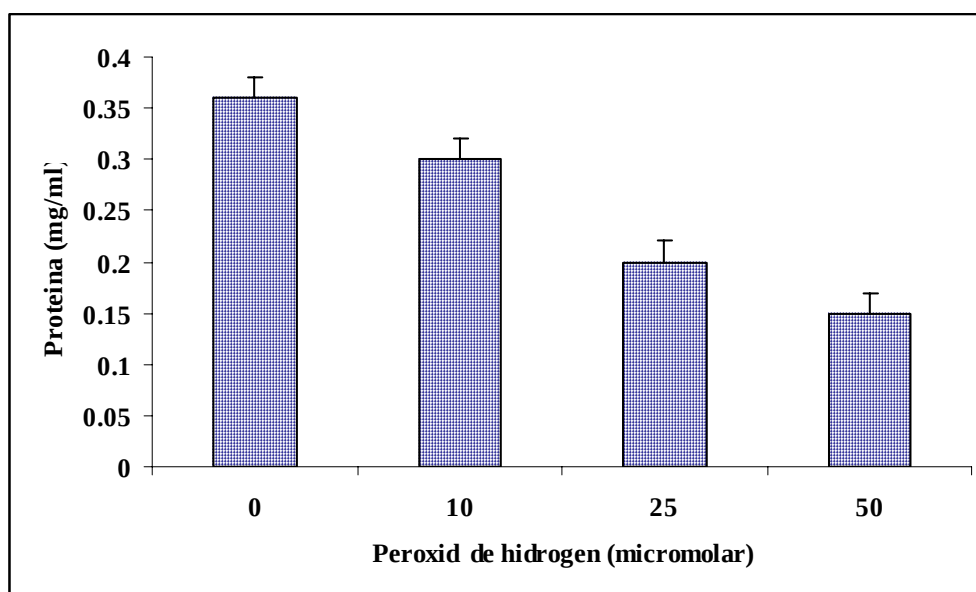


Fig. 2. Efectul stresului oxidativ asupra cantitatii de proteina, dupa incubarea cu estrogen

Aceste rezultate sunt in concordanta cu rezultatele obtinute in urma numararii celulelor efectuata in faza III. In literature de specialitate nu am intalnit studii asemanatoare.

CAPITOLUL XII

Determinarea apoptozei celulare

a. Determinarea proteinei p53

1. Solutii si reactivi

Acrilamida-Bis, dodecilsulfatul de sodiu, persulfatul de amoniu, tetraetilmetilendiamina au fost procurate de la Sigma.

2. Mod de lucru

Electroforeza proteinelor din omogenatul total al cardiomiocitelor incubate in diferite conditii a fost realizata conform metodei descrisa de Laemmli (5). Electroforeza a fost realizata in conditii denaturante, in gel de poliacrilamida 10%. Proteinele separate au fost transferate pe membrana de nitroceluloza, folosind metoda Western. Transferul realizat a fost utilizat in continuare pentru evidentierea prezentei proteinei p53 la nivel celular.

3. Obținerea omogenatului celular (Galvez si colab. (4) a fost efectuata prin suspendarea cardiomiocitelor, incubate in diferite conditii, in tampon Tris-HCl 10 mM, pH=7,3, la temperatura camerei, cu ajutorul unui ac hipodermic, pana in momentul in care toate celulele au fost sparte. Omogenatul total a fost ulterior utilizat pentru electroforeza si transfer, in vederea detectarii prezentei proteinei p53.

3. Rezultate

Determinarea prezentei proteinei p53 in omogenatele celulare a fost realizata prin imunotransfer, pentru fiecare varianta experimentală.

Studii anterioare realizate pe cardiomiocite de sobolan nou-nascut au aratat faptul ca expunerea acestor celule la conditii de hipoxie induce apoptoza (7).

Rezultatele obtinute de noi arata faptul ca in conditii de hipoxie are loc o crestere a expresiei proteinei p53 in cardiomiocitele de sobolan nou-nascut (Fig. 3 c,d,e,g,h,i). Tratatamentul cu estrogen, realizat anterior conditiilor hipoxice, a avut un efect protector numai in cazul concentratiei de 10 μM H_2O_2 (Fig. 3 c versus g). In cazul celulelor incubate cu 25 si 50 μM H_2O_2 se observa prezenta proteinei p53, desi intr-o concentratie mai mica comparative cu celulele netratate cu estrogen (Fig. 3 d,e versus h,i).

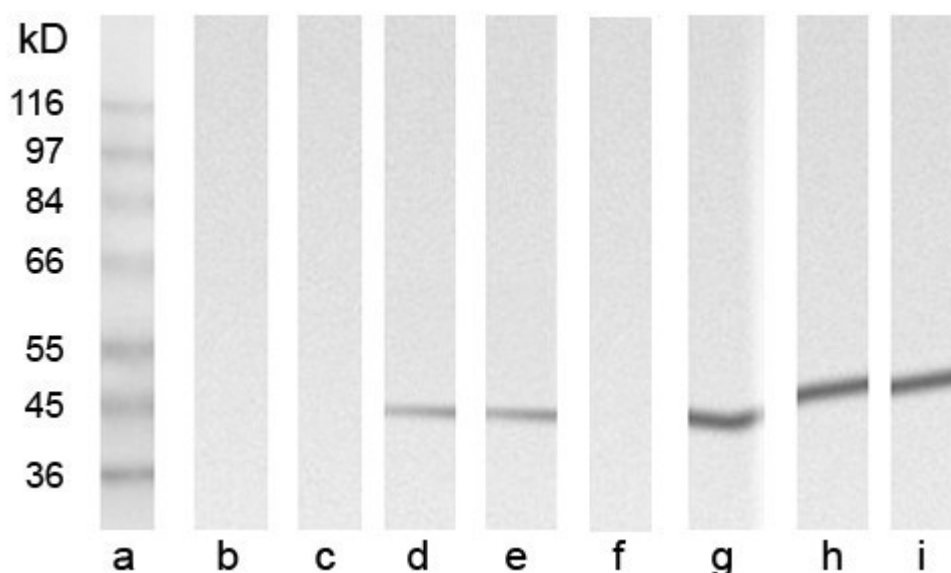


Fig. 3. Imunodetectia proteinei p53 in omogenatul obtinut de la cardiomiocite tratate (b-e) sau nu (f-i) cu estrogen si apoi supuse stresului oxidativ prin incubare in mediu cu diferite concentratii de H_2O_2 ; a - markeri de greutate moleculara, b - cardiomiocite tratate cu estrogen, c - cardiomiocite tratate cu estrogen si incubate cu H_2O_2 10 μM , d - cardiomiocite tratate cu estrogen si incubate cu H_2O_2 25 μM , e - cardiomiocite tratate cu estrogen si incubate cu H_2O_2 50 μM , f - cardiomiocite mentinute in conditii normale de cultura, g - cardiomiocite incubate cu H_2O_2 10 μM , h - cardiomiocite incubate cu H_2O_2 25 μM , i - cardiomiocite incubate cu H_2O_2 50 μM .

Studiile privind rolul proteinei p53 in controlul mortii celulare programate au aratat faptul ca, in functie de tipul de celula, cresterea concentratiei acestei proteine sau activarea ei determina stoparea cresterii celulelor sau apoptoza, aceasta proteina functionand ca un factor de protectie al genomului (8).

b. Activitatea pompei de sodiu si potasiu

1. Solutii si reactivi

NaCl, KCl, $MgCl_2$, Tris, acid ascorbic, molibdatul de amoniu, ATP au fost procurate de la Sigma.

2. Mod de lucru (Garner, 1996)

Probele de analizat au fost incubate la 37°C intr-un mediu Tris HCl 50 mmol/l, pH=7,4, continand NaCl 130 mmol/l, KCl 20 mmol/l, $MgCl_2$ 7 mmol/l si ATP 4 mmol/l. Ortofosfatul eliberat este dozat colorimetric in urma reactiei cu molibdatul de amoniu in mediu acid. Fosfomolibdatul format este redus, in mediu slab acid, la albastru de molibden, care este dozat colorimetric la 660 nm. Rezultatele au fost exprimate in nmoliPi/h/mg proteina.

3. Fractionarea omogenatului a fost facuta prin centrifugari succesive la $800 \times g$, $20.000 \times g$ si $100.000 \times g$, in vederea separarii fractiei microzomale. Aceasta a fost folosita pentru determinarea activitatii Na,K-ATPazei.

4.Rezultate

Activitatea pompei de sodiu si potasiu este extrem de importanta la nivel celular, deoarece mentine potentialul electric la nivelul membranei plasmatic, mentine echilibrul osmotic al celulei si, prin activitatea ei de indepartare a ionilor de sodiu din celula, da nastere unei forte de transport folosita pentru importul glucozei, al aminoacizilor si a altor nutrienti in celula.

In experimentele noastre am analizat efectul hipoxiei si al tratamentului cu estrogen asupra functiei Na,K-ATPazei din membrana plasmatica a cardiomiocitelor.

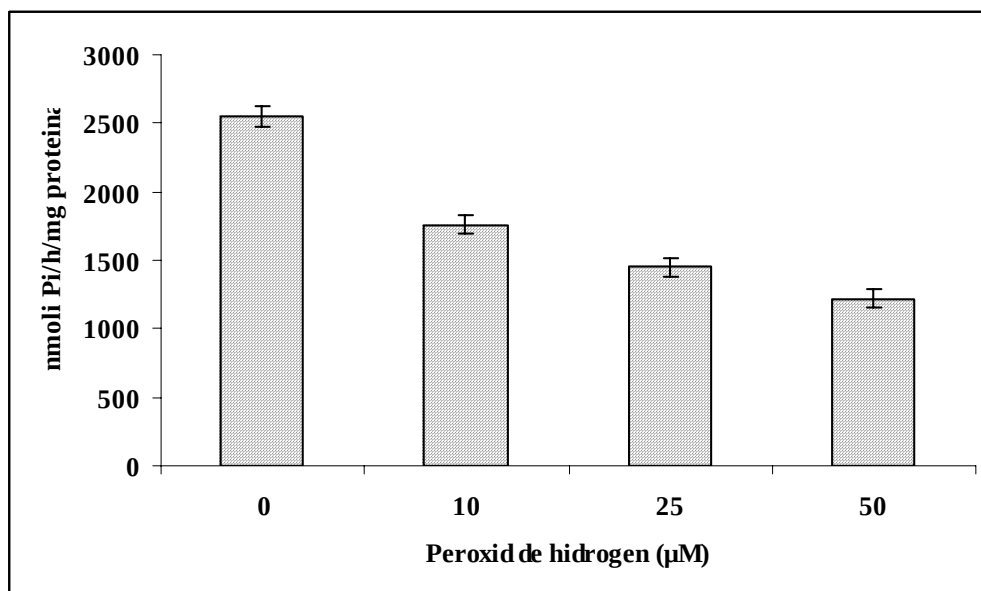


Fig.4. Efectul stresului oxidativ asupra activitatii pompei de sodiu, in cazul cardiomiocitelor netratate cu estrogen

Tratarea cardiomiocitelor cu estrogen nu determina o crestere semnificativa a activitatii pompei de sodiu si potasiu fata de martor. In cazul incubarii celulelor in conditii capabile sa induca stressul oxidativ (10, 25 si 50 μM H_2O_2), activitatea Na,K-ATPazei scade cu 30%, atunci cand incubarea se face cu 10 μM H_2O_2 , 43% in cazul incubarii cu 25 μM H_2O_2 si cu 50% in cazul celulelor incubate cu 50 μM H_2O_2 , fata de proba martor (Fig. 4).

In conditiile in care celulele sunt tratate cu estrogen anterior incubarii cu H_2O_2 , efectul stresului oxidativ este atenuat comparativ cu celulele netratate cu estrogen. Activitatea pompei de sodiu in cazul cardiomiocitelor tratate cu estrogen si incubate cu 10 μM H_2O_2 este practic neschimbata fata de valoarea martorului

corespunzator. Cresterea concentratiei de H_2O_2 din mediul de incubare induce o scadere a activitatii Na,K-ATPazei cu 14%, pentru concentratia de $25\ \mu\text{M}$ H_2O_2 si cu 34% pentru concentratia de $50\ \mu\text{M}$ H_2O_2 , comparativ cu martorul corespunzator (Fig. 5).

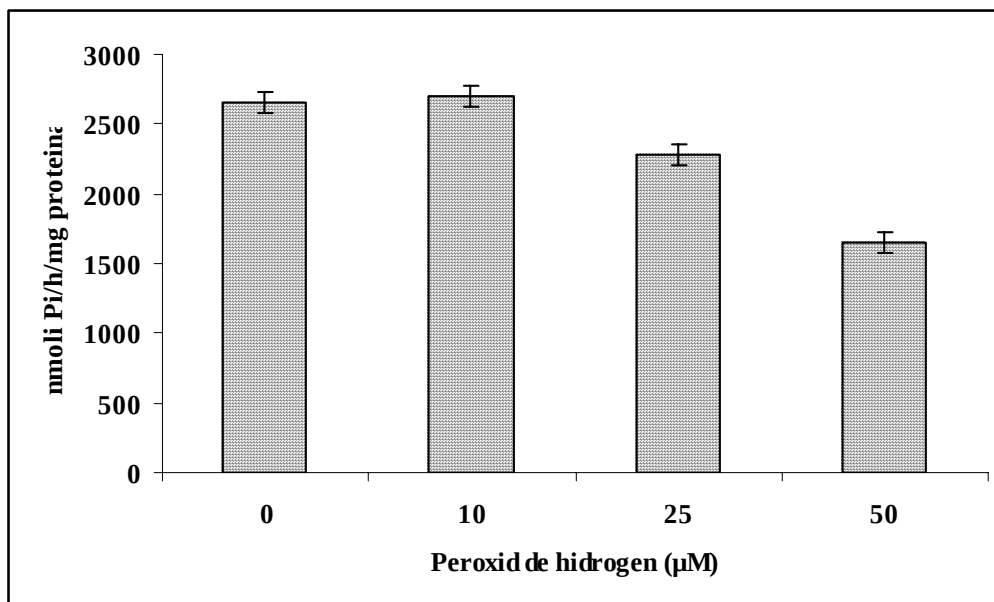


Fig.5. Efectul stresului oxidativ asupra activitatii pompei de sodiu, in cazul cardiomiocitelor tratate cu estrogen

Rezultatele experimentale obtinute au aratat faptul ca, in conditii de stress oxidativ, tratamentul cu estrogen asigura o activitate mai buna a Na,K-ATPazei. In cazul cardiomiocitelor supuse tratamentului cu estrogen, incubarea in prezenta concentratiilor mari de peroxid de hidrogen (25 si $50\ \mu\text{M}$) determina scaderea activitatii pompei de sodiu, dar acest fenomen nu este la fel de drastic ca in cazul celulelor netratate (Fig. 6).

Ca urmare, se poate afirma faptul ca tratamentul cu estrogen protejeaza partial Na,K-ATPaza de efectele stresului oxidativ.

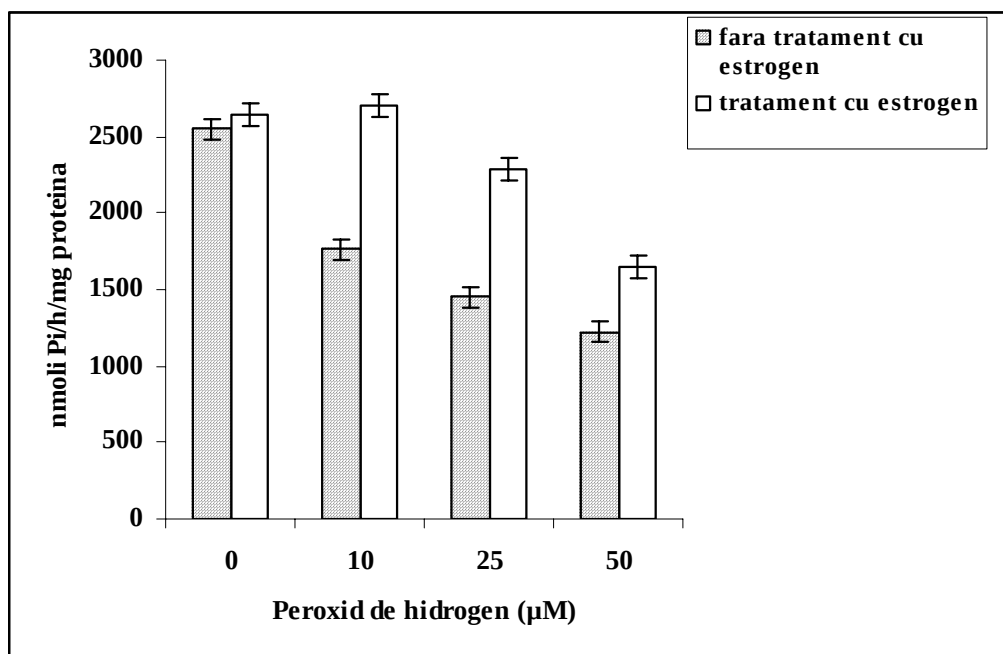


Fig. 6. Efectul protector al tratamentului cu estrogen asupra activitatii Na,K-ATPazei

Xie si colab.(1999) au aratat ca inhibarea partiala a Na^+/K^+ -ATPazei de catre ouabaina determina o usoara crestere a Na^+ intracelular, care conduce apoi la o crestere semnificativa a Ca^{2+} intracelular si la modificarea contractilitatii prin efectele Ca^{2+} asupra proteinelor contractile.

CONCLUZII

În concluzie, datele studiate demonstrează că celulele cardiace (cardiomiocitele) embrionare în cultura păstrează caracteristicile celulelor *in vivo*. În acest fel, cultura de cardiomiocite se dovedește un model experimental util pentru studiul influenței estrogenilor și a efectelor determinate de stresul oxidativ.

Cardiomiocitele patologice prezintă modificări structurale, ultrastructurale și funcționale ce pot fi studiate *in vitro* pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor de producere și prevenire.

Mecanismele care implică speciile reactive ale oxigenului sunt multiple, complexe și neelucidate pe deplin.

O posibilă modalitate de contracarare a efectelor stresului oxidativ este tratamentul hormonal deoarece datele din literatură sunt contradictorii și abordarea subiectului este limitată.

Astfel, este necesară continuarea studiilor în scopul elaborării și realizării unei metode terapeutice de tratare a cardiomiocitelor supuse stresului oxidativ, bine fundamentată științific, bazată pe utilizarea hormonilor estrogeni.

Metoda elaborată în cadrul proiectului reprezintă un instrument de lucru pentru tratarea cardiomiocitelor neonatale cu estrogen. Culturile de cardiomiocite neonatale au fost tratate cu estrogen și supuse stresului oxidativ conform schemei de lucru stabilite.

Incubarea cu concentrații crescătoare de peroxid de hidrogen a cardiomiocitelor de sobolan nou-născut determină apariția stresului oxidativ care are ca rezultat final instalarea apoptozei, demonstrată prin evidențierea prezentei proteinei p53 în omogenatele celulare. Acest proces este însoțit de o scădere a activității pompei de sodiu, cu toate consecințele derivate de aici.

Tratamentul cu estrogen al cardiomiocitelor are un efect protector în cazul în care celulele sunt supuse incubării cu peroxid de hidrogen 10 μM . Acest efect este demonstrat de lipsa expresiei proteinei p53 în omogenatul obținut din cardiomiocite tratate cu estrogen și incubate cu peroxid de hidrogen 10 μM , precum și de valoarea activității Na,K-ATPazei.

Continuarea studiilor va permite elaborarea, realizarea și experimentarea unei metode de tratare a cardiomiocitelor supuse stresului oxidativ bazată pe utilizarea hormonilor estrogeni.

BIBLIOGRAFIE

1. Adderley SR., Fitzgerald DJ., 1999, Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases1/2- mediated induction of cyclooxygenase-2. *J.Biol.Chem.*, **274(8)**, 5038-5046.
2. Aikawa R., Nawano M., Gu Y., Katagiri H., Asano T., Zhu W., 2000, Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* **102**, 2873-2879.
3. Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marban E. (2003) Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes, *Circ Res*; **92**:186-194.
4. Bell RM., Maddock HL., Yellou DM. (2003) The cardioprotective and mitochondrial depolarising properties of exogenous NO in mouse heart, *Cardiovascular Res.*, **57**: 404-415.
5. Benjamin IJ., McMillan DR. (1998) Stress (Heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.*, **83**: 117-132.
6. Bird SD., Doevendans PA., van Rooijen MA., Brutel de la Riviere A., Hassink RJ., Passier R., Mummery CL (2003) The human adult cardiomyocyte phenotype, *Cardiovascular Res.*, **58**: 423-434.
7. Blondel B., Roijem I., Cheneval JP., 1971, Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia*, **27**, 356-358.
8. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. (1988) Demonstration of free radical generation in 'stunned' myocardium of intact dogs with the use of the spin trap α -phenyl N-tert-butyl nitron, *J Clin Invest*; **82**: 476-485.
9. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**: 248-154;
10. Brette F., Orchard C.(2003) T-Tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ.Res.* **92**, 1182-1192.
11. Burton KP., Morris AC., Massey KD., Buja LM., Hagler HK., 1990, Free radicals alter ionic calcium levels and membrane phospholipids in cultured rat ventricular myocytes. *JMolCellCardiol*, **22**, 1035-1047.
12. Byrne JA., Grieve DJ., Cave AC., Shah AM. (2003) Oxidative stress and heart failure. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, **96(3)**: 214-221.
13. Cadenas E, Davies KJA. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic Biol Med*; **29**:222-230.
14. Cadre BM., Qi M., Eble DM., Shanon TR., Bers DM., Samarel AM., 1998, Cyclic stretch down-regulates calcium transporter gene expression in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Mol.CellCardiol.*, **30**, 2247-2259.
15. Cantor EJF., Mancini EV., Seth R., Xing-Hai Yao., Netticadan T. (2003) Oxidative stress and heart disease: Cardiac dysfunction, nutrition and gene therapy. *Current Hypertension Reports*, **5**: 215-220.

16. Chlopčiková S., Psotová J., Miketová P., 2001, Neonatal rat cardiomyocytes – A model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed. Papers*, **145(2)**, 49-55.
17. Chung TH., Wang SM., Wu JC.(2004) 17 β -estradiol reduces the effect of metabolic inhibition on gap junction intercellular communication in rat cardiomyocytes via the estrogen receptor. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**: 1013-1022.
18. Clark W.A., 1976, Selective control of fibroblast proliferation and its effect on cardiac muscle differentiation *in vitro*. *Dev. Biol.* **52**, 263-282.
19. Claycomb W.C., Palazzo M.C., 1980, Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell. A light and scanning electron microscope study. *Dev. Biol.* **80**, 466-482.
20. Cruce M., Stanoiu B., Cruce R., Ardelean A., Pirici D., Pisoschi C. (2004) Hormonii steroizi si moleculele hidrofobe de semnalizare. In: Cai si retele de semnalizare celulara, Ed. Aius, Craiova: 16-18.
21. Cuevas P., Carceller F., Giménez-Gallego G. (2001) Fibroblast growth factors in myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic preconditioning, *J.Cell.Mol.Med.*, **5(2)**: 132-142.
22. Darabont RO., Dinu V. (1991) Implicatiile radicalilor liberi derivati din oxigen in patologia ischemiei acute. *Medicina interna*, **XLII(1-2)**: 38-45.
23. Das DK., Maulik N. (2003) Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry (Moscow)*, **69(1)**: 10-17.
24. De Jager T., Pelzer T., Müller-Botz S., Imam A., Muck J., Neyses L., 2001, Mechanisms of Estrogen Receptor Action in the Myocardium. *J. Biol. Chem.*, **276(30)**, 27873-27880.
25. Dumitrescu C. (1992) The role of free radicals in normal and pathologic cell proliferation, *Rom.J.Endocrinol.*; **30(1-2)**: 45-62.
26. Duranteau J., Chandel NS., Kulisz A., Shao Z., Schumacker PT., 1998, Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.*, **273(19)**, 11619-11624.
27. Ejiri J., Inoue N., Tsukube T., Munezane T., Hino J., Kobayashi S., Hirata K., Kawashima S., Imajoh-Ohmi S., Hayashi Y., Yokozaki H., Okita Y., Yokoyama M. (2003) Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: Protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker. *Cardiovascular Res.* **59**: 988-996.
28. Ek B., Hallberg C., Sjogren K-G., Hjalmarson A., 1994, Reoxygenation-induced cell damage of isolated neonatal rat ventricular myocytes can be reduced by chain-breaking antioxidants. *Free Radical Biol.Med.*, **16**, 117-121.
29. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties, *Biochim. Biophys Acta*; **850**: 436-448.
30. Enmark E., Pelto-Hikko M., Grandien K., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson JA. (1997) Human estrogen receptor beta-gene

structure, chromosomal localization and expression pattern. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **82**: 4258-4265.

31. Finkel T., Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239-247.

32. Galaris D., Hóijer B., Rydström L., 1980, Improved methods for automatic monitoring of contracting heart cells in culture. *J.Biochem.Biophys. Methods*, **2**, 213-225.

33. Galien R., Evans H.F., Garcia T.(1996) Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-kappa B binding sites in interleukin-6 promoter inhibition by estrogens. *Mol. Endocrinol.* **10**: 713-722.

34. Galien R., Garcia T. (1997) Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2424-2429.

35. Galvez AS., Ulloa JA., Chiong M., Criollo A., Eisner V, Barros LF., Lavandero S., (2003) Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **278** (40): 38484-38494;

36. Gannon F., Denger S., Reid G. (2000) Estrogen receptors: Challenging current paradigms, *EMBL 2000 Research Reports*.

37. Garner MH, (1996) Changes in Na,K-Adenosine Triphosphatase (ATPase) concentration and Na,K-ATPase-dependent adenosine triphosphate turnover in human erythrocytes in diabetes, *Metab.*, **45**: 927-934;

38. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes, *J Clin Invest*; **94**:1621-1628.

39. Grynberg A., Athias P., Degois M., 1986, Effect of change in growth environment on cultured myocardial cells investigated in a standard medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **22**, 44-50.

40. Gupta S., Knowlton A.A.(2002) Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia and apoptosis. *Circulation* **106**: 2727-2733.

41. Guy De Backer (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in clinical practice). *Eur Heart J*; **24**:1601-1610.

42. Hall JM., McDonnell DP. (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ER beta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, **140**: 5566-5578.

43. Halliwell B.(2000) A super way to kill cancer cells? *Nature medicine*, **6(10)**: 1105-1106.

44. Hamilton K.L., Gupta S., Knowlton A.A.(2004) Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NFkB signaling. *J. Mol. Cell. Card* **36**: 577-584.

45. Harman D. (1957) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J.Gerontol.*, **2**: 298-300.
46. Hein S, Scheffold T, Schaper J. (1995) Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium, *J Thorac Cardiovasc Surg*; **110**: 89-98.
47. Ho KJ, Liao JK. (2002) Non-nuclear actions of estrogen: New targets for prevention and treatment of cardiovascular disease, *Mol. Interventions*, **2**: 219-228.
48. Hoshida S., Nishida M., Yamashita N., Igarashi J., Aoki K., Hori M., Kuzuya T., Tada M., 1996, Heme oxygenase-1 expression and its relation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, **28**, 1845-1855.
49. Hu F.B., Grodstein F., Hennekens C.H. (1999) Age at natural menopause and risk of cardiovascular disease. *Arch.Intern Med.*, **159**: 1061-1066.
50. Inserte J., taimor G., Hofstaetter B., Garcia-Dorado D., piper HM., 2000, Influence of simulated ischemia on apoptosis induction by oxidative stress in adult cardiomyocytes of rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H94-H99.
51. Iwaki K., Chi S-H., Dillman WH., Mestril E., 1993, Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress. *Circ.Res.* **87**, 2023-2032.
52. Jacobson SL., Piper HM., 1986, Cell Cultures of Adult Cardiomyocytes as Models of the Myocardium. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, **18**, 661-678.
53. Janero D.R., Hreniuk D., Sharif H.M.(1991) Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative membrane injury. *J. Cell. Physiol.* **149**: 347-364.
54. Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. (1981) Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol*; **88**:526-535.
55. Jonassen A.K., Brar B.K., Mjos O.D., Sack M.N., Latchman D.S., Yellon D.M.,2000, Insulin administered at reoxygenation exerts cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *Circulation* **32**, 757-764.
56. Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK, Terzic A.(1998) Protective action of 17 beta estradiol in cardiac cells: implications for hyperkalemic cardioplegia. *Ann Thorac Surg.*, **66(5)**, 1658-1661.
57. Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., Anversa, P. (1996) *Lab. Invest.* **74**, 86–107;
58. Kaminischi K., Yanagishita T., Kako K.J. (1989) Oxidant injury to isolated heart cells. *Can.J.Cardiol.*; **5**: 168-174.
59. Kang PM., Izumo S. (2001) Morphological changes associated with reoxygenation in adult cardiac myocytes, *J.Cell.Mol.Med.*, **5(2)**: 198-199.
60. Kato S., Takemura G., Maruyama R., Aoyama T., Hayakawa K., Koda M., Kawase Y., Li Y., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H. (2001) Apoptosis, rather than oncosis is the predominant mode of spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture. *Jpn. Circ. J.* **65**: 743-748.

61. Kirk M.M., Izu L.T., Chen-Izu Y., McCulle S.L., Wier W.G., Balke C.W., Shorofsky S.R.(2003) Role of the transverse-axial tubule system in generating calcium sparks and calcium transients in rat atrial myocytes. *J. Physiol.* **547**, 441-451.
62. Knowlton A.A., Sun L.(2001) Heat shock factor-1, steroid hormones and regulation of heat shock protein expression in the heart. *Am. J. Physiol.* **280**: H455-464.
63. Kobayashi Y., Kitamoto T., Masuhiro Y. (2000) p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains, *J.Biol.Chem.*, **275**:15645-15651.
64. Kourie J.I. (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am.J.Physiol. (Cell Physiol.)*; **275**:C1-C24
65. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*; **495**:12-15.
66. Kuiper GG., Brinkmann AO (1994) Steroid hormone receptor phosphorylation: is there a physiological role? *Mol.Cell.Endocrinol.*, **51**:941-951.
67. Kuiper GG., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson JA. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **138**: 863-870.
68. Kyaw M., Yoshizumi M., Tsuchiya K., Izawa Y., Kanematsu Y., Tamaki T. (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases, *Acta Pharmacologica Sinica*, **25(8)**: 977-985.
69. Laemmli UK, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 689-685;
70. Lahooti H., Thorsen T., Aakvaag A. (1998) modulation of mouse receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J.Mol.Endocrinol.*, **20**: 245-259.
71. Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, Kaplan D, Lubart R. (2003) Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem*; **278**:40917-40922.
72. Lazennec G.,Bresson D., Lucas A., Chauveau C., Vignon F. (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, **142**: 4120-4130.
73. Long X, Goldenthal MJ, W GM, Marin-Garcia J. (2004) Mitochondrial Ca^{2+} flux and respiratory enzyme activity decline are early events in cardiomyocyte response to H_2O_2 . *J Mol Cell Cardiol*; **37**: 63-70.
74. Long X., Boluyt MO., Maria de Lourdes Hipolito, Lundberg ML., Zheng JS., O'Neill L, Cirielli C., Lakatta EG., Crow MT., (1997) p53 and the Hypoxia-induced Apoptosis of Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes, *The Journal of Clinical Investigation*, **99 (11)**: 2635–2643.

75. Mark GE., Strasser FF., 1966, Pacemaker activity and mitosis in cultures of newborn rat heart ventricle cells. *ExpCellRes.*, **44**, 217-233.
76. McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function erythrocyte peroxidase (hemocopper). *J.Biol.chem.*, **244**: 6049-6055.
77. McInerney EM., Tsai MJ., O'Malley BW., Katzenellenbogen BS. (1996) Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc.Natl.Acad.USA.*, **93**: 10069-10073.
78. Moritz F., Monteil C., Isabelle M., Bauer F., Renet S., Mulder P., Richard V., Thuillez C. (2003) Role of reactive oxygen species in cocaine-induced cardiac dysfunction. *Cardiovascula Res.*, **59**: 834-943.
79. Moses R.L., Claycomb W.C., 1984, Ultrastructure of cultured atrial cardiac muscle cells from adult rats. *Am. J. Anat.* **171**, 191-206.
80. Muramatsu M., Inoue S. (2000) Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**: 1-10.
81. Musters RJ., Post JA., Verkleij AJ., 1991, The isolated neonatal rat-cardiomyocytes used in an in vitro model for "ischemia". I. A morphological study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1091**, 270-277.
82. Nag A.C., Cheng M., 1981, Adult mammalian cardiac muscle cells in culture. *Tissue&Cell* **13**, 515-523.
83. Nag AC, Sreepathi P, Lee M, redde JR. (1996) Effect of oxidative insult on young and adult cardiac muscle cells *in vitro* *Cytobios*; **85**:7-27.
84. Narula J., Haider N., Virmani R., DiSalvo TG., Kolodgie FD., Hajjar RJ., Schmidt U., Semigran MJ., Dec MW., Ban-An Khaw (1996) Apoptosis in Myocytes in End-Stage Heart Failure, *The New England Journal of Medicine*, **335**:1182-1189.
85. Nguyen TT, Eleffson RD, Hodge (1997) Predictive value of electrophoretically detected lipoprotein (a) for coronary heart disease and cerebrovascular disease in a community based cohort of 9936 men and women. *Circulation*; **96**:1390-1397.
86. Nishida S, Iruma S, Hashimoto S. (1987) Immunohistochemical change of actin in experimental myocardial ischemia. Its usefulness to detect very early myocardial damages. *Histol Histopathol*; **2**: 417-428.
87. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H, Hori M. (1997) Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17 beta estradiol. *Circulation*, **96**:1953-1963.
88. Nuedling S, Karas RH., Mendelsohn ME., Katzenellenbogen JA., Katzenellenbogen BS., Meyer R., Vetter H., Grohe C., 2001, Activation of estrogen receptor β is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Letters*, **502**, 103-108.
89. Opie LH. (1989) Reperfusion injury and its pharmacological modification. *Circulation*; **80**:1049-1062.

90. Paech K., Webb P., Kuiper GG., Nilsson S., Gustafsson J., Kushner PJ., Scanlan TS. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors Eralpha and Erbeta at AP1 site. *Science*, **277**: 1508-1510.
91. Patten RD., Pourati I., Atonovitz MJ., Baur J., Celestin F., Chen X., Michael A., Haq S., Nuedling S., Grohe C., Force T., Mendelsohn ME., Karas RH., 2004, 17 β -Estradiol Reduces Cardiomyocytes Apoptosis In Vivo and In Vitro via Activation of Phospho-Inositide-3 Kinase/Akt Signaling. *Circ Res.*, **95**, 692-699.
92. Picard D., Kumar V., Chambon P. (1992) Signal transduction by steroid hormones: Nuclear localisation is differently regulated in estrogen and glucocorticoid receptor, *Cell Regul.*, **1**:291-299.
93. Pinson A, Tirosh R. (1996) Reversible and irreversible damage in reoxygenated ischemic ventricular myocytes in culture. *Mol Cell Biochem*; **160/161**:137-147.
94. Piper HM., Jacobson SL., Schwartz P., 1988, Determinants of Cardiomyocyte Development in Long-term Primary Culture. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, **20**, 825-835.
95. Powell T., Twist V.W.,1976, A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 327-333.
96. Ranki HJ, Crawford RM, Budas GR, Jovanovic A.(2002) Ageing is associated with a decrease in the number of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels in a gender-dependent manner. *Mech Ageing Dev.*, **123(6)**, 695-705.
97. Rao BR. (1998) Isolation and characterisation of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *J.Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **65**: 3-41.
98. Rappaport L. (2000) Ischemia-reperfusion associated myocardial contractile dysfunction may depend on Ca²⁺-activated cytoskeleton protein degradation. *Cardiovasc Res*; **45**: 810-812.
99. Redberg R.F. (2002) Coronary artery disease in women: understanding the diagnostic and management pitfalls. *Medscape Women's Health eJournal* **3(5)**.
100. Reiter R.J., Dun-Xian Tan (2003) Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart, *Cardiovascular Res.*, **58**: 10-19.
101. Rollerova E., Urbancikova M. (2000) Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review). *Endocrine Regulations*, **34**: 203-218.
102. Rudiger von Harsdorf, Pei-Feng Li, Dietz R. (1999) Signaling pathways in reactive oxygen species – Induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*; **99**:2934-2941
103. Saville B., Wormke M., Wang F., Nguyen T., Enmark E., Kuiper G., Gustafsson JA., Safe S. (2000) Ligand-, cell- and estrogen receptor subtype

(alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J.Biol.Chem.*, **275**: 5375-5387.

104. Savolainen-Peltonen H. (2004) Vascular biology of estrogen receptors alpha and beta-an experimental approach to restenosis and transplant arteriosclerosis, Helsinki University Biomedical Dissertations nr.56, Academic Dissertation.

105. Semenza G. L. (2000) Cellular and molecular dissection of reperfusion injury. ROS within and without. *Circulation Research*; **86**:117.

106. Severs N.J., Rothery S., Dupont E., Coppen S.R., Yeh H.I., Ko Y.S., Matsushita T., Kaba R., Halliday D.(2001) Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 301-322.

107. Severs NJ (2001) Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?, *J.Cell.Mol.Med.*, **5(4)**: 355-366.

108. Sharp WW, Terracio L, Borg TK, Samarel AM. (1993) Contractile activity modulates actin synthesis and turnover in cultured neonatal rat heart cells. *Circ. Res.*; **73**:172-183.

109. Shlipak M.G., Angeja B.G., Go A.S., Frederick P.D., Canto J.G., Grady D.(2001) Hormone therapy and in-hospital survival after myocardial infarction in postmenopausal women. *Circulation* **104**: 2300-2304.

110. Simpson P., Savion S., 1982, Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *CircRes.*, **50**, 101-116.

111. Sommer J.R., Jennings R.B.,(1992) Ultrastructure of Cardiac Muscle. {n: The Heart and Cardiovascular System, Second Edition,(H.A. Fozzard, Ed), Raven Press, Ltd., New York, 3-50.

112. Strehlow K., Rotter S., Wassmann S., Adam O., Grohé C., Laufs K., Böhm M., Nickenig G. (2003) Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ.Res.*, **93**: 170-177.

113. Stroescu V. (1999) Hormonii sexuali si preparatele similare, gonadotrofinele, antagonistii hormonilor sexuali. In: Bazele farmacologice ale practicii medicale, editia a VI-a, Ed. Medicala, Bucuresti: 711-719.

114. Suzuki T., Tsuruda A., Katoh S., Kubodera A., Mitsui Y., 1997, Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rate assay of myocytes cultured in a serum-free medium. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **29**, 2087-2093.

115. Tanaka, M., Ito H., Adachi S., Akimoto H., Nishikawa T., Kasajima T., Marumo F., Hiroe M. (1994) Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes, *Circ. Res.* **75**:426-433;

116. Tanonaka K., Iwai T., Motegi K., Takeo S. (2003) Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart, *Cardiovascular Res.*, **57**: 416-425.

117. Taylor RP, Ciccolo JT, Starnes JW. (2003) Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. *Cardiovasc Res*; **58(3)**:575-582.
118. Terracio L., Ingebretsen C.C., Ingebretsen W.R., 1982, Isolation and culture of adult rat heart myocytes. *Anat. Rec.* **204**, 403-444-50.
119. Vaccarino V, Parsons L, Every NR, Barron HV, Krumholz HM. (for the National registry of MI 2 Participants) (1999) Sex-Based Differences in Early Mortality after Myocardial Infarction. *NEJM*; **341**:217-225.
120. van Boek AP, Ruijter-Heijstek FC, Erkelens DW (1999) Menopause is associated with reduced protection from post-prandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **19**:2737-2741.
121. Vanden Hoek TL., Becker LB., Shao Z., Li C., Schumacker PT., 1998. Reactive Oxygen Species Released from Mitochondria during Brief Hypoxia Induce Preconditioning in Cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.*, **273(29)**, 18092-18098.
122. Vandroux D, Schaeffer C, Tissier C, Lalande A, Bes S, Rochette L, Athias P. (2004) Microtubule alterations is an early cellular reaction to the metabolic challenge in ischemic cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*; **258**: 99-108.
123. Voss M.R., Stallone J.N., Li M., Cornelussen R.N.M., Knuefermann P., Knowlton A.A.(2003) Differences in the expression of heat shock proteins: The effect of estrogen. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**: H687-692.
124. Wagner DR., Combes A., McTiernan Ch., Sanders VJ., Lemster B., Feldman AM., 1998, Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res.*, **82**, 47-56.
125. Wang GW, Schuschke DA, Kang YJ. (1999) Metallothionein-overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H₂O₂ toxicity. *Am J Physiol*; **276**:H167-H175.
126. Wei S., Rothstein E.C., Fliegel L., Dell'Italia L.J., Lucchesi P.A. (2001) Differential MAP kinase activation and Na⁺/H⁺ exchanger phosphorylation by H₂O₂ in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*; **281**:C1541-C1550.
127. Xie Z., Kometiani P., Liu J., Li J., Shapiro J.I., Askari A. (1999) Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes, *JBiolChem*, **274(27)**: 19323-19328.
128. Xu Y., Armstrong S.J., Arenas I.A., Pehowich D.J., Davidge S.T.(2004) Cardioprotection by chronic estrogen or superoxide dismutase mimetic treatment in the aged female rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**: H165-H171.
129. Zhai P., Eurell T.E., Cotthaus R., Jeffery E.H., Bahr J.M., Gross D.R.(2000) Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **279**: H2766-H2775.

Pentru intelegerea mecanismelor implicate in functionarea miocardului normal si patologic precum si pentru a stabili noi metode de cardioprotectie sunt necesare modele experimentale care sa corespunda necesitatilor studiilor efectuate. Modelele experimentale cele mai utilizate in studiile de cardiologie sunt organul (inima) izolat si cultura de celule (cardiomiocite).

Cultura de cardiomiocite permite observarea efectelor diferitelor agenti chimici si/sau farmaceutici la nivel celular, efecte declansate de acestea fara implicarea fluxului sanguin si a sistemului neuro-endocrin. In plus, culturile celulare sunt modele simple si reproductibile ce permit monitorizarea toxicitatii selective si inducerea mortii celulare.

Cultura de cardiomiocite elimina variabilitatea interindividuala si permite studiul metabolismului si a mecanismelor de reglare ale enzimelor ce metabolizeaza medicamentele, in diferite conditii experimentale. In plus, culturile primare permit, printre altele, diminuarea utilizării animalelor de laborator care necesita conditii specifice (t^0 , dieta, numar limitat de teste) ceea ce duce la cresterea costurilor studiilor.

Cultura de cardiomiocite permite evaluarea directa a efectelor compusilor chimici si/sau farmaceutici asupra sistemului cardiac. Diferitele substante pot fi administrate culturilor celulare in concentratii farmacologice cunoscute. Se pot elimina astfel interactiile metabolice cu alte celule sau organe. Moleculele chimice pot fi adaugate si indepartate cu ușurința din mediul de cultura putand fi astfel studiate efectele acestora pe termen lung.

Cultura celulara face posibila studierea interactiilor cardiomiocitelor cu alte tipuri celulare (fibroblaste cardiace, celule endoteliale) prin co-cultivarea acestora sub forma de monostraturi separate, in aceeasi placa de cultura. Sistemul astfel realizat poate aduce informatii despre modul in care raspund cardiomiocitelor la mediul conditionat de alte tipuri celulare si invers precum si despre modul in care este afectata dezvoltarea si functionarea acestora.

Efectuarea unor studii privind efectele hormonale estrogeni asupra cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ in vederea elaborarii, realizarii si experimentarii unei metode de de tratare a cardiomiocitelor supuse stressului oxidativ bazata pe utilizarea hormonilor estrogeni reprezinta subiectul acestei carti.

Editura Balneară

ISBN: 978-606-92826-7-0