

Angiogeneza și limfangiogeneza pe modele experimentale de diabet

Principalele motive pentru care am ales abordarea acestei teme de cercetare sunt reprezentate de: epidemiologia diabetului zaharat, conform atlasului IDF la sfârșitul anului 2019, s-au înregistrat 463 milioane persoane adulte cu diabet zaharat, prevalența afecțiunii a fost în creștere în ultimii ani și se estimează că la sfârșitul anului 2030 se vor înregistra 578 milioane persoane adulte cu diabet. Modificările morfologice și imunohistochimice ale etapelor precoce de distrucție insulară au fost foarte puțin studiate, combinația dintre factorul inflamator, angiogeneza și limfangiogeneza în etapele preliminare diabetului zaharat este ambiguă. Implicarea podoplaninei în patogeneza diabetului zaharat este complet necunoscută, majoritatea modelelor experimentale de diabet s-au obținut prin inducție chimică (metodă prin care se omite principalul factor inductor al diabetului zaharat tip 2, alimentația necorespunzătoare). Caracterizarea marker-ilor angiogenici și limfangiogenici încă din etapele preliminare diabetului zaharat poate constitui abordarea unor noi ținte de tratament.

Material și metode

Au fost utilizați 13 șobolani de tip Sprague Dowley, găzduiți în biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara, în condiții optime, conform normelor europene în vigoare. Aceștia au fost hrăniți cu alimentație hipercalorică (hiperglucidică-glucide cu absorbție rapidă, hiperlipidică, bogată în grăsimi saturate și trans, hiperproteică). De circa 2-3 ori/săptămână au primit mâncare de tip fast food, dietă similară cu a subiecților umani care dezvoltă obezitate cu sau fără prediabet/diabet zaharat tip 2. A fost măsurată glicemia bazală, din sângele capilar, prin punșionarea cozii, cu glucometrul Achtung, inițial (înainte de expunerea la alimentația hipercalorică), respectiv, la 3 și 9 săptămâni post expunere.

S-a prelevat țesut pancreatic înainte de expunere, la 3, 6, 9, 12 și 16 săptămâni post expunere. Fragmentele recoltate au fost notate (N1, control 1), (OB1, obez1), (OB2, obez2), (OB3, obez3), (OB4, obez4) și OB5 (obez5). A urmat procesarea primară, colorarea cu hematoxină-eozină care a permis diagnosticul histopatologic și selecționarea cazurilor pentru evaluare imunohistochimică (s-au utilizat ac.anti-insulină, ac.anti-factor VIII, ac.anti-AC-133, ac.anti-OCT3/4, ac.anti-podoplanină, ac.anti-PROX1). După evaluarea imunohistochimică au fost selectate cazurile pentru validare prin tehnica de hibridizare in situ de tip RNAscope.

Primul capitol al tezei a analizat modificările morfologice ale insulelor Langerhans, în dinamică, înainte de expunere, respectiv, în diferite etape de expunere la alimentația obezogenă.

În cazul (N1, control) s-a observat distribuția specifică, normală, a insulelor Langerhans în parenchimul exocrin. Insule rotund-ovalare bine delimitate, mai palid colorate, localizate în centrul lobulilor pancreatici (insule compacte), iar la periferia lobulilor pancreatici s-au observat structuri mai palid colorate, slab delimitate de componenta exocrină, insule pancreatice difuze. Pe lamă s-a evidențiat și fragment splenic, deoarece pancreasul la rozătoare este dificil de recoltat, fiindcă nu este

organizat într-un organ bine definit, fiind constituit din țesut pancreatic inclus în grăsimea din cavitatea abdominală, posterior de stomac.

În cazul (OB1, la 3 săptămâni post expunere) s-au evidențiat următoarele diferențe: hipertrofia insulelor compacte, creșterea densității insulare per secțiune pancreatică, distribuția heterogenă a insulelor pancreatice în parenchimul pancreatic, hiperemia mai accentuată a vaselor periinsulare.

În cazul (OB3, la 9 săptămâni post expunere) s-a observat parenchimul pancreatic înconjurat de o cantitate crescută de țesut adipos alb, iar la (OB5, la 16 săptămâni post expunere) s-a decelat degenerescență grasă periinsulară.

Modificările de detaliu, în dinamică, la nivelul insulelor Langerhans constau în: la (N1)-celulele endocrine intrainsulare ocupă aproape toată aria insulară, vascularizația este mai accentuată în centrul insulei, comparativ cu zona periferică; în cazul (OB1) s-au identificat insule compacte hipertrofiate, cu predominanța celulelor endocrine optice goale (active din punct de vedere funcțional) dispuse în cordoane, cu accentuarea vascularizației periinsulare. La (OB2) s-a observat apariția infiltratului inflamator la periferia insulelor hipertrofiate, iar în cazul (OB4) s-a evidențiat modificarea arhitecturii celulare intrainsulare (în cazul unei insule hipertrofiate), dezorganizare celulară, scăderea densității celulare, vascularizație accentuată, cu stază evidentă.

În cazul (OB3) s-a observat creșterea cantității de țesut adipos alb peripancreatic, cu infiltrat inflamator, localizat difuz și cu aspect folicular. În plus, în țesutul adipos alb peripancreatic s-au observat celule endoteliale izolate, celule endoteliale care delimitează structuri tubular-like neperfuzate și vase mature perfuzate, aspecte care ne-au sugerat un posibil proces angiogenic activ (etapele cunoscute din angiogeneza de tip sprouting).

Concluziile primului capitol din teză sunt: dieta hipercalorică induce precoce modificări morfologice majore la nivelul insulelor pancreatice, dinamica modificărilor morfologice ale insulelor pancreatice este un proces complex care nu afectează doar celulele β pancreatice, dar și rețeaua capilară, precum și statusul inflamator dependent de timpul scurs de la implementarea dietei hipercalorice. Microdensitatea vasculară crește proporțional cu hipertrofia insulelor pancreatice, există două tipuri de angiogeneză în insulele pancreatice după administrarea dietei hipercalorice: angiogeneza compensatorie, fiziologică și angiogeneza inflamatorie, patologică. Dieta hipercalorică nu determină doar acumularea de țesut adipos peripancreatic, dar și organizarea sa particulară, prin existența infiltratului inflamator difuz sau organizat sub formă de pseudofoliculi, precum și prin existența unei rețele de capilare active într-o permanentă remodelare.

În al doilea capitol din teză am evidențiat variabilitatea expresiei insulinei și corelația cu glicemia din sângele capilar.

În cazul (N1), celulele pozitive pentru insulină au fost distribuite în toată aria insulelor pancreatice, cu un aspect intens, omogen citoplasmatic. La (OB1), imunoexpresia pentru insulină a fost mai crescută comparativ cu (N1), densitatea celulelor insulino- pozitive a crescut, ocupând aproape întreaga arie insulară, în cazul insulelor compacte hipertrofiate. În cazul insulelor difuze hipertrofiate, densitatea

celulelor insulare insulino-pozitive a fost semnificativ mai redusă față de cele compacte, iar intensitatea imunoexpresiei a fost moderată/slabă. În cazul (OB2) s-a observat o marcată creștere a intensității imunoexpresiei pentru insulină în insulele hipertrofiate, comparativ cu (N1), aspect care coincide cu statusul hipersecretor și cu scăderea valorilor glicemice. În cazul (OB3) s-a observat o scădere drastică a imunoexpresiei pentru insulină, aspect care se suprapune cu scăderea secreției de insulină și cu creșterea valorilor glicemice.

Dieta hipercalorică determină hipertrofia precoce a insulelor pancreatice prin hiperplazia celulelor secretoare de insulină. Precoce se produce o scădere a valorilor glicemice determinată de cantitatea mare de insulină secretată compensator. Hipertrofia insulară cu creșterea densității și imunoexpresiei insulinei în celulele β pancreatice s-a corelat cu scăderea tranzitorie a glicemiei din sângele capilar. Tardiv, epuizarea celulelor β pancreatice determină hiperglicemie și diabet zaharat. Degenerarea insulară, cu scăderea numărului și a intensității imunoexpresiei pentru insulină a determinat apariția hiperglicemiei serice, tardiv de la începerea dietei hipercalorice.

În cel de-al treilea capitol al tezei am evaluat microvascularizația insulelor pancreatice după administrarea dietei hipercalorice. Am utilizat ac.anti-FVIII. În cazul (OB2) s-a remarcat densitate vasculară intrainsulară crescută, dilatarea vaselor periinsulare, vase pozitive la FVIII, intensitatea imunoexpresiei a fost mai mare în vasele mature periinsulare și discontinuă/inconstantă în vasele intrainsulare. În cazul (OB2), vasele dilatate de la periferia insulelor invadează insulele pancreatice hipertrofiate, vasele au grad mare de ramificare, celulele de la vârful sprout-ului sunt pozitive la FVIII, vasele ramificate din vasul care a invadat insula nu au lumen patent, aspect de cordon într-o etapă precoce a angiogenezei insulare.

În cazul (OB3) s-a observat microvascularizația țesutului adipos alb peripancreatic, densitate crescută a vaselor capilare și ramificare intensă a acestora, în special în apropierea de țesutul pancreatic.

Dieta hipercalorică induce creșterea vascularizației insulelor pancreatice direct proporțional cu timpul de administrare a acestei diete. Datele noastre susțin existența a două tipuri de angiogeneză dependentă de momentul de evaluare a acesteia: angiogeneza adaptivă ca factor adjuvant al creșterii tranzitorii a secreției de insulină și a eliberării compensatorii a acesteia, angiogeneză care poate fi considerată fiziologică, dată fiind interrelația dintre celula endotelială și celulele β pancreatice în insulele normale, o angiogeneză de tip inflamator, apărută în etapele tardive de administrare a dietei hipercalorice, angiogeneză care poate fi considerată patologică, prin întreținerea acumulării de macrofage și distrucția ireversibilă a insulelor pancreatice.

În cel de-al patru-lea capitol al tezei am studiat reacția vasculară a implantului de pancreas pe membrana corioalantoidă (CAM), recoltat în diferite etape ale administrării dietei hipercalorice.

În momentul grefării țesutului pancreatic de la (OB3) pe CAM s-a remarcat aria liberă de vase sanguine din jurul implantului.

În ziua a doua post implant s-a remarcat reacția angiogenică indusă de implantul de țesut pancreatic de la (OB3). Macroscopic s-a observat o creștere a densității vasculare periimplant, rețeaua vasculară

periimplant este constituită din numeroase vase sanguine de calibru mic, vase cu un grad mare de ramificare, care realizează o rețea densă în jurul implantului. De asemenea densitatea vasculară și gradul de ramificare al vaselor periimplant a fost mai mare în ziua a 4-a postimplant comparativ cu ziua a 2-a. Aceste aspecte au fost validate și prin imaginile obținute cu stereomicroscopul: în ziua a 4-a postimplant, în momentul întreruperii experimentului, vasele periimplant au invadat periferia țesutului pancreatic implantat și s-au ramificat intens, acestea au fost perfuzate. Periimplant s-a remarcat emergența unui număr foarte mare de vase din vasele preexistente, acestea au avut un aspect sinuos, capătul lor liber fiind dilatat, ceea ce a sugerat o angiogeneză încă activă. Zona centrală mai palid colorată a implantului a sugerat liză a țesutului pancreatic, dar periferia acestuia a fost viabilă, cel mai probabil achiziției de vase sanguine.

Examenul microscopic a relevat liza centrală a implantului (masă intens acidofilă) și preservarea țesutului de la periferia implantului. Implantul a fost aderent de CAM și vascularizat la periferie, țesutul adipos peripancreatic a fost înconjurat de infiltrat inflamator. S-a observat infiltrat inflamator masiv în corionul condensat al CAM. LA nivelul CAM s-a evidențiat pe lângă bogatul infiltrat inflamator și accentuarea vascularizației, vase cu densitate crescută, vase sanguine dilatate, cu un conținut bogat în celule inflamatorii, aspecte observate la distanță de implantul de țesut pancreatic.

Implantul de pancreas pe CAM are o viabilitate scăzută și necesită o atenție particulară în ceea ce privește prelevarea și implantarea sa pe CAM. Xenogrefa de pancreas induce un răspuns inflamator masiv în corionul CAM, celulele inflamatorii fiind prezente în număr mare și în vasele sanguine din CAM. Reacția vasculară periimplant, de achiziție de noi vase sanguine, s-a datorat infiltratului inflamator masiv din CAM. Infiltratul inflamator s-a regăsit și în zona periferică a țesutului adipos adiacent implantului, aspect similar cu cel observat pe preparatele microscopice.

În capitolul 5 al tezei am identificat și caracterizat celulele CD-133 pozitive și OCT $\frac{3}{4}$ pozitive (celule stem) în modificările pancreatice după administrarea dietei hipercalorice.

În cazul (N1) s-au decelat rare celule endoteliale CD-133 pozitive pe traiectul vaselor sanguine din parenchimul exocrin, celule pozitive cu aspect stelat în parenchimul exocrin și celule pozitive ovalare situate în grupuri mici sau izolate, de cele mai multe ori la periferia pancreasului exocrin. În cazul (OB3) a crescut densitatea vaselor și celulelor CD-133 pozitive cu aspect stelat (comparativ cu N1), cu tendință de a se organiza în rețea la nivelul componentei exocrine.

La nivel insular, la (N1), s-a observat o singură celulă cu aspect stelat pozitivă la CD-133, situată la periferia insulei pancreatice. În cazul (OB1) s-a evidențiat creșterea densității celulelor intrainsulare CD-133 pozitive, hipertrofia insulară se corelează cu numărul de celule CD-133 pozitive din interiorul insulelor pancreatice. În cazul (OB2) și (OB3) s-a observat creșterea numărului de celule CD-133 pozitive intrainsulare, dar și un număr crescut de celule CD-133 pozitive care delimitează vase mici intrainsulare, aspect care sugerează imaturitatea vaselor în această perioadă de administrare a dietei hipercalorice.

În cazul (OB2), OCT3/4 a fost exprimat în rare celule de la periferia insulelor pancreatice, iar în cazul (OB3) s-a remarcat creșterea densității celulelor OCT3/4 pozive, majoritatea vaselor de dimensiuni mici au prezentat în interiorul endoteliului celule cu expresie nucleară a OCT3/4.

Celulele CD-133 pozitive pancreatice suferă modificări de distribuție și densitate, dependent de timpul administrării dietei hipercalorice. Există două subpopulații de celule CD-133 pozitive în pancreasul exocrin, dar numai celulele cu aspect stelat au fost observate ca fiind în cantitate crescută în insulele pancreatice la (OB3). Celulele CD-133 pozitive participă la regenerarea insulelor pancreatice, dar și a vaselor intrainsulare. OCT ¾ este exprimat într-un număr redus de celule intrainsulare la (N1), numărul celulelor care exprimă OCT3/4 fiind crescut în insulele pancreatice de la (OB3).

Studiul nostru demonstrează implicarea axului Podoplanină/PROX-1 în modificările ireversibile ale parenchimului pancreatic endocrin.

În capitolul șase al tezei am evaluat podoplanina și PROX1 în modificările pancreatice induse de dieta hipercalorică.

La (N1) expresia podoplaninei a fost omogenă la nivelul insulelor Langerhans și la nivelul celulelor ductelor centroacinare, cu imunoexpresie mai crescută în zona periferică a lobulilor pancreatici. De asemenea au fost pozitive celule endoteliale limfatice, din țesutul adipos peripancreatic. În cazul (OB2) imunoexpresia insulară a devenit heterogenă, cu intensitate crescută la periferia insulelor Langerhans. La (OB2) s-a observat o creștere a expresiei podoplaninei la nivelul insulelor hipertrofiate, cu infiltrat inflamator periinsular. În cazul (OB3) s-a evidențiat tot o creștere a imunoexpresiei podoplaninei în insulele hipertrofiate cu infiltrat inflamator periinsular. Expresia podoplaninei a fost validată prin metoda RNAscope. În cazul (OB2) au fost evidențiate celule pozitive la periferia ariei insulare. Celulele de la periferia insulelor pancreatice au fost intens pozitive pentru PROX1, în cazul (N1). La (OB1), celulele PROX1 pozitive de la periferia insulară au scăzut, au fost observate rare celule pozitive în zona centrală. La (OB2) distribuția celulelor PROX1 pozitive a devenit focală, în grupuri mici la periferia ariei insulare. În zona centrală a insulei, expresia a fost izolată și cu densitate crescută, atât în insulele hipertrofice și în cele cu arie normală, cu expresie în clustere a PROX1 mARN în insulele hipertrofice. În cazul (OB2), în insulele de dimensiuni normale, distribuția celulelor pozitive a fost diferită față de cea din pancreasul normal.

Atât podoplanina cât și PROX-1 se exprimă diferit, dependent de durata administrării dietei hipercalorice. Podoplanina mediază distrucția insulelor pancreatice cel mai probabil prin mecanism imun și/sau autoimun.

PROX-1 are un rol dual în patogeneza modificărilor precoce ale parenchimului endocrin din diabetul zaharat, rezultatele noastre susținând următoarele căi: (a) reactivarea PROX-1 indusă de hiperglicemie poate determina inițial creșterea numărului de celule β pancreatice imature, aspect susținut și de creșterea numărului de celule CD-133 pozitive descrisă în studiul nostru, în capitolul precedent; (b) represiile prin hiperglicemia susținută de administrarea dietei hipercalorice determină

inhibarea genei GSIS care susține secreția de insulină. Astfel se explică dispariția expresiei PROX-1 și scăderea imunoexpresiei insulinei în pancreasul recoltat la 9 săptămâni.

Studiul de față reprezintă prima descriere a variabilității de expresie a D2-40 în insulele pancreatice în decursul administrării dietei hipercalorice, recunoscută ca fiind responsabilă de inducerea și întreținerea diabetului zaharat. Corelarea PROX-1 scăzut cu imunoexpresia scăzută a insulinei și creșterea tranzitorie a CD-133 susține un mecanism compensator ineficient, agravat și de răspunsul imun inițiat și susținut de D2-40.

Concluzii finale:

Parenchimul pancreatic suferă modificări precoce după începerea dietei hipercalorice.

Modificările pancreatice afectează populația celulară din pancreasul endocrin, dar și pe cea a pancreasului exocrin.

Factorii implicați în modificările degenerative ale pancreasului endocrin în timpul dietei hipercalorice sunt multipli: angiogenici, inflamatori, activarea factorilor de transcripție, supresia expresiei factorilor cu posibil rol regenerativ.

Hipersecreția de insulină este tranzitorie și anihilează tranzitoriu hiperglicemia indusă de dieta hipercalorică.

Angiogeneza observată în modificările pancreatice induse de dieta hipercalorică joacă un rol dual în degenerescența pancreatică.

Angiogeneza apărută precoce, în etapele de hipertrofie a insulelor pancreatice are un rol compensator, de a participa la eliberarea crescută de insulină și este în directă interrelație cu numărul și secreția celulelor β pancreatice. Angiogeneza asociată inflamației din etapele tardive ale degenerescenței pancreatice reprezintă un suport pentru afluxul de celulele inflamatorii care întrețin distrucția pancreatică.

Angiogeneza nu este restricționată doar la nivelul insulelor pancreatice, ea fiind prezentă și exacerbată în dinamică și în țesutul adipos peripancreatic, precum și în parenchimul exocrin periinsular.

Originea vaselor de neoformație din modificările pancreatice induse de dieta hipercalorică nu este elucidată și necesită studii ulterioare.

Efectul angiogenic a fost certificat pe modelul experimental de implant pe membrana corioalantoidă (supraviețuirea până în ziua 4 fiind excepțională) care a certificat angiogeneza patologică, inflamatorie care a contribuit la distrucția parenchimului implantat.

Modificările precoce induse de dieta hipercalorică determină activarea celulelor cu rol stem CD-133 pozitive, cel mai probabil compensator pentru regenerarea celulelor β pancreatice, dar această activare este tranzitorie și ineficientă.

Activarea factorului de transcripție PROX-1 este prezentă în etapele precoce ale modificărilor pancreatice post dietă hipercalorică și controlează expresia D2-40 în insulele pancreatice afectate.

Inactivarea PROX-1 determină eșecul obținerii de celule β pancreatice mature secretoare de insulină, cel mai probabil prin supresia genei GSIS, responsabilă de stimularea secreției insulare.

Elementele de originalitate ale prezentei teze sunt: (a) inducerea modificărilor tisulare pancreatice prin administrarea hranei similare cu cea consumată de subiecții umani și nu indusă medicamentos; (b) corelarea imunoexpresiei insulinei cu nivelul glicemic; (c) evaluarea în dinamică a variabilității densității vasculare în timpul modificărilor pancreatice; (d) studiul celulelor CD-133 pozitive în parenchimul pancreatic și vasele aferente după administrarea dietei hipercalorice și nu după inducția medicamentoasă.

Raportarea pentru prima dată a expresiei și variabilității de expresie a D2-40, dar și a PROX-1 în insulele pancreatice afectate de dieta hipercalorică, precum și certificarea acestora prin aplicarea metodei de tip *RNA-scope* pentru identificarea PROX-1 mRNA, dat fiind faptul că este raportat în literatură că supresia secreției de insulină este determinată de scăderea mRNA, dar nu și a expresiei proteice.