

# RAPORT STIINTIFIC

## FAZA III

### **Evaluarea *in vitro* a impactului unor fracții de cultură de *P. aeruginosa* și a unor molecule de Quorum Sensing purificate asupra viabilității și profilului citokinic al celulelor gazdă**

În interacțiunea dintre microorganisme și organismele gazdă superioare, ambii parteneri implicați vor suferi inevitabil modificări care sunt influențate nu doar de contactul celular, ci și de molecule solubile, încă incomplet elucidate.

În cadrul acestei etape a fost evaluat impactul unor fracții de cultură, precum și al moleculelor de semnalizare Quorum Sensing (QS) la *P. aeruginosa*, asupra profilului citokinic și a modulării morții celulelor gazdă. Studiul a utilizat ca model eucariot culturi de celule mezenchimale (MSC) proaspăt izolate din maduvă de donatori umani. MSC reprezintă o perspectivă promițătoare pentru reconstrucția pulmonară și a căilor respiratorii în urma leziunilor apărute în infecțiile cu *P. aeruginosa* în special la pacienți cu fibroză chistică. Studii foarte recente au raportat că *P. aeruginosa* stimulează tranziția celulelor epiteliale la celule mezenchimale în epiteliul respirator în urma infecției pacienților transplantați sau cu leziuni pulmonare severe, favorizând apariția bronșiolitei obliterante (Borthwick și colab ., 2011). Cu toate acestea, efectul prezenței celulelor bacteriene sau a moleculelor de semnalizare QS produse de *P. aeruginosa* asupra celulelor mezenchimale nu a fost raportat până în prezent.

#### **Materiale si metode:**

**Modele utilizate:** celule MSC+culture bacteriene integrale diluate pana de 50-100UFC ml<sup>-1</sup> / corpi bacterieni inactivati termic (1h la 69°C) / supernatante de cultura / molecule de semnalizare QS purificate (obtinute de la firma Sigma Aldrich).

Procentul de celule MSC viabile a fost cuantificat prin metoda de excludere a albastrului de Tripan. Modificările morfologice ale MSC induse în urma tratamentului au fost analizate prin microscopie după marcarea cu iodură de propidiu și fluorescein diacetat. Evaluarea expresiei unor gene implicate în modularea morții celulare apoptotice și a răspunsului imunitar s-a realizat prin metoda qRT-PCR. Cuantificarea procentului de celule apoptotice și necrotice s-a realizat prin citometrie în flux, după marcarea celulelor MSC cu iodură de propidiu anexină V -FITC. Analiza producerii de citokine s-a realizat prin metoda ELISA, utilizând kituri specifice pentru detecția citokinelor: IL -1β, IL-8, IL-6, IL-10 și TNFα. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic cu softwarele GraphPad Prism, InStat (GraphPad) și Excel (Microsoft), utilizând teste Anova și T test. Valori ale lui P<0.05 au fost considerate semnificative.

#### **Determinarea procentului de celule viabile prin metoda excluderii colorantului albastru tripan**

În urma testului de excludere a colorantului albastru de tripan s-a observat că celulele MSC prezintă grade diferite de viabilitate în funcție de tratamentul la care au fost supuse și de timpul de interacțiune. Ca și densitate bacteriană s-a utilizat un inocul foarte scăzut (de 50-100UFC ml<sup>-1</sup>) pentru a mima cât mai eficient condițiile de infecție întâlnite *in vivo* și pentru a păstra condițiile experimentale utilizate în testele anterioare. Rezultatele obținute au arătat că în cazul utilizării unei culturi integrale diluate de *P. aeruginosa* PAO1, viabilitatea MSC este afectată în timp, procentul de celule viabile devenind mai mic decât cel de celule non-viabile după aproximativ 18h.

După utilizarea de corpi bacterieni (CB) și inactivați termic, sau supernatante (SN) sterile, rezultatele au arătat că aceste fracții de cultură au un efect foarte slab asupra viabilității celulelor MSC.

Supernatantele de cultură reduc viabilitatea celulară la cel mult 83%, în decurs de 18h, corpi bacterieni inactivați având un efect ne semnificativ (Tabelul 1).

Moleculile de semnalizare QS purificate s-au dovedit a avea efecte distincte în funcție de tipul lor și timpul de acțiune. Astfel, cel mai toxic compus este OdDHL, o concentrație de 50μM manifestându-și citotoxicitatea la două ore după tratament. S-a observat că efectul citotoxic al OdDHL este accentuat în timp, astfel încât dacă după 2 ore de tratament, procentul de celule viabile este de 81%, după 18h procentul de celule viabile va fi de 37%. Celălalt autoinductor AHL testat, C4HSL, s-a dovedit a avea un efect foarte slab asupra viabilității celulelor MSC, rat ele de supraviețuire în perioadele de timp testate fiind de cel puțin 90% (Tabelul 1).

Moleculile de semnalizare AQ au de asemenea un efect diferit asupra celulelor MSC. Efectul citotoxic al PQS pare a fi mai pronunțat comparativ cu efectul HHQ, însă devine evident după 18h de incubare. În timp ce procentul de celule MSC viabile în prezența PQS rămâne mai mare de 90% la 12h după tratament, la 18h procentul de celule viabile scade la 71%. HHQ are un efect citotoxic scăzut, cuantificarea ratelor de viabilitate celulară conferind procente mai mari de 93%, până la 12 h de tratament, iar la 18h procentul scade la 86%. Analiza comparativă a impactului moleculelor de semnalizare QS asupra viabilității MSC, a demonstrat că OdDHL manifestă efectul cel mai rapid, efectele fiind evidente imediat după administrare, pe când celelalte molecule de semnalizare manifestă un efect scăzut asupra viabilității celulelor MSC, sau efectul acestora apare după o perioadă mai îndelungă de tratament (Tabelul 1).

Tabelul 1. Procentele de viabilitate celulară observate prin colorare cu albastru tripan, în urma tratamentului monostratului celular MSC cu diferite fracții de cultură de PAO1 sau molecule de semnalizare purificate, pentru 2, 6, 12 și 18h. Monostraturile celulare tratate au fost incubate la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pentru 2, 4, 6 și 18h.

Condiție experimentală	Viabilitate în timp			
	2h	6h	12h	18h
<i>MSC ctrl.</i>	99%	99%	100%	99%
<i>Cultură integrală</i>	98%	92%	70%	42%
<i>Cultură integrală + 50μM NA</i>	98%	83%	65%	28%
<i>50μM NA ctrl.</i>	99%	99%	99%	99%
<i>Corpi bacterieni</i>	99%	99%	93%	88%
<i>Supernatant</i>	99%	92%	88%	83%
<i>50μM OdDHL</i>	81%	63%	55%	37%
<i>50μM C4HSL</i>	99%	99%	93%	90%
<i>50μM PQS</i>	99%	94%	91%	71%
<i>50μM HHQ</i>	99%	99%	93%	86%

### ***Evaluarea morfologiei celulare și determinarea procentului de celule viabile prin analiză microscopică***

Analiza microscopică a evidențiat faptul că tratamentul cu diferite fracții de cultură PAO1 determină modificări structurale ale celulelor MSC, acestea aderă la substrat și colorează diferit, relevând grade diferite de viabilitate. Monostraturile celulare au fost analizate la aceleași intervale de timp

ca în experimentul anterior, și anume 2, 6, 12 și 18h, însă fotografiile au fost realizate doar la 2 și 18h de tratament pentru a se evidenția efectul imediat sau pe termen lung al fracțiilor și moleculelor utilizate. Rezultatele au arătat că utilizarea unei culturi PAO1 integrale diluate nu determină nici un efect cuantificabil asupra celulelor MSC după 2 ore de cocultivare, însă la 18h de incubare se observă că celulele eucariote au o morfologie alterată, un procent semnificativ pierzând capacitatea de aderență la substratul inert (figura 1).

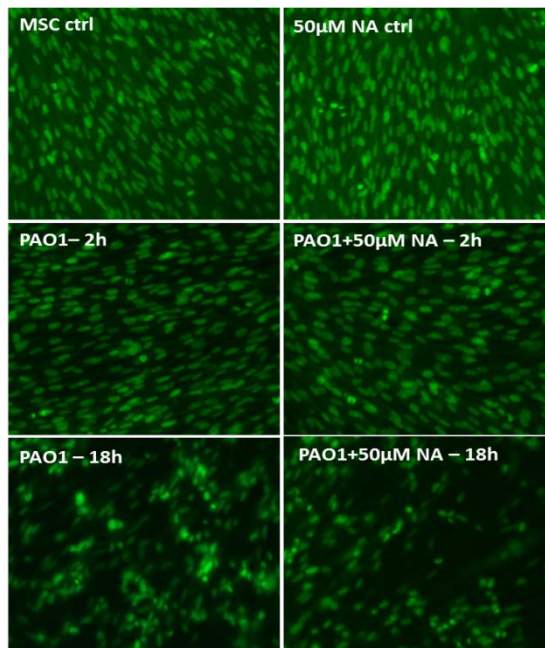


Fig. 1. Imagini de microscopie de fluorescență ale monostraturilor MSC cultivate în prezența culturilor integrale diluate de PAO1, în prezența sau absența a 50µM NA, pentru 2 sau 18h. 488 – FDA, Obiectiv cu Imersie, 100x.

După incubarea cu supernatante de cultură sau corpi bacterieni inactivați termic, celulele MSC nu par a suferi modificări structurale semnificative după o perioadă de până la 18h de expunere, exprimând o morfologie normală, similară cu a celulelor MSC control, netratate (Fig. 2). Aceste rezultate confirmă datele obținute în urma cuantificării procentului de celule viabile prin excluderea colorantului albastru tripan, demonstrând că fracțiile de cultură reprezentate de supernatante sterile și corpi bacterieni inactivați termic nu au un efect foarte pronunțat asupra viabilității celulelor MSC pentru cel puțin 18h de incubare.

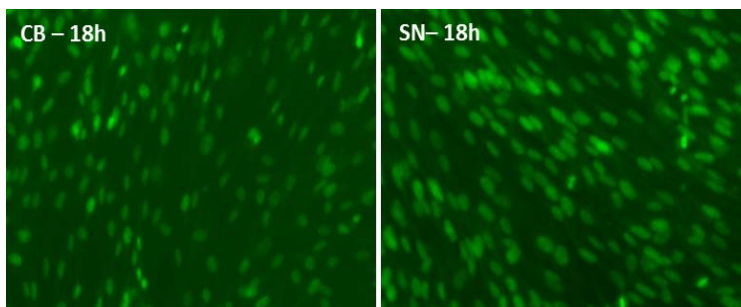


Fig. 2. Imagini de microscopie de fluorescență ale monostraturilor MSC cultivate în prezența supernatantului (SN) de cultură sau a corpurilor bacterieni (CB) timp de 18h. 488 – FDA, Obiectiv cu Imersie, 100x.

Rezultatele obținute după tratamentul monostratului de celule mezenchimale cu diferite molecule de semnalizare QS purificate au demonstrat că acestea acționează în mod diferit asupra viabilității și

morfologiei MSC, obținându-se efecte de intensități diferite, amplificate în timp. Astfel, OdDHL s-a dovedit a avea cel mai pronunțat efect asupra viabilității și arhitecturii celulelor MSC, afectând morfologia acestora după 2 ore de tratament. Celulele eucariote prezintă o morfologie alterată, devenind neregulate, cu aspect lamelar, evidențiindu-se și formațiuni de tipul pseudopodelor, ceea ce indică o interacțiune între OdDHL și citoscheletul celulelor MSC. În timp, fenotipul este puternic accentuat, o mare parte dintre celulele eucariote pierzând contactul cu substratul inert, devenind ne-aderente, ceea ce semnifică lipsa viabilității acestora după 18h de incubare. În plus, în urma marcării cu iodură de propidiu (PI) se observă că un mare procent dintre celulele ștate la substrat prezintă alterări ale permeabilității membranei, apărând colorate în roșu, cel mai probabil fiind celule non-viabile (Fig. 54).

Al doilea dintre autoinductorii cu structură homoserin lactonică testată C4HSL, s-a dovedit a avea un efect moderat asupra morfologiei celulelor MSC, însă fără a afecta în mod semnificativ viabilitatea celulară. Se poate observa că C4HSL induce apariția de formațiuni anormale în morfologia celulelor eucariote, de tipul lamelelor citoplasmatici și determină înmugurirea citoplasmei. Acest fenotip este deseori corelat cu apariția morții celulare apoptotice, în plus faptul că puține celule au permeabilitatea alterată, colorându-se în roșu după aplicarea PI, confirmă faptul că moartea celulelor nu este datorată necrozei, fiind mai degrabă de natură apoptotică (Fig. 3).

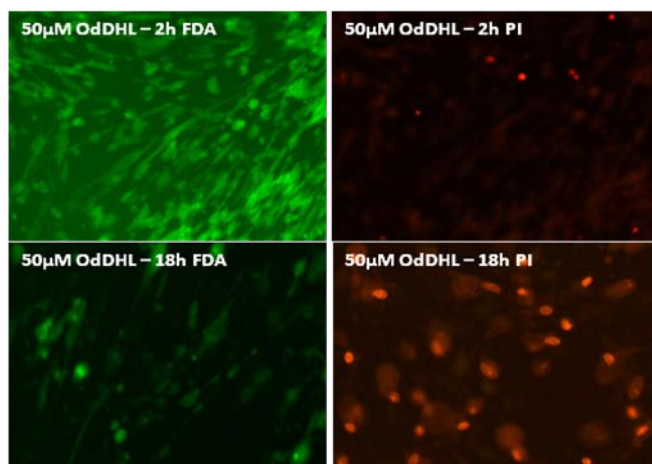


Fig. 3. Imagini la microscopul cu fluorescență ale monostraturilor MSC tratate cu 50μ M OdDHL, timp de 2 și 18h. FDA=marcare cu fluorescein diacetat (vizualizare la 488 nm), PI=iodură de propidiu (vizualizare la 546 nm). Obiectiv cu Imersie, 100x.

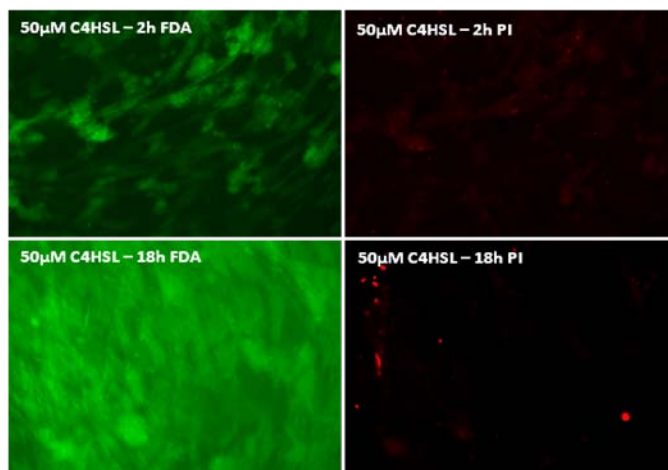


Fig. 4. Imagini la microscopul cu fluorescență ale monostraturilor MSC tratate cu 50 $\mu$ M C4HS L, timp de 2 și 18h. FDA=marcare cu fluorescein diacetat (vizualizare la 488 nm), PI=iodură de propidiu (vizualizare la 546nm). Obiectiv cu Imersie, 100x.

În cazul utilizării PQS, se observă un efect citotoxic ce apare la scurt timp după inițierea tratamentului (după 2h) și care va fi amplificat în timp. PQS alterează semnificativ morfologia și arhitectura celulelor MSC, favorizând pierderea contactului celulelor cu substratul celular și prin urmare moartea acestora. După 18h de tratament procentul de celule viabile aderente la substrat va fi vizibil mai mic decât procentul de celule moarte ce înglobează PI (Fig. 5).

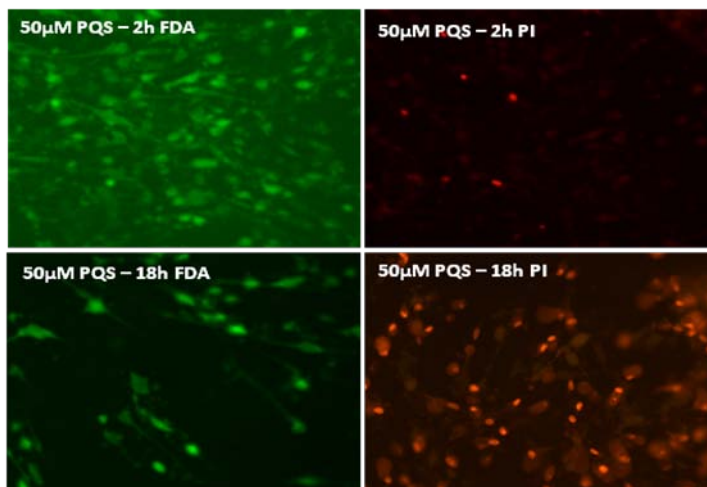


Fig. 5. Imagini la microscopul cu fluorescență ale monostraturilor MSC tratate cu 50 $\mu$ M PQS, timp de 2 și 18h. FDA=marcare cu fluorescein diacetat (vizualizare la 488 nm), PI=iodură de propidiu (vizualizare la 546nm). Obiectiv cu Imersie, 100x.

Rezultatele obținute după analiza celulelor MSC tratate cu 50 $\mu$ M HHQ arată că HHQ nu manifestă efecte evidente imediat după administrare, însă determină modificări ce indică o citotoxicitate înaltă după 18h de tratament. Acest rezultat nu se corelează cu rezultatul obținut în urma analizei viabilității celulare prin metoda excluderii colorantului vital albastru tripan, care arată că HHQ nu este un compus citotoxic nici după perioade îndelungate de tratament. Analiza microscopică demonstrează că după 18h de incubare, HHQ determină desprinderea masivă a celulelor de pe substratul inert, inducând în același timp modificări în permeabilitatea membranei celulelor, care se vor colora în prezența PI, însă nu și în prezența FDA (Fig. 6).

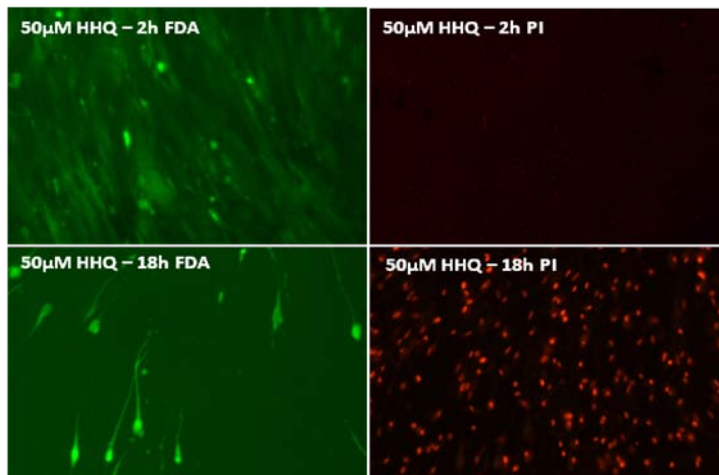


Fig. 6. Imagini la microscopul cu fluorescență ale monostraturilor MSC tratate cu 50μM HHQ, timp de 2 și 8h. FDA=marcare cu fluorescein diacetat (vizualizare la 488 nm), PI=iodură de propidiu (vizualizare la 546nm). Obiectiv cu Imersie, 100x.

### *Evaluarea procentului de celule viabile și non-viabile prin citometrie în flux*

Pentru discriminarea cât mai eficientă între procentul de celule viabile și non-viabile, însăși pentru separarea celulelor necrotice de cele apoptotice (cele două modalități majore de moarte celulară), s-a utilizat un kit comercial cu anexină V-FITC și iodură de propidiu (Sigma), urmărind instrucțiunile producătorului.

Pentru experimentele de citometrie în flux s-au utilizat numai supernatante de cultură și molecule de semnalizare QS purificate deoarece după infecția bacteriană, forma și mărimea celulelor eucariote sunt în general modificate, astfel încât rezultatele obținute sunt alterate și dificil de confirmat. Rezultatele au arătat că utilizarea supernatantelor de cultură nu determină modificări majore asupra viabilității celulelor MSC la 18h de incubare, procentul de celule necrotice fiind similar cu cel din cazul celulelor netratate, iar cel de celule apoptotice fiind slab crescut (Tabelul 2).

Tabelul 2. Procentele de celule MSC viabile, apoptotice și necrotice, obținute după incubare în prezența supernatantului de cultură (SN) sau a moleculelor QS purificate, timp de 18h la 37°C, atmosferă cu 5%CO<sub>2</sub>.

Colorație	MSC	SN	OdDHL	C4HSL	PQS	HHQ
Q1: FITC- , FL3_PI+	7,01	6,73	32,2	5,2	14,8	45,9
Q2: FITC+ , FL3_PI+	0,007	0,035	0,508	0,022	0,337	0,389
Q3: FITC+ , FL3_PI-	0,081	0,389	1,04	0,178	0,709	1,79
Q4: FITC- , FL3_PI-	92,9	92,8	66,2	94,6	84,1	51,9

În cazul utilizării moleculelor de semnalizare QS, rezultatele au arătat că acestea au un efect diferit asupra morții celulare MSC. Astfel, OdDHL s-a dovedit a avea un efect citotoxic pronunțat determinând moartea necrotică a unui procent de aproximativ 33% dintre celulele MSC. Apoptoza MSC este slab afectată, un procent de numai 1,6% dintre celule analizate fiind apoptotice (Fig. 7). De cealaltă parte, al doilea autoinductor AHL testat, C4HSL, nu are nici un efect asupra celulelor MSC, procentul de celule viabile fiind maxim, și anume 94,6%.

Analiza de citometrie în flux a dovedit că PQS are un efect moderat asupra viabilității MSC, inducând apariția unui procent de celule necrotice de 14,8%, pe când procentul de celule apoptotice înregistrează aproximativ 1,2%. HHQ s-a dovedit a avea cea mai pronunțată activitate, determinând o viabilitate celulară de 52%, mai scăzută decât cea înregistrată în cazul utilizării OdDHL (Tabelul 2). Cuantificarea viabilității/morții celulelor MSC a demonstrat că HHQ determină moartea necrotică a unui procent de 45,9% dintre celulele MSC tratate, moartea celulară apoptotică fiind înregistrată la un procent de 2,2% dintre celule (Fig. 7).

Cu toate că cercetări anterioare asupra moleculelor QS homoserin lactonice și a unor derivați structurali ai acestora, demonstrează ca OdDHL stimulează moartea celulară apoptotică în celule fagocitice, neavând un efect semnificativ pe celule epiteliale (Tateda și colab., 2003), rezultatele înregistrate în acest studiu demonstrează că în cazul celulelor mezenchimale OdDHL promovează preferențial moartea necrotică, în defavoarea apoptozei.

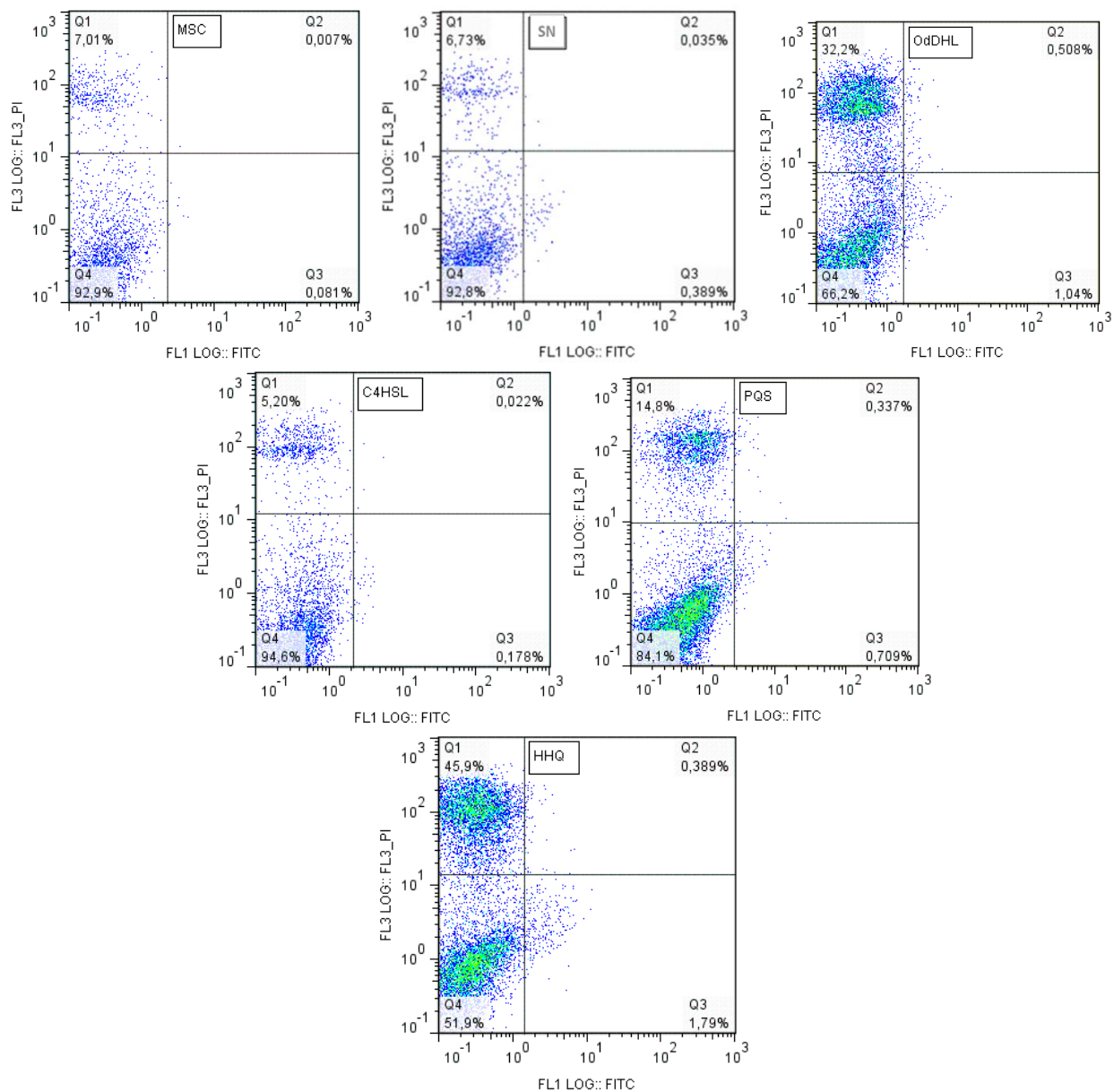


Fig. 7. Diagrame obținute în urma analizei rezultatelor de citometrie în flux a celulelor MSC cultivate în prezența a diferit e molecule QS timp de 18h la 37°C, atmosferă cu 5%CO<sub>2</sub>. MSC=control, celule MSC netratate, SN=celule MSC cultivate în prezența supernatantelor de PAO1, OdDHL= celule MSC cultivate în prezența a 50μM autoinductor OdDHL, C4HSL= celule MSC cultivate în prezența a 50μM autoinductor C4HSL, PQS= celule MSC cultivate în prezența a 50μM autoinductor PQS, HHQ= celule MSC cultivate în prezența a 50μM autoinductor HHQ. Q1=fereastra în care sunt cuprinse celulele necrotice, Q2=fereastra în care sunt cuprinse celulele apoptotice târzii, Q3=fereastra în care sunt cuprinse celulele apoptotice timpurii, Q4=fereastra în care sunt cuprinse celulele MSC viabile. Prelucrare cu CellQuest™ Pro.

În plus studiile asupra efectului mediatorilor AQ în modularea morții celulare sunt absente. Faptul că HHQ s-a dovedit o moleculă de semnalizare cu efect toxic asupra celulelor MSC este confirmat de rezultatele obținute în urma analizei microscopice. Aceste studii reprezintă prima dovadă a implicării moleculelor de semnalizare QS produse de *P. aeruginosa* în moartea celulelor stem mezenchimale.

### Evaluarea expresiei genice a unor gene implicate în modularea procesului apoptotic

Pentru a putea estima dacă fracțiile de *P. aeruginosa* testate induc modularea procesului apoptotic în celulele MSC, sau determină doar moarte celulară necrotică, nespecifică, s-a cuantificat nivelul de expresie al unor gene, atât cu efect pro-, câtși anti -apoptotic. Genele codificatoare pentru proteine antiapoptotice folosite în studiu sunt *bcl-2* și *relA*, iar genele codificatoare pentru proteine pro-apoptotice sunt *bax* și *caspaza9*. Gena GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenază) a fost utilizată ca referențial pentru normalizarea nivelului de expresie a genelor analizate.

Rezultatele au arătat că fracțiile de cultură utilizate au un efect diferit asupra morții celulare programate a celulelor MSC. Astfel, utilizarea de supernatanteși corpi bacterieni s -au dovedit a modula slab expresia tuturor genelor testate, însă fără a indica producerea unui proces apoptotic la 2, 6și 12h. Cu toate că după 18h expresia genelor este semnificativ alterată, nici în acest caz pattern-ul de expresie nu sugerează producerea unui proces apoptotic (Fig. 8). Utilizarea unei culturi integrale diluate de PAO1 s-a dovedit a avea un efect semnificativ asupra expresiei genice a genelor testate în toate punctele de timp. Astfel, dacă la 2și 6h efectul de inducere al apoptozei nu este evident, la 12 și 18h se poate observa supraexpresia genelor pro-apoptotice *bax* și *caspaza 9*, precumși inhibarea expresiei genelor anti -apoptotice *bcl-2* și *relA*. Modularea specifică a acestor gene cheie implicate în apoptoza celulelor eucariote prin inhibarea expresiei genelor anti-apoptotice și supraexpresia genelor pro -apoptotice, demonstrează implicarea *P. aeruginosa* în inducerea morții celulare programate în celule stem mezenchimale.

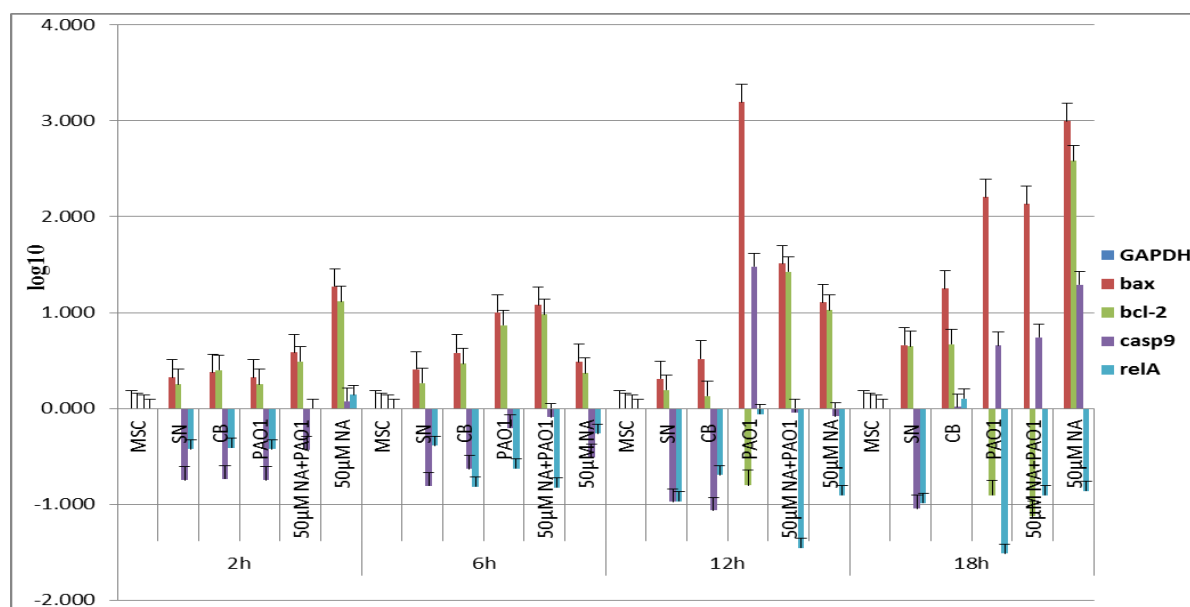


Fig. 8. Reprezentarea grafică a nivelului de expresie a genelor *bax*, *bcl-2*, *casp9* și *relA* pentru celulele MSC incubate în prezența a diferite fracții de cultură de *P. aeruginosa* PAO1, timp de 2, 6, 12 și 18h la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

S-a observat ca toate moleculele de semnalizare QS utilizate modulează expresia genică în celulele MSC, efectul lor fiind modificat în timp. OdDHL nu afectează drastic expresia genică la 2 ore după tratament, însă efectul său devine mai pronunțat în timp, astfel încât la 12și 18h *pattern*-ul de expresie al genelor testate sugerează inițierea unui proces apoptotic, genele *bcl-2* și *relA* fiind repressate, pe când *bax* și *caspaza9* sunt supraexprimate (Fig. 9). Aceste rezultate arată că OdDHL ar putea modula moartea celulară apoptoticăși în celulele stem mezenchimale, în mod similar cu activitatea sa asupra celulelor fagocitice ale gazdei. C4HSL determină de asemenea modularea expresiei genice a genelor testate, efectul



acestui autoinductor fiind modificat în timp. Dacă la 2 și 6h expresia genelor *bax* și *bcl-2* este supraexprimată, iar a *casp9* și *relA* este inhibată, după 18h expresia tuturor genelor testate este puternic repressată. În ciuda acestor modificări evidente ale expresiei genice, *pattern*-urile de expresie nu indică însă desfășurarea unui proces apoptotic. Autoinductorii quinolonici PQS și HHQ au demonstrat efecte similare asupra expresie genice, în mod corelativ cu *pattern*-ul de expresie obținut în urma utilizării C4HSL, rezultatele obținute neputând fi atribuite inducerii unui proces apoptotic (Fig. 9).

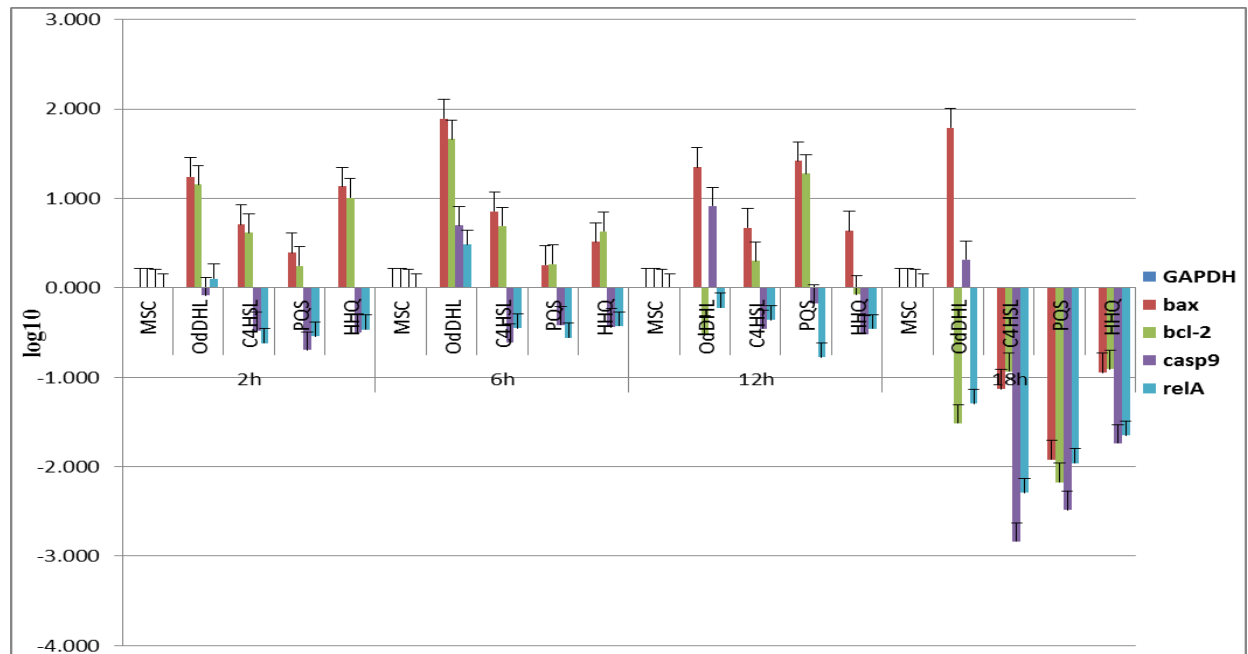


Fig. 9. Reprezentarea grafică a nivelului de expresie genelor *bax*, *bcl-2*, *casp9* și *relA* pentru celulele MSC incubate în prezența a diferite molecule de semnalizare QS produse de *P. aeruginosa* PAO1, timp de 2, 6, 12 și 18h la 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

În afara influenței pe care infecția cu *P. aeruginosa* sau simpla prezență a moleculelor QS pseudomonadale o determină asupra viabilității celulelor gazdă, un alt aspect investigat în prezent este impactul acestora asupra răspunsului imunitar al gazdei.

#### **Impactul diferitelor fracții de cultură și a unor molecule de semnalizare purificate asupra profilului secretor al celulelor mezenchimale**

Dintre toate moleculele de semnalizare QS produse de *P. aeruginosa*, numai rolul OddDHL în modularea răspunsului imunitar al gazdei a fost raportat. Se pare că OddDHL are proprietatea de a stimula într-o manieră dependentă de doză producerea de interleukină-8 (IL-8) de către celule respiratorii epiteliale, stimulează secreția de imunoglobulină E (IgE) de către limfocite B umane și inhibă producerea de IL-12 și TNF- $\alpha$  de către macrofage peritoneale aderente. În plus, poate avea activitate mitogenică (Smith și colab., 2001; 2002). Cu toate acestea, nu există date experimentale care să demonstreze efectul OddDHL asupra profilului secretor al celulelor stem mezenchimale, sau modul de acțiune al acestei molecule în timp, precum nu s-a raportat nici efectul autoinductorilor AQ sau a altor mediatori QS AHL.

Analiza nivelului TNF $\alpha$  produs de celulele MSC cultivate în prezența a diferite fracții de cultură a demonstrat că această chemokină nu este secretată în culturile de MSC în condițiile experimentale testate. Toate valorile obținute în urma cuantificării concentrațiilor de TNF $\alpha$  în supernatantele de cultură testate s-au dovedit a fi negative. Rezultatele au fost validate în urma analizei curbei standard, valorile obținute încadrându-se între limitele recomandate de producătorul trusei de detecție (Fig. 10).

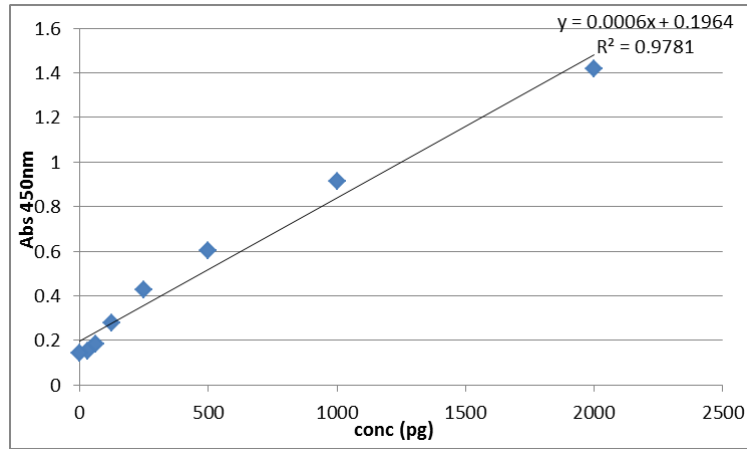


Fig. 10. Representarea grafică a analizei curbei standard pentru TNF $\alpha$  în vederea obținerii ecuației de calcul a concentrației (în pg) din probelor analizate.

TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*) este o citokină implicată în inflamația sistemică ce aparține grupului de citokine stimulate în reacția de fază acută. Rolul primar al TNF $\alpha$  este în reglarea celulelor imunitare. Fiind un pirogen endogen determină apariția febrei, moartea celulară apoptotică și apariția inflamației și inhibarea tumorigenezei, precum și replicarea virală, alterând producerea de IL1 și IL6 (Locksley și colab., 2001).

Evaluarea producerii de IL-1 $\beta$ , o citokină proinflamatorie cu rol în chemotaxia neutrofililor, a demonstrat că în supernatantele culturilor MSC cultivate în prezența supernatantelor de PAO1, a corpilor bacterieni inactivați și a culturilor bacteriene integrale diluate, concentrația acestora este neafectată timp de până la 12h de cultivare, fiind însă produsă în exces la 18h (fig. 11).

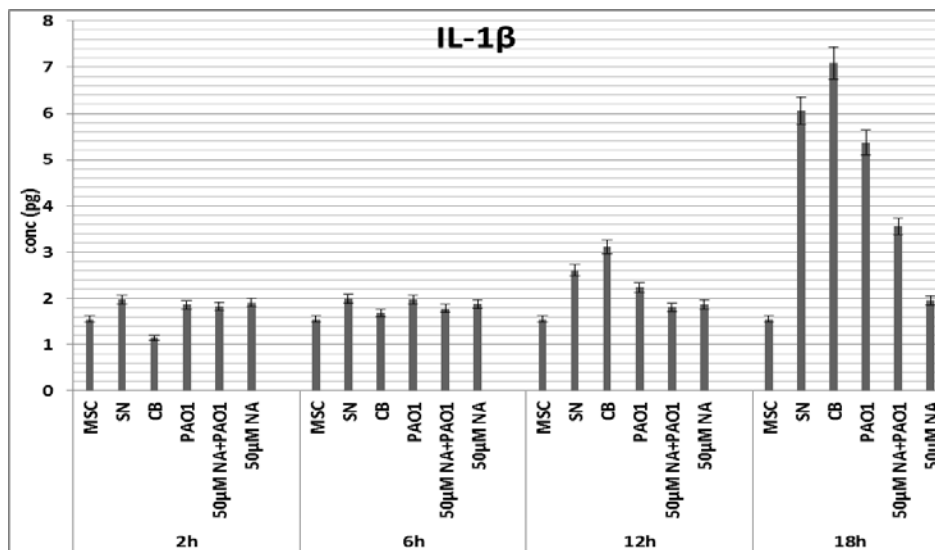


Fig. 11. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție IL-1 $\beta$  în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența a diferite fracții de cultură de *P. aeruginosa* PAO1. SN=supernatant, CB=corpi bacterieni inactivați termic, PAO1=cultură bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup>.

Analiza culturilor MSC tratate cu molecule de semnalizare QS a demonstrat în schimb că nici unul dintre autoinductorii testați nu determină modificări semnificative ale *pattern*-ului de secreție a IL-

IL-1 $\beta$ . Astfel, în toate cazurile se poate observa menținerea constantă a unor concentrații relativ uniforme de IL-1 $\beta$ , similare controlului netratat, la toate perioadele de timp în care s-a efectuat cuantificarea (Fig. 12).

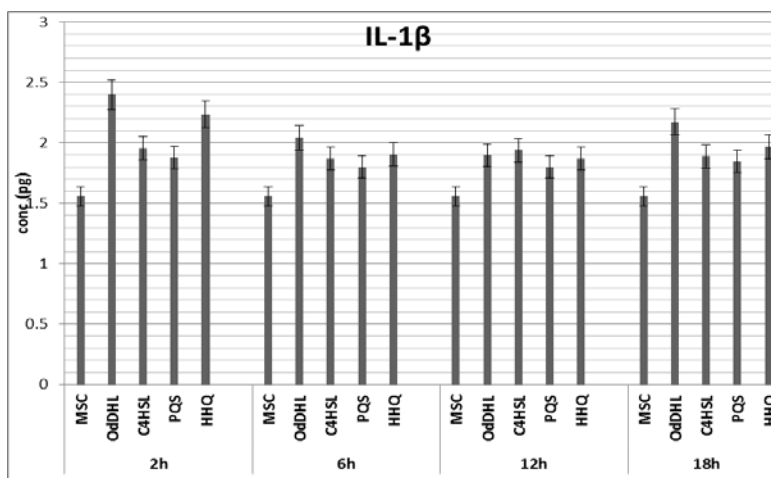


Fig. 12. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL-1 $\beta$  în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența unor concentrații de 50 $\mu$ M de OddHL, C4HSL, PQS și HHQ.

IL-1 $\beta$  este produsă de către macrofagele activate ca o pro-proteină, ce va fi ulterior procesată proteolitic de către caspaza 1 (CASP1/ICE). Această citokină este un mediator important al răspunsului inflamator, fiind implicată într-o varietate de activități celulare, precum proliferare celulară, diferențiere și apoptoză (Smirnova și colab., 2003).

Cuantificarea concentrației de IL-8 secretată în supernatantele de celule MSC a dovedit că utilizarea de supernatante de cultură bacteriană determină reducerea concentrației de citokină secretată, efectul fiind constant în timp. Utilizarea de corpi bacterieni inactivați termic nu determină modificări semnificative în concentrația de IL-8 secretată după 2-6h de cultivare, însă reduc semnificativ concentrația acesteia la 12 și 18h. În schimb, în urma utilizării de culturi bacteriene integrale diluate de *P. aeruginosa* se observă că acestea nu produc efecte evidente asupra secreției de IL-8 la mai puțin de 12 ore de cocultivare, însă la 18h determină o reducere pronunțată a concentrației de citokină (fig 13).

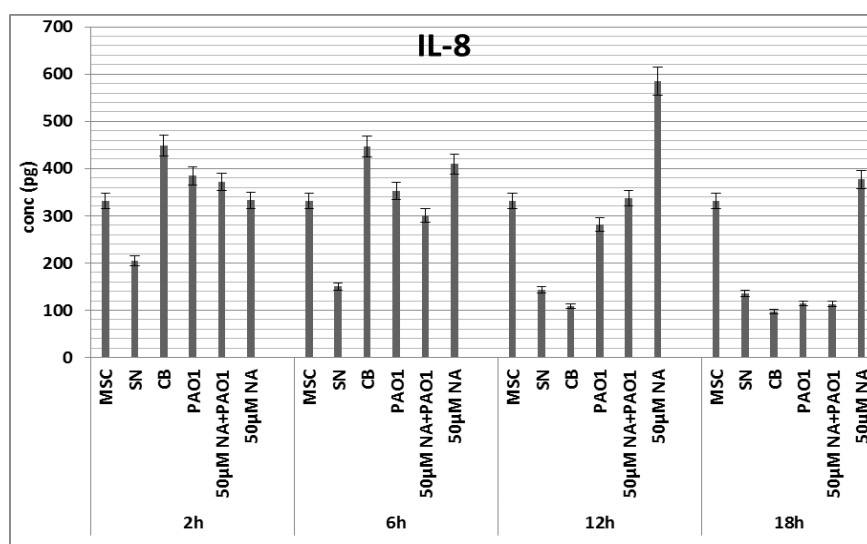


Fig. 13. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL-8 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența a diferite fracții de cultură de *P. aeruginosa* PAO1. SN=supernatant, CB=corpi bacterieni inactivați termic,

PAO1=cultură bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup>, 50μM NA+ PAO1= cultură bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup> și 50μM NA, 50μM NA=control de NA în cultură MSC sterilă.

Evaluarea efectului moleculelor de semnalizare asupra secreției IL -8 în supernatantele culturilor de celule mezenchimale a demonstrat că toate moleculele utilizate determină o suprasecreție de IL-8, concentrația de citokină produsă în timp nefiind semnificativ afectată (Fig. 14).

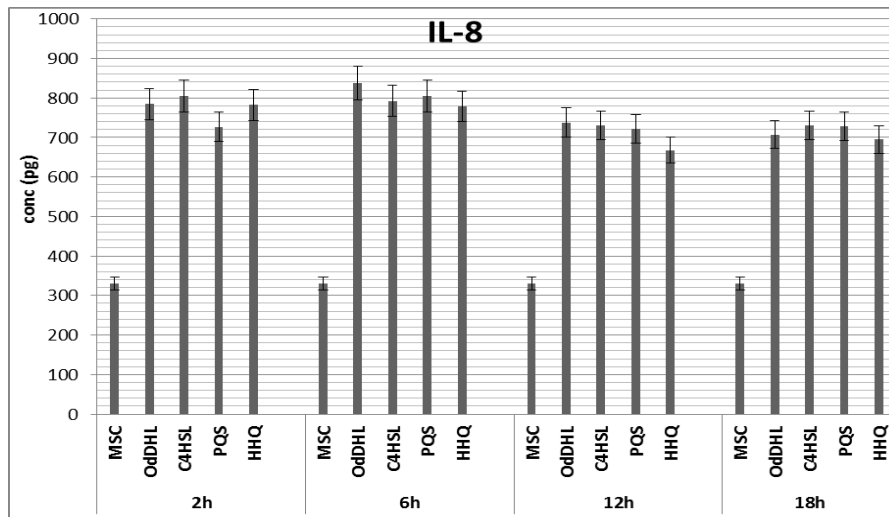


Fig. 14. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL -8 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența unor concentrații de 50μM de OdDHL, C4HSL, PQS și HHQ.

În cazul cuantificării secreției de IL -6, s-a observat că utilizarea de supernatante de corpi bacterieni nu determină un efect pronunțat asupra secreției de IL -6 la 2 și 6h, însă scad dramatic producerea acestei citokine după 12 ore de expunere. Utilizarea unei culturi de PAO1 integrale diluate nu determină un efect clar asupra secreției IL -6 decât după 18h de cocultivare, însă efectul PAO1 asupra acestui fenotip este modulat de prezența NA, care stimulează producerea de IL-6 după 6 ore de tratament a coculturii (Fig. 15).

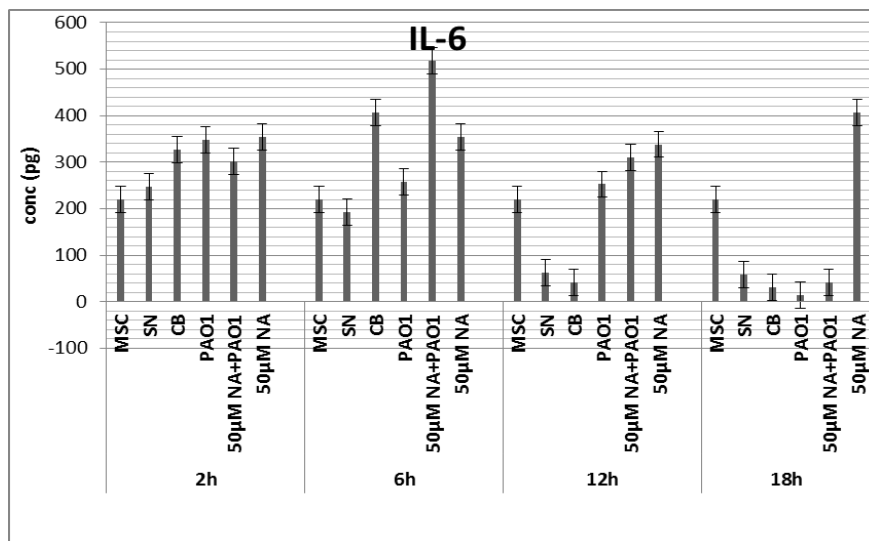


Fig. 15. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL -6 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența a diferite fracții de cultură de *P. aeruginosa* PAO1. SN=supernatant, CB=corpi bacterieni inactivi termic,

PAO1=cultura bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup>, 50μM NA+ PAO1= cultura bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup> și 50μM NA, 50μM NA=control de NA în cultură MSC sterilă.

Cuantificarea producerii de IL-6 în supernatantele de celule eucariote cultivate în prezența moleculelor de semnalizare QS a arătat că acestea au efecte distincte asupra secreției de IL-6. Astfel, PQS manifestă cel mai pronunțat efect asupra IL-6, stimulând secreția acesteia. PQS determină o activare timpurie a producerii de IL-6, determinând suprasecreția acestei chemokine după 2 ore de cultivare. Efectul PQS este însă diminuat în timp, devenind ineficient după 18h de incubare, probabil datorită degradării moleculei de către celulele gazdă. Și HHQ, precursorul molecular al PQS, determină o activare timpurie a secreției de IL-6, însă efectul său nu este atât de evident precum al PQS, fiind estompat mai rapid în timp. OddDHL stimulează de asemenea secreția IL-6, însă efectul său devine evident numai după cel puțin 6h de cultivare, acționând astfel mai lent decât PQS. C4HSL nu are nici un efect evident asupra secreției IL-6 în supernatantele culturilor de celule mezenchimale în nici una dintre perioadele de timp testate (Fig. 16).

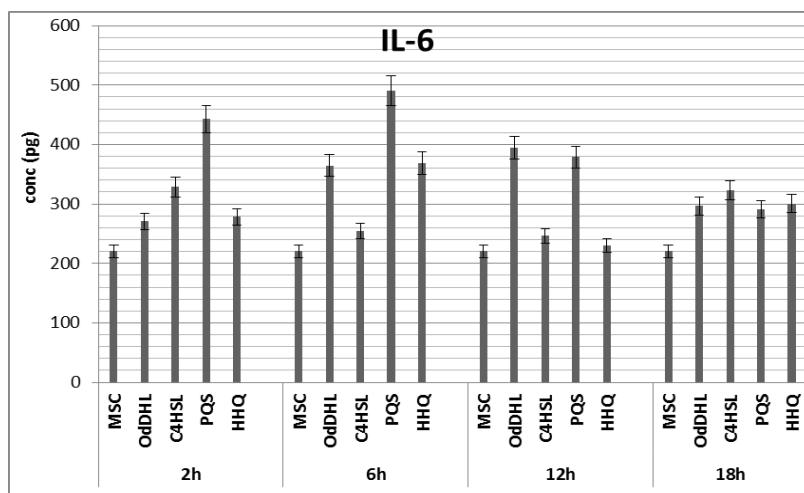


Fig. 16. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL-6 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența unor concentrații de 50μM de OddDHL, C4HSL, PQS și HHQ.

Producerea de IL-10, s-a dovedit a fi influențată semnificativ de cultivarea celulelor MSC în prezența corpurilor bacterieni inactivați. Aceștia stimulează puternic secreția de IL-10 imediat după adăugarea lor în mediul de cultură, iar efectul stimulator este menținut timp de cel puțin 18 h. Utilizarea unei culturi integrale de PAO1 nu determină un efect detectabil asupra secreției de IL-10 decât după 18h de co-cultivare. Interesant este faptul că prezența NA anulează complet efectul PAO1 asupra stimulării producerii de IL-10. Utilizarea de supernatante bacteriene s-a dovedit a fi ineficientă în determinarea unui efect asupra producerii de IL-10 la toate intervalele de timp testate (Fig. 17).

Moleculele de semnalizare QS au demonstrat efecte distincte și în cazul alterării producerii IL-10. Astfel, OddDHL și C4HSL au un efect slab stimulator asupra secreției IL-10 în supernatantele de culturi MSC imediat după adăugare, acest fenotip fiind însă absent după 6 ore de cultivare. HHQ s-a dovedit a avea un efect foarte puternic asupra producerii de IL-10, stimulând cu mai mult de 20 ori secreția acestei citokine în mediul de cultură. În plus efectul HHQ se menține până la aproximativ 12 ore, fiind atenuat la 18h de cultivare. PQS nu determină nici un efect asupra secreției de IL-10 (Fig. 18). Acest rezultat evidențiază că rata de degradare a HHQ este mai mică comparativ cu rata de degradare a PQS, ceea ce favorizează menținerea efectului său timp mai îndelungat.

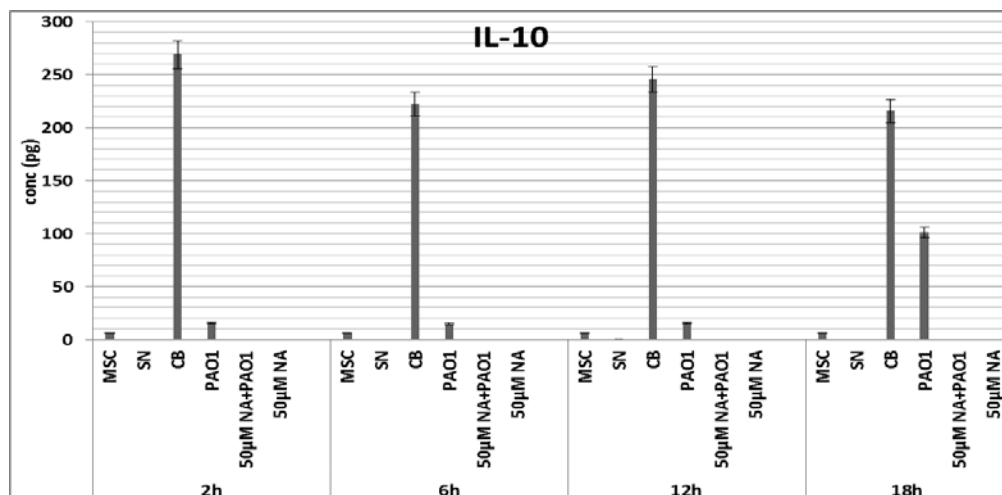


Fig. 17. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL-10 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența a diferite fracții de cultură de *P. aeruginosa* PAO1. SN=supernatant, CB=corpi bacterieni inactivați termic, PAO1=cultură bacteriană integrală diluată până la 50-100 UFC ml<sup>-1</sup>.

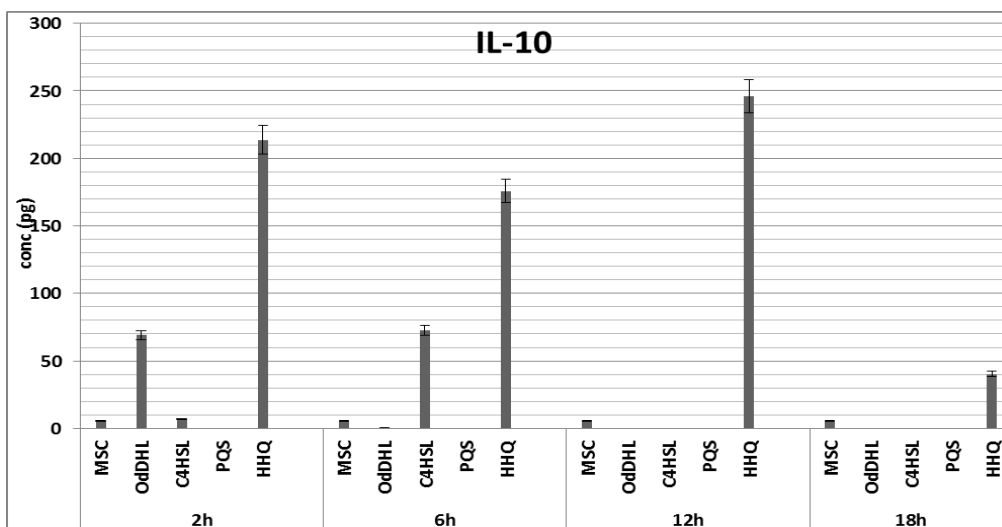


Fig. 18. Evaluarea comparativă a profilurilor de secreție a IL-10 în supernatantele de culturi de celule mezenchimale cultivate în prezența unor concentrații de 50µM de OdDHL, C4HSL, PQS și HHQ.

## Concluzii

Rezultatele obținute au demonstrat că anumite frecții de cultura și molecule de semnalizare QS produse de *P. aeruginosa* manifestă efecte distincte asupra celulelor gazdă, iar fenotipurile determinate pot fi influențate de timpul de acțiune.

Studiul și rezultatele obținute privind efectul *P. aeruginosa* și al moleculelor de semnalizare QS asupra viabilității și profilului secretor al celulelor gazdă pe un model experimental reprezentat de celule mezenchimale *in vitro*, investigate la nivel fenotipic și molecular reprezintă o premieră internațională în literatura de specialitate.

Utilizând acest model s-a demonstrat că OdDHL are efectul cel mai pronunțat asupra viabilității și răspunsului citokinic al celulelor mezenchimale în cultură, rezultatele obținute fiind similare cu cele raportate de alte grupuri de cercetare pe alte tipuri de celule eucariote.

În plus, și autoinductorii quinolonici PQSHHQ pot afecta în mod semnificativ căi de semnalizare ale celulelor gazdă implicate în modularea răspunsului celular, precum și a răspunsului imun proinflamator, ca și anti-inflamator.

### ***Bibliografie***

1. Borthwick LA, Sunny SS, Oliphant V, Perry J, Brodli M, Johnson GE, Ward C, Gould K, Corris PA, De Soyza A, Fisher AJ. *Pseudomonas aeruginosa* accentuates epithelial-to-mesenchymal transition in the airway. *Eur. Respir. J.*, 37(5):1237-47, 2011.
2. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.*, 71:5785–5793, 2003.
3. Smith RS, Rodney K, Iglewski BH, Phipps RP. The *Pseudomonas* Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Induces Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Production in Human Lung Fibroblasts: Implications for Inflammation. *J. Immunol.* 169:2636-2642, 2002.
4. Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B and activator protein-2. *J. Immunology* 167(1):366–374, 2001.
5. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* 104 (4): 487–501, 2001.
6. Smirnova MG, Kiselev SL, Gnuchev NV. Role of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8 in the pathogenesis of the otitis media with effusion. *Eur. Cytokine Netw.* 13 (2): 161–72, 2003.

## Lucrari publicate pina in prezent, cu suportul acestui grant:

### Conferinte internationale

#### 2013

1. P1123 In vitro study of the influence of potato shoot lectins on the expression of bacterial virulence factors and adherence capacity. F. Iordache\*, A. Holban, C. Chifiriuc, V. Lazar, C. Curutiu, A. Pop (Bucharest, RO) . ECCMID 2013
2. P1154 The impact of the neuroendocrine stress hormone noradrenaline on the physiology of *Pseudomonas aeruginosa*. A.M. Holban\*, S. Heeb, M.C. Chifiriuc, V. Lazar, P. Williams (Bucharest, RO) 2013
3. R2567 Influence of subinhibitory concentrations of phenyl lactic acid and its synergistic activity with antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains. L. Ditu\*, L. Marutescu, G. Mihaescu, V. Lazar, M. Chifiriuc (Bucharest, RO)
4. P1664 Subinhibitory concentrations of organic acids produced by a probiotic culture reduce the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. A.I. Cotar, C. Saviuc, M.C. Chifiriuc, I. Czbor\*, V. Lazar (Bucharest, RO)

#### 2012

5. Qualitative and quantitative assessment of *Drosophila melanogaster* native microbiota. The 35th International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED). Valencia, Spain, May 15th - 17th, 2012. Al. Ecovoiu, Attila Cristian Ratiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc
6. Holban AM, Heeb S, Chifiriuc MC, Lazar V, Williams P. The impact of the neuroendocrine stress hormone noradrenaline on the physiology of *Pseudomonas aeruginosa*. 23rd ECCMID, Berlin, Germany –author principal. conferinta internationala indexata ISI. 2012, 26-30.04.2013
7. Ani Ioana Cotar, Mariana Carmen Chifiriuc , Alina-Maria Holban, Crina Saviuc, Coralia Bleotu, Veronica Lazar. Real-time qRT-PCR evaluation of HeLa cells apoptosis
8. induced by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules. 2012, 22rd ECCMID, 31 march-3 april, London, UK.
9. Ani Cotar, M.C. Chifiriuc, D. Pelinescu, L. Olariu, V. Lazar. The inhibitory activity of organic acids produced by probiotic culture filtrate on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* virulence factors expression. The 35th International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED) May 15th - 17th, 2012, Valencia, Spain

#### 2011

10. Cotar A.I., Chifiriuc M.C., Holban A., Popa M., Banu O., Lazar V. P 1752 Virulence patterns of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains associated with different clinical infections. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Milan, CMI, vol. 17, S4: p/ 400-401

### Conferinte nationale cu participare internationala

#### 2012



1. Alina Maria Holban, Mariana Carmen Chifiriuc, Veronica Lazăr. The role of catecholamine stress hormones in *Pseudomonas aeruginosa*-host communication. *Rom. Archiv. of Microbiol. and Immunol.*, 2012, 71(3):140-141. –prezentare orală: autor principal, conferința națională.
2. *Drosophila melanogaster*, model eucariotpentru studiul interacțiilor gazdă-parazit în infecții experimentale cu *Pseudomonas aeruginosa*. Conferința Diaspora 2012. Alexandru Al. Ecovoiu, Attila Cristian Rătiu, Ilda Czobor, Mariana Carmen Chifiriuc

#### 2011

3. Cotar A.I., Chifiriuc M.C., Israil A.M., Borcan E., Banu O. Molecular markers of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* nosocomial strains. National Microbiology Meeting 10-12.11.2011, Abstract published in *Bact. Virusol. Parasitol. Epidemiol.*, 2011, Suppl. 56

**Articole publicate în reviste ISI care conțin parțial rezultate obținute prin desfășurarea proiectului Idei 154/2011, și care menționează codul proiectului la Acknowledgements**

#### 2013

1. Curutiu C., Chifiriuc M. C., Mitache M. *Pseudomonas aeruginosa* -Eukaryotic Cell Crosstalk: Mediators, Mechanisms and Implications for the Antimicrobial Therapy *Current Organic Chemistry*, 2013, 17 (2), 149-154.
2. Cotar A., Saviuc C., Nita A., R., Bezirtzoglou E., Lazar V., Chifiriuc, C. M.C. Anti-pathogenic Strategies for Fighting *Pseudomonas aeruginosa* Infections- probiotic Soluble Compounds as Inhibitors of Quorum Sensing Genes Expression *Current Organic Chemistry*, 2013, 17 (2), 155-161.
3. Ion Anghel, Carmen Limban, Alexandru M Grumezescu, Alina G Anghel, Coralia Bleotu and Mariana C Chifiriuc, *In vitro* evaluation of anti-pathogenic surface coating nanofluid, obtained by combining Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/C12 nanostructures and 2-((4-ethylphenoxy)methyl)-N-(substituted-phenylcarbamothioyl)-benzamides, *Nanoscale Research Letters* 2012, 7:513
4. Limban C., Grumezescu M.A., Chirea M., Matei L., Chifiriuc M.C. Antimicrobial Potential of Benzamides and Derived Nanosystems for Controlling *in vitro* Biofilm Development on Medical Devices *Current Organic Chemistry*, 2013, 17 (2), 162-175.

#### 2012

5. Carmen Limban, Alexandru Grumezescu, Crina Saviuc, Georgeta Voicu, Carmen Chifiriuc, Optimized anti-pathogenic agents based on core/shell nanostructures and 2-((4-ethylphenoxy)methyl)-N-(substituted-phenylcarbamothioyl)-benzamides, *International Journal of Molecular Science*, 13, 12584-12597, 2012
6. Carmen Mariana Chifiriuc, Alexandru Mihai Grumezescu, Crina Saviuc, Cristina Croitoru, Dan Eduard Mihaiescu, Veronica Lazar, Improved antibacterial activity of cephalosporins loaded in magnetic chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 436, Issues 1–2, 15 October 2012, Pages 201-205; doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.031, 2012
7. Alexandru Mihai Grumezescu, Ecaterina Andronescu, Anton Ficaș, Coralia Bleotu, Dan Eduard Mihaiescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Synthesis, characterization and *in vitro*

assessment of the magnetic chitosan-carboxymethylcellulose biocomposite interactions with the prokaryotic and eukaryotic cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 436 (2012) 771– 777.

8. Paul Catalin, Ecaterina Andronescu, Alexandru Mihai Grumezescu, Anton Fikai, Keng-Shiang Huang, Chih-Hui Yang, Yung-Sheng Lin, Carmen Mariana Chifiriuc, Fabrication, characterization and *in vitro* profile based interaction with eukaryotic and prokaryotic cells of alginate-chitosan-silica biocomposite. *International Journal of Pharmaceutics*, 10.1016/j.ijpharm.2012.10.045, 2012
9. Grumezescu A. M., A. Fikai, D. Fikai, G. Prdean, M. C. Chifiriuc, Polymeric magnetic silica microspheres as a drug loader for antimicrobial delivery substances, *Digest Journal of Nanomaterials and Biosstructures*, Vol. 7, No. 4, October-December 2012, p. 1891-1896.

### **Articole BDI**

#### **2013**

1. Holban A.M., Chifiriuc M.C., Lazăr V. Host cells response in *Pseudomonas aeruginosa* infections-role of quorum sensing African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(21), 2420-2429.
2. Holban AM, Chifiriuc MC, Cotar AI, Bleotu C, Grumezescu AM, Banu O, Lazar L: Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. Romanian Biotechnological Letters, acceptat, 2013.

#### **2012**

3. Alexandru Mihai Grumezescu, Ecaterina Andronescu, Anton Fikai, Denisa Fikai, Keng-Shiang Huang, Irina Gheorghe, Carmen Mariana Chifiriuc. Water soluble magnetic biocomposite with potential applications for the antimicrobial therapy. *Biointerface Res Appl Chem* 2012, 6(2): 469-375

### **Capitole carte**

1. Holban AM, Coralia B, Chifiriuc MC and Lazar V. Control of bacterial virulence by cell-to-cell signalling molecules. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Microbiology Book Series – 2013 Edition, Badajoz (Spain), (acceptat spre publicare in 12.06. 2013

### **Carti**

1. Israil A., Chifiriuc C., Palade G., Cotar A., Clinical and bacteriological aspects of bacterial infections associated to abdominal surgical emergencies. *Ars Docenti Publ. House*. 150 pag., 2013, ISBN 978-973-558-664-5