

INTOXICAȚIA CU UNELE PESTICIDE INDUCE ELIBERAREA CITOCROMULUI C ȘI FRAGMENTAREA ADN ÎN CULTURI DE CELULE UMANE HUH 7

Eugeniu Simionică*, C. Munteanu**, R. Huculeci**, A. Dinischiotu**

*USMF „N. Testemițanu” Catedra Biochimie și Biochimie Clinică; **Universitatea din București, Facultatea de Biologie, Catedra Biochimie

Summary

Intoxication with some pesticides induce release of cytochrome C and DNA fragmentation in human cell line Huh 7

Lindane and deltamethrin are insecticides with very large utilization in agriculture and public health which are dangerous contaminants for human organism. We studied the capacity of lindane and deltamethrin to induce release of cytochrome C and DNA fragmentation in human cell line Huh 7, as a possible mechanism of toxicity. Our results suggest that intoxication with lindane and deltamethrin induce biochemical modifications related to apoptosis.

Rezumat

Lindanul și deltametrinul sunt insecticide pe larg utilizate în agricultură și sănătate publică, periculoase ca contaminanți pentru organismul uman. Noi am studiat capacitatea acestor insecticide de a provoca eliberarea citocromului c și fragmentarea ADN în culturi de hepatocite umane transformate Huh7, ca un posibil mecanism al toxicității lor urmat de declansarea procesului apoptotic. Rezultatele obținute, sugerează că intoxicația cu aceste pesticide induce modificările biochimice caracteristice apoptozei.

Întroducere

Apoptoza și stresul oxidativ sunt asociate cu expunerea la pesticide și alte substanțe toxice. Multe cercetări indică că expunerea la pesticide poate determina creșterea nivelului radicalilor liberi care pot induce apoptoza [1,2]. Radicalii liberi influențează expresia genelor, reglează răspunsul celular la acțiunea citokinelor, precum și evenimentele legate de proliferarea celulelor. Toate aceste evenimente sunt ținte ale apoptozei [3,5,7].

O posibilă legătură între speciile ROS și apoptoză poate lua naștere în timpul unor intoxicații grave cu pesticide. În aceste cazuri în celule sunt activate ciclurile redox în care are loc degradarea pesticidelor și generarea speciilor ROS, ca anionul superoxid, peroxidul de hidrogen, radicalul hidroxil [5, 14]. Aceste specii reactive pot interacționa cu proteinele și lipidele membranei mitocondriale perturbând permeabilitatea și provocând deschiderea canalelor membranare cunoscute sub numele de pori de permeabilitate tranzitorie PTP (*permeability transition pore*). Deschiderea neselectivă a acestor canale, ca urmare a unui stimul citotoxic, poate provoca pătrunderea necontrolată a apei și ionilor în mitocondrie determinând o expansiune a volumului matriceal și ruperea membranei mitocondriale externe ce permite ieșirea citocromului C (cyt C) în citosol. Odată eliberat în citoplasmă, cyt C se va asocia cu proteina Apaf-1 și apoi cu procaspaza 9 formând apoptozomul [8,10]. Caspaza 9 activează alte caspaze ceea ce conduce la o activitate proteolitică intensă ce implică digestia proteinelor structurale în citoplasmă, inactivarea proteinelor care apară organismul de apoptoză (ICAD, Bcl-2), activarea endonucleazelor (CAD) care provoacă fragmentarea ADN și în final apoptoza.

Experimente efectuate pe culturi de celule, indică capacitatea multor pesticide de a induce apoptoza. În lucrarea de față sa studiat capacitatea inducerii apoptozei de intoxicația cu insecticidele deltametrin și lindan în culturi de hepatocite umane transformate Huh 7 (human hepatocarcinome).

Deltametrinul reprezintă un insecticid piretroid (Fig. 1, A) sintetizat în 1974 și este utilizat în agricultură pentru tratarea culturilor de bumbac (45% din consumul total), de cafea, porumb și alte cereale, fructe, legume, precum și a produselor depozitate. De asemenea este utilizat în zootehnie, medicina veterinară și sănătate publică. Intoxicația cu deltametrin la oameni a generat: ataxie, convulsii ce au dus la paralizii musculare, dermatite, edeme, diaree, dispnee, dureri de cap, iritabilitate, tremor, vomă și chiar moarte datorită stopării respirației [13].

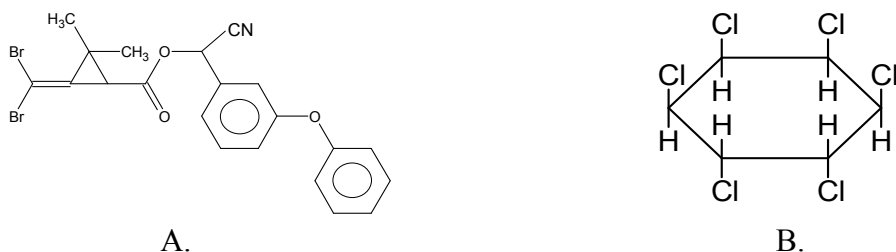


Fig.1 Formulele de structură ale deltametrinului (A.) și lindanului (B.)

Lindanul este un insecticid și fumigant care din punct de vedere chimic, reprezintă un compus organic clorurat cu denumirea sistemică de 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexan sau γ -hexaclorociclohexan (Fig.1, B). Din 1949, lindanul este folosit pe scară largă împotriva diferitelor insecte dăunătoare în agricultură, industrie alimentară, sănătate publică și împreună cu fungicidele ca agent de tratare a semințelor. Este component al loțiunilor, cremelor și șampoanelor pentru controlul păduchilor și scabiei la om. La om simptomele intoxicației sunt legate de expunerea ambientală cronică și sunt caracterizate prin pierderea echilibrului, cariarea dinților și hiper-iritabilitate. Loțiunile ce conțin 10% lindan, aplicate pentru prevenirea scabiei la copii pot avea consecințe severe. Biochimic lindanul este implicat în dereglările homeostaziei ionilor de Ca^{2+} datorită analogiei structurale cu inozitolul, poate induce peroxidarea lipidelor membranare și modificarea activității enzimelor antioxidative urmată de declanșarea procesului apoptotic [13,14].

Scopul acestei lucrări a fost stabilirea capacității insecticidelor deltametrin și lindan de a iniția eliberarea cyt C și fragmentarea ADN în culturi de hepatocite umane transformate Huh 7 – evenimente moleculare importante în aprecierea leziunilor provocate de intoxicații capabile de a induce moartea celulară prin apoptoză.

Materiale și metode

Model de studiu *in vitro*. Studiul a fost realizat pe culturi de hepatocite umane transformate, Huh7, intoxicate cu 70 μM lindan și 50 μM deltametrin, în prezența de 10% ser fetal bovin în mediul de cultură DMEM (Dullbeco's Modified Eagle's Medium).

Test de citotoxicitate. Concentrația optimă de lindan și deltametrin utilizată pentru tratamentul culturii de hepatocite a fost stabilită în urma realizării unui test de citotoxicitate folosind MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu], care permite evaluarea metabolismului oxidativ, pe baza transformării MTT-ului într-un formazan sub acțiunea enzimelor NAD(P)H-dependente. Culoarea (galben până la albastru) este proporțională cu numărul celulelor active metabolic.

Evidențierea citocromului C. Pentru evidențierea cyt C celulele tratate cu pesticid au fost tripsinizate și ulterior resuspendate în 2 ml tampon de extracție (210 mM manitol, 70 mM sucroză, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, KCl 50 mM, EGTA 50 mM, MgCl_2 2mM, ditionitrol 1mM). După liză, celulele au fost centrifugate 5min/12000xg/4°C, supernatantul obținut fiind ultracentrifugat 30min/100.000xg(46.000rpm)/4°C. Frația citosolică obținută a fost concentrată, probele fiind supuse unor centrifugari succesive folosind centricoane YM-10 (centrifugarea a fost realizată câte 1 oră/5000xg/4°C). Determinarea concentrației proteice a probelor s-a realizat folosind metoda Lowry. Separarea proteinelor s-a efectuat prin migrarea probelor în condiții denaturante în 15% gel de poliacrilamidă. Probele supuse electroforezei au prezentat o concentrație de 70 $\mu\text{g/godeu}$.

După migrare, proteinele au fost transferate utilizând metoda transferului umed Western blot pe membrane PVDF în prezența tamponului de transfer (Tris 25 mM, glicină 192 mM, metanol 20%). Membrana a fost spălată cu apă distilată și apoi blocată în 10 ml tampon de blocare 30 min (tamponul de blocare, soluțiile de diluție, anticorpii și soluția de spălare anticorpi au fost utilizate din kitul Invitrogen Western Breeze, Chromogenic Immunodetection System).

După blocare membrana a fost spălată cu 20 ml apă și incubată în prezența anticorpului primar anti-cyt *C*. După incubare în prezența anticorpului primar membrana a fost spălată cu soluție spălare anticorpi și incubată 30 min în prezența anticorpului secundar (donkey anti sheep conjugat cu peroxidaza). Revelarea a fost realizată în 10 ml DAB cromogen (NOVOCASTRA Liquid DAB Substrate Kit for Peroxidase).

Evaluarea gradului de fragmentare a ADN. Pentru evaluarea gradului de fragmentare a ADN au fost tripsinizate și omogenizate 2×10^6 celule Huh 7 în 200 μ l PBS. Omogenatul celular se adaugă etanol 70% și se incubează 48 ore/-20°C. După o centrifugare 1500 rpm/10min/4°C, se îndepărtează etanolul și sedimentul celular se resuspendă în 100 μ l tampon de extracție (0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M ac. citric, pH 7.8) și se incubează timp de 30 de minute, la 37°C. Omogenatul este centrifugat și din supernatant se transferă 80 μ l într-un Eppendorf 1.5 ml steril se adaugă 5 μ l ARN-ază și se incubează 30 min/37°C. Apoi se adaugă 10 μ l proteinază K și se incubează 30 min/37°C. 20 μ l din amestec se incubează 30 min la temperatura camerei în prezență de EDTA 125 mM, etanol 100%, se omogenizează amestecul, se centrifugează și se înlătură supernatantul. Peletul ADN este spălat cu etanol 70% se usucă la pompa de vid 10 min și apoi se face resuspendarea peletului în soluție de rehidratare ADN (Tris/HCl 10mM, pH 7.4, EDTA 1mM, pH 8). Vizualizarea fragmentelor ADN s-a realizat prin migrarea electroforetică în gel de agaroză (h.r.) 1.8% în prezența de bromură de etidiu.

Rezultate și discuții

Principali markeri apoptotici urmăriți pentru evidențierea efectului indus de tratamentul cu pesticide la nivel hapatocitar au fost: eliberarea citocromului *C* mitocondrial în citoplasmă și procesul de fragmentare ADN, apărut în faza târzie a apoptozei.

Concentrația optimă de pesticide utilizată pentru tratamentul hepatocitelor în vederea inducerii apoptozei a fost stabilită în urma realizării unui test de citotoxicitate folosind MTT, care permite evaluarea metabolismului oxidativ. Rezultatele acestui test (Fig. 2 și 3) indică faptul că tratamentul cu lindan (70 μ M) timp de 12 și 24 ore induce efecte toxice moderate la nivelul celulelor Huh7.

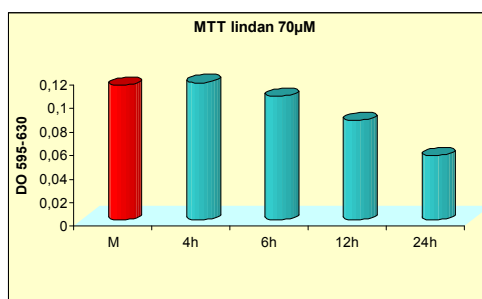


Fig.2 Test de citotoxicitate la nivelul celulelor Huh7 tratate cu lindan 70 μ M

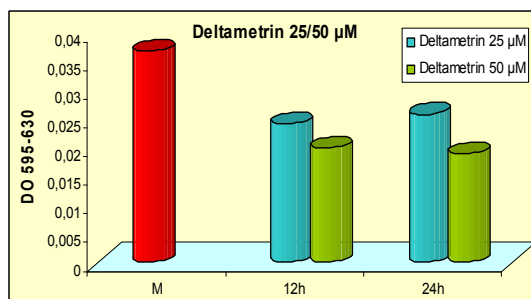


Fig.3 Test de citotoxicitate la nivelul celulelor Huh7 tratate cu deltametrin 25 și 50 μ M

Eliberarea citocromului C: Citocromul *C* a fost prima moleculă mitocondrială implicată în semnalizarea apoptotică. Studiile efectuate pe culturi de celule Huh 7 au arătat ca atât intoxicația cu lindan 70 μ M cât și intoxicația cu deltametrin 50 μ M provoacă eliberarea cyt *C* (Figurile 4 și 5).

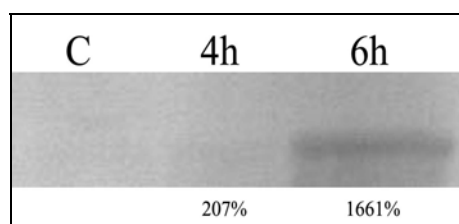


Fig.4 Analiza Western blot a cyt *C* eliberat de la nivelul celulelor tratate cu 70 μ M lindan timp de 4 și 6 ore

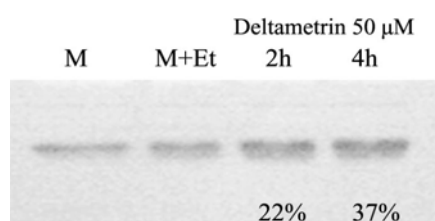


Fig.5 Analiza Western blot a cyt *C* eliberat de la nivelul celulelor tratate cu 50 μ M deltametrin timp de 2 și 4 ore

Rezultatele obținute au pus în evidență eliberarea cyt *C* de la nivel mitocondrial din celulele Huh 7 tratate timp de 6 ore cu 70 μ M lindan (Fig. 4). Din densitometrarea benzilor obținute în urma revelării specifice a membranei PVDF cu anticorpi anti-cyt *C*, se poate observa o creștere a cantității de cyt *C* din citoplasma celulelor tratate, comparativ cu celulele martor, care este proporțională cu intervalul de tratament.

Cantitatea de cyt *C* eliberată la nivel citoplasmatic în urma tratamentului hepatocitelor cu lindan timp de 4 ore a fost cu 207 % mai mare comparativ cu martorul, în timp ce în urma tratamentului timp de 6 ore, cantitatea de proteina eliberată este cu 1661% mai mare în comparație cu celulele netratate (Fig. 4). Comparativ cu celulele tratate cu lindan 70 μ M, în celulele tratate cu 50 μ M deltametrin eliberarea cyt *C* de la nivel mitocondrial are loc după un interval de timp mai scurt (2 ore; Fig.5) decât cel în urma căruia se eliberează cyt *C* din celulele tratate cu lindan (6 ore; Fig.4). Acest lucru poate demonstra efectul mai toxic al tratamentului cu deltametrin comparativ cu cel cu 70 μ M lindan.

Toate aceste rezultate sugerează faptul că procesul apoptotic indus la nivelul celulelor Huh 7, atât sub acțiunea deltametrinului cât și a lindanului este dependent de mitocondrie și implică eliberarea cyt *C* de la acest nivel.

Evaluarea gradului de fragmentare a ADN: Fragmentarea ADN reprezintă faza terminală a apoptozei, care are loc în câteva etape: formarea unor macrofragmente ADN de 300 mii perechi de baze (p.b.), generarea unor fragmente mai mici de 30-50 mii p.b. și scindarea internucleozomală cu formarea fragmentelor de 180 p.b. sau multiplul lor. Aceste fragmente de 180 p.b., în timpul electroforezei ADN purificat din celulele apoptice, apar sub forma unei trene, fapt pe larg utilizat în identificarea apoptozei celulare [11].

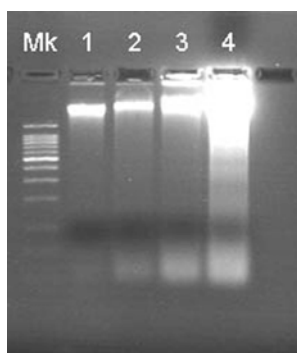


Fig. 6 Fragmentarea ADN indusă în celule Huh7 de tratamentul cu 50 μ M deltametrin
 1 - marker 100 bp
 2 - celule control
 3 - celule tratate 24 de ore
 4 - celule tratate 48 de ore
 5 - celule tratate 72 de ore

Datele experimentale obținute în studiile noastre, arată că atât în cazul tratamentului cu deltametrin (50 μ M) cât și cu lindan (70 μ M) are loc inducerea fragmentării ADN la nivel celular. Apariția acestui proces se observă foarte clar la 72 ore de tratament cu 50 μ M deltametrin și la 48 și respectiv 72 de ore în cazul tratamentului cu 70 μ M lindan.

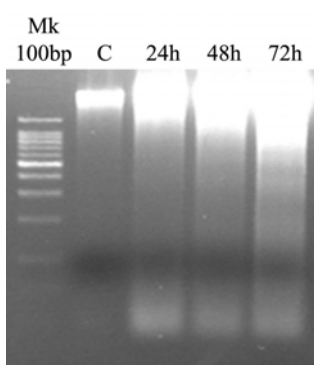


Fig.7 Fragmentarea ADN indusă în celule Huh7 de tratamentul cu 70 μ M lindan
 1 - marker 100 bp
 2 - celule control Huh7
 3 - celule tratate 24 de ore
 4 - celule tratate 48 de ore
 5 - celule tratate 72 de ore

În cazul tratamentului cu lindan 70 μ M, se observa că intensitatea fragmentării ADN crește proporțional cu intervalul de expunere (Fig. 7). Studii recente efectuate pe alte tipuri de culturi celulare au arătat capacitatea acestora și a altor pesticide de a provoca fragmentarea ADN [11,15].

Concluzii

Studiul efectului toxic al lindanului în concentrație de 70 μ M și a deltametrinului în concentrație de 50 μ M *in vitro* (culturi de celule Huh 7), au subliniat capacitatea acestor pesticide de a induce efecte caracteristice procesului apoptotic. Rezultatele obținute sugerează faptul că procesul apoptotic indus de aceste pesticide este dependent de mitocondrie și implică eliberarea cyt C de la acest nivel. De asemeni mărirea duratei de intoxicație până la 72 ore induce și fragmentarea ADN - semnal final în declanșarea procesului apoptotic.

Bibliografie

1. Akhgari M., Abdollahi M., Kebryaezadeh A., Hosseini R., Sabzevari O. - *Hum. Exp. Toxicology*, 22(4):205-11, [2003]
2. Ananya R., Subeena S., Kumar D.A., Kumar D.T., - *Med. Sci. Monit.*, 11(9):325-329, [2005]
3. Atif F., Parvez S., Pandey S., Rehman H. - *Archives of Environ. Contamination and Toxicology*, [2005].
4. Banerjee B.D., Seth V., Ahmed R.S. - *Rev. Environ. Health.*, 16(1):1-40, [2001].
5. Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T. - *Toxicol. Lett.* 107(1-3):33-47, [1999].
6. Chandra J, Samali A, Orrenius S. - *Free Radic. Biol. Med.* 29:323-33, [2000].
7. Cornejo P, Tapia G, Puntarulo S, Galleano M, - *Toxicol Lett.* 119(2):87-93, [2001].
8. Descampiaux B., Leroux J.M., Peucelle C., Erb F. - *Cell Biol. Toxicol.* 12(1):19-28, [1996].
9. Fabreguettes C. - *Centre International de Toxicologie, Misery, Evreux, France*, [1991].
10. Garcia-Fernandez A.J., Bayoumi A.E., Perez-Pertejo Y., Romero D., Ordonez C., Reguera R.M., Balana-Fouce R., 11. Ordonez D. - *Xenobiotica.* Nov;32(11):1007-16, [2002].

12. Goldstein J.C., C Muñoz-Pinedo, J-E Ricci, S R Adams, A Kelekar, Schuler, R Y Tsien and D R Green - *Cell Death and Differentiation*, 12, 453–462, [2005].
13. Sauviat M.P., Pages N. - *J.Soc.Biol.*;196(4):339-48. [2002].
14. Kroemer G. - *Biochemical & Biophysical Res. Communic.*, Vol.304:433-435, [2003].

TERAPIA GENICĂ ÎN PATOLOGIIILE CORDULUI

Mihail Taşnic

(Cond. şt. – dr., conf. universitar, I. Cemortan)

Catedra Biologie Moleculară şi Genetică Umană USMF „Nicolae Testemiţanu”

Summary

Gene therapy of heart diseases

Gene therapy offers large possibilities in heart diseases treatment: coronarian disease, congestive heart insufficiency, cardiomyopathy, and arrhythmias. Expression of therapeutic genes in target tissues assures angiogenesis, calcium intracellular homeostasis, apoptosis preventing and heart contractility genes modulation. Implementation of the gene therapy needs to resolve the following problems: selection of therapeutical genes, vectors and methods of their delivery.

Rezumat

Terapia genică oferă posibilităţi vaste în tratamentul patologiilor cardiace cum ar fi boala coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă, cardiomiopatii, disritmii etc. Expresia genelor terapeutice în regiunile tisulare ţintă asigură angiogeneza terapeutică, homeostazia intracelulară a ionilor de calciu, preîntâmpinarea apoptozei şi modularea genelor ce controlează ritmul celular. Implementarea terapiei genice necesită soluţionarea problemelor legate de alegerea genelor terapeutice, vectorului, modului de introducere a vectorului în ţesutul ţintă etc.

Actualitatea temei

Patologiile cardiovasculare deţin locul întâi în rândul bolilor cu cea mai mare rată de morbiditate şi mortalitate mondială. Progresul tehnico-ştiinţific în domeniul terapiei genice oferă perspective largi în tratamentul, iar în unele cazuri şi profilaxia multor patologii cardiace precum: boala coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă, cardiomiopatii, disritmii etc.

Implementarea terapiei genice în tratamentul pacienţilor cardiaci minimizează intervenţiile traumatice la nivelul cordului reducând complicaţiile postoperatorii şi tratând pacienţii la nivel molecular prin intermediul produşilor elaboraţi de propriile celule, activate prin modularea genică.

Obiectivele lucrării

Scopul actualului studiu este analiza datelor bibliografice recente privind succesele în domeniul tratamentului genic al afecţiunilor cordului de diversă geneză.

Rezultate şi discuţii

După o perioadă lungă de studii experimentale preclinice, terapia genică permite modularea genică la pacienţii cu diverse patologii ischemice, nereceptive la metodele terapeutice medicamentoase [6] şi a celor la care angiogeneza fiziologică este compromisă (vârsta înaintată, hipercolesterolemia, diabetul zaharat, disfuncţii endoteliale) [3]. Terapia genică a miocardului poate veni în ajutorul ameliorării stării pacienţilor cu boală coronariană, insuficienţă cardiacă congestivă sau disritmii greu tratabile. Un interes deosebit prezintă profilaxia genică a complicaţiilor stentingului coronarian [7, 8].

Terapia genică presupune transferul genelor de interes prin intermediul unor vectori specifici în regiunile tisulare cu expresie genică anormală. Odată pătruns în celula ţintă, vectorul trece în nucleu, asigurând integrarea „genelor terapeutice” în genomul gazdei urmată de expresia acestora.