

Programul CERES**RAPORT FINAL DE ACTIVITATE
Contract nr. 149/2001**

Denumirea proiectului : Studii privind acțiunea unor efectori fizici și chimici asupra sistemului antioxidant și apoptozei în culturi de celule animale

Perioada acoperita: 31.10.01-10.12.03

Data prezentarii: 05.01.2004

Bugetul proiectului**Finanțare de la bugetul de stat**

An	Conform contractului de finantare	Modificari prevazute prin act aditional
2001	350.000.000	350.000.000
2002	455.000.000	449.932.000
2003	420.000.000	420.000.000
2004	0	0
Total	1.225.000.000	1.219.932.000

Obiective

Ob.1. Obținerea și conservarea culturilor primare de fibroblaste (FB). Studiul evoluției unor componente ale sistemului antioxidant (glutation, superoxid dismutază, glutacion peroxidază și glutacion reductază) și a procesului de apoptoză în culturi de FB iradiate (γ sau UV) sau tratate glucoză (GLC), vanadat (VAS) sau selenit (SES)

Ob.2. Obținerea și conservarea culturilor primare de keratinocite (KC) și studii pe KC iradiate γ și UV privind statusul oxidativ și nivelul apoptozei

Ob.3. Obținerea și conservarea culturilor primare de melanocite (MC) și studiul efectelor iradierii lor γ sau UV sau a tratamentului cu GLC, VAS sau SES asupra statusului oxidativ și nivelului apoptozei.

Ob.4. Obținerea și conservarea culturilor primare de hepatocite (HP) și studiul unor componente ale sistemului antioxidant la nivelul HP tratate cu GLC, VAS și SES

Ob.5. Studiul posibilității folosirii VAS ca factor de creștere în culturi celulare

Rezultate experimentale**1. Obținerea, cultivarea și conservarea celulelor animale și umane**

HP au fost izolate după protocolul descris de **Miller și colab. [1986]**, modificat de noi, din șobolani Wistar. După perfuzia ficatului cu collagenază, țesutul a fost mărunțit și reluat într-o soluție tampon HEPES 10 mM, pH 7,4; 142 mM NaCl; 6,7 mM KCl și antibiotice pentru a împiedica creșterea microbiană. Suspensia rezultată este filtrată pentru a reține țesutul nedigerat. Celulele sunt separate prin centrifugarea suspensiei celulare, la $50 \times g$. Pentru obținerea unei culturi primare de HP s-au utilizat plăci Petri cu collagen preaderat și mediu esențial minimal MEM Eagle cu 10 % ser fetal bovin (SFB).

Din pielea unor pacienți implicați în operații chirurgicale plastice s-au separat principalele celule din dermă: FB și din epidermă: KC și MC. Fragmentele biopsice de piele - obținute cu acordul pacienților - au fost spălate în mediu MEM în prezența unor concentrații descrescătoare de antibiotice. FB au fost separate din biopsiile de piele utilizând tehnica explantelor după protocolul elaborat de **Jones și Wise [1997]**. Pentru ieșirea FB din explant și

creșterea lor s-a utilizat mediul de cultivare DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplimentat cu 15 % SFB, 1% penicilina, 1% streptomycină, 1% L- glutamina. Subcultivarea FB s-a realizat cu mediul DMEM suplimentat cu 10% SFB și antibiotice. Mediul a fost schimbat de trei ori pe săptămână. În studiile noastre s-au utilizat FB în pasajele 5-8. KC și MC s-au izolat după separarea epidermei de dermă, principal prin metoda descrisă de [Hara și colab. \[1994\]](#), prin tratament enzimatic cu dispază II, timp de 30-120 minute și cu ajutorul forcepsului. Celulele din epidermă au fost disociate prin incubare cu tripsină 0,25 % și EDTA 0,1 % la 37°C timp de 15 minute, acțiunea tripsinei fiind inhibată prin tratament cu mediu DMEM +10% SFB. Pentru izolarea KC, suspensia de celule se plasează în mediu KMK-2 (Sigma) fără SFB și se incubează la 37°C în mediu cu 5% CO₂. Pentru izolarea MC, suspensia de celule se plasează în mediu MMK-2 (Sigma) fără SFB și se incubează la 37°C în mediu cu 5% CO₂. Mediul a fost schimbat de trei ori pe săptămână. Când celulele epidermei ajung la confluență încep pasajele. În experiențele noastre s-au utilizat celule epidermice în pasajele 2-3.

FB pot fi crioconservate în azot lichid într-un amestec 75 % DMEM, 10% dimetil sulfoxid și 15% SFB. KC pot crioconservate în azot lichid într-un amestec 70% KMK-2, 10% dimetil sulfoxid și 20% SFB, în vederea utilizării lor în studiile ulterioare. MC nu pot fi crioconservate cu păstrarea viabilității celulare.

[Hara, M., Yaar, M., Tang, A., Eller, M.S., Reenstra, W., Gilchrest, B.A. Role of integrins in melanocyte attachment and dendricity. J. Cell Science 107, 2739-2748 \(1994\)](#)

[Jones, E.G, Wise, J. C, Establishment, maintenance and cloning of human dermal fibroblasts. In "Methods in Molecular Biology, vol. 75: Basic Cell Culture Protocols", Pollard W.J., Walker, M.G. \(Eds\), Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 13- 22, 1997](#)

[Miller, T.B., Garnache, A.K., Cruz, J., McPherson, R.K., Wolleben, C., Regulation of glycogen metabolism in primary cultures of rat hepatocytes, J. Biol. Chem., 261, 785-790, 1986](#)

2. Tratamente

Celulele au fost supuse atât unor tratamente chimice :

vanadatul de sodiu (VAS) este un compus mult studiat în ultimul timp în legătură cu proprietățile lui similare insulinei, existând chiar tentative clinice de utilizare a acestuia în terapia diabeticilor. De asemenea, compușii vanadiului interferă în mitoză și în distribuția cromozomilor în diviziune, poate genera specii reactive ale oxigenului (SRO) și datorită potențialului său redox este un agent mutagen slab. De asemenea, există studii corelate cu expunerea profesională la compuși ai vanadiului, care sugerează efectul lor genotoxic. În studiile noastre, celulele au fost tratate cu VAS în concentrații cuprinse între 2,5 μM și 10 mM, diferite perioade de timp;

compușii seleniului reduc riscul la cancer, au activități antitumorogene și sunt utilizați ca agenți de chemoprevenție a cancerului. Totuși doza administrată este critică, compușii Se dezvoltând efecte antioxidante la doze mici și pro-oxidante la doze mari. În studiile noastre, celulele au fost tratate cu selenit de sodiu (SES) în concentrații finale în mediu de 50 μM și 100 μM, diferite perioade de timp;

glucoza (GLC) este un glucid fiziologic normal care reprezintă în concentrații fiziologic normale (circa 5 mM) un combustibil metabolic pentru toate tipurile celulare. Concentrațiile mai mari de glucoză în sânge sunt asociate cu diabetul zaharat, sindrom patologic deosebit de complex asociat printre altele cu defecte în vindecarea leziunilor pielii. Noi am realizat tratarea celulelor în concentrații de GLC cuprinse între 5 și 27,5 mM, diferite perioade de timp.

cât și unor tratamente fizice :

radiațiile UV (UVR) reprezintă cel mai agresiv carcinogen fizic din mediu, pielea fiind principala lor țintă. La nivelul acestui țesut, UVR induce efecte acute ca eritemele sau efecte cronice ca fotoîmbătrânirea prematură și tumorile pielii, afectându-l în diferite moduri în funcție de lungimea de undă. Efectele UVA (320-400 nm) sunt în principal datorate SRO dezvoltate, care produc leziuni oxidative la nivelul biomoleculelor și ansamblurilor biologice supramoleculare. Noi am realizat iradiere UVA (UVAR) a celulelor izolate din piele cu o lampă UV la 365 nm cu o intensitate de 3,8 mW/cm², diferite perioade de timp ;

radiațiile ionizante produc efecte nocive asupra sistemelor biologice care depind de doza expusă/absorbită, durata expunerii, intervalul de relaxare post-expunere, radiosensibilitate sursei biologice, etc. Majoritatea leziunilor celulare produse de radiațiile ionizante sunt mediate de SRO generate prin interacția radiației cu moleculele de apă din celule. În experiențele noastre iradierea gamma (GI) a fost realizată cu o sursă de Co^{60} cu 2 - 8 Gy la o rată a dozei de 0,0629 Gy/sec, la temperatura camerei.

3. Metode utilizate în studiul experimental

În studiul experimental au fost utilizate tehnici de monitorizare a culturilor celulare supuse diferitelor tratamente, de evaluare a stresului oxidativ și a apoptozei. Numărul și tipul metodelor utilizate în fiecare etapă a depins de nivelul finanțării și de evoluția/cerința cercetării.

Monitorizarea culturilor celulare

Celulele supuse diferitelor tratamente au fost monitorizate prin: (i) numărarea celulelor cu un hemocitometru, (ii) studiul viabilității celulelor după colorare cu *Trypan blue* [Patterson, 1979]; (iii) evaluarea citotoxicității tratamentelor prin dozarea activității lactat dehidrogenazei (LDH) - o enzimă localizată aproape integral în citoplasmă - în mediu de cultură și în extracte celulare; (iv) evaluarea proliferării celulare prin metoda cu MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] care permite evaluarea metabolismului oxidativ [Richard și colab., 1992] și prin reacția cu Cristal violet care leagă și colorează nucleii [Barrio și colab., 1997] în care colorantul fixat pe celule este determinat cantitativ la 540 nm după extracție; (v) dozarea concentrației proteice intracelulare prin metoda Bradford [1976], (vi) determinarea concentrației glucozei în mediul de cultură (cu glucozoxidaza și peroxidaza), etc

Stresul oxidativ a fost studiat prin :

A. analiza unor componente ale sistemului antioxidant de apărare : (i) nivelul glutationului total intracelular (GSH+GSSG) prin metoda lui Akerboom și Sies [1981] modificată, (ii) a glutationului oxidat (GSSG) determinat în aceleași condiții, după ajustarea pH cu etanolamină și prin captarea GSH cu 3-vinilpiridină [Emonet, 1997], (iii) nivelul glutationului redus (GSH)- prin metoda descrisă de Hissin și Hilf [1976] pe baza reacției cu o-ftaldialdehida; a activităților (iv) superoxid dismutazei (SOD) prin metoda lui Flohé și Ötting [1984] care utilizează ca sistem de generare a anionului superoxid : xantin/xantin oxidază și o reacție indicator : reducerea citocromului c; activitatea Mn-SOD mitocondrială a fost diferențiată de activitatea Cu, Zn-SOD citosolică prin rezistența ei la 5 mM cianură de sodiu; (v) glutation peroxidazei Se-dependente (GSH-Px) a fost dozată utilizând GSH și t-butil hidroperoxid ca substrat și monitorizând producția de GSSG prin oxidarea NADPH cu glutation reductază [Wendel, 1981], (vi) glutation reductazei (GR) pe baza reducerii glutationului oxidat cu NADPH și (vii) catalazei conform metodei descris de Aebi [1984], bazată pe scăderea absorbanței la 240 nm [Aebi, 1985].

B. evaluarea producției intracelulare a speciilor reactive ale oxigenului (SRO) prin metoda descrisă de Royall și Ischiropoulos [1993], care constă în oxidarea dihidrorodaminei 123 (DHR) de către SRO produse în celule la rodamină.

C. evaluarea stresului oxidativ prin determinarea gradului de peroxidare lipidică - dozarea substanțelor reactive cu acid barbituric (TBARS *thiobarbituric-reactive substances*) în supernatante și/sau celule, principial conform metodei descrise de Ohkawa și colab. [1979] modificată.

Apoptoza a fost studiată prin :

Studiul apoptozei a fost realizat utilizând două tehnici: 1) ELISA cu kitul «*Cell death detection*» care determină cantitativ nivelul fragmentelor DNA asociate histonelor prezente în citoplasmă în urma distrugerii structurii nucleului. Anticorpul monoclonal contra DNA și histonelor au legată covalent peroxidază din hrean, a cărei activitate este dozată în prezență de H_2O_2 și ABTS [2,2'-azino - di-(3 - etilbenzotiazolin sulfonat)] la 405 nm; 2) prin citometrie în flux, după marcarea cu anexina V conjugată cu izotiocianat de fluoresceină și iodură de propidiu; primul marker monitorizează celulele aflate în faza inițială a apoptozei la care resturile de fosfatidil serină suferă translocare de pe fața internă pe cea externă a membranei plasmatică, cel de al doilea marker se leagă la DNA celular din celulele necrotice când membrana celulară este total compromisă.

- Aebi, H., Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.*, 105, 121-126, 1985
- Akerboom, T., Sies, H., Assay of glutathione, glutathione disulfides and glutathione mixed disulfides in biological samples, în: S.P. Colowick și N. O. Kaplan (eds). *Methods in Enzymology*, Acad. Press, New York, 1981, p. 373-382
- Barrio, DA, Brazionas, MD., Etcheverry, SB, Cortizo, A.M., Maltol complexes of vanadium (IV) and (V) regulate *in vitro* alkaline phosphatase activity in osteoblast-like cell growth, *J. Trace Elements Med. Biol.*, 11, 110-115, 1997
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254, 1976
- Emonet, N., Leccia, M.T., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J., Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation, *J. Photochem. Photobiol B: Biology*, 40, 84-90, 1997
- Flöhe, L., Günzler, W.A., Superoxide dismutase assays, *Methods Enzymol.*, 93, 104-121, 1984
- Hissin, P.J., Hilf, R., A fluorimetric method for determined of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.*, 74, 214-226, 1986
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.*, 95, 351-358, 1979
- Patterson, M.K., Measurement of growth and viability of cells in culture, *Methods Enzymol.*, 58, 141-152, 1979
- Richard, M.J., Guiraud, P., Monjo, A.M, Favier, A., Development of a simple antioxidant screening assay using human skin fibroblast, *Free Rad. Res. Commun.*, 16, 303-314, 1992
- Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Evaluation of 2,7-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells *Arch Biochem Biophys.*, 302, 348-355, 1993
- Wendel, A., Glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.*, 77, 325-333, 1981

4. Studii pe fibroblaste dermice

Tratamentul cu doze mici de VAS (2,5-10 μ M) stimulează creșterea celulelor și metabolismul lor oxidativ, induce scăderea nivelului SRO, nu modifică nivelul glutathionului total, crește activitatea GSH-Px în acord cu scăderea concentrației GSH intracelular și cu menținerea relativ constantă a nivelului peroxizilor lipidici intracelulari. La concentrații ≥ 50 μ M VAS se observă scăderea proliferării celulelor și a metabolismului oxidativ, apar efecte citotoxice, nivelul glutathionului total scade, activitatea GSH-Px scade odată cu creșterea concentrației efectorului, deci capacitatea acestei enzime de a descompune SRO se diminuează în acord cu creșterea puternică a nivelurilor SRO, a peroxizilor lipidici. Este interesant că nivelul peroxizilor lipidici extracelulari este superior celui al peroxizilor lipidici intracelulari indicând că ținta primară a SRO sunt membranele protoplasmice ale FB. Datele noastre sugerează că V (+5) are un rol anti-oxidant la concentrații mici și pro-oxidant la concentrații mari. La concentrații mici de VAS, sistemul glutathionului din FB tamponează stresul oxidativ indus de vanadiu, în timp ce la concentrații mai mari sistemul antioxidant al FB nu poate depăși efectele nocive ale SRO. Studiul apoptozei FB s-a realizat la două concentrații de VAS : 50 și 100 μ M utilizând tehnica ELISA cu kitul Boehringer « *Cell death detection* ».

Un obiectiv distinct al proiectului (Ob.5) a fost « *Studiul posibilității folosirii vanadatului ca factor de creștere în culturi de celule animale* ». Incubarea FB cu VAS induce proliferarea celulelor într-o manieră bifazică. Dozele mici de VAS (2,5-10 μ M) stimulează creșterea celulelor cu circa 28 % față de nivelul de bază. Doza de 25 μ M nu afectează proliferarea celulară, iar dozele mai mari de 50 μ M o inhibă proporțional cu doza aplicată. Numărul celulelor apoptotice ajunse în stadiul fragmentării DNA a fost crescut cu 255,6 % în urma tratamentului FB, timp de 24 ore cu 100 μ M VAS. Doze mai mari produc profunde fenomene de necroză celulară.

În cazul studiului efectelor SES asupra statusului oxidativ al FB se constată că tratamentul cu Na₂SeO₃ 50 μ M și 100 μ M nu afectează sensibil proliferarea FB, în schimb doza de 200 μ M are efecte citotoxice. Datele noastre sugerează că tratamentul cu SES, indiferent de concentrație, nu afectează conținutul în GSH și în peroxizi lipidici extracelulari. Diferențe semnificative se observă în cazul tratamentului cu SES 200 μ M când crește nivelul SRO și al peroxizilor lipidici intracelulari, sugerând că citotoxicitatea tratamentului cu SES 200 μ M este datorată SRO care afectează în special citosolul și chiar organitele intracelulare. Activitatea Mn-SOD mitocondrială nu este afectată semnificativ, în timp Cu/Zn-SOD citosolică este activată de tratamentele cu SES 50 μ M și 100 μ M și anulată la 200 μ M. Deci, la concentrații de 50-100

μM SES, SOD descompune anionii superoxid, ceea ce explică și producția scăzută de SRO și de peroxizi lipidici. În cazul tratamentului cu SES $200 \mu\text{M}$ activitatea SOD citosolică este practic nulă, poate avea loc reacția HABER-WEISS cu formare de radicali hidroxi extrem de nocivi. Activitatea GSH-Px, enzimă Se-dependentă, este crescută în FB tratate cu SES $50 \mu\text{M}$ și $100 \mu\text{M}$. La concentrația maximă $200 \mu\text{M}$ efectul activator al SES este practic anulat de efectele nocive ale SRO asupra propriei proteine. Activitatea catalazei care descompune peroxidul de hidrogen nu este afectată de tratamentul cu SES 50 și $100 \mu\text{M}$ sugerând că funcția de detoxifiere a acestor SRO este realizată de alte enzime scavenger, de exemplu GSH-Px. La concentrația maximă de SES ($200 \mu\text{M}$) se observă deprecierea activității catalazei, odată cu scăderea întregului metabolism oxidativ. Studiul FB tratate cu SES $50 \mu\text{M}$ și $100 \mu\text{M}$ indică procente mici de apoptoză, care nu cresc cu doza.

În studiul efectului GLC asupra FB, o concentrație de 20 mM produce deprecierea viabilității și proliferării celulare și a activității lor metabolice. Pe parcursul tratamentului se observă creșterea continuă a nivelului SRO și al peroxizilor lipidici, mai accentuat între 24 și 48 ore. Conținutul în GSH nu este modificat în primele 5 ore de incubare, dar scade după $24-48$ ore indicând scăderea capacității celulei de apărare contra stresului oxidativ indus de GLC. Tratamentele cu GLC nu induc apoptoza FB nici la creșterea nivelului efectorului la $27,5 \text{ mM}$.

FB au fost iradiate UVA (UVAR) cu diferite doze UVA ($6,84 - 41,04 \text{ J/cm}^2$). Iradierea cu doze mai mici de $13,68 \text{ J/cm}^2$ afectează într-un grad mic viabilitatea celulelor, în timp ce la doze mai mari se manifestă acțiunea letală a UVAR proporțional cu creșterea dozei de radiații aplicată. Pentru elucidarea mecanismului de acțiune al radiațiilor UVA asupra FB s-a studiat evoluția peroxidării lipidelor și a unor componente ale sistemului antioxidant de apărare. Nivelul substanțelor TBARS formate în mediu în urma UVAR a FB este dependent de doză, crescând aproape liniar până la 41 J/cm^2 . Formarea substanțelor TBARS intracelulare este detectată numai după o oră de la iradiere, dar nivelul lor nu crește proporțional cu doza (de la $13,7$ la 41 J/cm^2). Studiul efectului UVA asupra eliberării LDH din celule în mediul de cultură, ca o măsură a deteriorării structurii membranei plasmatică, sugerează că expunerea la doze mici de UVA ($< 15 \text{ J/cm}^2$) induce leziuni slabe ale membranei. Doze mai mari de UVA au ca rezultat o formare mai pronunțată de MDA (malondialdehidă) în mediu și în celule, precum și o eliberare mai accentuată de LDH. În consecință, există valori prag pentru TBARS ($\sim 0,4$ și $\sim 1,8 \text{ pmoli}/\mu\text{g}$ proteină, în celule și respectiv în mediu) peste care ele sunt asociate cu o eliberare semnificativă de LDH. Producția de MDA și lezarea membranelor indicată de eliberarea LDH susține ipoteza că UVA induce peroxidarea lipidelor. Faptul că nivelul MDA crește post-iradiere sugerează că peroxidarea lipidelor, odată inițiată, continuă prin mecanismele radicalice cunoscute. Studiul unor componente ale sistemului antioxidant din FB supuse UVAR a arătat o scădere în nivelul glutationului total la doze mai mari de $27,36 \text{ J/cm}^2$, creșterea activității GSH-Px după $2,5$ ore de iradiere cu o sursă cu $3,8 \text{ mW/cm}^2$ și nemodificarea activităților SOD. Datele obținute de noi sugerează o depreciere a sistemului tampon redox GSSG/GSH după două ore de UVAR corelată cu creșterea sensibilității FB la UVA și cu procesele de citotoxicitate evidențiate prin tehnica MTT. Creșterea semnificativă a activității GSH-Px la doze UVA mai mari de $34,2 \text{ J/cm}^2$, susține ipoteza inducerii GSH-Px de către UVA, putând explica și procentul mare de supraviețuire a celulelor. S-a studiat posibilitatea apariției procesului de apoptoză la FB supuse iradierii cu UVA (365 nm) timp de $1,5$ ore cu o doză de $20,52 \text{ J/cm}^2$. Apoptoza a fost studiată prin dectarea nucleosomilor citoplasmatici, prin tehnica ELISA, la diferite perioade de timp ($0, 3, 6, 8, 11, 12$ și 18 ore) după încetarea stresului fizic. Rezultatele experimentale indică faptul că inducerea apoptozei în FB de către UVAR are un aspect bifazic. În primele 6 ore post-iradiere nu se observă o creștere în nivelul fragmentelor DNA asociate histonelor, detectate în citoplasmă. Nivelul oligonucleosomilor citoplasmatici în FB crește modest în primele $8-11$ ore după iradiere, urmată de o revenire la valorile de bază și apoi o creștere majoră la circa 18 ore după iradiere. În final, a fost studiată eliberarea oligonucleosomilor citoplasmatici în FB iradiate cu diferite doze UVA, după 18 ore de la încetarea stresului fizic. Se observă o relație doză-răspuns între dozele UVA și apoptoză.

Expunerea celulelor la GI are ca rezultat o varietate de modificări în funcție de doză expusă și doză absorbită, durata expunerii, intervalul după expunere și susceptibilitatea la GI. Imediat după iradiere, viabilitatea celulelor - determinată prin numărare directă pe o lamă Bürker-Turk - a fost de 49% la 2 Gy și de 16% la 4 Gy . După 48 ore de la iradiere, viabilitatea FB - studiată prin tehnica cu MTT - este de 68% la 2 Gy și de 23% la 4 Gy . GI

provoacă o slabă eliberare a LDH în mediu, ceea ce ar putea sugera că după iradiere modificările induse de GI sunt reversate rapid. Imediat după iradiere nivelul substanțelor TBARS intracelulare este crescut puțin, dar semnificativ ($p < 0,05$) proporțional cu doza aplicată. După 48 ore, nivelul substanțelor TBARS intracelulare crește de circa 7 ori pentru o doză de 2 Gy și de circa 13 ori pentru o doză de 4 Gy. Aceste creșteri în conținutul substanțelor TBARS intracelulare pot fi rezultatul reacțiilor radicalice înlănțuite de peroxidare a lipidelor. Conținutul în peroxizi lipidici eliberați în mediul de cultură crește de peste 290 ori după iradierea cu doza minimă (2 Gy) și de peste 560 ori în cazul dozei de 4 Gy, indicând prezența unui stres oxidativ profund. Datele obținute sunt contradictorii cu cele obținute în studiul LDH, putând reflecta o etapă în cadrul răspunsului complex al celulei la iradierea gamma. Activitatea GSH-Px, enzimă care protejează celula contra leziunilor oxidative induse de o varietate de hidroperoxizi, nu este modificată semnificativ imediat după iradierea cu doze de 2 și 4 Gy. După 48 ore, activitatea GSH-Px este crescută cu 38,2 % (2 Gy) și cu 43,6 % (4 Gy) indicând efortul celulei de a face față stresului oxidativ indus de GI. Dintre cele două tipuri de superoxid dismutaze investigate numai activitatea Mn-SOD este modificată la 48 ore după GI. Rezultatele noastre sugerează că stresul oxidativ indus de radiații afectează în principal gena SOD-2 (codifică Mn-SOD) supusă reglării de către factori transcripționali sensibili la SRO, conducând la creșterea protecției antioxidante la nivelul mitocondriei. Se observă că procesul apoptotic începe imediat după iradiere, nivelul oligonucleozomilor citoplasmatici crescând de la $0,118 \pm 0,02$ în probele control la $0,204 \pm 0,03$ și $0,244 \pm 0,02$ în probele de FB iradiate cu 2 Gy și respectiv 4 Gy, valorile fiind exprimate în unități de absorbantă conform indicațiilor firmei Boehringer Mannheim. După 24 ore de la iradiere, nivelul oligonucleozomilor eliberați în citoplasmă ca rezultat al procesului apoptotic crește la $0,511 \pm 0,92$ în probele de FB iradiate cu 2 Gy și la $0,708 \pm 0,41$ în cele iradiate cu 4 Gy, sugerând evoluția morții apoptotice. Aceste date sunt în acord cu rezultatele obținute în evaluarea substanțelor TBARS intracelulare, a căror concentrații cresc puțin, dar semnificativ imediat după iradiere și considerabil după 48 ore. Studiile realizate de noi sugerează că FB supuse GI suferă un proces timpuriu de apoptoză datorită SRO eliberate, care produc peroxidarea lipidelor intracelulare și membranare; procesul evoluând după terminarea iradierii.

6. Studii pe keratinocite epidermice

KC au fost tratate cinci concentrații de VAS cuprinse între 10 μM și 10 mM. Incubarea celulelor, timp de 24 ore, cu doze de 10 și 50 μM VAS nu afectează fenotipul KC dar induce un fenomen de hiperproliferație celulară - crescând numărul celulelor viabile cu $116,5 \pm 16,3$ % și respectiv $135 \pm 18,4$ %. Aplicarea dozei de 100 μM VAS induce apariția unei hipertrofii celulare, cu evidențierea nucleilor cu 2-3 nucleoli și conturarea mai evidentă a KC. Tratamentul KC cu 1 mM VAS afectează puternic aspectul celulelor: coloniile sunt dezorganizate, se observă ghirlande de celule provenite din foste colonii, multe celule se desprind de pe suport, iar cele care au rămas aderente sunt alungite și dezvoltă excrescențe în formă de spini la suprafață. Modificările KC tratate cu 10 mM VAS se deosebesc numai cantitativ de cele observate la celulele incubate cu 1 mM efector. Procesul de disociere a interacțiilor intercelulare avansează, la fel desprinderea KC de pe suport. Se observă puternica vacuolizare a celulelor și creșterea granulației intracelulare. Concentrațiile mai mari de VAS au efecte citotoxice, numărul de celule viabile scăzând la $83,5 \pm 10,6$ % (0,1 mM), la $42,0 \pm 2,1$ % (1 mM) și la $23,0 \pm 2,8$ % (10 mM). Menționăm că în literatura de specialitate nu există studii privind efectele VAS asupra keratinocitelor umane epidermice.

Iradierea UVA a subculturilor de KC cu o intensitate 38 mW/cm^2 arată o rezistență remarcabilă a acestor celule care după 3 ore iradiere prezintă o scădere a viabilității cu $12,5 \pm 1,1$ %. Citotoxicitatea UVA a fost evaluată prin distrugerea membranelor celulare și eliberarea LDH din celulă în mediul de reacție. Iradierea KC cu doze până la 27,36 J/cm^2 nu are efecte citotoxice, în timp ce la doza maximă (iradiere 3 ore) eliberarea LDH din celulă crește de circa 1,8 ori. Ca marker al stresului oxidativ indus de UVA s-a utilizat peroxidarea lipidelor intracelulare, prin evaluarea TBARS. Peroxidarea lipidelor intracelulare în KC începe după 2 ore de iradiere UVA (3,8 mW/cm^2), după care nivelul TBARS este relativ constant chiar la creșterea dozei UVA. Compararea tuturor datelor experimentale obținute în studiul KC supuse iradierii UVA sugerează că viabilitatea lor este afectată semnificativ numai de doza maximă de radiații

(41,4 J/cm²) când apar și fenomene de citotoxicitate. Speciile SRO apar de la doze mai mici (20,52 J/cm²), dar peroxidarea lipidelor intracelulare începe la doze de 27,36 J/cm²) – reflectând existența unui eficace sistem antioxidant de apărare. În cazul KC, nivelul SRO crește ca urmare a UVAR în special după 1,5 ore de iradiere, la doza maximă concentrația intracelulară a acestor specii crescând cu 178 %. Studiile de apoptoză realizate cu kitul ELISA «*Cell death detection*» au fost efectuate pe KC - control, iradiate UVA cu 41,4 J/cm². UVAR crește apoptoza keratinocitelor cu 532,7 ± 43,7 %

Iradierea γ scade viabilitatea KC, progresiv cu mărimea dozei, la 8 Gy — cu 39 %. Studiul citotoxicității GI asupra KC arată că dozele 2 Gy și 4 Gy nu afectează membrana lor plasmatică, dar iradierea cu 8 Gy crește citotoxicitatea tratamentului de ~ 2,2 ori. Nivelul SRO din KC nu este modificat după GI cu 2 și 4 Gy față de conținutul bazal în timp ce aplicarea dozei maxime de 8 Gy crește concentrația acestora cu ~ 140 % în acord datele creșterii citotoxicității acestui tratament. Concordanța rezultatelor obținute în studii de citotoxicitate și de dozare a SRO intracelulare sugerează că citotoxicitatea radiațiilor γ este datorată majoritar SRO formate intracelular. GI a culturilor de KC nu afectează nivelul peroxidizilor lipidici intracelulari decât în cazul dozei maxime (8 Gy) când crește cu ~ 69 %. Studiile de apoptoză realizate cu kitul ELISA «*Cell death detection*» au fost efectuate pe KC iradiate γ cu 8 Gy, când se constată creșterea gradului de apoptoză cu 185,7 ± 37,1 %.

7. Studii pe melanocite epidermice

Până în prezent nu au mai fost realizate studii privind efectele GLC, VAS și SES asupra MC. Acești compuși au potențiale redox ce pot afecta statusul oxidativ al MC, esențial pentru producția de melanine. Există studii care susțin o reglare redox aberantă în celulele melanomului uman comparativ cu melanocitele normale.

MC au fost tratate cu cinci concentrații de VAS cuprinse între 10 μ M și 10 mM. Tratamentul cu VAS 10 μ M a MC are evident un efect hiperproliferativ, numărul celulelor viabile crește cu 74,7 ± 10,6 %, însă talia corpului celular scade ușor, dendritele devin mai ramificate și se scurtează, distanțele intercelulare se micșorează creind aspectul general de contracție a coloniei de MC. La microscopul în contrast de fază, MC tratate cu VAS 10 μ M sunt mai pigmentate în nuanțe de galben-roșu ceea ce ar sugera o sinteză crescută de pheomelanine. Doza de 50 μ M conduce la creșterea taliei, granulației și dendriticității MC, fără a se observa un efect hiperproliferativ. În culturile de MC tratate cu 100 μ M VAS se observă desprinderea celulelor de pe suport, scăderea numărului de celule aderate care au un fenotip modificat. Dendritele suferă un proces de ramificare intern, anastomozare, iar corpul celular este crescut și puternic pigmentat. Tratamentul MC cu VAS 10, 50 și 100 μ M nu afectează viabilitatea celulelor evaluată prin testul cu Trypan Blue, dar crește gradul de proliferare al lor, proporțional cu doza aplicată. Introducerea în mediul de cultură a unor doze de 1 și 10 mM VAS scade viabilitatea culturii și proliferarea celulelor, în cel mai mare grad la concentrația maximă de 10 mM. La dozele mici nu apar efecte citotoxice, dar la concentrații mai mari (1 mM și 10 mM) se observă un proces de necroză celulară.

Având în vedere aceste observații s-a considerat necesară determinarea conținutului în melanine din MC supuse diferitelor tratamente deoarece 1) funcția principală a MC este sinteza de melanine cu rol fotoprotector; 2) în cursul reacțiilor de polimerizare din melanogeneză se formează H₂O₂ și poate și alte SRO și 3) în literatura de specialitate există rezultate contradictorii. Tratamentul MC cu VAS nu afectează semnificativ conținutul în melanine la concentrații mici (10 – 100 μ M) și stimulează melanogeneza la doze mari (1 mM și 10 mM) – proporțional cu doza, fapt observat și la microscopul în contrast de fază. Deci concentrațiile mici de VAS induc o creștere în proliferarea celulelor fără a afecta melanogeneza, în timp ce scăderea proliferării în cazul tratamentului cu doze mari citotoxice este asociată cu creșteri în conținutul melaninelor de 2,14 și 3,3 ori la 1 mM și respectiv 10 mM VAS. MC care mor în cultură sunt extrem de pigmentate datorită probabil acumulării unor produși finali melaninici citotoxici ce nu pot fi diluați prin diviziunea celulară. Studiile noastre arată că din toate variantele de tratamente luate în studiu, numai incubarea melanocitelor cu VAS, în doze de 1 mM și 10 mM crește melanogeneza într-o manieră proporțională cu doza.

Pentru a obține informații privind statusul oxidativ al MC tratate cu VAS, s-au studiat doi parametri: nivelul GSH și conținutul în MDA ca marker al peroxidării lipidelor membranare. Introducerea în mediu a diferitelor concentrații de VAS scade nivelul GSH într-o manieră proporțională cu doza, ceea ce sugerează consumul GSH în reacții de apărare antioxidantă contra SRO produse în urma tratamentului. Nivelul MDA este relativ constant la doze de 10 – 100 μM VAS indicând că SRO formate sunt « stinse » de sistemele antioxidante din melanocite și nu produc peroxidarea lipidelor membranare. VAS, în concentrații de 1 mM și 10 mM nivelul MDA crește de 2,22 și respectiv de 4,13 ori indicând incapacitatea sistemului antioxidant din melanocite de a face față stresului oxidativ. SRO formate stimulează melanogeneza, probabil ca o măsură de protecție contra atacului oxidativ.

Pentru verificarea concluziilor acestor experimente privind acțiunea VAS s-a studiat producția generală oxidantă a celulelor prin metoda descrisă de **Royall și Ischiropoulos [1993]**, care permite evaluarea în principal a H_2O_2 . Se constată VAS în doze mici (10 și 50 μM) nu induce formarea SRO în MC tratate, în timp ce concentrații de 100 μM , 1 mM și 10 mM VAS produc cantități crescânde de SRO. Rezultatele sunt în concordanță cu creșterea nivelului peroxidării lipidice și scăderii capacității sistemului GSH/GSSG de a stinge aceste specii hiperreactive.

Având în vedere rezultatele prezentate, precum și costul studiilor de citometrie în flux, studiul primelor etape ale apoptozei au fost realizate numai pe MC tratate cu VAS. La flow-citometru au fost analizate probe de MC tratate cu trei concentrații de VAS 10 μM , 100 μM și 10 mM., marcate dublu cu FITC-A și cu IP. Analizele realizate arată că 16,7 % din celulele culturii control sunt în apoptoză, tratamentul cu 10 μM și 100 μM VAS conduce la creșterea apoptozei la 23,3 % și respectiv 34,6 % din totalul celulelor, în timp ce în cazul MC incubate 24 ore cu doza maximă de VAS 80,3 % din celule sunt în apoptoză. Analiza aceluiași date prin exprimarea fluorescenței PI care indică necroza celulară arată tratamentul cu VAS 10 mM induce necroza în 62,4 % din MC. Celulele control, tratate cu 10 μM și 100 μM VAS au un procent mic de celule necrozate.

Fragmentarea DNA, ca stadiul final al apoptozei, în urma tratamentului cu VAS a fost evaluată utilizând kitul ELISA « *cell death detection* ». Datele obținute care arată că tratamentul MC cu VAS 1 mM și 10 mM produce o intensă apoptoză sunt în acord cu rezultatele studiilor de citometrie în flux.

MC au fost tratate cu două concentrații de SES 50 μM și 100 μM care nu afectează viabilitatea celulară având un efect stimulator asupra proliferării, a cărei mărime nu este dependentă de doza aplicată. De asemenea, aceste tratamente nu afectează procesul de melanogeneza. În schimb, tratamentul cu două doze de SES scade nivelul MDA cu 45,8 %, respectiv cu 58,2 % sugerând implicarea acestui compus anorganic al Se în captarea SRO și efectul protector al tratamentului față de stresul oxidativ, probabil prin activarea GSH-Px care catalizează reacția $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{G-S-S-G} + 2\text{H}_2\text{O}$ și îndepărtează SRO. Tratamentele cu SES nu afectează nivelul GSH ceea ce sugerează că sistemul tampon redox GSH/GSSG funcționează optim. Studiul evoluției nivelului GSH și al peroxidării lipidice în urma tratamentelor cu SES (100 μM și 200 μM) oferă o protecție antioxidantă acestor celule din epidermă. De asemenea, tratamentul cu SES este puternic protector pentru MC scăzând cu 41,2 - 47,6 % nivelul SRO în MC tratate, probabil prin activarea enzimelor și proteinelor Se-dependente (glutation peroxidaza, tioredoxin reductaza, etc).

Tratamentul MC cu GLC 10 mM nu afectează sensibil viabilitatea și proliferarea celulelor. Incubarea MC cu GLC 27,5 mM, timp de 24 ore, scade atât viabilitatea cât și proliferarea celulelor, într-un grad mai mare cel de al doilea parametru, sugerând afectarea funcției mitocondriale. Incubarea MC timp de 24 ore cu ambele concentrații de GLC 10 mM și 27,5 mM nu afectează semnificativ conținutul în melanine, nivelul GSH, SRO și nu induce procese de peroxidare lipidică.

UVR este stimulul major al pigmentării pielii *in vivo*, al proliferării MC *in vitro* și al producției melaninelor, dar mecanismele care conduc la această activare nu sunt încă elucidate. În studiile noastre, culturile de MC au fost iradiate cu diferite doze UVA cuprinse între 6,84 și 41,04 J/cm^2 . Iradierea UVA a MC arată că aceste celule sunt mai sensibile decât KC, la doza maximă de 41,04 J/cm^2 observându-se scăderea viabilității lor cu $25,2 \pm 2,9$ %. Efectele citotoxice cresc cu timpul de iradiere, la 41,04 J/cm^2 eliberarea LDH din celulă crescând de circa

2,2 ori. Nivelul SRO din MC este în general mai scăzut, probabil datorită rolului scavanger al melaninelor prezente în aceste celule epidermice. Numai la doze mari de UVAR conținutul intracelular de SRO crește dar numai cu 28 %. Iradierea UVA a culturilor de MC nu este soldată cu creșterea semnificativă a nivelului lipidelor intracelulare peroxidate, decât la doza maximă 41,04 J/cm² când acest nivel crește numai cu 41 %. Aceste studii sugerează existența unor mecanisme antioxidante eficiente, printre care și pigmentii melaninici, care conferă o rezistență redox mai mare melanocitelor în comparație cu KC. Compararea tuturor datelor experimentale obținute la iradierea UVA a culturilor de MC arată scăderea viabilității celulare și creșterea citotoxicității tratamentului proporțional cu doza aplicată, într-un grad mai mare decât în cazul KC. Totuși speciile SRO apar numai la doze $\geq 27,36$ J/cm², iar peroxidarea lipidelor intracelulare este evidentă numai la doza UVAR maximă (41,4 J/cm²) sugerând pe de o parte existența unui sistem antioxidant mai activ în MC decât în KC, iar pe de altă parte faptul că citotoxicitatea UVAR în MC nu este datorată numai SRO. Studiile de apoptoză realizate cu kitul ELISA «*Cell death detection*» pe melanocite - control, iradiate UVA cu 41,4 J/cm² au arătat că în stare bazală MC prezintă un grad mai mare de apoptoză (cu 23,5 %) decât KC în acord cu rezultatele studiilor de citotoxicitate în care se observă o eliberare semnificativă de LDH din celulă în mediu chiar în lipsa iradierilor. Această apoptoză bazală crescută poate explica și faptul că MC sunt celule greu de cultivat și au un grad de proliferare scăzut. UVAR crește apoptoza MC cu $71,9 \pm 9,5$ %.

Culturile de MC au fost GI cu doze de 2, 4 și 8 Gy la o rată a dozei de 0,0629 Gy/sec, la temperatura camerei. Evaluările au fost realizate după 48 ore de la GI. Iradierea MC scade viabilitatea celulelor, progresiv cu mărirea dozei, la 8 Gy — cu 51,5 %. Studiul citotoxicității GI asupra MC arată că doza minimă de 2 Gy nu afectează membrană lor plasmatică, la doze mai mari apărând fenomene de toxicitate (la doza maximă citotoxicitatea tratamentului crește de ~2,8 ori). Nivelul SRO în MC nu este afectat de doza minimă (2 Gy) dar crește la doze mai mari: cu 103,3 % la 4 Gy și cu 191,7 % la 8 Gy. Concordanța rezultatelor obținute în studii de citotoxicitate și de dozare a SRO intracelulare sugerează că citotoxicitatea GI este datorată majoritar SRO formate intracelular. Dozarea TBARS ca marker al stresului oxidativ indus de radiații arată că MC sunt sensibile la stresul oxidativ dezvoltat de iradierea γ care induce peroxidarea lipidelor în doze mai mici. Nivelul peroxidizilor lipidici din melanocite crește cu 100 % la o doză de 4 Gy și cu 211 % la 8 Gy. Compararea tuturor rezultatelor obținute în studiul GI arată că MC sunt mai afectate decât KC, prezentând o viabilitate mai mică și o citotoxicitate mai mare. Nivelul speciilor SRO este mai crescut în MC, unde la doze ≥ 4 Gy când sunt observate procese de peroxidare a lipidelor. Studiile de apoptoză realizate cu kitul Roche ELISA pe MC control și GI cu 8 Gy arată că iradierea induce grade similare de apoptoză în MC și KC.

Datele obținute de noi sugerează căi de semnalizare intracelulare diferite ale radiațiilor UVA și γ , cel puțin în cazul MC.