



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00471**

(22) Data de depozit: **10/08/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **MANDA GINA, STR.DR.EUGEN O.IOSIF
NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DOBRE MARIA, STR.DOCTOR NICULAE
D.STAICOVICI, NR.53, SC.A, AP.1,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NEAGOE IONELA VICTORIA,
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35, SC.
A, AP. 47, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ DE TESTARE ȘI CERCETARE A EFECTELOR
EXERCITATE LA NIVEL CELULAR DE APA TRITIAȚĂ
UTILIZÂND MODIFICĂRI DE EXPRESIE A UNOR GENE
DE STRES**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de testare in vitro a efectelor exercitate la nivel celular de apa tritiată, utilizând modificările de expresie a unui ansamblu de gene de stres în monocite umane din linia SC. Metoda, conform invenției, constă în etapele: cultivarea și tratarea cu apă tritiată a monocitelor umane din linia SC, evaluarea prin testul reducerii unei sări de tetrazoliu a viabilității celulelor tratate, comparativ cu celulele control netratate, selecția unor concentrații sub-toxice de apă tritiată la concentrațiile radioactive selectate, realizarea reacției

qRT-PCR pentru un ansamblu de 5 gene de stres (GSR, CD40 LG, BBC3, IL1A și CCL2) și 2 gene de referință (GAPDH și HPRT1) în vederea evaluării modificărilor de expresie genică induse de expunerea la diverse concentrații radioactive necitotoxice de apă tritiată.

Revendicări: 2
Figuri: 6



OFICIUL	PENTRU INVENȚII ȘI MARCI
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 ep 471
Data depozit10-08-2021	

63

12.2. DESCRIEREA INVENȚIEI

METODĂ DE TESTARE ȘI CERCETARE A EFECTELOR EXERCITATE LA NIVEL CELULAR DE APA TRITIAȚĂ UTILIZÂND MODIFICĂRI DE EXPRESIE A UNOR GENE DE STRES

INTRODUCERE

Prezenta invenție se referă la o metodă de testare *in vitro* a efectelor la nivel celular ale apei tritiate, utilizând modificările de expresie a unui ansamblu de gene de stres în monocitele umane din linia SC.

Domeniul de utilitate al metodei revendicate în invenție este impactul asupra sănătății al apei tritiate generate ca produs secundar în activitatea centralelor nucleare-electrice de tip CANDU (Canadian Deuterium Uranium), cum ar fi cea de la Cernavodă, la care pot fi expuși accidental lucratorii și populația din zonele limitrofe.

Invenția răspunde nevoii actuale de dezvoltare a unor noi metode de testare *in vitro* a efectului biologic la nivel celular al apei tritiate, pentru caracterizarea impactului expunerii la apă tritiată asupra sănătății. Metoda revendicată prin prezenta invenție, se referă la un ansamblu de gene cu expresie modificată datorită expunerii celulelor la apă tritiată. Metoda se poate utiliza de asemenea pentru testarea *in vitro* a unor co-terapii cu rol de contracarare a efectelor nocive ale expunerii celulelor la apă tritiată.

JUSTIFICARE

Tritiul este singura formă radioactivă a hidrogenului (^3H), care în cursul dezintegrării la heliu emite particule beta cu o energie maximă de 18 keV și o energie medie de 5.7 keV (*Institut de Radioprotection at Surete Nucleaire. Radionuclide fact sheet. Tritium and the environment, https://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/environment/Documents/Tritium_UK.pdf*).

Tritiul este generat în principal ca produs secundar în reactoarele nucleare-electrice de tip CANDU care utilizează apă grea și uraniu (*Le Guen B. Impact of tritium around EDF nuclear power plants. J Radiol Prot 2009, 29:163–173*). Din interacția neutronilor generați în timpul fisiunii uraniului cu moderatorul și cu apa grea din instalațiile de răcire rezultă aproximativ 10^{16} Bq/an tritii. În viitorul apropiat se previzionează creșteri ale cantității de tritii ca urmare a implementării celei de-a treia generații de centrale nucleare-electrice (*Commission opinion of 3 June 2021 relating to the plan for the disposal of radioactive waste arising from the*



Sizewell C power station site (two UK EPR reactors), located in Suffolk, United Kingdom 2021/C 221/01 - <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3febe6b6-c985-11eb-84ce-01aa75ed71a1/language-en>).

Tritiul poate exista sub formă de apă tritiată sau gaz tritiat. Deși tritiul are un timp de înjumătățire mare de 12,33 ani, timpul său de înjumătățire biologică este mult mai scurt, de aproximativ 40 zile când tritiul este în forma anorganică, și de aproximativ 10 zile când tritiul este sub formă de apă tritiată (*Tritiated Water Task Force, iunie 2016 - https://www.meti.go.jp/english/earthquake/nuclear/decommissioning/pdf/20160915_01a.pdf*). Tritiul se găsește în materia organică ca tritiu liber de apă ("free water tritium") și ca tritiu legat la materia organică, acesta din urmă absorbindu-se repede în organism, ceea ce are drept consecință un timp biologic de înjumătățire mai lung.

Strategiile de management ale tritiului în centrale nucleare de tip CANDU, barierele construite în astfel de centrale, ca și implementarea unor procedee de detritiere și de reutilizare ale apei grele au fost până în prezent capabile să minimizeze probabilitatea de scurgere a apei grele și a tritiului. Totuși, există un risc să se producă contaminarea lucrătorilor în cursul manipulării deșeurilor de tritiu sau în cursul unor accidente nucleare minore. De exemplu, concentrația de tritiu în apa mării la Fukushima (la o adâncime de 200 – 300 m) a fost de 0.07 Bq/L înainte de accidentul nuclear din martie 2011, și a crescut la o valoare de 0.15 Bq/L după accident (*Tritiated Water Task Force, iunie 2016 - https://www.meti.go.jp/english/earthquake/nuclear/decommissioning/pdf/20160915_01a.pdf*).

Se apreciază faptul că, prin infiltrarea tritiului în apa freatică sau în mări și oceane un întreg lanț trofic poate fi perturbat (*Adam-Guillermine C, Pereira S, Della-Vedova C, Hinton T, Garnier-Laplace J. Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals. Rev Environ Contam Toxicol 2012, 220: 67-103*). Astfel, poate să fie afectată chiar și populația generală datorită ingestiei de tritiu prin intermediul apei și al hranei, printre altele datorită consumului de organisme marine (*IAEA-TECDOC-1638, Setting Authorized Limits for Radioactive Discharges: Practical Issues to Consider*).

Deși tritiul este mult mai puțin dăunător sănătății decât cesiul, se consideră totuși că expunerea internă cronică la apă tritiată poate reprezenta un risc pentru sănătate datorită incorporării dinamice a tritiului în biomolecule și în precursori ai ADN, cu efecte pe timpul vieții celulelor, care se transmit chiar la progenitorii acestora (*Harrison JD, Khurshid A, Lambert BE. Uncertainties in dose coefficients for intakes of tritiated water and organically bound forms of tritium by members of the public. Radiat Prot Dosimetry 2002, 98: 299–311*).



În acest context, organismele de reglementare au stabilit limite maxime pentru tritiiu în apa de băut, care să fie suficient de sigure pentru a nu induce efecte carcinogenice. Astfel, 100 Bq/L este concentrația radioactivă recomandată în Uniunea Europeană, 740 Bq/L în SUA, 30.000 Bq/L limita pentru tritiiu în Finlanda, iar Organizația Mondială a Sănătății recomandă o limită de 10.000 Bq/L (*Dingwall S, Mills CE, Phan N, Taylor K. Human Health and the Biological Effects of Tritium in Drinking Water: Prudent Policy Through Science – Addressing the ODWAC New Recommendation. Dose Response 2011, 9(1): 6–31*). Interesant, se propune ca limita de 7.000 Bq/L utilizată în Canada (Canadian Nuclear Safety Commission, 2008) să fie redusă la 20 Bq/L, pentru a preîntâmpina potențiale efecte nocive ale tritiului pe termen lung. Deși limitele de concentrație ale tritiului în apa de băut au fost stabilite din perspectiva potențialelor efecte carcinogenice, studii recent realizate pe bacterii au arătat faptul că tritiiu poate afecta celulele și prin intensificarea unor procese transmembranare care sunt probabil activate prin ionizare și radioliză a mediilor apoase de către radiațiile beta de energie joasă emise de tritiiu (*Rozhko TV, Badun GA, Razzhivin IA, Guseynov OA, Guseynov VE, Kudryashev NS. On the mechanism of biological activation by tritium. Journal of Environmental Radioactivity 2016, 157: 131-135*). Aceste efecte se datorează parcursului mai scurt a electronilor beta emiși de tritiiu (6 μm) comparativ cu dimensiunile unei celule (10-20 μm). În plus, Straume și Carsten au arătat că efectele radiobiologice ale apei tritiate descrește cu creșterea dozei și a debitului de doză (*Straume T, Carsten AL. Tritium radiobiology and relative biological effectiveness. Health Phys 1993, 65: 657–672*), atenționând asupra potențialelor efecte biologice ale unor concentrații relativ joase de apă tritiată.

DESCRIERE

1. Metoda propusă în invenție

Metoda propusă în invenție constă în etapele descrise succint în **Schema 1**, care se realizează conform metodologiei prezentate detaliat mai jos.

1.1 Mediu de cultură. Mediu de cultură Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% supliment HT (ThermoFisher Scientific), care conține 10 mM sodium hipoxantină sodică și 1.6 mM timidină, și cu 1% soluție stabilizată de antibiotice-antimicotice (Sigma-Aldrich) care conține 10.000 unități de penicilină, 10 mg streptomycină și 25 μg amfotericină B per mL. Acest mediu de cultură cu supliment este denumit în continuare mediu de cultură complet.

1.2 Apă tritiată. Apa tritiată (AT) se poate obține prin comandă la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară „Horia Hulubei” (Măgurele,



[Handwritten signature]

România), care va realiza și diluarea AT în mediu de cultură complet (preparatul radioactiv este denumit în continuare mediu de cultură AT) pentru a se obține concentrațiile radioactive de testat în sistem celular.

1.3 Celule. Se utilizează monocite umane din linia SC (CRL-9855) care se procură de la American Tissue and Cell Collection (ATCC, US. <https://www.atcc.org/products/crl-9855>). Linia celulară proliferativă, cu caracteristici de monocite/macrofage umane netransformate neoplazic, a fost stabilizată prin pasaje succesive din celule mononucleare periferice umane (Collins GW, Largen MT. *Continuous mammalian cell lines having monocyte/macrophage characteristics and their establishment in vitro*. US Patent 5,447,861 dated Sep 5 1995). Celulele neaderente SC se mențin în cultură și se multiplică în mediul de cultură complet descris la punctul 1.1, la 37°C, în atmosferă de 5% bioxid de carbon. În funcție de rata de multiplicare a celulelor, pasajul culturii se realizează periodic (de exemplu, la 48-72 h), astfel încât densitatea celulelor în cultură să nu depășească 1×10^6 celule/mL. După fiecare pasaj, celulele se recultivă la o densitate inițială de $0.4-0.5 \times 10^6$ celule/mL. Numărarea celulelor se realizează la microscopul optic într-un hemocitometru (cum ar fi camera de numărare Burkert-Turk), iar viabilitatea celulară se determină prin metoda excluziei unui colorant vital, cum ar fi albastrul de tripan (Strober W. *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. *Current Protocols in Immunology* 1997, 21: A.3B.1-A.3B.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>). În experimente se utilizează celule SC cu rată stabilă de multiplicare (de exemplu, între pasajele 4 și 15) și cu viabilitate mai mare de 95%. Periodic se verifică potențiala contaminare a celulelor cu micoplasmă, utilizând serviciile unui laborator acreditat.

1.4 Tratarea celulelor SC cu AT. Celulele SC la densitatea de 0.5×10^6 celule/mL, suspendate în mediu de cultură complet (probe control) sau în mediu de cultură AT cu diverse concentrații radioactive (probe AT), se plasează în flask-uri sau plăci de cultură, în funcție de testul care va fi realizat. Pasajul celulelor în probele control sau în probele AT se realizează la 48 h prin diluare $\frac{1}{2}$ în mediu de cultură complet sau în mediu de cultură AT cu diverse concentrații radioactive.

1.5 Evaluarea viabilității celulare cu testul reducerii unei săruri de tetrazoliu. Pentru evaluarea viabilității celulelor SC pe parcursul tratării lor cu AT, comparativ cu celule netratate cu AT (control), se utilizează o metodă colorimetrică de determinare a reducerii unei săruri de tetrazoliu. De exemplu, se utilizează compusul tetrazolic MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliu] în amestec cu etosulfatul de fenazină, care constituie reactivul de reacție al kitului CellTiter

96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (*Promega*, https://www.promega.ro/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay_mts_/?catNum=G3582). Compusul tetrazolic MTS este bioredux de către celule prin intermediul NADPH sau NADH generate de către dehidrogenaze în celulele metabolice active (*Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys 1993, 303, 474–82*), rezultând un produs colorat de formazan care este solubil în mediul de cultură și a cărui concentrație se determină colorimetric la o lungime de undă 490 nm față de o referință de 620 nm. Dependența intensității reacției de reducere a MTS de numărul de celule SC din probe se determină anterior inițierii experimentelor, întrucât un număr prea mare de celule în probă poate altera rezultatele datorită saturării reacției (vezi Exemplul 1). De asemenea, prealabil experimentării, se stabilește momentul optim pentru citirea intensității reacției de reducere a MTS (vezi Exemplul 1). Pe scurt, 100 μL suspensie de celule SC din fiecare probă (realizată în triplicat) se incubă cu 20 μL din reactivul kitului timp de 60-120 min la 37°C, la întuneric, într-o placă de cultură cu 96 godeuri. Pe lângă probele celulare (tratate sau netratate cu AT), se realizează probe acelulare, conținând numai mediu de cultură complet și/sau mediu de cultură AT, pentru determinarea valorii de fond a reacției. Intensitatea reacției de reducere a MTS în probe se determină la un cititor ELISA, la lungimea de undă de 490 nm față de lungimea de undă de referință de 620 nm. Datele primare sunt citirile de densitate optică (DO) la lungimile de undă mai sus menționate. Valorile DO în probele celulare se corectează prin scăderea fondului (valoarea medie a DO în probele acelulare). Efectul AT se calculează în fiecare probă a triplicatului tratat cu AT cu ajutorul formulei

$$\text{Efect AT (\%)} = \frac{\text{DO în proba tratată cu AT}}{\text{Valoare medie a DO în probele netratate cu DO (probe control)}} \times 100. \text{ Pentru}$$

fiecare tip de probă se face media efectelor înregistrate în fiecare probă a triplicatului. Interpretarea rezultatelor se face astfel: 1) efectele AT cu valori mai mici de 90% indică citotoxicitate; 2) efectele AT cu valori mai mari de 100% indică intensificarea proliferării celulare sau activarea oxidoreductazelor care realizează reducerea MTS.

1.6 Izolarea ARN. Probe celulare, conținând minim 2×10^6 celule, se centrifughează 5 min la 1200 rpm. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul celular se reia în 2 mL tampon fosfat salin rece (de la frigider sau ținut pe gheață). Probele se centrifughează 5 min la 1200 rpm și 4°C. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul celular se reia într-un mL de



reactiv de extracție a ARN (cum ar fi reactivul Ribozol de la VWR), se omogenizează și se stochează la -80°C până la extracția ARN. După dezghețare proba se ține la temperatura camerei 5 min pentru a permite disocierea completă a complexului nucleo-proteic. Se adaugă 200 μL cloroform, se agită 15 secunde, se ține 3 minute la temperatura camerei, se centrifugează 15 minute la $12.000 \times g$, 4°C . Faza apoasă (conține ARN) se recoltează cu grijă și se transferă într-un tub Eppendorf PCR clean. Urmează precipitarea și spălarea ARN. Se adaugă 0,5 mL de izopropanol 100%, se omogenizează prin pipetare, se ține 10 min la temperatura camerei după care se centrifughează 10 min la $12.000 \times g$, 4°C . Se îndepărtează supernatantul cu grijă fără a atinge peletul (ARN), se adaugă peste pelet 1 mL etanol 75%, se omogenizează prin pipetare, se centrifughează 10 min la $7500 \times g$, 4°C . Se îndepărtează supernatantul cu grijă fără a atinge peletul (ARN) și se lasă tubul Eppendorf cu capacul deschis timp de 5 - 10 min până la uscarea completă a ARN. Pentru hidratarea și omogenizarea ARN se adaugă 50 μL apă pură liberă de nucleaze și se agită conținutul prin pipetare blândă. Se determină spectrofotometric calitatea și cantitatea ARN obținut și se stochează la -80°C .

1.7 Revers transcrierea ARN. Revers-transcrierea (sinteza primei catene ADNc pe matrită de ARNm), se realizează cu ajutorul RT² First Strand PCR Array kit și cuprinde următoarele etape:

- Eliminarea ADN genomic

Componentele amestecului necesar unei reacții sunt: 1 μL GE (5x gDNA Elimination Buffer), 250 ng ARN total și apă pură liberă de nucleaze până la obținerea unui volum total de 5 μL . Se pipetează componentele amestecului într-un tub PCR, se omogenizează amestecul prin pipetare, se centrifughează scurt, se incubează la 42°C , 2 min, apoi 1 minut pe gheață.

- Prepararea amestecului pentru sinteza primei catene de ADNc

Amestecul se prepară și se păstrează pe gheață până la utilizare. Componentele amestecului sunt: 2 μL BC3 (5x Buffer 3), 0,5 μL P2 (Primer and External Control Mix), 1 μL RE3 (RT Enzyme Mix 3) și 1,5 μL apă fără RN-aze. Se adaugă cei 5 μL amestec pentru revers-transcriere la fiecare 5 μL amestec inițial, se agită blând prin pipetare, incubare la 42°C , 15 min, urmată de stoparea reacției la 95°C timp de 5 min. Se adaugă 45,5 μL apă pură liberă de nucleaze. Produsul se utilizează imediat pentru real-time PCR sau se păstrează până la utilizare la -20°C .



1.8 Evaluarea nivelului de expresie a genelor de stres. Genele propuse pentru a fi evaluate sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1. Genele din metoda propusă în invenție conform GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Simbol	Descriere	GenBank
IL1A	Interleukin 1, alpha	NM_000575
CD40LG	CD40 ligand	NM_000074
BBC3	BCL2 binding component 3	NM_014417
GSR	Glutathione reductase	NM_000637
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_002982

Pentru realizarea reacției PCR se utilizează kitul RT² SYBR Green Mastermix Kit (Qiagen). Componentele amestecului pentru o reacție într-un tub PCR sunt următoarele: 12,5 μ L 2x RT² SYBR Green Mastermix, 1 μ L ADNc, 1 μ L RT Primer assay, 10,5 μ L apă pură liberă de nucleaze.

– Programul PCR

1. Denaturare 95°C 10 min
2. Amplificare 40 cicluri
 - 95°C 15 sec
 - 60°C 1 min
3. Curba de topire (program implicit al aparatului).

1.9 Analiza rezultatelor. La finalul amplificării tuturor probelor se stabilește valoarea prag la 0,150 (aceeași pentru toate probele). Prin trasarea valorii prag se obțin valorile CT (threshold cycle) care reprezintă numărul ciclului la care valoarea prag intersectează curba de amplificare. Calculul nivelului de exprimare a unei gene se realizează pe baza valorii CT. În prima etapă a acestui calcul se aleg genele de referință și se realizează normalizarea valorilor CT prin intermediul genelor de referință, utilizându-se formula $\Delta CT = CT(GI) - CT(MG)(GR)$, unde GI = gena de interes, MG = media geometrică, GR = gena de referință. Genele de referință în cazul tratării celulelor SC cu AT sunt: GAPDH și HPRT1, al căror nivel de expresie nu este influențat de condițiile experimentale (tratarea celulelor SC cu AT).

După normalizare, se calculează valoarea $\Delta\Delta CT$ pentru identificarea expresiei genice relative, astfel: $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{probă}) - \Delta CT(\text{control})$.

Valoarea "fold change" (FC) a fiecărei gene de interes comparativ cu aceeași genă din grupul control (netratat cu AT) este dată de valoarea $2(-\Delta\Delta CT)$. O valoare FC supraunitară



indică supraexpresia genei de interes, în timp ce o valoare subunitară indică subexpresie genică. O variantă alternativă de procesare a datelor de expresie genică se poate face utilizând mărimea "fold regulation" (FR), care se calculează pe baza valorilor FC. FR are valori pozitive supraunitare egale cu FC atunci când gena este supraexprimată, și are valori negative supraunitare date de formula $FR = -1/FC$ pentru genele subexprimate. Cu ajutorul mărimii FC se poate face diferențierea netă a genelor supraexprimate (valori FC supraunitare pozitive) de cele subexprimate (valori supraunitare negative).

2. Alte metode utilizate pentru demonstrație în capitolul Rezultate

2.1. Evaluarea apoptozei și a necrozei prin citometrie în flux

Apoptoza și necroza celulelor SC în diverse sisteme experimentale a fost evaluată prin citometrie în flux, utilizând anexina V ca marker de apoptoză și iodura de propidiu ca marker de apoptoză târzie și de necroză. A fost utilizat kitul Annexin V- Propidium iodide (BioLegend). Pe scurt, celulele SC (aproximativ 300000 celule) au fost spălate prin centrifugare cu TFS rece, după care au fost resuspendate în tamponul de legare a anexinei din kitul mai sus menționat. Celulele au fost marcate timp de 15 min. la întuneric, cu 5 μ L anexină V-FITC (An) și 10 μ L iodură de propidiu (IP). În final, reacția a fost stopată prin adăugarea a 400 μ L tampon de legare a anexinei. Probele au fost citite într-un interval de maxim 30 min la un citometru în flux (Bd FACSCanto, Becton Dickinson). Pentru fiecare probă au fost achiziționate minim 5000 evenimente. Excitarea fluoroforilor s-a realizat cu laserul de 488 nm iar emisia a fost înregistrată în canalul FL1 (verde) pentru An și în canalul FL3 (roșu) pentru IP. Achiziția și procesarea datelor de fluorescență s-a realizat cu programul BD FACSDiva (Becton Dickinson). Celulele apoptotice și cele necrotice au fost identificate astfel: 1) celule în apoptoză timpurie An+/PI-; 2) celule în apoptoză târzie AN+/IP+; 3) celule necrotice An-/IP+.

2.2. Identificarea prin PCR array a genelor de stres cu expresie modificată

Pentru identificarea genelor de stres s-a utilizat kitul RT² Profiler™ PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinder (Qiagen, PAHS-003Z) iar genele investigate sunt prezentate în Tabelul 2.

Toate probele utilizate în experimente au avut concentrații de ARN mai mari de 100 ng/ μ L, valorile raportului A260:A230 au fost $1,80 \div 1,98$, iar valorile raportului A260:A280 au fost $1,7 \div 2,1$.

Tabel 2. Genele de stres cărora li se adresează kitul RT² Profiler™ PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinder (Qiagen, PAHS-003Z).

Stres genotoxic		
Blocarea ciclului celular: CDKN1A (p21CIP1, WAF1), CHEK1, CHEK2 (RAD53), DDIT3 (GADD153, CHOP), HUS1, MRE11, NBN, RAD17, RAD9A		Alte răspunsuri induse de alterarea ADN: ATM, ATR, DDB2, GADD45A, GADD45G, RAD51, TP53 (p53), XPC.
Moarte celulară		
Apoptoză: CASP1 (ICE), FAS, MCL1, TNFRSF10A (TRAIL-R), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF1A (TNFR1)	Necroză: FAS, GRB2, PARP1 (ADPRT1), PVR, RIPK1, TNFRSF10A (TRAIL-R)	Autofagie: ATG12, ATG5, ATG7, BECN1, FAS, ULK1
Stres oxidativ: FTH1, GCLC, GCLM, GSR, GSTP1, HMOX1, NQO1, PRDX1, SQSTM1, TXN, TXNRD1		Hipoxie: ADM, ARNT, BNIP3L, CA9, EPO, HMOX1, LDHA, MMP9, SERPINE1 (PAI-1), SLC2A1, VEGFA
Stres osmotic: AKR1B1, AQP1, AQP2, AQP4, CFTR, EDN1, HSPA4L (OSP94), NFAT5, SLC5A3		Stres inflamator: CCL2 (MCP-1), CD40LG, CRP, CXCL8 (IL8), IFNG, IL1A, IL1B, IL6, TLR4, TNF

2.2.1 Revers-transcrierea ARN.

Revers-transcrierea (sinteza primei catene ADNc pe matriță de ARNm), s-a realizat cu ajutorul kit-ului RT² First Strand PCR Array și a cuprins următoarele etape:

- Eliminarea ADN genomic. Componentele amestecului pentru o probă au fost următoarele: 2 μ L GE (5x gDNA Elimination Buffer), 500 ng ARN total și apă fără RN-aze până la realizarea unui volum final de 10 μ L. S-a omogenizat amestecul prin pipetare, urmată de centrifugare scurtă, incubare la 42°C timp de 5 min, urmată de stoparea reacției pe gheață timp de 1 minut.
- Prepararea RT Cocktail pentru sinteza primei catene de ADNc. Componentele amestecului pentru o probă sunt: 4 μ L BC3 (5x Buffer 3), 1 μ L P2 (Primer and External Control Mix), 2 μ L RE3 (RT Enzyme Mix 3), 3 μ L apă fără RN-aze. S-au adăugat 10 μ L RT Cocktail la fiecare 10 μ L Genomic DNA Elimination Mixture, agitare blândă prin pipetare, incubare la 42°C, 15 min, urmată de stoparea reacției la 95°C timp de 5 min, adăugare 91 μ L apă fără nucleaze la fiecare 20 μ L cDNA.

2.2.2 Pregătirea amestecului PCR și a plăcii de reacție. Amestecul PCR s-a realizat conform indicațiilor producătorului și a constat în: 1320 μ L 2x RT² SYBR Green Mastermix, 102 μ L ADNc și 1248 μ L apă pură liberă de nucleaze, iar reacția de amplificare s-a realizat după următorul program: a) Denaturare (95°C, 10 min); b) Amplificare 40 cicluri: 95°C, 15 s - 60°C, 1 min; c) Curba de topire (program implicit al aparatului).



2.2.3 Analiza rezultatelor s-a realizat conform algoritmului descris la punctul 1.9.

REZULTATE

Exemplul 1

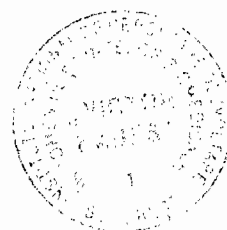
Într-o primă etapă s-a realizat un studiu pentru identificarea unor concentrații radioactive de AT care nu exercită efecte citotoxice la nivelul monocitelor umane din linia SC.

Demonstrația s-a realizat prin testul reducerii MTS care furnizează informații privind numărul de celule metabolice active în cultură, respectiv celule care prezintă dehidrogenaze generatoare de NADPH sau NADH funcționale, capabile să reducă agentul de detecție (MTS) (*Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. 303, 474–82).*

Dependența intensității reacției de reducere a MTS de numărul de celule SC din cultură este prezentată în **Figura 1**. Datele experimentale arată liniaritatea reacției în domeniul 1.000 - 70.000 celule SC/probă, cu valori ale densității optice (DO) mai mari ca 0,3 în domeniul 10.000-70.000 celule/probă. La un număr de celule mai mare de 80.000 celule/probă reacția de reducere a MTS a intrat în saturare, iar rezultatele nu mai prezintă confidență. Pe baza analizei pantelor dreptelor, se constată că cea mai bună discriminare a numărului de celule din probă se obține la 120 min de la inițierea reacției de reducere a MTS.

În intervalul de concentrații radioactive ale AT de (10 – 40) kBq/L nu s-au înregistrat scăderi ale intensității reacției de reducere a MTS după 48 h și 96 h de expunere continuă a celulelor SC la AT (**Figura 2**). Aceste rezultate au fost confirmate de faptul că nu s-au detectat creșteri ale procentului de celule apoptotice sau necrotice la 96 h de expunere continuă a celulelor SC la 40 kBq/L AT (**Figura 3**). Astfel, datele experimentale indică faptul că AT nu afectează viabilitatea celulară în intervalul de concentrații radioactive (10 – 40) kBq/L.

La concentrații radioactive mai mari de AT, respectiv de 80 kBq/L, se înregistrează însă o scădere semnificativă a reducerii MTS ($p < 0,05$; **Figura 2**), însoțită de creșterea procentului de celule în apoptoză timpurie (**Figura 3**), fără ca procentul de celule necrotice să crească. Aceste rezultate evidențiază faptul că AT, la concentrația radioactivă de 80 kBq/L, a indus efecte citotoxice la nivelul monocitelor SC, reducând semnificativ numărul de celule metabolice active și crescând în același timp procentul de celule apoptotice.



Conform datelor prezentate mai sus, în intervalul de concentrații radioactive (10 - 40) kBq/L, AT nu exercită efecte citotoxice evidente asupra monocitelor umane din linia SC, ceea ce permite investigarea unor potențiale efecte mai subtile ale AT la nivel de expresie a unor gene de stres, după cum va fi descris în Exemplul 3.

Exemplul 2

Considerând faptul că linia de monocite umane din linia SC ar putea fi mai rezistentă la radiotoxicitatea AT comparativ cu celulele mononucleare umane primare, a fost testat efectul exercitat de AT asupra reducerii MTS de către celulele mononucleare umane izolate din sângele recoltat de la 6 donatori.

Datele experimentale au evidențiat o tendință de scădere a intensității reducerii MTS de către celulele mononucleare umane primare ca urmare a expunerii lor la 20 kBq/L AT timp de 48 h (Figura 4), efectul mediu exercitat de AT fiind de $(90,2 \pm 2,4)\%$. Se remarcă de asemenea variabilitatea inter-individuală relativ la efectul exercitat de AT. Astfel, pentru 4 subiecți din cei 6 investigați s-a înregistrat o scădere statistic semnificativă a reducerii MTS, dar AT nu a exercitat efecte notabile asupra celulelor de la ceilalți 2 subiecți analizați.

Rezultatele obținute arată următoarele: 1) celulele mononucleare primare sunt mai sensibile la expunerea la AT decât linia celulară de monocite umane SC, 2) 20 kBq/L reprezintă o concentrație radioactivă de AT cu efecte slab citotoxice la nivelul celulelor primare, dar nu al liniei celulare SC investigate. Se evidențiază astfel un decalaj al dozelor de AT cu impact asupra viabilității celulelor primare (20 kBq/L) și a celulelor SC (>40 kBq/L).

Deși celulele mononucleare umane sunt mai relevante pentru studiul efectelor biologice ale AT, linia celulară de monocite umane SC prezintă unele avantaje pentru realizarea unor experimente preliminare privind efectul la nivel celular exercitat *in vitro* de AT la doze radioactive necitotoxice: 1) linia SC este o linie celulară normală constitutiv proliferativă fără a fi transformată neoplazic (brevet US5447861A), care poate fi propagată în condiții standardizate, furnizând un număr mare de celule necesare pentru experimente complexe; 2) permite expunerea repetată a celulelor la AT pentru timpi îndelungați (>168 h), spre deosebire de celulele mononucleare umane care nu pot fi cultivate mai mult de 72 h; 3) celulele SC, fiind constitutiv proliferative, pot oferi informații asupra efectului exercitat *in vitro* de AT asupra ciclului celular.



Exemplul 3

Utilizând monocite umane din linia SC expuse timp de 96 h la AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L, a fost investigat prin qRT-PCR profilul de expresie a 84 gene de stres, enumerate în Tabelul 2. Pentru normalizarea datelor s-au utilizat genele de referință ("housekeeping") GAPDH și HPRT1, care au fost selectate pe baza stabilității analizând un panel de 5 gene de referință (GAPDH, HPRT1, B2M, RPLPO, ACTB) (Figura 5) cu ajutorul aplicației RefFinder (Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. 2012. *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. *Plant molecular biology* 80 (1): 75-84).

Au fost evidențiate 4 gene de stres semnificativ sub-exprimate (valoarea medie a FR < -1,5) în monocitele SC tratate cu AT la concentrații necitotoxice în domeniul (20-40) kBq/L, care au fost selectate în Exemplul 1. Aceste gene de stres (în ordinea valorii medii a FR) sunt: GSR, CD40 LG, BBC3 și IL1A (Tabelul 3, Figura 6). Dintre acestea, genele CD40 LG și IL1A au manifestat sub-expresie persistentă în timp, evidențiată atât după 96 h cât și după 168 h de tratare continuă a celulelor cu 20 kBq/L AT (Tabelul 4). În experimente individuale, au fost identificate și alte gene de stres sub-exprimate datorită expunerii la AT, dar rezultatele nu au fost validate în experimente independente, rațiune pentru care nu au fost menționate în prezenta invenție.

O singură genă a prezentat tendință de supra-expresie ca urmare a expunerii timp de 96 h a celulelor SC la AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L, și anume gena CCL2 pentru care s-a obținut o valoare medie a FR de $+2.09 \pm 0.49$.



Tabel 3. Genele cu expresie modificată în celulele mononucleare SC ca urmare a tratării lor timp de 96 h cu AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L. Datele de expresie genică obținute în 2 experimente independente sunt prezentate ca valori $2^{-\Delta Ct}$ pentru probele tratate sau netrate cu AT (control), pe baza cărora s-au calculat mărimile FC și FR.

Gena	2 ^{-ΔCt}		FC	FR	2 ^{-ΔCt}	FC	FR
	Control	AT 20 kBq/L			AT 40 kBq/L		
Experiment 1							
BBC3	0.001207	0.000474	0.39	-2.54	0.000293	0.24	-4.11
CD40LG	0.003921	0.001936	0.49	-2.02	0.001946	0.49	-2.01
GSR	0.005984	0.001427	0.23	-4.19	0.001118	0.18	-5.35
IL1A	0.001517	0.000481	0.31	-3.15	0.000518	0.34	-2.92
CCL2	0.001087	0.002286289	2.10	2.10	0.003656	3.36	3.36
Experiment 2							
BBC3	0.001302	0.000717	0.55	-1.81	0.000555	0.42	-2.34
CD40LG	0.00222	0.001124	0.50	-1.97	0.000439	0.19	-5.06
GSR	0.007114	0.004854	0.68	-1.46	0.003185	0.44	-2.23
IL1A	0.00562	0.003835	0.68	-1.46	0.002641	0.46	-2.12
CCL2	0.008459	0.016439	1.94	1.94	0.008288	0.98	-1.02

Tabel 4. Dinamica modificării expresiei genelor CD40 LG și IL1A la 96 h și 168 h de tratare continuă a monocitelor umane din linia SC cu AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L.

Gena	96 h		FC	FR	168 h		FC	FR
	2 ^{-ΔCt}				2 ^{-ΔCt}			
	Control	AT 20 kBq/L			Control	AT 20 kBq/L		
CD40LG	0.003921	0.001936	0.49	-2.02	0.001937	0.003432	0.56	-1.77
IL1A	0.001517	0.000481	0.31	-3.15	0.002366	0.004563	0.52	-1.93

CONCLUZII

Domeniul de utilitate a metodei: sănătate și mediu, în contextul expunerii accidentale a lucrătorilor din centralele nucleare-electrice de tip CANDU (Canadian Deuterium Uranium) și a locuitorilor din zonele limitrofe.

În mod specific, metoda are următoarele aplicații:

1. Testarea *in vitro* a efectului biologic la nivel celular al apei tritiate prin analiza modificărilor de expresie a cinci gene de stres (GSR, CD40 LG, BBC3, IL1A și CCL2) în monocitele umane din linia SC, în vederea caracterizării impactului asupra sănătății al expunerii accidentale la apă tritiată;

2. Utilizarea ansamblului de gene de stres cu expresie modificată datorită expunerii monocitelor umane din linia SC la apă tritiată în vederea testării *in vitro* a unor co-terapii cu rol de contracarare a efectelor nocive ale expunerii accidentale la apă tritiată.

Ansamblul de gene revendicat în invenție

Ansamblul de gene revendicat în invenție este format din genele GSR, CD40 LG, BBC3, IL1A și CCL2 pentru care s-au demonstrat modificări de expresie ca urmare a expunerii timp de 96 h a celulelor SC la AT în domeniul de concentrații radioactive necitotoxice (20-40) kBq/L. Dintre aceste gene selectate, CD40 LG și IL1A au avut sub-expresie persistentă care s-a manifestat atât la 96 h cât și la 168 h de expunere continuă a celulelor la AT. Genele de referință utilizate pentru determinarea nivelului de expresie al genelor de interes prezentate mai sus sunt GAPDH și HPRT1.

LISTA DESENELOR

Schema 1. Etapele metodei revendicate în invenție.

Figura 1. Dependența intensității reacției de reducere a MTS de numărul de monocite umane din linia SC. Evaluarea s-a realizat la 60 min, 90 min și 120 min după inițierea reacției. Sunt reprezentate pantele dreptelor pentru fiecare timp de incubare cu reactivul de detecție.

Figura 2. Efectul tratării continue a celulelor SC timp de 48 h sau 96 h cu AT în domeniul de concentrații radioactive (10-40) kBq/L asupra intensității reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a efectului exercitat de AT pentru triplicat de probă. Efectul AT a fost calculat pentru fiecare triplicat de probă după formula $\frac{\text{valoare în prezență de AT}}{\text{media valorilor în absență de AT}} \times 100$.

Figura 3. Procentul de celule SC în fază timpurie sau târzie de apoptoză după tratare continuă timp de 96 h cu AT la concentrațiile radioactive de 40 kBq/L și 80 kBq/L. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a procentului de celule apoptotice pentru triplicat de probă.

Figura 4. Efectul *in vitro* exercitat de AT la concentrația radioactivă de 20 kBq/L asupra reducerii MTS de către celulele mononucleare umane izolate din sânge recoltat de la 6 voluntari. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a valorilor triplicatului realizat cu celulele izolate din fiecare probă de sânge. Este reprezentat de asemenea efectul procentual al AT pentru fiecare triplicat de probă, calculat cu formula $\frac{\text{valoare medie în prezență de AT}}{\text{valoare medie în absență de AT}} \times 100$. Compararea probelor celulare tratate cu AT cu probele control netratate cu AT s-a realizat cu testul Student pentru probe pereche: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 5. Stabilitatea genelor de referință analizate, obținută cu ajutorul aplicației RefFinder (Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. 2012. *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. *Plant molecular biology* 80 (1): 75-84).

Figura 6. Gene semnificativ sub-exprimate ($FR < -1.5$) în monocitele umane din linia SC ca urmare a expunerii acestora timp de 96 h la AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L. Nivelul de expresie al genelor s-a determinat prin qRT-PCR. Rezultatele sunt prezentate ca "fold regulation" (FR).

LISTA ABREVIERILOR

ADNc – ADN complementar; ARN – acid ribonucleic; ARNm – ARN mesager; AT – apă tritiată; Bq – bequerel; DO – densitate optică; Gi – genă de interes; GR – genă de referință; MG – medie geometrică; MTS - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliu]; rpm – rotații pe minut.

12.3. REVENDICĂRI

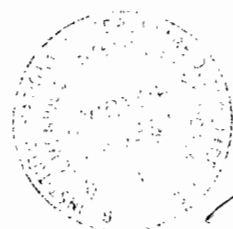
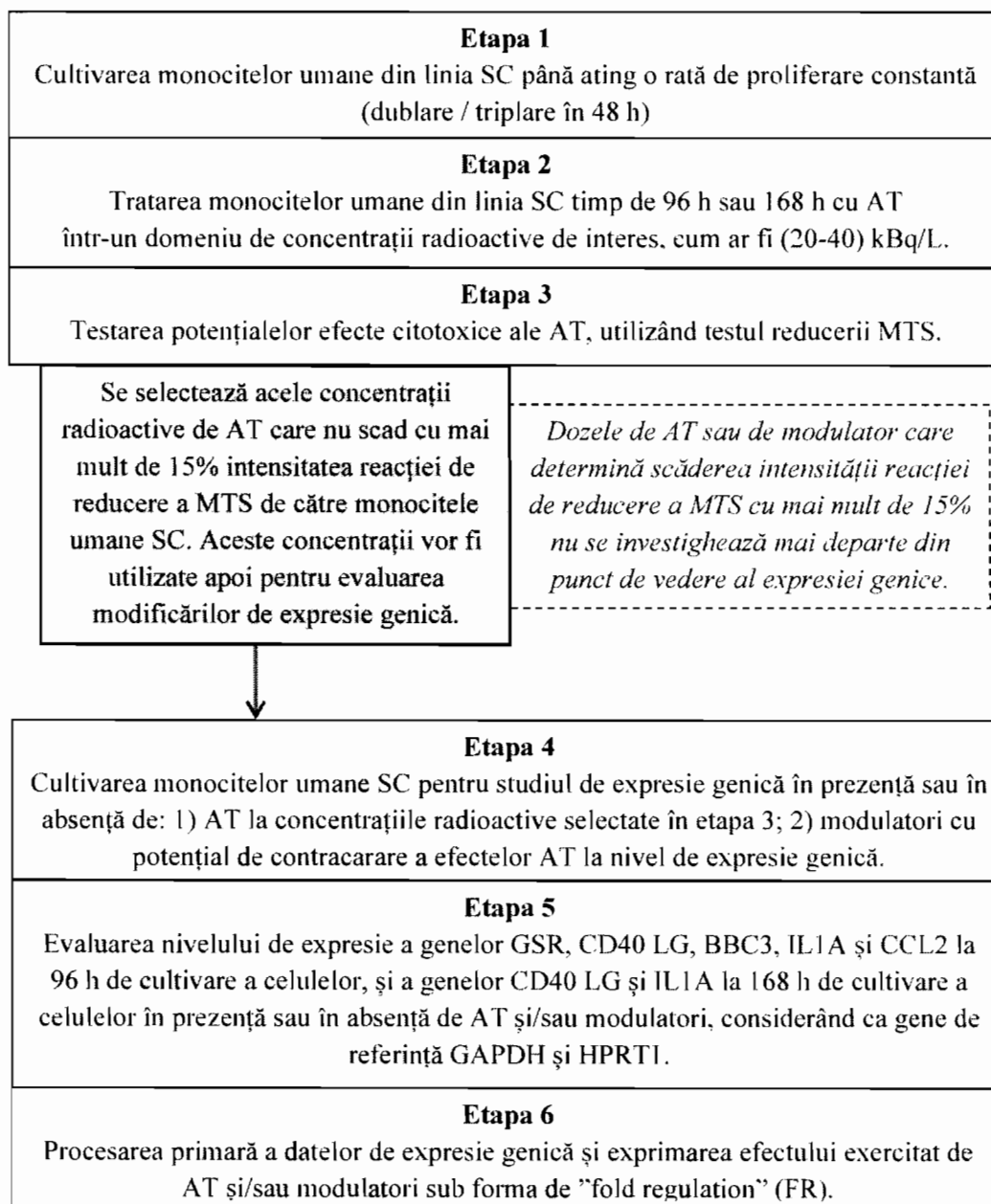
Revendicarea 1. Metodă de testare *in vitro* a efectelor exercitate de apă tritiată la nivelul monocitelor umane din linia SC. Metoda are următoarele etape: cultivarea și tratarea cu apă tritiată a monocitelor umane din linia SC, evaluarea prin testul reducerii unei săruri de tetrazoliu a viabilității celulelor tratate, comparativ cu celulele control netratate, selecția unor concentrații sub-citotoxice de apă tritiată, izolarea ARN din celulele cultivate în prezență și în absență de apă tritiată la concentrațiile radioactive selectate, realizarea reacției qRT-PCR pentru un ansamblu de gene de stres și gene de referință în vederea evaluării modificărilor de expresie genică induse de expunerea la diverse concentrații radioactive necitotoxice de apă tritiată.

Revendicarea 2. Ansamblu de cinci gene de stres (GSR, CD40 LG, BBC3, IL1A și CCL2) cu expresie modificată ca urmare a expunerii celulelor SC la apă tritiată în domeniul de concentrații radioactive necitotoxice de (20 – 40) kBq/L, și două gene de referință (GAPDH și HPRT1), care au expresie stabilă în celulele tratate și netratate cu apă tritiată, pentru aplicarea metodei conform revendicării 1.



12.4 DESENE

Schema 1. Etapele metodei propuse în invenție.



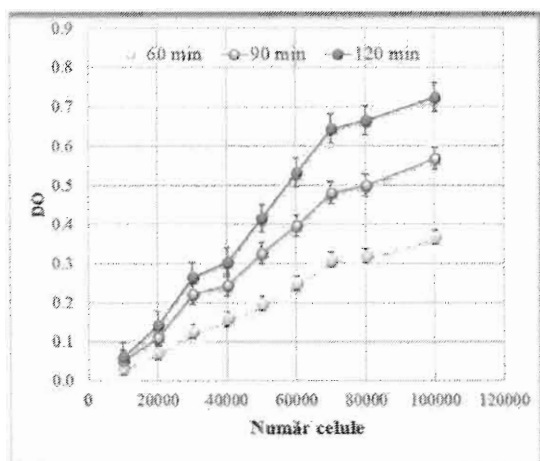


Figura 1. Dependența intensității reacției de reducere a MTS de numărul de monocite umane din linia SC. Evaluarea s-a realizat la 60 min, 90 min și 120 min după inițierea reacției. Sunt reprezentate pantele dreptelor pentru fiecare timp de incubare cu reactivul de detecție.

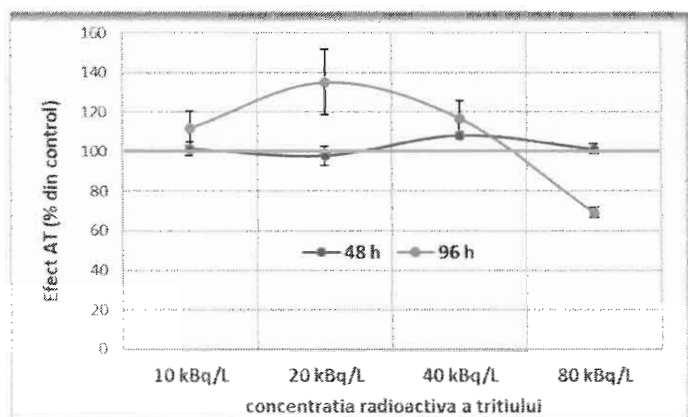


Figura 2. Efectul tratării continue a celulelor SC timp de 48 h sau 96 h cu AT în domeniul de concentrații radioactive (10-40) kBq/L asupra intensității reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a efectului exercitat de AT pentru triplicat de probă. Efectul AT a fost calculat pentru fiecare triplicat de probă după formula $\frac{\text{valoare în prezență de AT}}{\text{media valorilor în absență de AT}} \times 100$.

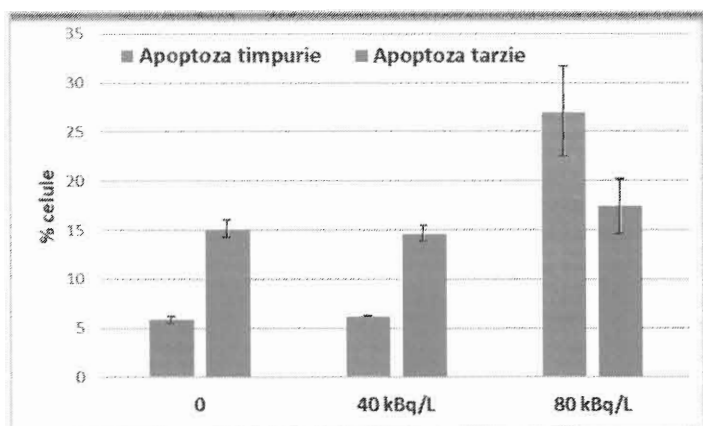


Figura 3. Procentul de celule SC în fază timpurie sau târzie de apoptoză după tratare continuă timp de 96 h cu AT la concentrațiile radioactive de 40 kBq/L și 80 kBq/L. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a procentului de celule apoptotice pentru triplicat de probă.

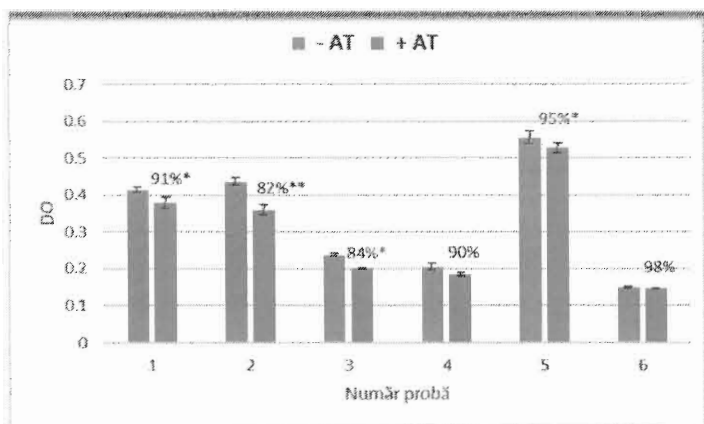


Figura 4. Efectul *in vitro* exercitat de AT la concentrația radioactivă de 20 kBq/L asupra reducerii MTS de către celulele mononucleare umane izolate din sânge recoltat de la 6 donatori. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM a valorilor triplicatului realizat cu celulele izolate din fiecare probă de sânge. Este reprezentat de asemenea efectul procentual al AT pentru fiecare triplicat de probă, calculat cu formula $\frac{\text{valoare medie în prezență de AT}}{\text{valoare medie în absență de AT}} \times 100$. Compararea probelor celulare tratate cu AT cu probele control netratate cu AT s-a realizat cu testul Student pentru probe pereche: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

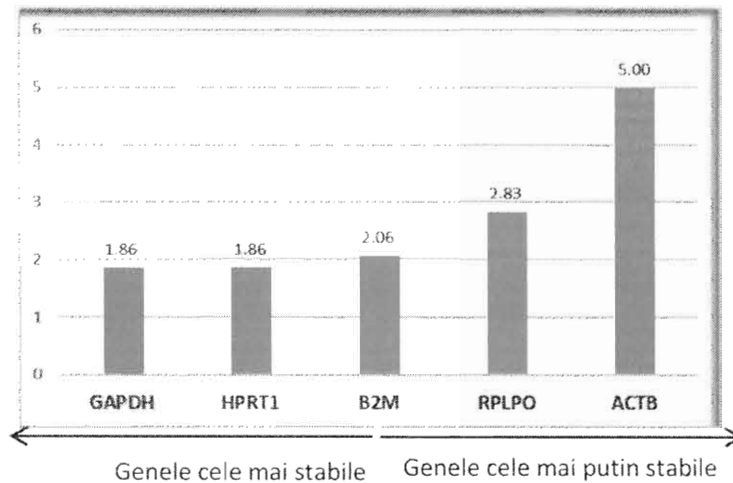


Figura 5. Stabilitatea genelor de referință analizate, obținută cu ajutorul aplicației RefFinder(Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. 2012. *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant molecular biology* 80 (1): 75-84).

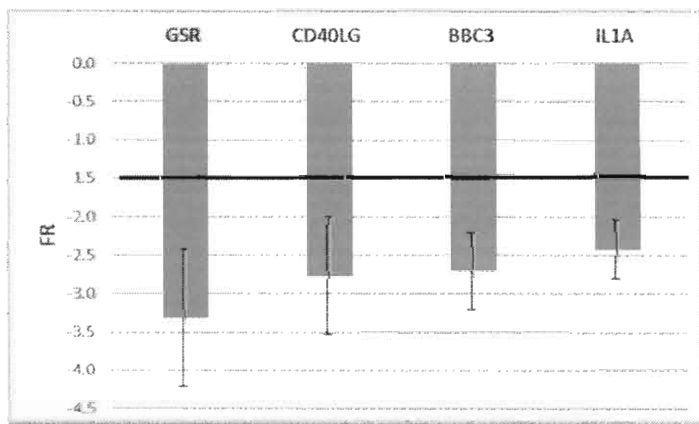


Figura 6. Gene semnificativ sub-experimentate ($FR < -1.5$) în monocitele umane din linia SC ca urmare a expunerii acestora timp de 96 h la AT în domeniul de concentrații radioactive (20-40) kBq/L. Nivelul de expresie al genelor s-a determinat prin qRT-PCR. Rezultatele sunt prezentate ca "fold regulation" (FR).