



**Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași**  
**Facultatea de Fizică, Școala Doctorală**  
**Laboratorul de Biofizică Moleculară și**  
**Fizică Medicală**



## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

*Efectele citotoxice induse de unele peptide  
asupra unor linii celulare tumorale*

**Conducător științific:**

**Prof. Univ. Dr. Tudor Luchian**

**Doctorand:**

**Mihaela Pascariu**

**Iași 2012**

Universitatea „ALEXANDRU IOAN CUZA”, IAȘI

În atenția

.....

Vă facem cunoscut că în data de **29 septembrie 2012**, ora 10:00, în sala FERDINAND, domnișoara **Mihaela PASCARIU** va susține, în ședință publică, teza de doctorat:

**„Efectele citotoxice induse de unele peptide asupra unor linii celulare tumorale”**

în vederea obținerii titlului științific de doctor în domeniul fundamental Științe Exacte, domeniul Fizică.

Comisia de examinare a tezei:

Prof. univ. dr. Gheorghe Popa - *Președinte*

Facultatea de Fizică

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Prof. univ. dr. Tudor Luchian – *Conducător științific*

Facultatea de Fizică

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Prof. univ. dr. Dorina Creangă - *Referent*

Facultatea de Fizică

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Prof. univ. dr. Eugen Carasevici – *Referent*

Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa”, Iași

Prof. univ. dr. Leontin David – *Referent*

Universitatea “Babeș Bolyai” Cluj Napoca

Vă invităm pe această cale să participați la ședința publică de susținere a tezei.

## CUPRINSUL TEZEI

<i>Introducere</i> .....	6
--------------------------	---

### **Capitolul I Caracterizarea peptidelor citotoxice**

I. 1. Generalități.....	8
I. 2. Structura și proprietățile peptidelor citotoxice.....	9
I.2.1. <i>Magainina II</i> .....	11
I.2.2. <i>Cecropina A și Cecropina B</i> .....	13
I.2.3. <i>Defensina HNP-1(Human Defensin Neutrophil Peptide1)</i> ....	15
I. 3. Clorhidratul de doxorubicină (sindroxocin).....	17

### **Capitolul II Mecanismele de interacțiune a peptidelor citotoxice cu membrana celulară**

II. 1. Membranele celulare.....	19
II. 2. Descrierea morfo-funcțională a bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative.....	25
II. 3. Diferențele membranare care contribuie la selectivitatea peptidelor antimicrobiene pentru celulele canceroase.....	27
II. 4. Modele de interacțiune a peptidelor citotoxice cu bistraturile lipidice membranare.....	28
II. 4. 1. Modelul <i>barrel stave</i> sau al porilor clasici .....	29
II. 4. 2. Modelul <i>carpet</i> sau de 'carpetare'.....	29
II. 4. 3. Modelul porilor toroidali .....	30
II. 4. 4. Formarea canalului ionic de către peptidele citotoxice.....	31

### **Capitolul III Materiale, metode și tehnici de cercetare**

III. 1. Tehnici de cultivare a celulelor .....	33
III. 2. Liniile celulare tumorale .....	39

<b>III. 3.</b> Testul de viabilitate folosind MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu].....	41
<b>III. 4.</b> Evaluarea apoptozei celulare prin tehnica citometriei în flux ( <i>Flow cytometry</i> ).....	47
<b>III. 5.</b> Evaluarea proliferării celulare cu ajutorul tehnicii RTCA DP ( <i>Real-Time Cell Analyzer Dual Plate</i> ).....	59
<b>III. 5. 1.</b> Principalele componente ale instrumentului RTCA DP.....	59
<b>III. 5. 2.</b> Model teoretic de detectare a impedanței electrice celulă-substrat.....	65
<b>III. 5. 3.</b> Principiul de măsurare a indicelui celular bazat pe impedanța electrică.....	69
<b>III. 5. 4.</b> Avantajele instrumentului RTCA DP.....	74

**Capitolul IV Stabilirea numărului optim de celule pentru evaluarea citotoxicității unor peptide (magainina II, defensina HNP-1, cecropinele A și B)**

<b>IV. 1.</b> Testul de viabilitate cu albastru de tripan ( <i>Trypan Blue</i> ).....	78
<b>IV. 2.</b> Testul de viabilitate cu iodură de propidiu (PI).....	79

**Capitolul V Evaluarea citotoxicității magaininei II și a cecropinelor A și B asupra celulelor tumorale**

<b>V. 1.</b> Cultivarea și subcultivarea liniilor celulare tumorale tratate cu magainină II și cecropinele A, B.....	83
<b>V. 2.</b> Evaluarea viabilității celulare cu ajutorul testului de viabilitate folosind MTT.....	87
<b>V. 3.</b> Evaluarea citotoxicității clorhidratului de doxorubicină (sindroxocinului) asupra celulelor tumorale studiate.....	100
<b>V. 4.</b> Evaluarea apoptozei cu ajutorul citometriei în flux ( <i>Flow cytometry</i> ).....	104

V. 5. Evaluarea proliferării celulare cu ajutorul tehnicii RTCA DP.....	116
---	-----

***Capitolul VI Evaluarea citotoxicității defensinei HNP-1 asupra celulelor normale și tumorale***

VI. 1. Cultivarea și subcultivarea liniilor celulare tumorale tratate cu defensină HNP-1.....	125
VI. 2. Evaluarea viabilității și citotoxicității celulare cu ajutorul testului MTT.....	129
<i>Concluzii</i> .....	142
<i>Bibliografie</i> .....	144
<i>Participări la conferințe naționale și internaționale</i> .....	154
<i>Publicații</i> .....	155
<i>Anexă 1</i> .....	156
<i>Anexă 2</i> .....	168

---

## *Caracterizarea peptidelor citotoxice*

---

Din literatura de specialitate s-a constatat că majoritatea peptidelor naturale și de sinteză, au un spectru larg antimicrobian, antiviral, iar unele dintre acestea au chiar potențial anticancerigen.

În această teză, ne-am propus să evaluăm efectele antitumorale ale unor peptide naturale (*magainină II*, *defensină HNP-1*, *cecropină A* și *cecropină B*) pe mai multe tipuri de linii celulare: MDA-MB231-adenocarcinom mamar, HT-29-adenocarcinom colorectal, M14K-mezoteliom uman, A549-carcinom alveolar uman, cât și a unei linii celulare normale de keratinocite epidermice umane-HEK (*Human Epidermal Keratinocyte*).

***Magainina II*** aparține unei clase de peptide citotoxice care a fost izolată din epiteliu de broască (*Xenopus Laevis*). *Magaininele* prezintă activitate antibiotică pentru bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative precum fungi și protozoare [1]. Structura primară a acestui peptid este dată de următoarea succesiune de aminoacizi:

**NH<sub>2</sub>-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-CONH<sub>2</sub>**

Structura amfifilică de tip  $\alpha$ -helix permite acestui peptid să țintească membranele celulare la nivelul cărora poate forma canale ionice permeabile care să conducă la depolarizare membranară și în cele din urmă la moartea celulei [2, 3].

***Cecropinele A și B*** aparțin unei clase de polipeptide cu proprietăți bioactive, conținând 34-39 reziduuri de aminoacizi în structura lor. Au fost pentru prima dată izolate din hemolimfa fluturului de mătase (*Hyalophora cecropia*) [4, 5, 6].

Structura primară în cazul *cecropinei A*:

**H - Lys - Trp - Lys - Leu - Phe - Lys - Lys - Ile - Glu - Lys - Val - Gly - Gln - Asn - Ile - Arg - Asp - Gly - Ile - Ile - Lys - Ala - Gly - Pro - Ala - Val - Ala - Val - Val - Gly - Gln - Ala - Thr - Gln - Ile - Ala - Lys - NH<sub>2</sub>**

*Cecropina B* prezintă următoarea secvență de aminoacizi:

**H - Lys - Trp - Lys - Val - Phe - Lys - Lys - Ile - Glu - Lys - Met - Gly - Arg - Asn - Ile - Arg - Asn - Gly - Ile - Val - Lys - Ala - Gly - Pro - Ala - Ile - Ala - Val - Leu - Gly - Glu - Ala - Lys - Ala - Leu - NH<sub>2</sub>**

Ambele *cecropine* au o structură secundară de tip  $\alpha$ -helix cu capătul NH<sub>2</sub>-terminal intens amfifatic în timp ce capătul COOH-terminal din  $\alpha$ -helix este hidrofob [6].

Numeroase studii au demonstrat că *cecropina A* și *cecropina B* prezintă activitate antitumorală împotriva leucemiei la mamifere, asupra limfomului și liniilor celulare tumorale de carcinom de colon [7, 8], cancer pulmonar și cancer gastric. *Cecropina A* și *B* exercită activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative în concentrații micromolare [9, 10].

### ***Defensina HNP-1 (Human Defensin Neutrophil Peptide-1)***

*Defensinele* sunt peptide cationice, amfifactice, formate din 29-47 aminoacizi. Secvența de aminoacizi în cazul *defensinei HNP-1*:

**Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys**

Majoritatea *defensinelor* sunt molecule amfifactice ce prezintă o succesiune de aminoacizi hidrofilii și hidrofobi dispuși de o parte și de cealaltă a structurii de tip  $\alpha$ -helix. Acest lucru le permite să interacționeze cu membranele celulare microbiene [11].

*In vitro*, *defensinele* expun o gamă largă de activități antimicrobiene împotriva, bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, fungilor, virusurilor și paraziților [12, 13] dar sunt de asemenea citotoxice pentru diferite tipuri de celule de mamifere [14, 15].

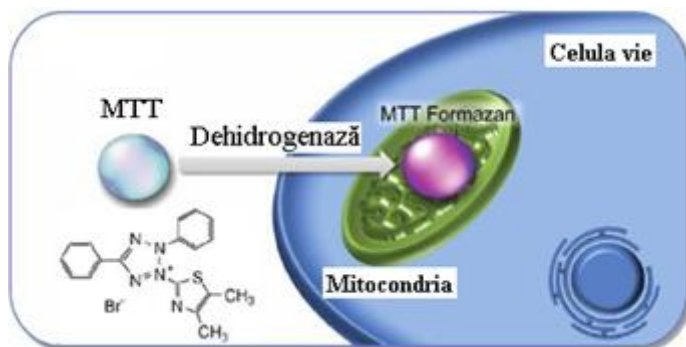
---

## *Materiale, metode și tehnici de cercetare*

---

### **Testul de viabilitate folosind MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu]**

Descris prima dată în 1983 de către Mosmann este un test care analizează metabolismul celular și care se bazează pe capacitatea succinat dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii de a reduce sărurile solubile de tetrazolium din MTT - (galben) și de a forma cristale insolubile de formazan (violet) (Fig. 1).



*Fig. 1. Principiul metodei [adaptat din www].*

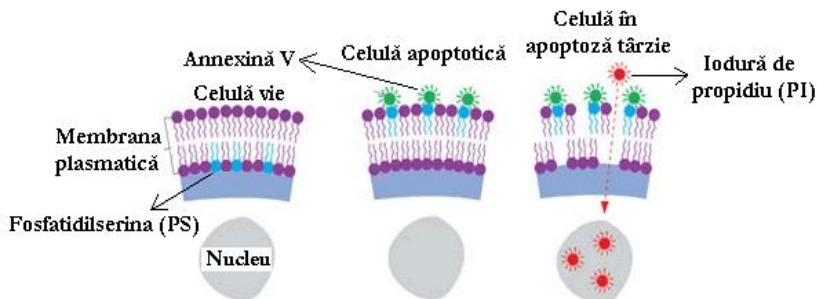
Formazanul insolubil în apă poate fi solubilizat cu izopropanol, dimetilsulfoxid (DMSO) sau alt solvent organic. Extincția a fost citită la un spectrofotometru cu plăci de cultură cu 96 godeuri (Tecan Sunrise™), la lungimea de undă de 570/620 nm [16].

### **Evaluarea apoptozei celulare prin tehnica citometriei în flux (*Flow cytometry*)**

Apoptoza celulară poate fi urmărită cu ajutorul tehnicii de citometrie în flux. În acest scop am utilizat anexină V (*BD Pharmingen*) cuplată cu fluoroforul ficoeritrină.



Anexina V are afinitate pentru fosfatidilserină, cu care se cuplează în prezența ionilor de calciu în stratul extern al bistratului lipidic al unei celule aflată în apoptoză (Fig. 2) [17, 18, 19].



*Fig. 2. Reprezentarea mecanismului de detectare a celulelor apoptotice cu ajutorul anexinei V [20].*

Dacă membrana celulară este lezată atunci cel de al doilea fluorofor utilizat și anume 7-AAD (7-amino-actinomicin D) va pătrunde în celulă și se va intercala la nivel nuclear având afinitate crescută pentru bazele azotate guanină-citozină. Astfel că celulele vii normale nu prezintă fluorescență fiind dublu-negative atât pentru anexină V cât și pentru 7-AAD.

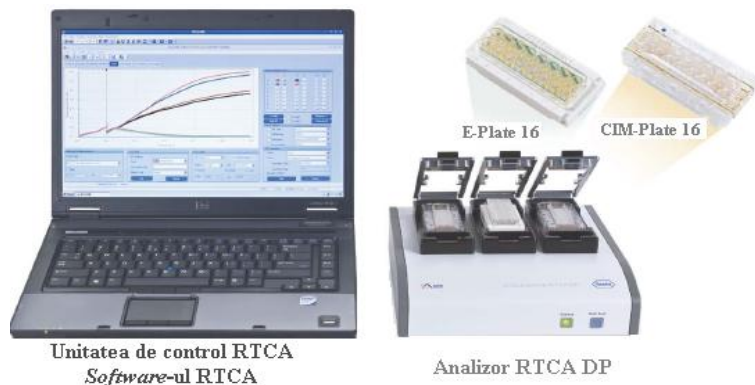
Celulele intrate în apoptoză timpurie păstrează o membrană celulară intactă astfel încât vor prezenta fluorescență doar pentru anexină V, spre deosebire de celulele intrate în apoptoză târzie a căror membrană celulară este distrusă și care vor prezenta fluorescență atât pentru anexină V cât și pentru 7-AAD [21].

### **Evaluarea proliferării celulare cu ajutorul tehnicii RTCA DP (*Real-Time Cell Analyzer Dual Plate*)**

Instrumentul RTCA DP include următoarele componente principale:

- **Analizorul celular** în timp real cu plăci duble - RTCA DP;

- **Unitatea de control RTCA 1.1** cu *Software*-ul RTCA 1.2 preinstalat;
- **placa E (E-Plate) 16** sau **placa CIM (CIM-Plate)16** (Fig. 3).



**Fig. 3.** Instrumentul RTCA DP cu principalele componente [22].

Probele biologice sunt cultivate în plăci de cultură celulară formate din 16 godeuri prevăzute cu o rețea de microelectrozi din aur. Fiecare godeu al plăcii pentru analiza celulară conține o colecție integrală de electrozi senzori dispuși „în plasă”, ce permit monitorizarea celulelor din godeu [22].

Indicele celular (IC) este un parametru utilizat pentru a măsura modificarea relativă a impedanței electrice, reprezentată de poziția celulei. Valorile impedanței reflectă cantitativ statutul biologic al celulelor. Instrumentul RTCA DP este extrem de cantitativ, cu o excelentă acuratețe, precizie și ușurință de utilizare [22, 23].

---

## *Evaluarea citotoxicității magaininei II și a cecropinelor A și B asupra celulelor tumorale*

---

### **Evaluarea viabilității celulare cu ajutorul testului de viabilitate folosind MTT**

Pentru experiment s-a folosit placă de cultură cu 96 godeuri. Celulele au fost incubate în 200  $\mu$ l mediu complet/godeu conținând *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* de diferite concentrații finale (60  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M, 3,75  $\mu$ M, 1,87  $\mu$ M și 0,9  $\mu$ M) la 37  $^{\circ}$ C timp de 72 h.

**Controlul negativ** a fost constituit din celulele aflate în godeurile în care nu au fost adăugate peptide citotoxice.

**Controlul pozitiv** a fost reprezentat de clorhidratul de doxorubicină (sindroxocin) - 60  $\mu$ M.

După 72 h de la incubare, în fiecare godeu au fost adăugați 20  $\mu$ L MTT (Sigma, 5 mg/mL). Celulele au fost incubate la 37  $^{\circ}$ C, timp de 4 h, după care mediul a fost eliminat și înlocuit cu 100  $\mu$ L DMSO, pentru dizolvarea cristalelor de formazan formate prin reducerea MTT-ului. A fost citită extincția spectrofotometric, experimentul fiind realizat în triplicat.

Din datele obținute pentru celulele de adenocarcinom colorectal se poate spune că cele trei tipuri de peptide nu au acționat asupra celulelor, evoluția spre apoptoză fiind evidentă în cazul doxorubicinei (citostazie 50 %).

După 72 h de la incubarea celulelor tumorale de adenocarcinom mamar cu cele trei tipuri de peptide s-a remarcat că acestea nu manifestă un efect citotoxic asupra acestui tip de celule. Controlul pozitiv a prezentat un procent semnificativ de citostazie (90 %).

Cellulele de carcinom alveolar uman incubate cu *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* nu prezintă o schimbare la impactul cu peptidele. Procentul de citostazie în cazul controlului pozitiv este de 70 %.

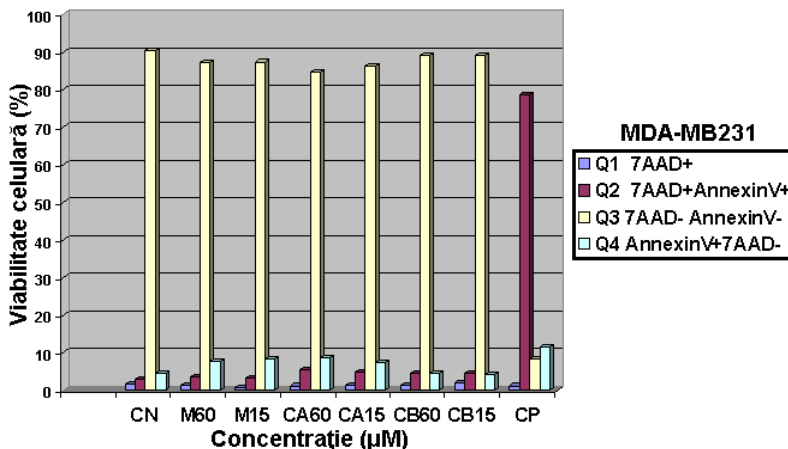
În cazul incubării celulelor de mezoteliom uman timp de 72 h cu *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* nu s-a evidențiat un efect citotoxic asupra celulelor. În cazul clorhidratului de doxorubicină (60  $\mu\text{M}$ ) procentul de citostazie a fost de 80 % [24, 25].

### **Evaluarea apoptozei cu ajutorul citometriei în flux (*Flow cytometry*)**

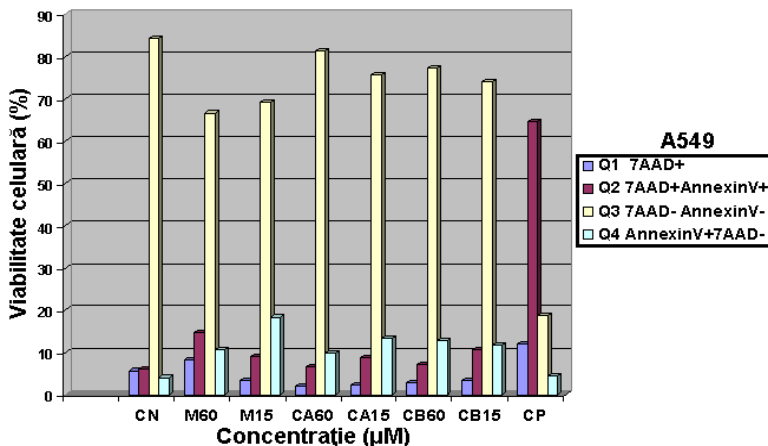
După 72 h de la incubare mediul din fiecare godeu care conține celulele moarte a fost colectat în tuburi de polistiren de 12x75 mm, apoi etichetate corespunzător pentru analiza citometriei în flux. Godeurile au fost clătite cu PBS (tampon fosfat salin) și celulele aderente au fost desprinse cu tripsină EDTA după 3-10 minute de incubare în funcție de linia celulară.

Tripsina a fost inactivată prin adăugarea de mediu complet care a fost colectat după o clătire a godeului și adăugat în tubul corespunzător pentru FACS. După două spălări în PBS rece, centrifugare la 300 g pentru 5 min, *peletul* (sedimentul) a fost resuspensionat în 100  $\mu\text{L}$  anexină V diluată și incubată pentru 15 min la întuneric cu 5  $\mu\text{L}$  PE (ficoeritrină) anexină V și 5  $\mu\text{L}$  de 7-AAD.

Analiza prin citometrie în flux a evidențiat o viabilitate celulară pentru linia MDA-MB231 după 72 h de la incubare cu *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* de concentrație 60  $\mu\text{M}$  și 15  $\mu\text{M}$  asemănătoare cu cea a controlului negativ (peste 80 %) (Fig. 4). Evaluarea viabilității celulelor A549 după 72 h de la incubarea acestora cu 60  $\mu\text{M}$  și 15  $\mu\text{M}$  *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* ne-a condus la concluzia că peptidele utilizate nu au avut un efect biologic semnificativ asupra celulelor (Fig. 5).

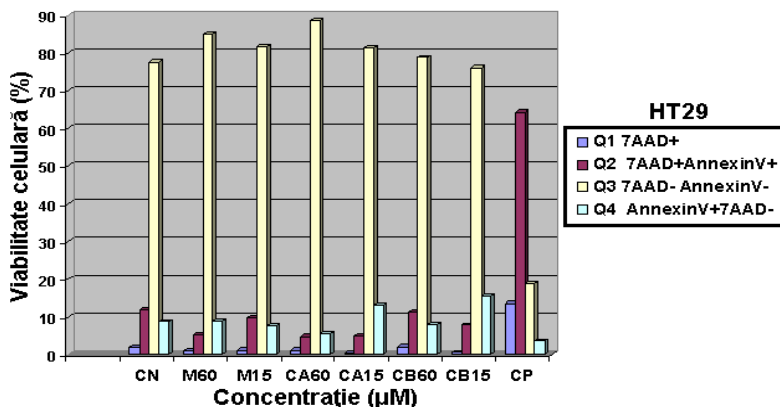


**Fig. 4.** Analiza viabilității celulelor MDA-MB231 prin citometrie în flux, evaluare realizată după 72 h de la incubarea acestora cu magainină II, cecropină A și B în raport cu un control pozitiv și un control negativ.

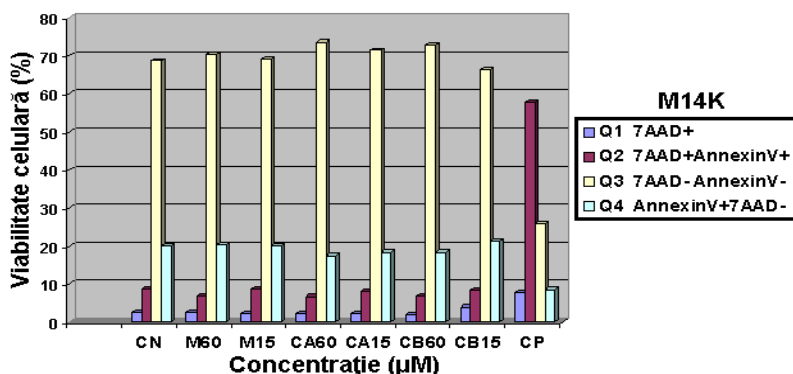


**Fig. 5.** Analiza viabilității celulelor A549 prin citometrie în flux, evaluare realizată după 72 h de la incubarea acestora cu magainină II, cecropină A și B în raport cu un control pozitiv și un control negativ.

În cazul celulelor A549 și MDA-MB231, ratele de apoptoză care s-au indus au fost de până la 15 %.



**Fig. 6.** Analiza viabilității celulelor HT29 prin citometrie în flux, evaluare realizată după 72 h de la incubarea acestora cu magainină II, cecropină A și cecropină B în raport cu un control pozitiv și un control negativ.



**Fig. 7.** Analiza viabilității celulelor M14K prin citometrie în flux, evaluare realizată după 72 h de la incubarea acestora cu magainină II, cecropină A și cecropină B în raport cu un control pozitiv și un control negativ.

După incubarea celulelor HT29 cu 60  $\mu\text{M}$  și 15  $\mu\text{M}$  *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* s-a observat că viabilitatea celulară nu a fost afectată de peptide. Numai în cazul controlului pozitiv celulele HT29 au intrat în apoptoză (Fig. 6). Evoluția celulelor M14K la impactul acestora cu trei tipuri de peptide citotoxice este asemănătoare cu cea a celulelor HT29 (Fig. 7).

### **Evaluarea proliferării celulare cu ajutorul tehnicii RTCA DP (*Real Time Cell Analyzer – Dual Plate*)**

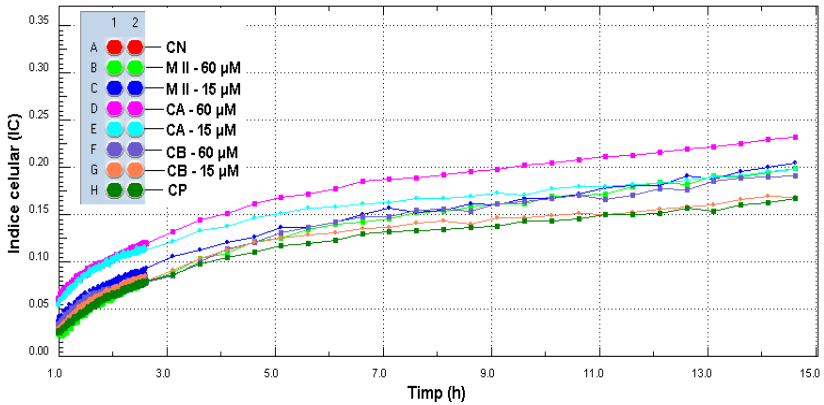
O altă tehnică utilizată pentru evaluarea efectului biologic al acestor peptide asupra liniilor celulare tumorale, a fost RTCA DP.

Acest sistem - *xCELLigence RTCA* pentru analize celulare în timp real - măsoară impedanța electrică a semnalelor provenite de la celulele aderente la suprafața microelectrozilor din aur, cuantificând astfel în timp real, **proliferarea și viabilitatea** celulară.

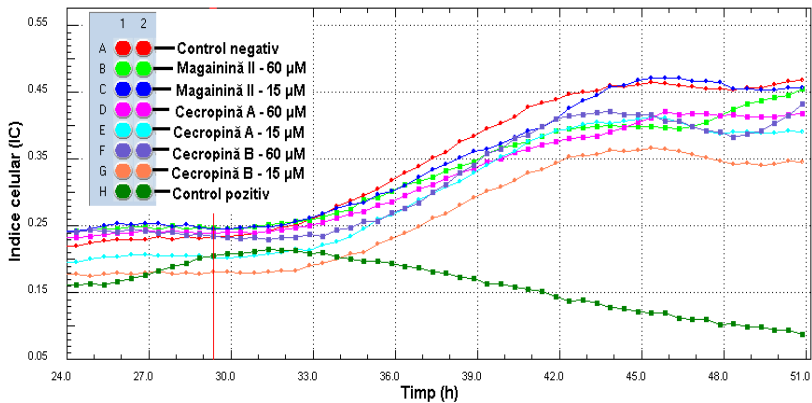
Celulele au fost cultivate în duplicat, 5000 celule/godeu/200  $\mu\text{L}$ , în E-Plate 16 (*Roche*), 2 benzi cu câte 8 godeuri. Efectul celor trei peptide (*magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B*) asupra celulelor HT-29 a fost monitorizat timp de 72 h după incubare cu două concentrații de peptid 60  $\mu\text{M}$  și 15  $\mu\text{M}$ . Celulele incubate fără peptid au reprezentat controlul negativ, în timp ce godeurile cu celule în care s-a adăugat 60  $\mu\text{M}$  clorhidrat de doxorubicină (sindroxocin) a constituit controlul pozitiv.

Indicele celular este o unitate arbitrară utilizată pentru exprimarea impedanței electrice.

Din reprezentarea grafică (Fig. 8) se observă o creștere a proliferării celulare în cazul celulelor tumorale HT-29 în prezența celor trei tipuri de peptide comparativ cu, controlul negativ.



**Fig. 8.** Monitorizarea culturii celulare HT-29 pe parcursul a 15 h de la incubare în cazul celulelor fără peptide (control negativ-linia roșie) și a celulelor în care s-a adăugat peptidă de concentrație 15  $\mu\text{M}$  și 60  $\mu\text{M}$  comparativ cu celulele în care a fost adăugat clorhidrat de doxorubicină (control pozitiv-linia verde).



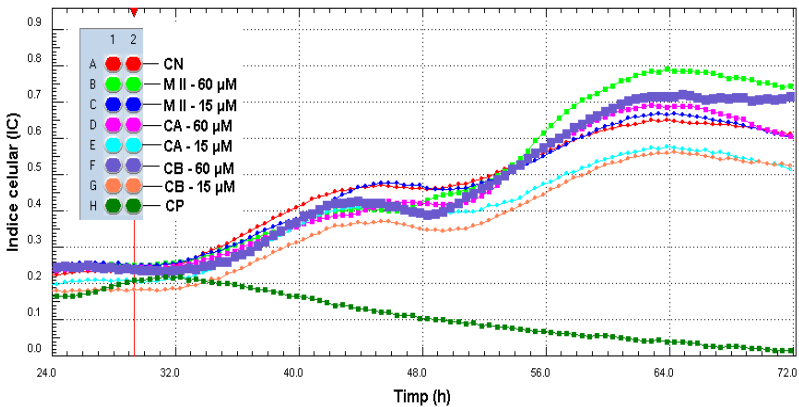
**Fig. 9.** Monitorizarea culturii celulare HT-29 timp de 51 h de la incubare cu cele trei tipuri de peptide (15  $\mu\text{M}$  și 60  $\mu\text{M}$ ) comparativ cu, controlul pozitiv – linia verde și controlul negativ – linia roșie.



Celulele tumorale HT-29 incubate cu 60  $\mu\text{M}$  clorhidrat de doxorubicină (controlul pozitiv) au avut o evoluție similară cu cea a controlului negativ, rezultate obținute în primele ore de la incubare (Fig. 8).

Experimentul a fost realizat în duplicat. Rezultatele experimentale obținute prin utilizarea celor două concentrații de peptide (15  $\mu\text{M}$  și 60  $\mu\text{M}$ ) pentru linia tumorală HT29, au evidențiat o descreștere semnificativă a viabilității celulare în timp (51 h), comparativ cu cea a controlului negativ (fără peptide).

În cazul celulelor tumorale HT29 tratate cu 60  $\mu\text{M}$  clorhidrat de doxorubicină (linia verde) dacă inițial s-a observat o ușoară proliferare celulară, ulterior s-a remarcat o citostazie importantă (Fig. 9).



**Fig. 10.** Monitorizarea culturii celulare HT-29 pe parcursul a 72 h de la incubare în cazul celulelor fără peptidă (control negativ) și a celulelor în care s-a adăugat peptidă de concentrație 15  $\mu\text{M}$  și 60  $\mu\text{M}$  comparativ cu celulele în care a fost adăugat clorhidrat de doxorubicină (control pozitiv).

Din această reprezentare grafică se poate observa că după o perioadă mai lungă de incubare majoritatea celulelor tumorale HT29 incubate cu peptide prezintă o proliferare mult mai pronunțată comparativ cu cea a controlului negativ, excepție făcând cecropina A și cecropina B care arată o scădere a proliferării celulare la concentrația de 15  $\mu\text{M}$  comparativ cu celulele în care nu a fost adăugat peptidă (control negativ) (Fig. 10).

---

## *Evaluarea citotoxicității defensinei HNP-1 asupra celulelor normale și tumorale*

---

*In vitro*, defensinele sunt substanțe care prezintă numeroase activități antimicrobiene împotriva, bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, fungilor, virusurilor și paraziților [12, 13]. În literatura de specialitate sunt citate de asemenea, efecte citotoxice pentru diferite tipuri de celule de mamifere [14, 15].

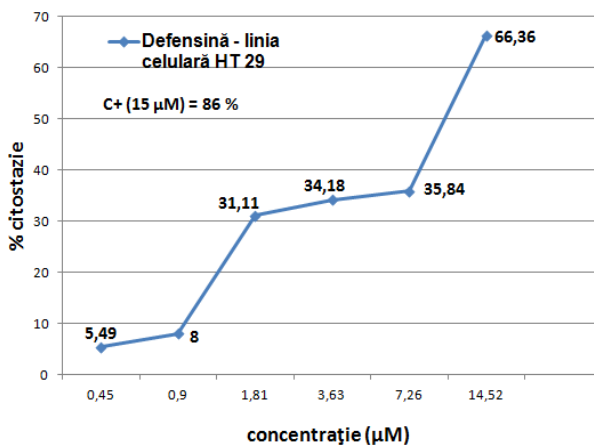
Rezultatele obținute în urma tratării liniilor celulare tumorale cu diferite concentrații de defensină, au fost comparate în acest studiu cu cele obținute pentru o linie de celule normale adulte HEK–keratinocite epidermice umane). În vederea evaluării citotoxicității celulare indusă de defensină asupra celulelor tumorale s-a folosit metoda MTT.

Celulele au fost incubate în 200  $\mu\text{L}$  mediu RPMI complet/godeu conținând defensină HNP-1 de diferite concentrații finale (14,52  $\mu\text{M}$ , 7,26  $\mu\text{M}$ , 3,63  $\mu\text{M}$ , 1,81  $\mu\text{M}$ , 0,9  $\mu\text{M}$ , 0,45  $\mu\text{M}$ , 0,22  $\mu\text{M}$ , 0,11  $\mu\text{M}$  și 0,05  $\mu\text{M}$ ) la 37  $^{\circ}\text{C}$  timp de 72 h.

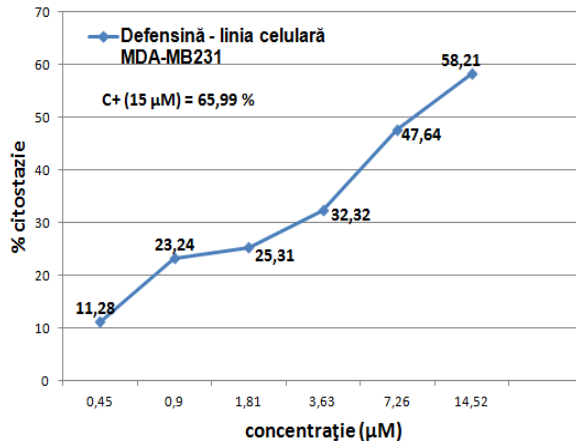
**Controlul negativ** a fost constituit din celulele tumorale de același tip, adică din celulele distribuite în număr egal în godeurile în care nu s-au adăugat peptide citotoxice.

Pentru a verifica dacă celulele sunt afectate de soluția (serul fiziologic) cu care s-a dizolvat peptidele citotoxice a fost folosit un godeu care a conținut: 150  $\mu\text{L}$  ser fiziologic cu  $10^5$  celule tumorale și 50  $\mu\text{L}$  mediu de cultură. **Controlul pozitiv** a fost reprezentat de clorhidratul de doxorubicină.

Din analiza realizată pe celulele de cancer colorectal se observă că în cazul incubării celulelor cu defensină HNP-1 procentul de citostazie este semnificativ la concentrația de defensină folosită (14,52  $\mu\text{M}$ ).

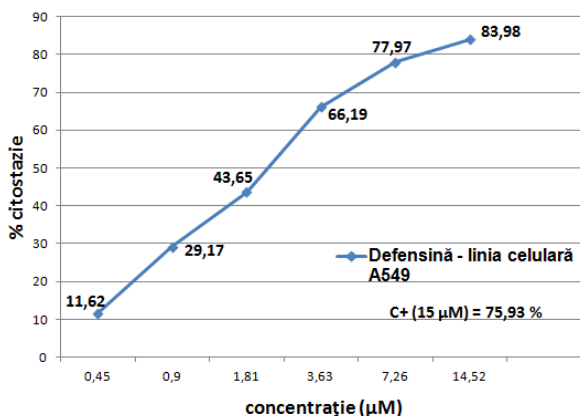


**Fig. 11.** Reprezentarea grafică a procentului de citostazie în funcție de concentrația peptidei (defensină HNP-1) pentru linia celulară HT29.



**Fig. 12.** Reprezentarea grafică a procentului de citostazie în funcție de concentrația peptidei (defensină HNP-1) pentru linia celulară MDA-MB231.

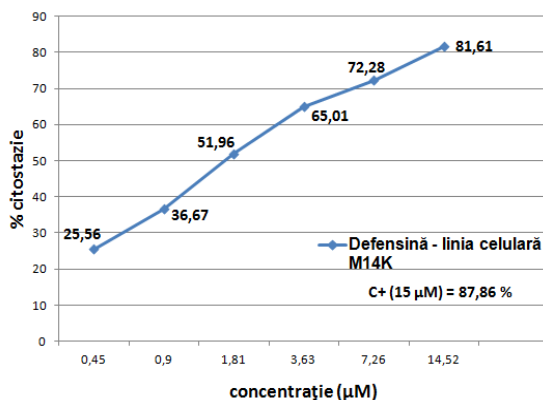
Un procent de citostazie semnificativ (86,38 %) a fost obținut și în cazul celulelor incubate cu clorhidrat de doxorubicină de concentrație 15  $\mu\text{M}$  (Fig. 11). În cazul incubării celulelor tumorale de cancer mamar cu *defensină* de diferite concentrații succesive plecând de la o concentrație de 14,52  $\mu\text{M}$  a fost remarcat un procent de citostazie de 58,21 % (Fig. 12).



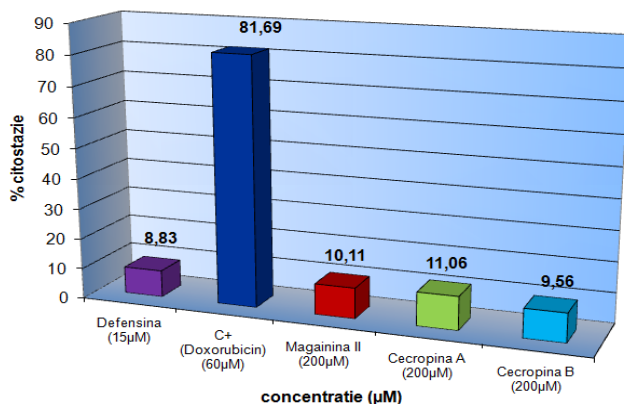
**Fig. 13.** Reprezentarea grafică a procentului de citostazie în funcție de concentrația peptidei (*defensină HNP-1*) pentru linia celulară A549.

Celulele tumorale de carcinom alveolar uman incubate cu ser fiziologic (150  $\mu\text{L}$ ) au prezentat un procent de citostazie de 2,78 %. Această valoare obținută se încadrează în limite normale (fiziologice), deoarece citostazia celulelor este considerată a fi normală până la o valoare de 10 % (Fig. 13).

Pentru linia celulară tumorală de mezoteliom uman a fost obținut un procent de citostazie de 81,61 % la concentrația de 14,52  $\mu\text{M}$  *defensină (HNP-1)*. La incubarea celulelor tumorale M14K timp de 72 h cu clorhidrat de doxorubicină procentul de citostazie a fost de 87,86 % (Fig. 14).



**Fig. 14.** Reprezentarea grafică a procentului de citostazie în funcție de concentrația peptidei (defensină HNP-1) pentru linia celulară M14K.



**Fig. 15.** Reprezentarea grafică a procentului de citostazie în funcție de concentrația peptidei pentru linia celulară HEK.

Din analiza efectuată pe linia celulară de keratinocite epidermice umane pentru un interval de timp de 72 h la aceleași concentrații de defensină se poate spune că procentul de citostazie a fost diferit comparativ cu liniile celulare tumorale studiate (Fig. 15).

## Concluzii

Acest studiu a avut ca scop evaluarea efectelor citotoxice al unor peptide naturale cunoscute (*magainina II*, *cecropina A* și *cecropina B*) asupra unor linii celulare tumorale (MDA-MB231-adenocarcinom mamar, HT-29-adenocarcinom colorectal, A-549-carcinom alveolar uman, M14K-mezoteliom uman) și o linie celulară normală, de keratinocite epidermice umane (HEK).

În urma efectuării acestor experimente putem concluziona:

- ✓ Concentrația optimă de celule necesară pentru a evalua efectul peptidelor citotoxice a fost de  $10^5$  celule /200  $\mu$ L mediu/godeu.
- ✓ Incubarea cu 60  $\mu$ M *magainină II*, *cecropină A* și *cecropină B* a avut efect biologic numai în cazul celulelor A549 și MDA-MB231, ratele de apoptoză care s-au indus fiind de până la 15%.
- ✓ În ciuda faptului că s-a observat apoptoză pentru celulele A549 și MDA-MB231, viabilitatea liniilor celulare studiate nu a fost afectată semnificativ.
- ✓ Celulele incubate cu ser fiziologic (150  $\mu$ L) au prezentat un procent de citostazie de 2,78 %. Această valoare obținută se încadrează în limite normale (fiziologice), deoarece, citostazia celulelor este considerată a fi normală până la o valoare de 10%. În concluzie putem spune că serul fiziologic nu a influențat viabilitatea și proliferarea celulelor tumorale studiate.
- ✓ *Defensina* este o peptidă citotoxică care poate influența semnificativ viabilitatea și proliferarea celulelor tumorale la concentrația de 14,52  $\mu$ M. În comparație cu celulele tumorale, *defensina* nu a influențat semnificativ supraviețuirea și rata de proliferare a celulelor normale utilizate în aceste experimente.

## ***Bibliografie selectivă:***

- [1] I. Kourie and A. A. Shorthouse, *Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels*, Am J Physiol Cell Physiol 278:1063-1087, **2000**.
- [2] Zasloff, M., *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterisation of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5449-5453, **1987**.
- [3] Steve J. Ludtke, Ke He, William T. Heller et al., *Membrane Pores Induced by Magainin*, Biochemistry, Vol. 35, 13723-13728, **1996**.
- [4] Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH et al., *Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins*, Eur J Biochem, 201: 23-31, **1991**.
- [5] Andreu D, Merrifield RB, Steiner H et al., *Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides*, Proc Natl Acad Sci USA, 80: 6475-6479, **1983**.
- [6] Henrik Suttman, Margitta Retz, Friedrich Paulsen et al., *Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells*, BMC Urology, 8:5doi:10.1186/1471-2490-8-5, **2008**.
- [7] Chen HM, Wang W, Smith D, Chan SC: *Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 1336:171-179, **1997**.
- [8] Moore AJ, Devine DA, Bibby MC: *Preliminary experimental anticancer activity of cecropins*. Pept Res, 7:265-269, **1994**.
- [9] Shin SY, Lee MK, Kim KL, Hahm KS: *Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides*. J Pept Res, 50:279-285, **1997**.



- [10] Chan SC, Hui L, Chen HM: *Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells*. *Anticancer Res*, 18:4467-4474, **1998**.
- [11] Tomas Ganz, *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*, *Nature Reviews Immunology* 3, 710-720, September, **2003**.
- [12] Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein, and T. Ganz, *Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells*, *Annu. Rev. Immunol*, 11:105–128, **1993**.
- [13] Aley, S.B., M. Zimmerman, M. Hetsko et al., *Killing of Giardia lamblia by cryptidins and cationic neutrophil peptides*, *Infect. Immun.* 62:5397–5403, **1994**.
- [14] Okrent, D.G., A.K. Lichtenstein, and T.Ganz, *Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141:179–185, **1990**.
- [15] Lichtenstein, A., T. Ganz, M.E. Selsted, and R.I. Lehrer, *In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes*, *Blood*, 68:1407–1410, **1986**.
- [16] Zasloff, M., *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterisation of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:5449-5453, **1987**.
- [17] Petru Cianga, *Tehnici utilizate în imunologie*, Editura Pim, **2008**.
- [18] Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C., *Flow cytometry of apoptotic cell death*, *J. Immunol. Meth.*, Vol. 243, **2000**.
- [19] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH., *Annexin V for flow cytometric detection of*

*phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*, Blood, 84(5):1415-1420, **1994**.

[20] seallab.wordpress.com - *Cellular Toxicity of Nanoparticles*

[21] Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescenc in single laser flow cytometry*, Cytometry, 13(2):204-208, **1992**.

[22] www.roche-applied-science.com.

[23]L. Yang, L. Arias, T. Lane, M. Yancey, J. Mamouni, *Real-time electrical impedance-based measurement to distinguish oral cancer cells and non-cancer oral epithelial cells*, Anal Bioanal Chem, 399:1823–1833, 2011.

[24] **M. PASCARIU, A. NEVOIE ANGHELACHE D. CONSTANTINESCU, D. JITARU, E. CARASEVICI, T. LUCHIAN, THE EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECT OF CYTOTOXIC PEPTIDES ON TUMOR CELL LINES**, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 7, No 1, January – March 2012, p. 79 – 84.

[25] Henrik Suttmann, Margitta Retz, Friedrich Paulsen, et al., *Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells*, BMC Urology, 8:5doi:10.1186/1471-2490-8-5, 2008.

## *Participări la conferințe naționale și internaționale*

- Anișoara Nevoie, **Mihaela Pascariu**, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *Human DNA extraction for spectrophotometric and electrophoresis studies*, 10<sup>th</sup> International Balkan Workshop on Applied Physics, 6-8 July, 2009, Constanța, Romania.
- **Mihaela Pascariu**, Anișoara Nevoie, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *The importance of the concentration and purity of genomic DNA in the PCR (polymerase chain reaction) technique*, PhD Students Workshop on Fundamental and Applied Research in Physics, 24 October, 2009, Iași, Romania (**Premiul al II-lea**).
- Anișoara Nevoie, **Mihaela Pascariu**, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *Detection of few mutations in cancer by electrophoresis*, PhD Students Workshop on Fundamental and Applied Research in Physics, 24 October, 2009, Iași, Romania (**Premiul al II-lea**).
- **Mihaela Pascariu**, Anișoara Nevoie, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *PCR-RFLP analysis of human DNA: detection of a mutation in the neoplastic disease*, 1<sup>st</sup> International Symposium on Applied Physics – Materials Science, Environment and Health (ISAP1), 28-29 november, 2009, Galați, Romania.
- Anișoara Nevoie, **Mihaela Pascariu**, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *Optimization of the PCR (polymerase chain reaction) technique for the detection of a mutation in acute leukemia*, 1<sup>st</sup> International Symposium on Applied Physics – Materials Science, Environment and Health (ISAP1), 28-29 november, 2009, Galați, Romania.
- Jitaru, Daniela; Negura, Lucian; Ungureanu, Didona; Dascalescu, Angela; Burcoveanu, Cristina; Nevoie, Anișoara; **Pascariu, Mihaela**; Carasevici, Eugen, *Detection of FLT3 Mutations at acute myeloid leukemia patients*, 5th RAML Conference with International Participation, 16-19 iunie 2010.

- Daniela Jitaru, Lucian Negură, Angela Dăscălescu, Cristina Burcoveanu, Anișoara Nevoie, **Mihaela Pascariu**, Eugen Carasevici, *Deteția mutațiilor FLT3 la pacienții cu leucemie acută mieloblastică*, Conferința Națională “Zilele Oncologiei Iașene”, organizată de Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa”, Iași, 3-5 decembrie, 2009, Iași, România.
- **Mihaela Pascariu**, Anișoara Nevoie, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *Flow cytometry analysis of irradiated cell culture*, 10<sup>th</sup> International Balkan Workshop on Applied Physics, 6-8 July, 2010, Constanța, Romania.
- Anișoara Nevoie, **Mihaela Pascariu**, Daniela Jitaru, Eugen Carasevici, Tudor Luchian, *Cytogenetic changes induced by ionizing radiation in normal human culture*, 10<sup>th</sup> International Balkan Workshop on Applied Physics, 6-8 July, 2010, Constanța, Romania.
- Nevoie Anișoara, **Pascariu Mihaela**, Jitaru Daniela, Carasevici Eugen, Luchian Tudor, *X ray causes chromosomal aberration and apoptosis in cell culture*, Conferința Națională de Fizică, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași, 23-25 septembrie 2010.
- **Pascariu Mihaela**, Nevoie Anișoara, Jitaru Daniela, Carasevici Eugen, Luchian Tudor, *Irradiation of culture medium and cells responses*, Conferința Națională de Fizică, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași, 23-25 septembrie 2010.
- Nevoie Anișoara, **Pascariu Mihaela**, Ivanov Iuliu, Jitaru Daniela, Negura Lucian, Carasevici Eugen, *CHROMOSOMAL ABERRATIONS INDUCED BY IONIZING RADIATION AT DIFFERENT DOSES*, *Primul Simpozion de Biochimie medicală și Medicină moleculară cu participare internațională*, 7-9 octombrie, Iasi 2010.

## *Publicații*

- Nevoie, Anișoara; **Pascariu, Mihaela**; Jitaru, Daniela; Carasevici, Eugen; Luchian, Tudor -*Spectrophotometric and electrophoresis analysis of human DNA: detection of a mutation in cancer*- THE ANNALS OF THE “DUNAREA DE JOS” UNIVERSITY OF GALATI, Year III (XXXII) 2009.
- Nevoie Anișoara, **Pascariu Mihaela**, Ivanov Iuliu, Jitaru Daniela, Negura Lucian, Carasevici Eugen - *CHROMOSOMAL ABERRATIONS INDUCED BY IONIZING RADIATION AT DIFFERENT DOSES* - Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM XI, 2010.
- A. Nevoie, **M. Pascariu**, D. Jitaru, I. Ivanov, D. Constantinescu, E. Carasevici, T. Luchian, *INVESTIGATION OF APOPTOSIS IN NORMAL AND LEUKEMIC CELLS INDUCED BY X-RAY IRRADIATION*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 6, No 1, p. 261-266, January-March 2011.
- A. NEVOIE, **M. PASCARIU**, D. CONSTANTINESCU, D. JITARU, I. IVANOV, E. CARASEVICI, T. LUCHIAN, *X-RAY IRRADIATION OF CULTURE MEDIUM WITH OR WITHOUT CELLS*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 6, No 2, April - June 2011, p. 761 – 768.
- **M. PASCARIU**, A. NEVOIE ANGHELACHE D. CONSTANTINESCU, D. JITARU, E. CARASEVICI, T. LUCHIAN, *THE EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECT OF CYTOTOXIC PEPTIDES ON TUMOR CELL LINES*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 7, No 1, January – March 2012, p. 79 – 84.

## Listă de abrevieri:

<b>A-549</b>	carcinom alveolar uman
<b>AMP</b>	peptide antimicrobiene
<b>A<math>\beta</math>P</b>	proteina $\beta$ amiloid
<b>AP</b>	amiloid proteină
<b>ADN</b>	acid dezoxiribonucleic
<b>ARN</b>	acid ribonucleic
<b>CMI</b>	concentrație minimă inhibitorie
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoxid
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraacetic
<b>HT-29</b>	adenocarcinom colorectal
<b>IC</b>	indice celular
<b>LPS</b>	lipopolizaharide
<b>MDA-MB231</b>	adenocarcinom mamar
<b>MTT</b>	bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-
2,5-difeniltetrazoliu	
<b>M14K</b>	mezoteliom uman
<b>PBS</b>	tampon fosfat salin
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PE</b>	fosfatidiletanolamina
<b>PET</b>	tereftalat de polietilenă
<b>PG</b>	fosfatidilglicerol
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PrP</b>	proteină prionică
<b>PS</b>	fosfatidilserina
<b>7-AAD</b>	7-amino-actinomicina D
<b>SDH</b>	dehidrogenază
<b>SFV</b>	ser fetal de vițel