

ASOCIAȚIA MEDICALĂ ROMÂNĂ
SOCIETATEA ROMÂNĂ DE MICROBIOLOGIE
în colaborare cu
SOCIETATEA ROMÂNĂ DE EPIDEMIOLOGIE



Bacteriologia



Virusologia



Parazitologia



Epidemiologia

PROGRAM / VOLUM DE REZUMATE

A VIII-A CONFERINȚĂ NAȚIONALĂ
DE MICROBIOLOGIE ȘI EPIDEMIOLOGIE

Bolile transmisibile, domeniu prioritar pe agenda sănătății publice

12 - 14 noiembrie 2015

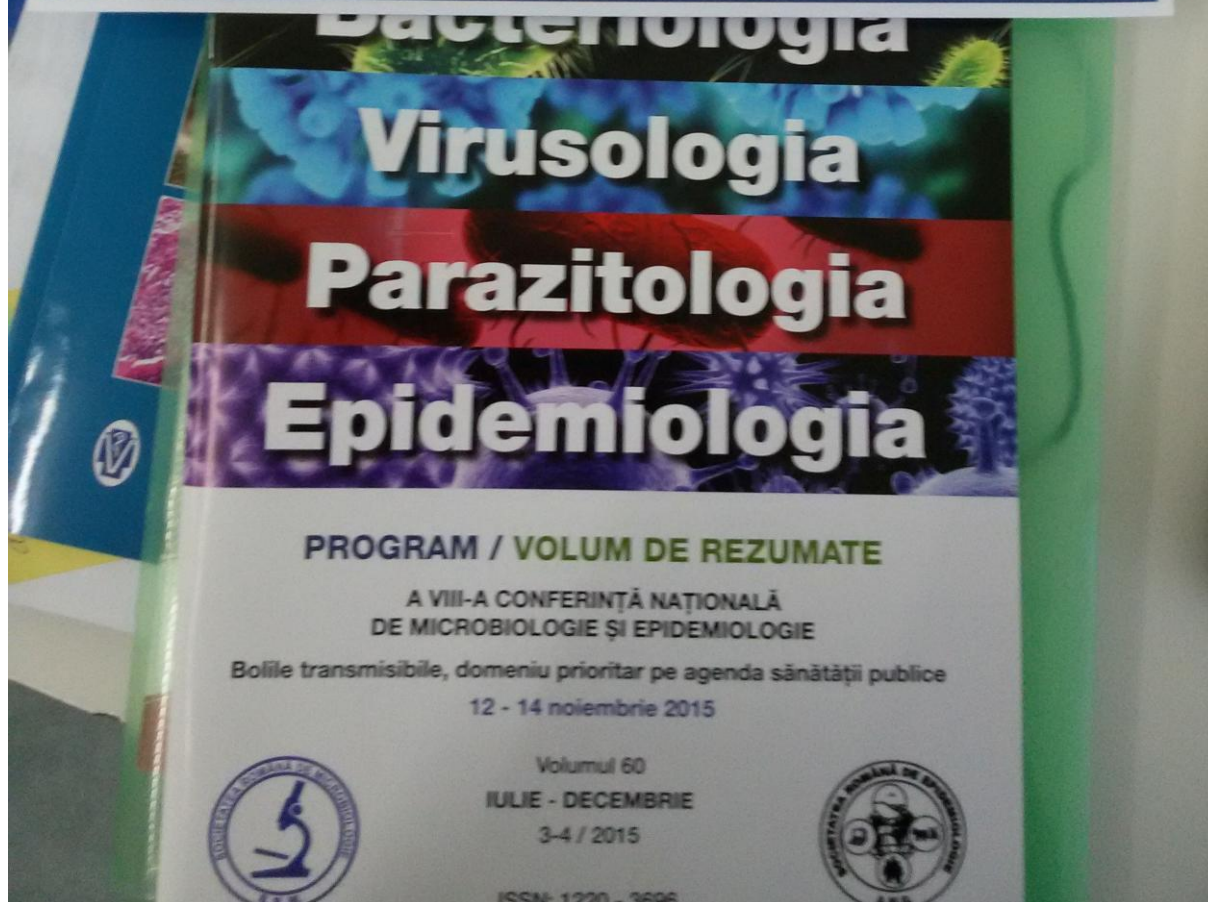
Volumul 60

IULIE - DECEMBRIE

3-4 / 2015

ISSN: 1220 - 3696





STUDII PRIVIND EFECTUL APOPTOTIC AL *ARTEMISININEI* ASUPRA FIBROBLASTELOR EMBRIONARE DE GAINA

**Virgilia Popa^{1,2}, Dumitru Militaru^{1,2,3},
Beatrice Stirbu^{1,3}, Daniela Botus^{1,3}, Adriana Gyorko⁴, Vasile Cozma^{2,4}**

1 - SN Institutul PASTEUR SA;

2 - Academia de Științe Agronomice și Silvice "GHEORGHE IONESCU - SISESTI";

3 - USAMV București; 4 - USAMV Cluj

**A 8-A CONFERINȚA NAȚIONALĂ
DE MICROBIOLOGIE ȘI EPIDEMIOLOGIE**

**HOTEL RAMADA PARC
București 12 – 14 noiembrie 2015**

INTRODUCERE

Fenomenul de rezistență tot mai pregnant întâlnit la antibioticele și antiparazitarele convenționale și agricultura organică au impus găsirea unor alternative terapeutice, între care se situează și artemisinina, un reprezentant al grupului endoperoxid-sesquiterpen-lactone.

Artemisinina* este sintetizată la nivelul tricomilor glandulari foliari ai **Artemisia annua** denumită popular **pelinul dulce, năfurică, măturicea raiului, tamița, iarba sfintei Sofia** sau **matură turcească**).

Folosită cu succes de câteva decenii în terapia malariei, în ultimii ani face obiectul unor intense studii pentru extinderea domeniilor ei de utilizare medicală, atât la om cât și la animale.

***Pentru descoperirea artemisininei, cercetătoarea chineză You You Tu a primit jumătate din Premiul Nobel pentru medicină acordat în 2015.**

INTRODUCERE

Studii relativ recente au demonstrat ca artemisinina poate fi eficienta in controlul coccidiozelor puilor dar sunt putine date privind toxicitatea si efectele secundare ale artemisininei asupra gazdei.

In acest context, studiile de fata au fost derulate *in vitro*, pe monostrat de fibroblaste embrionare de gaina (FEG), pentru a stabili implicarea artemisininei in fenomene apoptotice, prin cuantificarea colorimetrica a activitatii caspazei 3 fata de substratul Ac-DEVD-pNA

Apoptoza (gr. "caderea petalelor florilor / funzelor copacilor", descrisa initial in 1842-1865, premiul Nobel pentru medicina in 2002 pentru identificarea genelor care o controleaza) este un mecanism normal al organismelor pluricelulare, fiind implicata, printre altele, in embriogeneza si in evolutia sistemului imunitar, caracterizata de aparitia unor modificari veziculoase la nivelul membranei celulare si absenta inflamatiei ca rezultat final, si produsa prin activarea caspazei 3 si eliberarea citocromului C.

Caspazele fac parte din familia proteazelor cysteinyl aspartat-specifice, iar CASP3 este procesata si activata de CASP8, 9 si 10, la randul ei clivand CASP6 si 7, fiind astfel un efector esential in producerea mortii celulare programate.

MATERIAL SI METODE

- Solutii stoc *ex tempore* de artemisinin comerciala (ART, *Sigma*), 0.5 mg/ml, in DMF si DMSO (*Merck*)

- concentratii testate: 177,097 μ M; 17,7097 μ M; 3,5419 μ M; 1,77097 μ M (1h, 24h); 177,097 nM (1h, 24h, 48h); 17,7097 nM; 8,8548 nM; 4,4274 nM (1h,48h) .

-Monostrat de fibroblaste embrionare de gaina (embrioni SPF, 11 zile, *Charles River Laboratories*, 10^4 celule / godeu, cultivate in mediul MEM, suplimentat cu ser fetal bovin 10%, ATCC; 37°C, 5% CO₂)

-Martor pentru apoptoza: solutie de colchicina, concentratie finala / godeu: 20 μ M (*Fluka*)



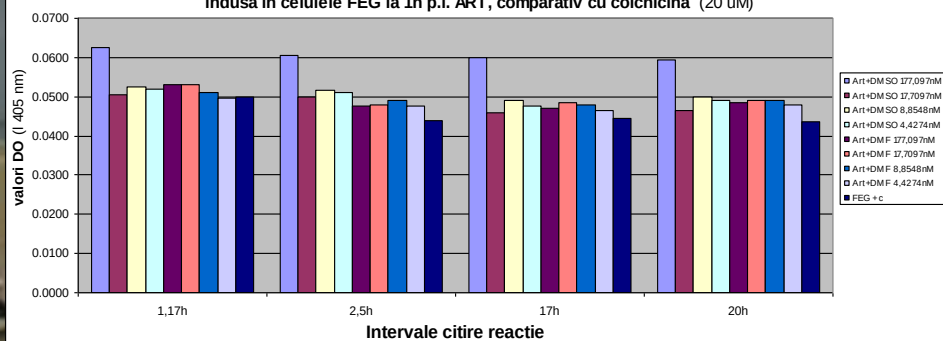
MATERIAL SI METODE

-Caspase 3 Assay kit, Colorimetric (Sigma)

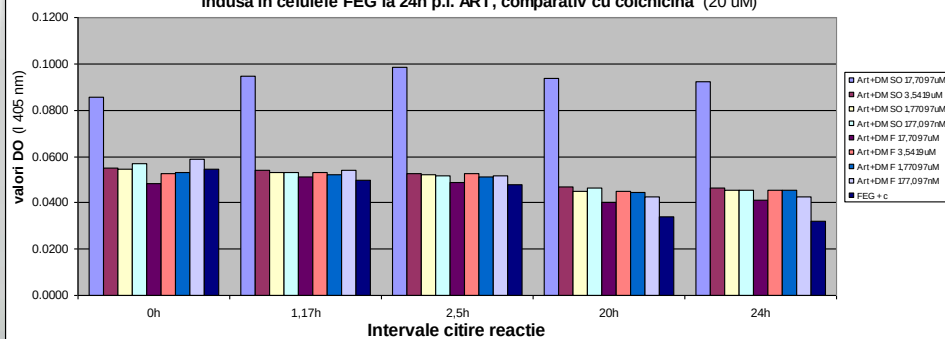
- Indepartat supernatantul de cultura (100 μ l / godeu)
 - Liza celulara a monostratului FEG la 4°C, 20' (25 μ l / godeu tampon de liza, in dilutia de lucru; verificare la microscopul optic ranversat, 200x)
 - Inhibitor Ac-DEVD-CHO (0.02 mM final) : 10 μ l / godeu
 - Substrat Ac-DEVD-pNA (0.2 mM final) :10 μ l / godeu
- ## -Spectrofotometru pentru placi, λ = 405 nm (Multiscan EX, Labsystems)
- Citiri la 1h, 24h si 48h post - inocularea ART si a martorului de apoptoza
 - Intervale de dezvoltare a reactiei de culoare de 1,17h, 2,5h, 17h, 20h si 24h (incubare la 37°C).

REZULTATE

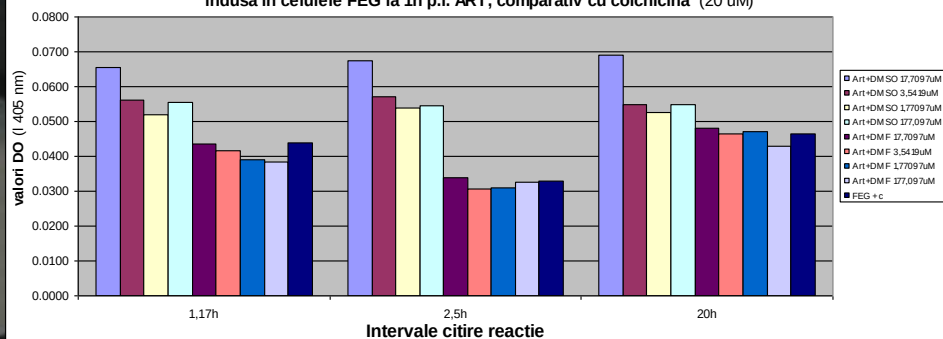
Cuantificarea relativa a activitatii caspasei 3
indusa in celulele FEG la 1h p.i. ART, comparativ cu colchicina (20 uM)



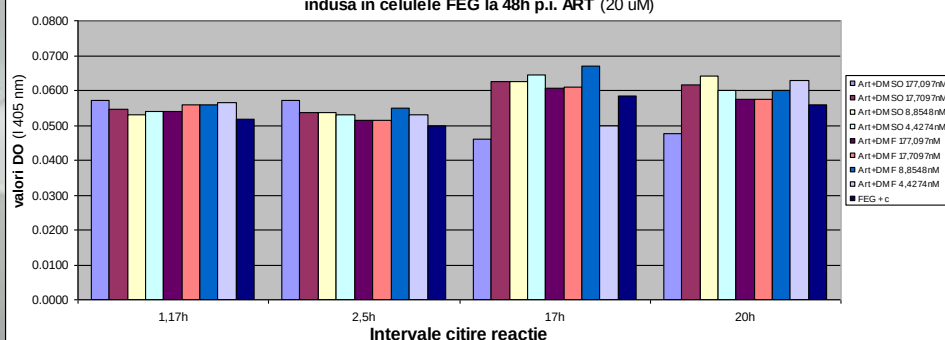
Cuantificarea relativa a activitatii caspasei 3
indusa in celulele FEG la 24h p.i. ART, comparativ cu colchicina (20 uM)



Cuantificarea relativa a activitatii caspasei 3
indusa in celulele FEG la 1h p.i. ART, comparativ cu colchicina (20 uM)



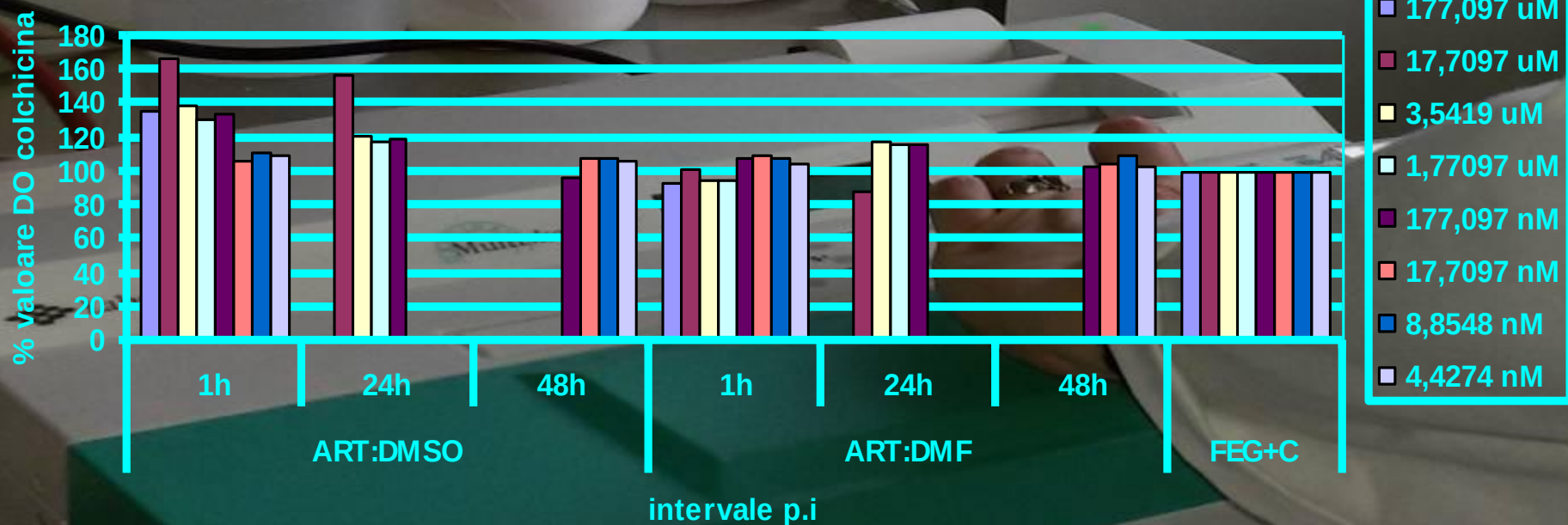
Cuantificarea activitatii caspasei 3 fata de Ac-DEVD-pNA (2mM)
indusa in celulele FEG la 48h p.i. ART (20 uM)



Valori DO necorectate

REZULTATE

Cuantificarea relativa a activitatii caspasei 3 indusa in celulele FEG
la 1h, 24h si 48h p.i. ART, comparativ cu colchicina



DMSO 1,4075 mM DMF 1,2995 mM colchi 20 uM ART 177,097uM

Valori DO corectate (minus blank=tampon kit Casp3, minus inhibitor; semnul “-” neglijat; valorile DO ale colchicinei, considerate referinta, 100%).

CONCLUZII

Rezultatele obtinute sugereaza faptul ca:

1. Artemisininina a indus cresterea activitatii CASP3 in fibroblastele embrionare de gaina la 1h post-inoculare, fata de colchicina, la care CASP3 a inregistrat un maxim de activitate mai tardiv, spre 20h de la inoculare
2. Efectul a fost inregistrat indiferent de solventul utilizat si la concentratiile cele mai mici testate ale ART
3. Rezultatele impun confirmarea prin teste de cuantificare a expresiei genelor pro-apoptotice / anti-apoptotice si derularea unor studii farmacologice privind utilizarea artemisininei in terapia animalelor crescute in ferme organice si / sau conventionale