

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE FARMACIE**

**DRĂGHICI GEORGE ANDREI**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**EFECTE TOXICE ȘI ASPECTE OBSERVAȚIONALE**  
**REFERITOARE LA CADMIU SI CUPRU PE MODELE**  
**EXPERIMENTALE**

**Conducător Științific**  
**PROF. DR. FARM. CRISTINA ADRIANA DEHELEAN**

**Timișoara**  
**2020**

## CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Lista abrevierilor	VIII
Indexul Figurilor	IX
Indexul Tabelelor	XI
Mulțumiri	XII
INTRODUCERE	XIII

### PARTEA GENERALĂ

1. Current aspects of cadmium and copper toxicity	1
2. Gastropods and ecotoxicology	10

### PARTEA SPECIFICĂ

3. Expunerea la soluri contaminate cu cupru	32
4. Expunerea la cadmiu prin consum alimentar timp de 14, 28 și 112 zile	49
5. Efectul doze reduse de cadmiu din hrană asupra homeostazei cuprului, manganului și fierului în hepatopancreas	57
6. Determinarea stării de metilare a genei Cd-MT	64
7. Efectul cadmiului asupra proliferării celulare (test BrdU)	70
8. Efectul cadmiului asupra nivelului total de metilare a ADN-ului	80
9. Efectul cadmiului asupra metilării globale și exprimării DNMT (determinat prin RT-PCR)	84
10. Expunerea la Cd și Cu induce modificări citotoxice și epigenetice ale celulelor canceroase colorectale umane - HT-29	89

<b>Conclusions</b>	108
--------------------	-----

<b>BIBLIOGRAPHY</b>	110
---------------------	-----

**Cuvinte cheie: cadmiu, epitoxicogenomică, gastropode**

## **INTRODUCERE**

Deși cadmiul și cuprul pot fi găsite în natură în cantități mici (ordinul ppm), modernizarea și înmulțirea accesoriilor tehnologice care utilizează electricitate a dus la răspândirea și acumularea de metale grele toxice precum cadmiu și cupru în diferite componente ale dispozitivelor electromecanice (cabluri, baterii, circuite, materiale plastice, anvelope etc.). Uzura acestor dispozitive permite unor cantități importante din aceste metale să treacă în mediu, contribuind astfel la creșterea efectelor toxice asupra solului, vegetației și implicit a omului.

Întrucât analiza instrumentală modernă permite detectarea rapidă și sensibilă ridicată a Cd și Cu, determinarea efectelor lor poluante asupra lumii vii rămâne o problemă deschisă. Utilizarea gastropodelor ca bioindicator al acestor efecte este inclusă în actualele direcții de cercetare. Gastropode precum *Cantareus aspersus* (Müller, 1774; syn. *Cornu aspersum* sau *Helix aspersa*) sunt tolerante la ingerarea unor niveluri ridicate de cadmiu și acumulează în țesuturi niveluri ridicate din acest metal.

Melcii pulmonați tereștri utilizează cuprul ca oligoelement esențial, dar prezența unor cantități importante din acest metal pot produce efecte toxice asupra melcilor. Reglarea homeostatică a Cu trebuie să fie, prin urmare, un obiectiv esențial al melcilor terestre pentru a supraviețui. Aceste moluște acumulează cupru în majoritatea organelor lor, o anumită proporție fiind întotdeauna legată, la concentrații constante, de o izoformă a unei metalotioneine conținând Cu (Cu-MT), indiferent dacă animalele au fost expuse la cantități fiziologice sau crescute de Cu.

Scopul general al tezei mele de doctorat a fost evaluarea efectului expunerii la cadmiu, și respectiv cupru, pe diferite căi de expunere asupra diferitelor modele toxicologice.

Lucrarea de față este structurată în două părți principale: o parte generală și o parte specifică. Partea generală conține informații teoretice cu privire la relevanța pentru mediu și om a expunerii la cadmiu și cupru. Această parte oferă, de asemenea, o perspectivă detaliată asupra efectelor toxice ale acestor oligoelemente la mai multe niveluri organismale, inclusiv epigenomul, ca dovezi convingătoare pentru utilitatea melcilor ca bioindicatori.

În acest scop, am folosit melcul de grădină, *Cantareus aspersus*, ca model nevertebrat și linia umană a celulelor HT-29 ca model toxicologic uman. Pentru a furniza date relevante din punct de vedere toxicologic, am utilizat o gamă largă de endpoint-uri toxicologice, cu accent pe modificările care apar la nivelul genelor și mecanismelor cheie care reglează funcționalitatea lor (metilarea ADN-ului).

Ca urmare a utilizării unor scenarii de expunere cu multiple durate, căi și doze de expunere, rezultatele tezei mele de doctorat ar trebui să ofere o nouă dimensiune asupra înțelegerii efectelor toxice legate de contaminarea / poluarea cu cupru și cadmiu și modificările moleculare asociate cu aceste evenimente.

## Studiul 1. Expunerea la soluri contaminate cu cupru

**Obiectivul:** Obiectivele principale ale acestui studiu au fost: (i) să identifice dacă melcii tereștri preiau cuprul din sol în mod direct, independent de ingestia alimentelor și (ii) să evalueze potențialul toxic al contaminării solului cu cupru asupra pe melcilor tereștri (*Pulmonata*). Exemplare tinere din specia *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) au fost utilizate ca model animal, deoarece această specie are o biologie binecunoscută și este ușor crescută atât în condiții de laborator, cât și în aer liber. În acest context, am evaluat transferul direct al cuprului din sol în corpul melcilor așa cum apare în natură, adică simultan prin contactul epitelial și ingestia solului. În această direcție au fost măsurate nivelurile de bioacumulare (niveluri de Cu în hepatopancreasul, piciorul și cochilia melcilor), parametrii morfologici (mărimea cochiliei) și letalitatea (rata de supraviețuire), în timp ce sulfatul de cupru a fost utilizat ca sursă de cupru. Pentru a furniza date relevante din punct de vedere ecologic, acest experiment a fost realizat în condiții semirealistice de câmp, majoritatea parametrilor reproducându-i pe cei întâlniți în natură (lumina solară, curenții de aer, temperatura, fotoperioada).

**Materiale și metode:** Acest experiment a fost realizat în satul Temerești (județul Timiș, România; 45,8747° lat. N, lungime 22,2117° long E). Pentru a asigura o populație de testare omogenă, au fost achiziționate 350 de exemplare tinere din specia *C. aspersus*, cu vârsta de trei luni, de la o fermă de melci din România (S.C. Edimpe Auto S.R.L., Muntenii de Sus, județul Vaslui). După ce au fost adaptați la creșterea în spațiu închis pe parcursul unei perioade de pre-expunere de șase săptămâni, melcii au fost hrăniți *ad libitum* cu o dietă neîmbogățită în cupru conținând cretă furajeră (15%), făină de grâu (10%), făină de porumb (7%), șrot de soia (10%), șrot de germen de porumb (10%), șrot de floarea soarelui (15%), fosfat monocalcic (3%), Inlavit (10%), griș de grâu (10%) și premix vitamino-mineral pentru porci (10%).

**Analize chimice:** Având în vedere motivele menționate mai sus, pentahidrat de sulfat de cupru pur ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 99,99% urme de metale) a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Elveția) și utilizat pentru a pregăti următoarele soluții: (i) în Faza E1: grup M1, grup de control; grup Cu1.1., 30 miligrame pe litru (mg / L) Cu; grup Cu2.1., 60 mg / L Cu; grup Cu3.1., 160 mg / L Cu; grup Cu4.1., 300 mg / L Cu; și (ii) faza E2: grup M2, grup de control; grup Cu1.2., 60 mg / L Cu; grup Cu2.2., 120 mg / L Cu; grup Cu3.2., 320 mg / L Cu; grup Cu4.2., 600 mg / L Cu. Această abordare ne-a permis să obținem pentru toate substraturile contaminate cu Cu concentrații de cupru în sol de două ori mai mari la 60 de zile comparativ cu 30 de zile. Concentrațiile de cupru au fost cuantificate prin spectrofotometrie de absorbție atomică cu flacără cu sursă continuă de înaltă rezoluție.

**Rezultate:** Concentrațiile de cupru ale solului au fost corelate puternic cu cele măsurate în hepatopaneas ( $r = 0,765$ ,  $p = 0,000$ ) și piciorul ( $r = 0,631$ ,  $p = 0,000$ ), dar corelate moderat cu cele determinate în coajă ( $r = 0,426$ ,  $p = 0,019$ ). La 30 de zile, concentrație de cadmiu în hepatopaneas a atins un platou, valori cuprinse între 38 și 41 mg / kg d. wt Cu fiind determinate pentru primele trei cele mai mari doze de expunere. Valorile măsurate la 60 de zile au crescut odată cu conținutul de cupru din sol, dar numai după ce au prezentat valori similare (aproximativ 55 mg / kg dw Cu) pentru melcii expuși la cele mai mici doze de cupru.

Dacă raportul dintre cantitatea de cupru din hepatopaneas și sol în melcii din lotul de control a fost mai mare de 10, la gastropode expuse la cupru rapoartele au fost adesea mai mici de 1 și cel puțin de 10 ori mai mici decât cele măsurate în grupurile de control. Regresiile dintre cantitățile de cu din sol și hepatopaneas au fost semnificative (faza E1:  $p = 0,031$ ,  $R^2 = 0,321$ ; faza E2:  $p = 0,000$ ,  $R^2 = 0,902$ ), dar pantele de regresie corespunzătoare au fost similare între faza E1 și E2 (ANCOVA,  $p = 0,191$ ), în timp ce coeficienții de regresie corespunzători au fost statistic diferiți ( $p = 0,000$ ).

În plus, conținutul de Cu în hepatopaneasul melcilor din grupul de control din faza E1 a fost diferit în mod semnificativ de cel măsurat în faza E2 (testul Tukey HSD,  $p = 0,035$ ). Cu toate acestea, valorile măsurate în picior în aceste două momente nu au fost semnificativ diferite (testul Tukey HSD,  $p \geq 0,194$ ). La 30 de zile, cuprul din hepatopaneas a atins o concentrație de platou pentru cele mari doze de expunere, mai precis între 38 și 41 mg / kg d. wt Cd.

Regresiile dintre conținutul de Cu în sol și hepatopaneas au fost semnificative (faza E1:  $p = 0,031$ ,  $R^2 = 0,321$ ; faza E2:  $p = 0,000$ ,  $R^2 = 0,902$ ), dar pantele lor au fost similare între fazele E1 și E2 (ANCOVA,  $p = 0,191$ ), în timp ce coeficienții de regresie corespunzători au fost statistic diferiți ( $p = 0,000$ ). Pentru toate tratamentele din faza E2, testarea post-hoc a evidențiat rate de supraviețuire semnificativ mai mici la melcii expuși la cupru decât la melcii de control (test Breslow,  $p \leq 0,029$ ).

## **Studiul 2. Expunerea la cadmiu prin consum alimentar timp de 14, 28 și 112 zile**

**Obiectiv:** Prezentul experiment a urmărit să determine nivelul de Cd din hrană care a condus la o creștere a retenției de Cd în hepatopaneasul melcului. S-a folosit un scenariu de expunere continuă (14, 28 și 112 zile) și multiple doze de expunere, folosind melcii *Cantareus aspersus* nou-maturizați ca model de invertebrat.

**Materiale și metode:** Au fost utilizate cinci doze experimentale, cu trei replicări pe fiecare doză; concentrațiile nominale folosite fiind: 0, 0,02, 0,05, 0,2 și 1 mg / kg dw. Sulfatul de cadmiu ( $\text{CdSO}_4$ , puritate 99,99%, Sigma-Aldrich) a fost utilizat ca sursă de cadmiu. S-a utilizat un furaj având următoarea compoziție per porție: 20 g piure morcovi (HiPP, Marea Britanie)), 50 g cereale pentru copii fortificate (Nestle Nestum5 - Five Cereals) și 3 ml fungicid (soluție de metil paraben 1%) pentru a realiza o distribuție uniformă a cadmiului în mediu de alimentare cu melc. Probele de hepatopaneas au fost dezghețate, uscate la cuptor (105 °C, 24 h), apoi cântărite cu precizie de 0,01 mg. Proba a fost calcinată într-un calcinator (Nabertherm B150, Lilienthal; 550 °C, 6 h), cenușa rezultată fiind supusă ulterior

digestiei umede cu acid. Pe scurt, cenușa a fost tratată cu 0,5 ml HNO<sub>3</sub> 65% (Merck, suprapur), încălzită până la uscare și dizolvată în 20 ml HNO<sub>3</sub> 0,5N. După filtrare prin hârtie filtrantă fără cenușă, volumul fiecărei probe a fost adus la 30 ml cu 10 ml HNO<sub>3</sub> 0,5N.

**Rezultate:** Opt melci au fost prelevați pentru fiecare grup experimental la 14, 28 și 112 zile. Nivelurile de cadmiu în hepatopaneas au avut tendința de a crește odată cu doza și durata de expunere, atingând diferențe semnificative comparativ cu loturile de control pentru cele mai mari doze de expunere (marcate cu \* pentru  $p \leq 0,05$ ): la 14 zile: pentru tratamentul 0Cd,  $2,23 \pm 0,32$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,02Cd,  $2,16 \pm 0,44$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,05Cd,  $2,01 \pm 0,05$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,2Cd,  $2,37 \pm 0,29$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul cu 1Cd,  $11,30 \pm 1,49$  \* mg / kg dw Cd; și la 28 de zile: pentru tratamentul cu 0Cd,  $2,38 \pm 0,22$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul cu 0,02Cd,  $2,73 \pm 0,55$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,05Cd,  $3,71 \pm 0,93$  mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,2Cd,  $6,54 \pm 0,27$  \* mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 1Cd,  $13,73 \pm 2,57$  \* mg / kg dw Cd.

Concentrațiile medii de cadmiu măsurate la 112 zile în hepatopaneas au fost: pentru tratamentul 0,02Cd, 3,80 mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,05Cd, 4,85 mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 0,2 Cd, 4,98 mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 1Cd, 44,34 mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 10Cd, 212,14 mg / kg dw Cd; pentru tratamentul 100Cd, 406,36 mg / kg dw Cd. Aceste rezultate sugerează existența potențială a nivel prag de cadmiu sub care acești melci sunt capabili să mențină concentrații de cadmiu relativ stabile în hepatopaneas, acest prag fiind 5 mg / kg dw Cd.

### **Studiul 3. Efectul doze reduse de cadmiu din hrană asupra homeostazei cuprului, manganului și fierului în hepatopaneas**

**Obiectiv:** Am investigat efectele pe termen scurt ale Cd din hrană asupra concentrației de Cu, Mn și Fe în hepatopaneasul melcilor tereștri.

**Materiale și metode:** Protocolul de creștere și procedurile corespunzătoare sunt similare cu cele descrise la studiul 2.

**Rezultate:** Nivelurile de hepatopaneas Cd au tins să crească odată cu doza și durata de expunere. În schimb, nu s-a observat nici un efect dependent de doza de cadmiu din hrană în ceea ce privește conținutul de cupru, mangan și fier din hepatopaneas. Cu toate acestea, nivelurile de cupru din hepatopaneasul melcilor expuși la Cd au fost semnificativ mai ridicate decât cele măsurate în grupul martor atât în perioada 0-14 zile, cât și în perioada 15–28 zile. De asemenea, am observat concentrații notabil crescute de mangan în cazul melcilor expuși comparativ cu indivizii din grupul martor, în timp ce nu a fost evidentă nici o tendință clară în ceea ce privește efectul dozei de cadmiu asupra fierului din hepatopaneas.

### **Studiul 4. Determinarea stării de metilare a genei Cd-MT**

**Obiectiv:** Prezentul studiu a urmărit să identifice dacă promotorul genei Cd-MT de la *Helix aspersa* este nativ metilat și dacă și în ce măsură cadmiu afectează statusul său de metilare.

**Materiale și metodă:** ADN-ul genomic a fost extras din celulele hepatopancreatice folosind un kit QIAamp ADN Micro (Qiagen, Germania). Concentrația ADN-ului a fost determinată folosind un spectrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, SUA), concentrațiile măsurate variind între 120 și 875 ng / mL. În continuare, conversia bisulfică a ADN-ului hepatopancreasului a fost efectuată folosind un kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, Germania). După conversia bisulfică, am efectuat un PCR specific pentru metilare (MS-PCR) folosind primeri proiectați specific pentru secvența ADN-ului convertit după bisulfitare. Primeri utilizați pentru promotorul genei Cd-MT au fost: CdMTbs-Fw1-GGATTTATYGTAGGATATTAATTAAGG promotor, CdMTbs-R1-TAAAAATAAAACCAAATACCAATCCTAC; CdMTbs-R2-CCTTACCACACTTACAACCATC.

**Rezultate:** Analiza ADN-ului extras din melci expuși la doze de 0 mg / L Cd, 0,1 mg / L Cd, 0,2 mg / L Cd, 1 mg / L Cd, 5 mg / L Cd, 10 mg / L Cd și 100 mg / L Cd prin analiza MS-PCR a sugerat lipsa de metilare a promotorului pentru această genă.

#### **Studiul 5. Efectul cadmiului asupra proliferării celulare (test BrdU)**

**Obiectiv:** Scopurile acestui studiu au fost determinarea efectului citotoxic al cadmiului asupra celulelor hepatopancreasului.

**Materiale și metodă:** După 28 de zile de expunere continuă la Cd (via hrană), am selectat șase melci din grupul martor, din grupul de 10 ppm și din grupul de 100 ppm; și le-am injectat BrdU (Roche) la 14 ore înainte de sacrificare la o doză de 0,1 mg / g greutate umedă. Soluția BrdU utilizată a fost obținută prin dizolvarea în condiții sterile a pulberii BrdU în soluție Ringer (80 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES tampon, 5 mM galactoză, 2 mM trehaloză, 5 mM glucoză , acetat de sodiu 1 mM).

**Rezultate:** Rezultatele prezente sugerează că proliferarea celulară a celulelor hepatopancreasului de melci adulți, *Helix aspersa*, este sensibilă la expunerea la cadmiu începând de la doze de 10 mg / kg dw Cd înainte.

#### **Studiul 6. Efectul cadmiului asupra nivelului total de metilare a ADN-ului**

**Obiectiv:** Scopul acestui studiu a fost să stabilească dacă și în ce măsură cadmiul influențează nivelurile globale de (hidroxi) metilare ale ADN-ului din hepatopancreasul melcilor *C. aspersus*.

**Materiale și metodă:** ADN-ul a fost izolat din țesutul hepatopancreatic din patru melci pe fiecare replică folosind kitul DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), conform

protocolului standard pentru țesuturile animale. ADN-ul extras a fost verificat calitativ (migrație în gel de agaroză) și cantitativ (260/280 nm, NanoDrop-2000, Thermo Fisher Scientific Inc., SUA);

Conținutul total de 5mc în ADN hepatopancreatic a fost determinat folosind metoda ELISA colorimetrică. Această metodă a fost aleasă deoarece reprezintă o alternativă rapidă, ieftină și de încredere la metodele utilizate în mod curent pentru a determina metilarea ADN-ului global, în special pentru măsurători în serie, așa cum a fost cazul prezentului experiment.

**Rezultate:** Nivelurile de 5 mC în ADN-ul hepatopancreatic au variat de la  $0,29 \pm 0,10$  în grupul 10Cd la  $0,98 \pm 0,24$  în grupul 100Cd. Pentru melcii din grupul de referință, nivelul de 5mC a fost de  $0,34 \pm 0,08$ . Valorile măsurate de 5mC pentru cea mai mare doză de cadmiu (grup 100Cd) au fost semnificativ crescute în comparație cu controalele (test Tukey HSD,  $p \leq 0,001$ ), dar nu valorile determinate pentru celelalte grupuri de tratament (test Tukey HSD,  $p \geq 0,05$ ).

#### **Studiul 7. Efectul cadmiului asupra metilării globale și exprimării DNMT (determinat prin RT-PCR)**

**Obiectiv:** Scopul general a acestui studiu fost acela de a identifica efectul expunerii la Cd asupra genelor cheie care modulează ciclul de metilare.

**Materiale și metodă:** ARN-ul a fost izolat folosind un kit Direct-zol™ RNA MiniPrep și evaluat cantitativ cu un spectrofotometru DS-11, transcripția inversă fiind realizată folosind kitul de sinteză ADNc Maxima® First Strand. Condițiile PCR-ului, realizat cu ajutorul unui sistem Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific, SUA), au fost de 95 °C (10 sec), urmat de 40 de cicluri de denaturare la 95 ° C timp de 15 sec și și elongarea ADN-ului la 55 ° C timp de 1 min. Primerii utilizați pentru a amplifica genele analizate au fost:

18S (hs) f: 5'GTACCCGTTGAACCCATT3",  
r: 5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3",  
DNMT1: f: 5'ACCGCTTCTACTTCCTCGGCCTA3',  
r: 5'GTTGCAGTCCTCGTGAACACTGTGG3' ,  
DNMT3A: f: 5'CACACAGAAGCATATCCAGGAGT G3",  
r: 5'AGTGGACTGGGAAACCAAATACCC3".  
DNMT3B f: 5'AATGTGAATCCAGTCAGG3",  
r: 5'ACTGGATTAACTCCAGGAACCGT3".

**Rezultate:** Expresia DNMT1 la melcii din grupul martor (grupul 0Cd) a fost mai mică decât cele cuantificate pentru melcii 0.02Cd, melcii 0.2Cd, melcii 10Cd și melcii 100Cd și mai mare decât cea determinată pentru melcii din grupurile 0.05Cd și 1Cd, dar comparațiile post-hoc asociate nu au arătat prezența unor diferențe statistice semnificative comparativ cu lotul martor. Rezultatele noastre au arătat că dintre



diferitele gene care codifică enzimele DNMT în vertebrate numai gena candidată care codifică DNMT1 este funcțională în hepatopacreasul melcilor maturi *C. aspersus*. După căutarea cu BLAST în DDBJ Sequence Read Archive (DRA) pentru corespondența dintre primerii pentru DNMT1 și DNMT3 uman și secvențele de nucleotide din transcriptomul *C. aspersus* (accesare SRX1058255), am identificat doar pentru DNMT1 secvențele de nucleotide care prezintă o similaritate de 64% cu gena DNMT1 umană. Prin conectarea expresiei genelor candidate care codifică DNMT și expunerea la cadmiu, rezultatele noastre extind în mod semnificativ cunoștințele anterioare despre mecanismele potențiale care la speciile de nevertebrate relevante toxicologic stau la baza modificării statusului de metilare a ADN-ului ca urmare a expunerii la substanțe chimice. Mai precis, cadmiul ar putea acționa prin perturbarea expresiei normale a DNMT1, ceea ce conduce la modificări ale nivelului genomic de 5mC.

Relația dintre cadmiul din hrană și expresia DNMT1 nu a evidențiat o curbă clară doză-răspuns, ci mai degrabă un model bimodal de răspuns, cu distribuția transcripților prezentând două maxime. Dată fiind cunoașterea foarte limitată a metilării ADN-ului la moluște și a interacțiunii sale cu factorii abiotici este dificil de explicat relevanța biologică a rezultatelor prezente.

#### **Studiul 8. Expunerea la Cd și Cu induce modificări citotoxice și epigenetice ale celulelor canceroase colorectale umane - HT-29**

**Obiectiv:** Prezentul studiu a avut ca scop verificarea impactului soluțiilor apoase de CdCl<sub>2</sub> și CuSO<sub>4</sub> asupra celulelor carcinomului colorectal uman - HT-29 în ceea ce privește viabilitatea celulelor, morfologia și capacitatea de migrare și metilarea ADN-ului.

**Materiale și metode:** CuCl<sub>2</sub> și CuSO<sub>4</sub> au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (Germania) sub formă de pulberi de puritate analitică. Mediul de cultură celulară: McCoy's Modified Medium și suplimente - ser fetal bovin (PBS), amestec de antibiotic penicilină / streptomycină. Ceilalți reactivi folosiți în prezentul proiect experimental au fost: tampon de soluție salină fosfat (PBS), albastru Tripa și albastru Alamar. Partea experimentală in vitro a prezentului studiu a fost realizată pe o linie celulară de carcinom colorectal uman - HT-29 (ATCC® HTB-38™). ARN-ul total a fost izolat din celulele HT-29 folosind reactiv trizol și kituri de purificare Quick-RNA™ (Zymo Research). Primerii utilizați pentru a amplifica genele analizate au fost aceleași ca în studiul 9

**Rezultate:** Adăugarea soluției de CdCl<sub>2</sub> în mediul celulelor HT-29 și expunerea la acest compus timp de 24 de ore au fost asociate cu modificări notabile în morfologia celulelor în comparație cu celulele controlate (nestimulate) și celulele tratate cu solvent. Astfel, cele mai mici concentrații - 0,05 și 0,2 pg / ml nu au avut niciun impact asupra formei, confluentei sau aderenței celulelor la placa de cultură, în timp ce începând cu 1 pg / ml celulele au devenit rotunde, flotabile în mediu iar la cea mai mare concentrație testată - 100 pg / ml, celulele au părut să se dezintegreze, confirmând datele de viabilitate și indicând un efect citotoxic pentru Cd.

Stimularea celulelor cu  $\text{CuSO}_4$  (la concentrații de 0,05; 0,2 și 1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) timp de 24 de ore nu a avut niciun impact asupra morfologiei celulelor HT-29 în ceea ce privește forma, aderența sau confluența în comparație cu celulele martor sau celulele stimulate cu solvent. Cu toate acestea, s-au observat anumite modificări în celulele expuse la cele mai mari concentrații de Cu, adică 10 și 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Aceste celule au prezentat o morfologie diferită în raport cu celelalte grupuri de celule și erau vizibile ca celule rotunde care erau detașate și pluteau în mediul de cultură.

Modificările induse de clorura de cadmiu asupra activității genelor DNMT1, DNMT3A și DNMT3B a înregistrat un trend similar în raport cu creșterea concentrațiilor de Cd. Valorile determinate au scăzut de la cea mică doză de cadmiu la penultima doză de cadmiu pentru a înregistra apoi din nou valori ridicate la cea mai mare doză de cadmiu.

## Concluzii:

1. Gastropodele terestre pot acumula Cu din sol independent de ingerarea de hrana, astfel perfecționând cunoștințele noastre despre toxicitatea cuprului asupra nevertebratelor terestre.
2. Studiul a confirmat (prin Elisa) prezența 5-mC în *C. aspersus* și ca prezența cadmiului în doze mari poate afecta nivelurile globale de 5 mC din hepatopaneas pentru această specie.
3. Analiza MS-PCR a sugerat lipsa de metilare a promotorului pentru gena Cd-MT.
4. Gena candidată pentru DNMT1 în melcii *C. aspersus* pare să fie exprimată funcțional în hepatopaneas; și expunerea la cadmiu ar putea afecta activitatea acestei gene.
5. Citotoxicitatea cadmiului pare să fie dependentă de doză de Cd din hrana.
6. Soluția  $\text{CdCl}_2$  a indus citotoxicitatea asupra celulelor Ht-29 (după stimularea 24 h) într-o manieră dependentă de doză și este caracterizată printr-o scădere a viabilității celulare și modificări ale morfologiei celulare.
7. La doze mici  $\text{CuSO}_4$  0,05; 0,2, 1 și 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) a exercitat un efect citotoxic prin reducerea semnificativă a viabilității celulelor, în timp ce la o doză mare - 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , s-a observat un efect stimulator.