

EFECTELE ACUTE PATOLOGICE ALE ETANOLULUI ȘI ACETALDEHIDEI ASUPRA CULTURILOR CELULARE DIN CARDIOMIOCITE DE ȘOBOLAN

*Petru Scripcariu**, *Constantin Cotrutz***, *O.C. Mungiu****, *Sultana Mihailovici*****,
*Carmen Cotrutz***, *Elena Teslaru****, *Olga Scripcariu**, *Emil Iacob*****, *Dan Despa*****,
*Cornel Moșoiu***, *Tudor Petreus***, *Cezar Ionescu***, *Adrian Cosovanu*****

REZUMAT

Scopul studiului este aprecierea efectelor acute patologice ale etanolului și ale metabolitului său acetaldehida, asupra cardiomiocitelor de șobolan aflate în culturi celulare.

Etanolul (20 mM/l și 200 mM/l) cât și acetaldehida (10 mM/l) și (100 mM/l) au determinat o detașare a filmului celular de pe substrat în proporție de peste 95%.

La microscopul fonic nu am decelat nici un fel de modificări celulare în culturile cardiomiocitare expuse la etanol. În schimb, în culturile expuse la acetaldehidă am constatat mici vacuole citoplasmice rezultate din dispariția materialului PAS pozitiv (glicogen). La microscopul electronic nu am notat nici o modificare ultrastructurală la culturile expuse la etanol. La cardiomiocitele expuse la acetaldehidă am notat o suferință mitocondrială exprimată prin balonizarea mitocondrială. De asemenea, am constatat o intensificare a activității funcționale desfășurată în reticulul endoplasmic ilustrată prin desprinderea de microvezicule de tranzit.

Concluzii: Efectele acute nocive ale etanolului la nivelul cardiomiocitelor se exercită mai ales prin intermediul metabolitului său toxic acetaldehida, etanolul "per se" având ca punct de impact membrana citoplasmică.

Cuvinte cheie: etanol, acetaldehidă, culturi celulare de cardiomiocite de șobolan.

ABSTRACT

Patological acute effects of ethanol and acetaldehyde on rat cultured cardiomyocytes

Ethanol (20 mM/l and 200 mM/l) and acetaldehyde (10 mM/l and 100 mM/l) exposure results in more than 95% detachment from substrate of rat cultured cardiomyocytes. On light microscope we didn't notice any cellular changes on the cultured cardiomyocytes exposed to ethanol. But on the cardiomyocytes exposed to acetaldehyde we have noticed small cytoplasmic vacuoles that resulted from the disappearance of PAS positive substance (glycogen). Neither on electron microscope we didn't notice any change of cells exposed to ethanol. But on the cardiomyocytes exposed to acetaldehyde we noticed a mitochondrial swollen and an intensification of the functional activity of the endoplasmic reticulum, manifested as formation of the transit microvesicles.

The study reveals that harmful acute effects of the ethanol at the cardiomyocytes level is exercised especially through his toxic metabolite acetaldehyde, the ethanol having as impact point the cytoplasmic membrane.

Key words: ethanol, acetaldehyde, rat cultured cardiomyocytes

Introducere

În ultimii ani studii numeroase au conturat în mod clar relația între alcoolism și dezvoltarea unei cardiomiopatii, numită din această cauză cardiomiopatia alcoolică (4, 5, 8). În același timp este recunoscut și conceptul de Holiday Heart Syndrom, o tahiaritmie paroxistică, de obicei supraventriculară, determinată de consumul acut, masiv de etanol. Studiul prezent se focalizează asupra efectelor acute ale etanolului asupra cardiomiocitelor, evidențiate, mai ales, la nivel ultrastructural, modificări patologice care, probabil, reprezintă primul moment al instalării fazei subclinice a cardiomiopatiei alcoolice.

Material și metodă

Studiul a fost realizat pe culturi de cardiomiocite de șobolan nou născut de trei zile, culturile de celule au fost

întreținute în cadrul laboratorului specializat al Institutului de Igienă Iași. Etapele studiului au fost: realizarea culturii celulare de cardiomiocite, aplicarea substanței de studiat pe mediul de cultură, evaluarea efectelor substanțelor asupra culturilor celulare.

Realizarea culturii de cardiomiocite. Tehnica de lucru (6, 7) a cuprins următoarele etape: prelevarea sterilă a inimii de șobolan nou născut de trei zile; fiecare cord a fost fragmentat separat în piese cu dimensiuni de 1 - 3 mm³; fragmentele au fost trecute într-un balon Erlenmeyer și spălate în tampon fosfat salin; după ultima spălare fragmentele au fost introduse în EDTA 0,02%, încălzite la 37° C; în balon s-a introdus o bară magnetică, amestecul a fost agitat magnetic timp de 30 minute la temperatura camerei, după care s-a îndepărtat supernatantul care conține material citotoxic; peste fragmentele rămase s-a adăugat soluție EDTA; s-au efectuat scurte șarje de dispersie care au durat 4-5 minute fiecare; după fiecare șarjă, supernatantul a fost colectat într-un

*Petru Scripcariu, Olga Scripcariu - Clinica Urgențe Medicale Iași

**Constantin Cotrutz, Carmen Cotrutz, Cornel Moșoiu, Tudor Petreus, Cezar Ionescu - Catedra Biologie Celulară, UMF Iași

***O.C. Mungiu, Elena Teslaru - Catedra Farmacologie, UMF Iași

****Emil Iacob, Dan Despa - Institutul de Sănătate Publică Iași

*****Adrian Cosovanu - Clinica a III-a Medicală Cardiologică "I. Enescu", UMF Iași

*****Sultana Mihailovici - Catedra de Anatomie Patologică, UMF Iași

recipient cufundat într-un cristalizor cu gheață; supernatantele astfel colectate au fost amestecate și centrifugate la 600 - 800 rotații/minut; supernatantul rezultat a fost înlăturat, iar sedimentul a fost preluat în mediu in vitro I-65 suplimentat cu 10% ser de vițel; s-a efectuat număratoarea celulelor din suspensie cu ajutorul hemocitometrului și concentrația a fost corectată cu mediul astfel încât să se obțină $5 \times 1.000.000$ cardiomiocite/ml; pentru fiecare experiment suspensia a fost repartizată în două părți egale în volum de 2 ml, în două recipiente de cultură, prevăzute cu dop de cauciuc atoxic și incubate la termostat la $37^{\circ} C$, unul fiind supus acțiunii substanței de cercetat, iar celălalt fiind martorul. Am utilizat un număr de 12 tuburi. Aplicarea substanței de cercetat pe cultura de celule s-a făcut în a 5-a zi de dezvoltare a culturilor, moment în care filmul de cardiomiocite era complet în toate tuburile. Am realizat în condiții de maximă sterilitate, soluții mai concentrate de etanol și acetaldehidă, astfel încât într-un volum mic de 0,1 ml să fie cuprinsă o cantitate de substanță care să realizeze în mediul de cultură (2 ml) dintr-un tub concentrațiile: tub 5; 9: etanol 20 mM/l; tub 6; 10: etanol 200 mM/l; tub 7; 11: acetaldehidă 10 mM/l; tub 8; 12: acetaldehidă 100 mM/l.

Aplicarea substanței de testat s-a făcut în condiții de maximă sterilitate. Durata expunerii a fost de 120 min., timp în care tuburile au fost menținute în termostat la $37^{\circ}C$.

Evaluarea efectelor etanolului și acetaldehidei asupra

culturilor celulare s-a făcut după următoarele criterii: A - adezivitatea monostratului celular la peretele tubului; B - morfologia celulară la microscopia fonică; C - morfologia celulară și a organelor celulare la microscopia electronică.

După expirarea celor 120 minute tuburile cu culturi celulare au fost scoase de la termostat și au fost examinate rapid la microscopul fonic, studiindu-se aspectul filmului celular. Pentru tuburile martor desprinderea filmului celular de pe perete a fost realizată cu ajutorul unei soluții de EDTA. Toate tuburile au fost centrifugate la 1000 rotații pe minut timp de 5 minute. S-a aruncat supernatantul, iar din sedimentul tuburilor (și martorii corespunzători) s-au făcut câte trei fracțiuni pentru fiecare tub, ulterior aceste fracțiuni au fost colorate cu hematoxină eozină, PAS (acid Schiff) și PAS cu digestie (DIATAZĂ). Aceste lame au fost examinate la microscopul fonic. Suspensiile celulare din tuburile 9, 10, 11, 12 și martorii corespunzători, au fost preparate pentru examinarea la microscopul electronic PHILIPS CM 100.

Rezultate:

A. Studiul aderenței filmului celular la peretele tubului de cultură s-a făcut prin citire "in vivo" la microscopul fonic în două momente: înainte și după 120 minute de expunere la etanol și acetaldehidă. Rezultatele sunt prezentate în **tabelul I**.

Tabel I

Film celular	M	Etanol	Etanol	Acetaldehidă	Acetaldehidă
	Martor	20 mM/l	200 mM/l	10 mM/l	100 mm/l
Detașat %	0%	95%	95%	100%	100%

B. Morfologia celulară la microscopul fonic. În culturile cardiomiocitare expuse la concentrații de etanol de 20 mM/l și 200 mM/l timp de 120 minute, colorate cu hematoxină eozină, PAS și PAS cu digestie anterioară și examinate la microscop fonic cu obiectiv 40, nu am decelat nici un fel de modificări. În schimb, în culturile cardiomiocitare expuse la acetaldehidă 10 mM/l și colorate PAS s-au observat vacuolizări citoplasmice discrete care au devenit marcate la concentrația acetaldehidei de 100 mM/l (**Fig. 1**).

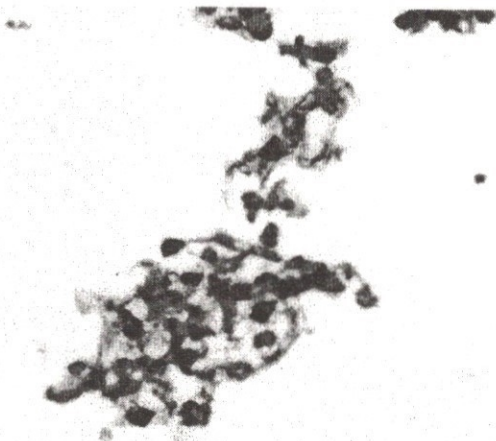


Fig. 1. Placard de cardiomiocite cu vacuolizări marcate ale citoplasmei (colorate PAS - obiectiv 40)

Dispariția materialului PAS pozitiv după digestie prealabilă cu diatază, arată în mod cert că materialul PAS pozitiv prezent în cardiomiocite este glicogen.

C. Studiul în microscopie electronică, efectuat la microscopul electronic PHILIPS CM 100 nu a evidențiat nici un fel de modificări în culturile celulare expuse la etanol 20 mM/l și etanol 200mM/l, timp de 120 minute. La culturile de cardiomiocite expuse la acetaldehidă 10 mM/l și 100 mM/l, am notat prezența unei balonizări mitocondriale (**Fig. 2**) și apariția de microvezicule de tranzit la nivelul reticulului citoplasmic (**Fig. 3**).



Fig. 2. Cardiomiocit cu mitocondrii balonizate. M: mitocondrie; FMC: fibrilă musculară cardiacă; DI: disc intercalar; RE: reticul endoplasmatic

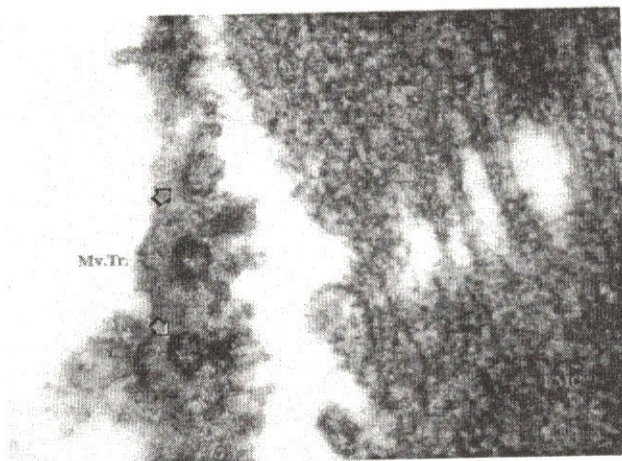


Fig. 3. Reticul citoplasmatic cu vezicule de tranzit. MvTr: microvezicule de tranzit; FMC: fibrilă musculară cardiacă

Discuții și concluzii

Cardiomiocitele în cultură nu reprezintă fidel ansamblul caracteristicilor fundamentale pe care ele le exprimă in vivo. Acestea variază, de altfel, în funcție de specia animală, de vârstă și funcție de condițiile fiziologice sau patologice. În practică astăzi, numai caracteristicile celulelor în primo-cultură sunt suficient de cunoscute pentru a permite utilizarea lor în toxicologie. Modelul ales de noi (2,3), primo-culturi de cardiomiocite de șobolan nou născut de trei zile, expuse în experiment acut la concentrații variate (cu echivalent în practica medicală) de etanol și acetaldehidă, ne-a permis să afirmăm că acetaldehida în concentrații de mM determină un spectru larg de efecte citopatice. Este cunoscut faptul că etanolul inhibă comunicările intercelulare care joacă un rol central în reglarea creșterii și diferențierii celulare. Etanolul prin efect indirect acționează asupra joncțiunilor gap, în timp ce acetaldehida, nu (1). Totuși noi considerăm că atât etanolul cât și acetaldehida acționează și la nivel membranar, ceea ce ar explica detașarea filmului celular de pe peretele tubului

de cultură, atât a cardiomiocitelor expuse la etanol (10 mM/l și 20 mM/l, cât și a celor expuse la acetaldehidă 10 mM/l și 100 mM/l.

Constatăm prin prisma rezultatelor obținute în microscopie electronică că în culturile de cardiomiocite de șobolan nou născut are loc un fenomen de agresiune toxică în urma acțiunii acute a acetaldehidei, manifestată morfologic la nivel mitocondrial și reticul citoplasmatic. Evidențiem faptul că efectele acute ale etanolului la nivelul cardiomiocitelor se exercită mai ales prin intermediul metabolitului său toxic acetaldehida.

BIBLIOGRAFIE

1. **Abou Hashieh I., Mathieu S.:** Inhibition of gap junction intercellular communications of cultured rat hepatocytes by ethanol: role of ethanol metabolism. *Journal of Hepatology* 24 (3): 360 - 7, Mar. 1996
2. **Graf Strom R.C., Dypbukt J.M.:** Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis*, 15 (5): 985 - 90, 1994 May
3. **Olivares I.P., Bucio L.:** Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line, *Toxicology* 120 (2): 133 - 44, 1997, Jun. 27.
4. **Wynne J., Braunwald E.:** The Cardiomyopathies and myocardites in heart disease, 5th Ed., E. Braunwald (Ed.) Philadelphia, Saunders, 1997, pp. 1404 - 1463
5. **Kasper EK et al.:** The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 675 consecutive patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 23: 586, 1994
6. **Blondel B.:** Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experient* 1971, 273: 356 - 358
7. **Perelakis M., Bkaily G.:** Cultured cell models for studying problems in cardiac toxicology. In: *Atterwill Ck (Ed): In vitro methods in toxicology, 1 vol.* 1987
8. **Cioranu R., Apetrei E., Stancu M., Minescu B., Dăcu G., Bruckner I., Cristodorescu R., Cosovanu A., Nechita E., Craiu E.:** Romanian dilated cardiomyopathy register, *Congresul mondial de cardiologie, Brazilia*, 1998.