EFECTELE DIOXIDULUI DE SILICIU ŞI ALE CURCUMINEI ASUPRA MALONDIALDEHIDEI ÎN ŢESUTUL PULMONAR

MARIA BÂRSAN[1], MARILENA OARGĂ[2], CEZAR CRISTIAN LOGIN[3], NICOLETA DECEA[4]

[1,2,3,4]Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca

Cuvinte cheie: *silicoză experimentală, silice liberă, malondialdehidă, stres oxidativ, curcumină*

Rezumat: *Inflamaţia cronică din silicoză presupune cu multă probabilitate prezenţa unui exces de radicali oxigenaţi liberi (ROL), al căror efect poate fi evidenţiat prin markeri biologici precum malondialdehida (MDA). Scopul cercetării constă în evaluarea MDA în ţesutul pulmonar la şobolani Wistar, instilaţi intratraheal cu SiO_2 cristalin şi protejaţi cu curcumină. Rezultate: MDA creşte precoce, semnificativ, la 30 de zile după instilare şi se menţine crescută pe toată durata observaţiei, diferenţa valorilor (exprimate în nmoli/mg proteină) înregistrate la 30 de zile (0,374±0,06), la 90 de zile (0,441±0,13) şi la 120 de zile (0,44 ±0,08), fiind nesemnificativă statistic. Curcumina determină o scădere a MDA la 90 de zile, revenind la valori apropiate celor observate în lotul netratat, la 120 de zile. Concluzii: Evidenţierea stresului oxidativ în silicoza experimentală beneficiază de un biomarker valoros, malondialdehida în ţesutul pulmonar. Curcumina are un efect benefic, scăzând MDA în faza de promovare a inflamaţiei.*

Keywords: *experimental silicosis, free silica, malondialdehyde, oxidative stress, curcumin*

Abstract: *Chronic inflammation found in silicosis probably implies the presence of an excess of free oxygenated radicals (FOR) with an effect shown through biological markers, such as malondialdehyde (MDA). Our purpose is to evaluate MDA in the lung tissue of Wistar rats, intratrachealy instillated with crystalline SiO_2 and protected with curcumin. Results: MDA levels rise significantly early on, 30 days after instillation and remain elevated throughout the entire observation period, the difference in values (measured in nmol/mg protein) recorded at 30 days (0.374±0.06), at 90 days (0.441±0.13) and at 120 days (0.440±0.08) being statistically insignificant. Curcumine induces a decrease in MDA at 90 days, reaching values close to the ones observed in the untreated group at 120 days. Conclusions: The prominence of oxidative stress in silicosis benefits from malondialdeyde in lung tissue as a valuable biomarker and curcumin has a positive effect, lowering MDA in the initial phase of inflammation.*

INTRODUCERE

Cercetările din ultimele două decade cu privire la toxicitatea silicei libere, configurează stresul oxidativ ca o verigă importantă în secvenţialitatea mecanismelor inflamatorii, atât la nivelul parenchimului pulmonar, cât şi la nivelul căilor aeriene. Producerea excesivă de ROL este posibilă graţie proprietăţilor chimice legate de reactivitatea chimică la suprafaţa particulelor de cuarţ, dar şi prin fagocitarea acestora de către macrofagele alveolare care, activate pe această cale, generează specii reactive ale oxigenului (SRO).(1,2) Disponibilitatea în radicali ai silicei este strâns dependentă de prospeţimea suprafeţelor fracturate ale cristalului de cuarţ.(3) Sunt necesare încă cercetări care să confirme cu certitudine faptul că, ROL formaţi consecutiv inhalării silicei libere, deţin acest rol cheie în declanşarea şi întreţinerea inflamaţiei cronice şi, în consecinţă, a fibrozei silicotice. Câteva studii susţin această supoziţie.(2,4,5,6,7,8,9)

Instalarea stresului oxidativ corespunde fazei în care producţia excesivă de ROL nu mai poate fi neutralizată de sistemul antioxidativ (10,11), iar SRO stimulează secreţia de citokine proinflamatorii şi alţi mediatori care întreţin inflamaţia şi evoluţia pneumoconiozei.(12,13) ROL determină peroxidarea lipidelor din membranele celulare cu formarea de lipoperoxizi şi aldehide, a căror determinare în ser sau în ţesuturi permite aprecieri asupra intensităţii stresului oxidativ.(11,14)

Malondialdehida (MDA) este un produs de degradare caracteristic al acizilor graşi polinesaturaţi sub acţiunea ROL şi reflectă, prin creşterea sau scăderea concentraţiei sale în mediul biologic investigat, accentuarea, respectiv diminuarea procesului de lipoperoxidare.(14,15) Ea se recomandă astfel ca un biomarker de efect al ROL, foarte util în investigarea mecanismelor implicate în inflamaţie. Asocierea formării de ROL cu morfogeneza şi evoluţia silicozei, motivează interesul de evaluare a efectelor antiinflamatorii în silicoza umană şi cea experimentală obţinute cu agenţi antioxidanţi.

SCOP

Scopul acestui studiu a constat în cuantificarea dinamică a concentraţiei de MDA în ţesutul pulmonar la şobolanii Wistar, instilaţi intratraheal cu SiO_2 liber cristalin şi aprecierea efectelor benefice obţinute prin administrarea unui antioxidant natural, curcumina.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

Experimentul s-a efectuat pe şobolani Wistar de sex masculin cu vârsta de 180 de zile şi greutatea medie de 320 grame. S-a utilizat o suspensie de dioxid de siliciu cristalin standardizat produs de firma Berkeley Springs, West Virginia (SUA). Administrarea silicei s-a făcut intratraheal în doză de 0,3ml din suspensia conţinând 30mg/ml în soluţie fiziologică, după ce animalele au fost anesteziate cu un amestec de

[1]Autor corespondent: Maria Bârsan, Str. Pasteur, Nr. 3-5, Cluj-Napoca, România, E-mail: Maria.Opritoiu@umfcluj.ro, Tel: +40745 315575
Articol intrat în redacţie în 03.06.2013 şi acceptat spre publicare în 12.08.2013
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Septembrie 2013;2(3):101-103

Ketamină 10% şi Xilazină 2% în proporţie de 2:1, utilizând o doză de 0,1ml/100g. Loturile martor au fost instilate, la aceeaşi dată, cu o cantitate identică de soluţie fiziologică (două loturi martor: unul sacrificat la 30 de zile după instilare – M_{30}, altul la 120 de zile – M_{120}). Am constituit două loturi martor pentru a compara mai exact rezultatele obţinute, având în vedere că intensitatea stresului oxidativ este în relaţie şi cu vârsta. În raport cu timpul scurs până la data sacrificării, animalele au fost repartizate în 7 loturi: martor (M_{30} şi M_{120}), instilate cu SiO_2 şi sacrificate la: 30 de zile (SiO_2.30), 90 de zile (SiO_2.90) şi 120 de zile (SiO_2.120). Alte două loturi, instilate cu SiO_2, au fost tratate cu curcumină şi sacrificate la 90 de zile (SiO_2.90+C), respectiv 120 de zile (SiO_2.120+C). Curcumina, care este un antioxidant fenolic aromat, extract natural din specia Curcuma longa, originară din India, şi utilizat ca şi colorant şi conservant în industria alimentară, s-a administrat per os, în concentraţia de 50mg/kgc, începând cu ziua a 10-a după instilarea cu SiO_2, cu o ritmicitate de 3 administrări/săptămână. În final, configuraţia celor 7 loturi şi numărul de animale din fiecare lot sunt ilustrate în tabelul nr. 1. Sacrificarea s-a efectuat prin administrarea unei supradoze de amestec anestezic (doza dublă faţă de cea utilizată la instilare). După sacrificare s-au prelevat traheea şi plămânii, din care s-au recoltat fragmente în vederea prelucrării. Animalele au fost ţinute în condiţiile obişnuite ale biobazei şi alimentate ad libitum. Experimentul a primit avizul Comisiei de Etică a Universităţii de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca.

Tabelul nr. 1. Configuraţia loturilor şi valorile medii ale MDA

Lotul	Nr. exemplare	Media±DS
M_{30}	10	0,252 ±0,04
SiO_2 .30	9	0,374 ±0,06
SiO_2 .90	8	0,44 ±0,14
SiO_2 .90 + C	7	0,267 ± 0,04
M_{120}	8	0,281 ± 0,05
SiO_2 .120	7	0,440 ±0,08
SiO_2 .120 + C	7	0,341±0,10

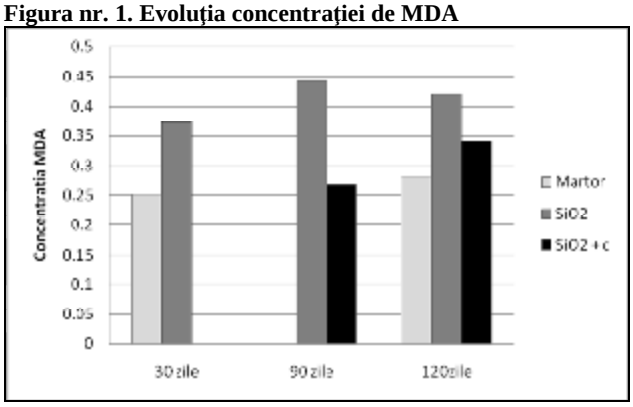
Fragmentele de ţesut pulmonar recoltate au fost omogenizate în vederea dozării MDA, iar omogenatul tisular s-a fiert timp de o oră cu o soluţie de acid 2-tiobarbituric 10mM în K_2HPO_4 75mM, la pH=3. Produsul de reacţie s-a extras în n-butanol, după răcirea bruscă a probei, iar concentraţia de MDA s-a determinat în faza organică după separare şi centrifugare, utilizând tehnica de fluorescenţă sincronă la o diferenţă de lungime de undă între excitaţie şi emisie (Δλ) de 14nm. Valorile au fost exprimate în nmoli/mg proteine.(16) Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat în programul MedCalc.

REZULTATE

Concentraţiile de MDA în ţesutul pulmonar a fost semnificativ mai mari la animalele tratate cu dioxid de siliciu, comparativ cu cele din loturile martor (tabelul nr.1 şi tabelul nr.2). MDA a fost crescută semnificativ la 30 de zile, creştere care s-a menţinut la 90 şi 120 de zile la un nivel constant.

Administrarea de curcumină pe parcursul experimentului s-a dovedit eficientă mai ales pe durata primelor 90 de zile după instilarea cu silice, fenomen tradus prin scăderea concentraţiei de MDA până aproape de valorile constatate la martori (tabelul nr. 2 şi figura nr. 1). La 120 de zile după instilare cu SiO_2, curcumina, deşi a scăzut valorile MDA, nu a atins eficienţa observată în lotul sacrificat la 90 de zile.

Figura nr. 1. Evoluţia concentraţiei de MDA



Tabelul nr. 2. Valorile p pentru corelaţia dintre loturi (s-a utilizat testul Student t)

	M_{30}	SiO_2.30	SiO_2. 90	SiO_2.90+C	M_{120}	SiO_2. 120	SiO_2. 120+C
M_{30}	-	**0,0001**	**0,0055**	0,47	0,21	**<0,0001**	0,06
SiO_2.30	**0,0001**	-	0,22	**0,0011**	**0,005**	0,08	0,43
SiO_2. 90	**0,0055**	0,22	-	**0,007**	0,12	0,97	0,06
SiO_2.90+C	0,47	**0,0011**	**0,007**	-	0,58	**0,0002**	0,08
M_{120}	0,21	**0,005**	0,12	0,58	-	**0,0008**	0,18
SiO_2. 120	**<0,0001**	0,08	0,97	**0,0002**	**0,0008**	-	0,06
SiO_2.120+C	0,06	0,43	0,06	0,08	0,18	0,06	-

DISCUŢII

ROL, generaţi fie prin activitatea de suprafaţă a silicei cristaline, fie mijlocit de celulele inflamatorii prin intermediul macrofagelor alveolare sunt consideraţi, în tot mai multe studii, ca verigi importante în instalarea şi întreţinerea inflamaţiei produsă de dioxidul de siliciu (2,9,17,18), stresul oxidativ fiind indus fie prin excesul acestora, fie prin scăderea potenţialului defensiv antioxidant. Langley şi colab. (6) au constatat în silicoza experimentală o suprareglare a genelor care controlează procesul de fibroză şi stresul oxidativ.

Cercetările noastre au confirmat că determinarea MDA în ţesutul pulmonar este un biomarker valoros în evaluarea stresului oxidativ din silicoza experimentală, aceasta fiind sursa creşterii nivelului seric observat la subiecţi cu silicoză (19,20,21). Creşterea MDA în ţesutul pulmonar s-a dovedit a fi un fenomen precoce, iar menţinerea valorilor crescute în timp reflectă menţinerea unei inflamaţii cronice. Zang şi colab. (10) au constatat o creştere a MDA serice necorelat cu stadiul bolii, aspect sugestiv pentru persistenţa stresului oxidativ pe parcursul evoluţiei silicozei umane.

Scăderea semnificativă a concentraţiei de MDA în ţesutul pulmonar sub influenţa curcuminei, confirmă un efect benefic al acesteia, probabil prin interferarea stresului oxidativ. Capacitatea sa antioxidativă a fost confirmată în cancer, diabet, diverse afecţiuni cardiovasculare (22,23), dar şi în cercetări experimentale care au utilizat modelul fibrozei pulmonare indusă de bleomicină.(24) Totuşi, în studiul iniţiat de noi, eficienţa semnificativă a curcuminei a fost prezentă în faza iniţială, de promovare a inflamaţiei, iar persistenţa tardivă a creşterii MDA sugerează o epuizare a potenţialului defensiv.

Aceste aspecte reprezintă obiectivele unei cercetări viitoare.

CONCLUZII

Dioxidul de siliciu, instilat intratraheal la şobolani Wistar, a determinat o creştere semnificativă statistic în raport cu animalele martor a MDA în ţesutul pulmonar. Creşterea MDA s-a menţinut pe întreaga durată a experimentului sugestiv pentru persistenţa stresului oxidativ.

Scăderea MDA sub influenţa curcuminei s-a observat în primele 90 de zile după instilare.

REFERINŢE

1. Cocârlă A. Astmul bronşic profesional. In:Medicina Ocupaţională, sub redacţia Cocârlă A, Cluj-Napoca:Editura Medicală Universitară „Iuliu Haţieganu”. 2009;1:706.
2. Surcel D. Radicalii liberi în silicoză. Pneumoftiziologia. 1992;41(2-3):103-11.
3. Vallyathan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. Am Rev Respir Dis. 1988 Nov;138(5):1213-9.
4. Vallyathan V, Leonard S, Kuppusamy P, Pack D, Chzhan M, Sanders SP, et al. Oxidative stress in silicosis: evidence for the enhanced clearance of free radicals from whole lungs. Mol Cell Biochem. 1997 Mar;168(1-2):125-32.
5. Liu BL. The study of oxidative injury of alveolar macrophage in the development of silicosis. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 1993 Jan;27(1):10-2.
6. Langley RJ, Mishra NC, Peña-Philippides JC, Rice BJ, Seagrave JC, Singh SP, et al. Fibrogenic and redox-related but not proinflammatory genes are upregulated in Lewis rat model of chronic silicosis. J Toxicol Environ Health A. 2011;74(19):1261-79.
7. Kuwano K. Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. Intern Med. 2008;47(5):345-53.
8. Miao RM, Zhang XT, Guo P, He EQ, Zhou F, Zhao DK, et al. Effect of oxidative stress on development of silicosis. World J Respirol. 2012 February 28;2(1):1-5.
9. Porter DW, Millecchia LL, Willard P, Robinson VA, Ramsey D, McLaurin J, et al. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. Toxicol Sci. 2006 Mar;90(1):188-97.
10. Zhang JW, Lv GC, Yao JM, Hong XP. Assessment of serum antioxidant status in patients with silicosis. J Int Med Res. 2010 May-Jun;38(3):884-9.
11. Mureşan A, Tache S, Orăsan R. Stresul oxidativ în procesele fiziologice şi patologice. Cluj-Napoca: Editura Todesco; 2006.
12. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. Free Radic Biol Med. 2003 Jun 15;34(12):1507-16.
13. Vallyathan V, Shi X, Castranova V. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. Environ Health Perspect. 1998 Oct;106 Suppl 5:1151-5.
14. Dejica D. Antioxidanţi şi terapie antioxidantă. Casa Cărţii de Ştiinţă:Cluj-Napoca; 2001.
15. Login CC. Implicaţiile stresului oxidativ în mecanismele patogenetice ale hepatopatiilor toxice experimentale. Teză de doctorat, Cluj-Napoca:Universitatea de Medicină şi Farmacie „Iuliu Haţieganu”; 2009.
16. Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. Clin Chem. 1991 Jul;37(7):1273-5.
17. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994 Sep 10;344(8924):721-4.
18. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. Free Radic Biol Med. 2009 Nov 15;47(10):1371-4.
19. Mansour A, Ramazani B, Mosavian MA, Movahadi M, Salephour S. Serum Malondialdehyde and Urinary Neopterin Levels in Glass Sandblasters Exposed to Crystalline Silica Aerosols. Int J Occup Hyg, 2008-5435;11/31:29-32.
20. Orman A, Kahraman A, Cakar H, Ellidokuz H, Serteser M. Plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in workers with cement dust-exposure. Toxicology. 2005 Feb 1;207(1):15-20.
21. He JL, Zhang JW, Lv GC, Zhao Y, Hong XP. Study on serum oxidative stress status in silicosis patients. Afr J Biotehnol. 2011;10(51):10504-8.
22. Mun SH, Kim HS, Kim JW, Ko NY, Kim do K, Lee BY, et al. Oral administration of curcumin suppresses production of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 to ameliorate collagen-induced arthritis: inhibition of the PKCdelta/JNK/c-Jun pathway. J Pharmacol Sci. 2009 Sep;111(1):13-21.
23. Socaciu C. Food colorants: chemical and functional properties. New York: CRC Press-Taylor and Francis Group; 2008.
24. Zhang D, Huang C, Yang C, Liu RJ, Wang J, Niu J, Brömme D. Antifibrotic effects of curcumin are associated with overexpression of cathepsins K and L in bleomycin treated mice and human fibroblasts. Respir Res. 2011 Nov 29;12:154.