

RAPORT ȘTIINȚIFIC

COD PROIECT PN-II-RU-TE-2014-4-015
CONTRACT NR. 181/2015

**Factorii de mediu și mecanismele epigenetice – o verigă
comună în etiologia bolilor cronice de rinichi**

**Environmental factors and epigenetic mechanisms – a common
link in chronic kidney diseases**
Acronim: ENVIROCONNECT



ETAPĂ UNICĂ/ 2015

Contractor: UMF „Victor Babeș” Timișoara

Director proiect: Conf. Dr. Calin A. Tatu

Rezumatul etapei

Obiectivul principal al acestei etape a fost prelevarea de probe biologice și de mediu din zone cu nefropatie endemica balcanică (NEB), precum și din zone nonendemice (regiuni de control), și actualizarea situației epidemiologice a cazurilor de NEB de la noi din țară. În vederea atingerii acestui obiectiv au fost realizate vizite pe teren, în zone endemice și nonendemice, de unde s-a realizat prelevarea probelor de mediu. În cadrul vizitelor efectuate s-a restabilit contactul cu medicii nefrologi de la Clinica RENAMED, din Turnul Severin de unde s-au obținut date cu privire la bolnavii de NEB din județul Mehedinți, date ce vor fi utilizate în elaborarea unei statistici actualizate privind incidența și prevalența pacienților cu NEB. De asemenea, au fost recoltate și probe biologice, pentru demararea studiilor epigenetice.

Obiectivul general al etapei: a inclus investigații de teren și prelevarea din zonele endemice și non-endemice a probelor de aer, apă, sol, carbune (lignit Pliocen) și plante în vederea monitorizării compușilor, cu efect carcinogenic și citotoxic, asociați cu etiologia NEB, și evaluarea epidemiologică a zonelor endemice/non-endemice, pentru o selecție riguroasă de includere a pacienților și a cazurilor de control.

Activități specifice

1. Investigații de teren și prelevare din zonele endemice și non- endemice a probelor de mediu pentru analiza geochimica.

Pentru realizarea acestei activități, în perioada **17-19 noiembrie 2015**, cinci membri ai echipei de cercetare au efectuat o deplasare pe teren, în zona **Drobeta Turnu Severin (județul Mehedinți)**, unde se găsește **principala regiune afectată de NEB din România**, precum și într-o regiune control nonendemică, fără cazuri de NEB și similară din punct de vedere geologic, geografic și botanic cu regiunea endemică.



Figura 1. Zonele endemice pentru nefropatia endemica balcanica în România

Pentru prelevarea de probe de mediu a fost efectuată o deplasare în satul hiperendemic Erghevița, considerat în anii 1950-1960 epicentrul bolii, aici fiind raportate atunci cele mai multe cazuri de NEB și cea mai mare mortalitate prin această boală. Au fost vizitate mai multe case ale unor foști pacienți cu NEB și a fost analizată distribuția și abundența plantei *Aristolochia clematitis* (care conține acidul aristolochic, în prezent considerat unul dintre factorii etiologici ai NEB), și au fost prelevate probe de plantă, de sol, de praf, de carbune și de apă. Toate probele au fost prelevate și etichetate, conform normelor standard de colectare a probelor de mediu, astfel încât să se evite contaminarea sau cross-contaminarea probelor. După recoltare, probele au fost menținute la 4°C pe toată durata transportului, iar apoi stocate în laborator la -20°C, până în momentul prelucrării.

Probele vor fi prelucrate (prin uscare și apoi extracție cu solvenți specifici) și analizate prin metode sensibile de spectrometrie de masă (GC-MS/LC-MS) în laboratorul de chimie din cadrul Centrului de Imunofiziologie și Biotehnologii al UMF din Timisoara. Probele de apă (10 litri/probă) vor fi concentrate prin metoda de ultrafiltrare tangențială în flux continuu (tangential flow ultrafiltration) și analizate pentru detecția de compusi cu masă moleculară mare, prin spectrofotometrie de excitație/emisie în matrice.

Probe similare de mediu au fost prelevate și din două sate nonendemice, din regiunea Reșița (considerată zona nonendemică de control) și din comuna Ghioroc, din județul Arad.

Atât în zonele endemice cât și în cele nonendemice a fost demonstrată prezența în abundență a plantei *Aristolochia clematitis* atât în grădinile oamenilor, printre plantele de cultură, cât și pe terenurile extravilane, la distanță de zonele locuite. În ambele zone, planta înflorește și germinează de două-trei ori pe an. O diferență între zonele endemice și nonendemice ar putea fi însă compoziția solului, astfel încât, în satele cu NEB să permită aerosolizarea mai facilă a acidului aristolochic prin particulele de praf, comparativ cu satele nonendemice. Aceasta ar explica expunerea diferită la toxină a populației din zonele endemice și nonendemice și, într-o oarecare măsură, restricția geografică a bolii, pe lângă susceptibilitatea idiosincronică genetică/epigenetică.

Activitățile pe teren sunt ilustrate în figurile următoare.



Figura 2. Grădină din Erghevița (sat endemic) infestată cu plante de Aristolochia clematitis, la a doua sau a treia generație de creștere anuală.



Figura 3. Planta de Aristolochia clematitis într-o grădină din satul endemic Erghevița. Planta este la a treia generație anuală. Cu cât numărul de generații anuale este mai mare cu atât potențial crește și contaminarea cu acid aristolochic a solului din jurul plantei și gradul de expunere la toxină a populației din zonă.



Figura 4. Prelevare de probe de sol, praf și plante dintr-o grădină din satul endemic Erghevița.



Figura 5. Grădină infestată cu plante de Aristolochia clematitis (posibil a doua generație anuală) în satul nonendemic (control) Sasca Romana, județul Caraș-Severin.



Figura 6. Prelevare de probe de mediu (sol, plante) de pe un câmp situat într-o zona nonendemică in judetul Caras-Severin (regiune control).



Figura 7. Investigații de teren într-o regiune nonendemică control (Sasca Română)



Figura 8. Prezenta in abundenta a plantei A. clematitis intr-o gadina din satul endemic Erghevita (A), si intr-o zona nonendemica (B).



Figura 9. Aspect general al minei de lignit Husnicioara din judetul Mehedinti, de unde au fost prelevate probe de carbune (lignit Pliocen)



Figura 10. Sursa de apa potabila (izvor) in satul endemic Erghevita.



Figura 11. Prelevarea de probe de praf prin metoda "window-wipe" folosind filtre din fibra de sticla, intr-o locatie din satul Erghevita.

Activități suplimentare

2.1. Prelevarea de probe biologice și izolarea materialului genetic (ADN) .

În cadrul deplasării la Turnu Severin, a fost efectuată o vizită la **Clinica RENAMED** din oraș și au fost stabilite contactele necesare cu medicii nefrologi care tratează bolnavii cu NEB. RENAMED este cea mai mare clinică de hemodializă din județul Mehedinți. Clinica preia majoritatea cazurilor de nefropatie din cele **40 de sate endemice**. În urma discuțiilor cu medicii nefrologi a fost obținută statistica actualizată privind incidența și prevalența pacienților cu NEB. Datele astfel obținute vor fi tratate pe baza regulilor de confidențialitate privind informația medicală privată iar numele pacienților au fost anonimizate.

De asemenea, **au fost recoltate 37 de probe de sânge (pe anticoagulant) -28 de probe de la pacienți NEB, și 9 controale de boală (pacienți cu boli renale cronice, majoritatea GNC)**, în vederea extracției de ADN pentru investigații epigenetice. Probele au fost colectate în duplicat, câte 2 ml de sânge/pacient. Prelevarea probelor de sânge s-a făcut pe baza de consimțământ informal, conform normelor etice europene în vigoare. Acestea au fost stocate la 4°C pe toată durata transportului și o parte dintre acestea au fost prelucrate imediat după revenirea de pe teren. Izolarea probelor de ADN s-a făcut utilizând kitul Invitrogen, PureLink, Genomic DNA Mini Kit. Restul probelor au fost stocate la -20°C și vor fi prelucrate în perioada următoare.

Probele de ADN izolate au fost măsurate spectrofotometric pentru determinarea concentrației de ADN cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND 1000 și ulterior stocate la -20°C, până la momentul utilizării în cadrul studiilor epigenetice.

Spectrofotometrul NanoDrop ND 1000 are un spectru de măsurare cuprins între 190-840 nm și măsoară probe cu volum de 0,5-1 μ l cu o acuratețe și o reproductibilitate ridicată. NanoDrop ND 2000 este accesat prin intermediu unui soft, iar datele obținute în urma măsurărilor sunt stocate sub forma unui raport pe calculator. Purity și concentrația probelor de ADN se face prin măsurarea absorbanței totale a extractului la lungimi de undă de 260nm și de 280nm. Dacă raportul A260/A280 este cuprins între valorile 1,7 și 2,0 atunci puritatea extractului este considerată optimă. Concentrațiile de ADN obținute au variat între 121 ng/ μ l și 31 ng/ μ l, pornind de la un volum total de sânge de 200 μ l. În urma acestor proceduri s-a concluzionat ca 2 ml sânge/probă reprezintă un volum suficient de probă pentru toate analizele epigenetice ulterioare.

În tabelul/graficul de mai jos sunt prezentate concentrațiile ADN obținute de la probele prelevate și prelucrate până în acest moment, de la pacienți NEB (1-10) și controale de boală (01-09):

PROGRAMUL RESURSE UMANE
CONTRACT NR. 181/2015
ENVIROCONNECT –RAPORT STIINTIFIC - ETAPA UNICA/2015

Plots

Report

Test type: Nucleic Acid

11/23/2015 2:41 PM

Exit

Report Name

Report Full Mode Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
Proba 1	Default	11/23/2015	2:17 PM	121.88	2.438	1.346	1.81	2.06	50.00	230	1.181	0.089
Proba 2	Default	11/23/2015	2:18 PM	85.87	1.717	0.947	1.81	2.01	50.00	230	0.856	0.099
Proba 3	Default	11/23/2015	2:19 PM	83.82	1.676	0.904	1.85	1.92	50.00	230	0.872	0.052
Proba 4	Default	11/23/2015	2:20 PM	75.02	1.500	0.813	1.85	2.04	50.00	230	0.736	0.040
Proba 5	Default	11/23/2015	2:21 PM	39.27	0.785	0.457	1.72	1.58	50.00	230	0.497	0.176
Proba 6	Default	11/23/2015	2:23 PM	63.45	1.269	0.744	1.71	1.66	50.00	230	0.765	0.094
Proba 7	Default	11/23/2015	2:24 PM	47.04	0.941	0.499	1.89	1.89	50.00	230	0.498	0.114
Proba 8	Default	11/23/2015	2:25 PM	100.60	2.012	1.117	1.80	2.02	50.00	230	0.997	0.058
Proba 9	Default	11/23/2015	2:26 PM	67.31	1.346	0.712	1.89	2.03	50.00	230	0.663	0.080
Proba 10	Default	11/23/2015	2:28 PM	55.65	1.113	0.591	1.88	1.88	50.00	230	0.593	0.085
Proba 01	Default	11/23/2015	2:29 PM	57.26	1.145	0.631	1.82	1.36	50.00	230	0.845	0.130
Proba 02	Default	11/23/2015	2:30 PM	60.53	1.211	0.637	1.90	1.88	50.00	230	0.643	0.073
Proba 03	Default	11/23/2015	2:31 PM	55.59	1.112	0.598	1.86	2.15	50.00	230	0.518	0.035
Proba 05	Default	11/23/2015	2:32 PM	49.47	0.989	0.556	1.78	1.30	50.00	230	0.763	0.131
Proba 06	Default	11/23/2015	2:33 PM	56.83	1.137	0.617	1.84	1.62	50.00	230	0.701	0.089
Proba 07	Default	11/23/2015	2:34 PM	68.93	1.379	0.770	1.79	1.92	50.00	230	0.718	0.054
Proba 08	Default	11/23/2015	2:35 PM	31.72	0.634	0.396	1.60	1.37	50.00	230	0.463	0.085
Proba 09	Default	11/23/2015	2:36 PM	52.12	1.042	0.548	1.90	2.03	50.00	230	0.513	0.064
H2O	Default	11/23/2015	2:37 PM	-1.99	-0.040	-0.002	16.16	0.38	50.00	230	-0.106	0.016

Figura 12. Concentrațiile de ADN obținute de la probele recoltate de la pacienți NEB și controale

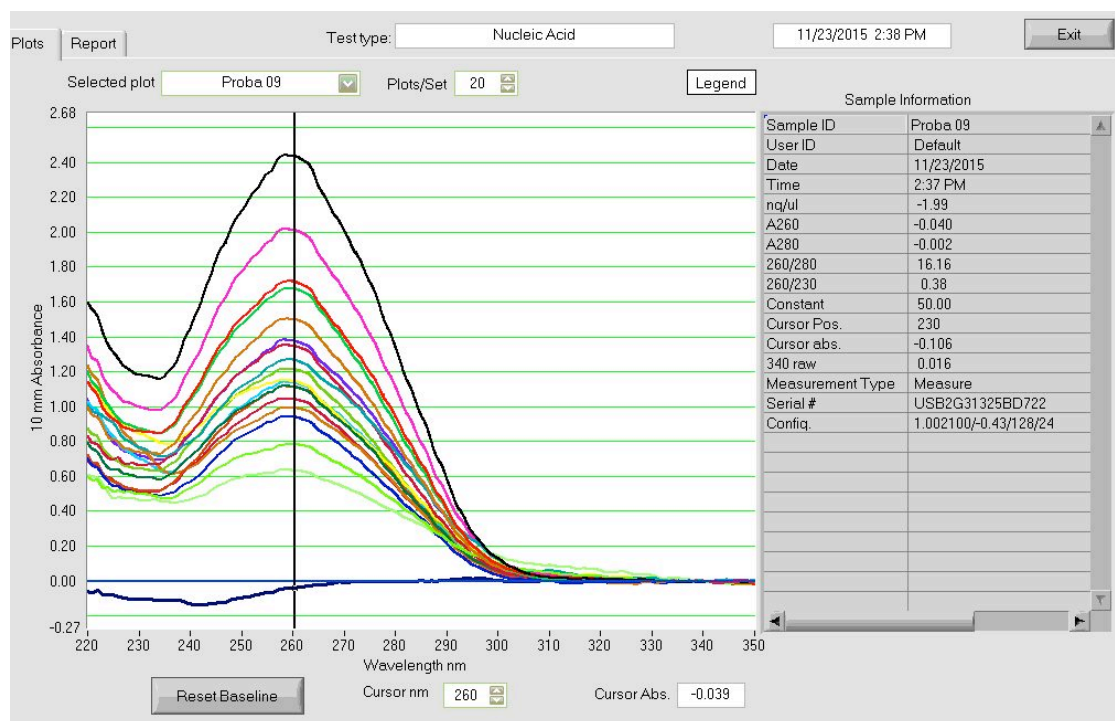


Figura 13. Graficul spectrelor de absorbanță pentru probele de AND izolate din probele de sânge provenite de la pacienți NEB și controale de boală

Obiectivul acestei etape de cercetare a fost atins în totalitate și considerăm ca se poate trece la etapa a doua a studiului nostru, care va consta în principal din:

- prelucrarea și analiza probelor de mediu,
- prelevarea de noi probe de mediu (în principal aerosoli),
- prelevarea de noi probe biologice de la indivizi sănătoși din zonele endemice și din cadrul familiilor cu cazuri de NEB,
- prelevarea de probe biologice de la indivizi sănătoși din zone non-endemice,
- inițierea unui studiu pilot pe probele de ADN obținute până în prezent de la pacienți și controale, pentru validarea tehnicii de lucru în vederea stabilirii profilului de metilare

Rezultatele acestei etape pot fi cuantificate prin:

- colectare probe de mediu (plantă, sol, praf, carbune și apa) din zone endemice și non-endemice;
- o statistica actuală privind incidența și prevalența pacienților cu NEB;
- colectare probe biologice de la pacienți NEB și controale de boala de la pacienți cu alte boli renale cronice;
- izolare probe de ADN de la pacienți NEB și controale de boala de la pacienți cu alte boli renale cronice;

Director Proiect,
Calin A. Tatu
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara

25/11/2015