

Alessandro Lupi
Francesco De Palma*
Angelo Minucci*
Pasquale De Sole*
Giuseppina Nocca*

C.N.R. - Sezione di Roma
Istituto di Chimica
del Riconoscimento Molecolare
*Università Cattolica del S. Cuore, Roma
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica
Direttore: Prof. Bruno Giardina

Corrispondenza:
Dott. Giuseppina Nocca
Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica Facoltà
di Medicina e Chirurgia
Università Cattolica del S. Cuore
L.go Francesco Vito, 1 - 00168 Roma
Tel. +39 06 3057612 Fax +39 06 3053598
E-mail: giuseppina.nocca@icrm.cnr.it

Pervenuto in redazione il 21 marzo 2005
Accettato per la pubblicazione il 6 maggio 2005

Effetti di monomeri metilacrilici sul metabolismo delle cellule HL-60

Effects of methacrylic monomers on HL-60 cell metabolism

RIASSUNTO

Scopo: i monomeri metilacrilici presenti nelle resine composite per uso dentale possono causare effetti avversi, sia di tipo locale che sistemico, dato che la reazione di polimerizzazione non è mai completa e comporta un loro rilascio nel cavo orale. Scopo di questo lavoro è stato quello di studiare alcune delle interazioni biochimiche che intercorrono tra le cellule HL-60 ed i monomeri 2-idrossietil-metilacrilato (HEMA) e bisfenolo A-glicerolato (1 glicerolo/fenolo)-dimetilacrilato (Bis-GMA).

Metodologia: le cellule HL-60 differenziate rappresentano un modello accettato per gli studi *in vitro* sui granulociti che, presenti nel tessuto ematico, possono entrare in contatto, *in vivo*, con i composti metilacrilici. Le interazioni funzionali dei monomeri sopramenzionati a concentrazioni non citotossiche sono state analizzate attraverso la valutazione di parametri, quali il consumo di ossigeno da parte di cellule intatte e di mitocondri isolati, il consumo di glucosio, l'attività degli enzimi Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi (G6PDH) e Glutazione-Reduttasi (GR) ed infine il differenziamento cellulare. I dati sono stati raccolti ed analizzati statisticamente.

Risultati: i risultati ottenuti hanno evidenziato che i metilacrilati presi in esame inducono diverse alterazioni nel metabolismo delle cellule HL-60. In particolare, il Bis-GMA riduce il consumo di ossigeno sulle cellule intatte ma non sui mitocondri isolati, incrementa il consumo di glucosio ed induce differenziamento cellulare. L'HEMA, invece, riduce il consumo di ossigeno sia sulle cellule intere che sui mitocondri isolati, incrementa l'attività degli enzimi sopra

descritti ed induce differenziamento cellulare.

Conclusioni: in uno studio approfondito di biocompatibilità di un materiale, è importante valutare l'effetto dei componenti anche a concentrazioni non citotossiche, per ampliare le conoscenze sulle possibili interazioni fra cellule e materiali e favorire lo sviluppo di prodotti con caratteristiche sempre migliori.

Parole chiave:

Monomeri, mitocondri, glutazione, glucosio.

ABSTRACT

Aim: methacrylic monomers present in dental composite materials can cause both local and systemic adverse effects, because polymerization reaction is never complete and tends to a release monomers in the oral cavity. The aim of the present study was to evaluate biochemical interactions between HL-60 cells and the monomers 2-hydroxyethyl-methacrylate (HEMA) and bisphenol A-glycerolate (1 glycerol/phenol)-dimethacrylate (Bis-GMA).

Methodology: differentiated HL-60 cells represent an accepted model for the *in vitro* studies on granulocytes, cells present in the blood and capable of enter in contact with methacrylic compounds *in vivo*. In the present study reactions between cells and the above mentioned monomers at non-cytotoxic concentrations were evaluated by analyzing the following parameters: oxygen consumption of intact cells and of isolated mitochondria, Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G6PDH) and Glutathione-Re-

ductase (GR) enzymatic activity, and cellular differentiation.

Results: results showed that the tested monomers can induce various alterations in the metabolism of the HL-60 cells. Bis-GMA reduces oxygen consumption on the intact cells but not on the isolated mitochondria, increases glucose consumption and induces cellular differentiation. On the contrary HEMA reduces oxygen consumption both on the intact cells and on the isolated mitochondria, increases the activity of the above mentioned enzymes and induces cellular differentiation.

Conclusions: in order to assess biocompatibility of dental materials it is important to evaluate the possible functional reactions, even at non-cytotoxic concentrations, to increase the knowledge of cell-material interactions and to promote the development of more biocompatible products.

Key words:

Monomers, mitochondria, glutathione, glucose.

INTRODUZIONE

Composti metilacrilici come il 2-idrossietil-metilacrilato (HEMA) ed il bisfenolo A-glicerolato (1 glicerolo/fenolo)-dimetilacrilato (Bis-GMA) sono largamente presenti nelle resine composite per uso odontoiatrico; una struttura reticolata viene generata attraverso la reazione di polimerizzazione a cui vengono sottoposte tali molecole ma il grado di conversione non supera - anche nelle migliori condizioni - valori del 75-80% (1). Questa incompleta trasformazione comporta - nella pratica odontoiatrica - il rilascio di

monomeri nella cavità orale e nei fluidi biologici (2); i tessuti pulpari possono dunque essere esposti all'azione dei metilacrilati (3) e molti lavori hanno confermato una diffusione dentinale di HEMA a concentrazioni tali da causare danno cellulare (1, 4, 5).

Poiché i meccanismi intracellulari di questo fenomeno non sono stati ancora completamente chiariti, risulta importante approfondire lo studio delle interazioni biochimiche tra i suddetti monomeri e le cellule umane.

Recentemente è stato dimostrato che l'HEMA induce nei fibroblasti gengivali un incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species), di origine sconosciuta (6); anche il trietilenglicol-dimetilacrilato (TEGDMA) stimola produzione di ROS, la cui origine è stata localizzata nel mitocondrio (7). Un danno mitocondriale potrebbe inoltre spiegare il motivo per il quale, in presenza dei monomeri, si osserva un aumento del rapporto nucleotidi trifosfato/nucleotidi difosfato (8). L'azione detossificante che il glutatione (GSH) esercita, reagendo con composti endogeni ed esogeni, garantisce la difesa cellulare (9); in particolare, il GSH agisce come antiossidante nella protezione della membrana mitocondriale dai radicali endogeni (10, 11) evitando l'apoptosi indotta dai ROS (12). La concentrazione intramitocondriale di GSH è mantenuta elevata grazie ad un trasporto ATP-dipendente dal citoplasma (13).

Il mantenimento delle scorte di glutatione è garantito anche dalla riduzione - catalizzata dalla GSSG-riduttasi (GR) - del glutatione ossidato (GSSG) da parte del dinucleotide nicotina-adenina ridotto (NADPH), prodotto nella via dei pentosofosfati (14, 15). Questa via metabolica è accelerata quando il rapporto NADPH/NADP⁺ diminuisce a causa dello *stress* ossidativo con una modulazione dovuta alla glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), enzima allosterico che catalizza il passaggio limitante la velocità della via dei pentosofosfati (16, 17).

Come è noto, i metilacrilati mostrano la capacità di determinare una diminuzione del glutatione ridotto (GSH) (6, 18, 19) sia a causa di un'interazione diretta con il GSH che mediante l'ossidazione dovuta ad un aumento dei ROS.

I granulociti, presenti nel tessuto ematico, possono entrare in contatto *in vivo* con i composti metilacrilici rilasciati dalle resine odontoiatriche e le cellule HL-60 differen-

ziate rappresentano un modello accettato per gli studi *in vitro* sui granulociti (20, 21). Durante il differenziamento le cellule HL-60 interrompono la crescita, diventano più piccole ed acquisiscono la capacità di rispondere a stimoli antigenici mediante il "burst ossidativo", fenomeno che può essere analizzato attraverso varie tecniche tra cui la chemiluminescenza (CL) (22, 23). Le cellule HL-60 sono differenziate (24, 25) da numerose sostanze chimiche, quali il dimetilsolfossido (DMSO) (26), la 1,25-diidrossi-vitamina D₃ (27), l'acido retinoico tutto-*trans* (ATRA) (20) ed il bezafibrato (28).

Scopo di questo lavoro è stato lo studio degli effetti dei monomeri sopra citati sulla linea cellulare HL-60, attraverso la valutazione del danno mitocondriale e delle possibili conseguenze sia sul metabolismo del glucosio che sull'attività degli enzimi coinvolti nella regolazione della concentrazione del GSH.

MATERIALI E METODI

Materiali e reagenti

Se non diversamente indicato, tutti i reagenti sono stati ottenuti dalla ditta Sigma-Aldrich Srl di Milano.

Culture cellulari

La linea cellulare HL-60 (Istituto Zooprofilattico di Brescia) è stata mantenuta a 37 °C in atmosfera umidificata con CO₂ (5%) in RPMI 1640 con siero fetale bovino (10% v/v), penicillina (100 unità/mL), streptomina (100 µg/mL) e glutammina (2 mmol/L).

Trattamento con acido retinoico tutto-*trans* e con i monomeri metilacrilici

Le cellule HL-60 sono state trattate con Bis-GMA (a concentrazioni comprese tra 8.00 x 10⁻³ mmol/L e 16.00x10⁻³ mmol/L) o con ATRA (1.00x10⁻³ mmol/L); le soluzioni madri sono state preparate in DMSO immediatamente prima dell'uso a concentrazioni 1000 volte superiori a quelle somministrate alle cellule, per ottenere una concentrazione di DMSO pari allo 0.1% nel mezzo di coltura. Il monomero HEMA è stato aggiunto direttamente al terreno di coltura a concentrazioni comprese tra 0.11 mmol/L e 1.10 mmol/L.

Vitalità cellulare

Le cellule HL-60 in crescita esponenziale (15x10⁶, 2x10⁵ cellule/mL) sono state seminate in RPMI 1640 contenente ATRA o differenti concentrazioni di ogni monomero, secondo lo schema riportato nella Tabella 1 e quindi incubate per 5 giorni. Il numero di cellule è stato determinato utilizzando il saggio di esclusione del colorante Trypan blue: la soluzione di colorante (0.5 % in NaCl 0.9 %) è stata miscelata con un ugual volume di sospensione cellulare e quindi trasferita in un emocitometro, determinando il numero di cellule vive (non colorate) e morte (colorate) per ogni fiasca. Le curve di proliferazione sono state calcolate come area sotto la curva (AUC, Area Under the Curve) e la mortalità cellulare è stata calcolata come segue:

$$(\text{cellule morte} / \text{cellule totali}) \times 100$$

Velocità di consumo di ossigeno da parte delle cellule intatte

Le cellule HL-60 in crescita esponenziale (20x10⁶, 2x10⁵ cellule/mL) sono state seminate in RPMI 1640 contenente alternativamente ATRA, HEMA (1.10 x 10⁻³ mol/L) oppure Bis-GMA (16x10⁻⁶ mol/L) ed incubate per 1 h a temperatura ambiente.

Le cellule sono state quindi lavate in soluzione di tampone fosfato (PBS) senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, e risospese in soluzione *Krebs Ringer Phosphate* (KRP) alla densità di 1 x 10⁷ cellule/mL. Il consumo di ossigeno è stato misurato con un ossigrafo (Oxygen Meter Model 781, Strathkelvin Instruments, UK): la sospensione (2 mL) è stata trasferita nella cella dello strumento e la velocità di consumo dell'ossigeno è stata registrata sotto agitazione costante per 30 minuti (respirazione basale).

Velocità di consumo di ossigeno da parte dei mitocondri isolati

Le cellule HL-60 (1 x 10⁸), dopo trattamento con ATRA, Bis-GMA (16 x 10⁻⁶ mol/L) oppure HEMA (1.10 x 10⁻³ mol/L) ed incubazione (1 h a temperatura ambiente), sono state centrifugate (500 g, 5 min) e lavate con PBS freddo senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (250 g); le cellule sono state quindi risospese in PBS (10 mL) contenente fenilmetansulfonil-fluoruro (PMSF, 0.3 mmol/L) e digitonina (100 µmol/L), ed incubate (5 min, 37 °C). Dopo questo periodo le soluzioni sono state centrifugate (10.000 g, 10 min, 4 °C) ed il *pellet* è stato risospeso in un tampone di isolamento per mitocondri contenente saccarosio

(250 mmol/L), Hepes (10 mmol/L, pH 7.4) ed EDTA (1 mmol/L); le soluzioni ottenute sono state quindi omogeneizzate in ghiaccio con un *potter* (20 colpi a 4.500 RPM). Le cellule distrutte, come confermato dalla colorazione con il Trypan blue, sono state centrifugate (600 g, 10 min, 4 °C) ed i supernatanti ottenuti sono stati a loro volta centrifugati (15.000 g, 10 min, 4 °C); i mitocondri ottenuti sono stati lavati con lo stesso tampone e risospesi in un tampone senza EDTA. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati entro 5 h (29, modificato) e la concentrazione proteica è stata determinata per mezzo del *BioRad Protein Assay*. Le misure di consumo di ossigeno sono state realizzate a 37 °C con l'ossigrafo sopra descritto in un mezzo contenente EDTA (1 mmol/L), saccarosio (225 mmol/L), KCl (10 mmol/L), MgCl₂ (5 mmol/L), tris(idrossimetil)aminometano (10 mmol/L) e KH₂PO₄ (10 mmol/L) a pH 7.4; i mitocondri (0.5 mg/ml) sono stati trattati con succinato (5 mmol/L) e rotenone (2.5 mmol/L).

Consumo di glucosio

Le cellule HL-60 in crescita esponenziale (10×10^6) sono state seminate in RPMI 1640 (2×10^5 cellule/mL) contenente alternativamente ATRA o differenti concentrazioni di monomeri (Tab. 1); le incubazioni sono state effettuate per 48 ore a 37 °C, in atmosfera umidificata di CO₂ (5%).

Il consumo di glucosio cellulare è stato misurato nei sovrantananti di coltura mediante un analizzatore automatico Hitachi 917 (Roche Diagnostics AG, Switzerland) ed un appropriato *kit* (Glucose GOD-PAP-HK, Roche Diagnostics AG, Switzerland). Per normalizzare il consumo di glucosio alle differenti velocità di proliferazione. I dati sono stati espressi come consumo di glucosio *vs* AUC della crescita cellulare durante 48 ore di coltura.

Determinazione dell'attività enzimatica della Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi (G6PDH) e della Glutazione-Reduttasi (GR)

Le cellule HL-60 di in crescita esponenziale (10×10^6 , 2×10^5 cellule/mL) sono state seminate in RPMI 1640 contenente ATRA, Bis-GMA (16×10^{-6} mol/L) o HEMA (1.10×10^{-3} mol/L) e lasciate ad incubare per 48 ore.

L'attività degli enzimi è stata determinata sugli estratti cellulari interi: i *pellets* delle cellule, ottenuti dopo centrifugazione (400 g, 5

ATRA	Bis-GMA	HEMA
1 μ mol/L	8 μ mol/L	110 μ mol/L
	16 μ mol/L	500 μ mol/L
		1.100 μ mol/L

Tav. 1 - Concentrazioni utilizzate per l'ATRA e per i due monomeri.

min), sono stati lavati in PBS e conservati a -80°C per non più di 1 settimana. Successivamente i lisati cellulari sono stati centrifugati (20.000 g, 15 min, 4 °C) ed i sovrantananti sono stati raccolti ed usati per la determinazione della concentrazione proteica tramite *BioRad Protein Assay*; l'attività enzimatica è stata valutata tramite un analizzatore Olympus AU 400 con gli appropriati *kits* G6PDH e GR Randox (Sigma).

Saggi di differenziamento

La produzione di ROS - stimolata dal Forbolo 12-Miristato-13-Acetato (PMA) ed essenzialmente dovuta all'attività della NADPH ossidasi - è stata adottata come *marker* di differenziamento cellulare per la linea mieloide HL-60 ed è stata studiata tramite CL (30). Le cellule HL-60 in crescita esponenziale (10×10^6 , 2×10^5 cellule/mL) sono state seminate in RPMI 1640 contenente ATRA o differenti concentrazioni di ogni monomero (Tab. 1) ed incubate successivamente per 5 giorni. Il sistema di CL è stato realizzato con una miscela di luminolo (100 nmoli), 1×10^5 cellule trattate o non trattate (controllo), il tutto in presenza o in assenza di PMA (1.50 nmoli) in un volume finale (1 mL) raggiunto con tampone *Krebs Ringer Phosphate* (KRP). Il parametro di CL considerato per le analisi è stato l'indice di trattamento:

$$\left(\frac{\text{area dei fotoni prodotti dalle cellule trattate}}{\text{area dei fotoni prodotti dalle cellule non trattate}} \right) \times 100$$

Le prove sono state eseguite in triplicato a 25 °C per 120 min, usando il luminometro LB 953 (Berthold, EG&G Co., Germania).

Analisi statistica

Tutti i risultati sono espressi come media \pm DS o media \pm SEM. I gruppi di medie sono

stati comparati tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita, quando necessario, da una comparazione multipla delle medie mediane il *test* Student-Newman-Keuls. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Vitalità cellulare

Bis-GMA: a concentrazione 16×10^{-3} mmol/L questa sostanza ha indotto, rispetto al controllo, un significativo decremento della proliferazione cellulare ($p < 0.01$) senza incremento di mortalità (Fig. 1); questo valore è stato quindi scelto per i successivi esperimenti.

HEMA: alle concentrazioni utilizzate questo composto non mostra alcun effetto sulla proliferazione cellulare e sulla mortalità (Fig. 1); la concentrazione più elevata (1.10 mmol/L) è stata quindi arbitrariamente scelta per i successivi esperimenti.

ATRA: alla concentrazione scelta, questa molecola ha mostrato i noti effetti citostatici (Fig. 1).

Velocità di consumo di ossigeno da parte delle cellule intatte

I risultati sono riportati come percentuale del consumo di ossigeno delle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo; le cellule trattate con ATRA mostrano un consumo di ossigeno non statisticamente diverso da quello delle cellule di controllo, mentre quelle trattate con i monomeri presentano una significativa riduzione del parametro ($p < 0.01$ per le cellule trattate con Bis-GMA e $p < 0.05$ per le cellule trattate con HEMA) (Fig. 2).

Velocità di consumo di ossigeno da parte dei mitocondri isolati

I mitocondri isolati dalle cellule trattate con HEMA mostrano un decremento nella velocità di consumo di ossigeno rispet-

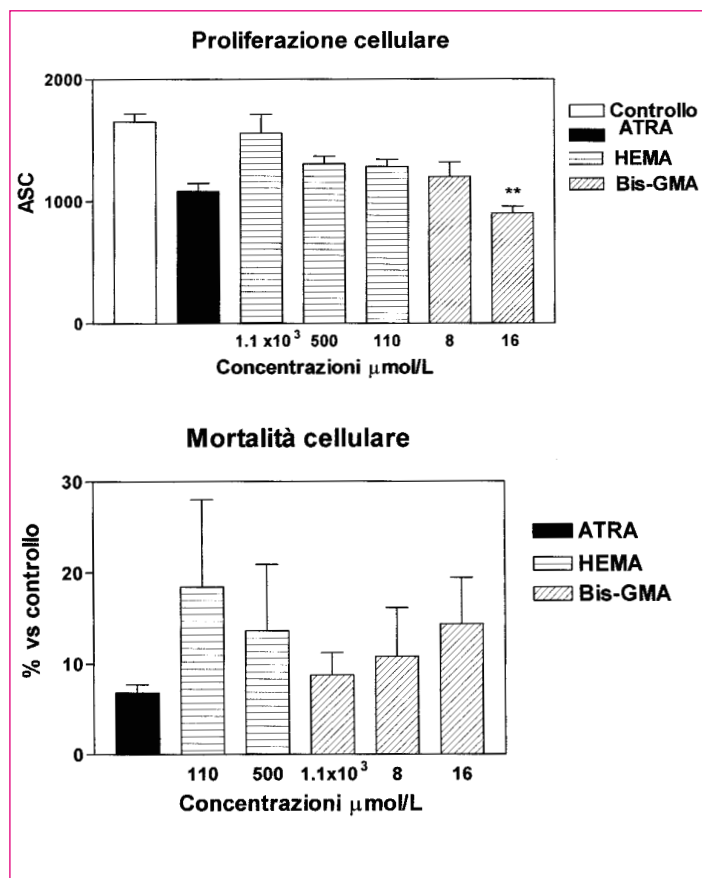


Fig. 1 - Parametri di tossicità cellulare. I dati sono espressi come media \pm SEM (** $p < 0.01$).

to a quelli derivanti dalle cellule trattate con ATRA ($p < 0.05$); questi ultimi e quelli trattati con Bis-GMA non mostrano differenze significative rispetto al controllo (Fig. 3).

Consumo di glucosio

Le cellule trattate con Bis-GMA (8×10^{-3} mmol/L e 16×10^{-3} mmol/L) mostrano un significativo aumento del consumo di glucosio rispetto a quelle trattate con ATRA ($p < 0.01$); queste ultime e quelle trattate con HEMA non mostrano differenze rispetto al controllo (Fig. 4).

Determinazione dell'attività enzimatica della Glucosio-6-Fosfato-Deidrogenasi (G6PDH)

L'enzima estratto dalle cellule trattate con HEMA presenta un aumento di attività statisticamente significativo ($p < 0.05$) rispetto a quello delle cellule trattate con ATRA, mentre la presenza di Bis-GMA non ha prodotto alcun effetto (Fig. 5).

Determinazione dell'attività enzimatica della Glutazione-Reduttasi (GR)

L'enzima estratto dalle cellule trattate con HEMA mostra un incremento statisticamente significativo nell'attività della GR rispetto a quello delle cellule trattate con ATRA ($p < 0.05$); anche in questo caso la presenza di Bis-GMA non ha prodotto alcun effetto (Fig. 6).

Saggio di differenziamento

Le analisi di CL hanno mostrato che il Bis-GMA (16×10^{-3} mmol/L) e l'HEMA (1.1 mmol/L) inducono nelle cellule HL-60 un recupero del *burst* ossidativo (Fig. 7).

DISCUSSIONE

Numerosi studi hanno dimostrato che i composti metilacrilici presenti nelle resine usate nei materiali dentali possono causare effetti avversi, sia di tipo locale che sistemi-

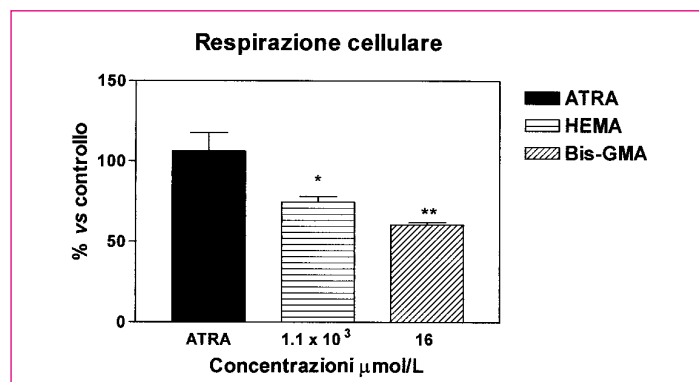


Fig. 2 - Consumo di ossigeno da parte delle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. I dati sono espressi come media \pm DS (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

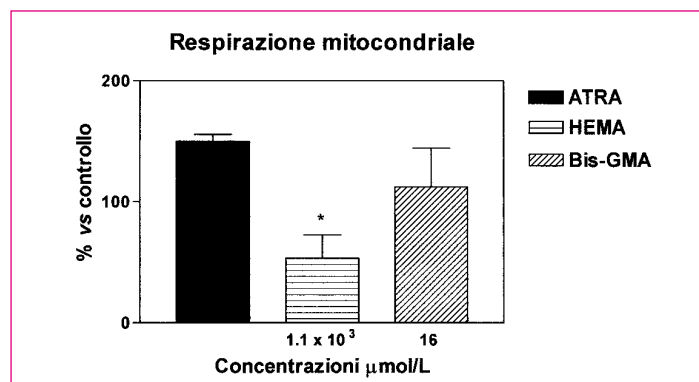


Fig. 3 - Consumo di ossigeno da parte dei mitocondri isolati da cellule trattate rispetto ai mitocondri isolati dalle cellule di controllo. I dati sono espressi come media \pm DS (* $p < 0.05$).

co: irritazione della polpa, lesioni lichenoidi e reazioni allergiche sono state infatti riscontrate *in vivo* (31), mentre genotossicità ed alterazioni citotossiche - dovute ad un meccanismo d'azione non ancora chiarito - sono state osservate *in vitro* (2, 32).

In questo lavoro sono state studiate alcune delle interazioni biochimiche che intercorrono tra le cellule HL-60 ed i monomeri HEMA e Bis-GMA; preliminarmente sono stati eseguiti esperimenti di proliferazione cellulare, necessari per stabilire le concentrazioni da utilizzare nelle successive prove funzionali. Per il Bis-GMA è stata scelta la concentrazione che, pur senza indurre mortalità, provocasse un rallentamento della proliferazione cellulare; per l'HEMA è stata scelta una concentrazione che, pur non inducendo un significativo rallentamento della proliferazione a causa della sua minore tossicità, non fosse troppo superiore a quelle presumibilmente riscontrabili *in vivo*.

Gli esperimenti per la valutazione delle in-

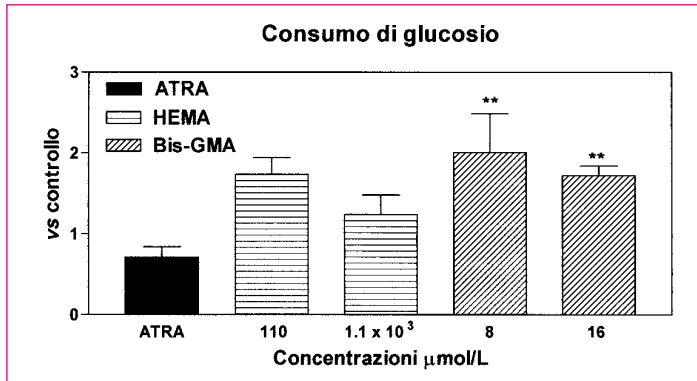


Fig. 4 - Incremento nel consumo di glucosio da parte delle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. I dati sono espressi come media \pm SEM (** $p < 0.01$).

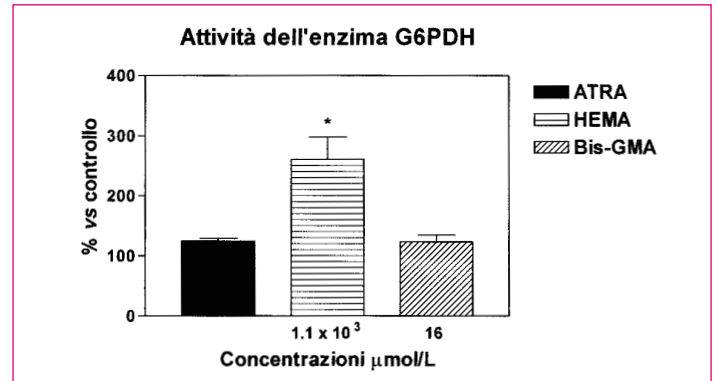


Fig. 5 - Variazioni dell'attività enzimatica dopo trattamento delle cellule con i monomeri. I dati sono espressi come media \pm SEM (* $p < 0.05$).

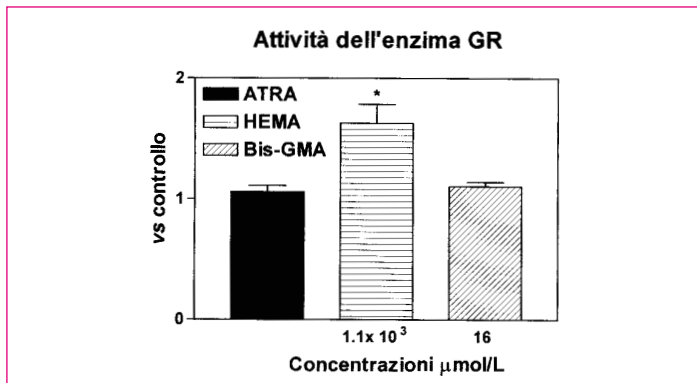


Fig. 6 - Variazione dell'attività enzimatica dopo trattamento delle cellule con i monomeri. I dati sono espressi come media \pm SEM (* $p < 0.05$).

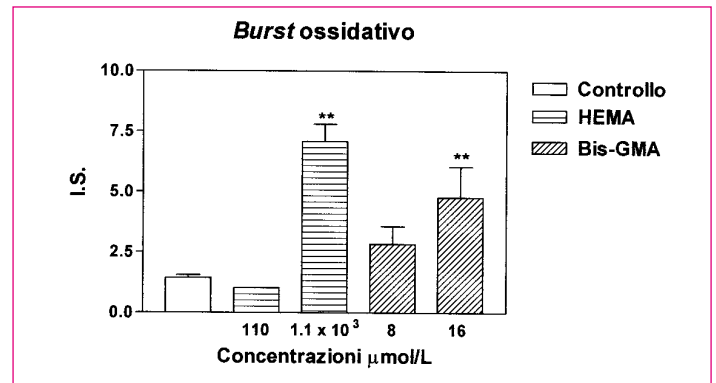


Fig. 7 - Effetto dei monomeri sul burst ossidativo delle cellule. I dati sono espressi come media \pm SEM (** $p < 0.01$).

terazioni tra mitocondri e monomeri hanno dimostrato che questi ultimi provocano una diminuzione della velocità di consumo di ossigeno delle cellule trattate rispetto al controllo: per chiarire se questo decremento fosse effettivamente dovuto ad un danno mitocondriale o ad un'alterazione cellulare differente, tutti gli esperimenti sono stati ripetuti sui mitocondri isolati da cellule trattate. I risultati ottenuti con i mitocondri isolati hanno confermato il danno mitocondriale causato dall'HEMA e la mancanza di alterazione della respirazione mitocondriale da parte del Bis-GMA: è quindi probabile che il bersaglio di quest'ultimo non sia il mitocondrio e che l'alterazione della respirazione cellulare sia dovuta ad un effetto meno specifico. Poiché, come precedentemente indicato, l'HEMA è in grado di indurre una parziale inibizione della respirazione mitocondriale e di stimolare la produzione intracellulare di ROS, è ragionevole ipotizzare che il mitocondrio sia la sorgente di tali specie; infatti, nella ca-

tena di trasporto mitocondriale degli elettroni vengono fisiologicamente prodotte, a livello dei complessi I e III, ROS la cui concentrazione può aumentare in seguito ad una diminuzione della funzionalità mitocondriale ed al conseguente allungamento del periodo di emivita dei trasportatori di elettroni presenti in tali complessi (33-36). Il danno mitocondriale può comportare un'insufficiente concentrazione di ATP a cui le cellule possono far fronte aumentando la velocità della glicolisi, con eventuale aumento del consumo di glucosio. Il Bis-GMA infatti, a differenza dell'HEMA, incrementa in modo significativo il consumo di glucosio che subisce diversi destini metabolici in base al monomero utilizzato:

- nelle cellule trattate con Bis-GMA non aumenta l'attività di G6PDH e di GR, quindi il glucosio consumato in eccesso viene presumibilmente utilizzato per produrre ATP;
- nelle cellule trattate con HEMA, invece, aumenta l'attività di G6PDH e di GR, e

quindi una parte del glucosio viene dirottato verso la via dei pentoso-fosfati.

Si può quindi ipotizzare che il Bis-GMA non interagendo direttamente con i mitocondri non determini uno *stress* ossidativo e quindi non induca ossidazione del glutathione; l'HEMA invece, provocando *stress* ossidativo, stimola la produzione di NADPH per la ricostituzione delle scorte di glutathione ridotto.

Infine, sulla base dei dati precedenti, è stato analizzato l'effetto differenziante delle due molecole sulle cellule HL-60: i risultati ottenuti in CL hanno dimostrato il recupero del *burst* ossidativo dovuto ad una corretta disposizione degli enzimi costituenti la NADPH ossidasi di membrana.

Il meccanismo biologico di questo differenziamento è ancora sconosciuto sebbene due siano le ipotesi più verosimili: a) le ROS prodotte dai mitocondri danneggiati potrebbero agire come secondi messaggeri nella trasduzione del segnale, oppure b) i monomeri, interagendo con la membrana pla-

smatica, potrebbero attivare un meccanismo aspecifico di trasduzione del segnale, legato ai lipidi di membrana.

Entrambi i monomeri analizzati in questo studio inducono - a concentrazioni non citotossiche - alcune alterazioni nel metabolismo delle cellule HL-60.

In particolare il Bis-GMA:

- riduce il consumo di ossigeno nelle cellule intatte ma non nei mitocondri isolati;
- incrementa il consumo di glucosio;
- riduce la proliferazione cellulare;
- induce il differenziamento cellulare.

Questi dati fanno pensare ad uno stato di sofferenza cellulare indotto dal monomero, evidenziato dalla riduzione del consumo di ossigeno indipendente dal danno mitocondriale. In queste condizioni sperimentali non c'è probabilmente ossidazione del GSH, come indicato anche dalla mancata

alterazione dell'attività degli enzimi coinvolti nella riduzione del GSSG; la riduzione della velocità di proliferazione ed il differenziamento cellulare potrebbero dunque rappresentare un tentativo, da parte delle cellule, di adattarsi alla nuova situazione determinata dalla presenza del monomero.

L'HEMA invece:

- riduce il consumo di ossigeno, sia sulle cellule intere che sui mitocondri isolati;
- incrementa l'attività degli enzimi G6PDH e GR;
- induce il differenziamento cellulare.

Questi risultati sembrano indicare una condizione di *stress* ossidativo generata dal danno mitocondriale con conseguente produzione di ROS, le quali probabilmente portano alla formazione di GSSG, successivamente ridotto grazie all'azione di G6PDH e

GR.

CONCLUSIONI

Le alterazioni metaboliche osservate in questo lavoro potrebbero essere coinvolte nella tossicità cellulare indotta dalle resine composite di uso odontoiatrico: naturalmente le osservazioni del presente lavoro non possono essere esaustive per quanto riguarda la totalità delle interazioni tra le cellule ed i biomateriali, ma dai dati rilevati emerge l'importanza di tali interazioni sia per la ricerca che la clinica, al fine di incrementare le conoscenze su tali interazioni e possibilmente sviluppare nuovi materiali con caratteristiche sempre migliori anche dal punto di vista della biocompatibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996; 24:125-128.
2. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 41:474-480.
3. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res* 2002; 81 (4):265-269.
4. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Bernard C, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996; 22:244-248.
5. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil* 1998; 25:45-51.
6. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005; 26: 745-753.
7. Lefevre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005; 26: 5130-37.
8. Geurtsen W and Leyhausen G. Chemical-biological interaction of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res*; 2001; 80 (12): 2046-2050.
9. Cheng JZ, Singhal SS, Sharma A, Saini M, Yang Y, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC. Transfection of mGSTAG-4 in HL-60 cells protects against 4-Hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch Biochem Biophys* 2001; 392:197-207.
10. Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 1263-73.
11. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J*. 2002; Aug 15, 366(1): 45-55.
12. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281, 1309-1312.
13. Griffith OW and Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82, 4668-4672.
14. Cohen G. and Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 1963; 2, 1420-1428.
15. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM and Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 23, 334-339.
16. Luzzatto L and Metha A. The metabolic basis of inherited disease (Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D., Eds), pp. 3367-3398, MacGraw Hill, New York 1995.
17. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 1994; Feb 8 (2): 174-81.
18. Stanislawski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili-Majid E., Goldberg M. Perianin ATEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*. 2003; Sept 1; 66(3): 476-82.
19. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the Intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2002; 63: 746-751.
20. Breitman TR, Selonick SE. and Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukaemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980; 77, 2936-2940.
21. Yeh CG, Papamichael M. and Faulk WP. Loss of transferring receptors following induced differentiation of HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Exp Cell Res* 1982; 138, 429-433.
22. Harris P and Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: A review of HL-60 and U937 cell lines. *Leukoc Biol* 1985; 37, 407-422.
23. Thompson BY, Sivam G, Britigan BE, Rosen GM and Cohen MS. Oxygen metabolism of the HL-60 cell line: comparison of the effects of monocytoid and neutrophilic differentiation. *J Leukoc. Biol* 1988; 43, 140-147.
24. Collins SJ, Gallo RC and Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* 1977; 270, 347-349.
25. Gallagher RE, Collins SJ, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F and Gallo RC. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukaemia. *Blood* 1979; 54, 713-733.
26. Blair OC, Carbone R and Sartorelli AC. Differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: Simultaneous determination of phagocytic activity and cell cycle distribution by flow cytometry. *Cytometry* 1986; 7, 171-177.
27. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Nishii

- Y. and Suda T. 1,25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia line (HL-60); the presence of a cytosol receptor and induction of differentiation. *Biochem. J* 1982; 204, 713-719.
28. Scatena R, Nocca G, De Sole P, Rumi C, Puggioni P, Remiddi F, Bottoni P, Ficarra S, Giardina B. Bezafibrate as differentiating factor of human myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* 1999; 6, 781-787.
29. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003; 278 (10): 8516-25.
30. De Baeselier P, and Schram E. Luminescent bioassay based on macrophage cell lines. *Meth. Enzymol* 1986; 133: 507-30.
31. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000; 11 (3): 333-55.
32. Schweikl H., Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the HPRT gene of V 79 cells. *Mutat Res* 1999; 438: 71-78.
33. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001; 52: 159-164.
34. St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J. and Brand M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
35. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL and Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278, pp. 36027-36031.
36. Hagen T, D'Amico G, Quintero M, Palacios-Callender M, Hollis V, Lam F, Moncada S. Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 322(3), 24 September, 923-929.