

RAPORT DE FAZA PENTRU ETAPA II

2016

PROIECT ERANET - NanoToxClas, second SIINN Joint Call 2013
“Stabilirea strategiilor de grupare/clasificare a nanomaterialelor în acord
cu toxicitatea și efectele biologice ca suport pentru evaluarea riscurilor”

Etapa II: Evaluarea *in vitro* a stresului oxidativ indus de nanomaterialele fabricate în celulele pulmonare

Activitatea II.1 Determinarea potențialului oxidant al nanomaterialelor și analiza nivelului de ATP generat în celule

Activitatea II.2 Determinarea nivelului de GSH și MDA

Activitatea II.3 Determinarea activităților specifice ale CAT, SOD, GPx, GST și GR

Activitatea II.4 Analiza nivelului de proteine nitrozilate, glutationilate și carbonilate

Activitatea II.5 Testarea potențialului membranei mitocondriale

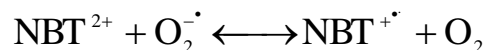
Activitatea II.6 Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor

Activitatea II.7 Diseminarea rezultatelor

Activitatea II.1 Determinarea potențialului oxidant al nanomaterialelor și analiza nivelului de ATP generat în celule

II.1.1 Evaluarea nivelului de radicali liberi eliberati intracelular in urma expunerii la NPs de SiO₂ în prezența sării de nitro-blue-tetrazoliu (NBT)

Metoda de evidențiere a produșilor cu potențial oxidativ se bazează pe proprietățile optice ale anumitor substanțe care suferă modificări în prezența diferitelor tipuri de specii reactive de oxigen (ROS). Astfel, anionul superoxid are capacitatea de a reduce sarea de NBT la un compus stabil, insolubil de tip formazan:



Celulele MRC-5 tratate cu NPs SiO₂ au fost tripsinizate, omogenizate în 0.5 ml NBT (0,5 mg/ml în PBS) și incubate timp de 2 ore la 37°C. După incubare celulele au fost centrifugate la 1500 rpm/ 5 min./ 12°C și precipitatul format a fost solubilizat în 600 μl DMSO. Citirea DO la 520 nm a fost realizată în placi de 96 de godeuri, folosind un multireader TECAN.

În Figura 1 este prezentat profilul variației concentrației de anion superoxid în celulele MRC-5 tratate cu 62.5 $\mu\text{g/mL}$ nanoparticule de SiO_2 . Se poate observa că nivelul acestuia a crescut cu 18%, 35% și 40% după 24, 48 respectiv 72 ore.

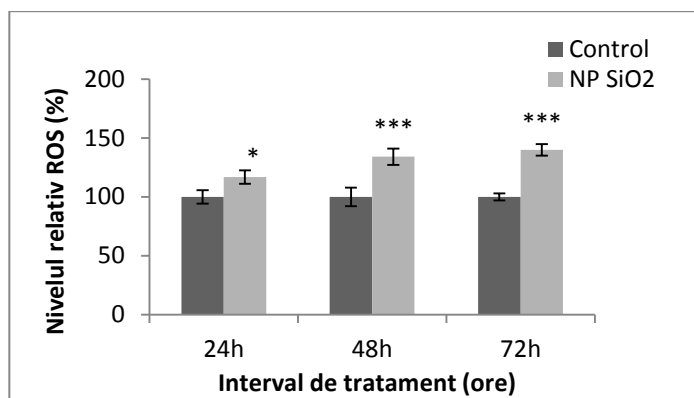
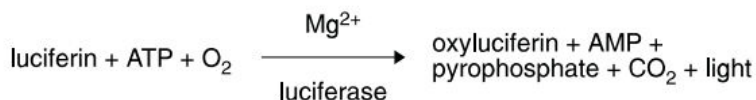


Figura 1. Nivelul ROS în celulele MRC-5 după 24h, 48h și 72 de ore de la expunerea cu nanoparticule de SiO_2 . Asterixurile reprezintă semnificația statistică: $P < 0.05^*$; $P < 0.001^{***}$. Barele verticale reprezintă deviația standard.

II.1.2 Determinarea nivelului de adenozin-5'-trifosfat (ATP) intracelular

Pentru a determina nivelul de ATP din celulele expuse la NPs de SiO_2 s-a folosit kit-ul ATP Determination Kit (A22066) de la Molecular Probes. Acesta este un test bioluminescent pentru determinarea cantitativă a ATP ce utilizează luciferaza recombinată și D-luciferina ca substrat. Acest test se bazează pe necesitatea de ATP a luciferazei pentru generarea de lumină (emisie maximă ~560 nm la pH 7.8) conform reacției:



După expunerea la NPs de SiO_2 , celule pulmonare au fost lizate în tampon fosfat salin (PBS) prin sonicare și centrifugate la 10 minute la 3000 rpm, 4°C. Un volum de 10 μL din supernatant a fost adăugat peste 100 μL mix de reacție alcătuit din: 8.9 mL apă distilată, 0.5 mL 20X Reaction Buffer, 0.1 mL DTT 0.1 M, 0.5 mL D-luciferină 10 mM și 2.5 μL luciferază 5 mg/mL. Amestecul pipetat într-o placă de 96 de godeuri neagra a fost incubat 10 minute la temperatura camerei. Luminescența rezultată a fost măsurată utilizând FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader de la Molecular Devices LLC și soft-ul SoftMax Pro.

Pentru determinarea concentrației de ATP din celulele expuse la NPs de SiO₂ s-a folosit o curba etalon de concentrații cuprinse între 0-10 μM. Drept standard s-a utilizat soluția de ATP furnizată în kit. Rezultatele au fost exprimate în μM/mg proteină și reprezentate în valori relative ± abaterea standard.

În urma acestui test s-a observat o scădere semnificativă cu 35% a nivelului de ATP în celulele pulmonare începând cu 24 de ore de expunere la NPs de SiO₂ comparativ cu proba control. După 48 și 72 de ore de expunere s-a înregistrat o scădere cu 24% și respectiv 30% față de control (Figura 2).

Scăderea nivelului de ATP din celule poate avea consecințe dramatice asupra metabolismului celular întrucât determină scăderea pH-ului, comutarea pe metabolism anaerob și dezintegrarea lizozomilor, cu eliberarea hidrolazelor acide, ce duc la autodigestia celulei și necroză.

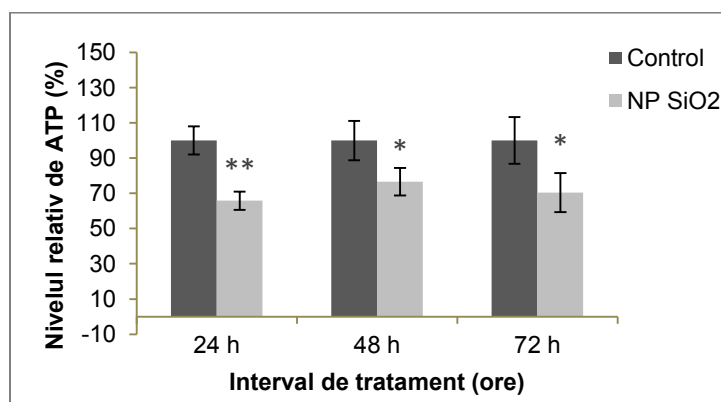


Figura 2. Nivelul de ATP la nivelul liniei celulare MRC-5 în urma tratamentului cu 62.5 μg/mL NP de SiO₂ după 24, 48 și 72 de ore. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: $p < 0.05$ * (semnificativ); $p < 0.01$ ** (distinct semnificativ).

Activitatea II.2 Determinarea nivelului de GSH și MDA

II.2.1 Dozarea concentrației de glutathion redus (GSH)

Determinarea concentrației de GSH la nivel celular a fost realizată cu kitul Arbor Assays Detectx™ Glutathione Colorimetric Detection Kit-K006-H1. Proteinele din probe au fost

îndepărtate prin precipitare cu acid sulfosalicilic (SSA) 5%. Rezultatele au fost raportate la concentrația proteică a probelor și au fost exprimate în nmoli/mg proteină.

Analizând Figura 3 se poate observa o scădere semnificativă a nivelului GSH în urma tratamentului cu nanoparticule de dioxid de siliciu, aceasta fiind dependentă de timp.

După 24, 48 și 72 ore concentrația acestui tripeptid a scăzut cu 36%, 50% respectiv 78% față de control. Scăderea nivelului de glutatation redus mitocondrial poate reprezenta principalul factor inductor al unui dezechilibru redox mitocondrial, a cărui consecință poate fi generarea în exces de specii reactive de oxigen. GSH furnizează protecție prin neutralizarea radicalului hidroxil, extrem de reactiv, care este o sursă majoră de vătămare celulară prin intermediul radicalilor liberi.

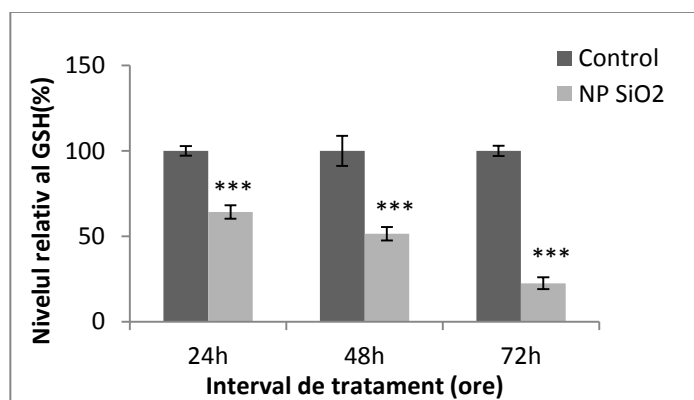


Figura 3. Concentrația de GSH în celule MRC-5 expuse la nanoparticule de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificatia statistică: P<0.001***. Barele verticale reprezintă deviația standard.

II.2.2 .Evaluarea nivelului de peroxidare lipidică

Nivelul de malondialdehida (MDA) ca marker de peroxidare lipidică *in vitro* a fost evaluat prin metoda descrisă de Del Rio (Del Rio și colab., 2003). Principiul metodei se bazează pe evaluarea cantitativă a aducțiilor fluorescenței ai MDA cu acidul tiobarbituric (TBA) la lungimile de undă Ex520nm/Em549nm. Ca standard s-a utilizat o soluție stoc de MDA de concentrație 1 μM, din care s-au realizat diluții în HCl 0.1 N cuprinse între 0 și 0.5 μM MDA.

După adăugarea a 700 μL HCl 0.1 M atât în tuburile pentru construirea curbei de etalonare, cât și în cele cu probele ce conțin lizatul celular diluat corespunzător (200 μL), s-a realizat o omogenizare. Ulterior au fost lăsate în repaus la temperatura camerei timp de 20 de

minute. În etapa următoare, s-au adăugat 900 μL TBA 0.025 M și au fost incubate timp de 65 de minute la 37°C, pentru formarea produșilor TBA-MDA.

În tuburile folosite la construirea curbei de etalonare s-au adăugat 400 μL BSA (de concentrație identică cu concentrația proteică a probelor), și respectiv la probe 400 μL PBS. Citirea fluorescenței s-a făcut la un fluorimetru de tip Jasco FP-750 folosind ca software Spectra Manager la excitație 520 nm, emisie 549 nm. Evaluarea gradului de peroxidare lipidică în fiecare probă s-a făcut prin raportarea nivelului concentrației de MDA obținută la concentrația proteică a probelor. Rezultatele au fost exprimate în $\mu\text{moli MDA/mg}$ proteină și reprezentate în valori relative \pm abaterea standard.

Malondialdehida se găsește în majoritatea probelor biologice, ser, plasma, țesuturi și urina, ca rezultat al peroxidării lipidelor și din acest motiv a devenit unul dintre cei mai analizați markeri ai estimării efectului stresului oxidativ la nivel lipidic. Capacitatea particulelor de siliciu de a peroxida lipidele este corelată cu producerea de radicali liberi ai oxigenului. În urma tratamentului cu nanoparticule de dioxid de siliciu se poate observa o creștere semnificativă a produsilor de peroxidare lipidică cu 47%, 66% respectiv 50% după 24, 48 și 72 ore (Figura 4).

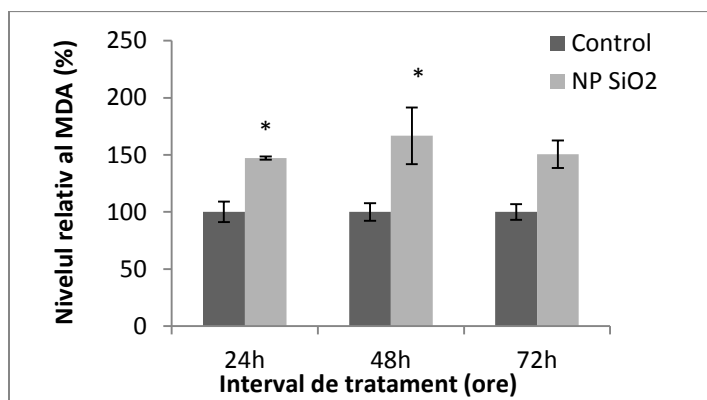
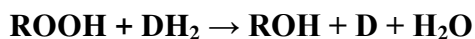
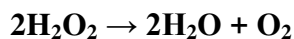


Figura 4. Nivelul de malondialdehida în celule MRC-5 expuse la nanoparticule de SiO_2 timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: $P < 0.05^*$. Barele verticale reprezintă deviația standard.

Activitatea II.3 Determinarea activităților specifice ale CAT, SOD, GPx, GST și GR

II.3.1 Evaluarea activității enzimatice a catalazei (CAT) și superoxid dismutazei (SOD)

Măsurarea activității CAT s-a realizat conform metodei spectrofotometrice descrisă de Aebi (1974), urmărind modificarea densității optice la 240nm, timp de un minut. Metoda de dozare enzimatică se bazează pe capacitatea catalazei de a cataliza următoarele reacții:



Degradarea H_2O_2 sub acțiunea catalazei existente în EPT a fost urmărită după adăugarea a 50 μl EPT în amestecul de reacție care conținea 600 μL de tampon fosfat de potasiu, 0,1M pH 7,1 și 350 μL H_2O_2 0,059 M. Citirile au fost realizate față de un martor în care nu a fost adăugat peroxidul de hidrogen. O unitate enzimatică descompune 1 μmol de H_2O_2 într-un minut la 25°C și pH 7,AE (k / min) = 2,3/1min x log E1/E2, unde E1 este valoarea $\Delta\text{DO}_{240\text{nm}}$ /min inițială și E2 este valoarea $\Delta\text{DO}_{240\text{nm}}$ /min finală. Determinarea activității catalazice a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

Măsurarea activității SOD a fost realizată utilizând metoda spectrofotometrică descrisă de Paoletti (1986), care se bazează pe capacitatea SOD de a cataliza reacția de transformare a anionilor superoxid în oxigen molecular și peroxid de hidrogen conform reacției:



Procesul de oxidare a NADH a fost urmărit timp de 20 de minute, prin modificarea densității optice la 340nm, după o perioadă de incubare de 5 minute la 37 °C la un multireader TECAN. Mediul de reacție a conținut: 20 μl EPT, 160 μl TDB (tampon 100mM trietanolamină – 100mM dietanolamină, pH 7,4), 5 μl soluție EDTA 100mM / MnCl_2 50mM, pH 7, 8 μl NADH 7,5 mM. Reacția enzimatică a fost declanșată prin adăugarea a 20 μl β – mercaptoetanol 100mM. După cele 5 minute de incubare la 37 °C, citirile s-au efectuat față de un martor care nu conține EPT.

O unitate de activitate SOD este definită ca acea cantitate de enzimă necesară inhibării cu 50 % a ratei de oxidare a NADH din martor.

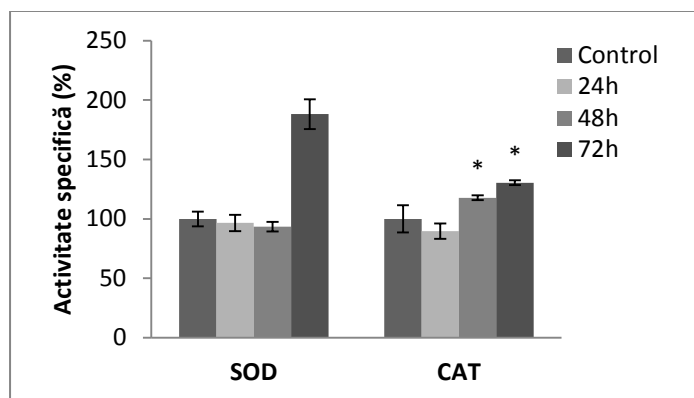


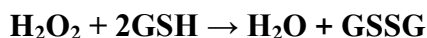
Figura 5. Activitatea specifică relativă a superoxid dismutazei (SOD) și a catalazei (CAT) la nivelul celulelor MRC-5 în urma expunerii la NPs de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: P < 0.05 *; Barele verticale reprezintă deviația standard.

În urma tratamentului cu NPs de SiO₂ activitatea enzimatică SOD a rămas nemodificată după intervalul de 24 de ore și 48 de ore comparativ cu intervalul de 72 de ore unde activitatea a crescut cu 88% față de control. În cazul CAT, după intervalul de 24 de ore de la expunere, a fost observată o scădere nesemnificativă a activității specifice, urmată de o creștere semnificativă cu 15% și 30% după intervalele de 48 și 72 de ore.

În cazul activității SOD, a fost înregistrată o creștere față de control abia după 72 de ore, care ar putea fi din cauza apariției tardive a stresului oxidativ. Astfel putem afirma că atât activitatea CAT cât și activitatea SOD a fost dependentă de timp.

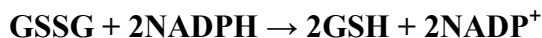
II.3.2 Evaluarea activității enzimatică a glutatión peroxidazei (GPX) și glutatión – S – transferazei (GST)

Determinarea activității GPX a fost realizată folosind metoda descrisă de Beutler (1984), bazată pe capacitatea GPX de a cataliza reacția de reducere a peroxidului de hidrogen și a altor peroxizi în prezența GSH.



Metoda aleasă pentru determinarea activității enzimei se bazează pe monitorizarea formării GSSG, care este redus continuu prin adăugarea unui exces de glutatión reductază, generând un nivel constant de GSH. Determinarea cantitativă a GSSG format se face indirect, prin măsurarea

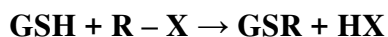
oxidării concomitente a NADPH la λ 340 nm, în conformitate cu reacția catalizată de glutatión reductază:



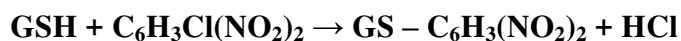
Procesul de oxidare a NADPH a fost urmărit timp de 5 minute, la 25 °C, după adăugarea a 10 μL terț butil hidroxiperoxid 7mM într-un amestec de reacție care conținea 798 μl H_2O , 100 μL tampon Tris / HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8, 20 μL GSH 0,1 M, 1 μL glutatión reductază, 60 μl NADPH 2 mM, 10 μL EPT, care a stat în repaus la temperatura camerei 5 minute.

Citirile au fost realizate față de o probă control în care nu s-au adăugat soluție NADPH 2mM și nici glutatión reductază. Activitatea enzimatică a fost calculată ca nmoli NADPH oxidat / min / mg proteină, folosind coeficientul de extincție molară $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Evaluarea activității glutatión peroxidazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

Dozarea activității GST a fost realizată cu ajutorul metodei descrise de Habig și colab. (1974). GST catalizează reacția în care este utilizat GSH și un substrat electrolil.



Reacția enzimatică a fost urmărită spectrofotometric prin creșterea absorbantei la 340nm. Metoda folosește un substrat electrolil de tipul clor dinitrobenzenului, reacția catalizată de GST fiind:



Creșterea absorbantei la 340 nm a fost urmărită timp de 5 minute, la 25 °C, după adăugarea a 50 μl EPT în amestecul de reacție care conținea 630 μl H_2O , 200 μL tampon fosfat de K 0,1 M, pH 7,1, 20 μL soluție alcoolică 1 – clor, 2, 4 – dinitrobenzen (CDNB) 25 mM și 100 μL GSH 20 mM. Reacția enzimatică a fost urmărită față de o probă martor în care nu a fost adăugat extractul proteic total cu activitate GST. Activitatea enzimatică specifică a fost calculată ca nmoli GS – $\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ / min / mg proteină, folosind coeficientul de extincție molară $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Evaluarea activității glutatión – S – transferazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

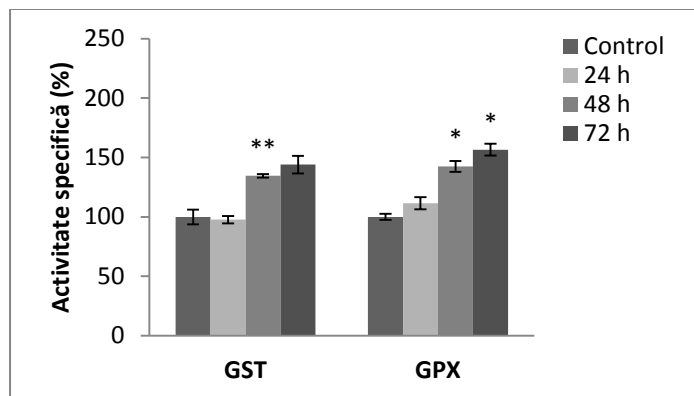


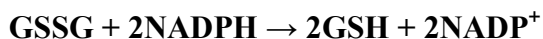
Figura 6. Activitatea specifică relativă a glutation S-transferazei (GST) și a glutation peroxidazei (GPX) la nivelul celulelor MRC-5 în urma expunerii la NPs de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: P < 0.05 * ; P < 0.01 **; Barele verticale reprezintă deviația standard.

În Figura 6 se poate observa că activitatea GPX crește cu 39%, respectiv 56% după intervalul de 48 și 72 de ore, comparativ cu controlul. În cazul GST activitatea specifică a crescut semnificativ cu 38% și 43% după intervalul de 48, respectiv 72 de ore.

Creșterea activității specifice GPX cu 56% și a activității CAT numai cu 30% după 72 de ore sugerează că după expunerea celulelor MRC-5 la NPs de SiO₂ poate conduce la generarea de peroxid de hidrogen care este mai puțin semnificativă decât cea a peroxidării lipidelor. Glutacion S-transferazele sunt enzime implicate în metabolismul xenobioticelor, capabile să catalizeze reacții multiple, în scopul de a detoxifica peroxizii lipidici (Picket și Lu, 1989). Expunerea celulelor MRC-5 la NPs de SiO₂ induce stres oxidativ într-o manieră dependentă de timp.

II.3.3 Evaluarea activității enzimice a glutation reductazei (GR):

Evaluarea activității GR a fost realizată utilizând metoda descrisă de Goldberg și Spooner (1983). Metoda de determinare a activității enzimice se bazează pe capacitatea GR de a cataliza reacția de reducere a glutationului oxidat cu participarea NADPH.



Oxidarea NADPH a fost urmărită spectrofotometric timp de 5 minute pe baza scăderii densității optice la 340 nm. Reacția enzimatică catalizată de GR a fost declanșată prin adăugarea a 25 μL lizat în amestecul de reacție care conține 855 μL H₂O, 50 μl tampon fosfat de K 0.1 M, pH 7.7, 50 μl NADPH 2 mM și 20 μl GSSG 33 mM. Citirile au fost efectuate la 25°C timp de 5

minute, la un interval de 15 secunde, de la adăugarea soluției de NADPH, față de un martor în care nu s-a adăugat soluție 33 mM GSSG. Activitatea enzimatică a fost calculată folosind coeficientul de extincție molară al NADP^+ $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Activitatea specifică a glutation reductazei din lizatele celulare s-a exprimat în U/mg proteină. Evaluarea activității glutation reductazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Perkin Elmer Lambda 25.

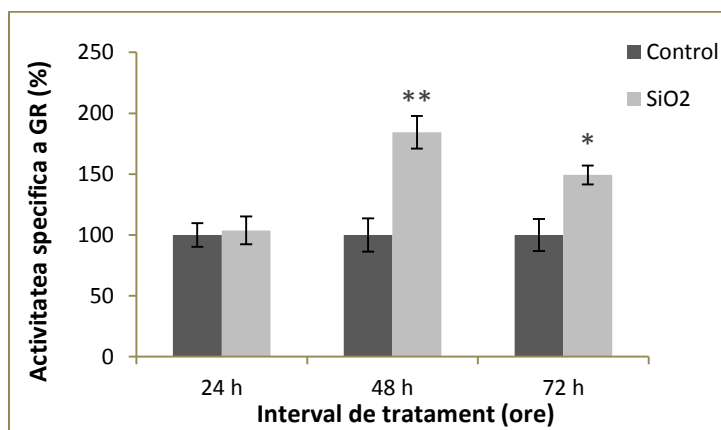


Figura 7. Activitatea specifică relativă a glutation reductazei (GR) la nivelul celulelor MRC-5 în urma expunerii la NPs de SiO_2 timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: $P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ **; Barele verticale reprezintă deviația standard.

În urma acestui test s-a remarcat o creștere semnificativă a activității specifice a glutation reductazei după o incubare cu NPs de SiO_2 de 48 și 72 de ore. Nivelul activității GR a crescut cu 84% în primele 2 zile și cu 49% în a 3-a zi comparativ cu nivelul înregistrat în celulele netratate.

Glutation reductaza este o FAD-enzimă homodimeră cu o structură înalt conservată în toate regnurile, fiind indusă în condiții de stres oxidativ. Rolul său în apărarea antioxidantă este de a reface GSH, important antioxidant celular. GR catalizează reducerea legăturii disulfurice a glutationului oxidat (GSSG) rezultând două molecule de GSH, fiecare cu câte o grupare sulfhidril. Creșterea nivelului activității GR reprezintă un mecanism de apărare antioxidantă ce determină refacerea rezervelor de GSH în vederea contracarării stresului oxidativ.

De obicei, celulele răspund la atacul oxidativ prin întărirea mecanismelor de apărare antioxidantă cu scopul de a se proteja de orice daune oxidative. Cu toate acestea, dacă mecanismele de apărare nu reușesc să neutralizeze atacul oxidativ, la nivelul celular au loc

oxidări ale proteinelor, peroxidări lipidice, leziuni ale ADN, perturbări mitocondriale și procese de apoptoză.

Activitatea II.4 Analiza nivelului de proteine nitrozilate, glutationilate și carbonilate

II.4.1 Evaluarea nivelului de expresie a nitrotirozinei prin imunodectie

Nitrotirozina este un produs relativ stabil format în urma nitrării resturilor de tirozină ale proteinelor mediate de către specii reactive precum anionul peroxinitrit și dioxidul de nitrogen. Nitrotirozina din proteine a fost pusă în evidență prin tehnica Western Blot. Metoda este utilizată pentru identificarea unor antigene (proteine) care reacționează cu un anticorp specific.

Prima etapă a presupus prepararea gelului de poliacrilamidă 10% care conține gelul de migrare/separare (30% acrilamidă bisacrilamidă, tampon Tris/HCl/SDS 0.5 M, pH 8.8, apă distilată, persulfat de amoniu 10% și TEMED) și gelul de concentrare (30% acrilamidă bisacrilamidă, tampon Tris/HCl/SDS 1.5 M, pH 6.8, apă distilată, persulfat de amoniu (APS) 10% și TEMED). După polimerizarea gelului s-au încărcat în fiecare godeu 25 μ L din fiecare probă (30 μ g proteină). Probele au fost anterior incubate în tamponul de încărcare (10 mL tampon încărcare 4x conțin: 3.6 mL glicerat, 1 g SDS, 0.6 mL β -mercaptoetanol, 1.2 mg bromfenol) 10 min la 100°C (într-un raport probă:tampon de 4:1). Drept marker de masă moleculară s-au utilizat 10 μ L See Blue Plus2 Prestained Standard 1x. Migrarea proteinelor s-a realizat cu ajutorul unui sistem de electroforeză la 90 V constant, timp de 2 ore la 25°C în tampon de migrare 1X (Tris 0.05 M, glicină 0.05 M, SDS 0.1%).

După migrarea în gel de poliacrilamidă, proteinele au fost transferate prin transfer umed. Transferul umed s-a realizat pe membrană PVDF (activată în metanol 100%) în prezența tamponului de transfer (Tris 25 mM, glicină 192 mM, metanol 20%), la 350 mA, 95 min, 4°C într-un tanc de transfer de la BIORAD.

După transfer, membrana a fost spălată de 2 ori cu câte 15 mL apă distilată și apoi blocată în 10 mL tampon de blocare (tamponul de blocare, anticorpul secundar, substratul cromogenic și soluția de spălare sunt incluse în kitul Invitrogen Western Breeze, Chromogenic Immunodetection System). Pentru revelarea proteinelor, membrana a fost incubată timp de 1 oră cu anticorp primar anti-nitrotirozină monoclonal obținut în șoarece, furnizat de *Invitrogen* (cod 32-1900), și 30 min cu anticorp secundar anti-mouse IgG cuplat cu fosfatază alcalină. Substratul

cromogenic BCIP (5 brom-4 clor-3 indolil-1 fosfat) / NBT (nitro blue tetrazoliu) a fost menținut timp de 1 oră până la apariția benzilor care ulterior au fost vizualizate și cuantificate cu ajutorul softului ImageLab de la BIORAD.

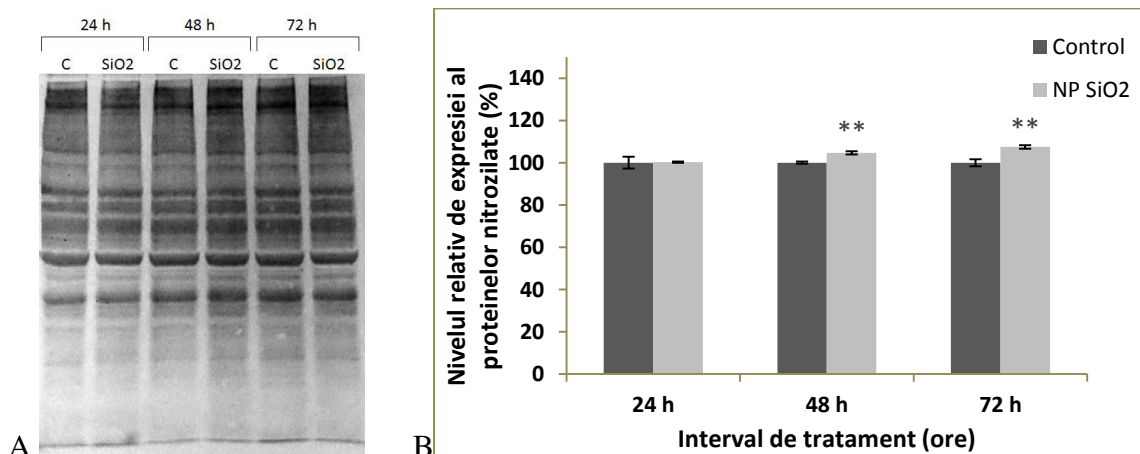


Figura 8. (A) Benzile de proteine pe membrana de blot – detecție cu cromogen; (B) Reprezentarea grafică a nivelului total de proteinelor nitrozilate din celulele MRC-5 expuse la NPs de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, $P < 0.01$ **. Barele verticale reprezintă deviația standard.

Rezultatele obținute au arătat că nivelul de proteine nitrozilate crește semnificativ în celulele MRC-5 după 48 de ore de expunere la NPs de SiO₂ (Figura 8) cu 4% și după 72 de ore cu 7% față de control. Creșterea nivelului de proteine nitrozilate ne indică instalarea proceselor oxidative în celulele pulmonare ca urmare a stresului oxidativ indus de NPs de SiO₂.

Nitrotirozina este considerată un marker al leziunilor celulare, al inflamației precum și al producției de oxid nitric și poate rezulta din diverse căi de reacție. Formarea nitrotirozinei reprezintă o modificare specifică a proteinelor mediată de peroxinitriți. În condiții de stres oxidativ, crește producția de anion superoxid și oxid nitric ce formează peroxinitrit (ONOO^-), un radical liber cu un potențial oxidant foarte ridicat. Producția acestui radical determină oxidarea unor lipoproteine și nitrarea resturilor de tirozină ale proteinelor. Astfel, poate rezulta inactivarea unor enzime cu rol antioxidant precum CAT și SOD.

II.4.1 Evaluarea nivelului de proteine glutationilate prin chemiluminescență

Determinarea nivelului de proteine glutationilate s-a realizat cu ajutorul kit-ului S-Glutathionylated Protein Detection Assay Kit (cod 10010721) de la Cayman Chemical. Acest test presupune mai multe etape. In prima etapa celulele permeabilizate sunt tratate cu un agent de blocare care permite modificarea gruparile tiol libere ale proteinelor. Apoi situsurile proteice S-glutathionilate sunt enzimatic reduse la tioli liberi folosind un agent de reducere. Acestia sunt marcati cu biotinimida tiol-specifica care va lega avidina adaugata ulterior pentru detectie.

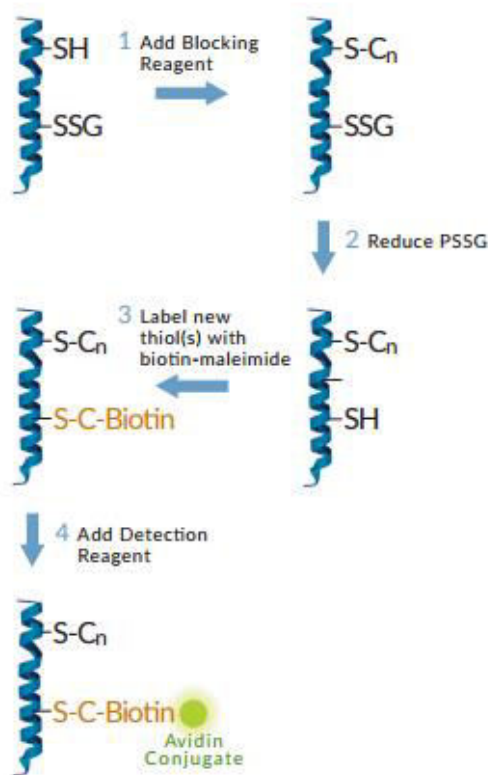


Figura 9. Procesul de marcare al proteinelor S-glutathionilate

Celulele astfel tratate au fost lizate si migrate in gel de poliacrilamida 10% conform protocolului descris anterior la subpunctul II.4.1. Proteinele (30 µg) au fost apoi trasferate in sistem umed pe membrana de PVDF iar situsurile libere de pe aceasta au fost blocate cu o solutie de albumina serica bovina 0.1% preparata in PBS. Membrana a fost incubata apoi cu agentul de detectie cuplat cu horseradish peroxidaza (HRP) iar revelarea s-a realizat cu un substrat specific format din 3,3'-diaminobenzidine (DAB) si peroxid de hidrogen (1:1). Benzile de proteine au fost vizualizate in chemiluminescenta cu ajutorul unui sistem de imagistica Chemidoc de la BIORAD și cuantificate cu ajutorul softului ImageLab de la BIORAD.

In urma tratamentului cu NPs de SiO₂ s-a observat o crestere semnificativa a nivelului de proteine S-glutationilate dependenta de intervalul de tratament (Figura 10). Astfel, dupa 24 de ore de expunere la NPs nivelul proteinelor glutacionilate in celulele MRC-5 a fost cu 80% mai ridicat comparativ cu proba control. Dupa 48 si 72 de ore nivelul a fost aproape dublu (a crescut cu 113%) si respectiv triplu (cu 208%) fata de control.

Aceste proteine pot fi consecinta unor modificari post translationale induse de NPs de SiO₂ iar acumularea lor la nivel celular poate determina modificarea activitatii unui numar insemnat de proteine celulare implicate in metabolism, structura, citoschelet si semnalizare.

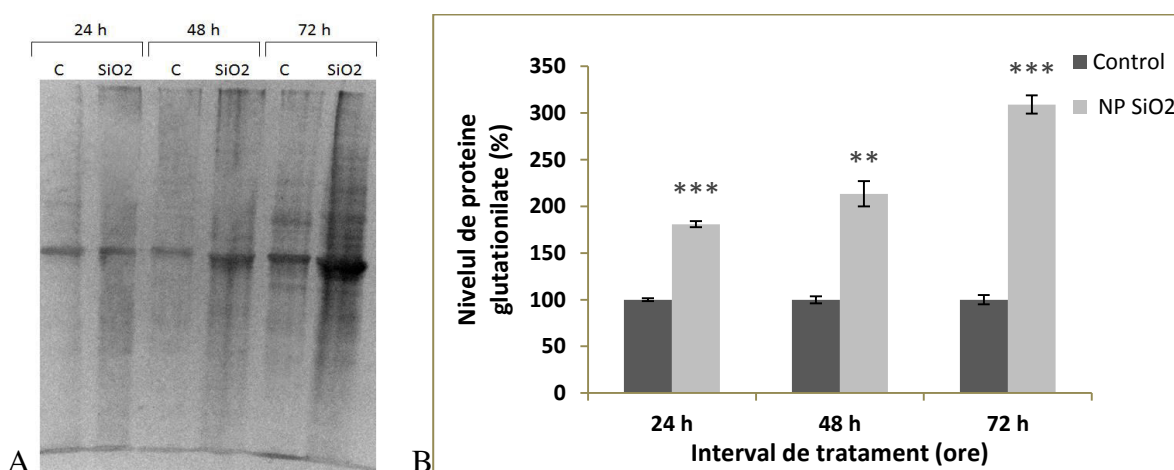


Figura 10. (A) Benzile de proteine pe membrana de blot - detecție prin chemiluminescență; (B) Reprezentarea grafică a nivelului total de proteinelor glutacionilate din celulele MRC-5 expuse la NPs de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, $P < 0.01$ **; $P < 0.001$ ***. Barele verticale reprezintă deviația standard.

II.4.3. Dozarea grupărilor carbonil

Nivelul grupărilor carbonil proteice a fost determinată prin metoda descrisă de Fields și Dixon (1971), care se bazează pe reacția dintre 2,4-dinitrofelihidrazină (DNPH) și grupările carbonil (aldehide și cetone) de la nivelul resturilor de aminoacizi al proteinelor oxidate, cu formarea unei baze Schiff.

La un volum de 500 μ L probă s-a adaugat un volum egal de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM în 2M HCl și s-a incubat 1h, la temperatura camerei. Proteinele din probă au fost precipitate cu TCA 20% pe gheață iar precipitatul obținut în urma centrifugării a fost spălat de 2-

3 ori cu 1 mL etanol- acetat de etil 1:1 pentru îndepărtarea reactivului liber. Proteinele au fost resolubilizate într-un volum corespunzător de NaOH 1M. Absorbanța probelor a fost citită la 370nm (spectrofotometru Jasco V-530) iar nivelul grupărilor carbonil a fost determinat cu ajutorul coeficientului molar de absorbție de $22000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Rezultatele se exprimă în nmoli/mg de proteină.

Introducerea de grupări carbonil în resturile de aminoacizi ale proteinelor, este o caracteristică a modificării oxidative. Grupările carbonil pot rezulta și în urma glicozilărilor enzimatică și neenzimatică ale proteinelor precum și în urma formării de aducți MDA-proteine.

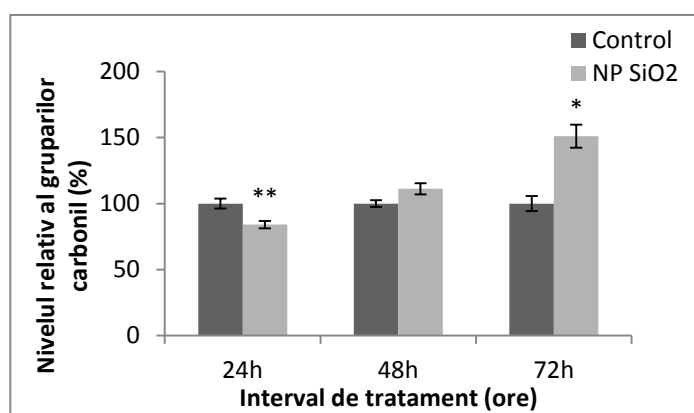


Figura 11. Nivelul grupărilor carbonil proteice în celulele MRC-5 expuse la nanoparticulele de SiO_2 timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificatia statistica obtinuta prin testul Student, astfel: $P < 0.05^*$; $P < 0.01^{**}$; Barele verticale reprezinta deviatia standard.

În urma tratamentului cu nanoparticule de dioxid de siliciu în celulele MRC-5 se observă o mică creștere a carbonililor proteici după 48 ore iar apoi, la 72 ore, o creștere semnificativă cu 50% față de celulele control, care sunt corelate cu generarea de specii reactive de oxigen și creșterea nivelului de MDA (Figura 11).

Activitatea II.5 Testarea potențialului membranei mitocondriale

Pentru testarea potențialului membranei mitocondriale s-a utilizat kitul “Mitochondria Membrane Potential Kit” MAK147 de la Sigma. Acest kit permite evaluarea potențialului membranei mitocondriale din celule cu ajutorul unui colorant cationic hidrofobic care se

acumulează în mitocondrie rezultând un semnal fluorescent (ex 540 nm/ em 590 nm). In celulele apoptotice, colapsul potențialului membranei mitocondriale determină o fluorescența scăzută.

Celulele MRC-5 au fost cultivate la o densitate de 2×10^4 în plăci cu 96 godeuri pentru 24 de ore. După expunerea la NPs de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore, mediul a fost îndepărtat și s-a adăugat 100 μL/godeu Dye Loading Solution din kit. După o incubare de 30 min la 37°C, 5% CO₂ s-au adăugat 50 μL/godeu Assay Buffer B pentru 30 min. Fluorescența a fost citită cu ajutorul unui instrument FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader de la Molecular Devices LLC și soft-ul SoftMax Pro

Mitocondria generează un potențial de-a lungul membranelor sale datorită activității enzimelor din lanțul transportor de electroni. Colapsul potențialului membranei mitocondriale coincide cu permeabilitatea porilor tranzitori mitocondriali ce duce la eliberarea citocromului c în citosol care declanșează cascada apoptotică.

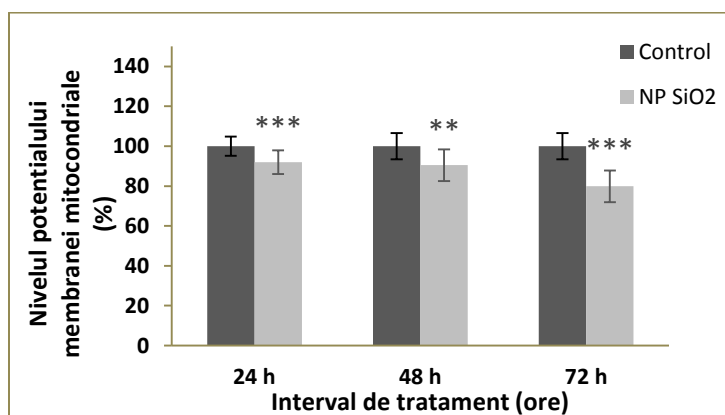


Figura 12. Nivelul potențialului de membrană mitocondrial din celulele MRC-5 expuse la nanoparticule de SiO₂ timp de 24, 48 și 72 de ore. Asterixurile reprezintă semnificatia statistică obținută prin testul Student, astfel: P<0.05*; P<0.01**; Barele verticale reprezintă deviația standard.

Acest test a revelat o scădere a potențialului membranei mitocondriale în celulele MRC-5 dependentă de intervalul de expunere la NPs de SiO₂ (Figura 12). Comparativ cu nivelul înregistrat în celulele netratate, după 24 de ore s-a observat o scădere cu 9%, după 48 de ore cu 10% și după 72 de ore cu 21%.

Activitatea II.6 Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor

Experimentele au fost realizate în triplicat iar pentru fiecare probă (celule tratate cu nanoparticule) s-a utilizat un control (celulele netratate). Rezultatele au fost exprimate în valori relative (%), probele fiind raportate la control (100%). Pentru analizele statistice și reprezentarea grafică a datelor obținute s-a folosit aplicația Excel a programului Microsoft Office 2013. Deviația standard pentru fiecare set de probe a fost calculată cu funcția STDEV iar pentru analiza semnificației statistice s-a utilizat funcția TTEST care se bazează pe testul t-student (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

Activitatea II.7 Diseminarea rezultatelor

În cadrul acestei etape s-au publicat: 1 articol într-un jurnal cu factor de impact 3.257 și 2 rezumate în cadrul unor congrese internaționale.

Articol

S.N. Petrache Voicu , D. Dinu, C.Sima, A. Hermenean, A. Ardelean, E. Codrici, M.S. Stan, O. Zarnescu, A. Dinischiotu , *Silica Nanoparticles Induce Oxidative stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line*, International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16, 29398-29416, IF 3.257.

Rezumate

1. S. N. Voicu, A. Dinischiotu. “*Amorphous silica nanoparticles induced inflammatory and cytotoxic effects in human lung fibroblast cells*”, în FEBS Journal 283 (Suppl.1), ISSN 1742-464X, pag. 129, 3-8 septembrie 2016, Kusadasi, Turcia.
2. A. Dinischiotu, S. N. Voicu. “*Silica nanoparticles exposure induced autophagy in MRC-5 cells*”, ESTIV 2016, In vitro Toxicology for Human Safety Assessment, pag. 123, Palais des Congres, Juan-les-Pins, France, 17-20 Oct, 2016

Concluzii

Expunerea fibroblastelor pulmonare umane MRC-5 la nanoparticule de SiO₂ în doza de 62,5 μg/ml a condus la instalarea unui stress oxidativ a cărui intensitate a crescut proportional cu timpul de expunere până la 72 h. Astfel, nivelul de ROS a fost cu 40% mai ridicat după 72 h

comparativ cu martorul, ceea ce a dus la o scadere a potentialului membranelor mitocondriale cu 21% si a nivelului de ATP cu 30%. Desi sistemul enzimatic de aparare antioxidanta a reactionat, anihilarea ROS nu a fost foarte eficienta, ceea ce a dus la necesitatea interventiei GSH impotriva radicalilor liberi ai oxigenului si azotului. Datorita acestui fapt, nivelul de proteine nitrozilate a crescut usor dupa 48 si 72 h, cel de proteine glutationilate a crescut din primele 24 h, atingand un maxim de 300% dupa 72 h, iar carbonilii proteici au crescut semnificativ numai dupa 72 h. Nivelul de malondialdehida a fost relativ constant datorita activitatii GST si GPX.

In concluzie, celulele MRC-5 au contracarat doar partial stresul oxidativ indus de expunerea la nanoparticule de SiO₂.

Bibliografie:

- Del Rio D., Pellegrini N., Colombi B., Bianchi M., Serafini M., Torta F., Tegoni M., Musci M., Brighenti F., *Rapid fluorimetric method to detect total plasma malondialdehyde with mild derivatization conditions*, Clin. Chem., **49**, 690–692, 2003.
- Fields R, Dixon HBF, *Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides uses 2, 4-dinitrophenylhydrazine*, Biochem J **121**, 587–589, 1971.
- Aebi H., Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol.3., Bergmeyer, H.U., Ed., Academic Press Inc., New York, NY, USA, 673–677, 1974.
- Beutler E., *Glutathione Peroxidase in Red Cell Metabolism*, A Manual of Biochemical Methods, Grune and Stratton, Orlando, 74 – 76, 1984.
- Goldberg D.M. and Spooner R.J. *Glutathione Reductase*. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H.U., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, **111**, 258–265, 1983.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, J. Biol. Chem., **249**, 7130–7139. 1974.
- Paoletti F.; Mocali A., *Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NADP(H) oxidation*. Methods Enzymol., **186**, 209–221, 1990.
- Picket C.B, Lu A.Y.H., *Ann Rev Biochem*, **58**, 743-764, (1989)
- Goldberg D.M., Spooner R.J. (1983), *Glutathione Reductase in Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer H. U. (Ed.) Chemie, 3rd edn, vol. 3, Verlag Chemie, Dearfield Beach, 258 – 265.

Scurt raport al deplasarilor in strainatate privind activitatea de diseminare si/formare profesionala

In anul 2016 au fost efectuate doua deplasari:

- In perioada 13-16 ianuarie, d-na prof. Anca Dinischiotu (OR 551/22.12.2015), s-a deplasat la Berlin/Germania pentru participare la “Kick-off Meeting” al proiectului, unde timp de 2 zile s-au stabilit exact tipurile de nanoparticule ce vor fi studiate, tipurile de celule si de analize in vitro si in vivo.
- In perioada 16-21 octombrie, d-na prof. Anca Dinischiotu (OR 488/29.06.2016), s-a deplasat la Juan les Pins/Franta pentru participare la Congresul ESTIV 2016, unde a fost prezentat posterul “Silica nanoparticles exposure induced autophagy in MRC-5 cells”
- In perioada 2-8 septembrie, dna Dr. Sorina Voicu trebuia sa se deplaseze in Turcia/ Kusadasi, pentru a participa la Congresul FEBS 2016. Datorita evenimentele din Turcia manifestarea FEBS a fost anulata, dar volumul de rezumate a fost publicat. Titlul lucrarii: “Amorphous silica nanoparticles induced inflammatory and cytotoxic effects in human lung fibroblast cells”, în FEBS Journal 283 (Suppl.1), ISSN 1742-464X, pag. 129, 3-8 septembrie 2016, Kusadasi, Turcia.