

# **RAPORT ȘTIINȚIFIC ETAPA I 2015**

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

## CUPRINS

Rezumat	Pag.1
Introducere	Pag.2
Activitatea I.1 Evaluarea viabilității celulare	Pag.4
I.1.1 Obținerea nanoparticulelor	Pag.4
I.1.2 Linia celulară MRC-5 și tratamentul acestora cu nanoparticule de SiO <sub>2</sub>	Pag.4
I.1.3 Evaluarea viabilitatii celulare prin testul MTT	Pag.4
I.1.4 Evaluarea citotoxicitatii prin testul LDH	Pag.5
Activitatea I.2 Determinarea nivelului de ROS și NO din celule	Pag.7
I.2.1Evaluarea capacității de generare a speciilor reactive de oxigen (ROS) la nivelul liniei celulare MRC-5	Pag.7
I.2.2Determinarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda colorimetrică Griess	Pag.8
Activitatea I.3 Analiza expresiei Nrf2	Pag.10
I.3.1 Obținerea lizatului celular	Pag.10
I.3.2 Determinarea concentrației proteice	Pag.10
I.3.3 Analiza expresiei proteinei Nrf2 la nivelul celulelor MRC-5 prin tehnica Western Blot	Pag.10
Activitatea I.4 Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor	Pag.12
Concluzii	Pag.13
Referinte bibliografice	Pag.14

**Obiectiv: Evaluarea citotoxicității nanomaterialelor fabricate asupra celulelor pulmonare**

**Activități:**

**Activitatea I.1 Evaluarea viabilității celulare**

**Activitatea I.2 Determinarea nivelului de ROS și NO din celule**

**Activitatea I.3 Analiza expresiei Nrf2**

**Activitatea I.4 Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor**

## REZUMAT ETAPA I 2015

Nanomaterialele pe bază de siliciu sunt din ce în ce mai mult utilizate în industria alimentară, cosmetică, dar și în diagnostic, imagistică și transport țintit al unor agenți terapeutici. De asemenea, în ultimul deceniu au fost dezvoltate numeroase tipuri de nanoparticule de siliciu dopate cu molecule fluorescente și funcționalizate la suprafață cu diverse grupări moleculare, destinate utilizării în detecție, imagistică și teragnostic. Până de curând, se considera că nanoparticulele de siliciu amorf sunt biocompatibile și că ele prezintă un grad de citotoxicitate nesemnificativ. În acest context, cercetările ce fac subiectul acestei studii au urmărit evaluarea citotoxicității nanoparticulelor de dioxid de siliciu, generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), producția de oxid nitric (NO) cât și expresia proteinei Nrf2 asupra celulelor pulmonare umane MRC-5 la intervale de 24, 48 și 72 de ore. Nanoparticulele de  $\text{SiO}_2$  (NP de  $\text{SiO}_2$ ) utilizate în acest studiu au fost obținute în cadrul Institutului Național de Fizica Laserilor, Plasmei și Radiațiilor, București-Măgurele, România. În vederea evaluării efectului citotoxic al NPs de  $\text{SiO}_2$  la nivelul fibroblastelor pulmonare umane, celulele au fost tratate timp de 24, 48 respectiv 72 de ore cu diferite concentrații de nanoparticule (25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , 75  $\mu\text{g/mL}$  și 100  $\mu\text{g/mL}$ ) pentru testul MTT, iar pentru testele LDH, ROS, NO și determinarea expresiei proteice Nrf2 s-a utilizat concentrația de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultatele obținute în urma tratamentului cu NP de  $\text{SiO}_2$  asupra liniei celulare MRC-5 au arătat că viabilitatea celulară scade în mod dependent de concentrație, dar și de timpul de expunere, în timp ce generarea speciilor reactive de oxigen (ROS) a avut loc după intervalul de 48 și 72 de ore. Nivelul expresiei proteinei Nrf2 cât și producția de oxid nitric a crescut semnificativ începând cu intervalul de 24 de ore, menținându-se ridicat și la celelalte intervale comparativ cu controlul. În concluzie se poate afirma că nanoparticulele de  $\text{SiO}_2$  pot induce efecte toxice la nivelul liniei celulare MRC-5, în special la concentrații mari.

## Introducere:

Nanomaterialele pe bază de siliciu sunt din ce în ce mai mult utilizate în industria alimentară, cosmetică, dar și în diagnostic, imagistică și transport țintit al unor agenți terapeutici. De asemenea, în ultimul deceniu au fost dezvoltate numeroase tipuri de nanoparticule de siliciu dopate cu molecule fluorescente și funcționalizate la suprafață cu diverse grupări moleculare, destinate utilizării în detecție, imagistică și teragnostic. Până de curând, se considera că nanoparticulele de siliciu amorf sunt biocompatibile și că ele prezintă un grad de citotoxicitate nesemnificativ. Totuși, percepția oamenilor de știință s-a schimbat în decursul ultimilor ani, existând date în literatura de specialitate care susțin ideea conform căreia siliciul amorf poate induce efecte citotoxice (Wang et al, 2009. Ye et al, 2010.; Lu et al., 2011). Dezvoltarea intensă a utilizării comerciale a nanomaterialelor necesită o mai bună înțelegere a posibilelor efecte și mecanisme, ale interacțiilor pe care nanoparticulele le pot avea cu sistemele biologice. Referitor la citotoxicitatea nanoparticulelor, numeroase studii au încercat găsirea unei conexiuni între toxicitatea acestora și dimensiuni. Totuși, deoarece toxicitatea depinde de multe alte proprietăți fizico-chimice: distribuția nanoparticulelor, forma, compoziția chimică, aria suprafeței, încărcarea electrică, natura învelișului, nu există o corelație clară între toxicitate și dimensiuni (Oberdörster et al., 2005). O serie de grupuri de cercetare (Waters et al., 2009; He et al., 2009; Yang et al., 2010) susțin ideea că toxicitatea este dependentă de dimensiuni, ipoteza lor fiind că nanoparticulele cu dimensiuni mai mici generează o toxicitate mai mare datorită ariei de suprafață mai mari. Totuși, rezultatele obținute de ei indică un nivel de citotoxicitate asemănător indus de nanoparticule de SiO<sub>2</sub> de 15 nm și 46 nm, explicația fiind că ambele tipuri de nanoparticule au agregat în mediul de cultură, formând particule de dimensiuni asemănătoare (590 și 617 nm). În contrast, expunerea liniei celulare BRL 3A la nanoparticule de Ag a evidențiat o toxicitate mai mare indusă de nanoparticulele de 100 nm în comparație cu cele de 15 nm (Hussain et al., 2005). În concluzie, fiecare tip de nanoparticule posedă proprietăți fizico-chimice unice care însumate determină potențialul lor de toxicitate. Date din literatura confirmă faptul că nanoparticule de SiO<sub>2</sub> au efecte citotoxice la nivelul liniilor celulare HaCat (Yang și colab., 2010), celulelor miocardice (Ye și colab., 2010), renale embrionare umane (Wang et al., 2009), endoteliale (Napierska et al., 2009), hepatice HepG2 (Lu și colab., 2011), macrofage (Waters et al., 2009) și celulele canceroase pulmonare (Lin și colab., 2006). Speciile reactive de oxigen (ROS) pot fi generate din surse exogene (expunerea la radiații UV și  $\gamma$ , toxine, poluanți,

medicamente) și endogene, una din principalele surse de ROS endogene fiind mitocondria, unde se formează radicalul superoxid ca rezultat al procesului de fosforilare oxidativă. În plus, anionul superoxid poate reacționa cu oxidul nitric ( $\text{NO}\bullet$ ), generând specii reactive de azot (RNS), cum ar fi peroxinitritul ( $\text{ONOO}^-$ ), dioxidul de azot ( $\text{NO}_2$ ) sau  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Deavall et al., 2012). Astfel, a fost introdus termenul de „stres nitrozativ” în analogie cu stresul oxidativ, pentru a defini formarea excesivă de  $\text{NO}\bullet$  sau RNS (Klatt & Lamas, 2000). Stresul oxidativ induce leziuni la nivelul proteinelor, lipidelor și ADN, iar aceste leziuni sunt implicate în inițierea și dezvoltarea a numeroase boli, inclusiv boli cardiovasculare, boli neurodegenerative și cancer, precum și în procesul fiziologic de îmbătrânire. Mizuno et al. (2011) au observat că protecția împotriva ROS asigurată de unii izotiocianați naturali are la bază creșterea nivelului intracelular de glutatation care rezultă din creșterea ratei de transcripție a genei pentru GCS (glutamylcisteine syntethase) indusă de activarea unei căi de semnalizare bazată pe factorul nuclear Nrf-2 care se leagă la secvența reglatoare ARE (antioxidant-response element).

În acest context, cercetările ce fac subiectul acestui studiu au urmărit evaluarea citotoxicității nanoparticulelor de dioxid de siliciu, generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), producția de oxid nitric cât și expresia proteinei Nrf2 asupra celulelor pulmonare umane MRC-5 la intervale de 24, 48 și 72 de ore.

## **Activitatea I.1 Evaluarea viabilității celulare**

### **I.1.1 Obținerea nanoparticulelor**

Nanoparticulele de SiO<sub>2</sub> utilizate în acest studiu au fost obținute în cadrul Institutului Național de Fizica Laserilor, Plasmei și Radiațiilor, București-Măgurele, România. Nanoparticulele de SiO<sub>2</sub> au prezentat o distribuție log-normală, cu dimensiuni de până la 14 nm cu maxime între 5 și 8 nm.

### **I.1.2 Linia celulară MRC-5 și tratamentul acestora cu nanoparticule de SiO<sub>2</sub>**

În cadrul acestui studiu a fost utilizată linia celulară de fibroblaste pulmonare umane MRC-5 (American Type Cell Culture, ATCC; cod CCL-171), obținută din țesut pulmonar normal de la un fătus de 14 săptămâni. Celulele au capacitatea de a-și dubla populația timp de 42 până la 46 de splituri, înainte de a îmbătrâni (Jacob JP., 1970). Linia celulară a fost menținută la 37°C în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub> și cultivată în mediul de cultură Minimum Essential Medium (MEM) cu 10% ser fetal bovin. În vederea evaluării efectului citotoxic al NPs de SiO<sub>2</sub> la nivelul fibroblastelor pulmonare umane, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de nanoparticule (25 μg/mL, 50 μg/mL, 62.5 μg/mL, 75 μg/mL și 100 μg/mL) pentru testul MTT, iar pentru testele LDH, ROS, NO și determinarea expresiei proteice Nrf2 s-a utilizat concentrația de 62.5 μg/mL. După 24, 48, și 72 ore de incubare cu nanoparticule, mediul a fost îndepărtat, celulele au fost spălate cu tampon fosfat salin (PBS) și prelucrate corespunzător pentru fiecare test evaluat în cadrul acestui studiu.

### **I.1.3 Evaluarea viabilității celulare prin testul MTT**

Determinarea viabilității celulare a fost realizată cu ajutorul testului colorimetric MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) (Mossman, 1983). Această metodă constă în reducerea compusului MTT de culoare galbenă, la cristale de formazan violet, de către enzimele (succinat dehidrogenaze mitocondriale – NAD(P)H dependente) celulelor active metabolic. Formazanul este apoi solubilizat cu izopropanol 100%, iar concentrația este determinată spectrofotometric la lungimea de undă 595 nm. Mediul de cultură a fost îndepărtat din fiecare godeu și s-a adăugat câte 1 ml de MTT 1 mg/ml. După 2 ore de incubare la 37°C în incubator s-a înlăturat soluția de MTT și cristalele de formazan au fost solubilizate cu 0.5 mL de

izopropanol per godeu. Absorbanța a fost citită la 595 nm la un spectrofotometru cititor de plăci Tecan GENios (Austria).

În vederea evaluării citotoxicității nanoparticulelor de SiO<sub>2</sub> la nivelul fibroblastelor pulmonare MRC-5, celulele au fost tratate timp de 24, 48 respectiv 72 de ore cu diferite concentrații de nanoparticule. Testul de citotoxicitate MTT a indicat un efect de reducere a viabilității celulare a fibroblastelor pulmonare apărut în urma tratamentului cu nanoparticule de SiO<sub>2</sub> cu aproximativ 20 % fata de control dupa intervalul de 24 de ore (Figura 1). De asemenea, cea mai mare scădere a viabilității celulare are loc după 72 de ore de expunere cu aproximativ 65% comparativ cu controlul (celule netratate) la concentrațiile de 75 și 100 μg/mL NP de SiO<sub>2</sub>. S-a constatat că efectele sunt dependente de concentrația de nanoparticule utilizată cât și de intervalul de expunere al celulelor. Având în vedere această constatare, în experimentele ulterioare s-a folosit numai concentrația de 62.5 μg/mL NP de SiO<sub>2</sub>.

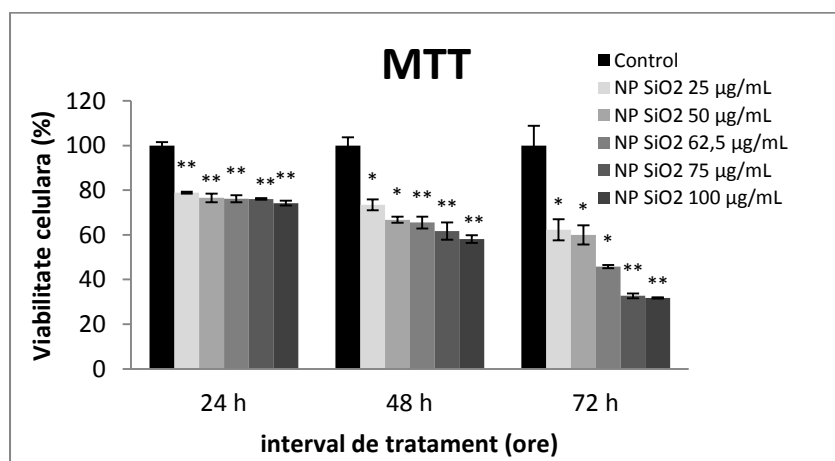


Figura 1. Viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare MRC-5 în urma tratamentului cu 25 μg/mL, 50 μg/mL, 62.5 μg/mL, 75 μg/mL și 100 μg/mL NP de SiO<sub>2</sub> după 24, 48 și 72 de ore. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: p < 0.05 \* (semnificativ); p < 0.01 \*\* (distinct semnificativ); p < 0.001 \*\*\* (foarte semnificativ).

#### I.1.4. Evaluarea citotoxicității prin testul LDH

Testul LDH (lactat dehidrogenaza) este o metodă bazată pe testarea integrității membranei celulare prin determinarea cantității de LDH eliberat în mediu. Metoda este simplă și des utilizată pentru acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor obținute. Distrugerea membranei



celulare duce la eliberarea în mediul de cultură a LDH ce poate fi cuantificat prin următoarele reacții cuplate în care această enzimă catalizează conversia lactat în piruvat prin reducerea NAD<sup>+</sup> la NADH, care este la rândul lui folosit pentru reducerea INT (clorură de 2-(4-iodophenil)-3-(4-nitrophenil)-5-fenil-2H-tetrazoliu), o sare de tetrazoliu, la un formazan de culoare roșie, care poate fi măsurat spectrofotometric la lungimea de undă de 450 nm.

Determinarea citotoxicității pe baza activității LDH s-a realizat conform kitului In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based de la Sigma-Aldrich, și a presupus preluarea unui volum de 50 μl din mediu de cultură la sfârșitul perioadei de tratament. Peste acest volum s-au adăugat 100 μl dintr-un mix de reacție ce conține părți egale din soluțiile: substrat, cofactor și colorant. S-a incubat timp de 30 minute la temperatura camerei, la întuneric, după care pentru a stopa reacția s-a adăugat un volum de 15 μl HCl 1N (1/10 din volum). Citirea absorbanței s-a făcut la un Multireader Thermo Scientific Appliskan la 450 nm.

Lactat dehidrogenaza (LDH) este unul dintre cei mai utilizați markeri pentru studiul citotoxicității. Ea este o enzimă stabilă, prezentă în citosol, în toate tipurile de celule și care poate fi rapid eliberată în mediul de cultură în urma degradării membranei celulare. Activitatea LDH în mediul de cultură este utilizată ca indicator al integrității membrane celulare și astfel a evaluării citotoxicității. Eliberarea LDH în mediu reprezintă de asemenea un marker al necrozei celulelor. În urma testului de citotoxicitate LDH, s-a constatat o creștere proporțională dependentă de concentrație și intervalul de tratament a activității lactat dehidrogenazei din mediul de cultură. Figura 2 arată că după 48 și 72 de ore de la expunere, nivelul LDH eliberat este mai crescut în comparație cu controlul.

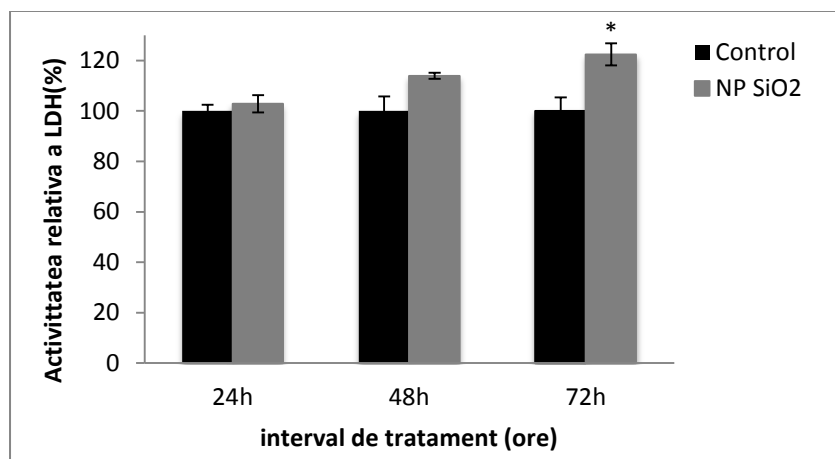


Figura 2. Activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) la nivelul liniei celulare MRC-5 în urma tratamentului cu 62.5 µg/mL NP de SiO<sub>2</sub> după intervale de 24, 48 și 72 de ore. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: p < 0.05 \* (semnificativ); p < 0.01 \*\* (distinct semnificativ); p < 0.001 \*\*\* (foarte semnificativ).

## Activitatea I.2 Determinarea nivelului de ROS și NO din celule

### I.2.1 Evaluarea capacității de generare a speciilor reactive de oxigen (ROS) la nivelul liniei celulare MRC-5

Detecția speciilor reactive de oxigen intracelulare a fost evaluată cu compusul fluorescent 5,6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetat (carboxy-DCFDA) conform instrucțiunilor furnizate de producător (Invitrogen-Molecular Probes). Compusul carboxy-DCFDA este hidrolizat de către esterazele celulare la carboxy-DCFH, iar acesta în prezența ROS nespecifice produse în celulă este oxidat la DCF emițând o fluorescență verde intensă (Figura 3). Celulele MRC-5 au fost cultivate în placi petri și incubate în condiții de creștere timp de 24, 48 și 72 de ore cu 62.5 µg/mL nanoparticule de SiO<sub>2</sub>. După tratamentul cu nanoparticulele de SiO<sub>2</sub> al celulelor, mediul de cultură s-a aspirat și s-au adăugat 1,5 mL soluție de carboxy-DCFDA 25µM în tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Celulele au fost incubate 45 minute la 37<sup>0</sup>C, apoi s-a realizat două spalări cu tampon HBSS. Intensitatea fluorescenței a fost citită la 488 nm excitație și 515 nm emisie la un aparat de tip Jasco Spectrofluorimeter FP-750 cu software Spectra Manager. Valorile obținute au fost raportate la numărul total de celule.

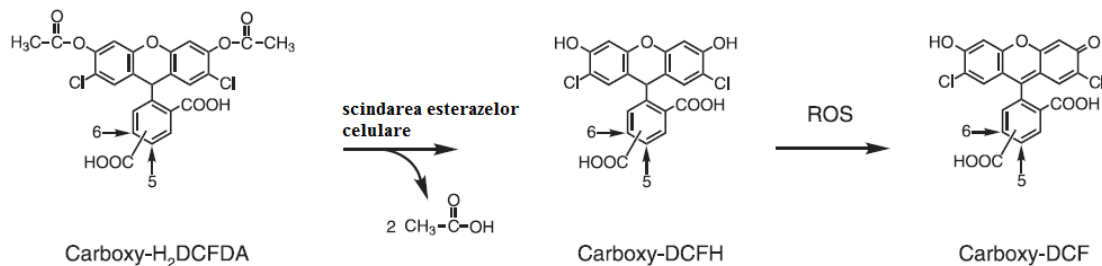


Figura 3. Formarea compusului fluorescent carboxi-DCF în urma hidrolizării esterazelor celulare și în prezența ROS.

În urma tratamentului cu NP de SiO<sub>2</sub> se produc specii reactive de oxigen, generarea cea mai mare de specii reactive de oxigen având loc la intervalul de 48 și 72 de ore cu 15 %, respectiv 20 % față de control.

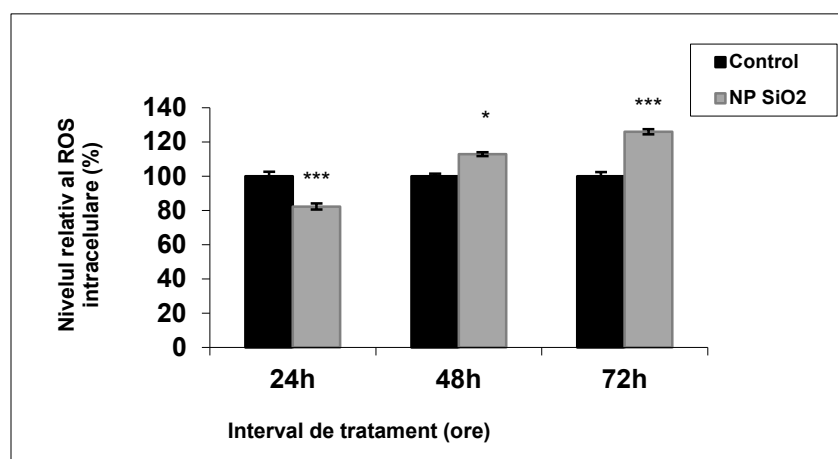


Figura 4. Nivelul ROS în celulele MRC-5 la nivelul liniei celulare MRC-5 în urma tratamentului cu 62.5 μg/mL NP de SiO<sub>2</sub> după 24, 48 și 72 de ore. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: p < 0.05 \* (semnificativ); p < 0.01 \*\* (distinct semnificativ); p < 0.001 \*\*\* (foarte semnificativ).

### I.2.2 Determinarea producției de oxid nitric (NO) prin metoda colorimetrică Griess

Metoda colorimetrică Griess este o metodă cantitativă de determinare a concentrației de oxid nitric din probă, pe baza determinării densității optice a produșilor colorimetrici obținuți (Griess, 1879). Astfel, într-o primă etapă, nitritul este tratat în mediu acid cu un agent de

diazotare S (sulfanilamida), formându-se o sare de diazoniu instabilă. Această sare de diazoniu instabilă, în prezență de naftil-etilen-diamină (NED), formează un compus colorat. Producția de oxid nitric este apreciată indirect, prin cuantificarea nitritului din probă (dat fiind faptul că oxidul nitric se transformă spontan atât în nitrit, cât și în nitrat, care, la rândul lui, se transformă în nitrit). Pentru a determina producția de oxid nitric din probe prin această metodă, celulele au fost însămânțate la o densitate de  $5 \times 10^5$  celule/godeu/1 ml mediu de cultură MEM + 10% ser fetal și tratate cu 62.5  $\mu\text{g/mL}$  nanoparticule de  $\text{SiO}_2$ . După incubarea celulelor cu nanoparticule timp de 24, 48 și 72 de ore, mediul de cultură a fost preluat pentru a fi ulterior folosit. Peste 80  $\mu\text{l}$  mediul de cultură se adaugă în fiecare godeu câte 80  $\mu\text{l}$  dintr-un amestec de soluție de sulfanilamidă și naftil-etilen-diamină, în raport de 1:1. În cele din urmă se citește densitatea optică la 550 nm la Multireader Thermo Scientific Appliskan, iar valorile obținute se reprezintă grafic.

În urma tratamentului cu nanoparticule de  $\text{SiO}_2$ , nivelul de oxid nitric crește semnificativ începând cu intervalul de 24 de ore cu aproximativ 60% față de control, comparativ cu celelalte intervale unde nivelul NO începe să revină la nivelul controlului.

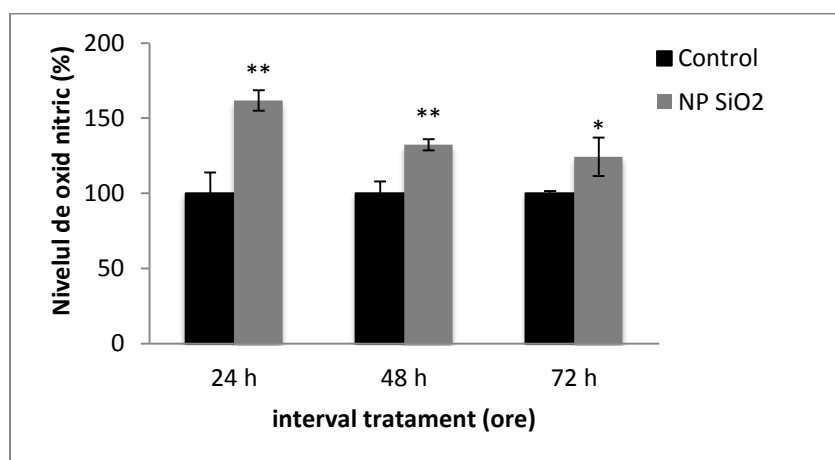


Figura 5. Producția de NO la nivelul liniei celulare MRC-5 în urma tratamentului cu 62.5  $\mu\text{g/mL}$  NP de  $\text{SiO}_2$  după 24, 48 și 72 de ore. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel:  $p < 0.05$  \* (semnificativ);  $p < 0.01$  \*\* (distinct semnificativ);  $p < 0.001$  \*\*\* (foarte semnificativ).

## **Activitatea I.3 Analiza expresiei proteinei Nrf2**

### **I.3.1 Obținerea lizatului celular**

Pentru obținerea lizatului celular, mai întâi se detașează celulele cu ajutorul tripsinei și se centrifughează la 1500 rpm/ 5 minute/ 18°C, pentru a putea prelua celulele. După ce supernatantul este aruncat, peletul celular este spălat cu 2 mL PBS steril, și apoi se centrifughează din nou la aceleași parametrii indicați mai sus. Se aruncă supernatantul obținut, iar peletul celular este resuspendat în 200  $\mu$ L PBS. Spargerea membranelor celulare și obținerea extractului proteic se realizează în urma procesului de sonicare: 3 x 30 secunde pe gheață. Urmează o centrifugare la 5000 rpm/ 10 minute/ 4°C pentru a înlătura debriurile celulare. Supernatantul obținut este alicotat și folosit pentru determinările biochimice.

### **I.3.2 Determinarea concentrației proteice**

Metoda folosită pentru determinarea concentrației proteice din lizatele celulare a fost metoda descrisă de Bradford în anul 1976. Principiul acestei metode se bazează pe proprietatea colorantului Coomassie Brilliant Blue G-250 din componența reactivului Bradford de a-și schimba spectrul de absorbție maxim de la 465 nm la 595 nm atunci când se leagă de proteină (Bradford, 1976). Se utilizează ca standard o soluție de albumină serică bovină (BSA) de concentrație 3 mg/mL, din care se realizează diluții cu concentrații cunoscute 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1 și 1,5 mg/mL BSA. Extractele proteice totale sunt diluate corespunzător în PBS (1/40) și câte 5  $\mu$ L din fiecare diluție sunt adăugate peste 250  $\mu$ L reactiv Bradford. În urma citirii densității fiecărui punct din curba etalon și a probelor la multireader-ul GeNios TECAN se obține un grafic în care se prezintă concentrația proteică în funcție de densitatea optică aferentă probelor de BSA. Pe această curbă etalon obținută se realizează o extrapolare pentru valorile densităților optice ale probelor obținute din lizatele celulare, determinându-se astfel concentrațiile lor proteice.

### **I.3.3 Analiza expresiei proteinei Nrf2 la nivelul celulelor MRC-5 prin tehnica Western Blot**

Western blot este o tehnică bazată pe principiul reacției antigen-anticorp, folosită pentru detectarea proteinelor specifice dintr-un extract proteic total sau lizat celular. Metoda de laborator folosește electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE) pentru separarea proteinelor în funcție de masa lor moleculară. Mai întâi au fost turnate gelurile,

iar apoi în fiecare godeu s-a încărcat cu o seringă Hamilton aceeași cantitate de proteină de 30 μg pentru toate probele în același volum de 25 μl. Unul din godeuri a fost păstrat pentru markerul de masă moleculară SeeBlue Pre-Stained Standard (Invitrogen) format dintr-un amestec de 10 proteine cu mase moleculare cuprinse între 3 și 188 kDa. Migrarea proteinelor s-a realizat în sistem discontinuu pe un gel de concentrare de poliacrilamidă 4.5% și un gel de migrare de poliacrilamidă 10%, în condiții denaturante (SDS-PAGE). Peste geluri, în tancul de transfer s-a turnat un tampon de electroforeză (Tris 0,05 M, glicină 0,05 M, SDS 0,1%) cât să acopere bine godeurile gelurilor, migrarea realizându-se la 90 V constant. După ce a avut loc migrarea proteinelor, gelurile au fost scoase cu grijă dintre geamuri și puse în tampon de transfer (Tris 25 mM, glicină 192 mM, 20% (v/v) metanol) pentru 15 minute împreună cu restul componentelor ce vor alcătui sandwich-ul de transfer. Înainte de această etapă, membranele de difluorură de poliviniliden (PVDF) au fost activate în metanol timp de 15 secunde pe fiecare față și apoi lăsate cele 15 minute în tamponul de transfer. Transferul proteinelor din gelul de migrare pe membrană s-a făcut în sistem umed la un amperaj constant de 350 mA/ la o temperatură de 4°C/ timp de 90 minute, într-un tanc de transfer la care s-a adăugat tamponul de transfer cât să acopere sandwich-ul care s-a realizat în următoarea ordine: burete, hartie de filtru, membrană, gel, hartie de filtru, burete. Etapa de revelare a proteinelor s-a realizat cu ajutorul kitului WesternBreeze Chromogenic Kit de la Invitrogen. Membranele pe care au fost transferate proteinele au fost plasate în 10 ml tampon de blocare un timp de 1 h, timp necesar pentru blocarea situsurilor potențial active ale proteinelor pe membrană. După aruncarea tamponului de blocare s-a adăugat anticorpul primar Nrf-2 rabbit (Santa-Cruz, diluție 250x), care a fost lăsat peste noapte pe un omogenizator. A doua zi s-au făcut două spălări cu tampon de spălare câte 5 minute fiecare, după care s-a adăugat anticorpul secundar. După 1 h membranele au fost spălate cu apă distilată, de 2 ori câte 5 minute. Pentru revelarea proteinelor pe membrană s-au adăugat 5 ml substrat cromogenic (NBT/BCIP) și au fost lăsate pe omogenizator până la apariția benzilor la o rezoluție optimă, după care s-a aruncat cromogenul și s-au făcut spălări cu apă distilată pentru a elimina orice resturi de anticorp sau cromogen rămase pe sau în jurul membranei. Membranele au fost vizualizate și cuantificate cu programul Image Lab.

Nrf2 este un factor de transcripție leucin-zipper (bZIP) de bază, care acționează ca un inițiator de reglare a răspunsului celular, la leziunile antioxidante. Pentru a se asigura că răspunsul antioxidant este reglat în mod corespunzător, conform homeostaziei redox, Nrf2 este reținut în

citoplasmă prin legarea domeniului său Neh2 N-terminal la Kelch și ECH ale proteinelor asociate (KEAP1). În cazul proteinei Nrf2 (Figura 6) în urma tratamentului cu NP de SiO<sub>2</sub>, expresia proteică crește semnificativ (140%) începând cu intervalul de 24h, nivelul crescut menținându-se și la intervalele de 48 și 72 de ore comparativ cu controlul.

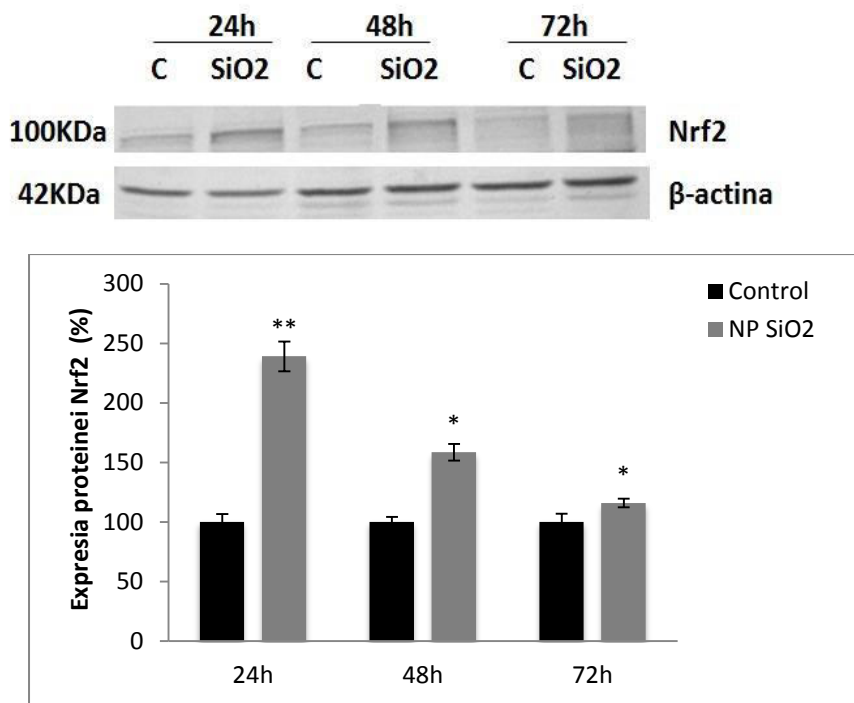


Figura 6. Profilul Western blot și reprezentarea grafică pentru proteina Nrf2 obținută în urma tratamentului celulelor MRC-5 cu nanoparticulele de SiO<sub>2</sub>. Barele verticale reprezintă deviația standard. Asterixurile reprezintă semnificația statistică obținută prin testul Student, astfel: p < 0.05 \* (semnificativ); p < 0.01 \*\* (distinct semnificativ); p < 0.001 \*\*\* (foarte semnificativ).

#### Activitatea I.4 Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor

Experimentele au fost realizate în triplicat, fiecare probă (celule tratate cu nanoparticule de SiO<sub>2</sub>) fiind raportată la un control (celule netratate). Pentru realizarea analizelor statistice și reprezentarea grafică a datelor obținute s-a folosit programul Microsoft Office 2007, extensia Excel. Cu ajutorul funcției STDEV s-a calculat deviația standard pentru fiecare set de probe, iar pentru analiza semnificației statistice s-a folosit funcția TTEST, bazată pe testul t-student (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001).

## CONCLUZII

În urma rezultatelor obtinute se pot evidenția următoarele concluzii:

- Nanoparticulele pe bază de siliciu determină scăderea viabilității celulare, într-o maniera dependenta de concentrație și de timpul de expunere.
- Creșterea activității lactat dehidrogenazei este dependentă de timp și de concentrația de nanoparticule.
- Generarea speciilor reactive de oxigen (ROS) a fost înregistrată după intervalul de 48 și 72 de ore.
- Nivelul producției de oxid nitric a crescut semnificativ incepand cu intervalul de 24 de ore, urmat de o revenire aproape de nivelul controlului la intervalul de 48 și 72 de ore.
- Nivelul expresiei proteinei Nrf2 atinge un maxim la intervalul de 24 de ore, mentinandu-se crescut și la intervalele de 48 și 72 de ore comparativ cu controlul.
- In concluzie se poate afirma ca nanoparticulele de SiO<sub>2</sub> pot induce efecte toxice la nivelul liniei celulare MRC-5, in special la concentratii mari.



## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE:

1. He, Q., Zhang, Z., Gao, Y., Shi, J., Li, Y., 2009. Intracellular localization and cytotoxicity of spherical mesoporous silica nano- and microparticles small 5,2722–2729
2. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 19:975-983
3. Lu, X., Qian, J., Zhou, H., Gan, Q., Tang, W., Lu, J., Yuan, Y., Liu, C., 2011. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. *Int. J. Nanomed.* 6, 1889–1901.
4. Napierska, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J.A., Hoet, P.H., 2009. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cell. *Small* 5,846–853.
5. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, *et al.* 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*, 2:8.
6. Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y., Liu, J., 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol. In Vitro* 23, 808–815.
7. Waters, K.M., Masiello, L.M., Zangar, R.C., Tarasevich, B.J., Karin, N.J., Quesenberry, R.D., Bandyopadhyay, S., Teeguarden, J.G., Pounds, J.G., Thrall, B.D., 2009. Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. *Toxicol. Sci.* 107, 553–569.
8. Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X., Yang, L., Yuan, J., Huang, H., He, L., Zhang, B., Zhuang, Z., 2010. SiO<sub>2</sub> nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *J. Appl. Toxicol. Part. Fibre Toxicol.* 7, 1.
9. Ye, Y., Liu, J., Chen, M., Sun, L., Lan, M., 2010. In vitro toxicity of silica nanoparticles in myocardial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 131–137.
10. Yu, T., Malugin, A., Ghandehari, H., 2011. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano* 5, 5717–5728.
11. Mossman BT. 1983. In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ Health Perspect*, 53:155-161.
12. Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt “Ueber einige azoverbindungen.” *Chem. Ber.* 12, 426–8.
13. Jacobs, Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 277:168 (1970):247-56 1970
14. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248–254;

15. Deavall, D.G., Martin, E.A., Horner, J.M., & Roberts, R. (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, Article ID 645460.
16. Klatt P, Lamas S., Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem*. 2000 Aug;267(16):4928-44. Review