

RAPORT ANUAL DE ACTIVITATE 2010
PROIECT TE_127
IMAGISTICA BAZATA PE NANOPARTICULE DE SILICIU FLUORESCENTE -
EVALUAREA TOXICITATII TISULARE DATORATE BIOACUMULARII IN VIVO PRIN
ABORDARI BIOCHIMICE SI MOLECULARE

Semiconductorii quantum dots (QDs) reprezinta nanoparticule ale caror caracteristici optice au trezit interesul cercetatorilor din domeniul biologiei si medicinei. Proprietatile fluorescente ale acestor tipuri de nanoparticule depind de dimensiunea lor, aceasta caracteristica facandu-le utilizabile ca sonde fluorescente care pot detecta biomarkeri specifici atat *in vitro* cat si *in vivo*, la nivel celular, tisular sau al unui intreg organism. La ora actuală, exista un interes deosebit in vederea dezvoltarii unei tehnologii bazate pe aceste nanoparticule fluorescente (NF) (Quantum Dots Technology). Astfel, QDs au fost incapsulate in polimeri amfilici si complexati de liganzi specifici pentru un anumit tip de celula tumorală sau in lipozomi in vederea administrării tinte a unui anumit compus medicamentos sau pot fi utilizate in tehnici de imagistica [Oh et al., 2009; Hussein et al., 2008; Bottini, 2007]. In acest context, importantă este studierea citotoxicității acestora, care este dependenta de un numar mare de factori incluzand dimensiunea, compozitia si concentratia nanoparticulelor utilizate precum si compozitia suprafetei active, tipul de incapsulare si parametrii de procesare implicati in sinteza acestor nanoparticule [Hardman, 2006; Hoet et al., 2004]. Chiar daca aceste nanoparticule nu induc modificari semnificative ale fiziologiei celulare, pot produce sensibile alterari ale functiilor care pot afecta calitatea parametrilor biologici, [Zhang et al., 2006].

Domeniul nanomaterialelor fiind un domeniu de actualitate, sunt puține studii *in vivo* la ora actuală în ceea ce privește efectul QDs [Chen et al., 2009; Chen et al., 2006; Derfus et al., 2004; Dick et al., 2003].

Pana in momentul de fata, nu au fost realizate studii *in vivo* comparative cu privire la efectele induse de nanoparticulele fluorescente pe baza de siliciu la nivelul tesuturilor animale. Pentru o buna intelegere a mecanismelor de acțiune ale QDs pe baza de siliciu *in vivo* si pentru a lamuri cauzele efectelor produse, în cadrul acestui proiect, s-a realizat un studiu complex comparativ la nivelul diferitelor tipuri de tesuturi izolate dupa expunerea pestilor la actiunea nanoparticulelor fluorescente. În prima parte a studiului am analizat bioacumularea nanoparticulelor la nivelul diverselor țesuturi prelevate, inducerea stresului oxidativ la nivel tisular, respectand regulile impuse de normele de bioetica.

MATERIALE ȘI METODE

Materialul biologic: Indivizii de *Carassius sp.* cu o greutate de 220 ± 20 g au fost obținuți de la Statia de Cercetare Piscicola Nucet, Romania. Peștii au fost aclimatizați 3 săptămâni la condițiile de laborator înainte de experiment. Apa dechlorinată a avut constant următoarele caracteristici : temperatură 19 ± 2 °C, pH (7.4 ± 0.05), oxygen dizolvat 6 ± 0.2 mg/L (aerație constantă) și o tărie de 175 mg/L CaCO₃. Peștii au fost menținuți 12h la lumină și 12h la întuneric și au fost hrăniți cu mâncare specială la o rată de 1% din greutatea corporală/zi. După perioada de aclimatizare, peștii au fost aleatoriu împărțiți în 3 loturi de câte 15 indivizi. S-au constituit : lotul 1, control netratati, lotul 2 injectați intraperitoneal cu o soluție de NaCl 0,7% și lotul 3 injectați intraperitoneal cu o suspensie de QDs 2 mg/kg corp în NaCl 0,7%. Peștii au fost sacrificați după 1 zi, 3 zile și 7 zile de la tratament în acord cu procedurile din *Guide for Use and Care of Laboratory Animals* ([European Communities Council Directive 1986](#)), reducând la minim numărul indivizilor din fiecare lot și suferința acestora, fiind prelevate țesuturile de interes (hepatic, muscular, renal, intestinal si nervos) care au fost imediat înghețate la -80°C în vederea analizelor ulterioare.

Obținerea QDs. Nanoparticulele de SiO₂/Si au fost obtinute in laborator prin metoda ablatiei laser.. Distributia dupa marime a nanoparticulelor de SiO₂/Si este o functie log-normală; dimensiunea acestora a fost între 2,75 nm-11,25 nm. Pentru vizualizarea nanoparticulelor, s-a folosit microscopia electronica de transmisie de inalta rezolutie (HRTEM).

Bioacumularea QDs la nivelul țesuturilor a fost evidențiată prin microscopie de fluorescență. Microsecțiunile au fost deparafinate și echilibrate în tampon PBS iar nucleii au fost marcați cu DAPI 300 nM, având un maxim de Em461 nm, Ex358 nm și vizualizate prin microscopie de fluorescență. Evidențierea bioacumulării în țesuturi a QDs de siliciu a fost realizată la aceleași lungimi de undă de Ex/Em.

Obținerea lizatei tisulare totale și dozarea proteinelor: Tesuturile înghețate au fost dezghețate și omogenizate cu un omogenizator Potter-Elvehjem în soluție tampon Tris-EDTA 0.1 M, pH 7.4, la un raport de extracție de 1g/10ml. Apoi au fost centrifugate la 8,000xg pentru 30 minute la 4°C. Proteinele din extractele tisulare au fost determinate atât prin metodele Lowry [Lowry, 1951] și Bradford [Bradford, 1976].

Evaluarea nivelului de peroxidare lipidică. Malondialdehida (MDA) a fost evaluată prin metoda descrisă de Del Rio [Del Rio et al., 2003]

Dozarea glutatationului redus (GSH) și oxidat (GSSG) s-a realizat cu ajutorul kitului de detecție colorimetrică Arbor Assays Detectx™ Glutathione Colorimetric Detection Kit-K006-H1.

Evaluarea activității enzimice SOD (EC 1.15.1.1) s-a realizat utilizând metoda spectrofotometrică descrisă de Paolettiet al. (1986).

Evaluarea activității enzimice CAT (EC 1.11.1.6) s-a realizat cu ajutorul metodei Aebi [Aebi și colab., 1974].

Evaluarea activității glutathion peroxidazei (EC 1.11.1.9). A fost realizată prin metoda descrisă de Beutler [1984].

Evaluarea activității glutathion S transferazei (EC 2.5.1.18) s-a determinat cu ajutorul metodei descrisă de Habig [Habig et al. 1974].

Evaluarea concentrației produsilor de oxidare avansată a proteinelor (AOPP) s-a realizat conform metodei descrisă de Witko et al. [1996].

REZULTATE

1. Caracterizarea QDs

Caracterizarea nanoparticulelor s-a realizat folosind microscopia electronică de transmisie de înaltă rezoluție (HRTEM) (microscop model Philips CM 120) iar dimensiunea lor a fost cuprinsă între 2,75 nm-11,25 nm.

În figura 1 este prezentată imaginea de microscopie electronică de înaltă rezoluție a particulelor. Din imagine, se observă cu ușurință că nanoparticulele de siliciu sunt acoperite cu un strat de SiO₂ al cărui grosime este în jur de 1,5 nm (Fig. 1A) iar miezul de Si este alcătuit din planuri paralele cristaline orientate pe direcția (111) (Fig. 1B). De asemenea se observă că nanoparticulele de SiO₂/Si se aglomerează în clustere datorită forțelor van der Waals și a celor electrostatice în timpul manipulării lor, nedepășind 11,25 nm (Fig. 1C).

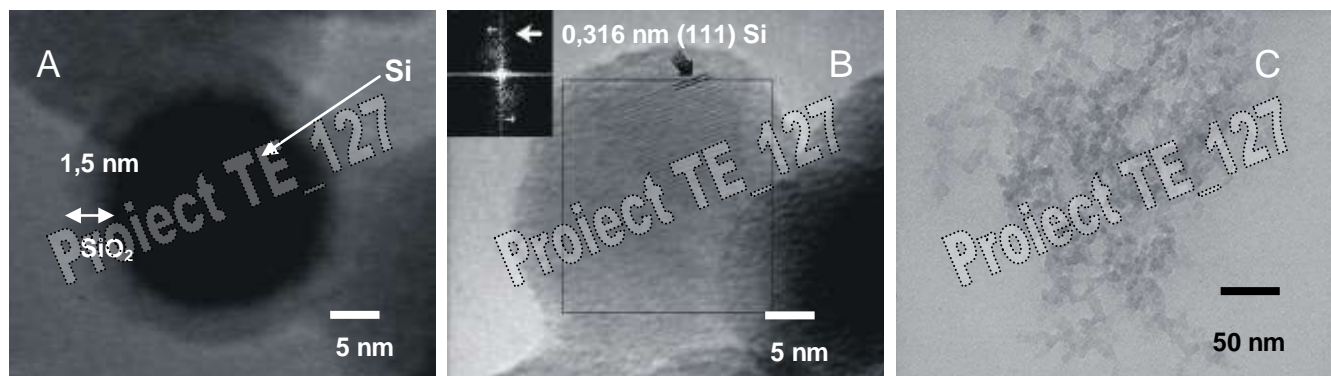


Figura 1. Imaginea HRTEM a nanoparticulelor primare de SiO₂/Si cu miez de Si acoperite cu SiO₂ (A), dispunerea planurilor cristaline paralele a miezului de Si (B) și aglomerarea în clustere de ordinul nm a acestor nanoparticule (C).

2. Evaluarea gradului de acumulare a nanoparticulelor fluorescente la nivelul tesuturilor prin microscopie de fluorescență

Prin microscopia de fluorescență a țesuturilor recoltate de la peștii din loturile martor și tratate au fost selectate țesuturile care au prezentat bioacumularea nanoparticulelor de SiO₂ și anume ficat, rinichi, mușchi roșu și alb, iar dintre acestea nivelul maxim al bioacumulării a fost înregistrat în cazul ficatului și rinichiului. La nivelul intestinului și a creierului nu s-a observat acumulare de nanoparticule. Astfel următoarele analize biochimice și de biologie moleculară se vor derula pe probe de ficat, rinichi, mușchi roșu și mușchi alb.

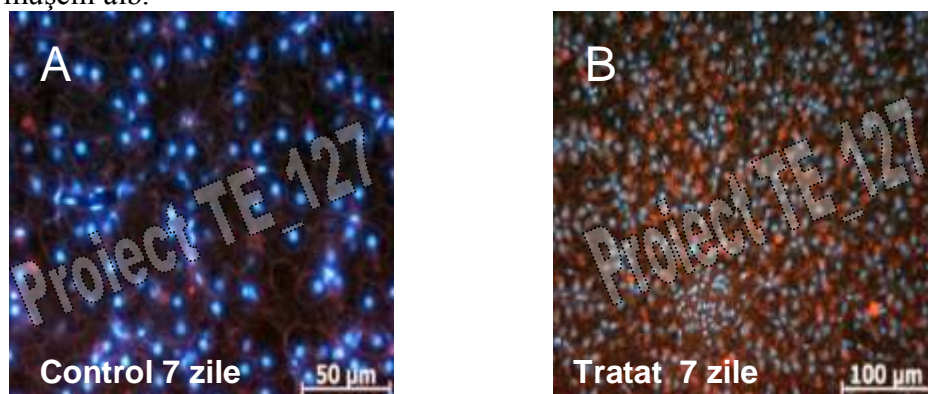


Figura 2. Imagini microscopie de fluorescență secțiuni ficat, marcarea DAPI

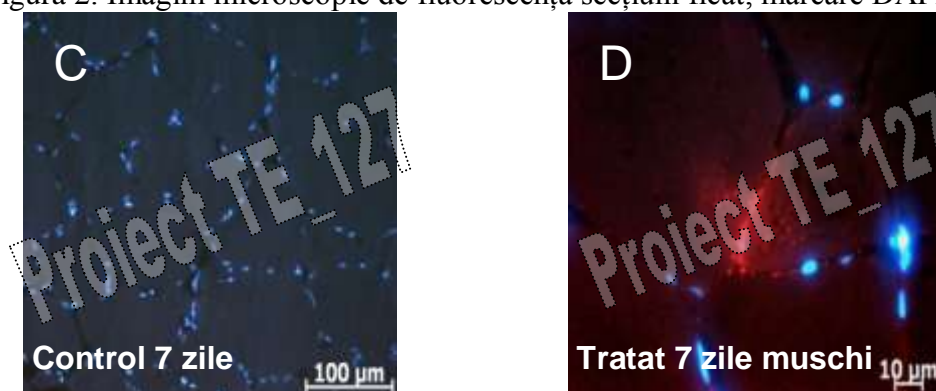


Figura 3. Imagini de microscopie de fluorescență secțiuni mușchi alb, marcarea DAPI

Imaginile de microscopie în fluorescență prin marcarea nucleilor cu DAPI, utilizând Ex 358 nm/Em 461 (fluorescență albastră) au demonstrat că acumularea nanoparticulelor de SiO₂ fluorescente la lungimile de undă mai sus menționate, a fost dependentă de timp și țesut atingând un maxim la 7 zile după administrarea tratamentului (Fig. 2,3).

3. Evaluarea stresului oxidativ tisular, a mecanismelor de aparare antioxidative precum și a gradului de oxidare a proteinelor celulare în urma expunerii peștilor la QDs

Analizând profilul enzimelor SOD și CAT care se corelează cu nivelul radicalilor superoxid și peroxid se observă că activitatea specifică a acestora începe să crească chiar de la o zi de la administrarea tratamentului, atinge un maxim la trei zile iar la șapte zile se menține la un nivel asemănător cu cel înregistrat la intervalul anterior (Fig.4).

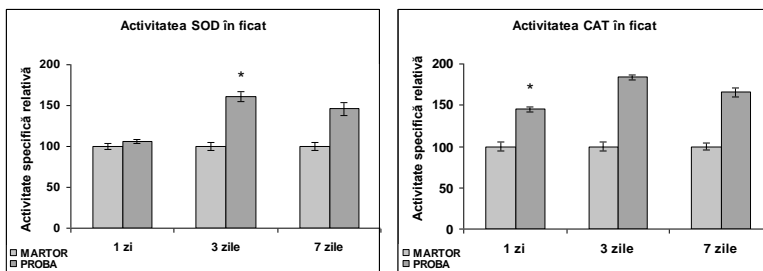


Figura 4. Activitatea specifică relativă a SOD și CAT la nivelul hepatocitului

Activitatea GPx scade sub nivelul martorului începând cu a treia zi de tratament iar activitatea GST, enzimă implicată în detoxifierea celulară, are o valoare sub martor chiar după 24 de ore, corelându-se cu scăderea dramatică a nivelului glutationului redus, cosubstratul acestor enzime (Figura 5). Acest fapt ne indică dezechilibrul redox la nivelul hepatocitelor indus de către QDs.

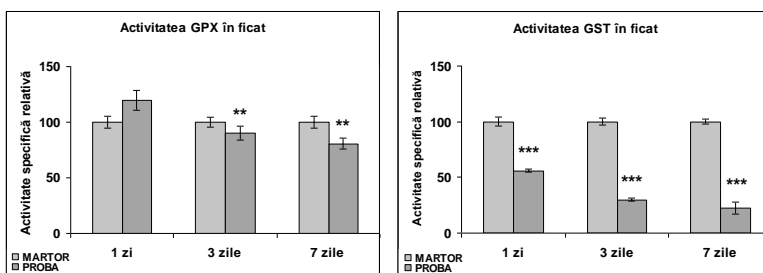


Figura 5. Activitatea specifică relativă a GPx și GST la nivelul hepatocitului

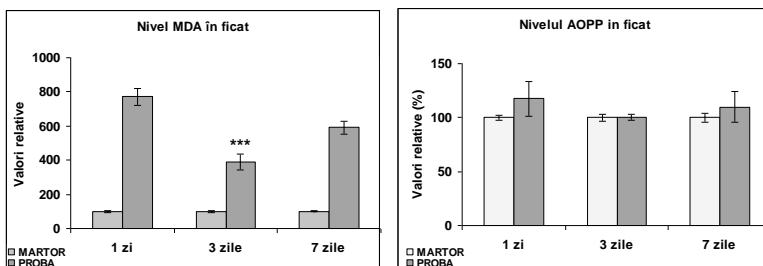


Figura 6. Nivelul MDA și AOPP în lizatul hepatic

Comportarea enzimelor antioxidante și detoxifiante se corelează perfect și cu nivelul peroxidării lipidice și cu al AOPP (Fig. 6). Nivelul MDA atinge un nivel maxim la 24 de ore, având o creștere de 800% față de lotul martor iar în cea de a treia zi nivelul MDA se reduce la jumătate din valoarea înregistrată la o zi, probabil datorită activităților maxime atinse de SOD și CAT la acest interval de tratament, dar la 7 zile se observă o creștere a nivelului peroxidării lipidice, ceea ce ne sugerează că sistemele antioxidative celulare în timp sunt depășite.

La nivelul rinichiului, activitatea SOD crește semnificativ după 7 zile, cu 200% față de martor (Fig. 7) deoarece sistemul renal este ultima țintă a nanoparticulelor, bioacumularea la nivelul acestor organe fiind defazată în timp comparativ cu ficatul, efectele fiind vizibile după o perioadă mai lungă. De asemenea în cazul CAT, nivelul activității enzimatică atinge un maxim tot după 7 zile de la administrarea tratamentului (Fig. 7).

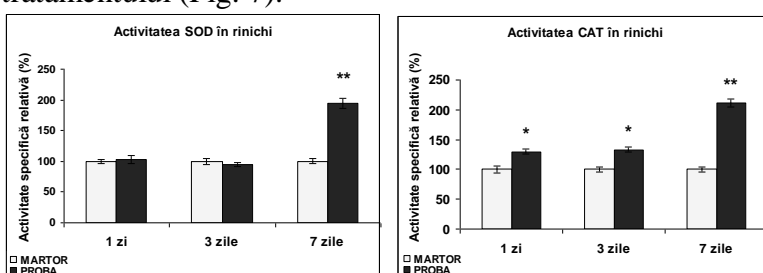


Figura 7. Activitatea specifică relativă SOD și CAT la nivel renal

Comparativ cu ficatul, nivelul GST crește cu 320% începând cu a treia zi, și atinge un maxim la 7 zile (450%), ceea ce poate explica scăderea nivelului peroxidării lipidice înregistrată la 7 zile, nivel care însă rămâne ridicat (270%) comparativ cu cel înregistrat la lotul martor (Fig. 8).

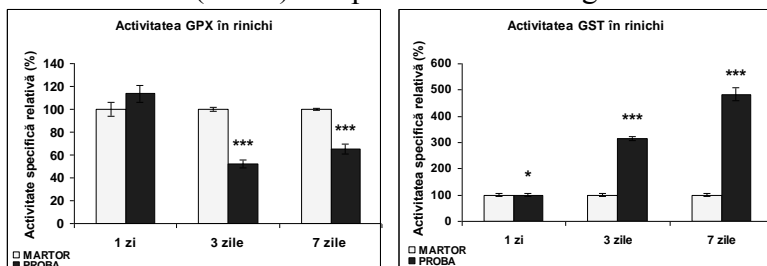


Figura 8. Activitatea specifică relativă GPx și GST la nivel renal

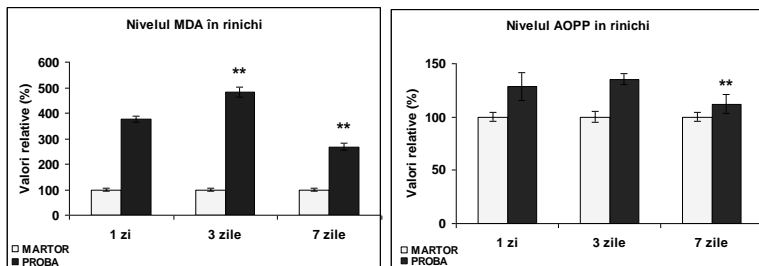
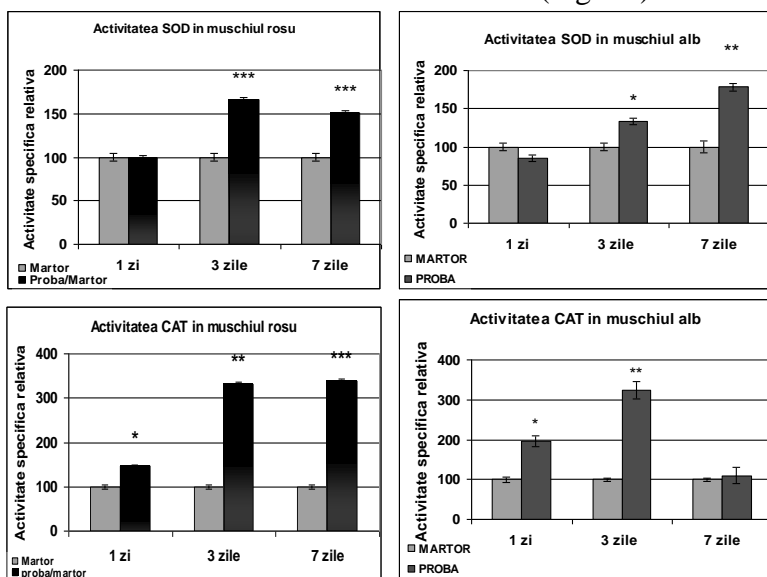


Figura 9. Nivelul MDA și AOPP în lizatul renal

Scăderea nivelului peroxidării lipidice este probabil datorată și activării CAT înregistrată la 7 zile de la administrare. Se observă deasemeni corelarea profilului MDA cu cel al produșilor de oxidare avansată ai proteinelor (AOPP) (Fig. 9). Aceste rezultate ne sugerează faptul că rinichiul este afectat ulterior ficatului și că celulele renale prezintă un mecanism de detoxifiere superior hepatocitelor, contracarând mai eficient efectele stresului oxidativ indus de nanoparticulele de siliciu.

Comparând rezultatele obținute pe mușchiul alb și roșu, s-a observat o comportare relativ asemănătoare a celor două tipuri de țesuturi la tratamentul cu nanoparticule de siliciu, cu excepția scăderii activității enzimice CAT la 7 zile în cazul mușchiului alb (Fig.10). Datorită faptului că tratamentul a fost efectuat la nivel intraperitoneal, se observă că răspunsul enzimelor antioxidative are loc în general chiar la 24 de ore, nivelul lor atingând un maxim la 3 zile consecutive tratamentului, încercând restabilirea echilibrului redox al celulelor (Fig. 10).



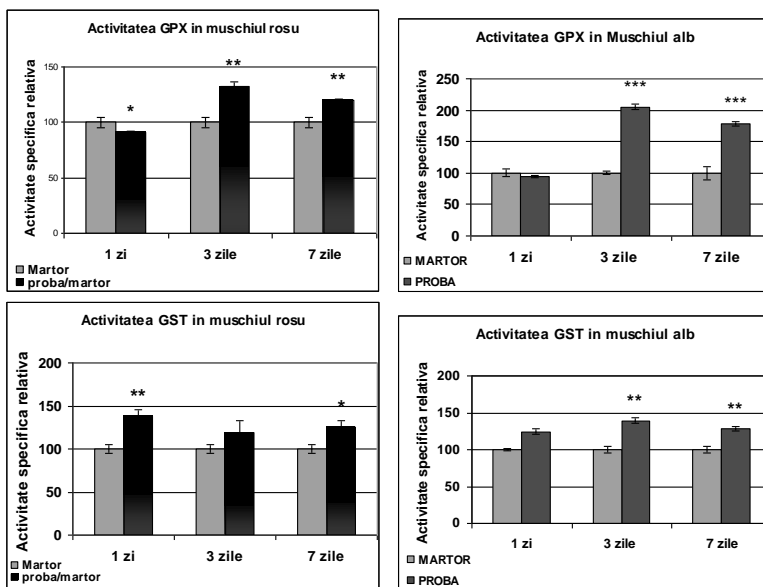


Figura 10. Activitatea enzimelor antioxidante SOD, CAT, GPx și GST în mușchiul roșu și alb

Nivelul peroxidării lipidice și al AOPP sunt mai ridicate la toate intervalele de tratament în cazul mușchiului roșu, dar ambele țesuturi sunt mult mai puțin afectate comparativ cu ficatul și rinichii, date care se corelează cu cele obținute prin microscopie, privind biacumularea nanoparticulelor.

Bibliografie

- Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* **4**:435–46, 2005.
- Husseini G.A. and W.G. Pitt, Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1137–1152, 2008.
- M. Bottini, F. D'Annibale, A. Magrini, F. Cerignoli, Y. Arimura, M.I. Dawson, E. Bergamaschi, N. Rosato, A. Bergamaschi and T. Mustelin, Quantum dot-doped silica nanoparticles as probes for targeting of T-lymphocytes, *International Journal of Nanomedicine* **2**, 227–233, 2007.
- Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect* **114**:165–72, 2006.
- Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles-known and unknown health risks. *J Nanobiotechnol* **2**:12-19; 2004.
- Zhang TT, Stilwell JL, Gerion D, Ding LH, Elboudwarej O, Cooke PA, et al. Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett* 2006; **6**:800–8.
- Chen J., X. Dong, J. Zhao and G. Tang, In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection, *Journal of Applied Toxicology* **29**, 330–337, 2009.
- Chen Z., H. Meng, G. Xing, C. Chen, Y. Zhao, G. Jia, T. Wang, H. Yuan, C. Ye, F. Zhao, Z. Chai, C. Zhu, X. Fang, B. Ma and L. Wan, Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicology Letters* **163**, 109–120, 2006.
- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett* **4**:11–8, 2004.
- Dick C.A., D.M. Brown, K. Donaldson and V. Stone, The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types, *Inhalation Toxicology* **15**, 39–52, 2003.
- Lowry O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and B.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275., 1951.
- Bradford, M. 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.
- Aebi, H. Catalase *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmayer. Weinheim, F.R.G, Chemie. **2**: 673-684, 1974.
- Beutler E., "A Manual of Biochemical Methods", Grune and Stratlon (Eds.), 3rd edn., New York, p. 74-76. 1984.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**:7130–7139, 1974.
- Witko-Sarsat V., M. Friedlander, C. Capeillere-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen and J. Zingraff *et al.*, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int* **49**, 1304–1313, 1996.