

**Planul de realizare PROIECT TE\_127**

**Obiective si activitati (stiintifice si complementare)**

An	Obiective (Denumirea obiectivului)	Activitati asociate
AN I	1 Stabilirea modelului experimental: stabilirea loturilor experimentale de pesti ( <i>Carassius sp.</i> ), tratamentul acestora cu quantum dots pe baza de siliciu, precum si recoltarea tesuturilor de interes, in vederea studiului efectelor biochimice si moleculare induse de expunerea la nanoparticule	1.1 Selectarea si aclimatizarea loturilor de pesti - (5 indivizi/interval de tratament 24 ore, 72 ore si 7 zile) care urmeaza a fi expusi actiunii nanoparticulelor 1.2 Tratatamentul loturilor de pesti prin injectarea intraperitoneala a suspensiei de nanoparticule fluorescente de Si 1.3 Recoltarea si conservarea la -80°C a tesuturilor de interes (tesut hepatic, tesut muscular rosu si alb, tesut renal, intestinal si nervos), 1.4 Evaluarea gradului de acumulare a nanoparticulelor fluorescente la nivelul tesuturilor analizate prin microscopie de fluorescenta si selectarea tesuturilor care prezinta nanoacumulare maxima
	2 Evaluarea stresului oxidativ tisular, a mecanismelor de aparare antioxidative precum si a gradului de oxidare a proteinelor celulare si desemnarea celui mai bun marker de evaluare a stresului oxidativ indus de expunerea la quantum dots pe baza de siliciu	2.1 Evaluarea nivelului de specii reactive de oxigen in tesuturile selectate 2.2 Evaluarea nivelului de peroxidare lipidica, a concentratiei de GSH intracelular si a activitatii enzimatic a glutation peroxidazei (GPx) si glutation S transferazei (GST) 2.3 Analiza nivelului de produse de oxidare avansata a proteinelor (AOPP- advanced oxidation protein products), a proteinelor thiol (P-SH) si proteinelor carbonilate, ca markeri ai procesului de oxidare proteica 2.4 Prelucrarea statistica a datelor si integrarea rezultatelor in vederea identificarii celui mai bun marker de evaluare a stresului oxidativ
AN II	1 Evaluarea modificărilor de expresie la nivel transcripțional (RT Real Time PCR) al genelor corespunzătoare Hsp27, Hsp60, Hsp70 si Hsp90 cu rol in protectia celulara impotriva potentialelor modificari induse de nanoparticule in tesuturile de <i>Carassius sp.</i>	1.1 Desemnarea primerilor pentru cele patru proteine chaperone in vederea cuantificarii expresiei genice prin RT Real-Time PCR 1.2 Extragerea ARN total din tesuturile netratate si tratate cu nanoparticule si obtinerea de ADNc prin reactii de revers transcriere 1.3 Optimizarea conditiilor de reactie RT Real-Time PCR pentru fiecare pereche de primeri nou sintetizata 1.4 Cuantificarea genica si analiza statistica a datelor
	2 Evaluarea modificărilor de expresie la nivel transcripțional al genelor codificatoare ale proteinelor implicate in raspunsul inflamator IL8 si a genelor codificatoare ale proteinelor implicate in remodelarea matrixului extracelular MMP2 si MMP9 in tesut de <i>Carassius sp.</i>	2.1 Desemnarea primerilor pentru genele codificatoare pentru IL8 si MMP2, MMP9 in vederea cuantificarii expresiei genice prin RT Real-Time PCR 2.2 Extragerea ARN total din tesuturile netratate si tratate cu nanoparticule si obtinerea de ADNc prin reactii de revers transcriere 2.3 Optimizarea conditiilor de reactie RT Real-Time PCR pentru fiecare pereche de primeri nou sintetizata 2.4 Cuantificarea genica si analiza statistica a datelor
	3 Evaluarea modificărilor de expresie la nivel transcripțional a genei codificatoare pentru p53 la nivelul tesuturilor ce prezinta nanoacumulare maxima	3.1 Desemnarea primerilor pentru gena codificatoare pentru p53 in vederea cuantificarii expresiei genice prin RT Real-Time PCR 3.2 Extragerea ARN total din tesuturile netratate si tratate cu nanoparticule si obtinerea de ADNc prin reactii de revers transcriere 3.3 Optimizarea conditiilor de reactie RT Real-Time PCR pentru perechea de primeri nou desemnata 3.4 Cuantificarea genica si analiza statistica a datelor
AN III	1 Analiza expresiei proteice a Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 (western blotting) si p53 (imunohistochimie si western blotting) din tesut hepatic, muscular si renal de <i>Carassius sp.</i> tratat si netratat cu QDs de siliciu	1.1a Obținerea de extracte proteice totale si dozarea concentratiei proteice a acestora 1.1b Obținerea de criosectiuni din tesut hepatic, muscular si renal 1.2a Separarea electroforetica a probelor in sistem SDS/PAGE si evidentierea colorimerica a expresiei proteice utilizand anticorpi primari policlonali antiHsp de peste si anti p53 (antibodies-online GmbH, Germany) 1.2b Coloratia imunohistochimica a criosectiunilor utilizand anticorpi policlonali anti p53 cuplati cu FITC 1.3a Densitometrarea si cuantificare benzilor obtinute precum si analiza comparativa a expresiei proteice a Hsp in diferitele tesuturi analizate 1.3b Analiza criosectiunilor la microscopul de fluorescenta si compararea imaginilor fluorescente obtinute
	2 Evaluarea activitatii	2.1 Obținerea de extracte proteice totale si dozarea concentratiei proteice a acestora

		enzimatice a metaloproteinazelor MMP2, MMP9 (zimografie) si IL8 (ELISA) din tesut tratat si netratat cu nanoparticule	2.2a Separarea electroforetica a probelor si evidentierea colorimerica a activitatii enzimatiche a MMPs in gel de poliacrilamida 15% 2.2b Evaluarea expresiei proteice IL8 (ELISA) din extracte tisulare hepatic, musculare si renale
			2.3a Densitometrarea si cuantificare benzilor obtinute precum si analiza comparativa a activitatii acestor MMPs in diferitele tesuturi analizate 2.3b Cuantificarea si analiza datelor obtinute prin ELISA in vederea evaluarii expresiei proteice a IL8 din tesuturile analizate
3		Corelarea datelor experimentale in vederea identificarii unei cai de semnalizare prin care actioneaza quantum dots pe baza de siliciu la nivelul unui tesut specific	3.1 Analiza statistica si corelarea datelor obtinute prin analiza expresiei genice cu cea a expresiei proteice in tesut HEPATIC 3.2 Analiza statistica si corelarea datelor obtinute prin analiza expresiei genice cu cea a expresiei proteice in tesut MUSCULAR rosu si alb 3.3 Analiza statistica si corelarea datelor obtinute prin analiza expresiei genice cu cea a expresiei proteice in tesut RENAL