



EVALUAREA TOXICITATII SI ECOTOXICITATII UNOR NANOMATERIALE PE BAZA DE PORFIRINE CU UN NOU MODEL EXPERIMENTAL UTILIZAND ERITROCITE NUCLEATE

D. Bratosin¹, E. Fagadar-Cosma², A.-M. Gheorghe¹, Al Rugina¹, L. Takacs¹, Al. Marinescu³, A. Ardelean⁴, J. Montreuil⁵

¹ Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Stiinte Biologice, Bucuresti, Romania (bratosind@yahoo.com)

² Institutul de Chimie Timisoara al Academiei Romane, Timisoara, Romania

³ Universitatea din Pitesti, Facultatea de Biologie, Pitesti, Romania

⁴ Universitatea de Vest "Vasile Goldis" din Arad, Facultatea de Stiinte ale Naturii

⁵ Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Laboratoire de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Cercetarile efectuate
au fost finantate prin Programul PN-II, IDEI,
Contract PCE: 916 /2008

Utilizarea nanoparticulelor pentru aplicatii biologice si medicale a cunoscut in ultimii ani o crestere rapida iar intelegerea potentialului lor toxic si a efectelor induse asupra organismului devine cruciala inainte de utilizarea lor clinica. Determinarea ecotoxicitatii acestora reprezinta deasemenea o arie larga de investigatie. Pana in prezent cele mai folosite sisteme de culturi celulare pentru testarea citotoxicitatii (ecotoxicitatii) au fost de origine non-umana

OBIECTIVE

- > Identificarea efectelor produse de nanoparticule, stabilirea concentratiilor de risc pentru sanatate si mediu prin noi metode de investigare celulara bazate in special pe tehnici de citometrie in flux.
- > Valorificarea conceptului emis de noi, potrivit caruia anumite tesuturi care vin in contact direct cu factori declansatori de apoptoza, cum ar fi factorii poluanti, in particular nanoparticule sau nanomateriale, pot induce un fenomen de apoptoza celulara.
- > Eritrocitele sunt celulele care vin cu prioritate si direct in contact cu factorii poluanti la nivel de branhii si pot declansa un fenomen de apoptoza sub actiunea acestora.
- > In plus incercam sa aplicam si sa valorificam rezultatele originale privind conceptul de apoptoza eritrocitara atat in cazul hematilor umane anucleate cat si nucleate de batracian, precum si testul original de determinare a viabilitatii celulare pe baza de Calcein-AM.

MATERIAL SI METODE

Nanoparticule pe baza de porfirine si hibridii acestora:

P1 = Meso-tetra-tolil-porfirina;

P2 = Sol-gel_Meso-tetra-tolil-porfirina, cataliza acido-bazica, HCl:TEOS=0.02:1; NH3:TEOS=0.0142:1;

P3 = Zn(II)-meso-tetra-piridil-porfirina;

P4 = Sol-gel_Zn(II)-meso-tetra-piridil-porfirina, cataliza acida;

P5 = Sol-gel_Zn(II)-meso-tetra-piridil-porfirina, cataliza acido-bazica

P6 = Meso-tetra-(3,4-dimetoxi-fenil)-porfirina

meso-5,10,15,20-tetra (3,4 dimetoxi-fenil) porfirina;

P7 = Sol-gel_Meso-tetra-(3,4-dimetoxifenil)-porfirina, cataliza acida

P8 = Sol-gel_Meso-tetra-(3,4-dimetoxifenil)-porfirina, cataliza acido-bazica)

> Diferitele tipuri de nanoparticule sau nanomateriale au fost incubate in Ser fiziologic (SF) pentru 24 de ore, in doua variante, fiind activate cu UV timp de 10 min. sau neactivate.

> Supernatantele au servit la obtinerea unor dilutii seriale in placi cu godeuri pentru culturi celulare, care au fost incubate pentru 20 h, la 20°C sau 37°C cu cele 3 tipuri celulare: eritrocite nucleate si anucleate precum si cu hepatocite.

> Concentratiile utilizate au variat intre 0,008 si 0,0005 g/ml

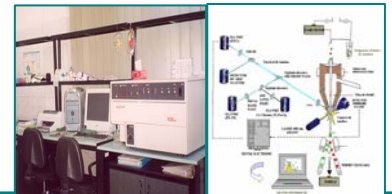
> ANALIZA PRIN CITOMETRIE IN FLUX:

• modificarile de morfologie (FSC/SSC)

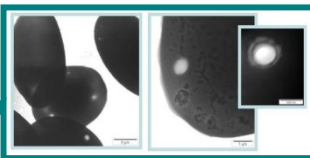
• apoptoza/necroza (FITC-annexin-V/PI)

• viabilitate celulara determinata cu calcein-AM

> TEHNICI DE MICROSCOPIE OPTICA SI ELECTRONICA complementare



REZULTATE

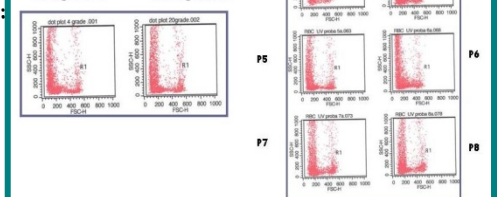


Analiza prin microscopie optica si electronica:
P2 si P3-modificarea morfologiei discoidale la forme rotunde
P4 si P7-modificarea morfologiei la forme neastepate de "rotite de bicicleta"
P5 si P8-inducere de "mega pori" in celula

Analiza modificarilor de morfologie in sistem FSC/SSC

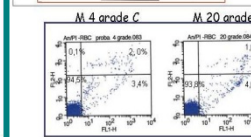
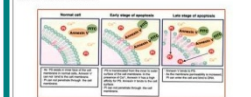
FSC= talie celulara = XGeoMean
SSC= granularitate (densitate)= YGeoMean

M 4 grade C M 20 grade C



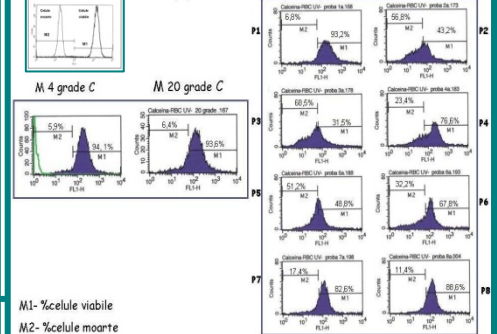
Analiza discriminativa a eritrocitelor nucleate viabile, in apoptoza sau moarte cu Annexin-V-FITC/Propidium Iodide

Evidentierea pierderii asimetriei membronare si a externalizarii de fosfatidil serina (PS) la exteriorul celulei



Estimarea viabilitatii eritrocitelor prin masurarea activitatii esterazelor intracelulare cu Calcein-AM

(dupa Bratosin et al., Cytometry, 2005)



CONCLUZII

- > Rezultatele noastre demonstreaza ca analiza prin citometrie in flux a viabilitatii si mortii celulare pentru eritrocitele nucleate supuse contactului direct cu nanomateriale porfirinice poate reprezenta un instrument rapid si eficient de evaluare *in vitro* a raspunsurilor biologice fata de nanoparticule sau nanomateriale cu aplicatii medicale, dar si pentru studii de ecotoxicologie.
- > Eritrocitele constituie un nou model celular experimental usor de utilizat si care nu necesita cheltuieli de cultura si intretinere.