
Acțiunea nanoparticulelor de Aur și Argint. Considerații toxicologice și terapeutice

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand **Romelia Pop** (căs. Ionică)

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Cornel Cătoi**



INTRODUCERE

Nanotehnologia reprezintă o ramură științifică care se ocupă de studiul materialelor de dimensiuni mai mici de 100 nm. Aceasta reprezintă domeniul de interes major în ceea ce privește cercetarea, accentul punându-se pe mecanismul funcțional al nanoparticulelor, în special a celor metalice. Nanotehnologia este utilizată pentru dezvoltarea nanoparticulelor cu diferite scopuri: transportul substanțelor medicamentoase, detectarea patogenilor, senzori biomoleculari, terapie antitumorală (Nanotechnology and Medicine 656, n.d.).

Nanoparticulele (NP) reprezintă grupuri de atomi de dimensiuni variabile 1-100 nm care posedă proprietăți chimice, optice și metalice extrem de promițătoare. Nanoparticulele au atras atenția datorită proprietăților lor fizice și chimice unice care derivă din cantitatea mare a atomilor de suprafață, dar și din relația suprafață/volum cu valoare mare. Pe măsură ce diametrul lor scade, suprafața disponibilă a particulei crește dramatic, prin urmare, apare o creștere a proprietăților originale ale materialelor brute corespondente. (Dos Santos și colab. 2014).

Nanoparticulele sunt candidați promițători pentru diverse aplicații, însă cu toate acestea, toxicitatea lor potențială ridică preocupări semnificative. Toxicitatea NP-urilor metalice este atribuită dimensiunii lor mici, raportului mare suprafață-volum și proprietăților fizico-chimice unice, care pot duce la interacțiuni cu sistemele biologice și pot induce efecte adverse. Studiile au arătat că NP-urile metalice pot induce stres oxidativ, pot perturba membranele celulare, pot interfera cu căile de semnalizare celulară și pot induce inflamație și genotoxicitate. În plus, eliberarea de ioni metalici toxici din NP poate exacerba și mai mult efectele lor adverse. Toxicitatea NP-urilor metalice variază în funcție de factori precum compoziția, dimensiunea, forma, chimia suprafeței și încărcătura de suprafață. Prin urmare, înțelegerea cuprinzătoare și evaluarea atentă a acestor parametri sunt esențiale pentru dezvoltarea sigură și durabilă a NP-urilor metalice pentru diverse aplicații.

În prezent, nanoparticulele reprezintă domeniul de baza al cercetării curente, scopul principal fiind acela de a înlocui pe viitor antibioticele, substanțele antivirale și antitumorle eliminând astfel riscul antibioretistenței și a rezistenței virale (Nanotechnology and Medicine 656, n.d.).

STRUCTURA LUCRĂRII

Lucrarea intitulată „Acțiunea nanoparticulelor de Aur și Argint. Considerații toxicologice și terapeutice” conține 161 de pagini și este redactată conform normelor în vigoare, fiind structurată în două părți.

Prima parte, respectiv cea bibliografică, este structurată în 3 capitole și cuprinde 35 de pagini. În această parte a tezei am sintetizat cadrul general actual al cunoașterii în ceea ce privește acțiunea antibacteriană, antitumorală și toxicitatea nanoparticulelor metalice de Aur, respectiv de Argint.

În cea de a doua parte, extinsă pe 100 de pagini și structurată în 5 capitole, am detaliat cercetările personale realizate în perioada 2020-2024. Fiecare capitol este împărțit în subcapitole ce prezintă scopul și obiectivele, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra noutății acestora și concluziile parțiale aduse în urma efectuării fiecărui studiu în parte. Rezultatele cercetării au fost ilustrate într-un număr de 76 de figuri și sintetizate în 8 tabele. Lucrarea se încheie cu bibliografia citată (185 titluri).

REZULTATELE CERCETĂRII

În partea a doua a prezentei lucrări, am studiat potențialul toxicologic și antitumoral al nanoparticulelor metalice de Aur și Argint. Principalele obiective pe care ni le-am propus:

- Descrierea și caracterizarea nanoparticulelor utilizate în studiile efectuate și a potențialelor leziuni macroscopice, respectiv histopatologice întâlnite în urma administrării nanoparticulelor.
- Analizarea distribuției nanoparticulelor metalice utilizând microscopia hiperspectrală în câmp întunecat (CytoViva).
- Evaluarea unor parametrii biochimici și hematologici.

Capitolul 5, intitulat „Evaluarea toxicității subacute sistemice induse prin administrarea pe cale orală a unei soluții apoase de GNP-CAE la șoarece” a avut drept scop devaluarea toxicității subacute la nivel sistemic apărută consecutiv administrării pe cale orală a unei soluții de nanoparticule de aur funcționalizate cu antigen carcinoembrionar GNP-CAE la șoarece. Pentru atingerea acestui scop au fost stabilite o serie de obiective: analizarea biodistribuției sistemice a GNP-CAE prin utilizarea microscopiei hiperspectrale “în câmp întunecat” (Cytoviva), analizarea potențialelor efecte adverse după expunerea de lungă durată (30 de zile) la GNP-CAE prin examinarea histopatologică a organelor pentru a caracteriza tipul și severitatea leziunilor induse de GNP-CAE și analizarea unor markeri de răspuns inflamator sistemic (IFN-gamma, Il 1 beta, Il 4, Il 10, Il 12, TGF-beta). În varianta de administrare subacută a prototipului, acesta induce la nivel hepatic: infiltrat cu mononucleare și

polimorfonucleare, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=5; grup 10mg GNP-CAE/kg n=4; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=4; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=4), amiloidoză hepatică, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=3; și grup 50mg GNP- CAE/kg , n=1). La nivel splenic, leziunile întâlnite sunt reprezentate de amiloidoza splenică, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=2; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=3; și grup 50mg GNP- CAE/kg , n=3), hiperplazia de pulpă albă, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=2; grup 10mg GNP-CAE/kg n=1; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=0; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=0). La nivel renal, leziunile întâlnite sunt reprezentate de: nefropatia progresivă cronică, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=1; grup 10mg GNP-CAE/kg n=2; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=3; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=2).La nivel gastric, leziunile întâlnite sunt reprezentate de levuri, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=1; grup 10mg GNP-CAE/kg n=1; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=2; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=1), supracreștere bacteriană, (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=3; grup 10mg GNP-CAE/kg n=1; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=4; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=1), hipercheratoză (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=1; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=1), amiloidoză gastrică (control, n=0; grup 5mg GNP-CAE/kg, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=2; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=0). La nivel cardiac, intestinal și cerebral nu se observă leziuni la nici un grup studiat. Particulele persistă într-un număr mic (minimal) la nivel tisular pentru toate cele 4 loturi experimentale. Din punct de vedere biochimic, se observă o activare imunitară cu predominanța a imunității celulare. **Capitolul 6**, intitulat Evaluarea toxicității acute sistemice induse prin administrarea pe cale orală a unei soluții apoase de GNP-CAE la șoarece” a avut drept scop principal evaluarea toxicității acute la nivel sistemic,

apărută consecutiv administrării pe cale orală a unei soluții de nanoparticule de aur funcționalizate cu antigen carcinoembrionar (GNP-CAE) la șoarece. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: analizarea biodistribuției sistemice a GNP-CAE prin utilizarea microscopiei hiperspectrale “în câmp întunecat”, analizarea potențialelor efecte adverse după expunerea de scurtă durată la GNP-CAE prin examinarea histopatologică a organelor (ficat, splină, rinichi, pulmoni, cord, stomac, și intestin) pentru a caracteriza tipul și severitatea leziunilor induse de GNP-CAE, analizarea unor markeri de răspuns inflamator sistemic (IFN-gamma, Il 1, Il 4, Il 10, Il 12, TGF-beta). În varianta de administrare acuta a prototipului, acesta induce la nivel hepatic, amiloidoză hepatică, (control, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=0; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=3), creșterea numărului de mitoze, (control, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=0; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=6). La nivel splenic, leziunile întâlnite sunt reprezentate de: amiloidoza splenică, (control, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=1; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=0; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=1). la nivel pulmonar, leziunile întâlnite sunt reprezentate de: Bronho-pneumonia interstițială, (control, n=0; grup 10mg GNP-

CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=1; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=0). La nivel gastric, leziunile întâlnite sunt reprezentate de supracreștere bacteriană, (control, n=0; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; grup 20mg GNP-CAE/kg , n=2; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=2), hipercheratoză (control, n=0;; grup 10mg GNP-CAE/kg n=0; gru 20mg GNP-CAE/kg , n=0; și grup 50mg GNP-CAE/kg , n=2). La nivel renal, cardiac, intestinal și cerebral nu se observă leziuni la nici un grup studiat. Particulele persistă într-un număr mic (minimal) la nivel tisular pentru toate cele 3 loturi experimentale. Din punct de vedere biochimic, se observă o activare imunitară cu predominanța a imunității celulare.

Capitolul 7, intitulat „Inducerea carcinogenezei hepatice prin administrarea intraperitoneală de DEN la șoarece și evaluarea efectelor AuNP-Cad-1-PEI-FA la nivel tumoral” a avut ca scop principal inducerea etapizată a carcinogenezei hepatice, și evaluarea efectelor locale ale nanoparticulelor utilizate. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: Investigarea modificărilor histopatologice la nivel hepatic induse de administrarea intraperitoneală de dietilnitrozamină (DEN) utilizând colorații standard (H&E) și colorații speciale (PAS, și Reticulin). Evaluarea imunohistochimice a E-caderinei. Evaluarea progresiei carcinogenezei hepatice la șoarece după injectarea intraperitoneală a DEN. Evaluarea rolului Concanalinei-A în diagnosticul carcinomului hepatocelular (HCC). Evaluarea intensității fluorescenței eozinei în nodulii hepatici preneoplazici, bazofili. Analizarea modificărilor de la nivel tumoral în urma administrării intratumorale de AuNP-Cad-1-PEI și detectarea nanoparticulelor cu ajutorul microscopiei hiperspectrale. Administrarea intraperitoneală (doză unică) a dietilnitrozaminei (DEN) induce la șoarecii din linia Swiss progresiv leziuni pretumorale (focare de alterare hepatocelulară) la 3 luni, adenoame hepatocelulare la 5 luni de la administrare și adenocarcinoame hepatocelulare la 8 luni. În procesul de carcinogeneză hepatocelulară indusă de DEN, celulele inițializate tumoral și cele transformate neoplastice manifestă alterări semnificative ale metabolismului glucidic, manifestate prin acumularea de glicogen și carbohidrați, cele din urmă demonstrate de creșterea afinității celulare pentru Con-A. În HCC, se observă o creștere a expresiei Con-A și schimbarea locației citoplasmice din perimembranară (observată preponderent în celulele normale) în locație perinucleară-citoplasmică. Expresia E-caderinei scade la nivelul focarelor tumorale de HCC, demonstrând alterări ale joncțiunilor intercelulare. În urma acestui studiu, am reușit să demonstrăm prezența modificărilor în spectrul de fluorescență al eozinei atunci când este legat de proteine atât în țesuturile hepatice normale, cât și în cele tumorale. Acest lucru evidențiază modul în care spectroscopia cu fluorescență poate completa observațiile histopatologice și poate dezvălui informații care se aliniază cu metodele clasice de colorare H&E. Administrarea intratumorală de nanoparticule de aur funcționalizate cu caderină-1-PEI-FA se asociază cu persistența intratumorală a acestora timp de peste 24 de ore, fără afectarea structurii tumorale sau producerea de efecte toxice în parenchumul hepatic peritumoral.

Capitolul 8, intitulat „Evaluarea toxicității pulmonare subacute prin administrarea intratraheală a nanoparticulelor de AuAg” a pornit cu scopul de a evalua toxicitatea

subacută (28 de zile) a nanoparticulelor de aliaj aur-argint (Au-AgNp) la nivel pulmonar apărută consecutiv expunerii aerogene (intratraheale). Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de Aur-Argint utilizate, respectând cerințele recomandate pentru studiile de toxicitate ce implică nanomateriale; investigarea modificărilor clinice (hematologice și BAL) și anatomopatologice (macroscopice și histopatologice) induse de administrarea intratraheală a nanoparticulelor Aur-Argint de diferite dimensiuni; identificarea unui posibil efect legat de cantitățile variabile de aliaj Au-Ag asupra acestei toxicități; investigarea distribuției pulmonare și a persistenței nanoparticulelor de Au-Ag la nivel tisular cu ajutorul microscopiei hiperspectrale (Cyto-Viva). La nivel pulmonar, leziunile întâlnite sunt reprezentate de pigmenți/Material inert, (control, n=0, grup 1, n=2; grup 2 n=1 și grup 3, n=1), inflamație, cronică, interstițială (control, n=0, grup 1, n=2; grup 2 n=3 and group 3, n=1). La nivel hepatic, splenic, renal, cardiac, gastrointestinal și cerebral nu se observă leziuni la nici un grup studiat. Particulele persistă într-un număr mic (minimal) la nivel pulmonar pentru toate cele 3 loturi experimentale.

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

1. Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M. P., Brix, A. E., Singh, B., Belpoggi, F., & Ward, J. M. (2010a). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicologic Pathology*, 38(7 SUPPL.). <https://doi.org/10.1177/0192623310386499>
2. Frazier, K. S., Seely, J. C., Hard, G. C., Betton, G., Burnett, R., Nakatsuji, S., Nishikawa, A., Durchfeld-Meyer, B., & Bube, A. (2012a). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System. *Toxicologic Pathology*, 40(4), 14S-86S. <https://doi.org/10.1177/0192623312438736>
3. De Berardis, B., Marchetti, M., Risuglia, A., Ietto, F., Fanizza, C., & Superti, F. (2020). Exposure to airborne gold nanoparticles: a review of current toxicological data on the respiratory tract. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 22, Issue 8). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04966-9>
4. 142. Nolte, T., Brander-Weber, P., Dangler, C., Deschl, U., Elwell, M. R., Greaves, P., Hailey, R., Leach, M. W., Pandiri, A. R., Rogers, A., Shackelford, C. C., Spencer, A., Tanaka, T., & Ward, J. M. (2016). Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *Journal of Toxicologic Pathology*, 29(1), 1S-124S. <https://doi.org/10.1293/tox.29.1S>
5. Willard-Mack, C. L., Elmore, S. A., Hall, W. C., Harleman, J., Kuper, C. F., Losco, P., Rehg, J. E., Rühl-Fehlert, C., Ward, J. M., Weinstock, D., Bradley, A., Hosokawa, S., Pearse, G., Mahler, B. W., Herbert, R. A., & Keenan, C. M. (2019a). Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Hematolymphoid System. *Toxicologic Pathology*, 47(6), 665-783. <https://doi.org/10.1177/0192623319867053>

