



**UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” din BUCUREȘTI**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR**

# **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**NANOBIOMATERIALE MULTIFUNCȚIONALE**

**MULTIFUNCTIONAL NANOBIMATERIALS**

**Autor: MSc. Ing. Roxana Cristina Popescu**

**Conducător de doctorat: Prof. Dr. Ing. Ecaterina Andronescu**

## **COMISIA DE DOCTORAT**

Președinte	Prof. Dr. Ing. Adelina Ianculescu	de la	Universitatea “POLITEHNICA” din București
Conducător de doctorat	Prof. Dr. Ing. Ecaterina Andronescu	de la	Universitatea “POLITEHNICA” din București
Referent	Prof. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc	de la	Universitatea din București
Referent	Conf. Dr. Ing. Alexandru Mihai Grumezescu	de la	Universitatea “POLITEHNICA” din București
Referent	C.S.I. Dr. Mihai Radu	de la	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Fizică și Inginerie Nucleară “Horia Hulubei”

**BUCUREȘTI**  
**2020**

## Cuprins

### CAPITOLUL I.

<b>Studiul critic al datelor de literatură</b> .....	8
I.1. Introducere.....	8
I.2. Progresul actual în funcționalizarea nanoparticulelor de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> pentru aplicații biomedicale.....	12
I.1.1. Funcționalizarea cu agenți anorganici a nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	13
I.1.2. Funcționalizarea cu carbon a nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	17
I.1.3. Funcționalizarea cu agenți organici a nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	17
I.3. Modele tumorale preclinice <i>in vitro</i> (2D și 3D) pentru evaluarea nanoparticulelor de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	28
I.3.1. Modele tumorale preclinice <i>in vitro</i> 2D pentru evaluarea nanoparticulelor de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	28
I.3.2. Modele tumorale preclinice <i>in vitro</i> 3D pentru evaluarea nanoparticulelor de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	30
I.4. Stadiul actual în utilizarea nanoparticulelor de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> în oncologia preclinică și clinică .....	36
I.4.1. Sisteme de eliberare controlată pe bază de nanoparticule de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	37
I.4.2. Radiosensibilizarea utilizând nanoparticule de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	40

### CAPITOLUL II.

<b>Contribuții originale</b> .....	44
II.1. Justificarea alegerii temei.....	44
II.2. Contribuții privind proiectarea, sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	46
II.2.1. Proiectarea nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	46
II.2.2. Sinteza nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	47
II.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	49
II.2.3.1. Metode utilizate pentru caracterizarea nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	49
II.2.3.2. Nanoparticule funcționalizate <i>in situ</i> cu gemcitabină .....	53
II.2.3.3. Nanoparticule funcționalizate <i>in situ</i> cu doxorubicină.....	57
II.2.3.4. Nanoparticule funcționalizate post- sinteză cu doxorubicină .....	60
II.2.3.5. Nanoparticule funcționalizate <i>in situ</i> cu polietilen glicol.....	60
II.2.3.6. Nanoparticule funcționalizate post-sinteză cu polietilen glicol .....	66
II.2.3.7. Selectarea nanoparticulelor pentru studii biologice .....	69
II.3. Contribuții privind evaluarea potențialului de sensibilizare chimică a nanoparticulelor de tip Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	71

II.3.1. Evaluarea mecanismelor biologice pentru nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ conjugate direct cu medicament .....	71
II.3.1.1. Nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ funcționalizate in situ cu gemcitabină.....	71
II.3.1.2. Nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ funcționalizate in situ cu doxorubicină .....	86
II.3.2. Evaluarea mecanismelor biologice pentru nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ utilizate pentru încapsularea de medicament .....	92
II.4. Contribuții privind evaluarea potențialului de radio-sensibilizare a nanoparticulelor de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	104
II.4.1. Evaluarea mecanismelor biologice implicate în radioterapia urmată de tratament cu nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	104
II.4.2. Evaluarea mecanismelor biologice în radioterapia mediată de tratament cu nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	114
<b>CAPITOLUL III.</b>	
<b>Concluzii generale</b> .....	136
<b>CAPITOLUL IV.</b>	
<b>Diseminarea rezultatelor</b> .....	139
<b>CAPITOLUL V.</b>	
<b>Bibliografie</b> .....	143

**Listă de notații**

NP	nanoparticule
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	magnetită
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agenția de Administrare a Alimentelor și Medicamentului din Statele Unite ale Americii)
PEG	poli(etilen glicol)
@	<i>core-shell</i> (miez-înveliș)
RMN	imagistica de rezonanță magnetică nucleară
CT	computer tomograf
ADN	acidul dezoxiribonucleic
GEM	gemcitabină
DOX	doxorubicină
SAED	<i>selected area electron diffraction</i> (difracție de electroni pe arie selectivă)
TEM	microscopie electronică prin transmisie
ATD	analiză termogravimetrică
EDX	<i>spectroscopia de radiație X cu dispersie în energie</i>
SEM	microscopie electronică de baleiaj
PIXE	<i>Particle-induced X-Ray emission</i>
XRD	difracție de raze X
MTT	bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazoliu)
PI	iodură de propidiu
BrdU	Bromodeoxiuridină
γ- H2AX	forma fosforilată a proteinei histonice X din familia H2A
PBS	Buffer fosfat salin
DMF	factor de modificare a dozei
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i> (Comitetul Unit pentru Standarde de Difracție pe Pulberi)
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Ser fetal bovin
Pimo	Pimonidazol
2D	bi-dimensional
3D	tri-dimensional

**Cuvinte cheie:** *nanoparticule de magnetită, anti-tumoral, chimiosensibilizare, radiosensibilizare.*



## Mulțumiri

*În vederea elaborării Lucrării de Doctorat intitulată “Nanobiomateriale multifuncționale” am beneficiat de colaborarea cu mai mulți cercetători de excepție din țară și respectiv din străinătate cărora doresc să le adresez mulțumiri. Experimentele prezentate au fost derulate în cadrul Universității Politehnica București (UPB) în colaborare cu Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară “Horia Hulubei” (IFIN-HH), Facultatea de Medicină din Mannheim a Universității din Heidelberg (UMM) și Universitatea de Medicină din Viena (MUW).*

*În primul rând, doresc să îi mulțumesc doamnei Prof. Ecaterina Andronescu pentru coordonarea activității mele de cercetare în vederea pregătirii Lucrării de Doctorat, dar și îndrumătorilor științifici Dr. Denisa Ficai, Dr. Bogdan Ștefan Vasile și Dr. Alexandru Mihai Grumezescu (UPB). De asemenea, le adresez mulțumiri speciale pentru îndrumare și sprijin colegilor de la IFIN-HH- Dr. Diana Iulia Savu, Dr. Mihaela Temelie, Dr. Mihai Radu și Dr. Ioan Dorobanțu și domnului Prof. Anton Ficai de la UPB.*

*Mulțumesc membrilor comisiei de evaluare a Doctoratului: doamnei președinte Prof. Adelina Ianculescu, și membrilor Prof. Mariana Carmen Chifiriuc, Dr. Alexandru Mihai Grumezescu și Dr. Mihai Radu.*

*Doresc să mulțumesc domnilor Prof. Marlon R. Veldwijk, Dr. Carsten Herskind (UMM) Prof. Wolfgang Doerr și domnișoarei Dr. Verena Kopatz (MUW) pentru îndrumare și ajutor în realizarea studiilor de radio-sensibilizare cu nanoparticule.*

*Nu în ultimul rând, mulțumesc următorilor colaboratori pentru facilitarea accesului și ajutorul acordat în vederea realizării unor analize fizico-chimice: Prof. Georgeta Voicu, Ing. Roxana Trușcă, Dr. Bogdan Ștefan Vasile (UPB), Dr. Mihai Straticiuc, Dr. Dragoș Mirea, Ing. Radu-Florin Andrei (IFIN-HH), Dr. Adina Boldeiu (Institutul de Microtehnologie București), Tehn. Hiltraud Hosser (UMM). Doresc să adresez mulțumiri pentru colaborare către: Dr. Irina Păun, Dr. Cătălin Luculescu, Ing. Oana Gherasim și Dr. Gabriel Socol (Institutul Național pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației).*

*Mulțumiri speciale doresc să adresez familiei pentru sprijinul moral și înțelegerea acordate cu privire la activitatea mea de cercetare.*

*Pentru finanțarea experimentelor prezentate în această lucrare mulțumesc Ministerului Educației și Cercetării din România (grant nr. PN18090202/2018 și PN19060203/2019), Serviciului de Schimb Academic German - Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) (grant nr. 57299291), Ministerului Federal al Educației, Științei și Cercetării din Austria-Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung, prin Agenția Austriacă pentru Cooperare Internațională în Educație - OeAD (grant nr. ICM-2018-10056) și Ministerului Fondurilor Europene din România (Programul Operațional Capital Uman- acord financiar 51668/ 09.07.2019, cod SMIS 124705).*

*Autoarea*

## I. Studiul critic al datelor de literatură

În ultimii ani, nanoparticulele (NP) de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) au atras un deosebit interes, în special în zona aplicațiilor medicale orientate spre implementare clinică, multe dintre acestea fiind deja aprobate spre utilizare de către Agenția de Administrare a Alimentelor și Medicamentului din Statele Unite ale Americii (*Food and Drug Administration*, FDA) în aplicații precum diagnosticarea clinică [1], tratamentul cancerului prin hipertermie [2] sau combaterea deficiențelor de fier (Fe) [3]. Acest fapt a fost posibil datorită următoarelor proprietăți: biocompatibilitatea [4], biodegradabilitatea [5], proprietățile magnetice [6] și ușurința în funcționalizare [7]. Pe lângă proprietățile avantajoase pe care le prezintă, nanoparticulele de magnetită au niște dezavantaje majore, date de aglomerarea rapidă, reactivitatea chimică, energia de suprafață ridicată, oxidarea, ceea ce poate altera biocompatibilitatea acestora, proprietățile și performanța. Pentru a preveni aceste evenimente nedorite, diferite metode de funcționalizare a suprafeței au fost aplicate [8].

Diferite încercări de funcționalizare a nanoparticulelor de magnetită au fost întreprinse în literatura de specialitate. Printre acestea, conjugarea nanoparticulelor de magnetită cu polimeri poate fi realizată atât prin metode *in situ*, cât și post-sinteză. Este des întâlnit în cazul metodei de co-precipitare pentru sinteza de nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  să se introducă molecule de polimer în soluția de precipitare, pentru a determina simultan nucleația, creșterea și funcționalizarea nanoparticulelor [9, 10]. În acest caz, apar în special legături non-covalente (forțe electrostatice) între polimeri și nanoparticulele de magnetită. Această metodă este preferată în cazul aplicațiilor pentru livrarea de medicamente. Pe de altă parte, metoda de funcționalizare post-sinteză pornește de la nanoparticule de magnetită sintetizate anterior, care pot fi conjugate cu diferiți polimeri prin intermediul grupărilor hidroxil existente pe suprafața lor. Acestea sunt de cele mai multe ori reacții de condensare, o posibilitate fiind formarea de legături esterice.

În dezvoltarea unei aplicații medicale bazate pe nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  este important să se demonstreze funcționalitatea sistemului propus, iar acest fapt se realizează inițial pentru modele biologice simple, care simulează anumite condiții din organismul uman. În general, acest proces de evaluare începe cu testarea *in vitro*, realizată pe diferite culturi de celule relevante pentru studiu, într-un mediu controlat. În mod convențional, acestea sunt de tip 2D. Culturile de celule sunt modele excelente pentru studiile mecanistice de biologie celulară și moleculară, ale fiziologiei și biochimiei celulelor, efecte ale medicamentelor și compușilor toxici, respectiv mutagenză și carcinogenză. Comparativ cu modelele 2D *in vitro*, modelele 3D au câteva avantaje majore ce provin din faptul că celulele tumorale sunt organizate similar ca în modelele *in vivo*. Astfel, expresia proteică, cea genică, gradientul de proteine, semnalizarea celulară, migrarea celulară și răspunsul la tratamentul medicamentos sunt similare cu cele întâlnite *in vivo*.

O potențială abordare în îmbunătățirea eficienței tratamentului cancerului este folosirea nanotehnologiei. Avantajul utilizării nanoparticulelor este acela că, odată ajunse în circulația sistemică, pot să atingă zona țintă, țesutul tumoral, nu doar printr-un transport pasiv, ca majoritatea farmaceuticelor disponibile clinic, ci poate fi implementat un transport activ, specific. Astfel, transportul pasiv se referă la efectul de permeabilitate și retenție mărită în zona tumorală, ce este explicat prin defectele existente în arhitectura vaselor de sânge din această zonă, dar și a drenajului limfatic defectuos. Transportul activ, pe de altă parte, poate fi obținut fie prin ghidaj magnetic sau prin aplicarea diferiților agenți de funcționalizare care să asigure specificitate nanoparticulelor pentru a se prinde de receptori de pe suprafața celulelor țintă.

Conjugarea cu alți compuși poate îmbogăți multi-funcționalitatea acestor nanomateriale și implementarea de proprietăți, precum internalizarea crescută și/sau specifică în celule canceroase [11, 12], dar poate ajuta și la modularea profilului de eliberare a substanței active:

(1) prin protejarea medicamentului, (2) prin întârzierea eliberării sau (3) prin eliberarea substanței active la comandă (mediată de pH, temperatură, lumină, enzime biologice, etc.). În acest sens, polietilen glicolul (PEG) a fost utilizat în mod intensiv în aplicațiile farmacologice datorită proprietăților precum: (1) solubilitatea ridicată în medii apoase; (2) minimizarea fenomenului de opsonizare; (3) funcția de *spacer* pentru diferite molecule și agenți de țintire, care minimizează interacțiunile non-specifice.

Terapia cancerului ce utilizează radiație presupune livrarea unei doze mari în zona tumorală, astfel încât creșterea celulelor tumorale să fie maxim inhibată, dar, în același timp, încercând să se protejeze celulele sănătoase înconjurătoare. Atunci când se folosesc elemente cu număr atomic mare ca și radio-sensibilizatori, acestea absorb majoritatea radiației, față de țesutul înconjurător și, datorită efectelor fotoelectric și Compton, eliberează fotoni cu energie redusă, electroni secundari Auger și electroni secundari de energie redusă. Aceste radiații secundare cresc producția de specii reactive de oxigen, însă, în cazul nanoparticulelor ce pot interacționa direct cu ADN-ul, este favorizată formarea interacțiunilor, a legăturilor sau intercalarea în lanțul ADN [13]. În cea ce privește efectele biologice, radio-sensibilizarea se manifestă prin influența asupra a trei căi de semnalizare celulară implicate în: (1) stresul oxidativ, (2) disrupția ciclului celular și respectiv (3) inhibarea reparării ADN-ului [14].

În ciuda interesului crescut pentru utilizarea nanoparticulelor ca sisteme de eliberare controlată și radiosensibilizatori în practica clinică, implementarea acestora nu a fost realizată încă [15]. Unul dintre neajunsurile care împiedică translația în clinică a acestor aplicații medicale o reprezintă țintirea non-specifică. O altă problemă o reprezintă abilitatea de reținere intracelulară a nanoparticulelor în urma penetrării stratului bilipidic și a trecerii în compartimentele citoplasmice.

## II. Contribuții originale

### Justificarea alegerii temei

Cancerul este o patologie complexă determinată de lezarea persistentă a unui țesut sau de interacțiuni de tip gazdă-mediu. În 2017, la nivel mondial, cancerul a reprezentat cea de a doua cauză a mortalității după bolile cardiovasculare [16, 17]. În România, la nivelul anului 2018 au fost înregistrate peste 80000 noi cazuri de cancer [18]. În acest context, una dintre preocupările majore în ceea ce privește cercetarea biomedicală o reprezintă dezvoltarea de noi metode pentru tratamentul cancerului, care să aducă un răspuns îmbunătățit, în condițiile reducerii efectelor adverse și al sporirii confortului pacientului.

**Scopul principal** al prezentei lucrări a fost de a construi și evalua nano-sisteme multifuncționale pe bază de nanoparticule de magnetită pentru eliberarea de substanțe active (chimioterapeutice) în vederea modulării chimice și radiologice a răspunsului celulelor tumorale.

### Obiective specifice:

- (1) Obținerea și caracterizarea fizico- chimică a transportorilor pe bază de magnetită; selectarea și optimizarea sistemelor;
- (2) Obținerea unui efect anti-tumoral *in vitro* al nanoparticulelor pe bază de magnetită specific unei anumite linii celulare tumorale;
- (3) Obținerea unui efect anti-tumoral în modele tumorale tri-dimensionale *in vitro* al nanoparticulelor pe bază de magnetită;
- (4) Măsurarea eficienței de internalizare a nanoparticulelor pe bază de magnetită în raport cu prezența sau absența radiației ionizante;

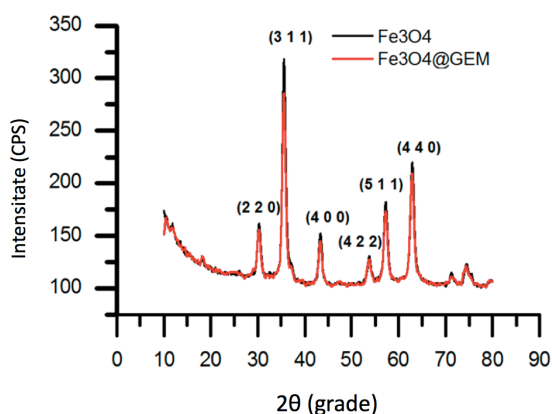
- (5) Caracterizarea mecanică a eficienței de internalizare a nanoparticulelor pe bază de magnetită în raport cu prezența sau absența radiației ionizante;
- (6) Obținerea unui efect anti-tumoral *in vitro* al nanoparticulelor pe bază de magnetită în prezența sau absența radiației ionizante;
- (7) Caracterizarea mecanică a acțiunii nanoparticulelor pe bază de magnetită, în prezența sau absența radiației ionizante, în raport cu efectele asupra stării celulelor tumorale (fază a ciclului celular sau moarte celulară).

### Contribuții privind proiectarea, sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$

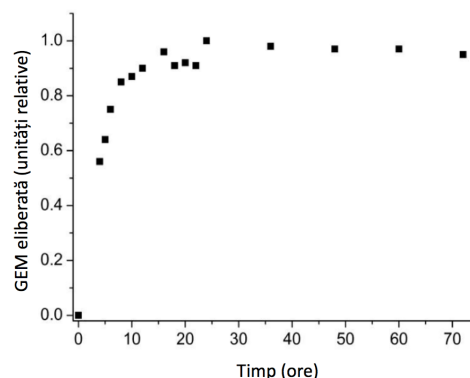
Pentru sinteza nanoparticulelor de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizate în acest studiu, s-a ales metoda coprecipitării [19], datorită avantajelor pe care le prezintă, precum reproductibilitate, randament mare al sintezei, ușurința de realizare și costurile scăzute. În vederea funcționalizării acestor nanoparticule au fost abordate ambele metode, *in situ*, respectiv post-sinteză. De asemenea, medicamentul cu efect anti-tumoral a fost introdus în sistemul pe bază de nanoparticule de magnetită, prin: (1) conjugare directă de grupările funcționale terminale ale  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , utilizând ambele abordări *in situ* și post-sinteză, cât și (2) înglobare într-un strat polimeric.

### Nanoparticule funcționalizate *in situ* cu gemcitabină

Caracterizarea gradului de cristalinitate și identificarea probelor rezultate a fost realizată cu ajutorul difracției de raze X (XRD) (Fig. II.1) și a difracției de electroni pe arie selectată (SAED) (Fig. II.3. C). Interferențele de difracție au fost indexate utilizând fișa JCPDS nr. 19-0629, ca fiind corespunzătoare pentru magnetită. Prezența substanței chimioterapeutice organice nu a afectat cristalinitatea nanoparticulelor și nu a indus alte modificări semnificative în ceea ce privește compoziția fazală a probelor.



**Fig. II.1.** Spectrul de difracție de raze X al  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GEM$ ; [20]

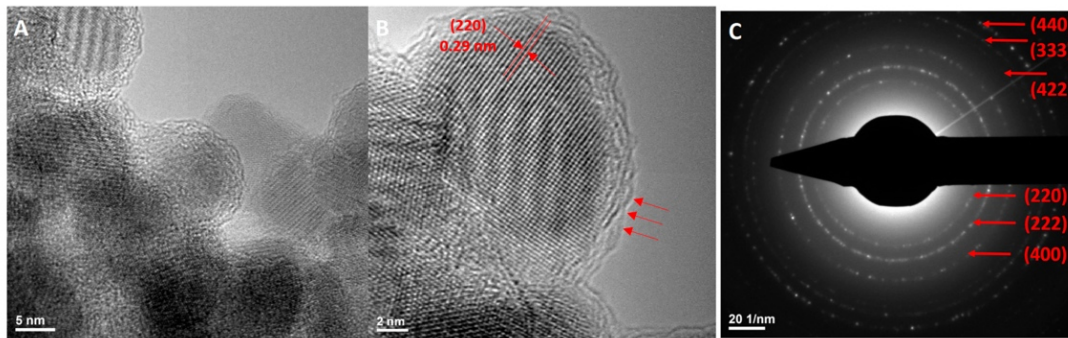


**Fig. II.2.** Cinetica de eliberare a medicamentului Gemcitabină din nanoparticule de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GEM$ ; [20]

Analiza termogravimetrică a fost utilizată pentru a măsura cantitatea fazei organice de gemcitabină, ce interacționează cu nanoparticulele de magnetită, pe baza diferenței de masă ce a rezultat în urma tratamentului termic aplicat  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GEM$ . Astfel, a rezultat o reducere a masei de 6,8% datorată degradării GEM.

Microscopia electronică prin transmisie (TEM) (Fig. II.3) a dat mai multe informații cu privire la morfologia și cristalinitatea nanoparticulelor, funcționalizate și nefuncționalizate. Din imaginile de înaltă rezoluție TEM (Fig. II.3. B), un grad înalt de cristalinitate pentru ambele probe a fost observat, în cazul nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GEM$ , Gemcitabina acoperind individual fiecare nanoparticulă, formând un strat amorf și continuu la suprafața  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,

rezultând structuri de tip *core-shell*. Fig. II.3.B evidențiază planul cristalin (220) de 0,29 nm, caracteristic pentru faza magnetită [21].



**Fig. II.3.** Imagini (A) TEM, (B) HRTEM și (C) spectru SAED pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$ . [20]

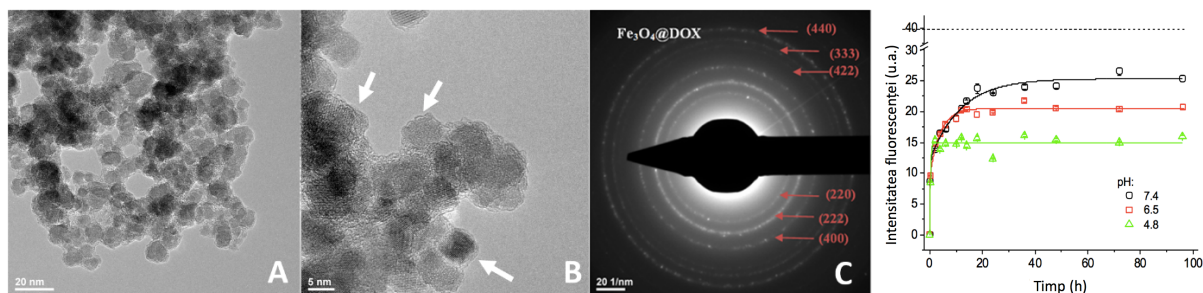
Comportamentul nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcționalizate cu GEM în două medii de cultură pentru celule (DMEM și MEM) a fost evaluat, prin investigarea stabilității nanoparticulelor și a diametrelor hidrodinamice pentru un interval de diluții de la 0,25 la 0,025% nanoparticule. A fost evidențiată stabilitatea coloidală înaltă a soluțiilor *stock* (1% nanoparticule în apă distilată): potențialul Zeta -32,69 mV, diametrul hidrodinamic mediu 176,9( $\pm$ 15) nm. Diametrele hidrodinamice ale  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  în DMEM complet au fost cuprinse în intervalul 218-280 nm și potențialul Zeta între -12 și -23 mV pentru intervalul de concentrații investigat. Nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  suspendate în MEM complet au demonstrat valori ale potențialului zeta peste 20 mV și o stabilitate ridicată, în comparație cu suspensiile realizate în DMEM, pe când diametrul hidrodinamic a fost între 238 și 270 nm. Indicii de polidispersitate au fost mai mici ca 0,3, ceea ce este un indicator pentru sisteme monodisperse [22]. Nanoparticulele de magnetită funcționalizate cu GEM au demonstrat eliberarea medicamentului în mediul înconjurător în primele 24h, asigurând în mod potențial o prezență mai îndelungată a medicamentului în fluxul sangvin.

### Nanoparticule funcționalizate *in situ* cu doxorubicină

Difracția de raze X a dus la obținerea unui spectru caracteristic fazei minerale magnetită (standardul JCPDS numărul 19-0629 [23]), fără a se detecta prezența unei alte faze secundare. De asemenea, introducerea doxorubicinei în sistemul de reacție nu a afectat compoziția sau cristalinitatea probelor. Cantitatea de medicament care a interacționat cu nanoparticulele de oxid de fier a fost determinată prin analiza termogravimetrică și a fost de 0,415% doxorubicină.

Investigațiile TEM și HR-TEM au evidențiat prezența doxorubicinei în nanoparticulele conjugate, formând o masă slab cristalină continuă în jurul agregatelor înalt cristaline (Fig. II.4. B) rezultând structuri de tip *core-shell*. Gradul înalt de cristalinitate (Fig. II.4. C) a fost confirmat prin metoda de difracție a electronilor pe arie selectată (SAED). Spectrele SAED au fost în concordanță cu spectrele XRD. Analizele de difracție cu raze X, HR-TEM și SAED au demonstrat că prezența doxorubicinei în mediul de reacție nu a modificat cristalinitatea și nici compoziția compusului obținut.

Comportamentul  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  în mediu biologic a fost studiat prin măsurarea potențialului Zeta și a diametrului hidrodinamic al constructelor, utilizând mediu MEM complet în condiții standard de temperatură și umiditate. Nanoparticulele de magnetită conjugate cu doxorubicină au demonstrat a fi înalt stabile (potențial Zeta -36,79 mV) și au avut un diametru hidrodinamic de 108,3 nm. Măsurătorile diluțiilor  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  în mediul de cultură (500, 100, respectiv 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) au arătat o bună stabilitate a nano-constructelor încărcate negativ (potențial zeta -26,67 mV pentru cea mai mare concentrație).



**Fig.II.4.** TEM, HR-TEM și SAED pentru nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (A-C), respectiv pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  (D-F). Cinetica de eliberare a doxorubicinei din  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  în medii cu valori diferite ale pH-ului; datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM; linia punctată marchează intensitatea fluorescenței măsurată într-o soluție de DOX de concentrație echivalentă cu cea înglobată în  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ ; figură adaptată după [24];

Studiul cineticii de eliberare a doxorubicinei în medii cu pH relevant biologic a relevat că substanța chimioterapeutică este eliberată gradual în PBS până la 72 h de incubare având o eliberare exponențială în primele 16h (Fig. II.4. dreapta). Rezultatele au demonstrat că medicamentul este eliberat într-o manieră invers proporțională cu pH-ul mediului în care s-a realizat măsurătoarea.

### Nanoparticule funcționalizate post-sinteză cu doxorubicină

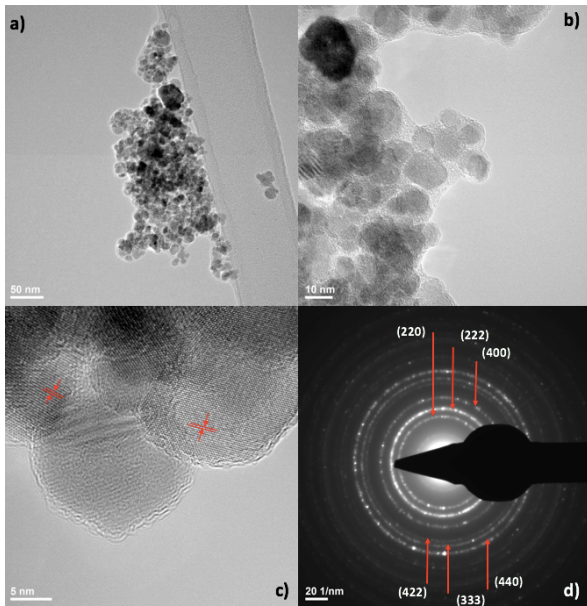
Măsurătorile spectrofotometrice realizate pentru restul mediului apos în care s-a realizat înglobarea medicamentului doxorubicină în nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , au demonstrat că o cantitate nesemnificativă de DOX a interacționat cu aceste nanoparticule, atât după 24, cât și după 48h timp de reacție. Mai mult, investigațiile de fluorimetrie au susținut aceste observații.

### Nanoparticule funcționalizate *in situ* cu polietilen glicol

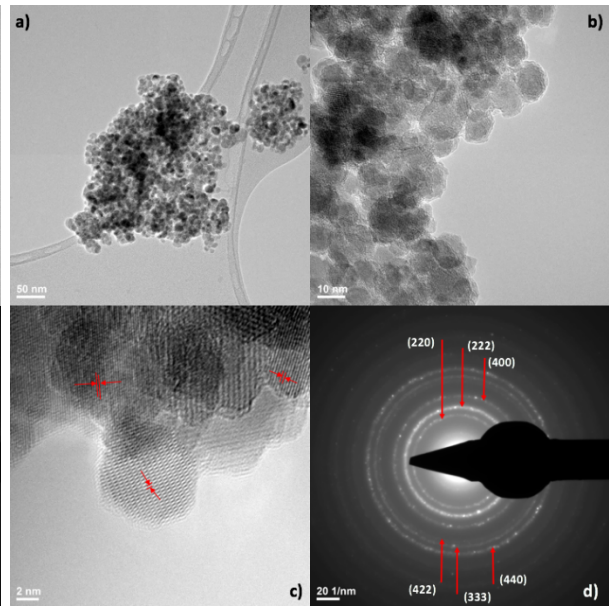
Difracția de raze X a fost utilizată a determinat identificarea interferențelor de difracție corespunzătoare pentru magnetită (fișa JCPDS nr. 19-0629), precum și gradul înalt de cristalinitate al nanoparticulelor. Aceste observații au fost confirmate prin spectrele SAED și microscopia HR-TEM (Fig. II.5- II.8. c-d). Microscopia electronică prin transmisie a fost utilizată pentru a evalua morfologia nanoparticulelor de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcționalizate *in situ* cu polietilen glicol de diferite mase moleculare. Astfel, nanoparticulele  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - PEG 4K, 6K, respectiv 20K au prezentat o morfologie sferică (Fig. II.5, II.6, II.7), având diametre:  $11,028\pm 2,447$  nm pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - PEG 4K,  $12,33\pm 2,748$  nm pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - PEG 6K, respectiv  $12,932\pm 4,023$  nm pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - PEG 20K. Prin creșterea masei moleculare a polimerului la 35K, morfologia nanoparticulelor a fost puternic afectată, acestea crescând în dimensiune ( $17,523\pm 10,55$ ) și având o formă rombică (Fig. II.8). În plus, a fost observată prezența unor nanoparticule de dimensiuni foarte mici și formă sferică (Fig. II.8), ce au rezultat probabil datorită unei funcționalizări incomplete.

Eficiența de înglobare a medicamentului DOX în nanoparticulele rezultate a fost determinată prin măsurători spectrofotometrice. Măsurătorile au demonstrat un efect dependent de masa moleculară a polimerului și de timpul de înglobare. Un efect semnificativ a fost observat în cazul probei  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG 6K pentru care s-a obținut o eficiență de înglobare a medicamentului de 24,48% la 24h, respectiv 40,95% la 48h [25].

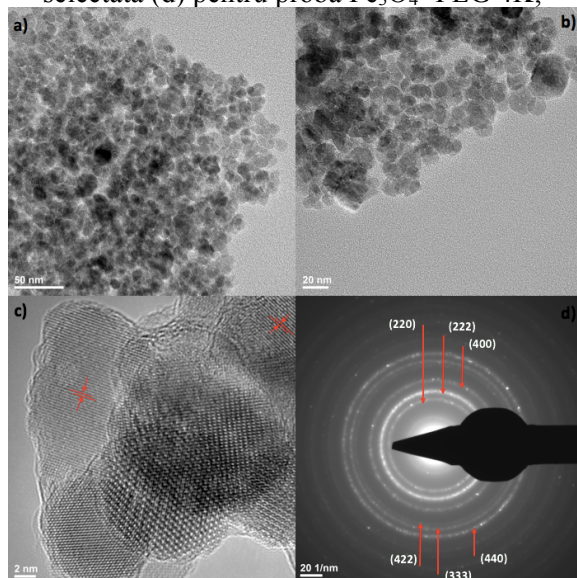




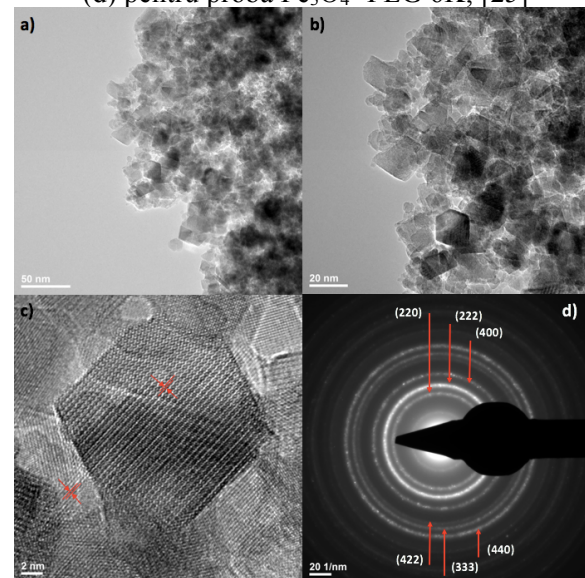
**Fig. II.5.** Imagini de microscopie electronică prin transmisie (a, b), microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție (c), respectiv spectrul de difracție de electroni pe arie selectată (d) pentru proba Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- PEG 4K;



**Fig. II.6.** Imagini de microscopie electronică prin transmisie (a, b), microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție (c), respectiv spectrul de difracție de electroni pe arie selectată (d) pentru proba Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- PEG 6K; [25]



**Fig. II.7.** Imagini de microscopie electronică prin transmisie (a, b), microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție (c), respectiv spectrul de difracție de electroni pe arie selectată (d) pentru proba Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- PEG 20K;



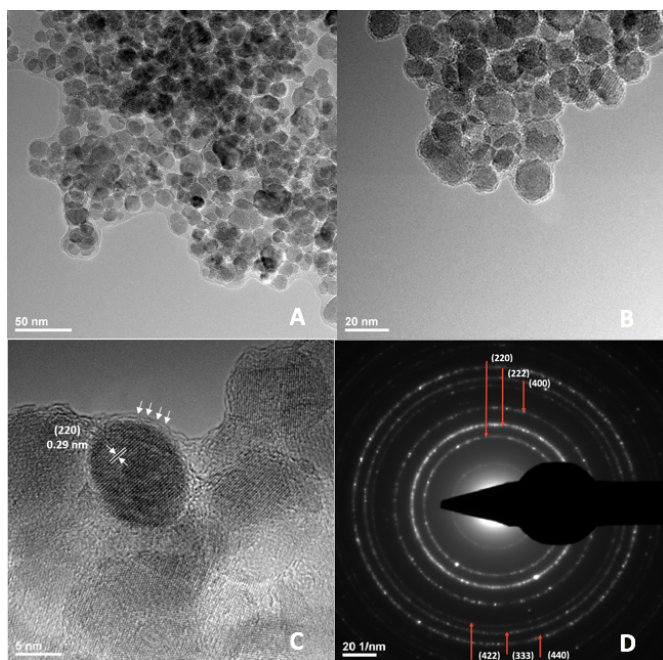
**Fig. II.8.** Imagini de microscopie electronică prin transmisie (a, b), microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție (c), respectiv spectrul de difracție de electroni pe arie selectată (d) pentru proba Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- PEG 35K;

### Nanoparticule funcționalizate post-sinteză cu polietilen glicol

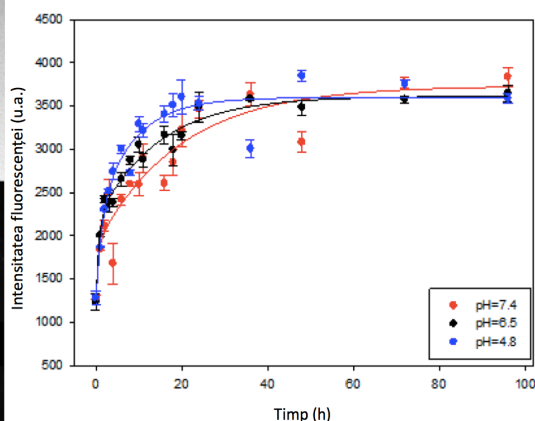
Obținerea Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/ DOX a fost realizată printr-o metodă de sinteză în trei etape, rezultând nanoparticule cu un grad înalt de cristalinitate (Fig. II.9. A-C); acestea au prezentat inele de difracție caracteristice pentru faza mineralogică magnetică cu structură spinelică, de tip cubic cu fețe centrate (Fig. II.9. D)). Microscopia HR-TEM a confirmat datele referitoare la cristalinitatea nanoparticulelor și au evidențiat prezența planului (220) de 0,29 nm grosime (Fig.

II.9. D), caracteristic fazei mineraloge magnetită. Funcționalizarea post-sinteză a nanoparticulelor de oxid de Fe cu polietilen glicol a determinat acoperirea individuală a NP cu o fază organică de cristalinitate redusă, formând structuri de tip *core-shell*, precum în imaginile de microscopie HR-TEM (Fig. II.9. A-C, stratul de PEG fiind evidențiat cu săgeți albe). Eficiența de înglobare a medicamentului DOX în Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/ DOX a arătat o valoare de 1,11 wt%.

Diametrul hidrodinamic mediu măsurat a fost de 164,2 nm, iar măsurătorile de potențial Zeta au arătat o bună stabilitate (14,8 mV pentru soluțiile stoc, fără un tratament prealabil cu ultrasunete). Cu toate acestea, încărcarea DOX a determinat o creștere a diametrului hidrodinamic și o modificare a sarcinii de suprafață către valori negative. Ambele constructe au fost sisteme de tip monodispers. Experimentele de eliberare au fost realizate în trei medii cu valori diferite ale pH-ului, nanoparticulele Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG6K/ DOX demonstrând o eliberare inițială rapidă ce a fost independentă de valoarea pH-ului mediului (Fig. II.10).



**Fig. II.9.** Caracterizarea structurală și compozițională a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K: (A) microscopie electronică prin transmisie (TEM), bară de măsură de 50 nm; (B) imagine TEM, bară de măsură de 20 nm; (C) microscopie TEM de înaltă rezoluție, bara de măsură 5 nm; (D) spectrul de difracție de electroni pe arie selectată (SAED); [26]



**Fig. II.10.** Eliberarea DOX din constructele Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG6K/ DOX la 37°C (0-96h); [26]

### Selectarea nanoparticulelor pentru studii biologice

În vederea selectării unor nanoparticule, dintre cele sintetizate anterior, pentru realizarea de studii biologice de chimio- și/sau radio-sensibilizare a celulelor tumorale, s-au urmărit o serie de parametri rezultați în urma caracterizării fizico-chimice a acestora, dar și în urma unei caracterizări biologice preliminare.

Inițial, studiul a pornit cu utilizarea a două medicamente cu efect anti-tumoral, anume gemcitabină și doxorubicină. Datorită aplicabilității în tratamentul unei game variate de cancer și a proprietății de fluorescență nativă, ce facilitează vizualizarea, s-a selectat medicamentul cu efect chimioterapeutic doxorubicină ca și substanță activă-model în realizarea sistemelor nanostructurate pe bază de nanoparticule de magnetită pentru sensibilizarea chimică și radio-sensibilizarea celulelor tumorale.



În ceea ce privește nanoparticulele de magnetită funcționalizate cu PEG, studiile de caracterizare a NP obținute prin conjugare *in situ* au relevat o variabilitate în ceea ce privește morfologia și omogenitatea probelor rezultate. Cel mai bun comportament biologic *in vitro* a fost obținut pentru proba Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG 6K, având valori peste 80% ale viabilității la 48h. În ceea ce privește metoda de funcționalizare, conjugarea post-sinteză a fost preferată în detrimentul celei *in situ*, întrucât în urma acestei metode au rezultat nanoparticule de tip *core-shell*, cantitatea totală de DOX înglobată în 24h fiind de 1,11 wt% [26], pe când nanoparticulele Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG 6K/DOX (funcționalizare *in situ*) au înglobat o cantitate de 0,49 wt% DOX [25].

### **II.3. Contribuții privind evaluarea potențialului de sensibilizare chimică a nanoparticulelor de tip Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

#### **II.3.1. Evaluarea mecanismelor biologice pentru nanoparticule de tip Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> conjugate direct cu medicament**

##### **II.3.1.1. Nanoparticule de tip Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> funcționalizate *in situ* cu gemcitabină**

Citotoxicitatea nanoparticulelor de magnetită funcționalizate cu GEM (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GEM) a fost evaluată pentru trei modele tumorale umane: BT474 carcinom mamar ductal uman (Fig. II.12), HepG2 carcinom hepatocelular uman (Fig. II.13) și MG63 osteosarcom uman (Fig. II.14). Pentru a caracteriza aceste efecte, a fost ales un test *in vitro* bazat pe săruri de tetrazoliu, ce vizează viabilitatea celulară. Efectul citotoxic al Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GEM asupra celulelor tumorale a fost caracterizat prin comparația cu nanoparticule de magnetită și tratamentul cu GEM neconjugată, în concentrații echivalente, pentru trei perioade de analiză (24, 48, respectiv 72 h). Concentrațiile de GEM neconjugată au fost calculate utilizând măsurătorile TGA (capitolul II.2.3.2. Nanoparticule funcționalizate *in situ* cu gemcitabină).

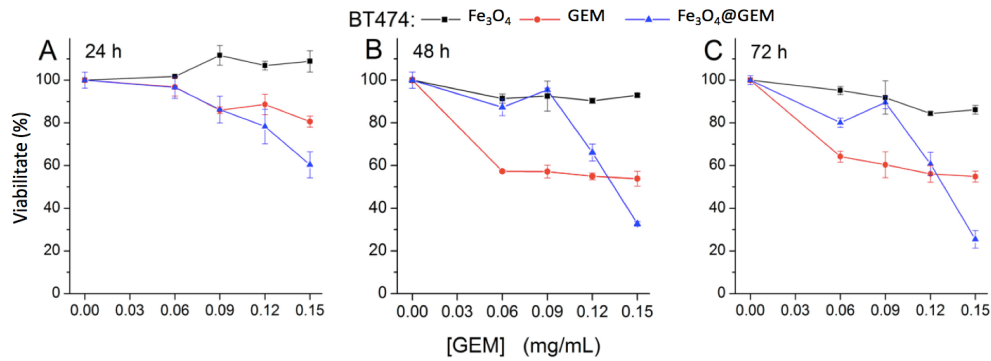
Pentru toate cele trei linii celulare, nanoparticulele nefuncționalizate de magnetită nu au prezentat schimbări semnificative în ceea ce privește viabilitatea, pentru toate perioadele de expunere investigate (Fig. II.12- II.14, graficele marcate cu pătrate de culoare neagră). Într-adevăr, nanoparticulele de magnetită s-au dovedit a fi biocompatibile (viabilitatea nu a fost mai scăzută de 80%, conform ISO 10993-12:2001(E)).

În ceea ce privește Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GEM, în cazul liniei celulare BT474 (Fig. II.12), rezultatele au demonstrat că au prezentat cu efect citotoxic (viabilitatea 60%, comparativ cu controlul), începând cu 24h de tratament, pentru cea mai mare concentrație echivalentă utilizată. Efectul anti-tumoral a devenit mult mai pronunțat cu timpul, la 48 și 72 h după tratament. Activitatea medicamentului, fie liber sau conjugat cu nanoparticule, a fost dependentă de timp și doza administrată. Un efect potențator al nanoconjugatului, comparativ cu GEM liberă a fost observat pentru cea mai mare concentrație (0,15 mg/mL GEM concentrație echivalentă) pentru toate intervalele de timp utilizate (Fig. II.12).

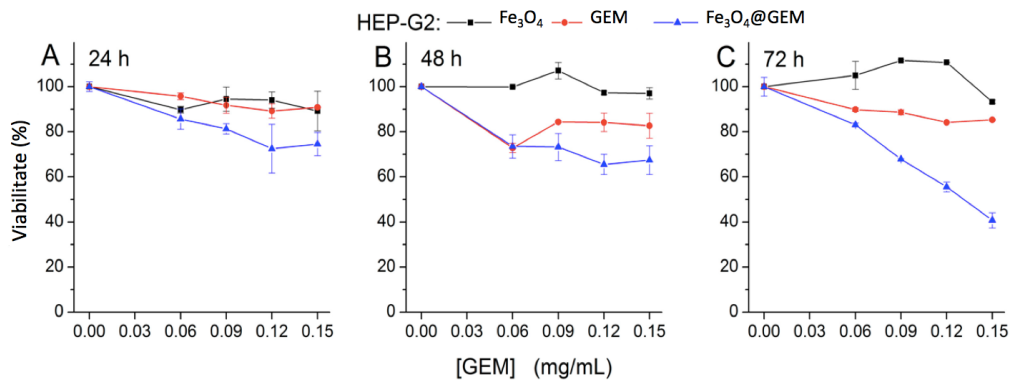
Pentru celulele de tip HepG2 (Fig. II.13), la 24 și 48 h după tratament, viabilitatea celulară descrește ușor în urma tratamentului cu GEM neconjugat și Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GEM, fiind în jurul valorii de 80%, comparativ cu controlul, fără a exista o dependență semnificativă de concentrație. Pentru cea mai mare concentrație echivalentă de GEM (0,15 mg/mL), efectul produs de nano-conjugat a fost statistic semnificativ mai pronunțat față de GEM neconjugat, efectul citotoxic fiind accelerat până la 72h după tratament. La acest interval de timp, viabilitatea a scăzut cu 40%, în cazul Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GEM, comparativ cu medicamentul neconjugat, pentru cea mai mare concentrație echivalentă utilizată (Fig. II.13. C).

Linia celulară MG63 osteosarcom uman este pozitivă pentru joncțiuni gap. GEM liberă a demonstrat a fi puternic citotoxică pentru aceste tipuri de celule, începând cu cele mai scăzute

concentrații întreprinse în studiu (Fig. II.14). Activitatea citotoxică a GEM neconjugată a fost mai proeminentă decât efectul indus de nano-conjugat. Cu toate acestea,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  s-a dovedit a fi puternic citotoxic pentru cea mai mare concentrație echivalentă de GEM întreprinsă (0,12 mg/mL), determinând o viabilitate de sub 40%, după 72 h de tratament.

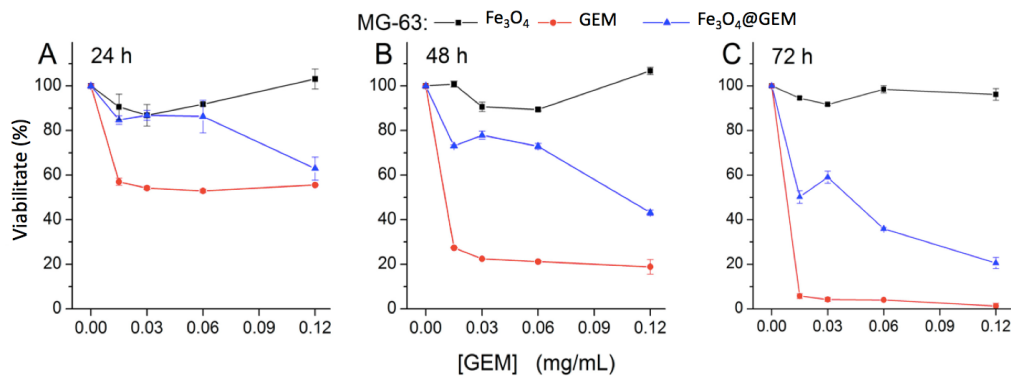


**Fig. II.12.** Viabilitatea celulară pentru BT474, incubate cu GEM neconjugată,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (concentrații echivalente de GEM), determinate la (A) 24h; (B) 48h și (C) 72h după tratament. [20].



**Fig. II.13.** Viabilitatea celulară pentru HepG2, incubate cu GEM neconjugată,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (concentrații echivalente de GEM), determinate la (A) 24h; (B) 48h și (C) 72h după tratament.

Rezultatele sunt exprimate ca procent din controlul netratat. [20].



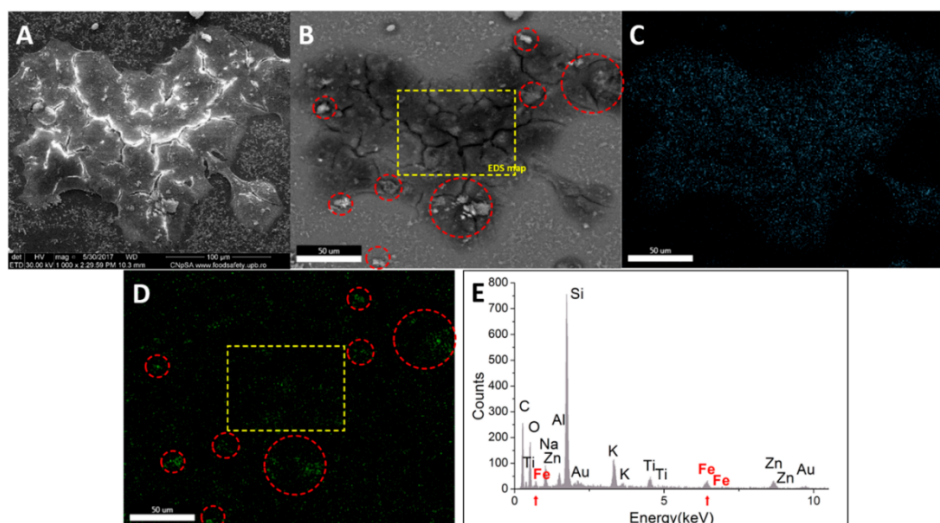
**Fig. II.14.** Viabilitatea celulară pentru MG63, incubate cu GEM neconjugată,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (concentrații echivalente de GEM), determinate la (A) 24h; (B) 48h și (C) 72h după tratament.

Rezultatele sunt exprimate ca procent din controlul netratat. [20].

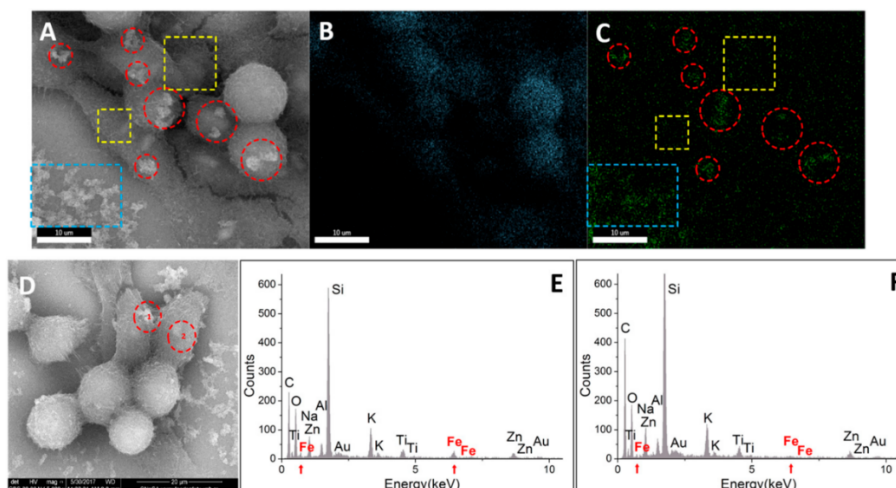
Este cunoscut faptul că, pentru GEM neconjugată, internalizarea se realizează prin intermediul transportorilor de tip nucleozide [27], în timp ce nanoparticulele anorganice pot să fie internalizate fie prin endocitoză, fie pot difuza direct în celule [28]. Modul în care nanoparticulele interacționează specific cu cinetica acestor procese poate să explice diferențele pe care le-am observat în ceea ce privește răspunsurile diferite obținute pentru fiecare linie celulară.

Pentru investigații ulterioare ale efectelor toxice date de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$ , modificări în morfologie au fost investigate. Microscopia electronică de baleiaj și spectroscopia cu energie dispersivă de raze X au fost utilizate pentru a evalua localizarea sistemelor nanostructurate în urma contactului cu celulele tumorale timp de 24h. În cazul celulelor BT474 (Fig. II.15), imaginile de morfologie rezultate pe baza semnalului provenit de la electronii secundari (Fig. II.15. B) evidențiază prezența agregatelor de nanoparticule la exteriorul celulelor (marcate cu cercuri de culoare roșie). Acest mod de analiză evidențiază elementele cu număr atomic mare ca fiind mai luminoase (precum Fe), în timp ce elementele cu număr atomic mic (precum C) sunt reprezentate cu nuanțe închise. Pătratul de culoare galbenă (Fig. II.15. B) delimitează o zonă ce este liberă de elemente luminoase, deci nu există aglomerate extracelulare de nanoparticule de Fe (prin comparație cu imaginea de morfologie, rezultată din semnalul provenit de la electronii secundari- Fig. II.15. A). Această zonă a fost supusă analizei de mapare EDX. Similar cu Fig. II.15. B, în Fig. II.15. D sunt evidențiate agregate extracelulare de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  marcate cu ajutorul pătratelor de culoare roșie (puncte de culoare verde cu intensitate luminoasă crescută). Pătratul galben evidențiază prezența aglomeratelor de Fe, ce corespund zonei din Fig. II.15. B, unde nanoparticulele de Fe nu sunt observabile în exteriorul celulei. Aceste aglomerate de Fe sunt acoperite cu un strat organic (Fig. II.15. B). De asemenea, această zonă marcată cu pătratul galben a fost supusă analizei cantitative EDX, compoziția atomică elementală prezentând o concentrație de 0,33 % at Fe, cu o eroare de 18,47%.

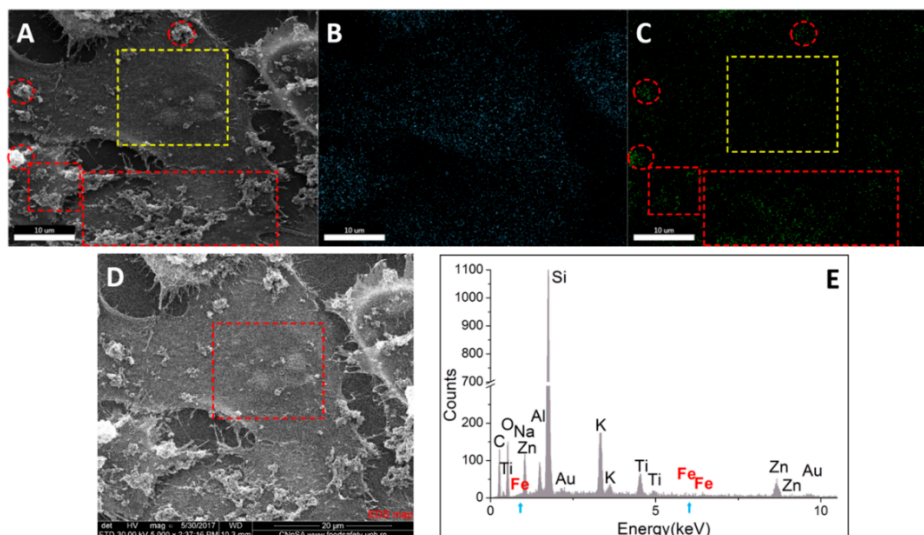
Același comportament a putut fi evidențiat și în cazul HepG2 (Fig. II.16). Aici, evaluarea cantitativă EDX a fost realizată pentru două zone care s-au distins în mod clar prin localizarea nanoparticulelor: zona 1 ce prezintă agregate de nanoparticule luminoase, situate în exteriorul membranei celulare, iar zona 2 ce prezintă o arie reprezentată în tonuri mai închise și este liberă de elemente cu număr atomic mare (Fig. II.16. D). Rezultatele pentru analiza compozițională elementală cantitativă au arătat o concentrație de 0,25% at Fe, cu o eroare de 23,09% pentru zona 1, respectiv 0,06% at Fe, cu o eroare de 62,01% pentru zona 2.



**Fig. II. 15.** Caracterizarea elementală calitativă și cantitativă pentru celule BT474 expuse la cea mai mare concentrație de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$ , după 24 h de tratament: (A) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul provenit de la electronii secundari (mărire 1000x); (B) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul de la electronii retroîmprăștiați (mărire 1000x); (C) harta elementală pentru atomii de C pentru imaginea B; (D) harta elementală pentru atomii de Fe pentru imaginea B; (E) spectrul EDX pentru imaginea B (pătrat galben); cercurile roșii marchează zone cu aglomerate extracelulare de nanoparticule; pătratul galben marchează o zonă liberă de aglomerate extracelulare de nanoparticule, ce a fost supusă analizei elementale cantitative; săgețile de culoare roșie marchează prezența Fe în zona pentru care s-a realizat analiza EDX. [20].



**Fig. II.16.** Caracterizarea elementală calitativă și cantitativă pentru celule HepG2 expuse la cea mai mare concentrație de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$ , după 24 h de tratament: (A) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul provenit de la electronii secundari (mărire 10000x); (B) harta elementală pentru atomii de C pentru imaginea A; (C) harta elementală pentru atomii de Fe pentru imaginea A; (D) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul de la electronii retroîmprăștiați (mărire 5000x); 1- zona cu aglomerate de nanoparticule, situate în exteriorul membranei celulare; 2- zona liberă de elemente cu număr atomic mare; (E) spectrul EDX pentru imaginea D (zona 1); (F) spectrul EDX pentru imaginea D (zona 2); cercurile roșii marchează zone cu aglomerate extracelulare de nanoparticule; pătratul galben marchează o zonă liberă de aglomerate extracelulare de nanoparticule; pătratul albastru marchează o zonă în care nanoparticulele au fost atașate de substratul de sticlă; săgețile de culoare roșie marchează prezența Fe în zona pentru care s-a realizat analiza EDX. [20]



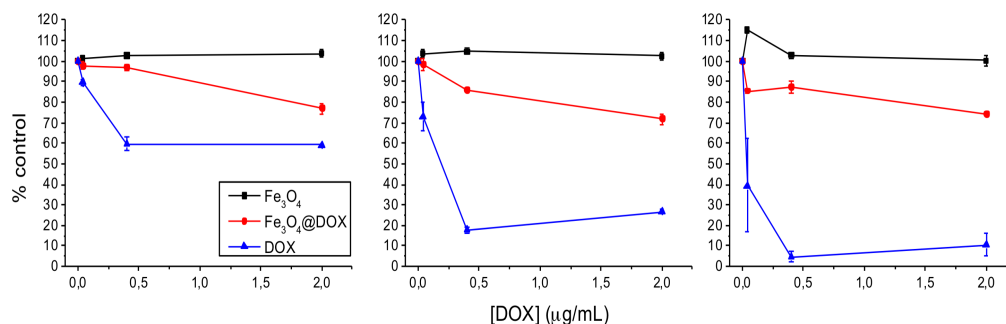
**Fig. II.17.** Caracterizarea elementală calitativă și cantitativă pentru celule MG63 expuse la cea mai mare concentrație de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$ , după 24 h de tratament: (A) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul provenit de la electronii secundari (mărire 5000x); cercurile roșii marchează zone cu aglomerate extracelulare de nanoparticule; pătratul galben marchează o zonă liberă de aglomerate extracelulare de nanoparticule; (B) harta elementală pentru atomii de C pentru imaginea A; (C) harta elementală pentru atomii de Fe pentru imaginea A; (D) imagine de morfologie rezultată folosind semnalul de la electronii secundari (mărire 5000x); pătratul roșu marchează zona ce a fost supusă analizei elementale cantitative; (E) spectrul EDX pentru imaginea D (pătrat roșu); săgețile de culoare albastră marchează absența Fe în zona pentru care s-a realizat analiza EDX. [20]

În cazul celulelor MG63 (Fig. II.17) este evidențiată disparitatea dintre zonele cu agregate extracelulare de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  (delimitate cu cercuri și pătrate de culoare roșie) și o zonă fără agregate extracelulare de nanoparticule (delimitată cu un pătrat de culoare galbenă). Harta EDX și spectrele cantitative EDX au demonstrat absența Fe din aria selectată (pătratul

galben), punctele de culoare verde cu intensitate luminoasă slabă din Fig. II.34. C fiind datorate zgomotului de fond. Aceste rezultate sugerează faptul că nanoparticulele nu au fost internalizate în celulele de tip MG63, rezultatele fiind în concordanță cu măsurătorile de viabilitate celulară, ce arată efecte citotoxice reduse (Fig. II.14).

### II.3.1.2. Nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ funcționalizate *in situ* cu doxorubicină

Efectul nanoparticulelor neconjugate și al celor conjugate cu doxorubicină prin metoda *in situ* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ ) asupra proliferării celulelor de tip osteosarcom uman MG63 au fost evaluate utilizând eficacitatea metabolică a acestor celule, prin testul cu săruri de tetrazolium MTT (Fig. II.18).  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  neconjugate nu au demonstrat citotoxicitate pentru celulele de tip MG63, la nici una dintre concentrațiile analizate, întrucât viabilitatea celulelor expuse la nanoparticule a fost aproximativ 100%, comparativ cu celulele netratate. Toxicitatea celulelor MG63 expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  a scăzut cu concentrația și timpul de expunere.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  a indus o scădere semnificativă în viabilitatea celulelor MG63 comparativ cu grupul control, dar și față de grupul expus la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nefuncționalizate în concentrații echivalente, așa cum a fost calculate cu ajutorul testului Student. În ceea ce privește răspunsul celulelor MG63 la DOX neconjugată, tratamentul timp de 24h a determinat o scădere a activității metabolice puțin sub 60%, efect semnificativ redus față de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ . După 48h de incubare în prezența DOX, celulele MG63 au demonstrat o inhibare accentuată a viabilității celulare pentru toate concentrațiile utilizate. Rezultatele testului MTT au demonstrat că, începând cu concentrația echivalentă 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  are loc o saturare a efectului de citotoxicitate, viabilitatea menținându-se constantă pentru ultimele două concentrații utilizate, la toate intervalele de timp.



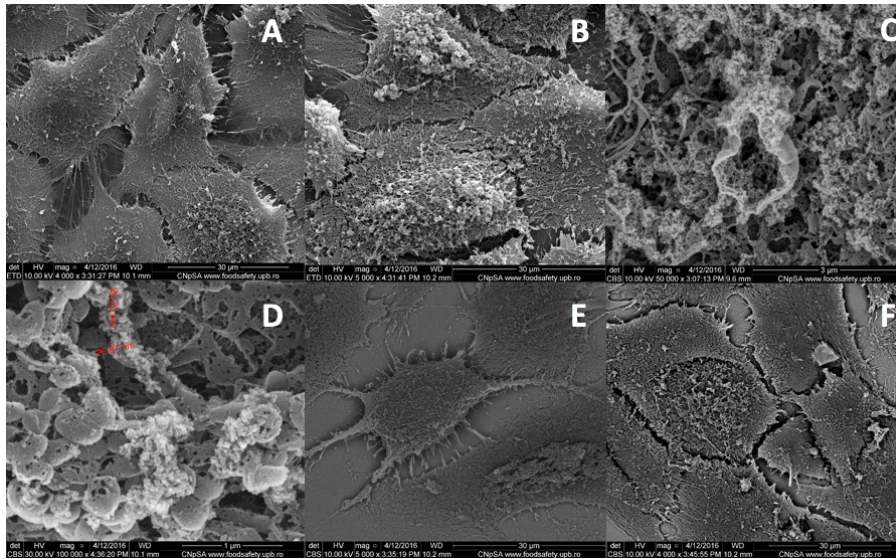
**Fig. II. 18.** MTT- viabilitatea celulelor MG63 expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  și DOX în concentrații echivalente timp de 24, 48, respectiv 72 h; date prezentate ca valoare medie  $\pm$ SEM; figură adaptată după [24];

Moartea celulară a fost cuantificată pentru a da informații cu privire la mecanismele ce au loc. Măsurătorile au arătat o creștere a numărului celulelor apoptotice ca urmare a expunerii la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  în dependență de concentrație. Numărul de celule necrotice în toate grupurile expuse tratamentului cu nanoparticule nu a demonstrat modificări semnificative statistic, comparativ cu controlul.

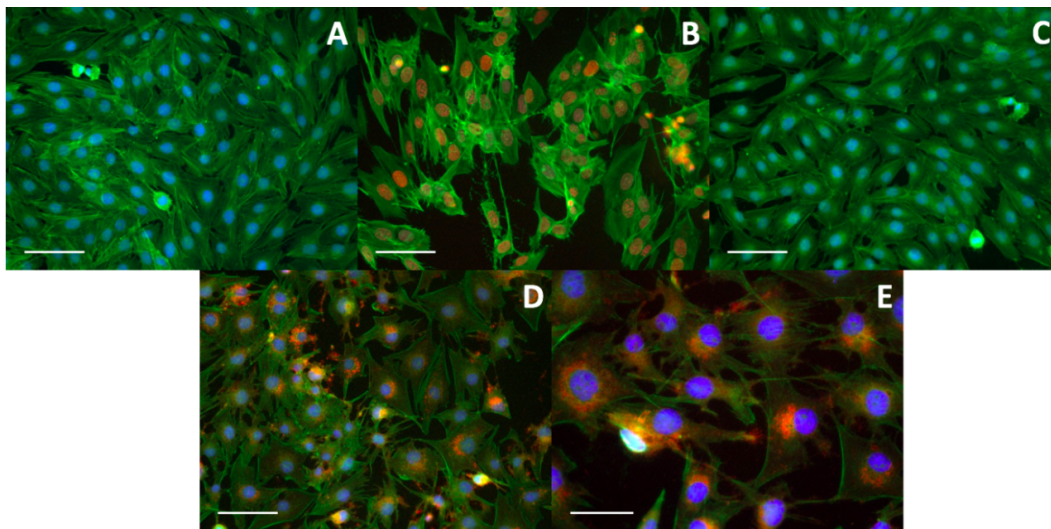
SEM a fost utilizată pentru a evalua morfologia detaliată a celulelor de osteosarcom MG63 tratate cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  precum și mecanismul de interacțiune cu nanoparticulele (Fig.II.19). Imaginile achiziționate au arătat o alterare a morfologiei și o creștere în volum, prin comparație cu celulele control. La acest interval de timp, puține agregate de nanoparticule au apărut la suprafața celulelor MG63 (Fig. II.19. B), probabil datorită internalizării, presupunere susținută de investigațiile realizate în modul retroîmprăștiere (Fig. II.19. F). Agregate de nanoparticule de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  au interacționat în mod direct cu membranele celulare și elongațiile filamentelor de actină din mediul extracelular, inducând un aspect de încrețituri la nivelul membranei (Fig. II.19. C, D). Structuri de tip vezicule au fost evidențiate la exteriorul



celulelor MG63 expuse la nanoparticule (Fig. II.19. B-D). Analiza SEM a arătat că un posibil mecanism al internalizării nanoparticulelor ar putea fi macropinocitoza, datorită aspectului membranelor celulare dar și a prezenței macropinozomilor [29].



**Fig. II.19.** Imagini de microscopie electronică de baleiaj pentru celule de tip osteosarcom MG63 cultivate timp de 48h: control (A, E) și în prezența a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  în cea mai mare concentrație utilizată (B-D, F); imaginile au fost achiziționate folosind informația de la electronii secundari (A-D), respectiv electroni retroîmprăștiați (E-F); imaginile au fost achiziționate la diferite mărimi: 4000x (A, F), 5000x (B), 50000x (C) and 100000x (D); [24];



**Fig. II.20.** Imagini de microscopie de fluorescență pentru celulele de osteosarcom MG63 la 48h de cultura în prezența/ absentă nanoparticulelor: (A) control; (B) celule expuse la 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX liberă; (C) celule expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  în concentrația echivalentă a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX; (D, E) celule expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  în concentrația echivalentă 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX; verde: faloidină-FITC, albastru: Hoechst, roșu: doxorubicina; Scala în (A- D) este echivalent cu 100  $\mu\text{m}$ , respectiv 50  $\mu\text{m}$  în (E); figură adaptată după [24];

Imaginile în fluorescență au fost realizate pentru a evalua procesul de internalizare și localizare a DOX,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  în celulele de osteosarcom, dar și pentru a detecta eventualele modificări morfologice ale acestora (Fig. II.20). Nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , până la concentrația de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nu au indus nici o modificare morfologică în celulele MG63 după 48 ore de expunere (Fig. 20.C). În schimb, celulele tratate cu DOX și cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  au prezentat modificări morfologice și de structură. Volumul celulelor de osteosarcom a crescut, în timp ce densitatea celulară a scăzut. În plus, filamentele de actină și-au pierdut structura

fibrilară (Fig. II.20. B, D, E). DOX este localizată în nucleul celular (Fig. II.20. B), în timp ce nanoparticulele conjugate cu DOX sunt situate în citoplasma celulelor, în regiunea perinucleară (Fig. II.20. D, E).

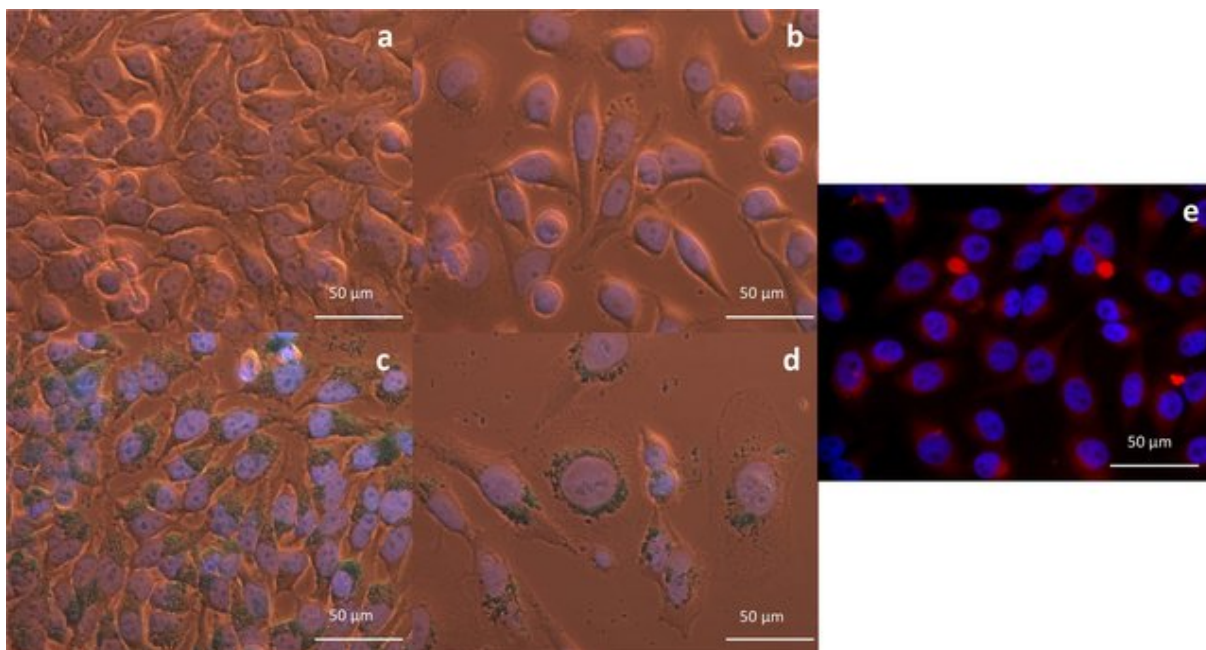
Datele noastre confirmă realizarea unei interacțiuni stabile între faza organică și cea anorganică. Prezența fazei organice a fost demonstrată prin analiza termogravimetrică, dar și prin fluorescența prelungită a nano-constructului, datorită autofluorescenței doxorubicinei. Conjugarea directă a doxorubicinei cu nanoparticulele de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a facilitat vizualizarea localizării sistemului în interiorul celulelor. NPs sunt distribuite în citoplasma celulelor MG63, cel mai probabil în endozomi, în timp ce doxorubicina intră în nucleu prin difuzie pasivă. Mecanismul de internalizare al nano-conjugatului este diferit și are loc mai lent. Astfel, la 48 h de incubare, nanoparticulele sunt localizate în vecinătatea nucleului. Rezultatele noastre au arătat că doxorubicina este eliberată cu viteză redusă din nano-transportor, în condiții fiziologice de pH, temperatură și umiditate, până la 72h.

### **II.3.2. Evaluarea mecanismelor biologice pentru nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$ utilizate pentru încapsularea de medicament**

Evaluarea internalizării și citotoxicității  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (/DOX) s-a realizat pentru linia celulară de adenocarcinom cervical uman HeLa. Vizualizarea nanoparticulelor în celule HeLa după 16h de la incubare în prezența NP a fost realizată utilizând o colorare cu albastru de Prusia, rezultând o colorare albastru deschis a structurilor sub-micrometrice localizate în principal în zona perinucleară (Fig. II.21).  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (/DOX) internalizate nu au trecut în nucleu, rămânând organizate ca și aglomerate ce acoperă membrana nucleară externă. Morfologia celulelor nu a fost afectată în cazul HeLa expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (Fig. II.21. C), însă densitatea celulară a fost afectată prin eliberarea DOX din  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K/DOX în probele corespunzătoare (Fig. II.21. B, D): celulele au apărut mai rotunde și mai mari ca dimensiune, volumul nucleilor crescând. Majoritatea agregatelor de nanoparticule au fost localizate în interiorul celulelor, perinuclear, însă, o parte din acestea interacționau direct cu partea exterioară a membranei, ca o urmare a procesului de internalizare aflat în curs de desfășurare. Complementar, în cazul  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K/DOX, localizarea nano-constructelor a fost confirmată și prin microscopia în fluorescență, ca urmare a proprietății DOX. Acest lucru a fost posibil datorită semnalului de fluorescență, caracteristic DOX din  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K/DOX. Aceste nanoparticule au fost organizate ca structuri sferice, sub-micronice, preponderent în zona peri-nucleară, dar și în citoplasmă (Fig. II.21 E).

Imaginile de microscopie electronică prin transmisie au fost achiziționate pentru celule HeLa ce au fost expuse anterior la diferite concentrații de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (/DOX) (100 și 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) timp de 16h, în vederea internalizării și localizării intracelulare. Această tehnică a fost folosită și pentru a studia potențialul mecanism de internalizare. În Fig. II.22 este evidențiată internalizarea  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K ca și agregate în zona peri-nucleară și în citoplasmă. Această observație a fost realizată pentru toate condițiile experimentale. Rezultatele au demonstrat că ambele tipuri de constructe sunt internalizate prin micropinocitoză și, uneori, agregate mai mici sunt internalizate prin endocitoză (Fig. II. 22. D, C). După 16h de incubare cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K, acestea au părut a fi internalizate în vezicule, într-un final fiind transferate în lizozomi, în timp ce mai puține agregate  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K/DOX au fost localizate în structuri veziculare și mai multe au fost libere în citoplasmă.

Analiza cantitativă PIXE (Fig. II.23) realizată pentru nanoparticule de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ce au interacționat cu celulele HeLa a demonstrat o concentrație intracelulară de  $31,66 \pm 3,06$  pg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ / celulă pentru probele incubate cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K și respectiv  $115,2 \pm 9,8$  pg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ / celulă pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K/DOX.



**Fig. II.21.** Imagini de microscopie optică ale celulelor HeLa expuse timp de 16h la: (A) celule control; (B) DOX (concentrație echivalentă de 1,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX); (C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) și (D)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); cu albastru sunt reprezentate nanoparticulele de oxid de Fe (datorită colorării cu albastru de Prusia), mărire 40x (ulei); adaptat după. (E) Imagini de microscopie în fluorescență ale celulelor HeLa expuse timp de 16h la 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX; cu albastru sunt reprezentați nucleii (marcați cu DAPI) și cu roșu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX sau DOX liberă (datorită fluorescenței DOX); mărire 40x; [26].

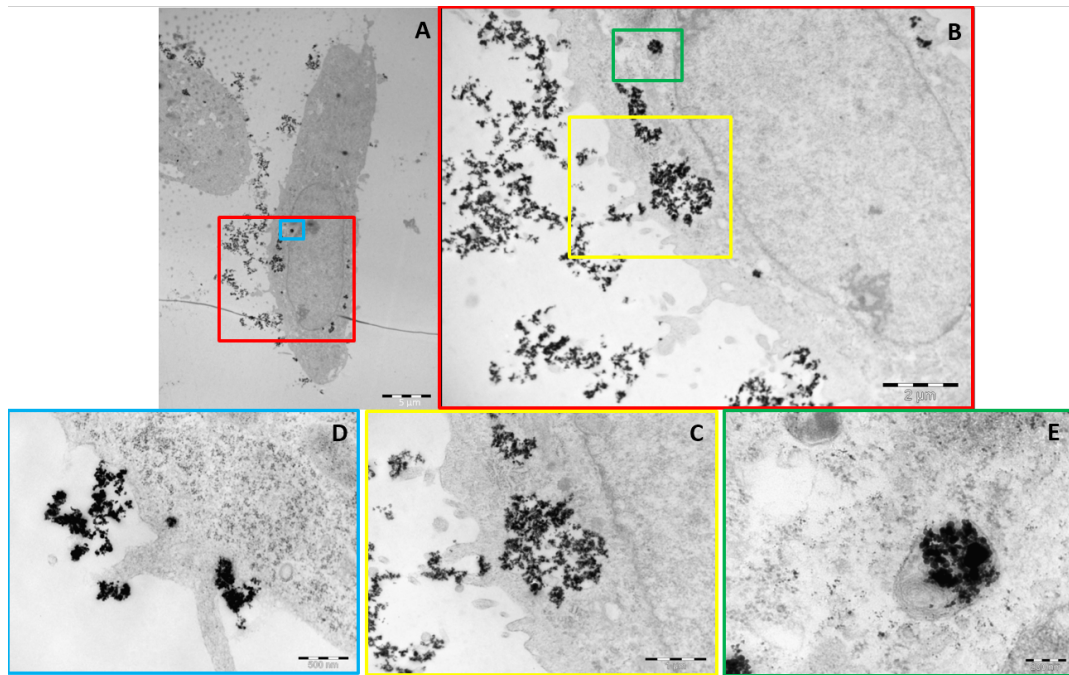
Măsurătorile citotoxicității pe termen scurt au fost realizate pentru o gamă largă de concentrații  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K (/DOX) (0-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluții binare). Pentru aceasta, potențialul metabolic mitocondrial a fost monitorizat prin intermediul testului de viabilitate celulară cu săruri de tetrazoliu MTT (Fig. II.24) până la 96h de tratament cu NP. Răspunsul celulelor HeLa la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K a depins mai mult de timp și mai puțin de concentrație (Fig. II.24). La 48h de expunere,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K au determinat o scădere treptată a viabilității celulare, invers proporțional cu concentrația. La 96h de tratament, nici o modificare semnificativă a viabilității celulare nu a fost observată, comparativ cu probele control, o reducere maximă a viabilității celulare fiind de  $10,88 \pm 7,675\%$  pentru 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K. Toate rezultatele au fost semnificative statistic, comparativ cu controalele (celule netratate).

Rezultatele pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX (Fig. II.24) au demonstrat efectul citotoxic al acestora pentru celulele HeLa, efect ce a crescut direct proporțional cu concentrația de NP administrate și cu timpul de expunere. Valorile calculate ale  $\text{IC}_{50}$  au fost de  $27,83 \pm 7,99$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  la 48h,  $2,31 \pm 0,32$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  la 72h și  $9,006 \pm 4,68$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  la 96h. Toate rezultatele au fost semnificative statistic, comparativ cu controalele (celule netratate), conform analizei one-way ANOVA. Mai mult, analiza statistică two-ways ANOVA a demonstrat o diferență semnificativă între efectele produse de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX ( $P < 0,0001$  pentru 48h;  $P < 0,0001$  pentru 72h;  $P < 0,0001$  pentru 96h). De asemenea, prezența DOX în construct a indus o reducere semnificativă a viabilității ( $P = 0,0003$  pentru 48h;  $P < 0,0001$  pentru 72h;  $P < 0,0001$  pentru 96h).

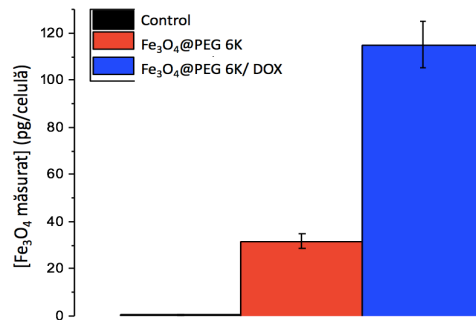
În acest studiu au fost proiectate și sintetizate nanoparticule de oxid de Fe funcționalizate cu polietilen glicol ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K) pentru încapsularea substanței cu efect chimioterapeutic doxorubicină ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX). Mecanismul de internalizare al  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K (/DOX) în celule HeLa s-a realizat prin pinocitoză și endocitoză, ambele NP acumulându-se în zona peri-nucleară. Nanoparticulele fără DOX au demonstrat a fi biocompatibile pentru celule HeLa, în timp ce tratamentul celulelor cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG}$  6K/DOX



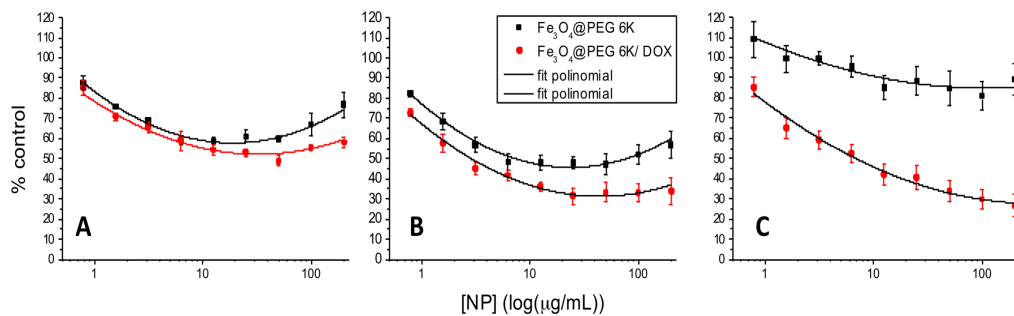
a determinat o scădere a proliferării dependentă de concentrație și timpul de incubare cu nanoparticule.



**Fig. II.22.** Celule HeLa expuse la 100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEG 6K}$  timp de 16h: (A) privire de ansamblu asupra întregii celule; (B) mărire a zonei delimitate cu dreptunghi de culoare roșie în (A); (C) mărire a zonei delimitate cu dreptunghi de culoare galbenă în (B); (D) mărire a zonei delimitate cu dreptunghi de culoare albastră în (A) și and (E) mărire a zonei delimitate cu dreptunghi de culoare roșie în (B); [26].



**Fig. II. 23.** Cantitatea de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  internalizată în celulele HeLa incubate cu 0, respectiv 100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEG 6K}$  (/DOX) timp de 16h, la 24h de la înlăturarea NP; rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM (n=3); adaptat după [26].



**Fig. II.24.** Viabilitata celulelor HeLa după incubarea cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEG 6K}$  (/DOX) (în concentrații echivalente), determinată la 48, 72, respectiv 96h după tratament. Rezultatele sunt exprimate ca procent din control (celule netratate). Rezultatele sunt experimentate ca medie $\pm$ SEM; adaptat după [26].

## II.4. Contribuții privind evaluarea potențialului de radio-sensibilizare a nanoparticulelor de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$

### II.4.1. Evaluarea mecanismelor biologice implicate în radioterapia urmată de tratament cu nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Efectele citotoxice potențiale ale tratamentului cu radiație urmat de epunerea la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  pentru celule de tip osteosarcom uman MG63 au fost evaluate prin investigații ale proceselor metabolice (testul MTT), proliferative (testul MTT și colorarea cu albastru de Tripan), respectiv genotoxicității (testul de formare a micronucleilor). Celulele MG63 aflate la confluență au fost iradiate cu 1 Gy (150 KeV), crescute timp de 4h și apoi au fost expuse la diferite concentrații de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  în intervalul 0-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

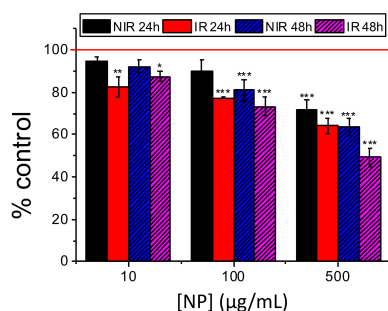
Celulele au demonstrat o reducere semnificativă a activității metabolice a MTT, accentuată pentru grupurile care au primit ambele tratamente (Fig. II.25). Astfel, celulele care au urmat expunere la 1Gy raze X și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  au demonstrat o scădere semnificativă statistic în abilitatea de reducere a sărurilor de tetrazoliu, dependentă de concentrația de nanoparticule. Complementar, testul clonogenic a fost realizat pentru a evalua citotoxicitatea pe termen lung a tratamentului format din radiație urmată de expunerea la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  (Fig. II.26). Rata de supraviețuire celulară a scăzut în urma tratamentului cu radiație, efectul fiind accentuat de adăugarea a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NP pentru 48h (o reducere totală a supraviețuirii celulare de  $50,62 \pm 5,8\%$ , comparativ cu controlul). Tratamentul doar cu nanoparticule a avut un efect inhibitor asupra supraviețuirii celulelor MG63, în funcție de concentrația de NP. S-a evidențiat un efect semnificativ al tratamentului prin radioterapie (1 Gy raze X) și  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) asupra fracției de supraviețuire celulară  $P < 0,01$  (Fig. II.26).

Măsurarea producției de micronuclei s-a realizat la 48h și, respectiv la 72 h de tratament cu nanoparticule (Fig. II.27).  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  nu a indus o modificare statistic semnificativă a numărului de micronuclei în celulele MG63 pentru nici una dintre concentrații, la 48 și 72h de tratament. După cum a fost de așteptat, iradierea a indus fragmentarea cromozomilor, măsurată printr-o creștere semnificativă a numărului de micronuclei la 48h ( $P < 0,01$ ), respectiv la 72h ( $P < 0,05$ ). Pentru grupurile expuse la tratament cu radiație ionizantă urmat de administrare de nanoparticule, s-a observat o creștere a numărului de micronuclei, comparativ cu controlul (celule netratate). Cu toate acestea,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  nu au determinat nici un efect adițional radiației, dar mai degrabă expunerea la 1 Gy raze X anterioară tratamentului cu nanoparticule a indus un efect semnificativ statistic comparativ cu probele expuse doar la NP ( $P < 0,01$  pentru 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectiv  $P < 0,001$  500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la 48h;  $P < 0,001$  pentru 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  și  $P < 0,05$  pentru 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la 72h).

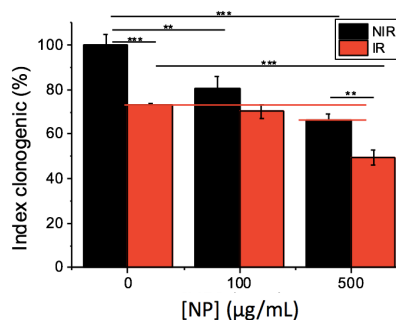
Mecanismele potențiale induse de radiația ionizantă asupra internalizării  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  în celule MG63 au fost investigate. Pentru acest lucru, au fost corelate măsurători cantitative asupra concentrației de Fe atomic din celule cu măsurători ale ciclului celular.

Tehnica PIXE a fost utilizată pentru a măsura concentrația atomică de Fe din celulele MG63 cultivate în prezența nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  pentru 24, respectiv 48h, în grupuri expuse la diferite doze de radiație (0 și 1 Gy) (Fig. II.28). Rezultatele au demonstrat că expunerea la nanoparticule a indus o creștere a concentrației de Fe atomic proporțională cu cantitatea de NP administrată. La 48h, o concentrație de  $473,5 \pm 97,63$  pg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  /celulă ( $P < 0,05$ , comparativ cu controlul) a fost măsurată în celulele MG63 neiradiate și tratate cu 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ , respectiv  $860,15 \pm 52,36$  pg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  /celulă ( $P < 0,001$ , comparativ cu controlul) pentru grupul echivalent care a primit și tratament cu radiație ionizantă. Astfel, după 48h, expunerea cu 1Gy raze X a determinat o creștere semnificativă statistic a cantității de NP

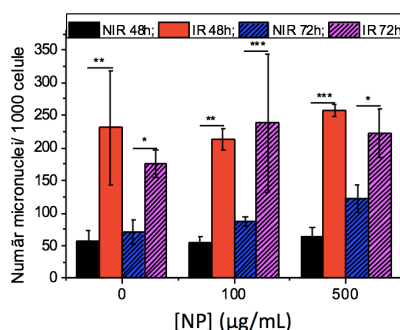
internalizate în celulele MG63 pentru cea mai mare concentrație administrată (500  $\mu\text{g/mL}$ ), cu  $P < 0,01$  comparativ cu grupul echivalent neiradiat.



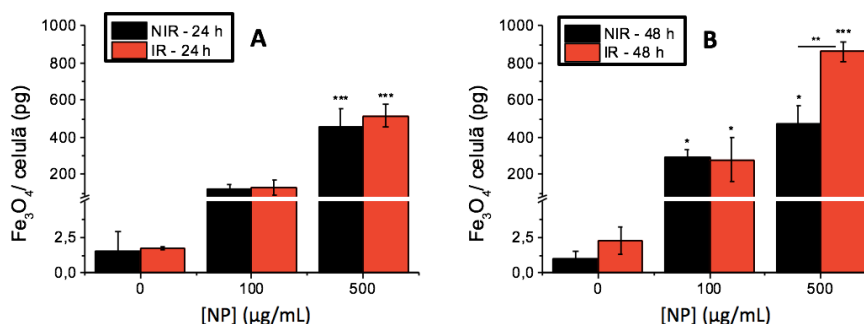
**Fig. II.25.** Viabilitatea celulelor MG63 expuse la diferite concentrații (0, 10, 100, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  timp de 24 și 48 h; un grup de celule a fost expus în prealabil la 1 Gy X-Ray (IR) vs control neiradiat (NIR); datele sunt prezentate ca valoare medie  $\pm$ SEM; \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  și \*\*\* $P < 0,001$ ; figură adaptată după [24];



**Fig. II.26.** Supraviețuirea celulară pentru MG63 expuse anterior la 0Gy, 1Gy raze X, 500  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  sau tratament combinat, pentru 48h; datele sunt prezentate ca valoare medie  $\pm$ SEM; \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$ , respectiv \*\*\* $P < 0,001$ ; figură adaptată după [24];



**Fig. II.27.** Numărul de micronuclei induși în celule MG63 expuse timp de 48, respectiv 72h la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ ; un grup de celule a fost expus în prealabil la 1 Gy raze X (IR); datele sunt prezentate ca valoare medie  $\pm$ SEM; \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$ , respectiv \*\*\* $P < 0,001$ ; figură adaptată după [24];

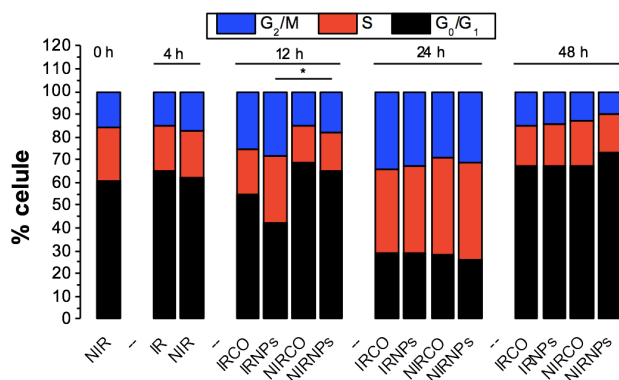


**Fig. II.28.** Cantitatea (pg) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  internalizată în celule de tip osteosarcom MG63 expuse la diferite concentrații de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$  timp de 24, respectiv 48h; un grup de celule a fost expus anterior la 1Gy; datele sunt prezentate ca valoare medie  $\pm$ SEM și raportate la numărul de celule viabile; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; figură adaptată după [24];

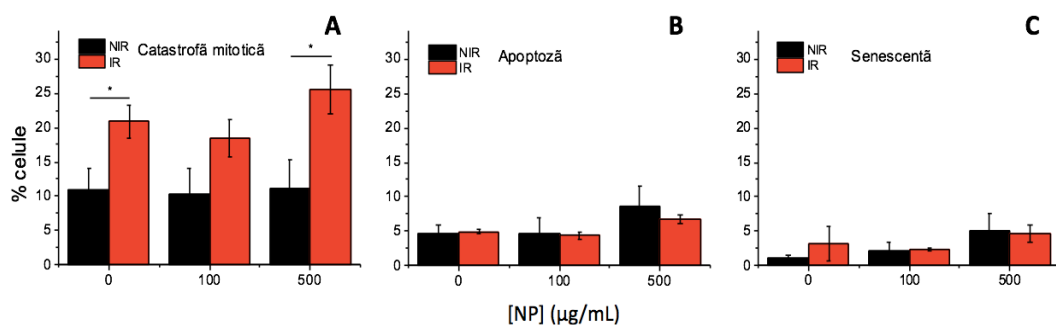
Celulele MG63 au fost cultivate la confluență pentru a crește procentul de celule din faza  $G_0/G_1$  și apoi au fost expuse la 1 Gy raze X. Detașarea ulterioară iradierii și reînsămânțarea celulelor nu au determinat modificări semnificative ale distribuției ciclului celular timp de 4h de incubare (Fig. II.29). La acest interval de timp, celulele din grupurile corespunzătoare au

fost expuse fie la mediu de cultură conținând nanoparticule. La un interval de 12 h după expunerea la radiații, au fost observate modificări evidente ale derulării ciclului celular (Fig. II.29). Tratatamentul cu radiație X a indus o acumulare a celulelor în etapa de tranziție  $G_2/M$  la 12h după iradiere ( $21,8 \pm 2,3\%$ ,  $P < 0,05$  în comparație cu controlul), în timp ce tratamentul doar cu NP nu a produs nici un efect semnificativ statistic. Totuși tratamentul combinat a condus la acumularea unui procent mai mare de celule blocate în faza de tranziție  $G_2/M$  ( $27,6 \pm 1,92$ ,  $P < 0,01$  comparativ cu controlul și  $P < 0,05$  comparativ cu celulele neiradiate tratate cu NP). La 24h, aproximativ 30% dintre celule au fost blocate în faza  $G_2/M$  în toate grupurile studiate (fără diferențe semnificative statistic). La 48h, procentul de celule în  $G_2/M$  a fost redus în toate grupurile (nici o diferență semnificativă statistic între grupuri), demonstrând că celulele probabil au ieșit din această fază și au intrat în mitoză.

Tipul de moarte celulară în urma expunerii la radiație ionizantă și tratament cu nanoparticule  $Fe_3O_4@DOX$  a fost investigat utilizând testul de moarte clonogenică (ex. apoptoză, catastrofă mitotică, respectiv senescentă). Evaluarea morfologică a morții celulare (Fig. II.30) a demonstrat că, la 48 h de tratament cu NPs și după subcultivarea clonelor rezistente pentru încă 24h, nu apare apoptoza indusă pentru nici un grup, cu excepția grupului tratat cu 1Gy și 500  $\mu g/mL$   $Fe_3O_4@DOX$ . Pentru celulele expuse la 1Gy și 500  $\mu g/mL$   $Fe_3O_4@DOX$ , o creștere de 2,34 ori a fost observată ( $P < 0,01$  comparativ cu controlul neiradiat). Aparent, tratamentul cu radiație și nanoparticule a contribuit la inducerea unei creșteri semnificative statistic a evenimentelor de catastrofă mitotică în celule expuse la cea mai mare concentrație de nanoparticule ( $P < 0,05$ ). Un procent mai mic de celule senescente a fost observat pentru populațiile expuse fie la cea mai mare concentrație de nanoparticule, fie la tratamentul combinat. Rezultatele noastre au demonstrat că metoda de moarte prin catastrofă mitotică este cea mai frecvent întâlnită în cazul tratamentului combinat. La 48h, aceste celule au ieșit din faza de blocare a ciclului celular  $G_2/M$  (un procent scăzut de celule în  $G_2/M$ , similar controlului) având ADN nereparat și mitoză aberantă (celule multi- nucleate).



**Fig. II.29.** Distribuția ciclului celular pentru MG63 supuse tratamentului cu radiații X (0, 1 Gy) și cu NPs (0, 500  $\mu g/mL$   $Fe_3O_4@DOX$ ) la diferiți timpi experimentali; \* $P < 0,05$ ; figură adaptată după [24];



**Fig. II.30.** Moartea celulara clonogenica indusa de 1 Gy de raze X, 500  $\mu g/mL$ , respectiv 100  $\mu g/mL$   $Fe_3O_4@DOX$ , sau tratament combinat; celulele au fost tratate timp de 48 h si reansamantatae pentru

24h pentru evaluarea morfologica și clasificare în: apoptotice, multinucleare și senescente; datele au fost prezentate ca medie  $\pm$ SEM; \* $P < 0,05$ ; figură adaptată după [24];

În acest studiu am utilizat radiația X de doze joase pentru a sensibiliza celule de osteosarcom aflate la confluență pentru nanoparticule Fe tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  conjugate cu doxorubicină printr-o metodă *in situ*. Am demonstrat că tratamentul combinat a indus o creștere a efectelor citotoxice și genotoxice în celule de tip osteosarcom, comparativ cu expunerea doar la nanoparticule. Rezultatele noastre au arătat că blocarea temporară a ciclului celular în faza  $G_2/M$  pentru celule expuse anterior la 1Gy raze X a fost asociată cu o internalizare ridicată a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@DOX$ . Grupul care a primit tratamentul cu 1Gy și 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NP a survenit o inducere timpurie a  $G_2/M$  la 12h de la iradiere, care a atins un maxim la 24h după tratament, atunci când toate grupurile de celule au intrat în această etapă.

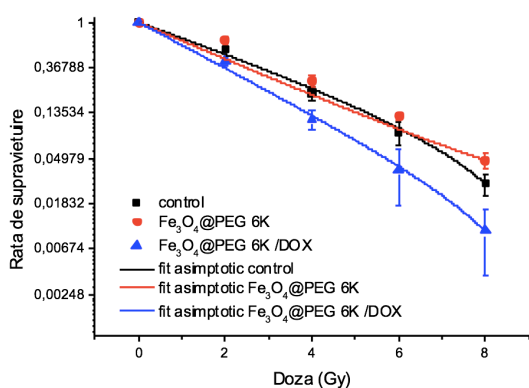
#### II.4.2. Evaluarea mecanismelor biologice în radioterapia mediată de tratament cu nanoparticule de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4$

În vederea evaluării potențialului de radiosensibilizare al nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K(/DOX), culturi celulare bidimensionale realizate din două linii celulare tumorale (celule carcinom scuamos FaDu, respectiv celule de tip adenocarcinom cervical uman HeLa) și respectiv o linie celulară normală (cheratinocite umane HaCat) au fost incubate cu NP timp de 16h, după care iradiate. Au fost exploatate atât razele X de energii mari (6 MV) cât și cele de energii mici (50 kV și 150 kV), întrucât au o relevanță clinică diferită.

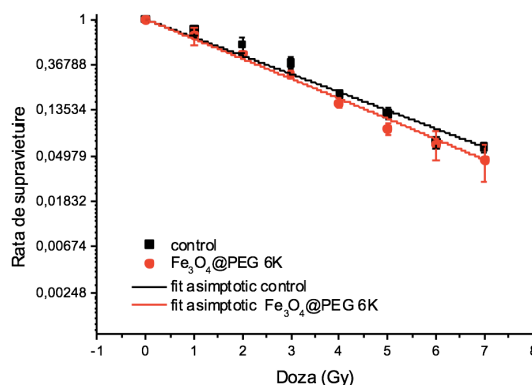
Răspunsul pe termen lung al tratamentului cu nanoparticule urmat de cel cu radiație ionizantă a fost evaluat cu ajutorul testului clonogenic, pentru a revela posibile efecte de chimio- și/ sau radio-sensibilizare. Prin incubarea celulelor HeLa cu 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K/DOX timp de 16h s-a determinat o scădere semnificativă în rata de supraviețuire a celulelor HeLa, comparativ cu grupul control ( $SF(\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K /DOX) =  $0,56 \pm 0,14$ ,  $P=0,04$ ), dar acest efect nu a fost obținut și pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K, demonstrând biocompatibilitatea nanoparticulelor fără medicament (Fig. II.31).

Expunerea celulelor HeLa la o concentrație de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K înainte de iradierea la o energie de 6MV nu a indus nici un efect semnificativ statistic față de răspunsul la radiație pentru nici una dintre dozele aplicate, cu excepția celei de 8 Gy, unde supraviețuirea clonogenică în grupul care a primit ambele forme de tratament a fost puțin mai ridicată comparativ cu controlul ( $P=0,04$ , fig. II.31). Pe de altă parte, efectul radio-sensibilizant al NP fără DOX (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a fost evidențiat pentru raze X de energie joasă (50 kV), întrucât a fost înregistrată o rată de supraviețuire a celulelor HeLa redusă semnificativ statistic comparativ cu celulele control din grupurile echivalente, la doze 4 și 5 Gy ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K vs control:  $P=0,03$ ,  $P=0,04$ , Fig. II.32). Incubarea cu  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K timp de 16h înaintea iradierii cu 50 kV a indus un efect radiosensibilizator cu un factor de modificare a dozei calculat pentru o rată de supraviețuire de 0,1  $DMF_{SF 0.1} = 1,13 \pm 0,05$ .

Încorporarea DOX în NP a determinat inactivarea clonogenică a celulelor de tip adenocarcinom cervical expuse tratamentului dublu (nanoparticule și radiație). Astfel, în cazul celulelor HeLa incubate timp de 16h cu 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K/DOX și apoi iradiate cu diverse doze (0-8 Gy), la o energie de 6 MV, s-a înregistrat o reducere a supraviețuirii celulare la 2 și la 4 Gy:  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K /DOX vs  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K:  $P=0,003$ ,  $P=0,006$ ;  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K/DOX vs control:  $P=0,009$ ,  $P=0,02$  (Fig. II.31). Factorul de modificare a dozei (DMF) pentru celule HeLa expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEG$  6K/DOX urmate de terapie cu radiație de energie 6 MV a fost  $DMF_{SF 0.1} = 1,3 \pm 0,1$ . Aceste observații au sugerat că efectul de scădere al ratei de supraviețuire al celulelor HeLa poate fi datorat mai degrabă unui efect citotoxic aditiv al DOX, decât unui efect radio-sensibilizant al terapiei prin radiație la 6MV.



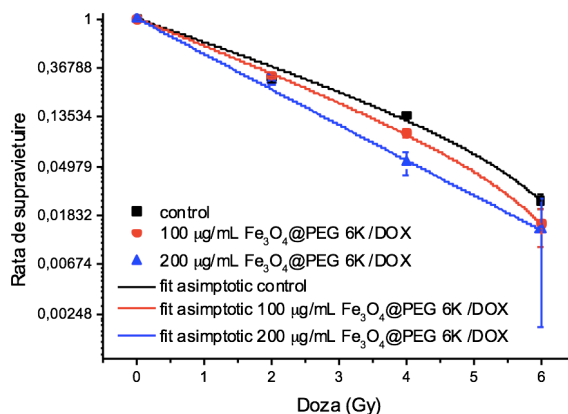
**Fig. II.31.** Rata de supraviețuire clonogenică a celulelor HeLa după expunerea la 100 µg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/(DOX) timp de 16h și urmată de tratament cu raze X de energie 6MV. Rezultatele sunt prezentate ca media ±STDEV (n=3);



**Fig. II.32.** Rata de supraviețuire clonogenică a celulelor HeLa după expunerea la 100 µg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/(DOX) timp de 16h și urmată de tratament cu raze X de energie 50 kV. Rezultatele sunt prezentate ca media ±STDEV (n=3);

Iradieră cu 150 kV a celulelor HeLa în urma incubării cu 100 µg/mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/DOX a determinat o scădere semnificativă a indexului clonogenic pentru doza 4 Gy (P<0,01, Fig. II.33) cu DMF<sub>SF=0,1</sub>=1,29±0,04. Similar, incubarea prealabilă cu 200 µg/mL NP a indus o inactivare clonogenică semnificativă la 4 Gy (P=0,01, Fig. II.33) cu un DMF<sub>SF=0,1</sub>=1,55±0,12.

Incubarea celulelor de tip carcinom scuamos FaDu cu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K /DOX nu a determinat nici o modificare semnificativă a fracției de supraviețuire celulară după expunerea la diferite doze de radiație X cu energie de 150 kV, pentru nici una dintre concentrațiile investigate, sugerând faptul că efectul radio-modulator al acestor nanoparticule depinde de tipul de celule. În ceea ce privește răspunsul celular la radiație ionizantă având energie 150 kV, modelul 2D realizat din celule normale de tip cheratinocite umane (HaCat) a demonstrat o rezistență crescută, comparativ cu modelele tumorale. Incubarea cu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K /DOX timp de 16h înaintea iradierii a avut un efect radio-modulator în sensul în care nanoparticulele au determinat o protecție a cheratinocitelor împotriva radiației ionizante.



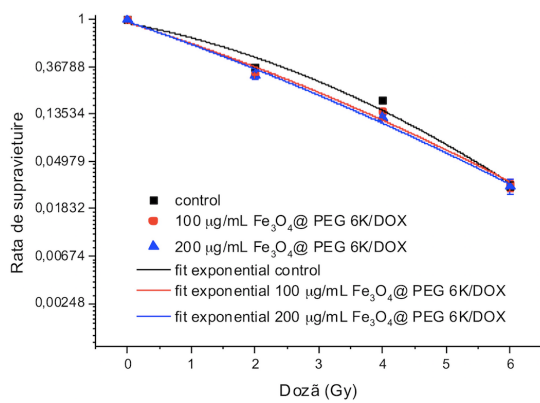
**Fig. II.33.** Supraviețuirea clonogenică a celulelor HeLa cultivate 2D și expuse la 0, 100, respectiv 200 µg/ mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG 6K/DOX timp de 16h și urmată de tratament cu raze X de energie 150 kV și diferite doze; rezultatele sunt prezentate ca valoarea medie ± STDEV (n=3);

Internalizarea nanoparticulelor în toate modelele tumorale 3D s-a realizat sub forma unui gradient de concentrație pornind din partea exterioară superioară a corpului sferoidului, înspre centrul acestuia și partea opusă, în sensul acțiunii forței gravitaționale. Gradul maxim de penetrare al nanoparticulelor înspre mijlocul sferoizilor a fost observat la 48h de incubare pentru ambele modele tumorale. Acest interval de timp a fost selectat pentru experimente

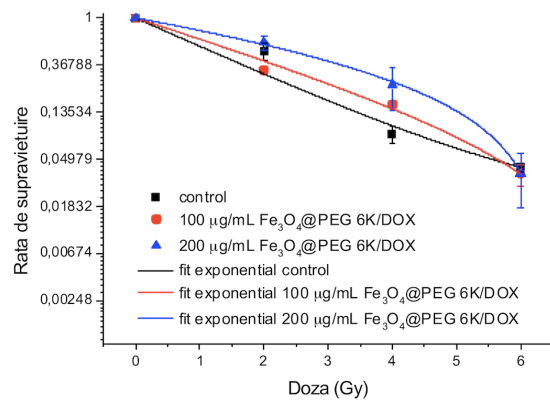


ulterioare cu radiație. În cazul modelelor 3D de adenocarcinom cervical tumoral, nanoparticulele au fost localizate în special în zona celulelor aflate în faza de proliferare (faza S a ciclului celular). Pe de altă parte, în cazul modelului FaDu,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/\text{DOX}$  s-au internalizat atât în celule aflate în zona proliferativă, cât și în cea hipoxică.

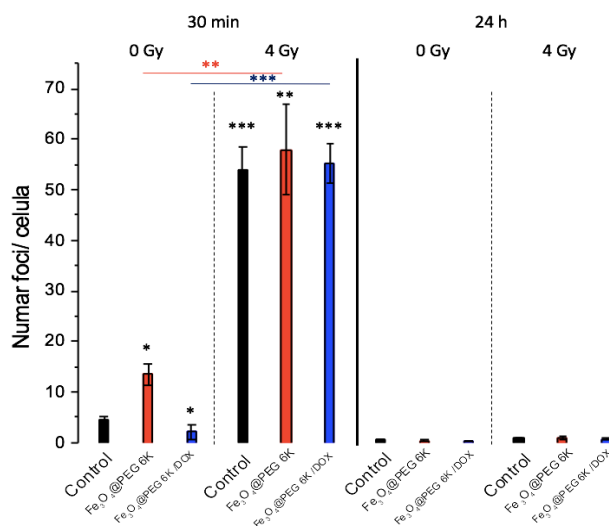
În modelele 3D, răspunsul celulelor la tratamentul cu nanoparticule și radiație ionizantă a fost diferit de răspunsul obținut în modele 2D. Astfel, în cazul modelului 3D HeLa,  $\text{DMF}_{\text{SF}=0,1} = 1,08$  pentru  $100 \mu\text{g/mL}$ , respectiv  $\text{DMF}_{\text{SF}=0,1} = 1,09$  pentru  $200 \mu\text{g/mL}$  (Fig. II.34), în timp ce, pentru modelul 3D FaDu, nanoparticulele au demonstrat mai degrabă un efect radio-protector (Fig. II.35). Testul two-ways ANOVA a demonstrat că rezultatele sunt semnificative statistic din punct de vedere al variației dozei, dar nu și al concentrației de nanoparticule. Testul Fisher a confirmat aceste observații și, în plus, a arătat că incubarea sferoizilor HeLa cu nanoparticule a indus un efect radio-sensibilizator la concentrația  $200 \mu\text{g/mL}$ .



**Fig. II.34.** Supraviețuirea clonogenică a celulelor HeLa cultivate 3D și expuse la 0, 100, respectiv  $200 \mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/\text{DOX}$  timp de 16h și urmată de tratament cu raze X de energie 150 kV și diferite doze; rezultatele sunt prezentate ca valoarea medie  $\pm$  SEM (n=3);



**Fig. II.35.** Supraviețuirea clonogenică a celulelor FaDu cultivate 3D și expuse la 0, 100, respectiv  $200 \mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/\text{DOX}$  timp de 16h și urmată de tratament cu raze X de energie 150 kV și diferite doze; rezultatele sunt prezentate ca valoarea medie  $\pm$  SEM (n=3);



**Fig. II.36.** Leziunile ADN măsurate prin focare  $\gamma\text{-H2Ax}$  induse de tratamentul cu  $100 \mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/\text{DOX}$  timp de 16h și/sau 4Gy 6MV; măsurătorile au fost realizate la 30 min, respectiv 24h de la tratament;

Ca posibil mecanism al toxicității radiației ionizante, frecvența ruperilor dublu catenare ale ADN-ului în celule de tip adenocarcinom cervical uman expuse la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/(\text{DOX})$  și raze X de energie 6 MV și doză 4 Gy a fost cuantificată prin măsurători ale focarelor  $\gamma\text{-H2AX}$  imediat după tratamentul cu radiație (30 min), respectiv la 24h după (Fig. II.36). În urma incubării timp de 16h cu nanoparticule, fără o expunere ulterioară la radiație, s-a obținut un număr mai ridicat al focarelor  $\gamma\text{-H2AX}$  per celulă atât pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}$ , cât și pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/\text{DOX}$ , semnificativ statistic comparativ cu celule control ( $P < 0,05$ , Fig. II.36). Expunerea la o doză de 4 Gy și raze X cu o energie de 6 MV a determinat o creștere a numărului de focare  $\gamma\text{-H2AX}$ / celulă, imediat după radiere (30 min). La 24 h de la tratamentul cu radiație, măsurătorile focarelor  $\gamma\text{-H2AX}$  au demonstrat că nu există modificări semnificative statistic ale numărului de ruperi dublu catenare pentru niciuna dintre condițiile studiate (Fig. II.36). Măsurătorile FACS ale ciclului celular au demonstrat că iradierea celulelor a indus o modificare semnificativă statistic a distribuției ciclului celular, confirmată prin testul two-ways ANOVA. Incubarea cu nanoparticule înaintea tratamentului cu radiație ionizantă cu energie de 6MV nu a influențat acest efect. Prin urmare, mecanismele celulare de radiosensibilizare cu nanoparticule de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEG 6K}/(\text{DOX})$  nu sunt corelate cu producerea de ruperi dublu catenare ale ADN-ului și nici cu modificări ale ciclului celular.

### III. Concluzii generale

Primul capitol (“Studiul critic al datelor de literatura”) realizează un sumar de tip review al progresului actual în ceea ce privește aplicabilitatea nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  în domeniul nanomedicinii. Nanoparticulele de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sunt cunoscute pentru proprietățile lor magnetice, dar pe lângă acestea sunt prietenoase cu țesuturile și fluidele biologice, biocompatibilitatea lor determinând aplicabilitatea în numeroase subdomenii biomedicale precum eliberarea controlată de substanțe active, tratamentul cancerului prin hipertermie magnetică, utilizarea ca și substanță de contrast în imagistica medicală, inhibiția biofilmului, dar și radiosensibilizarea.

Cel de al doilea capitol (“Contribuții personale”) conține rezultatele obținute în cadrul acestei lucrări, cu privire la obținerea, conjugarea și evaluarea nanoparticulelor de magnetită ca și chimio- și radio- sensibilizatori pentru modele preclinice *in vitro*. A fost utilizată metoda de co-precipitare pentru sinteza nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  aceasta demonstrând avantaje precum facilitatea, reproductibilitatea și randamentul înalt de sinteză. În urma sintezei, au rezultat nanoparticule omogene din punct de vedere morfologic, compozițional și având un grad înalt de cristalinitate.

Această metodă poate să fie modificată în vederea realizării unei funcționalizări *in situ*. Astfel, nanoparticulele de magnetită funcționalizate *in situ* cu medicament anti-tumoral (gemcitabină sau doxorubicină) au avut un grad înalt de stabilitate hidrodinamică. În plus,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GEM}$  au demonstrat o potențare chimică a efectelor citotoxice ale GEM pentru celule tumorale de sân de tip carcinom ductal- BT474 și respectiv carcinom hepatocelular- HepG2, dar nu și pentru celule MG63 de osteosarcom uman. Un efect similar a fost observat pentru  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DOX}$  și DOX. Nanoparticulele au fost internalizate prin macropinocitoză în celulele MG63, pe când DOX a fost internalizată prin difuzie directă în nucleu. Pe de altă parte, conjugarea post-sinteză a nanoparticulelor de magnetită cu medicamentul DOX a rezultat într-o înglobare ineficientă a DOX demonstrată prin metode spectrofotometrice, dar și prin teste biologice, prin tehnici precum microscopia în fluorescență.

Prin funcționalizarea nanoparticulelor de magnetită cu PEG s-a determinat creșterea cantității de DOX ce a interacționat cu acestea. Masa moleculară a PEG a influențat morfologia și omogenitatea NP rezultate în urma conjugării *in situ* a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , dar și cantitatea de DOX încapsulată. Din punct de vedere al omogenității morfologice și al rezultatelor testelor



biologice, probele conjugate *in situ* cu PEG având masă moleculară 6000 Da au determinat cel mai bun răspuns.

Funcționalizarea post-sinteză a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a determinat încapsularea unei cantități mai mari de medicament cu efect anti-tumoral comparativ cu probele obținute prin cojugare *in situ*. Testele biologice *in vitro* efectuate pentru linia celulară de adenocarcinom cervical uman HeLa au demonstrat că nanoparticulele de magnetită conjugate post-sinteză cu PEG având masă moleculară 6000 Da au fost eficiente internalizate prin mecanisme de macropinocitoză și endocitoză.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K au fost eficiente în încapsularea și livrarea direct în compartimentul citoplasmatic a medicamentului DOX, ducând la moartea celulară a HeLa.

Evaluarea implicației nano-sistemelor pe bază de magnetită în tratamentul dual al cancerului prin radioterapie și chimioterapie, mediat de nanoparticule, s-a realizat prin urmărirea efectelor citotoxice în urma aplicării tratamentului de radiație ionizantă înaintea incubării celulelor cu nanoparticule, sau după.

În primul caz s-a urmărit corelarea efectului de creștere a internalizării celulare a NP de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ DOX în urma iradierii celulelor cu modificarea progresiei ciclului celular, precum și caracterizarea gradului de citotoxicitate și genotoxicitate și identificarea tipului de moarte celulară tumorală. Un procent semnificativ mai mare de nanoparticule de magnetită conjugate *in situ* cu medicament a fost măsurat în celule iradiate anterior expunerii la NP, fenomen ce a fost asociat cu o intrare mai rapidă a celulelor în faza  $G_2/M$  a ciclului celular. Reluarea ciclului celular normal la 48h de tratament a fost corelată cu observațiile morfologice asupra modificărilor nucleilor celulelor de osteosarcom uman supuse catastrofei mitotice.

Pe de altă parte, prin incubarea celulelor tumorale cu nanoparticule de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (/DOX) urmată de iradiere la diferite energii și doze, s-a dorit caracterizarea efectului radiosensibilizator al acestor nano-sisteme.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K (/DOX) au demonstrat o influență dependent de concentrația de nanoparticule, concentrația DOX, dar și de doza și energia radiației ionizante. Mai mult, efectul a fost diferit pentru diferite linii celulare tumorale și normale. Rezultatele obținute au demonstrat că  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PEG 6K fără medicament determină scăderea supraviețuirii celulare în culturi 2D HeLa în urma iradierii cu raze X de energie scăzută (50 kV), dar nu și mare (6MV). Prin înglobarea medicamentului chimioterapeutic DOX s-a obținut un efect radio-sensibilizant asupra celulelor HeLa atât la energii convenționale (6 MV), cât și medii (150 kV), evidențiat atât în modele celulare 2D, cât și 3D. Fenomenul nu a fost corelat cu producerea de ruperi dublu catenare ale ADN-ului și nici cu modificări semnificativ statistice ale ciclului celular. Acțiunea radio-modulatoare citotoxică nu a fost observată pentru linia celulară tumorală de tip carcinom scuamos FaDu (în modele 2D și 3D) și nici pentru linia celulară normală de tip cheratinocite umane HaCat, rezultatele demonstrând mai degrabă un efect protector împotriva radiațiilor X.

Rezultatele au demonstrat eficiența nanoparticulelor de magnetită funcționalizate în utilizarea ca și sisteme de livrare controlată a unor medicamente cu efect anti-tumoral și în sensibilizarea chimică și/ sau radiologică a celulelor tumorale umane. Aceste observații confirmă aplicabilitatea nano-sistemelor obținute ca și potențiali candidați în chimio- și radio-terapia mediată de nanoparticule.

### Elemente de originalitate ale lucrării:

- Am obținut și raportat pentru prima dată nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  conjugate direct cu medicamentele cu efect anti-tumoral gemcitabină și respectiv doxorubicină, utilizând o metodă de funcționalizare *in situ*.
- Am utilizat tehnica de *mapping* elemental EDX corelată cu SEM în vederea evaluării internalizării nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GEM și a interacțiunii cu membranele celulare.
- Am utilizat tehnica STEM și *single point* EDX pentru a evalua internalizarea celulară a NP fără a realiza în prealabil secțiuni prin celule.

- Am caracterizat mecanismul de catastrofă mitotică al celulelor radio-rezistente MG-63 de osteosarcom uman asociat cu un efect crescut de internalizare a nanoparticulelor de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@DOX în urma iradierii.
- Am utilizat o metodă de co-precipitare adaptată la temperatura camerei, asociată cu încapsularea post-sinteză în PEG, rezultând nanoparticule de magnetită înalt cristaline de tip *core-shell*.
- Am raportat primul studiu cu privire la reținerea intracelulară și a sorții nanoparticulelor de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> funcționalizate cu PEG, mecanisme evaluate calitativ (prin tehnici de microscopie) și cantitativ (prin tehnici de spectrometrie) pentru intervale de timp mai mari de un ciclu celular complet după ce expunerea celulelor la NP a fost întreruptă.
- Am utilizat pentru prima dată sisteme de eliberare controlată a DOX bazate pe nanoparticule de magnetită încapsulate în PEG în vederea radiosensibilizării celulelor tumorale. Am raportat un efect radio-modulator semnificativ al acestora în culturi celulare 2D și 3D. Aceste efecte au fost asociate cu o localizare la nivel citoplasmatic a NP.

#### IV. Diseminarea rezultatelor

##### Articole publicate în reviste de specialitate indexate internațional ca și prim autor:

- [1] **R.C. Popescu**, M. Straticiuc, C. Mustaciosu, M. Temelie, R. Trusca, B.S. Vasile, A. Boldeiu, D. Mirea, R.F. Andrei, C. Cenusă, L. Mogoanta, G.D. Mogosanu, E. Andronescu, M. Radu, M.R. Veldwijk, D.I. Savu, “Enhanced Internalization of Nanoparticles Following Ionizing Radiation Leads to Mitotic Catastrophe in MG-63 Human Osteosarcoma Cells.” *Int J. Molec. Sci.*, 2020, **vol. 21**, nr. 19, 7220.
- [2] **R.C. Popescu**, D. I. Savu, A.D. Olarescu, O. Gherasim, S. Banita, M. Straticiuc, D. Mirea, R.F. Andrei, R. Trusca, B.S. Vasile, G. Socol, E. Andronescu. “In vitro magnetic targeted delivery of doxorubicin using iron oxide nanoparticles leads to enhanced cell death in glioblastoma” in *U.P.B. Sci. Bull, Series B*, **acceptat pentru publicare**, 2020.
- [3] **R.C. Popescu**, D. Savu, I. Dorobantu, B.S. Vasile, H. Hosser, A. Boldeiu, M. Temelie, M. Straticiuc, D.A. Iancu, E. Andronescu, F. Wenz, F.A. Giordano, C. Herskind, M.R. Veldwijk. “Efficient uptake and retention of iron oxide-based nanoparticles in HeLa cells leads to an effective intracellular delivery of doxorubicin.” in *Sci. Rep.*, **vol. 10**, 2020, 10530.
- [4] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, B.S. Vasile. “Recent Advances in Magnetite Nanoparticle Functionalization for Nanomedicine” in *Nanomaterials (Basel)*, **vol. 9**, nr. 12, 2019, 1791.
- [5] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, B.S. Vasile, R. Trusca, A. Boldeiu, L. Mogoanta, G.D. Mogosanu, M. Temelie, M. Radu, A.M. Grumezescu, D. Savu. “Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles” in *Molecules*, **vol.22**, nr. 7, 2017, 1080.

##### Articole publicate în reviste de specialitate indexate internațional ca și autor corespondent:

- [1] M. Temelie, **R.C. Popescu\***, D. Cocioaba, B.S. Vasile, D. Savu. “Biocompatibility study of magnetite nanoparticle synthesized using a green method” in *Rom. J. Phys.* **vol. 63**, 2018, 703.

##### Capitole de carte publicate la edituri internaționale ca și prim autor:

- [1] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, A.M. Grumezescu. “In vitro and in vivo technologies: an up to date overview in tissue engineering” in *Materials for Biomedical Engineering*, edited by

Alina-Maria Holban and Alexandru Mihai Grumezescu, Elsevier, 2019, pp. 463-484, ISBN 9780128169094.

[2] **R.C. Popescu**, D. Popescu, A.M. Grumezescu. "Applications of rubber-based blends" in Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends, edited by P.M. Visakh, Gordana Markovic and Daniel Pasquini, Woodhead Publishing, 2017, Pages 75-109, ISBN 9780081004081.

[3] **R.C. Popescu**, O. Fufa, A.I. Apostol, D. Popescu, A.M. Grumezescu, E. Andronescu. "Chapter 9 - Antimicrobial Thin Coatings Prepared by Laser Processing" in Nanostructures for Antimicrobial Therapy, Micro and Nano Technologies, Elsevier, 2017, Pages 223-236, ISBN 9780323461528.

[4] **R.C. Popescu**, M.O.M. Fufă, A.M. Grumezescu, A.M. Holban. "12 - Nanostructured membranes for the microbiological purification of drinking water" In Water Purification, Academic Press, 2017, Pages 421-446, ISBN 9780128043004.

#### Articole publicate în reviste de specialitate indexate internațional ca și co-autor:

[1] A. Bragaru, M. Simion, I. Mihalache, A. Radoi, M. Banu, P. Varasteanu, P. Nadejde, E. Vasile, M.A. Acasandrei, **R.C. Popescu**, D. Savu, K. Mihaela. "Comparative analysis of honey and citrate stabilized gold nanoparticles: In vitro interaction with proteins and toxicity studies" in J. Photochem. Photobiol. B Biol., vol. **197**, 2019, 111519.

[2] A.I. Visan, G. Popescu-Pelin, O. Gherasim, V. Grumezescu, M. Socol, I. Zgura, C. Florica, **R.C. Popescu**, D. Savu, A.M. Holban, R. Cristescu, C.E. Matei, G. Socol. "Laser processed antimicrobial nanocomposite based on polyaniline grafted lignin loaded with Gentamicin-functionalized magnetite" in Polymers, vol. **11**, nr. 2, 2019, 283.

[3] I. Negut, V. Grumezescu, A. Ficai, A.M. Grumezescu, A.M. Holban, **R.C. Popescu**, D. Savu, B.S. Vasile, G. Socol. "MAPLE deposition of Nigella sativa functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for antimicrobial coatings" in Appl. Surf. Sci., vol. **455**, 2018, pp. 513-521.

[4] G. Popescu-Pelin, O. Fufă, **R.C. Popescu**, D. Savu, M. Socol, I. Zgură, A.M. Holban, B.S. Vasile, V. Grumezescu, G. Socol. "Lincomycin-embedded PANI-based coatings for biomedical applications" in Appl. Sur. Sci., vol. **455**, 2018, pp. 653-666.

[5] D. Ficai, V. Grumezescu, O. Fufă, **R. Popescu**, A. Holban, A. Ficai, A. Grumezescu, L. Mogoanta, G. Mogosanu, E. Andronescu. "Antibiofilm coatings based on PLGA and nanostructured cefepime-functionalized magnetite" in Nanomaterials, vol. **8**, nr. 9, 2018, 633.

[6] I.A. Păun, **R.C. Popescu**, B. Ș. Călin, C.C. Mustăciosu, M. Dinescu, C.R. Luculescu. "3D biomimetic magnetic structures for static field stimulation of the osteogenesis" in Int. J. Molec. Sci., vol. **19**, nr. 2, 2018, 495.

[7] I.A. Păun, **R.C. Popescu**, C.C. Mustăciosu, M. Zamfirescu, B.Ș. Călin, M. Mihăilescu, M. Dinescu, A. Popescu, D.G. Chioibașu, M. Sopronyi, C.R. Luculescu. „Laser-direct writing by two-photon polymerization of 3D honeycomb-like structures for bone regeneration" in Biofabrication, vol. **10**, nr. 2, 2018, 025009.

[8] P.C. Balaure, B. Boarca, **R.C. Popescu**, D. Savu, R. Trusca, B.Ș. Vasile, A.M. Grumezescu, A.M. Holban, A. Bolocan, E. Andronescu. "Bioactive mesoporous silica nanostructures with anti-microbial and anti-biofilm properties" in Int. J. Pharmaceutics, vol. **531**, nr. 1, 2017, pp. 35-46, ISSN 0378-5173.

#### Capitole de carte publicate la edituri internaționale ca și co-autor:

[1] *O. Gherasim, R.C. Popescu, T.G. Gherasim, V. Grumezescu, E. Andronescu.* "Pharmacotherapy and nanotechnology" in *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, edited by Alexandru Mihai Grumezescu, William Andrew Publishing, 2019, pp. 1-21, ISBN 9780128165041.

[2] *O. Fufă, R.C. Popescu, T.G. Gherasim, A.M. Grumezescu, E. Andronescu.* "Chapter 16 - Silver-based nanostructures for cancer therapy" in *Nanostructures for Cancer Therapy*, Micro and Nano Technologies, edited by A. Ficai and A.M. Grumezescu, Elsevier, 2017, Pages 405-428, ISBN 9780323461443.

[3] *M.O.M. Fufă, R.C. Popescu, A.M. Grumezescu, A.M. Holban.* "7 - Microorganisms: new trends in environment-friendly and energy-saving water purification" in *Water Purification*, Academic Press, 2017, pp. 263-288, ISBN 9780128043004.

### Conferințe naționale și internaționale:

[1] *R.C. Popescu, A.D. Olarescu, O. Gherasim, S. Banita, M. Straticiuc, D.A. Mirea, R.F. Andrei, B.S. Vasile, G. Socol, E. Andronescu, D.I. Savu.* "In vitro magnetic targeted delivery of doxorubicin using iron oxide nanoparticles leads to enhanced cell death" 8<sup>th</sup> International Conference on Radiation in Various Fields of Research, RAD2020, 20-24 Iulie 2020, Virtual Participation; prezentare de tip poster.

[2] *R.C. Popescu, V. Kopaz, H. Hosser, F. Schneider, E. Andronescu, F. Wenz, F. Giordano, C. Herskind, W. Doerr, M.R. Veldwijk, D. Savu.* "Drug delivery nanosystems for intracellular release of doxorubicin improved the clonogenic inactivation of X-Rays in human cervical adenocarcinoma cells", 8<sup>th</sup> International Conference on Radiation in Various Fields of Research, RAD2020, 20-24 Iulie 2020, Virtual Participation; prezentare orală.

[3] *R.C. Popescu, M. Straticiuc, D. Mirea, R.F. Andrei, C. Mustaciosu, R. Trusca, B.S. Vasile, E. Andronescu, M. Radu, M.R. Veldwijk.* "Enhanced Internalizing of Nanoparticles Following Ionizing Irradiation Leads to Mitotic Catastrophe in Human Osteosarcoma Cells" Conferința Națională de Biofizică CNB2020, 14-16 Iunie 2020, Brasov, Romania; prezentare de tip poster.

[4] *RC Popescu, D Savu, I Dorobantu, BS Vasile, H Hosser, F Schneider, A Boldeiu, E Andronescu, F Wenz, FA Giordano, C Herskind, MR Veldwijk.* "Radiation Sensitization of Tumor Cells by Intracellular Accumulation of Doxorubicin by using Iron Oxide Nanoparticles" *Strahlentherapie und Onkologie*, Springer Heidelberg, vol. 195, S92-S93; prezentare de tip poster.

[5] *RC Popescu, D Savu, I Dorobantu, BS Vasile, H Hosser, F Schneider, A Boldeiu, E Andronescu, F Wenz, FA Giordano, C Herskind, MR Veldwijk.* "Radiosensitization of Tumor Cells by Intracellular Delivery of Doxorubicin Using Novel Iron Oxide-based Nanoconstructs" *Int J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 105, nr. 1, E681; prezentare de tip poster.

[6] *R.C. Popescu, D. Savu, I. Dorobantu, B.S. Vasile, H. Hosser, F. Schneider, A. Boldeiu, E. Andronescu, F. Wenz, C. Herskind, M.R. Veldwijk.* "Intracellular delivery of doxorubicin by novel iron oxide-based nano-constructs improves cytotoxic effects of ionizing radiation in human cervical adenocarcinoma cells" 2018 Jahrestagung Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung; prezentare de tip poster.

[7] *R.C. Popescu, I. Dorobantu, B.S. Vasile, H. Hosser, F. Schneider, E. Andronescu, F. Wenz, C. Herskind, D.I. Savu, M.R. Veldwijk.* "Can we use nanoparticles to improve radiation therapy?" Radiobiology Satellite Meeting of the 15th National Conference of Biophysics, Magurele, România, Septembrie 2018; prezentare de tip poster.

[8] *R.C. Popescu, E. Andronescu, M. Straticiuc, C. Mustaciosu, M. Temelie, L. Mogoanta, G.D. Mogosanu, B. Vasile, A. Boldeiu, A.M. Grumezescu, M. Radu, M.R. Veldwijk, D. Savu.* "Low dose radiotherapy enhances iron oxide nanoparticles internalizing and toxicity for MG-63 osteosarcoma cells", The 44th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Pecs, Ungaria, 21-25. 08.2018; prezentare de tip poster.

[9] *R.C. Popescu, E. Andronescu, D. Savu, M. Straticiuc, A.I. Apostol, C.C. Mustaciosu, G. Voicu, G.D. Mogosanu, I. Mindrila, B. Vasile, A.M. Grumezescu.* "Enhancement of entrapment

and toxicity of doxorubicin-functionalized iron oxide nanoparticles for MG-63 cells using low dose radiotherapy”, JINR 8<sup>th</sup> International Student Summer School «Nuclear Physics - Science and Applications, Brasov, Romania, 26 July- 4 August, 2017; prezentare orală.

[10] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, M. Straticiuc, B.S. Vasile, A.M. Grumezescu, M. Veldwijk, D. Savu. “In vitro biological testing of novel multifunctional nanosystems for chemo-sensitizing of tumor cells” JRC Summer School on Alternative Approaches for Risk assessment, Joint Research Center, Ispra, Italy, Aprilie 2017; prezentare de tip poster.

[11] **R.C. Popescu**, R. Trușcă, B. Vasile, M. Straticiuc, A. Apostol, G. Voicu, E. Andronescu, D. Savu, A.M. Grumezescu. “Doxorubicin- functionalized magnetite nanoparticles with anti-tumor applications: focus on electron microscopy investigations”CREMS, Sinaia, Romania, April 2017; prezentare de tip poster.

[12] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, A.I. Apostol, M. Straticiuc, B.S. Vasile, A.M. Grumezescu, M.R. Veldwijk, D. Savu. “Fabrication and testing of novel multifunctional nanosystems for chemo- and radio- sensitizing of tumor cells”RAD2017, Fifth International Conference on Radiation and Application in Various Fields of Research, Budva, Montenegro, Iunie 2017; prezentare orală.

[13] **R.C. Popescu**, “Fabrication and testing of novel multifunctional nanosystems for chemo- and radio- sensitizing of tumor cells”Sesiunea de comunicări științifice a tinerilor cercetători din IFIN-HH, 19-12 Decembrie 2016, Măgurele, România; prezentare orală.

[14] **R.C. Popescu**, A.I. Apostol, E. Andronescu, A.M. Grumezescu, D. Savu. “Fabrication of functionalized magnetite nanoparticles with applications in drug delivery systems”12-th National Medical Physics and Biomedical Engineering Conference, NMPEC-2016, Sofia, Bulgaria, Noiembrie 2016; prezentare orală.

[15] **R.C. Popescu**, E. Andronescu, A.I. Apostol, C. Mustaciosu, R. Trușcă, B. Vasile, G.D. Mogoșanu, L. Mogoanță, A.M. Grumezescu, D. Savu. “Doxorubicin functionalized magnetite nanoparticles- enhancers in radiotherapy”Symposium of the Young Chemical Engineers, SICHEM 2016, Politehnica University of Bucharest, Septembrie 2016, București, România; prezentare orală.

#### **Granturi de cercetare:**

[1] “Improvement of the tumor response to radiotherapy (including ion beam therapy) by nanoparticles”, Bundesministerium fur Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) prin Austrian Agency for International Cooperation in Education and Research (OeaD), Ernst Mach Grant-worldwide nr. ICM-2018-10056, la Universitatea de Medicină din Viena, perioada ianuarie 2019- iunie 2019.

[2] “Development and testing of novel multifunctional nanosystems for chemo- and radio-sensitizing of tumor cells”, Agenția de finanțare Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), DAAD Research Grants for Doctoral Candidates and Young Academics and Scientists nr. 57299291, la Universitatea din Heidelberg, Facultatea de Medicină din Mannheim, perioada octombrie 2017- iunie 2018.

## **V. Bibliografie**

- 
- [1]. \*\*\* Amag Pharmaceuticals. <http://www.amagpharma.com/our-products/> (accesat la data de 19 Noiembrie 2019).
- [2]. \*\*\* MagForce- Fighting Cancer with Nanomedicine. <http://www.magforce.de/en/home.html> (accesat la data de 7 Octombrie 2019).
- [3]. \*\*\* Feraheme- Ferumoxytol Injection. <https://www.feraheme.com> (acesat la data de 19 Noiembrie 2019).

- [4]. *Q. Tian, W. Ning, W. Wang, X. Yuan, Z. Bai.* “Synthesis of size-controllable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic submicroparticles and its biocompatible evaluation *in vitro*” in *J. Cent. South Univ.*, **vol. 23**, 2016, pp. 2784–2791.
- [5]. *K. Gu, R.H. Fang, M.J. Sailor, J.H. Park.* “*In vivo* clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals” in *ACS Nano*, **vol. 6**, 2012, pp. 4947–4954.
- [6]. *Q. Li, C.W. Kartikowati, S. Horie, T. Ogi, T. Iwaki, K. Okuyama.* “Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles” in *Sci. Rep.*, **vol. 7**, 2017, 9894.
- [7]. *W. Wu, Q. He, C. Jiang.* “Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies” in *Nanoscale Res. Lett.*, **vol. 3**, 2008, pp. 397–415.
- [8]. *R.C. Popescu, E. Andronescu, B. Vasile.* “Recent Advances in Magnetite Nanoparticle Functionalization for Nanomedicine.” in *Nanomaterials*, **vol. 9**, nr. 12, 2019, 1791.
- [9]. *A. Radon, A. Drygala, L. Hawelek, D. Łukowiec.* “Structure and optical properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by co-precipitation method with different organic modifiers.” *Mater. Charact.*, **vol. 131**, 2017, pp. 148–156.
- [10]. *M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, K. Balamurugan.* “Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications.” *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, **vol. 135**, 2015, pp. 536–539.
- [11]. *N.L. Chaves, I. Estrela-Lopis, J. Böttner, C.A. Lopes, B.C. Guido, A.R. de Sousa, S.N. Báo.* “Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells.” *Int J Nanomed*, **vol. 12**, 2017, pp. 5511–5523.
- [12]. *Q. Feng, Y. Liu, J. Huang, K. Chen, J. Huang, K. Xiao.* “Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings.” *Sci Rep*, **vol. 8**, 2018, 2082.
- [13]. *K. Li, X. Zhao, B.K. Hammer, S. Du, Y. Chen.* “Nanoparticles Inhibit DNA Replication by Binding to DNA: Modeling and Experimental Validation.” in *ACS Nano*, **vol. 7**, 2013, pp. 9664–9674.
- [14]. *R. Generalov, W.B. Kuan, W. Chen, S. Kristensen, P. Juzenas.* “Radiosensitizing effect of zinc oxide and silica nanocomposites on cancer cells.” in *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **vol. 129**, 2015, pp. 79–86.
- [15]. *S. Her, D.A. Jaffray, C. Allen.* “Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements.” in *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **vol. 109**, 2017, pp. 84–101.
- [16]. *M. Roser, H. Ritchie.* “Cancer” <https://ourworldindata.org/cancer>, 2015.
- [17]. \*\*\* World Health Organisation. Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, 2018.
- [18]. \*\*\* Medichub.Ritmul lumii medicale. Romania in Global Cancer Statistics 2018. <https://www.medichub.ro/reviste/oncolog-hematolog-ro/romania-in-global-cancer-statistics-2018-id-2019-cmsid-68>, 2018
- [19]. *R. Massart.* “Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media” in *IEEE Trans. Magn.*, **vol. 17**, 1981, pp. 1247–1248.
- [20]. *R.C. Popescu, E. Andronescu, B.S. Vasile, R. Trusca, A. Boldeiu, L. Mogoanta, G.D. Mogosanu, M. Temelie, M. Radu, A.M. Grumezescu, D. Savu.* “Fabrication and Cytotoxicity of Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles.” *Molecules*, **vol. 22**, 2017, 1080.
- [21]. *B. Li, H. Cao, J. Shao, M. Qu.* “Enhanced anode performances of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Carbon-rGO three dimensional composite in lithium ion batteries.” *Chem. Commun.*, **Vol. 47**, 2011, pp. 10374–10376.
- [22]. *S. Ahlberg, A. Antonopoulos, J. Diendorf, R. Dringen, M. Epple, R. Flöck, W. Goedecke, C. Graf, N. Haberl, J. Helmlinger.* “PVP-Coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and *in vivo* experiments.” *Beilstein J. Nanotechnol.*, **vol. 5**, 2014, pp. 1944–1965.
- [23]. \*\*\* The RRUFF Project The Database. Magnetite R061111. <http://rruff.info/magnetite/R061111> (Accesat la data de 22.07.2020).
- [24]. *R.C. Popescu, M. Straticiu, C. Mustaciosu, M. Temelie, R. Trusca, B.S. Vasile, A. Boldeiu, D. Mirea, R.F. Andrei, C. Cenusu, L. Mogoanta, G.D. Mogosanu, E. Andronescu, M. Radu, M.R. Veldwijk, D.I. Savu,* “Enhanced Internalization of Nanoparticles Following Ionizing Radiation Leads to Mitotic Catastrophe in MG-63 Human Osteosarcoma Cells.” *Int J. Molec. Sci.*, 2020, **vol. 21**, nr. 19, 7220.

- 
- [25]. **R.C. Popescu**, D.I. Savu, A.D. Olarescu, O. Gherasim, S. Banita, M. Straticiuc, D. Mirea, R.F. Andrei, R. Trusca, B.S. Vasile, G. Socol, E. Andronescu. "In vitro magnetic targeted delivery of doxorubicin using iron oxide nanoparticles leads to enhanced cell death in glioblastoma." U.P.B. Sci. Bull, Series B, **acceptat pentru publicare**, 2020.
- [26]. **R.C. Popescu**, D. Savu, I. Dorobantu, B.S. Vasile, H. Hossler, A. Boldeiu, M. Temelie, M. Straticiuc, D.A. Iancu, E. Andronescu, F. Wenz, F.A. Giordano, C. Herskind, M.R. Veldwijk. "Efficient uptake and retention of iron oxide-based nanoparticles in HeLa cells leads to an effective intracellular delivery of doxorubicin." Sci Rep, **vol. 10**, 2020, 10530.
- [27]. E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, T. Mazzei. "Cellular pharmacology of gemcitabine." Ann. Oncol., **vol. 17**, 2006, pp. v7–v12.
- [28]. S. Sabella, R.P. Carney, V. Brunetti, M.A. Malvindi, N. Al-Juffali, G. Vecchio, S.M. Janes, O.M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci. "A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles." Nanoscale, **vol. 6**, 2014, pp. 7052–7061.
- [29]. A.R. Munoz-Duarte, N.S. Castrejon-Jimenez, S.L. Blierra-Urbe, S.J. Perez-Rangel, N. Carapia-Minero, J.I. Castaneda-Sanchez, J. Luna-Herrera, R. Lopez-Santiago, A.V. Rodriguez-Tovar, B.E. Garcia-Perez. "Candida glabrata survives and replicate in human osteoblasts." Pathogens and Disease, vol. 74, nr. 4, 2016, ftw030.