

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Optimizarea terapiilor antitumorale în tumorile cerebrale maligne

---

Doctorand **Mihaela-Diana Aldea**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ioan-Ștefan Florian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

## INTRODUCERE

### STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

#### 1. Glioblastomul și celulele stem tumorale

1.1. Nanotehnologia în tumorile cerebrale

1.1.1. Bariera interstițială a GBM

#### 2. Nanoparticule pentru tumorile cerebrale

2.1. NP conjugate cu enzime modulatorie ale ECM

2.2. NP care țintesc hyaluronan-CD44

2.3. NP care țintesc fibroblastele asociate cancerului (CAFs)

2.4. NP "micșorate"

2.5. NP încorporate în celule care migrează către zone hipoxice

2.6. NP sensibile la pH

2.7. Detectarea metaboliților tumorali

2.8. NP sensibile la hipoxie cu bază de derivați nitroimidazolici

2.9. NP care detectează semnalizarea celulelor hipoxice

2.10. NP care detectează proteine supraexprimate la nivelul celulelor tumorale din glioblastom

### CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

#### 1. Ipoteza de lucru/obiective

#### 2. Metodologie generală

#### 3. Studiul 1 - Nanoparticulele de aur învelite în chitosan afectează supraviețuirea celulelor tumorale radiorezistente din glioblastom

3.1. Introducere

3.2. Ipoteza de lucru/obiective

3.3. Material și metodă

3.4. Rezultate

3.5. Discuții

3.6. Concluzii

#### 4. Studiul 2 - Livrarea metforminului prin utilizarea nanoparticulelor de aur învelite în chitosan

4.1. Introducere

4.2. Ipoteza de lucru/obiective

4.3. Material și metodă

4.4. Rezultate

4.5. Discuții

4.6. Concluzii

## **5. Studiul 3 - Nanoparticulele de aur în modelul de angiogeneză tumorală**

- 5.1. Introducere
- 5.2. Ipoteza de lucru/obiective
- 5.3. Material și metodă
- 5.4. Rezultate
- 5.5. Discuții
- 5.6. Concluzii

## **6. Discuții generale**

## **7. Concluzii generale**

## **8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

## **REFERINȚE**

**Cuvinte cheie** glioblastom, nanoparticule de aur, celule stem tumorale, chitosan, radioterapie, metformin, angiogeneză

## **Stadiul actual al cunoașterii**

Glioblastomul (GBM) este o tumoră extrem de agresivă, cu o angiogeneză remarcabilă și arii extinse de necroză, în care se impune găsirea unor noi strategii terapeutice. Rezecția neurochirurgicală completă este cel mai adesea imposibilă din cauza naturii înalt infiltrative a acestor tumori. În ciuda radio-chimioterapiei adjuvante, progresele în ceea ce privește supraviețuirea pacienților sunt limitate și recidiva tumorală este invariabilă. Pacienții trăiesc în medie doar 12-15 luni după diagnosticul inițial, ceea ce oferă GBM-ului cel mai prost prognostic în rândul tuturor cancerelor cerebrale primare.

Unul dintre elementele esențiale ce pot explica acest prognostic infaust este prezența celulelor stem tumorale din glioblastom (GSC), care supraviețuiesc în ciuda nevoii de oxigen și de nutrienți, sunt rezistente la radio-chimioterapie și dau naștere recidivelor tumorale. Capacitatea crescută de reparare a ADN-ului și expresia înaltă a casetelor de legare a ATP-ului a proteinelor de eflux protejează GSCs de tratamentele convenționale, explicând comportamentul lor agresiv. Această rezistență poate fi depășită prin utilizarea nanotehnologiei, care oferă strategii atrăgătoare pentru acumularea preferențială a medicamentelor, eliberarea controlată a agenților anti-tumorali sau țintirea specifică a celulelor tumorale, cu scopul de a obține o concentrație eficientă de medicament în tumoră, cu toxicitate minimă pe țesuturile sănătoase. Datorită dimensiunilor lor mici și a diferitor calități fizico-chimice, nanoparticulele (NP) ar putea să transporte medicamente sau terapii genice la nivelul barierei hemato-encefalice și ar putea fi proiectate să se acumuleze specific în regiuni cu pH scăzut, de tipul zonelor mai puțin oxigenate, unde ar putea să elibereze în mod selectiv conținutul lor.

Mai mult, nanotehnologia poate deschide noi căi în abordarea radiorezistenței. O metodă interesantă este cea a utilizării NP cu metale grele ca radio-expanderi pentru obținerea unei augmentări a radiației dinspre "interiorul" tumorii când o sursă de radiație relativ mică este aplicată din "afară". Acest fenomen poartă denumirea de "efectul Compton" și sugerează că NP cu metale grele iradiate (cum ar fi nanoparticule de aur = GNP) ar putea crește nivelul local de radiații printr-o iradiere secundară generată de NP, prin efectul fotoelectric (în mare parte) și/sau efectul Compton. Limitarea impactului din imediata vecinătate a conglomeratelor de GNP are avantajul de a limita leziunile cerebrale inutile.

## **Obiective**

Această lucrare se axează pe dezvoltarea unor produși noi anti-tumorali pe baza sintezei unui nanovector format din NP de aur învelite în chitosan, care poate fi încărcat cu agenți citotoxici sau îndreptați împotriva angiogenezei. Scopul este obținerea unei internalizări intracelulare tumorale crescute, a unei citotoxicități selective pentru celulele tumorale și studierea unui posibil efect de radiosensibilizare. De asemenea, se prezintă posibilele avantaje și limitări ale terapiilor bazate pe NP în țintirea celulelor tumorale din glioblastom și se discută aplicabilitatea acestora în tratamentul GBM.

## **Metodologie generală**

Am realizat un studiu experimental in vitro, pe culturi de celule stem tumorale izolate din glioblastom de către echipa Institutului Oncologic “Ion Chiricuță” și pe linii celulare comerciale. Designul, sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de aur funcționalizate cu diverși compuși a fost realizată cu ajutorul echipei de cercetare de la Facultatea de Fizică și de la Centrul de Nanobiofonică și Microscopie Laser, UBB Cluj-Napoca, precum și la Catedra de Biologie Celulară, UMF “Iuliu Hațieganu”.

Toate experimentele in vitro au fost realizate în cadrul Laboratorului de Biologie Tumorală, cu ajutorul echipei de cercetare a Institutului Oncologic. Experimentele de iradiere au fost realizate la Institutul Oncologic și la Clinica de Radioterapie Amethyst. Această lucrare a fost finanțată dintr-un grant de cercetare Tinere Echipe (PNII-RU-TE-2014-4- 0225 - coordonator - Conf Dr Gabriel Kacso) și un grant oferit de UMF “Iuliu Hațieganu” (7690/2/15.04.2016). Experimentele inițiale care au dus la conturarea acestei teze au fost finanțate dintr-un grant național coordonat de d-nul Prof Dr Ioan Ștefan Florian (ID 1161).

## **Studiul 1 - Nanoparticulele de aur învelite în chitosan afectează supraviețuirea celulelor tumorale radiorezistente din glioblastom**

În primul studiu, am sintetizat NP de aur funcționalizate cu chitosan (Chit-GNPs) cu scopul de a depăși limitările concentrațiilor medicamentoase printr-o internalizare crescută la nivelul GSC și am testat dacă astfel de NP de aur ar putea crește răspunsul GSC la radiații cu surse de radiație înalte (MV) și joase (kV).

Chitosanul, un polizaharid derivat din chitină, a fost utilizat la învelirea NP de aur datorită biocompatibilității sale, a profilului de toxicitate sigur, a capacității sale de a interacționa și a permeabiliza membranele celulare și de asemenea și pentru capacitatea sa de a elibera conținutul în condiții de aciditate. Mai mult de atât, chitosanul a fost raportat ca având un rol chiar și în țintirea tumorală datorită structurii sale asemănătoare cu a acidului hialuronic, un ligand natural CD44, care este un receptor exprimat în principal în celulele stem tumorale.

NP de aur funcționalizate cu citrat (GNP) au fost preparate după metoda Turkevich–Frens. Pentru caracterizarea fizico-chimică a NP, am realizat măsurători de spectrofotometrie, determinarea potențialului zeta, iar pentru determinarea concentrației de aur în suspensia coloidală ( $\mu\text{g/mL}$ ), a fost utilizată spectroscopia de absorbție atomică. Microscopia electronică de transmisie (TEM) a fost utilizată la determinarea mărimii medii a NP și pentru analiza internalizării NP la nivel intracelular. Experimentul a fost realizat pe linii celulare izolate din glioblastom, constând din trei linii de celule stem tumorale izolate anterior de echipa noastră din fragmente tumorale proaspăt rezecate de glioblastom. De asemenea, am folosit o linie de osteoblaste umane primare, care au servit ca “modele celulare normale”. GNP și Chit-GNPs au fost administrate în doze cu concentrații crescătoare variind de la 0.1 la 20  $\mu\text{g/mL}$ . Internalizarea NP a fost analizată prin microscopie în câmp întunecat și TEM. După administrarea NP, liniile celulare au fost iradiate cu radioterapie fracționată (3 fracțiuni consecutive de 1 și 2 Gy) și o singură fracțiune de 6 Gy la

energii de megavoltaj (1.25 MV) și energie joasă (0.3 MV) cu sursă de brahiterapie cu doză înaltă Iridium 192. Analiza citotoxicității tratamentelor a fost realizată prin analizarea viabilității celulare prin testul MTT.

În urma sintezei, am obținut NP de aur învelite în chitosan, de formă sferică, cu un diametru mediu de 26 nm și o sarcină pozitivă de + 49 mV. Aceste caracteristici fizico-chimice au permis Chit-GNP să fie intens internalizate în GSC și în osteoblaste prin pinocitoză și să formeze agregate numeroase și mari de NP în citoplasmă, lizozomi și în apropierea nucleului. În mod surprinzător, nicio GNP neacoperită nu a fost observată la 4 și 24 ore în GSC analizate. Această diferență imensă de captare celulară poate fi explicată prin sarcina pozitivă a Chit-GNP care sunt atrase cu ușurință de celulele cu sarcină negativă, în timp ce sarcina negativă a GNP goale ar putea împiedica internalizarea celulară din cauza forțelor de repulsie dintre celule și NP. O altă explicație ar fi aceea că din lipsa agenților adiționali de stabilizare, GNP funcționalizate cu citrat prezintă doar o stabilitate electrostatică care nu protejează NP de agregarea nedorită în mediu biologic. Ca și consecință, agregatele de NP mai mari create prin incubare ar putea fi greu internalizate de către celule.

Un alt scop al lucrării noastre a fost de a testa dacă Chit-GNP sau GNP ar putea sensibiliza la iradiere GSC înalt radio-rezistente. Am ales aurul pentru crearea NP nu doar pentru proprietățile sale inerte, dar mai ales pentru că se presupune că metalele grele cresc local răspunsul la iradiere când se aplică o sursă externă de iradiere cu fotoni. Baza fizică este efectul fotoelectric, care este semnificativ la energii joase ( $\leq 0.3$  MV) și de asemenea dependent de masa atomică ( $Z$ ) a țintei (așadar mai pronunțată pentru aur). La energii mai înalte, efectul Compton (independent de  $Z$ ) întrece efectul fotoelectric și rata de augmentare descrește. Acest fenomen a fost descris în mai multe studii ca fiind o strategie anti-tumorală eficientă.

În ciuda unei intense captări celulare a Chit-GNP, studiul nostru nu a evidențiat o radiosensibilizare a GSC când Chit-GNP/GNP au fost administrate în combinație cu iradierea. Cu toate acestea, efectul de radio-augmentare al NP a fost observat pe celulele normale, care au fost ușor sensibile la iradiere și sensibilizate și mai mult când au fost adăugate ambele GNPs și Chit-GNP. Acest fapt sugerează că GNP/Chit-GNP ar putea fi capabile să crească răspunsul la radioterapie doar dacă linia celulară are ca și caracteristică intrinsecă o sensibilitate parțială la iradiere. Joh et al. au utilizat linia celulară U251 glioblastom care a răspuns parțial la iradiere chiar și fără GNP, în timp ce GSC noastre au fost înalt rezistente la orice doze de iradiere / protocoale utilizate.

Un rezultat surprinzător al studiului nostru a fost acela că micile concentrații de  $\mu\text{g/mL}$  ale Chit-GNP s-au dovedit foarte citotoxice pentru GSC folosite, iar citotoxicitatea lor a fost selectivă pentru liniile tumorale și nu au afectat linia celulară normală. Acest fapt se poate explica prin acumularea intracelulară crescută de chitosan și aur, cu toate acestea, fiecare compus folosit în monoterapie este inofensiv pentru GSC.

Citotoxicitatea selectivă a Chit-GNP pentru GSC se poate datora internalizării majore a NP în GSC, care este mai mare comparativ cu cea în osteoblastele normale. Cu toate acestea,

numeroase agregate NP au fost observate în celulele normale, ceea ce face această presupunere mai puțin probabilă. Studiul lui Rao generează o ipoteză, deoarece autorii au observat că deși produsul lor cu chitosan, nDOX se putea lega de receptorii CD44 pe celulele mamosferă canceroase inclusiv celulele stem-like, nu se lega în mod necesar de receptorii CD44 înalt exprimați pe celulele stem necanceroase. Ei au arătat că nicio legare aparentă nu poate fi observată între nDOX și receptorii CD44 supra-exprimați pe celulele stem umane primare normale adipos-derivate cultivate fie în sfere 3D sau sub cultură aderentă 2D ceea ce sugerează că CD44 ar putea avea izoforme diferite exprimate pe celulele stem-like tumorale comparativ cu celulele stem normale.

Dozele scăzute de NPs și dozele mici de radiații folosite în acest studiu comparativ cu alte studii au fost alese în mod special din motive de siguranță din punct de vedere translațional. Dozele mai mari de NPs ar putea duce la o acumulare mai mare de excipienți în creier și fracțiunile de iradiere mai mari ar fi prea toxice pentru țesutul cerebral normal. Cu toate acestea, după ce nu s-a observat un efect de radio-augmentare la doze de 1 și 2 Gy, am verificat de asemenea și un nivel de doză de 6 Gy/fr, în încercarea de a depăși radiorezistența intrinsecă a liniilor noastre celulare, dar, din nou, fără diferență semnificativă. O limitare în studiul nostru ar putea fi utilizarea testului MTT pentru evaluarea răspunsului la iradiere.

În total, primul studiu al lucrării de doctorat a demonstrat că NP Chit-GNP au fost obținute printr-o manieră ușoară, reproductibilă și cost-eficientă. S-a demonstrat că Chit-GNPs au un efect citotoxic selectiv pe celulele stem prelevate de la pacienți cu glioblastom chiar și atunci când sunt folosite în concentrații mici și că acest efect are loc indiferent de iradierea celulară. Chit-GNP prezintă o captare celulară intensă și se acumulează în citosol prin pinocitoză, în lizozomi și în apropierea nucleului. Din contră, GNP neacoperite nu au fost observate în nicio linie GSC analizată. Astfel, acumularea NP mult crescută în celulele stem tumorale și mai ales efectul lor citotoxic selectiv pe celulele tumorale ar putea face Chit-GNP o componentă atractivă în armamentul împotriva glioblastomului și un vehicul promițător pentru livrarea de medicamente antitumorale.

## **Studiul 2 - Livrarea metforminului prin utilizarea nanoparticulelor de aur învelite în chitosan**

Cel de-al doilea studiu al lucrării de doctorat, are scopul de a continua cercetări anterioare ale echipei, bazate pe rolul metforminului ca agent antitumoral.

Metformin (MET), un medicament anti-diabetic bine-cunoscut, este privit ca un agent terapeutic promițător în diferite tipuri de cancer, datorită proprietăților sale antitumorale. Numeroase experimente in vitro și in vivo au demonstrat că metforminul are capacitatea de a reduce proliferarea tumorală, de a bloca ciclul celular, de a stimula producerea morții celulare de tipul apoptozei și autofagiei. Aceste efecte se datorează activării AMPK și inhibiției căii de semnalizare mTOR. De asemenea, există studii care susțin efectul MET de a sensibiliza celulele tumorale la radioterapie.

Echipa noastră a investigat MET în celulele stem tumorale din glioblastom și a demonstrat un efect surprinzător de reducere a proliferării tumorale a acestor celule extrem de rezistente.

Cu toate acestea, efectele benefice ale MET sunt observate la concentrații mari, cuprinse între 1-10 mM, ceea ce ar corespunde unor doze supra-clinice care ar fi greu de atins în practica clinică. Trialurile clinice care au testat până în prezent MET la aceleași doze ca cele folosite în tratamentul diabetului nu au demonstrat o eficacitate relevantă, posibil datorită faptului că pentru distrugerea celulelor tumorale este nevoie de doze mai mari.

În acest studiu, am pornit de la ipoteza că livrarea MET prin utilizarea nanotehnologiei ar putea depăși limitările dozelor mici de medicament. În consecință, am sintetizat NP de aur încărcate cu concentrații micromolare de MET pentru a testa dacă dozele mici administrate tumoral preferențial ar putea atinge eficacitatea concentrațiilor milimolare administrate fără nanovector.

Astfel, NP de aur învelite în chitosan (GNPc), sintetizate și prezentate în primul studiu, au fost încărcate cu MET, cu scopul unei livrări accentuate la nivelul celulelor tumorale. Sinteza MET-GNPc este ușoară și reproductibilă, rezultând într-un produs stabil, cu caracteristici fizico-chimice similare cu GNPc. Aceasta formulă de delivrare a demonstrat o internalizare intracelulară crescută datorită utilizării GNPc și o activitate antitumorală împotriva celulelor de glioblastom comparativ cu MET utilizat la aceleași doze micromolare în monoterapie. Cu toate acestea, MET-GNPc nu a demonstrat un efect semnificativ în comparație cu GNPc, posibil datorită concentrațiilor mici de MET utilizate la încărcarea NP.

Astfel putem conchide că în ciuda unei internalizări crescute a produsului nou sintetizat, impactarea proliferării tumorale pare să fie mai mult datorată componentei GNPc. Altfel, s-ar părea că încărcarea cu concentrații micromolare de MET nu aduce un beneficiu suplimentar GNPc, posibil din cauza dozelor mici folosite. Ținând cont de importantele efecte antitumorale demonstrate de MET utilizat în concentrații milimolare, ar merita continuată cercetarea pentru a găsi o metodă de delivrare mai eficientă, care să permită o încărcare mai importantă cu MET.

### **Studiul 3 - Nanoparticule de aur în modelul de angieneză tumorală**

Al treilea studiu al lucrării de doctorat se axează pe caracterizarea angiogenezei tumorale și pe sinteza unor NP care să țintească neovasele tumorale.

Aportul de nutrienți și de oxigen este o nevoie crucială a celulelor tumorale în permanentă divizare. Angiogeneza, una dintre cele 7 caracteristici esențiale ale cancerului, reprezintă în continuare o temă de actualitate în armamentariul cancerului, deoarece inhibiția eficientă a angiogenezei ar putea duce la distrucția tumorală.

Glioblastomul este o tumoră extrem de vascularizată, cu o angieneză importantă și arii de hipoxie care stimulează angieneză prin semnalizarea HIF alpha și producția de VEGF. Până în prezent, trialurile clinice care au investigat terapiile antiangiogenice nu au reușit să îmbunătățească supraviețuirea și prognosticul pacienților cu glioblastom. Acest eșec al terapiilor antiangiogenice ar putea fi datorat existenței la nivel tumoral a procesului numit mimare vasculogenică.



Mimarea vasculogenică constă din formarea canalelor microvasculare direct de către celulele tumorale și este un marker al agresivității tumorale, deoarece se dezvoltă mai ales în acele arii care sunt mai puțin oxigenate, fiind un mecanism prin care tumora se adaptează condițiilor nefavorabile. Având în vedere că aceste canale nu au în componență celule endoteliale, este foarte posibil ca acesta să fie una din explicațiile eșecului tratamentelor antiangiogenice convenționale. Mai mult, celulele tumorale de tip stem au capacitatea chiar de a se transforma în endoteliu tumoral, printr-un proces de transdiferențiere, creându-și propria nișă vasculară.

Țintirea angiogenezei ridică astfel mai multe probleme, întrucât devine evident faptul că nu este suficient ca terapiile să distrugă doar vasele provenite din endoteliu, ci este necesar ca acestea să distrugă și microvasele derivate din celule tumorale. Această diferențiere spre exprimarea unui fenotip angiogenic poate fi modulată prin numeroși factori: celulari, biochimici și factori de creștere pro-angiogenici. O linie normală de celule endoteliale cultivată în gel de fibrină îmbogățit cu factori de creștere determină dezvoltarea unor tubi capilari care mimează procesul de dezvoltare a vaselor de sânge. Celulele tumorale din glioblastom, și în special cele stem tumorale, au capacitatea de a forma endoteliu tumoral. În acest studiu, ne-am axat pe studiul mimării vasculare de către celulele tumorale și pe interacțiunea dintre acestea și celulele microendoteliale ale barierei hematoencefalice.

Într-o primă etapă am mimat nișă vasculară prin expunerea celulelor tumorale unor condiții favorabile dezvoltării de neovase. Am reușit să inducem formarea de microtubuli prin cultivarea celulelor pe Matrigel sau pe gel de fibrină și prin cultivarea celulelor în mediu de creștere endotelial îmbogățit cu factori de creștere angiogenică.

În continuare, cu scopul de a ținti și distruge vasele tumorale, am sintetizat NP care ar putea ataca endoteliul tumoral prin legarea NP de diverși anticorpi ce ar putea avea un dublu rol, atât în angiogeneza derivată din endoteliu, dar și în angiogeneza derivată din celulele tumorale. Astfel, realizarea unui agent terapeutic țintit și optimizarea eficienței acestuia a reprezentat un obiectiv cheie al proiectului. Ne-am focalizat pe funcționalizarea NP de aur cu anticorpi specifici endoteliului vascular, ținta fiind vascularizația anarhică tumorală. Am selectat 3 clase de anticorpi, și anume: anti-VEGF-R1; anti-VEGF-R2 (receptori ai factorului de creștere endotelial vascular= vascular endotelial growth factor- receptor 1 and 2) și anti-JAM-A (molecule de adeziune joncțională între celulele endoteliale= Junction Adhesion Molecules). Anticorpii anti-VEGF-R au fost folosiți datorită rolului indubitabil al VEGF atât în angiogeneza endotelială, cât și a celei tumorale, precum și a expresiei crescute a acestor receptori la suprafața celulelor tumorale din glioblastom. Szabo et al. au demonstrat că VEGF-R1 și VEGF-R2 modulează clonogenicitatea tumorală în glioblastom, viabilitatea și capacitatea de invazie prin secreție autocrină. Blocarea VEGFR a fost asociată cu reducerea dimensiunii tumorale și cu creșterea necrozei.

De asemenea, am folosit proteina JAM-A ca și țintă pentru NP deoarece JAM-A este o moleculă de adeziune care a fost identificată pe suprafața celulelor stem tumorale din glioblastom, și care s-ar părea să influențeze potențialul tumorigenic și de stemness al acestor GSC. Analizele imunohistochimice cu anticorpi anti-JAM-A au demonstrat o expresie variabilă a JAM-A în

diferite subtipuri tumorale gliale, atât la nivelul membranei celulare, cât și la nivelul citoplasmei. Fenotipurile tumorale mai agresive au fost asociate cu o expresie crescută de JAM-A. Lathia et al. au sintetizat NP anti-JAM-A și au obținut o diminuare a viabilității celulelor stem din glioblastom și a celor cultivate în mediu de diferențiere endotelial. Autorii sugerează că o asemenea metodă de blocare a JAM ar fi lipsită de toxicitate pentru țesutul cerebral normal, întrucât proteina JAM nu este exprimată de către progenitorii neurali.

Pornind de la rezultatele obținute în etapele anterioare ale proiectului, am selectat NP sferice de aur învelite în chitosan cu diametrul de  $26 \pm 6$  nm (GNPc) pentru a fi funcționalizate cu acești anticorpi. Rezultatele noastre au demonstrat un efect citotoxic al NP legate de anticorpi antiangiogenici, demonstrat prin reducerea viabilității celulare analizate prin testul MTT. Cele mai bune efecte anti-tumorale au fost obținute prin utilizarea NP legate de anticorpii VEGFR. Într-o încercare de a augmenta într-o mai mare măsură toxicitatea unor astfel de compuși, am testat și combinația dintre NP legate de anticorp și radioterapie. Cele mai bune rezultate par să fie asociate de asemenea cu utilizarea VEGF-R1-GNPc.

De asemenea, am testat existența unei posibile influențe între endoteliul normal reprezentat de celulele microvasculare ale barierei hematoencefalice și celule tumorale netratate sau tratate cu NP funcționalizate cu anticorpi prin realizarea unui co-culturi care să permită doar transferul de proteine/molecule și nu contact celular direct. Considerentul din spatele acestui model de co-cultură este bazat pe observația că rețelele mimării vasculogenice nu sunt conectate cu angiogeneza provenită din endoteliu. Astfel, studiile de circulație vasculară evaluate prin angiografia confocală cu indocianină verde au arătat că lichidul scapă și se scurge printre celulele endoteliale și în acest fel pătrunde în circulația microvaselor tumorale, pe unde își continuă circulația. Mai mult, prin supra-expresia factorilor pro-angiogenici de către glioblastom, aceste celule tumorale promovează neoangiogeneza și este posibil ca celulele tumorale infiltrative să inter-relaționeze cu celulele endoteliale și să stimuleze dezvoltarea unei rețele endoteliale cu capacități crescute de migrare. D Alessio et al. au lansat ipoteza că secreția crescută a VEGF de către glioblastom ar putea explica migrarea crescută a celulelor endoteliale co-cultivate cu celulele tumorale gliale. Modelul nostru de co-cultură însă nu a demonstrat nicio influență între cele două populații celulare după expunerea la diverse condiții de mediu. O explicație poate fi tipul celular diferit și anume, celulele microvasculare ale barierei hemato-encefalice, față de studiul lui Alessio, care a folosit celule endoteliale de tip HUVEC.

### **Concluzii generale și elemente de originalitate**

Nanotehnologia este o arie de cercetare inovativă, care se dezvoltă rapid și care pare extrem de promițătoare în tratamentul tumorilor cerebrale.

Pe lângă asigurarea unei acumulări selective la nivel tumoral, faptul că eliberarea medicamentelor încărcate poate fi realizată într-un mod controlat și de durată mai lungă, ar putea fi avantajos în lupta cu celule agresive din glioblastom. NP pot avea capacitatea de a traversa bariera interstițială determinată de matricea densă și bogată în collagen a GBM și pot avea o difuzie

accentuată la nivel tumoral, prin jonglarea cu proprietățile lor fizico-chimice în momentul sintezei. Literatura arată progrese importante în acest domeniu. Mecanismele de protecție ale tumorii ar putea fi utilizate ca și avantaje de către nanotehnologie, prin crearea unor ținte tumorale specifice.

În crearea designului NP utilizate la nivel cerebral, o atenție deosebită ar trebui acordată dimensiunii NP și încărcăturii lor electrice. Acestea sunt două elemente esențiale pentru penetrarea în tesutul tumoral, deoarece este preferabil ca NP să aibă o dimensiune mai mică de 50 nm, iar încărcătura lor electrică să fie modulată pentru a permite atât o difuzie prin interstițiul dens încărcat electric de diversele proteine componente, cât și o internalizare intracelulară eficientă. De asemenea, un alt aspect important este ca NP să fie biocompatibile și preferabil rapid degradabile, care să își atingă eficiența la concentrații mici, pentru a evita acumularea de excipienți în creier și posibilele efecte neurotoxice asociate.

Ținând cont de caracteristicile unor nanoparticule ideale, această lucrare prezintă sinteza și testează eficiența unor NP de aur funcționalizate cu chitosan și încărcate cu diferite molecule cu scopul de a obține efecte antitumorale. Studiile noastre au implicat modelul experimental in vitro pe celule stem tumorale și non-stem din GBM. Nanovectorul de bază sintetizat este NP de aur învelită în chitosan, Chit-GNP (sau GNPC), de dimensiuni medii de 26 nm, cu un potențial zeta ușor pozitiv și de formă sferică, care a dovedit o internalizare crescută la nivelul celulelor tumorale din GBM. În mod surprinzător, Chit-GNP au dovedit o activitate antitumorală chiar utilizate în doze mici și fără a fi încărcate cu agenți citotoxici, spre deosebire de GNP neînvelite în chitosan, care nu au avut niciun efect. Chiar dacă compusul a fost internalizat și de către celulele normale, citotoxicitatea sa s-a dovedit selectivă la nivel tumoral, întrucât acesta nu a afectat celulele normale, demonstrând astfel un profil de siguranță corespunzător. Aceste efecte ne-au sugerat că Chit-GNP poate fi un nanovector promițător și am continuat cercetarea prin încărcarea Chit-GNPC cu molecule cu scop antitumoral.

Am reușit sintetizarea unui nou produs prin încărcarea nanovectorului cu MET, însă deși produsul a fost citotoxic pentru celulele tumorale, s-ar părea că citotoxicitatea sa se datorează mai mult componente învelite în chitosan și că MET nu aduce un beneficiu semnificativ. Explicația cea mai probabilă este folosirea unei concentrații insuficiente de MET la încărcarea NP, limitare ce poate fi corectată prin testarea mai multor doze de încărcare.

Nanotehnologia poate fi de asemenea folosită pentru optimizarea țintirii angiogenezei unde este necesar ca terapiile să distrugă nu doar vasele provenite din endoteliu, ci și microvasele derivate din celule tumorale. Celulele tumorale din glioblastom, și în special cele stem tumorale, au capacitatea de a forma endoteliu tumoral. În acest sens, am sintetizat noi NP de aur cuplate cu anticorpi antiangiogenici de tipul anti-VEGFR și anti-JAM și am demonstrat ca aceste produse au o internalizare celulară eficientă și un efect citotoxic tumoral.

Pornind de la rezultate încurajatoare în ceea ce privește citotoxicitatea selectivă tumorală și a unui proces de sinteză relativ ușor și reproductibil, vom continua această cercetare pentru a explora diversele posibilități și posibilele beneficii ale nanovectorului de aur învelit în chitosan și ale încărcării acestuia cu diverși agenți anti-tumorali.

---

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

# The Optimization of Anti-cancer Treatments in Malignant Brain Tumors

---

PhD Student **Mihaela-Diana Aldea**

---

PhD Coordinator Prof.dr. **Ioan-Ștefan Florian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

## INTRODUCTION

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

### 1. Glioblastoma and cancer stem cells

- 1.1. Nanotechnology in brain tumors
  - 1.1.1. The interstitial barrier of GBM

### 2. Nanoparticles for brain tumors

- 2.1. NP conjugated with extracellular matrix modulating enzymes
- 2.2. NP targeting hyaluronan-CD44
- 2.3. NP targeting cancer-associated fibroblasts
- 2.4. Shrunken NP
- 2.5. NP incorporated in cells that migrate towards hypoxic zones
- 2.6. pH sensitive NP
- 2.7. The detection of tumoral metabolites
- 2.8. Hypoxia sensitive NP with nitroimidazoles derivatives
- 2.9. NP detecting hypoxic cells signaling
- 2.10. NP targeting the over-expressed antigens of glioblastoma cells

## PERSONAL CONTRIBUTION

### 1. Working hypothesis/objectives

### 2. General methodology

### 3. 1st Study – Chitosan-capped gold nanoparticles impact radioresistant glioblastoma cells

- 3.1. Introduction
- 3.2. Working hypothesis/objectives
- 3.3. Materials and Methods
- 3.4. Results
- 3.5. Discussions
- 3.6. Conclusions

### 4. 2nd Study – Metformin delivery via chitosan-capped gold nanoparticles

- 4.1. Introduction
- 4.2. Working hypothesis/objectives
- 4.3. Materials and Methods
- 4.4. Results
- 4.5. Discussions
- 4.6. Conclusions

### 5. 3rd Study – Gold nanoparticles targeting tumoral angiogenesis

- 5.1. Introduction

5.2. Working hypothesis/objectives

5.3. Materials and Methods

5.4. Results

5.5. Discussions

5.6. Conclusions

**6. General discussions**

**7. General conclusions**

**8. Originality and innovative contributions of the thesis**

## **REFERENCES**

**Key words** glioblastoma, gold nanoparticles, cancer stem cells, chitosan, radiotherapy, metformin, angiogenesis

### **Current state of knowledge**

Even to this day, glioblastoma (GBM) remains a challenge for oncologists worldwide, with a stringent need for new treatment strategies. Complete neurosurgical resection is frequently impossible due to the highly infiltrative nature of these tumors. Despite adjuvant radio-chemotherapy, improvements in patient survival are limited and tumor recurrence is invariable. Patients most likely live only 12-15 months after initial diagnosis, which confers GBM the worst prognosis of all primary brain cancer.

GBM has its Spartans: glioblastoma stem cells (GSCs), the strongest cells that survive despite oxygen thirst and nutrient craving, which also resist chemo- and radiotherapy and give rise to tumor relapse. Increased DNA repair capacity and enhanced expression of ATP-binding cassette drug transporters shield GSCs from conventional treatments and explain their aggressive behavior. This daunting treatment resistance may be overcome by the use of nanotechnology, which provides appealing strategies for preferential drug accumulation, controlled-release of anticancer agents or specific targeting of cancer cells, with the aim of attaining effective drug concentrations in the tumor and minimal toxicity on healthy tissues. Because of their small size and various chemical features, nanoparticles (NPs) could transport drugs or gene-silencing therapeutics across the blood brain barrier (BBB) and could be designed to specifically accumulate in low-pH tumoral regions, where they could selectively release their contents in order to attain effective drug concentrations.

Moreover, nanotechnology may open new avenues in addressing radioresistance. One interesting method would be the use of heavy metal nanoparticles (NPs) as radio-expanders in order to enhance the radiation from the “inside” of the tumor when a relatively low radiation source is applied from the “outside”. This phenomenon is termed the “Compton effect” and implies that irradiated high Z nanoparticles (such as gold nanoparticles = GNP) would be able to boost local radiation levels by secondary radiation produced by nanoparticles, through photoelectric effect (mainly) and/or Compton effect. The limitation of the impact in the immediate vicinity of GNP conglomerates has the advantage of sparing unnecessary brain damage.

### **Aim of the paper**

This paper aims to develop new anticancer agents by synthesizing a nanovector based on chitosan-capped gold nanoparticles, which will be subsequently loaded with cytotoxic or anti-angiogenic agents. The aim is attaining an increased intratumoral concentration, a selective tumoral toxicity and testing the occurrence of a possible radiosensitizing effect. Moreover, this paper presents the possible advantages and limitations of NP-based therapies in tumor targeting and discusses their applicability in GBM treatment.

### **General methodology**

This is an in vitro study where the experiments were tested on commercial glioblastoma cells lines and cancer-stem like cells, previously isolated from human glioblastoma specimens, by the research team of the Ion Chiricuta Cancer Center. The design, synthesis and nanoparticle

characterisation were made at the Nanobiophotonics and Laser Microscopy Center, Interdisciplinary Research in Bio-Nano-Sciences, and Faculty of Physics, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, and at the Departement of Cellular Biology, Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy.

All the in vitro experiments were realised at the Laboratory of Tumoral Biology, Ion Chiricuta Cancer Center. The irradiation experiments were developed at the Ion Chiricuta Cancer Center and the Amethyst Clinic of Radiotherapy. This project was financed by a national research grant Young Teams (PNII-RU-TE-2014-4- 0225 - coordinator- Conf Dr Gabriel Kacso) and a grant offered by the Iuliu Hatieganu University (7690/2/15.04.2016). The initial experiments which led to the design of this project were financed by a national grant coordinated by Prof Dr Ioan Ştefan Florian (ID 1161).

### **1st Study – Chitosan-capped gold nanoparticles impact radioresistant glioblastoma cells**

In the first study, we synthesized chitosan-capped gold nanoparticles (Chit-GNPs) in order to overcome the limitations of drug concentrations by an increased cell internalization within GSCs and we tested if such gold NPs could enhance the radiation response of GSCs with high (MV) and low (kV) energy sources of irradiation.

Chitosan, a polysaccharide derivative of chitin, was used to coat gold nanoparticles due to its biocompatibility, safe toxicity profile, its ability to interact and permeate cell membranes and also its ability to release the content in acidic conditions. Moreover, chitosan was reported to have a role even in tumor targeting due to its similar structure with hyaluronic acid, a natural ligand for CD44, which is a receptor mainly expressed by cancer stem cells.

Gold nanoparticles (GNP) and chitosan-capped nanoparticles (Chit-GNP) were synthesized through an adapted Turkevich-Frens method. NP physico-chemical characterization was analyzed through spectroscopic measurements, the determination of the zeta potential and by atomic mass spectroscopy for measuring the gold concentration from the colloid suspension. Transmission electron microscopy was used for NP measurements and for the study of NP cellular internalization. The experiments were performed on cancer stem-like cells previously isolated by our team from freshly resected glioblastoma fragments. Also, a primary human osteoblasts cell lines was used as a “normal control”. GNP and Chit-GNP were administered in various concentrations ranging from 0.1 to 20 µg/mL. NP internalization was assessed through dark field microscopy and TEM. After NP administration, cell lines were irradiated with fractionated radiotherapy (3 consecutive fractions of 1 and 2 Gy) and one fraction of 6 Gy at mega-voltage energies (1.25 MV) and low-voltage energies (0.3 MV) with a brachytherapy source of Iridium 192. The cytotoxicity was assessed through the MTT viability test.

Our work generated chitosan-capped gold nanoparticles of spherical shape, with a mean diameter of 26 nm and a positive charge of + 49 mV. These physico-chemical characteristics enabled Chit-GNPs to be highly internalized within GSCs and osteoblasts via pinocytosis and to



form numerous and large aggregates of NPs within the cytoplasm, lysosomes and near the nucleus. Their accumulation within the lysosomes might be a major advantage for further drug delivery applications because chitosan has the ability of releasing the content in acidic conditions. Surprisingly, no uncoated GNPs have been observed at 4 and 24 h in any of the analyzed GSCs. This huge difference in cellular uptake may be explained by the positive charge of Chit-GNP that are easily attracted by the negatively-charged cells, whereas the negative charge of naked GNP might impede cell internalization due to repulsion forces between cells and NPs. Another explanation might be that in the lack of additional stabilizing agents, citrate capped GNPs present only electrostatic stability which did not protect NPs from the undesired aggregation in biological medium. As a consequence, larger NP assemblies created upon incubation may be hardly internalized by cells.

Another aim of our paper was to test if Chit-GNPs or GNPs could sensitize highly radioresistant GSCs to radiotherapy. We chose gold for NP development not only for their inert properties, but especially because heavy metals are hypothesized to locally enhance the response to irradiation when an external source of photon irradiation is applied. The physical basis is by the photoelectric effect, which is significant at low energies ( $\leq 0.3$  MV) and also dependent on the atomic mass ( $Z$ ) of the target (and therefore more pronounced for the gold). At higher energies, the Compton effect (independent of the  $Z$ ) exceeds the photoelectric effect and the enhancement ratio decreases. This phenomenon has been described in several studies as an efficient anti-cancer strategy.

Despite having a huge Chit-GNP cellular uptake, our data did not confirm the results of Joh et al., as our study did not show a radiosensitization of GSCs when Chit-GNP/GNP were administered in combination with irradiation. However, the radio-enhancer effect of NPs was observed on normal cells, which were slightly sensitive to irradiation and further sensitized when both GNPs and Chit-GNPs were used. This suggests that GNP/Chit-GNPs might be able to enhance the response to radiotherapy only if the cell line is partly sensitive to irradiation as an intrinsic feature. Joh et al. used the U251 glioblastoma cell line that partly responded to irradiation even without GNPs, whereas our GSCs were highly resistant to any of the irradiation doses/protocols used.

A surprising result of our study was that small  $\mu\text{g/mL}$  concentrations of Chit-GNPs proved highly cytotoxic for two of the GSCs used and their cytotoxicity was selective for the tumor lines and did not affect the normal cell line. This could be explained by the increased intracellular accumulation of both chitosan and gold, however, each component used as monotherapy is harmless for GSCs.

The selective cytotoxicity of Chit-GNPs for GSCs could be due to the major NP internalization within GSCs, which is larger compared to normal osteoblasts. However, numerous NP aggregates have also been observed within normal cells, that makes this assumption less probable. The study of Rao generates a hypothesis because the authors observed that although their chitosan-decorated product, nDOX could bind to the CD44 receptors on the cancerous

mammosphere cells including cancer stem-like cells, it does not necessarily bind to the CD44 receptors highly expressed on non-cancerous stem cells. They showed that no apparent binding could be observed between nDOX and the CD44 receptors overexpressed on the normal primary human adipose-derived stem cells either cultured in 3D spheres or under 2D adherent culture which suggests that CD44 could have different isoforms expressed on cancer stem-like cells compared to normal stem cells.

The low doses of NPs and the small radiation doses utilized in this study compared to other studies were specifically chosen due to safety reasons from a translational point of view. High doses of NPs would result in an increased accumulation of excipients within the brain and higher fractions of irradiation would be too toxic for the normal brain tissue. Nevertheless, after not observing a radio-enhancement effect at doses of 1 and 2 Gy, we checked also a dose-level of 6 Gy/fr, trying to overcome the intrinsic radioresistance of our cell lines but, again, without significant difference. One limitation of our study could be the use of MTT test for assessing the response to irradiation.

This study concludes that chitosan-capped gold nanoparticles are produced in an easy, reproducible and cost-effective way. In this paper, we have proved that Chit-GNPs have a selective cytotoxic effect on patient-derived glioblastoma stem cells even when used in small concentrations and that this effect occurs irrespective of cell irradiation. The Chit-GNPs have a huge cellular uptake and they accumulate within the cytosol via pinocytosis, in the lysosomes and near the nucleus. On the contrary, uncoated GNP were not observed within any of the GSC lines analyzed. Radiotherapy failed to add an additional benefit when administered to these highly resistant GSC lines and Chit-GNP did not sensitize GSC to irradiation. However, our results on osteoblasts suggest that GNP and Chit-GNP may further sensitize cell to irradiation, if such cells have an intrinsic radiosensitivity. The highly increased NP accumulation within cancer stem cells and especially their selective cytotoxic effect on tumor cells, make Chit-GNP an attractive component of the armamentarium against glioblastoma and a promising backbone for anti-cancer drug delivery.

## **2nd Study – Metformin delivery through chitosan-capped gold nanoparticles**

The second study aims at pursuing anterior research of the team, based on the role of metformin as an anti-cancer agent.

Metformin (MET), a well-known oral antidiabetic, has been regarded as an extremely promising anticancer agent in many cancer types. In vitro and in vivo experiments proved a myriad of mechanisms of action, including decreased cell proliferation, cell cycle arrest, autophagy, apoptosis and cell death in vitro with a concomitant activation of AMPK and inhibition of the mTOR pathway, while also sensitizing cells to radiotherapy.

Our team investigated MET in glioblastoma cell lines and proved a surprising reduction of glioblastoma stem-like cells proliferation.

However, this benefits were observed mainly at supra-clinical doses of 1-10 mM, which are easily obtained in vitro or in vivo experiments, but are unlikely to be obtained in the clinical setting. Clinical cancer trials that have tested MET with the same doses used in anti-diabetic therapy failed to translate into a relevant tumor response, possibly due to lack of MET adequate high concentrations for cancer cell killing.

We hypothesize that MET tumor targeted delivery by nanotechnology might overcome the ineffectiveness of small drug concentrations. Therefore, in this study, we synthesized gold nanoparticles loaded with micromolar concentrations of MET in order to test if such low dose compounds reach the anticancer effects observed with high free drug MET therapy.

Therefore, our team further synthesized GNPC and managed to functionalize them with small micromolar concentration of MET, in order to test if their enhanced delivery would lead to a therapeutic drug efficiency within the tumor cells. The synthesis of MET nanoparticles was an easy, reproducible method and resulted in the development of a stable compound, with physico-chemical characteristics similar to GNPC. However, although both GNPC and MET-GNPC had an important intracellular accumulation and proved to impact the survival of glioblastoma cells, there were no statistically significant differences between GNPC and MET-GNPC, suggesting that MET does not bring an additional benefit when used in small micromolar drug concentrations.

Herein, we have developed a novel GNP loaded with MET, by using a biocompatible and biodegradable polymer, chitosan, as a reducing agent. This formulation exhibited high cell internalization due to the use of GNPC and had an increased anti-glioblastoma activity compared to free MET used in small micromolar concentrations. However, MET-GNPC does not add a significant benefit when compared to GNPC possible due to the small MET concentrations used for binding. Therefore, an increased internalization of MET-GNPC loaded with micromolar concentrations of MET does not prove the same anti-cancer effectiveness of millimolar concentrations of free MET. Improved delivery methods with an increased MET loading should be tested.

### **3rd Study – Gold nanoparticles targeting tumoral angiogenesis**

The third study focuses on tumor angiogenesis and aims at synthesizing NP that could target the tumoral neovasculature.

Providing nutrients and oxygen is a crucial need for the thriving malignant cells. Angiogenesis, one of the seventh hallmarks of cancer, is still a hot topic in the armamentarium of cancer, as its inhibition could lead to an efficient tumor destruction.

GBM is a highly vascularized tumor, with marked angiogenesis and areas of hypoxia and necrosis, that further stimulate angiogenesis through HIF alpha signaling and VEGF production. Clinical trials investigating anti-angiogenic therapies have failed in improving patient outcome. This lack of efficacy could be explained by the existence of vasculogenic mimicry, that is resistant to conventional anti-angiogenic therapies.

Vasculogenic mimicry consists of the development of microvascular canals directly by cancer cells and it is a marker of tumoral aggressiveness as it develops mainly on low oxygenated areas, which makes it an highly efficient method of adaptation to unfavorable environmental conditions. Considering that these canals are not formed by endothelial cells, it is possible that this might explain their lack of response to conventional anti-angiogenic treatments. Moreover, cancer stem cells have the ability of transforming into tumoral endothelium through a transdifferentiation process, by creating their own vascular niche.

Targeting angiogenesis rises several issues, as it becomes obvious that it is not enough for the anti-angiogenic treatments to be limited to destroying endothelial vessels, but also to target the tumoral-derived micro-endothelium. The differentiation through an endothelial phenotype might be modulated through several factors: cellular, biochemical and endothelial growth stimulatory factors. A normal endothelial cell lines cultured in fibrin gel enriched with endothelial growth factors develops capillary tubes mimicking the process of blood vascularization. Glioblastoma cells and especially cancer stem cells have the ability of forming tumoral endothelium. In this study, we focused on the vasculogenic mimicry process and the interaction between glioblastoma cells and human brain barrier micro-endothelial cells.

First, the vascular niche was created by exposing cancer cells to endothelial cell specific conditions. The microtubules formation was successfully developed by culturing cells on Matrigel or fibrin gel and by culturing cells in specific endothelial medium with angiogenic stimulatory factors.

With the aim of targeting and destroying tumoral vessels, we designed gold nanoparticles coupled with antibodies which might target antigens expressed by both the normal endothelium and the tumoral endothelium. Thus, the development of a targeted therapeutic agent was a key step of the project. Gold nanoparticles were functionalized with three antibodies which have an important role in angiogenesis: anti-VEGF-R1; anti-VEGF-R2 (receptors of endothelial growth factor) and anti-JAM-A (molecules of junctional adhesion between endothelial cells). The VEGF-R antibodies were used due to their undoubtedly importance in both the endothelial angiogenesis and the tumoral angiogenesis, as well as for their over-expression at the surface of glioblastoma cells. Szabo et al. demonstrated that VEGF-R1 and VEGF-R2 modulate tumoral clonogenicity of glioblastoma, cancer cell viability and the invasion capacity via autocrine secretion. The blockage of VEGFR was associated with reduction of tumoral size and necrosis.

JAM-A was chosen for NP targeting because JAM-A was identified on the surface of GSCs where it exercises its function as an adhesion molecule, which it is hypothesized to influence the tumorigenic potential of these GSC as well as the stemness maintenance. Immunohistochemical assays of JAM-A antibodies proved a various expression within different glioma subtypes, both at the level of cell membrane and within the cytoplasm. A higher expression of JAM-A is associated with a more aggressive tumor phenotype. Lathia et al. synthesized anti-JAM-A NPs and proved that they impaired the viability of GSCs and of glioblastoma cells cultured in endothelial-

differentiating medium. An advantage of blocking JAM is that such a strategy would not be toxic for the normal brain tissue as the JAM molecule is not expressed by neural progenitor cells.

Chitosan-capped GNP previously synthesized were used as the nanovector and functionalized with the angiogenic-related antibodies. Our results proved a cytotoxic effect of these NP, which led to a reduced viability as proven by the MTT test. The best results in terms of reduced cell viability were observed with the VEGFR-GNP complex. To enhance the anticancer effect of these NP, the administration of NP was combined with the use of radiotherapy. The best responses seem to be associated with VEGF-R1-GNPc.

Also, we tested the relationship between the normal endothelium represented by a cell line of human brain microendothelial cells and tumoral cells by co-culturing these cell populations in insert plates. This model of co-culture permitted only the transfer of molecules/proteins from the cell medium between the two cell populations, without direct cellular contact. Such model of co-culture without direct inter-cellular contact was chosen due to the observation that the tumoral vessels which form the vasculogenic mimicry are not connected with the endothelial-derived vasculature. Thus, studies evaluating the vascular circulation through green indocyanine confocal angiography proved that the liquid leaks through endothelial cells and subsequently enters the tumoral microtubules when it continues its passage. Moreover, as glioblastoma cells over-express pro-angiogenic factors, these cancer cells promote neoangiogenesis and it is possible that the interaction between normal endothelial cells and infiltrative cancer cells would stimulate the development of an endothelial network with increased migration capacities. D Alessio et al. have launched the hypothesis that increased VEGF secretion by glioblastoma cells might explain the enhanced migration of endothelial cells when co-cultured with glial cancer cells. However, our co-culture model did not demonstrate any influence between the two populations after exposing cells to different environmental conditions. One explanation might be the use of different cell types as our team used the microvascular endothelial cells from the brain blood barrier, whereas in Alessio's study, the HUVEC endothelial cells were used.

### **General conclusions and originality**

Nanotechnology, currently a rapidly developing area of research, keeps providing promising experimental approaches of targeting brain tumors, but the proposed nanotherapies are still in the infancy of their development.

Besides ensuring selective accumulation, controlled release and prolonged retention of anticancer drugs, NPs have been further improved to provide additional advantages in the battle against tumor hypoxia. NPs could overcome the interstitial barrier and deeply penetrate tumors by having the appropriate physico-chemical features. Unfavorable tumor features could be converted into targets of cancer treatment.

However, NP size and surface charge clearly restricts the types of nanocarriers that could be eligible for use in brain tumor treatment. To properly penetrate hypoxic regions, NPs less than 50 nm in diameter should be chosen, and their surface charge should be chosen in order to maximize

NP diffusion across dense tumor interstitium and prevent interactions between NP and the electrically-charged tumor stroma. Another important aspect is to engineer biocompatible, non-toxic and rapidly-degradable NPs for safe long-term use which would avoid major side effects.

Taking into account the ideal characteristics of a nanovector, this paper presents the synthesis of chitosan-capped gold nanoparticles and their functionalization with different molecules with the aim of obtaining anti-cancer effects. Our experiments used an in vitro model of glioblastoma, by using glioblastoma-derived cancer stem-like and non-stem cells. The synthesized nanovector was the chitosan-capped gold nanoparticle with a median size of 26 nm, with a slightly positive zeta potential and of spherical form. The compound proved an increased internalization within glioblastoma cells. Surprisingly, Chit-GNP proved an anti-cancer effect even when used at small doses and even without being loaded with specific anti-cancer agents, as opposed to uncapped GNP, which had non-significant toxicities. Even though Chit-GNP was highly internalized also within normal cells, it was non-toxic for the normal cell lines, thus proving an increased safety profile. These promising results suggested that Chit-GNP might be an innovative anti-cancer nanovector and we continued our research by loading the NP with anti-cancer agents.

Our team succeeded the synthesis of a novel product by loading the nanovector with MET. The product proved to be toxic for tumor cells, but its cytotoxicity was mostly associated with the chitosan-capped gold nanoparticle component and MET failed to bring a significant additional benefit. The most probable explanation is the use of an insufficient MET concentration at the NP synthesis, a limitation which might be overcome by testing more loaded drug concentrations.

Moreover, our team used nanotechnology for an optimized neoangiogenesis targeting, as we aimed to target not only the endothelial-derived tumor vasculature, but also the cancer cell-derived angiogenesis. As glioblastoma cells have the ability of forming tumoral microvessels, Chit-GNP were further functionalized with anti-angiogenic antibodies as anti-VEGFR and anti-JAM antibody and proved to have an increased intracellular accumulation and an anti-cancer effect.

The selective anti-cancer toxicity and the easy and reproducible synthesis of these NP are promising results suggesting that such agents might become innovative agents when loading with different anti-cancer molecules and that their optimal combinations worth being further explored.