
SUMMARY OF THE PhD THESIS

Toxicological evaluation of metallic nanostructures addressing the bioavailability improvement of biologically active compounds

PhD Candidate **Claudia Geanina Farcaș**

PhD Project Supervisor Prof. Dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. Nanotechnology and the main nanostructures used in the biomedical field	19
1.1. Lipid-based nanocarriers	21
1.1.1. Liposomes	21
1.1.2. Derived liposomal vesicles	22
1.2. Polymeric nanocarriers	24
1.3. Carbon-based nanostructures	24
1.4. Inorganic nanoparticles	25
1.4.1. Iron oxide nanoparticles	25
2. Nanotechnology-enabled strategies to improve chemotherapy	27
2.1. Enhanced permeability and retention effect	27
2.2. Active transport of the nanostructures	29
2.3. Stimuli-responsive nanosystems	29
2.3.1. Magnetoliposomes	31
3. Nanotechnology limitations in the biomedical field and the facing strategies	33
3.1. The main coating methods used for iron oxide nanoparticles stabilization	34
3.2. Microparticles: the impact in biomedical field	36
4. Nanoparticles impact at the cellular and subcellular level	37
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis/General Objectives	43
2. Study 1 – <i>In vitro</i> and <i>in ovo</i> assessment of naked and oleic acid double coated Fe₃O₄ nanoparticles	45
2.1. Introduction	45
2.2. Objectives	46
2.3. Material and method	46
2.3.1. Chemicals and reagents	46

2.3.2. Cell lines used in the current study	46
2.3.3. Synthesis and characterization of naked and oleic acid double coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles	46
2.3.4. 2D Cell culture	47
2.3.5. Alamar blue assay	48
2.3.6. Immunofluorescence staining	48
2.3.7. Quantification of apoptotic markers by real-time PCR	48
2.3.8. Hen's Egg Test - Chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay	49
2.4. Results	50
2.4.1. Physico-chemical characterization of naked and oleic acid double coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles	50
2.4.1.1. Assessment of Fe ₃ O ₄ suspension stability	50
2.4.1.2. Magnetic properties	52
2.4.1.3. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy	53
2.4.2. Biological assessment of naked and oleic acid double coated Fe ₃ O ₄ nanoparticles	54
2.4.2.1. Cell viability	54
2.4.2.2. Cell morphology	55
2.4.2.3. Bax and Bcl-2 mRNA expressions	57
2.4.2.4. Nuclear and microtubule organization	58
2.4.2.5. Irritation score	60
2.5. Discussions	61
2.6. Conclusions	67

3. Study 2 – Betulinic acid-loaded magnetoliposomes - a potential multifunctional approach to improve anticancer therapy

69

3.1. Introduction	69
3.2. Objectives	71
3.3. Material and method	72
3.3.1. Chemicals and reagents	72
3.3.2. Cell lines used in the current study	73
3.3.3. Three - dimensional reconstructed human epiderm model - EpiDerm™ Skin Model	73
3.3.4. Synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles coated with citric acid	73
3.3.5. Preparation of liposomal samples - <i>recipe I</i>	73

3.3.6. Preparation of liposomal samples - <i>recipe II</i>	74
3.3.7. Physico-chemical characterization of BA-loaded magnetoliposomes - <i>recipe I</i>	75
3.3.7.1. TG/DSC analysis	75
3.3.7.2. SEM-EDAX analysis	75
3.3.7.3. DLS and ζ -potential measurements	75
3.3.8. Physico-chemical characterization of BA-loaded magnetoliposomes and controls - <i>recipe II</i>	75
3.3.8.1. Raman spectroscopy	75
3.3.8.2. SEM-EDAX analysis	76
3.3.8.3. DLS and ζ -potential measurements	76
3.3.8.4. Magnetic characterization	76
3.3.8.4.1. Magnetometry	76
3.3.8.4.2. Magnetically induced heat generation	76
3.3.8.5. Thermal analysis	76
3.3.8.6. Evaluation of encapsulation efficiency	77
3.3.8.6.1. Determination of Fe concentration	77
3.3.8.6.2. Determination of betulinic acid concentration	77
3.3.9. <i>In vitro</i> assessments of BA-loaded magnetoliposomes and controls - <i>recipe I</i>	78
3.3.9.1. 2D Cell culture	78
3.3.9.2. Preparation of the 3D-EpiDerm™ Model	78
3.3.9.3. Alamar blue assay	79
3.3.9.4. Cell monolayer morphology	79
3.3.9.5. Viability assessment of 3D-EpiDerm™ Model	79
3.3.9.6. Interleukin 1 alpha (IL-1 α) quantification	80
3.3.10. Biological evaluation of BA-loaded magnetoliposomes and controls - <i>recipe II</i>	80
3.3.10.1. 2D Cell culture	80
3.3.10.2. Cell treatment protocol	81
3.3.10.3. Hyperthermia protocol	81
3.3.10.4. MTT viability assay	81
3.3.10.5. Prussian blue staining	82
3.3.10.6. LDH cytotoxicity assay	82
3.3.10.7. Scratch assay - a wound healing method	82
3.3.10.8. Fluorescence Immunocytochemistry	83
3.3.10.9. <i>In ovo</i> angiogenesis by means of chick chorioallantoic membrane (CAM) assay	83
3.3.10.10. Statistical analysis	84
3.4. Results	85

3.4.1. Physico-chemical characterization of BA-loaded magnetoliposomes– <i>recipe I</i>	85
3.4.1.1. Thermal analysis	85
3.4.1.2. Structural characterization	85
3.4.1.3. DLS analysis	86
3.4.2. Physico-chemical characterization of liposomal samples and controls – <i>recipe II</i>	87
3.4.2.1. Raman analysis	87
3.4.2.2. Morphological structure and elemental analysis	88
3.4.2.3. Stability, size, magnetization, heating and thermal analysis	88
3.4.2.4. Payload encapsulation efficiency within liposomes	90
3.4.3. <i>In vitro</i> assessment of liposomal samples and controls- <i>recipe I</i>	91
3.4.3.1. Cell viability of 2D cell cultures	91
3.4.3.2. Cell morphology	92
3.4.3.3. Skin irritation test of 3D-reconstructed human epidermis	94
3.4.3.4. Inflammatory mediator analysis of 3D-reconstructed human EpiDerm™ model	94
3.4.4. Biological evaluation of liposomal samples and controls – <i>recipe II</i>	95
3.4.4.1. Cell viability	95
3.4.4.2. Cytotoxic potential	98
3.4.4.3. Cell migration	99
3.4.4.4. MIONPs*CA localization in cells	100
3.4.4.5. Nuclear and microtubule organization	102
3.4.4.6. <i>In ovo</i> angiogenesis	105
3.5. Discussions	107
3.6. Conclusions	115
4. Study 3 – Superparamagnetic-Like Iron Oxide Micrometric Single Crystals – cytotoxicity assessments	117
4.1. Introduction	117
4.2. Objectives	118
4.3. Material and method	118
4.3.1. Chemicals and reagents	118
4.3.2. Cell lines used in the current study	118

4.3.3. Synthesis of superparamagnetic-like iron oxide micrometric single crystals	119
4.3.4. SEM-EDX analysis	119
4.3.5. Cell culture	119
4.3.6. MTT assay	119
4.3.7. Prussian blue staining	120
4.3.8. 4',6-diamidino-2- phenylindole - DAPI staining	120
4.4. Results	121
4.4.1. Physico-chemical characterization of SCMIOPs	121
4.4.2. <i>In vitro</i> impact of SCMIOPs	122
4.4.2.1. Cell viability	122
4.4.2.2. SCMIOPs localization within cell monolayer	123
4.4.2.3. Cell morphology and apoptotic markers	124
4.5. Discussions	126
4.6. Conclusions	128
5. General conclusions	129
6. Originality and innovative contributions of the thesis	131
REFERENCES (243 bibliographic quotations)	133
ANNEXES	151

Keywords: Iron oxide nanoparticles, thermo-sensitive magnetoliposomes, hyperthermia, betulinic acid, iron oxide microparticles, biological profile

INTRODUCTION

Nanotechnology has gained much attention in the last years as it guarantees novel applications in the biomedical field by employing various nanoparticles as diagnostic tools or as carriers for a plethora of therapeutically active compounds. As cancer is considered one of the leading cause of death in the 21st century, several structures are conjugated with anticancer agents being most often designed and developed by employing the field of nanotechnology. Thus, the unique features offered by the nanometric dimension of these structures are intensively investigated to improve the current anticancer therapy. However, it is important to understand the limits of nanotechnology and do not force its application beyond these curity limits, as it could be possible that under specific conditions microparticles of the same compound to hold superior biomedical potential. This thesis comprises two major parts, the first part, entitled "State of the art", aiming to provide up-to-date information regarding novel and

innovative nanosystems, new strategies for addressing cancer through nanotechnology and several limitations encountered by nano-based particles in the biomedical field, along with their corresponding overcoming approaches. The second part, named “Personal Contribution” aims to highlight the huge biomedical potential of iron oxide particles in various applications, such as i) therapeutically active agents; ii) suitable candidates to induce thermal destruction of thermosensitive nanoplatfroms; iii) ideal MRI agents with good biocompatibility. However, in order to point out the above-mentioned biomedical potentials, it was necessary to understand the limitations of these structures according to each application.

ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE

In recent years, nanomedicine has come in the spotlight due to the multitude of nanostructures that can be used as carriers employing physical encapsulation or chemical conjugation of therapeutically active substances. The main nanostructures utilized in the biomedical field are represented by liposomes, polymeric nanoparticles, carbon-based nanostructures and inorganic nanoparticles; each type of these structures presenting different characteristics related to the loading capacity of the active compound, the stability of the whole nano-system formed, the release rate of the active substance from the newly generated nano-platform and the targeted/controlled delivery features of the nanoformulation. The formulation of anticancer substances under different nanoparticulated systems can improve therapeutic efficacy and reduce the side effects of chemotherapeutics. Depending on the delivery strategy employed to transport the nanoplatfroms to the tumor site, there are three types of approaches from which the nanoplatfroms gather benefits from: i) passive transport; ii) active transport; iii) stimuli-responsive nanostructures. Besides this, broadening and understanding the mechanisms involved in the accumulation of nanoparticles within cells may reveal their true potential for biomedical applications.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. *In vitro* and *in ovo* assessment of naked and oleic acid double coated Fe₃O₄ nanoparticles

The aim of the present work is related to: i) the synthesis of naked magnetite nanoparticles obtained by combustion method followed by a coating process with a double layer of oleic acid in order to obtain a biocompatible colloidal suspension; ii) physico-chemical analysis of both naked magnetite nanoparticles and magnetite

colloidal suspension; iii) the *in vitro* cytotoxic assessment of naked and oleic acid coated magnetite nanoparticles on immortalized human keratinocytes (HaCaT) and two tumorigenic human (A375) and murine (B164A5) melanoma cells; iv) the assessment of iron oxide nanoparticles irritant potential by the means of chorioallantoic membrane assay, HET-CAM method. Thus, the present study provides data regarding a novel mechanism of activity of the Fe₃O₄@OA colloidal suspension - a particular enucleation process. In addition, it was proved the cytotoxic effect of Fe₃O₄@OA colloidal suspension on human and murine melanoma cells (starting at 10 µg/mL) by modulating mRNA expressions of apoptotic markers (Bax and Bcl-2). However, the moderate irritant potential of Fe₃O₄@OA colloidal suspension displayed at 50 µg/mL requires vigilance when choosing the dose for *in vivo* administration. However, further studies are required to be conducted to elucidate the particular enucleation process described herein.

Study 2. Betulinic acid-loaded magnetoliposomes - a potential multifunctional approach to improve anticancer therapy

This study aims to physico-chemically characterize the magnetoliposomes, followed by a preliminary evaluation in terms of cell viability of two different panels of cell lines. The first panel of cells is related to *skin cancer*. The second panel of cells is related to *breast cancer*. Thus, those structures that manifest the most promising physico-chemical features and show good preliminary results *in vitro*, were subjected to further *in vitro* and *in ovo* investigations under hyperthermic conditions in order to assess the possible heat-triggered destruction of the magnetoliposomes, followed by the release of the therapeutic substance (betulinic acid-BA). Thus, the combination of hyperthermia with the cytotoxic agent, could hypothetically enhance the therapeutic outcome. Indeed, the results showed that under hyperthermal treatment BA-loaded magnetoliposomes manifested enhanced anti-tumor activity and liposomes loaded with magnetic nanoparticles induced impairment of human breast adenocarcinoma cells, correlated to the enucleation process in MCF7 cells and DNA fragmentation in MDA-MB-231 cells. Summarizing the results, these findings could be important features for the development of a new and innovative breast cancer therapeutic approach, by merging the anti-tumor activity of BA with hyperthermal treatment. Therefore, future directions regarding advanced screening of the multifunctional nanoplateforms should be considered.

Study 3 - Superparamagnetic-Like Iron Oxide Micrometric Single Crystals- cytotoxicity assessments

This study has focused on several key aspects: i) developing a controlled hydrothermal synthesis technique for producing "Single Crystalline Micrometric Iron Oxide Particles" SCMIOPs (from 1 µm to 30 µm), qualified for biomedical applications

and able to overcome the limitations manifested by nanoparticles and micro-clusters; ii) to present an area of novelty regarding the cytocompatibility/cytotoxicity of SCMIOPs on normal – keratinocytes (HaCaT cells) and melanocytes (HEMA cells) and tumorigenic – human (A375) and murine (B164A5) melanoma cells by using specific *in vitro* methods such as viability assay, fluorescence microscopy techniques and iron-specific intracellular staining. Present *in vitro* findings reveal that the uncoated magnetite microparticles are cytocompatible/cytotoxic in a cell-dependent manner on non-tumor cells, according to ISO standard 10993-5:2009. The results indicate that SCMIOPs are cytocompatible for non-tumor cells with a low proliferation rate and cytotoxic for tumor metastatic cells, hypothesizing that melanin is the key player in the mechanism of action involved. Carefully selecting their size, it could be possible that applications like cellular MRI, monitoring cell migration for cell therapy or MRI contrast agents to benefit from using SCMIOPs.

General conclusions

Summarizing the results obtained from all three studies described in the present work, it could be stated that iron oxide structures are adequately considered promising candidates for various biomedical applications. The usefulness of these particles is especially reflected by their physico-chemical characteristics, however optimizing these features to the specific needs of different physiologic/pathologic conditions requires a thorough understanding of all aspects of the biological microenvironment that iron oxide particles may encounter in their path towards fulfilling their purpose.

Originality and innovative contributions of the thesis

It was discovered for the first time that the colloidal suspension of $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ induced a rare apoptotic process (the enucleation phenomenon) on human and murine melanoma (A375 and B164A5) cell lines. Another innovative part of this paper consists in the development of a totally new approach in order to enhance the bioavailability of the betulinic acid. Thus, it was reported the development of a BA-loaded thermosensitive platform for the first time which proved to induce promising anti-tumor results, especially on the highly aggressive breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells and minimal cytotoxic activity on the non-tumorigenic breast epithelial MCF 10A cells. Last but not least, it was reported for the first time that micrometric iron oxide particles are cytocompatible for non-tumor cells with a low proliferation rate and cytotoxic for tumor metastatic cells, hypothesizing that melanin plays an important role in the cytotoxic effect induced by these micrometric particles.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea toxicologică a nanostructurilor
metalice în vederea creșterii
biodisponibilității unor compuși biologic
activi

Doctorand **Claudia Geanina Farcaș**

Coordonator științific **Prof. Dr. Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Nanotehnologia și principalele structuri utilizate în domeniul biomedical	19
1.1. Nanotransportatori lipidici	21
1.1.1. Lipozomi	21
1.1.2. Vezicule lipozomale derivate	22
1.2. Nanotransportatori polimerici	24
1.3. Nanostructuri de Carbon	24
1.4. Nanoparticule anorganice	25
1.4.1. Nanoparticule de oxid de Fe	25
2. Strategii de utilizare a nanotehnologiei în chimioterapie	27
2.1. Efectul de sporire al permeabilității și retenției	27
2.2. Transportul activ al nanostructurilor	29
2.3. Nanosisteme sensibile la acțiunea unor stimuli	29
2.3.1. Magnetolipozomi	31
3. Limitări ale nanotehnologiei în domeniul biomedical și strategii de evitare	33
3.1. Principalele metode de acoperire ale nanoparticulelor de oxid de Fe	34
3.2. Microparticles: the impact in biomedical field	36
4. Implicațiile nanoparticulelor la nivel celular și subcelular	37
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. Ipoteză/Obiective generale	43
2. Studiul 1 – Evaluarea <i>in vitro</i> și <i>in ovo</i> a nanoparticulelor de de Fe₃O₄ neacoperite și acoperite cu dublu strat de acid oleic	45
2.1. Introducere	45
2.2. Obiective	46
2.3. Materiale și metode	46

2.3.1. Reactivi	46
2.3.2. Linii celulare utilizate în studiul curent	46
2.3.3. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor neacoperite și acoperite cu dublu strat de acid oleic	46
2.3.4. Culturi celulare 2D	47
2.3.5. Testul Alamar blue	48
2.3.6. Imunofluorescență	48
2.3.7. Cuantificarea markerilor apoptotici prin real-time PCR	48
2.3.8. Testul de iritație pe membrana corioalatoïdă (HET-CAM)	49
2.4. Rezultate	50
2.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor neacoperite și acoperite cu dublu strat de acid oleic	50
2.4.1.1. Evaluarea stabilității suspensiei de Fe ₃ O ₄	50
2.4.1.2. Proprietăți magnetice	52
2.4.1.3. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	53
(FT-IR)	
2.4.2. Evaluare biologică a nanoparticulelor neacoperite și acoperite cu dublu strat de acid oleic	54
2.4.2.1. Viabilitate celulară	54
2.4.2.2. Morfologie celulară	55
2.4.2.3. Expresia mRNA Bax și Bcl-2	57
2.4.2.4. Organizarea nucleară și a microtubulilor	58
2.4.2.5. Scor de iritație	60
2.5. Discuții	61
2.6. Concluzii	67
3. Studiul 2 – Magnetolipozomi încărcăți cu acid betulinic – o potențială abordare multifuncțională pentru îmbunătățirea terapiei anticanceroase	69
3.1. Introducere	69
3.2. Obiective	71
3.3. Materiale și metode	72
3.3.1. Reactivi	72
3.3.2. Linii celulare utilizate în studiul curent	73
3.3.3. Model epidermic reconstitutiv uman tridimensional – Țesut de piele EpiDerm™	73
3.3.4. Sinteza nanoparticulelor magnetice neacoperite și acoperite cu un strat de acid citric	73
3.3.5. Prepararea probelor lipozomale - <i>rețeta I</i>	73
3.3.6. Prepararea probelor lipozomale - <i>rețeta II</i>	74
3.3.7. Caracterizarea fizico-chimică a magnetolipozomilor încărcăți cu BA - <i>rețeta I</i>	75

3.3.7.1. Analiză TG/DSC	75
3.3.7.2. Analiză SEM-EDAX	75
3.3.7.3. Determinări ale DLS și potențial- ζ	75
3.3.8. Caracterizarea fizico-chimică a magnetolipozomilor încărcăți cu BA și a substanțelor control- <i>rețeta II</i>	75
3.3.8.1. Spectroscopie Raman	75
3.3.8.2. Analiză SEM-EDAX	76
3.3.8.3. Măsurători ale DLS și ale potențialului- ζ	76
3.3.8.4. Caracterizare magnetică	76
3.3.8.4.1. Magnetometrie	76
3.3.8.4.2. Generare de căldura indusă magnetic	76
3.3.8.5. Analiză termică	76
3.3.8.6. Evaluarea eficienței încapsulării	77
3.3.8.6.1. Determinarea concentrației de Fe	77
3.3.8.6.2. Determinarea concentrației de acid betulinic	77
3.3.9. Evaluarea <i>in vitro</i> a magnetolipozomilor încărcăți cu BA și a structurilor control - <i>rețeta I</i>	78
3.3.9.1. Culturi celulare 2D	78
3.3.9.2. Pregătirea modelului epidermic tridimensional EpiDerm™	78
3.3.9.3. Testul Alamar blue	79
3.3.9.4. Morfologia liniei celulare	79
3.3.9.5. Evaluarea viabilității țesutului EpiDerm™	79
3.3.9.6. Cuantificarea Interleuchinei 1 alpha (IL-1 α)	80
3.3.10. Evaluarea biologică a magnetolipozomilor încărcăți cu BA și a structurilor control - <i>rețeta II</i>	80
3.3.10.1. Culturi celulare 2D	80
3.3.10.2. Protocol de stimulare a celulelor	81
3.3.10.3. Protocol de inducere a hipertermiei	81
3.3.10.4. Evaluarea viabilității - testul MTT	81
3.3.10.5. Colorarea cu Albastru de Prusia	82
3.3.10.6. Evaluarea citotoxicității - tehnica LDH	82
3.3.10.7. Evaluarea potențialului migrator al celulelor - "testul de vindecare a rănilor"	82
3.3.10.8. Imunocitochimie fluorescentă	83
3.3.10.9. Evaluarea angiogenezei <i>in ovo</i> - testul membranei corioantaloide	83
3.3.10.10. Analiză statistică	84

3.4. Rezultate	85
BA- <i>rețeta I</i>	85
3.4.1. Caracterizare fizico-chimică a magnetolipozomilor încărcăți cu	85
3.4.1.1. Analiză termică	85
3.4.1.2. Caracterizare structurală	85
3.4.1.3. Analiză DLS	86
3.4.2. Caracterizare fizico-chimica a probelor lipozomale și a	87
structurilor control – <i>rețeta II</i>	87
3.4.2.1. Analiză Raman	87
3.4.2.2. Structura morfologică și analiza elementală	88
3.4.2.3. Stabilitate, mărime, magnetizare, analiza termică și	88
analiza încălzirii	88
3.4.2.4. Eficiența încapsulării conținutului în lipozomi	90
3.4.3. Evaluări <i>in vitro</i> a probelor lipozomale și a structurilor control -	91
<i>rețeta I</i>	91
3.4.3.1. Viabilitatea liniilor celulare 2D	91
3.4.3.2. Morfologie celulară	92
3.4.3.3. Testul de iritație al pielii pe țesuturi tridimensionale	94
epidermice umane	94
3.4.3.4. Analiza mediatorilor inflamatori pe model epidermic	94
tridimensional - EpiDerm™	94
3.4.4. Evaluarea biologică a probelor lipozomale și a structurilor	95
control – <i>rețeta II</i>	95
3.4.4.1. Viabilitate celulară	95
3.4.4.2. Potențialul citotoxic	98
3.4.4.3. Migrare celulară	99
3.4.4.4. Detecția MIONPs*CA in celule	100
3.4.4.5. Organizarea nucleară și a microtubulilor	102
3.4.4.6. <i>Angiogeneză in ovo</i>	105
3.5. Discuții	107
3.6. Concluzii	115

4. Studiul 3 – Cristale Micrometrice din Oxid de Fe cu Proprietăți Asemănătoare Superparamagnetismului – Evaluări Citotoxice

4.1. Introducere	117
4.2. Obiective	118
4.3. Materiale și metode	118
4.3.1. Reactivi	118
4.3.2. Linii celulare utilizate în studiul curent	118

4.3.3. Sinteza Cristale Micrometrice din Oxid de Fe cu Proprietăți Asemănătoare Superparamagnetismului(SCMIOPs)	119
4.3.4. Analiza SEM-EDX	119
4.3.5. Culturi celulare	119
4.3.6. Analiza MTT	119
4.3.7. Colorarea cu Albastru de Prusia	120
4.3.8. Colorare DAPI - 4',6-diamidino-2- phenylindole -	120
4.4. Rezultate	121
4.4.1. Caracterizarea fizico-chimică a SCMIOPs	121
4.4.2. Impactul <i>in vitro</i> a SCMIOPs	122
4.4.2.1. Viabilitate celulară	122
4.4.2.2. Detecția SCMIOPs în monostratul celular	123
4.4.2.3. Morfologie celulară și markeri apoptotici	124
4.5. Discuții	126
4.6. Concluzii	128
5. Concluzii generale	129
6. Originalitate și contribuții inovative ale tezei	131
REFERINȚE (243 de cote bibliografice)	133
ANEXE	151

Cuvinte cheie: Nanoparticule de oxid de Fe, magnetolipozomi termosensibili, hipertermie, acid betulinic, țesuturi epidermice 3D, microparticule de oxid de Fe, profil biologic

INTRODUCERE

Nanotehnologia a atras multă atenție în ultimii ani, deoarece garantează noi aplicații în domeniul biomedical prin utilizarea diferitelor nanoparticule ca instrumente de diagnostic sau ca structuri de transport pentru numeroși compuși activi terapeutic. Deoarece cancerul este considerat una dintre principalele cauze de deces în secolul al XXI-lea, multe structuri sunt conjugate cu agenți anticancerosi fiind cel mai adesea proiectate și dezvoltate prin utilizarea nanotehnologiei. Astfel, caracteristicile unice oferite de dimensiunea nanometrică a acestor structuri sunt investigate intens pentru a îmbunătăți terapia anticancerigenă actuală. Cu toate acestea, este important să

înțelegem limitele nanotehnologiei și să nu forțăm implementarea acesteia dincolo de aceste limite de curitate, deoarece ar putea fi posibil ca, în condiții specifice, microparticulele aceluiași compus să dețină un potențial biomedical superior. Această teză cuprinde două părți majore, prima parte, intitulată „Stadiul actual al cunoașterii”, cu scopul de a oferi informații actualizate cu privire la nanosistemele noi și inovatoare, noile strategii de abordare a cancerului prin nanotehnologie și câteva limitări întâmpinate de particulele bazate pe nano. În domeniul biomedical, împreună cu abordările lor de depășire corespunzătoare. A doua parte, denumită „Contribuție personală” își propune să evidențieze potențialul biomedical imens al particulelor

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În ultimii ani, nanomedicina a intrat în centrul atenției datorită multitudinii de nanostructuri care pot fi utilizate ca structuri de transport care folosesc încapsularea fizică sau conjugarea chimică a substanțelor terapeutice active. Principalele nanostructuri utilizate în domeniul biomedical sunt reprezentate de lipozomi, nanoparticule polimerice, nanostructuri pe bază de carbon și nanoparticule anorganice; fiecare tip de structură prezentând diferite caracteristici legate de capacitatea de încărcare a compusului activ, stabilitatea întregului nanosistem format, rata de eliberare a substanței active de la nano-platforma recent generată și caracteristicile de livrare țintite / controlate ale nanosistemului. Formularea substanțelor anticanceroase sub diferite sisteme nanoparticulate poate îmbunătăți eficacitatea terapeutică și poate reduce efectele secundare ale chimioterapiei. În funcție de strategia de livrare utilizată pentru transportul nanoplatformelor la locul tumorii, există trei tipuri de abordări de care nanoplatforme pot beneficia: i) transportul pasiv; ii) transport activ; iii) nanostructuri sensibile la acțiunea unor stimuli. Pe lângă aceasta, înțelegerea mecanismelor implicate în acumularea nanoparticulelor în celule poate dezvălui adevăratul lor potențial în aplicațiile biomedicale.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Evaluarea *in vitro* și *in ovo* a nanoparticulelor de Fe_3O_4 neacoperite și acoperite cu dublu strat de acid oleic

Scopul acestui studiu face referire la: i) sinteza nanoparticulelor de magnetită (Fe_3O_4) neacoperite obținute prin metoda combustiei urmată de un proces de acoperire cu strat dublu de acid oleic, având scopul de a obține o suspensie coloidală biocompatibilă; ii) analiza fizico-chimică atât a nanoparticulelor de magnetită neacoperite, cât și a suspensiei coloidale de magnetită; iii) evaluarea citotoxică *in vitro* a nanoparticulelor de magnetită neacoperite și acoperite cu acid oleic asupra keratinocitelor umane imortalizate (HaCaT) și două linii celulare tumorale de melanom

uman (A375) și murinic (B164A5); iv) evaluarea potențialului iritativ a nanoparticulelor de oxid de Fe utilizând testul membranei corioalantoide, metoda HET-CAM. Astfel, prezentul studiu oferă date referitoare la un mecanism nou de activitate a suspensiei coloidale de $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ - un proces particular de enucleoză. În plus, s-a dovedit efectul citotoxic al suspensiei $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ asupra celulelor melanomului uman și murin (începând de la 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) prin modularea expresiilor ARNm ale markerilor apoptotici (Bax și Bcl-2). Cu toate acestea, datorită potențialul iritant moderat al suspensiei coloidale de $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ manifestat la concentrația de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se solicită vigilență la alegerea dozei pentru o eventuală administrare *in vivo*, fiind necesare studii suplimentare pentru a elucida procesul de enucleoză descris în acest studiu.

Studiul 2 - Magnetolipozomi încărcăți cu acid betulinic - o potențială abordare multifuncțională pentru îmbunătățirea terapiei anticanceroase

Acest studiu are ca scop caracterizarea fizico-chimică a magnetolipozomilor, urmată de o evaluare preliminară în ceea ce privește vabilitatea celulară a două panouri diferite de linii celulare. Primul panou de celule este legat de cancerul de piele. Al doilea panou de celule este legat de cancerul de sân. Astfel că acele structuri care manifestă cele mai promițătoare caracteristici fizico-chimice și prezintă rezultate preliminare bune *in vitro*, au fost supuse unor investigații ulterioare *in vitro* și *in ovo* în condiții hipertermice pentru a evalua posibila dezintegrare a structurii magnetolipozomilor provocată de căldură, urmată de eliberarea substanței terapeutice (acidul betulinic -BA). Astfel, combinația de hipertermie cu agentul citotoxic, ar putea spori ipotetic rezultatul terapeutic. Într-adevăr rezultatele au arătat că sub tratament hipertermic magnetolipozomii încărcăți cu BA au manifestat o activitate anti-tumorală sporită, iar lipozomii încărcăți doar cu nanoparticule magnetice au indus afectarea celulelor adenocarcinomului mamar uman, corelată cu procesul de enucleoză în celulele MCF7 și fragmentarea ADN în celulele MDA-MB-231. Sintetizând toate rezultatele, acestea ar putea oferi caracteristici importante pentru dezvoltarea unei abordări terapeutice noi și inovatoare în tratarea cancerului de sân, prin fuziunea activității antitumorale a BA cu tratamentul hipertermic. Prin urmare, studii viitoare privind screening-ul avansat al acestor nanoplatformelor multifuncționale ar trebui luate în considerare.

Studiul 3 - Cristale Micrometrice din Oxid de Fe cu Proprietăți Asemănătoare Superparamagnetismului - Evaluări Citotoxice

Acest studiu s-a concentrat asupra mai multor aspecte cheie: i) dezvoltarea unei tehnici de sinteză hidrotermală controlată pentru producerea SCMIOP „particule

micrometrice monocristaline de oxid de fier” (cuprinse între 1 μm la 30 μm), potrivite aplicațiilor biomedicale și capabile să depășească limitările manifestate de nanoparticulelor și micro-clusterelor; ii) să prezinte o arie de noutate în ceea ce privește citocompatibilitatea / citotoxicitatea SCMIOP pe celulele normale - keratinocite (celule HaCaT) și melanocite (celule HEMA) și tumorale – melanom uman (A375) și murinic (B164A5), utilizând metode specifice *in vitro*, cum ar fi testul de viabilitate, tehnici de microscopie fluorescentă și colorare intracelulară specifică fierului. Rezultatele *in vitro* relevă faptul că microparticulele de magnetită neacoperite sunt citocompatibile / citotoxice depinzând de linia celulară testată, conform standardului ISO 10993-5: 2009. Rezultatele indică faptul că SCMIOPs sunt citocompatibile pentru celulele non-tumorale cu o rată mică de proliferare și citotoxice pentru celulele metastatice tumorale, presupunând că melanina este un factor cheie în mecanismul de acțiune implicat. Selectând cu atenție mărimea lor, ar putea fi posibil ca aplicații precum RMN celular, monitorizarea migrației celulare pentru terapia celulară sau agenții de contrast RMN să beneficieze de utilizarea SCMIOP.

Concluzii generale

Rezumând rezultatele obținute din toate cele trei studii descrise în lucrarea de față, se poate spune că structurile de oxid de fier sunt considerate în mod adecvat candidați promițători pentru diferite aplicații biomedicale. Utilitatea acestor particule este reflectată în special de caracteristicile lor fizico-chimice, cu toate acestea, adaptarea acestor caracteristici la nevoile specifice diferitelor condiții fiziologice/patologice necesită o înțelegere aprofundată a tuturor aspectelor microambientului biologic pe care particulele de oxid de fier le pot întâlni în drumul lor spre îndeplinirea scopul.

Originalitate și contribuții inovative ale tezei

S-a descoperit pentru prima dată că suspensia de $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ a indus un proces apoptotic rar (fenomenul de enucleoză) pe liniile celulare de melanomului uman și murinic (A375 și B164A5). O altă parte inovatoare a acestei lucrări constă în dezvoltarea unei abordări complet noi pentru a spori biodisponibilitatea acidului betulinic. Astfel, s-a raportat dezvoltarea unei platforme termosensibile încărcate cu BA pentru prima dată, care s-a dovedit a induce rezultate antitumorale promițătoare, în special asupra celulelor adenocarcinomului mamar extrem de agresiv MDA-MB-231, având activitate citotoxică minimă pe celule non-tumorale epiteliale mamare MCF 10A. Nu în ultimul rând, s-a raportat pentru prima dată că particulele micrometrice de oxid de fier sunt citocompatibile pentru celulele non-tumorale cu o rată mică de proliferare și citotoxice pentru celulele metastatice tumorale, presupunând că melanina joacă un rol important în efectul citotoxic indus de aceste particule micrometrice.