

Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Fizică

Rezumatul tezei de doctorat

**NANOPARTICULE HIBRIDE FOTOACTIVABILE PENTRU
AMPLIFICAREA TERAPIEI FOTODINAMICE SI IMAGISTICA
CELULARA MULTIMODALA**

Timea SIMON

Coordonator științific

Prof. Dr. Simion AȘTILEAN

CLUJ-NAPOCA

2013

CUPRINS

| | |
|--|-----------|
| Prezentare generala | 1 |
| Partea I: Introducere si documentare bibliografica..... | 2 |
| 1. Introducere..... | 2 |
| 2. Documentare bibliografica | 2 |
| 2.1. Metode de diagnostic si tratament bazate pe nanoparticule..... | 2 |
| 2.1.1. Terapie fotodinamica a cancerului (PDT)..... | 2 |
| 2.2. Nanoparticule de aur in medicina si nanomedicina..... | 4 |
| 2.2.1. Proprietile optice ale nanoparticulelor de aur | 4 |
| 2.2.2. Microscopia in camp intunecat pe baza de nanoparticule de aur pentru imagistica celulara | 4 |
| 2.2.3. Raspunsul optic si activitatea fotodinamica a moleculelor in prezenta nanoparticulelor plasmonice.. | 5 |
| 2.3. Nanoparticule hibride pentru aplicatii biomedicale | 6 |
| 2.3.1. Nanoparticule hibride aur-polymer | 6 |
| Partea II: Rezultate si discutii..... | 7 |
| 3. Nanoparticule aur-Pluronic: sinteza, caracterizare si evaluare biologica | 7 |
| 3.1. Prepararea si caracterizarea nanoparticulelor aur-Pluronic | 7 |
| 3.1.1. Prepararea nanoparticulelor aur-Pluronic | 7 |
| 3.1.2. Caracterizarea spectroscopica si morfologica | 7 |
| 3.1.3. Stabilitatea nanoparticulelor aur-Pluronic | 8 |
| 3.2. Evaluarea biologica a nanoparticulelor aur-Pluronic | 8 |
| 3.2.1. Citotoxicitatea nanoparticulelor aur-Pluronic | 8 |
| 3.2.2. Imagistica in camp intunecat a celulelor cancerigene | 9 |
| 4. Nanoparticule hibride Pluronic-aur incarcate cu albastru de metilen pentru imagistica celulara si terapia celulelor cancerigene..... | 10 |
| 4.1. Prepararea si caracterizarea nanoparticulelor de aur-Pluronic incarcate cu MB | 10 |
| 4.1.1. Prepararea si caracterizarea Au-PF127 | 10 |
| 4.1.2. Prepararea si caracterizarea Au-F127-MB..... | 11 |
| 4.2. Studii legate de robustetea si activitatea nanoparticulelor Au-PF127-MB cu privire la aplicatiile biomedicale | 12 |
| 4.2.1. Investigatii spectroscopice | 12 |
| 4.2.2. Studiul activitatii fotodinamice a Au-PF127-MB | 14 |
| 4.3. Utilizarea Au-PF127-MB in imagistica celulara si terapie fotodinamica a celulelor..... | 15 |
| 4.3.1. Studiul internalizarii nanoparticulelor Au-PF127-MB in celule prin microscopia in camp intunecat | 15 |
| 4.3.2. Terapie fotodinamica a celulelor cancerigene marcate cu Au-PF127-MB si activate cu LED..... | 16 |
| 5. Imagistica multimodala a celulelor vii utilizand nanoagregate fotoactivabile | 18 |
| 5.1. Prepararea probelor..... | 18 |
| 5.1.1. Prepararea agregatelor de nanoparticule de aur | 18 |
| 5.1.2. Conjugarea agregatelor cu albastru de metilen | 18 |
| 5.2. Caracterizarea nanoagregatelor..... | 18 |
| 5.2.1. Caracterizarea morfologica si optica..... | 18 |
| 5.3. Caracterizarea nanoconjugatelor..... | 19 |
| 5.3.1. Caracterizarea UV-Vis..... | 19 |
| 5.3.2. Masuratori de fluorescenta rezolvata temporal | 20 |
| 5.3.3. Stabilitatea in diferite conditii de mediu | 20 |
| 5.4. Detectia spectroscopica multimodala in celule vii | 20 |
| 5.4.1. Evaluarea internalizarii nanoparticulelor prin microscopie in camp luminos | 20 |
| 5.4.2. Masuratori SERS intracelulare | 20 |
| 5.4.3. Imagistica de fluorescenta rezolvata temporal a celulelor incubate GNPA-MB..... | 21 |
| 6. Concluzii finale | 22 |
| Referinte..... | 23 |
| Lista lucrarilor publicate..... | 25 |

PREZENTARE GENERALA

Teza este structurata in doua parti majore continand in total 6 capitole. **Partea I**, intitulata **Introducere si Documentare Bibliografica**, este compusa din doua capitole. **Capitolul 1** prezinta o scurta introducere in domeniul de cercetare si motivatia subiectului tezei. **Capitolul 2** contine o prezentare generala a aplicarii nanotehnologiei in sectorul medical, un domeniu in dezvoltare continua, numit *nanomedicina*.

Partea II, intitulata **Rezultate si discutii**, prezinta de-a lungul a trei capitole rezultatele experimentale obtinute in timpul cercetarii doctorale la *Centrul de Nanobiofotonica* din cadrul *Institutului de Cercetari Interdisciplinare in Bio-Nano-Stiinte* al Universitatii Babes-Bolyai, in colaborare cu *Laboratoire interdisciplinaire de Physique* from Joseph Fourier University, Grenoble.

Capitolul 3 prezinta prepararea si caracterizarea nanoparticulelor de tip “core-shell” Pluronic-aur, urmata de evaluarea aplicabilitatii biologice a acestora. Se evidentiaza importanta etapelor de purificare in timpul procesului de preparare prin investigarea citotoxicitatii nanoparticulelor. Mai mult, se arata ca nanoparticulele Pluronic-aur pot servi ca si agenti de contrast in imagistica celulelor cancerigene prin microscopia in camp intunecat.

Prima parte a **Capitolului 4** prezinta fabricarea si caracterizarea unei noi clase de nanoparticule hibride, in timp ce a doua parte investigheaza aplicabilitatea acestora in imagistica si terapia celulelor cancerigene. Nanoparticulele hibride Pluronic-aur au fost preparate intr-un singur pas folosind polimerul Pluronic ca si agent reductor si stabilizator, dupa care nanoparticulele au fost incarcate cu fotosensibilizatorul albastru de metilen (MB). Deoarece performanta terapeutica a MB poate fi afectata semnificativ in diferite conditii de mediu, o atentie speciala este dedicata investigarii proprietatilor acestuia dupa incarcarea pe nanoparticule. In continuare, se evalueaza internalizarea nanoparticulelor hibride in celulele cancerigene HTB utilizand-se microspectroscopia de imprastiere in camp intunecat. Ulterior, se demonstreaza eficienta nanoparticulelor hibride in terapia fotodinamica a celulelor cancerigene utilizand o dioda emitatoare de lumina (LED) pentru activarea fotosensibilizatorului incapsulat.

In **Capitolul 5** este prezentata prepararea unor agenti pentru imagistica multimodala bazati pe agregate mici de nanoparticule de aur invelite in Pluronic si conjugate cu MB. Metoda formarii agregatelor se bazeaza pe destabilizarea sarcinii de pe suprafata nanoparticulelor acoperite cu citrat de sodiu, urmata de stabilizarea imediata cu polimerul Pluronic, care mediaza de asemenea conjuagarea nanoparticulelor cu MB. In continuare, se investigheaza posibilitatea utilizarii cu succes a nanoconjugatelor obtinute in imagistica multimodala a celulelor cancerigene. In primul rand, se demonstreaza capacitatea nanoparticulelor de a fi utilizate ca nano-reporteri in spectroscopia SERS intracelulara. Pe de alta parte, se arata aplicabilitatea acestora in imagistica de fluorescenta rezolvata temporal (FLIM) a celulelor cancerigene.

Concluziile finale si perspectivele studiilor sunt prezentate in **Capitolul 6**.

Cuvinte cheie: nanoparticule de aur, Pluronic, albastru de metilen, imagistica in camp intunecat, terapie fotodinamica, SERS, FLIM

PARTEA I: INTRODUCERE SI DOCUMENTARE BIBLIOGRAFICA

1. Introducere

Nanomedicina a aparut ca urmare a aplicarii nanotehnologiei in medicina, fiind axata pe exploatarea materialelor de dimensiuni nanometrice cu scopul de a dezvolta materiale si metode noi pentru diagnostic si terapie [1].

Obiectivul principal al acestei teze este de a obtine nanoparticule hibride polimer-aur, stabile si biocompatibile, capabile sa transporte medicamente fotosensibilizatoare. Strategia abordata in aceasta teza, respectiv combinarea fotosensibilizatorului albastru de metilen cu nanoparticulele hibride Pluronic aur reprezinta o dezvoltare valoroasa in domeniul nanomaterialelor multifunctionale. Versatilitatea acestor nanoparticule consta in capacitatea detectiei si imagisticii spectroscopice multimodale combinata cu eficacitatea terapeutica ridicata impotriva celulelor cancerigene.

2. Documentare bibliografica

2.1. Metode de diagnostic si tratament bazate pe nanoparticule

Dezvoltand nanoparticule tintite, fabricate cu inalta precizie, nanotehnologia isi propune revolutionarea tratamentului cancerului, oferind strategii promitatoare pentru transportul selectiv si tintit, in concentratii ridicate al diferitilor agenti citotoxici sau markeri de imagistica. Pana in prezent s-au dezvoltat diverse nanoplatforme pentru transportul proteinelor, genelor si medicamentelor impotriva cancerului (chemoterapeuticele, fotosensibilizatoare). Datorita capacitatii de a ingloba cantitati mari de medicamente, nanoparticulele polimerice [2] si lipozomii [3] sunt cel mai intens utilizati in aplicatii de transport. De asemenea, nanoterapia include tratamentul termic local al cancerului, utilizandu-se agenti fototermici, cum sunt nanoparticulele de metal nobil sau nanomateriale pe baza de carbon, care in urma iradierii produc o crestere semnificativa a temperaturii in regiunea in care sunt localizati.

2.1.1. *Terapia fotodinamica a cancerului (PDT)*

PDT este o tehnica terapeutica in doua etape prin care o molecula fotosensibilizatoare este livrata la celulele sau tesuturile cancerigene de interes, urmata de activarea acesteia prin iradiere cu lumina vizibila [4].

2.1.1.1. Procesele fotofizice si fotochimice implicate in PDT

In urma iradierii cu lumina la o lungimea de unda adecvata, fotosensibilizatorul trece in stare excitata singlet de unde exista doua posibilitati: relaxarea in starea fundamentala emitand un foton fluorescent, sau trecerea in starea excitata triplet. Din starea triplet exista doua mecanisme posibile: relaxarea prin emiterea unui foton fosforescent sau transferul de energie unei alte molecule prin tranzitie nonradiativa. Stingerea starii triplet a fotosensibilizatorului se poate realiza prin mecanismul de *tip I* sau *tip II*. Primul implica interactiunea cu substratul biologic rezultand formarea unor radicali sau ioni de radicali. Al doilea insa se refera la transferul de energie intre starea triplet a fotosensibilizatorului si starea fundamentala a oxigenului molecular, conducand la generarea starii excitate a acestuia, cunoscut sub numele oxigen singlet [5].

2.1.1.2. Fotosensibilizatori folositi in PDT

Fotosensibilizatorii folositi in PDT se pot clasifica in trei clase: prima, a doua si a treia generatie. Pe scurt, fotosensibilizatorii de prima generatie includ derivatele de hematoporfirina si Photofrin. Generatia a doua de fotosensibilizatori a fost dezvoltata la sfarsitul anilor 1980 cu scopul de a depasi dezavantajele fotosensibilizatorilor de prima generatie. Fotosensibilizatorii de a treia generatie se refera la conjugatele fotosensibilizatorilor de a doua generatie, care prin cuplarea cu diferite biomolecule sau incarcarea pe/in nanoparticule purtatoare, imbunatatesc acumularea selectiva si tintita in tesuturile tumorale.

2.1.1.3. Nanoparticule pentru terapia fotodinamica a cancerului

Inglobarea in diverse nanoplatforme a fotosensibilizatorilor prezinta mai multe avantaje, si anume: internalizare imbunatatita prin efectul numit "permeabilitate si retentie ridicata" (EPR); capacitate ridicata de incapsulare si de posibilitatea conjugarii cu molecule de tintire cu scopul de a imbunatati acumularea selectiva. Cele mai des utilizate nanocontainere sunt miceliile de polimer si lipozomii.

2.1.1.4. Utilizarea albastrului de metilen in terapia fotodinamica

Albastrul de metilen (MB) este un colorant histologic bine cunoscut facand parte din clasa compusilor de fenotiazina [6]. MB prezinta banda de absorbtie in fereastra biologica a pielii la 664 nm [7] si un randament cuantic ridicat de generare a oxigenului singlet. Aceste caracteristici, impreuna cu toxicitatea redusa, fac ca MB sa fie un candidat adecvat pentru utilizarea in PDT. Desi MB poate fi folosit in tratamentul unei mari varietati de boli, utilizarea clinica a acestuia este limitata din cauza faptului ca in mediul biologic este redus de catre enzime

intr-o forma cu activitate fotodinamica neglijabila, numita *albastru de leucometilen*. Pentru prevenirea acestei degradari, au fost dezvoltate numeroase nanoformulari, capabile de a transporta MB si de a-l proteja de reducerea enzimatica [8,9,10].

2.2. Nanoparticule de aur in medicina si nanomedicina

Datorita proprietatilor atractive, cum ar fi biocompatibilitatea, proprietatile optice distinctive si metodele de preparare accesibile, in ultima vreme s-a dezvoltat o gama larga de nanoparticulele de aur pentru aplicatii in imagistica, diagnostic si terapie.

2.2.1. Proprietile optice ale nanoparticulelor de aur

In cazul nanoparticulelor cu dimensiuni mult mai mici decat lungimea de unda a luminii, un camp electromagnetic incident de o frecventa data induce osciliatia coerenta rezonanta a electronilor liberi din metal. Amplitudinea acestei oscilatii atinge maximul la o frecventa specifica, numita *rezonanta plasmonica de suprafata* (SPR), care determina aparitia unei benzi de absorbtie intense in spectrul vizibil [11].

In scopul de a urmari o anumita aplicatie, SPR nanoparticulelor de aur poate fi deplasata pe un domeniu spectral larg [12]. In cazul nanoparticulelor de forma sferica SPR se poate deplasa spre lungimi de unda mai mari prin creseterea dimensiunii acestora, inasa aceasta este limitata pe domeniul vizibil. Alte metode pentru deplasare benzii SPR spre domeniul infrarosu apropiat includ modificarea formei nanoparticulelor spre forme anizotrope cum ar fi bastonase, triunghiuri, forme stelare sau agregarea nanoparticulelor sferice in structuri bine definite.

2.2.2. Microscopia in camp intunecat pe baza de nanoparticule de aur pentru imagistica celulara

Microscopia in camp intunecat este una dintre cele mai populare metode de bioimagistica pe baza de nanoparticule de aur [13]. In urma excitarii nanoparticulelor de aur cu lumina alba, frecventele corespunzatoare frecventei SPR a nanoparticulelor sunt puternic imprastiate, aceasta lumina imprastiata putand fi colectata utilizand o configuratie specifica de microscopie. Ca urmare, nanoparticulele se vad ca niste puncte stralucitoare pe fundal negru, avand culoarea corespunzatoare frecventei SPR. Nanoparticulele de aur de diferite dimensiuni si forme au fost utilizate cu succes in microscopia in camp intunecat pentru detectia celulele microbiale, imagistica celulelor cancerigene, identificarea receptorilor de pe suprafata acestora, studiul endocitozei sau chiar imagistica unei tumori.

2.2.3. Raspunsul optic si activitatea fotodinamica a moleculelor in prezenta nanoparticulelor plasmonice

Prezenta campului electromagnetic intens din jurul nanoparticulelor de aur are efecte semnificative asupra moleculelor organice aflate in apropiata vecinatate a acestora, dand nastere la o serie de fenomene remarcabile cu interes special in aplicatiile de imagistica si detectie.

2.2.3.1. Fluorescenta moleculara in prezenta nanoparticulelor plasmonice

Interactiunea starii excitate a fluoroforilor cu electronii liberi din metal poate modifica emisia de fluorescenta a acestora, determinand stingerea sau amplificarea emisiei de fluorescenta. Stingerea fluorescentei se datoreaza transferului neradiativ de energie din starea excitata a fluoroforului la nanoparticule de aur, manifestandu-se de obicei la distante mici fata de suprafata metalica (~ 0–5 nm). La o distanta optima intre molecula fluorescenta si metal, se poate observa fenomenul de fluorescenta amplificata de metal (MEF), care se evidentiaza de obicei prin cresterea intensitatii de fluorescenta si scaderea timpului de viata [14].

2.2.3.2. Imprastierea Raman in prezenta nanoparticulelor plasmonice (Imprastierea Raman amplificata de suprafata)

Imprastierea Raman amplificata de suprafata (SERS) se bazeaza pe amplificare drastica a semnalului Raman al moleculelor active Raman in vecinatatea unor suprafete nanostructurate. [15]. Energia fotonului pierduta in timpul procesului de imprastiere, denumita *deplasare Raman*, furnizează informatii chimice si structurale despre molecula, in particular despre structura vibrationala a acesteia. SERS poate genera o amplificare de ordinul $10^9 - 10^{11}$, permitand chiar si detectia unei singure molecule [16].

2.2.3.3. Activitatea fotodinamica in prezenta nanoparticulelor plasmonice

Prima observatie a influentei pozitive a prezentei nanoparticulelor plasmonice asupra proceselor fotodinamice a fost raportata de catre Zhang et al. [17]. Generarea oxigenului singlet amplificata de metal (MESOG) a fost atribuita ratei ridicate de excitatie datorita prezentei metalului si cresterii implicite a transferului de energie catre sisteme alaturate (intersystem crossing) si starii excitate de triplet. In prezent, s-au propus doua mecanisme care stau la baza amplificarii randamentul cuantic al generarii oxigenului singlet: (1) cresterea eficientei de absorbtie a fotosensibilizatorului pe ansamblu sau (2) transfer de energie de la nanoparticule la molecule fotosensibilizatoare.

In consecinta, conjugarea fotosensibilizatorilor de nanoparticule de metal nobil reprezinta o abordare avantajoasa in vederea utilizarii acestora in terapiile bazate pe citotoxicitatea oxigenului singlet, cum este PDT.

2.3. Nanoparticule hibride pentru aplicatii biomedicale

Nanoparticulele hibride, combinand mai multe componente functionale, ofera posibilitatea detectiei si terapiei simultane a cancerului sau chiar combinarea diferitelor terapii care pot imbunatati semnificativ eficienta tratamentelor individuale. Aceste tipuri de nanoparticule sunt numite si *agenti teranostici*.

2.3.1. Nanoparticule hibride aur-polymer

Pana in prezent au fost exploatare numeroase tipuri de polimeri in fabricarea nanoparticulelor hibride aur-polimer cu diferite morfologii, ca de exemplu structuri sferice de tip "core-shell", particule asamblate incorporate in matrice polimerica sau micelii de polimer decorate cu nanoparticule mici de aur [18]. Tehnicile de preparare pot fi impartite in doua clase majore: (1) conjugare covalenta, adica imobilizarea polimerului pe suprafata nanoparticulelor de aur prin legaturi aur-sulf, si (2) adsorptie fizica, care include asocierea hidrofoaba si interactiunile electrostatice. Interfatarea nanoparticulelor de aur cu polimeri ofera stabilitate ridicata in mediul biologic, imbunatatirea semnificativa a biocompatibilitatii acestora, posibilitatea de a transporta medicamente si permite functionalizarea cu molecule de tintire pentru recunoasterea specifica a tumorilor.

2.3.1.1. Co-polimerul bloc Pluronic

Pluronic este o clasa a copolimerilor bloc, o marca inregistrata a companiei BASF. Acesti copolimer bloc sunt alcatuiti din unitati hidrofile de oxid de polietilena (PEO) si unitati hidrofobe de oxid de polipropilena (PPO), aranjate in structura PEO-PPO-PEO. Polimerii Pluronic in conditii date, se autoasambleaza in micelii, miezul acestora fiind alcatuit din PPO hidrofob, pe cand lanturile PEO formeaza coroana. Miceliile pot fi utilizate pentru incorporarea diferitelor agenti terapeutici si de diagnostic, in particular a acelor care nu se pot administra direct din cauza insolubilitatii in mediul biologic [19]. O alta proprietate atragatoare a clasei de copolimeri Pluronic o reprezinta biocompatibilitatea ridicata, capacitatea de a sensibiliza liniile de celule canceroase rezistente la medicamente multiple (MDR) si tintirea pasiva a tumorilor prin efectul EPR.

PARTEA II: REZULTATE SI DISCUTII

3. Nanoparticule aur-Pluronic: sinteza, caracterizare si evaluare biologica

3.1. Prepararea si caracterizarea nanoparticulelor aur-Pluronic

3.1.1. Prepararea nanoparticulelor aur-Pluronic

In prima etapa, nanoparticulele de aur au fost sintetizate in faza organica folosind oleilamina ca agent reductor si stabilizator. Apoi, nanoparticulele de aur stabilizate cu oleilamina au fost transferate in faza apoasa cu ajutorul polimerului Pluronic F127. Pluronic se leaga de suprafata nanoparticulelor de aur prin interactiunea hidrofoba dintre oleilamina si segmentul PPO al Pluronic, iar hidrofilicitatea lanturilor PEO asigura solubilitatea nanoparticulelor in apa, o cerinta cruciala pentru orice aplicatie biologica.

3.1.2. Caracterizarea spectroscopica si morfologica

Spectrele de absorbtie UV-Vis ale coloizilor obtinuti inainte si dupa invelirea cu Pluronic sunt prezentate in **Figura 3-1**. Nanoparticulele acoperite cu oleilamina dispersate in hexan prezinta rezonanta plasmonica de suprafata la 518 nm, caracteristica nanoparticulelor individuale de forma sferica (spectrul a). Deplasarea de 5 nm inspre lungimi de unda mai mari a benzii plasmonice dupa transferul de faza se datoreaza modificarii indicelui de refractie din jurul nanoparticulelor ca urmare a adsorbției Pluronic.

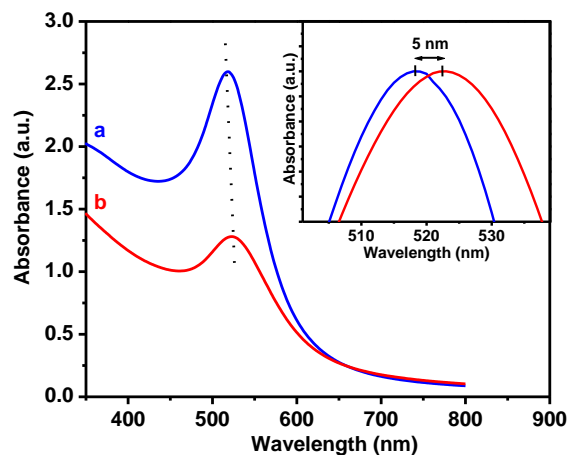


Figura 3-1 Spectrele de absorbtie UV-Vis ale nanoparticulelor de aur (a) si ale nanoparticulelor aur-Pluronic (b). Inset: imaginea marita a maximelor de absorbtie normalizate.

Pe baza imaginilor de microscopie electronica in transmisie (TEM) s-a confirmat ca nanoparticulele preparate sunt individuale, uniforme si de forma sferica, diametrul mediu al miezului de aur fiind de $9,4 \pm 1,8$ nm (**Figura 3-2**).

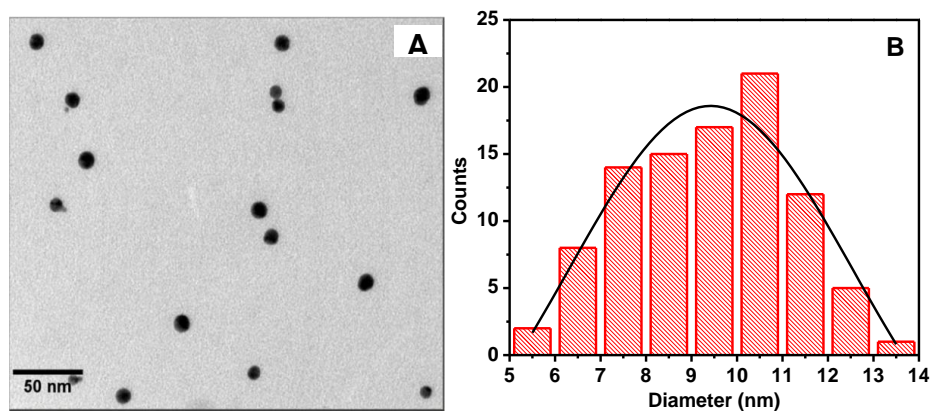


Figura 3-2 Imagine TEM (A) si hisograma de distributie dimensionala a nanoparticulelor de aur (B).

Conform masuratorilor de imprastiere dinamica a luminii (DLS), nanoparticulele de aur acoperite cu oleilamina au un diametru hidrodinamic mediu de 13.48 nm. Dupa transferul de faza diametrul nanoparticulelor a crescut la 34.75 nm, diferenta de ~ 10 nm fiind atribuita coajei polimerice, corespunzand unui singur strat de Pluronic. Prezenta polimerului pe suprafata nanoparticulelor de aur a fost confirmata de potentialul Zeta aproape neutru (4,48 mV) al nanoparticulelor aur-Pluronic.

3.1.3. *Stabilitatea nanoparticulelor aur-Pluronic*

In continuare, s-a investigat stabilitatea nanoparticulelor aur-Pluronic in solutie de NaCl monitorizand evolutia temporala a spectrului de absorbtie UV-vis. Rezultatele obtinute indica ca nanoparticulele aur-Pluronic sunt foarte stabile in solutie salina, spectrul de absorbtie fiind aproape nemodificat dupa 24 ore de incubare.

3.2. Evaluarea biologica a nanoparticulelor aur-Pluronic

3.2.1. *Citotoxicitatea nanoparticulelor aur-Pluronic*

Cu scopul de a evalua citotoxicitatea nanoparticulelor aur-Pluronic si de a scoate in evidenta importanta purificarii corecte a acestora, celule de tip HTB 177 au fost incubate cu diferite concentratii de nanoparticule purificate si nepurificate pentru diferite intervale de timp. Dupa aceea, starea celulelor a fost evaluata prin microscopia de fluorescanta utilizandu-se tehnica de dubla colorare cu calceina si iodura de propidium, care marcheaza celule vii, respectiv cele moarte. **Figura 3-3** prezinta imaginile in transmisie si de fluorescanta a celulelor incubate cu particule aur-Pluronic nepurificate incubate timp de 1 h (0.5 nM), respectiv timp de 24 h cu

particulele purificate (2 nM). Rezultatele indica ca nanoparticulele preprate omitand niste pasi de spalare induc moarte celulara chiar la concentratii foarte mici, pe cand nanoparticulele purificate de urmele de hexan si oleilamina nelegata sunt biocompatibile chiar dupa 24 ore de incubare.

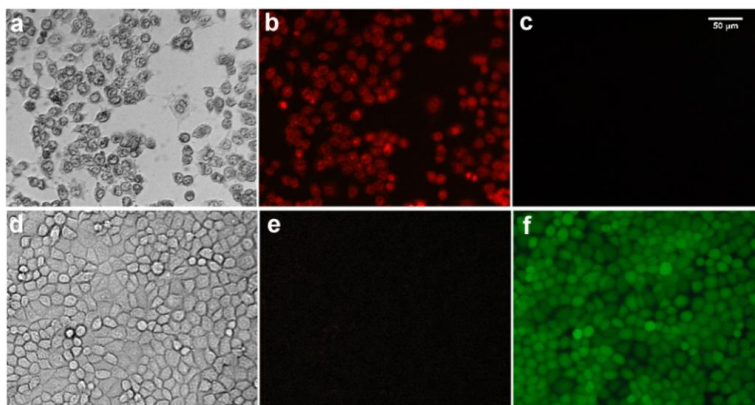


Figura 3-3 Imaginile in transmisie si de fluorescanta a celulelor incubate cu particule aur-Pluronic nepurificate (a,b and c) si purificate (d, e and f). Scala este de 50 µm.

3.2.2. *Imagistica in camp intunecat a celulelor cancerigene*

In continuare, s-a investigat capacitatea nanoparticulelor aur-Pluronic de a servi ca si agenti de imprastiere pentru imagistica celulara prin microscopie in camp intunecat. **Figura 3-4** arata imaginile microscopice in camp intunecat si in camp luminos ale celulelor cancerigene incubate cu nanoparticule aur-Pluronic (a, c) si fara nanoparticule (b, d). Internalizarea cu succes a nanoparticulelor in celule este demonstrata prin punctele stralucitoare de culoare galben-portocaliu din interiorul celulelor, care se datoreaza imprastierii luminii de catre nanoparticule la frecventa curespunzatoare rezonantei plasmonice a acestora.

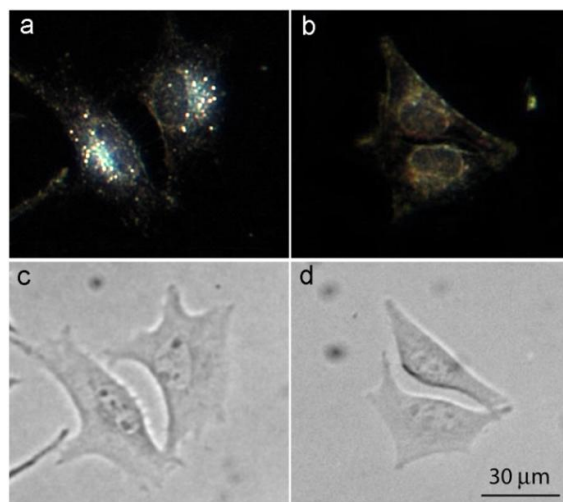


Figura 3-4 Imaginile de microscopie in camp intunecat si in camp luminos ale celulelor B16-F10 incubate cu nanoparticule aur-Pluronic (a, c) si imaginile de control fara nanoparticule (b, d).

4. Nanoparticule hibride Pluronic-aur incarcate cu albastru de metilen pentru imagistica celulara si terapia celulelor cancerigene

4.1. Prepararea si caracterizarea nanoparticulelor de aur-Pluronic incarcate cu MB

4.1.1. Prepararea si caracterizarea Au-PF127

4.1.1.1. Sinteza

Nanoparticulele de aur au fost preparate prin simpla amestecare a solutiei apoase de sare de aur cu diferite concentratii de Pluronic F127 (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM and 10 mM), urmata de purificarea acestora prin centrifugare si resuspendare in apa ultrapura.

4.1.1.2. Caracterizarea spectroscopica si morfologica

Spectrele de absorbtie ale coloizilor obtinuti cu diferite concentratii de Pluronic sunt prezentate in **Figura 4-1 A**. Toate spectrele prezinta o banda de absorbtie centrata la 540 nm corespunzatoare rezonantei plasmonice de suprafata a nanoparticulelor sferice individuale. Prin analiza acestor spectre s-a determinat concentratia de Pluronic care asigura o buna stabilitate a nanoparticulelor cu un exces minim de polimer in solutia coloidala (2 mM). Toate studiile urmatoare au fost efectuate cu nanoparticule sintetizate cu concentratia de 2 mM de Pluronic.

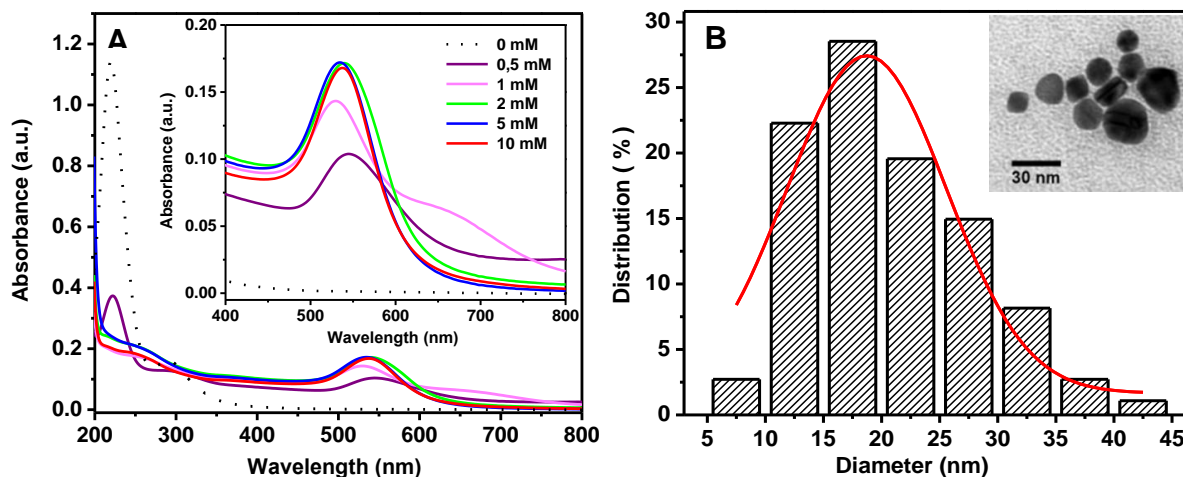


Figura 4-1 (A) Spectrele de absorbtie ale nanoparticulelor de aur sintetizate cu concentratia crescatoare de Pluronic F127. Inset: imaginea marita a benzilor plasmonice. Linia punctata reprezinta spectrul de absorbtie al solutiei HAuCl₄·3H₂O. (B) Hisograma de distributie dimensionala a nanoparticulelor Au-PF127 fitata cu o curba gaussiana. Inset: Imagine TEM a nanoparticulelor Au-PF127.

Histograma corespunzatoare distributiei dimensionale ale nanoparticulelor, fitata cu o gaussiana este prezentata in **Figura 4-1 B**, iar in inset se vede o imagine TEM reprezentativa. Diametrul mediu al Au-PF127 este de 20 ± 7 nm. Masuratorile DLS indica un diametru hidrodinamic de 41.5 nm, valoare care include invelisul polimeric indicand un singur strat de Pluronic. Datorita prezentei polimerului, potentialul Zeta masurat pe suprafata nanoparticulelor este neutru (-0.23 mV).

4.1.2. Prepararea si caracterizarea Au-F127-MB

4.1.2.1. Incarcarea nanoparticulelor cu MB

Incarcarea nanoparticulelor Au-PF127 cu MB s-a efectuat prin coincubarea acestora la temperatura camerei, urmata de purificarea solutiei de molecule nelegate prin centrifugare si resuspendare in apa ultrapura.

4.1.2.2. Caracterizarea spectroscopica

In prima etapa incarcarea nanoparticulelor Au-PF127 cu MB a fost caracterizata prin spectroscopia de absorbtie UV-Vis, spectrul Au-PF127-MB prezentand atat caracteristici spectrale corespunzatoare rezonantelor plasmonice ale nanoparticulelor de aur, cat si absorbtiei electronice a MB (spectrul b in **Figura 4-2**).

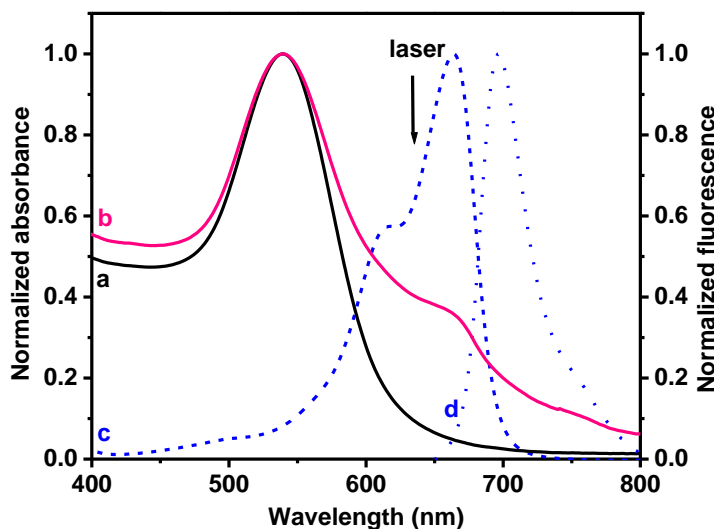


Figura 4-2 Spectrele de absorbtie normalizate ale Au-PF127 (a), Au-PF127-MB (b), MB (c) si spectrul de emisie normalizat al MB (d).

4.1.2.3. Stabilitatea nanoparticulelor Au-F127-MB in mediul biologic

Stabilitatea Au-PF127-MB in prezenta mediului celular a fost demonstrata prin semnalul spectroscopic aproape neschimbat al acestora dupa 24 ore de incubare. Este de remarcat faptul ca nu exista deplasare in maximul absorbantei plasmonice, singura modificare fiind aceea de largire a benzii datorita suprapunerii acesteia cu imprastirea proteinelor serice din mediu. Acest rezultat indica ca Pluronic previne adsorptia proteinelor.

4.1.2.4. Eliberarea MB in diferite conditii de ionicitate

Pentru cuantificarea eliberarii posibile a MB de catre Au-PF127-MB din cauza modificarii polaritatii solventului si ionicitatii din jurul nanoparticulelor, nanoparticulele au fost incubate in diferite solutii (NaCl, etanol, sodium dodecyl sulfat (SDS) si mediu celular). Cantitatea de MB eliberat s-a determinat prin masurarea spectrului de absorptie al supernatantului dupa centrifugare. Rezultatele indica ca 80 % din cantitatea initiala de MB a ramas legat de nanoparticule in cazul incubarii in apa, NaCl si mediu celular, 75 % in cazul etanolului iar 92 % in cazul SDS. Faptul ca mediul celular nu promoveaza eliberarea MB este un rezultat de mare relevanta in ceea ce priveste utilizarea ulterioara a Au-PF127-MB in aplicatii biomedicale,.

4.2. Studii legate de robustetea si activitatea nanoparticulelor Au-PF127-MB cu privire la aplicatiile biomedicale

4.2.1. Investigatii spectroscopice

4.2.1.1. Semnal dual de fluorescenta-SERS

In acest studiu am investigat activitatea SERS a nanoparticulelor Au-PF127-MB, cu scopul de a obtine informatii privind localizarea moleculelor la suprafata nanoparticulelor de aur. Spectrul SERS colectat din solutia Au-PF127-MB (**Figura 4-3**, spectrul b) prezinta atat emisie de fluorescenta a MB, cat si unele benzi Raman caracteristice ale acestuia. Masurand spectrul SERS al aceluiasi coloid, dar pe picatura uscata prezinta benzi Raman bine definite (**Figura 4-3**, spectrul c). Aceste rezultate confirma existenta MB in doua stari: legat de nanoparticule de aur generand semnal SERS si izolat de acestea prin lanturile polimerice emitand semnal de fluorescenta.

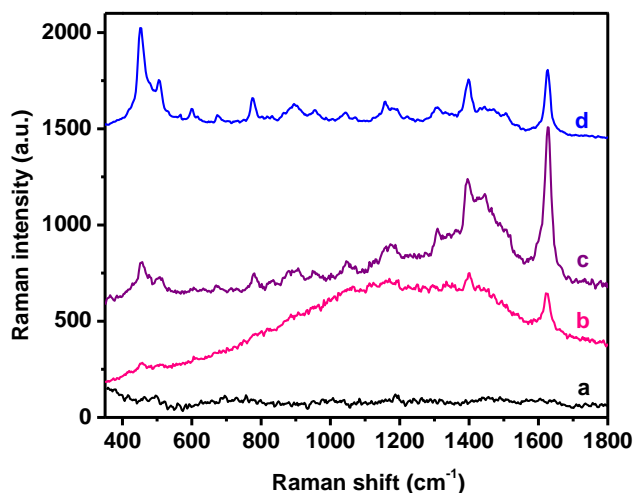


Figura 4-3 Spectrul Raman al Au-PF127 (a), semnal dual de SERS-fluorescenta al Au-PF127-MB in solutie (b), spectrul SERS al Au-PF127-MB pe picatura uscata (c) si spectrul Raman al MB solid (d).

4.2.1.2. Studiul formei moleculare a MB incapsulat

Deoarece agregarea unui fotosensibilizator ca urmare a incapsularii acestuia ii poate modifica semnificativ proprietatile terapeutice, in acest studiu am investigat starea de agregare a MB dupa inglobarea in Au-PF127 prin masurarea spectrelor de excitatie. Rezultatele obtinute indica ca forma monomerică a MB este mentinuta dupa incapsularea in Au-PF127, oferind beneficii semnificative in ceea ce priveste detectabilitatea nanoparticulelor Au-PF127-MB prin fluorescenta si aplicabilitatea acestora in PDT.

4.2.1.3. Studiul proprietatilor fotofizice ale MB incapsulat prin masuratori de fluorescenta rezolvata temporal

Cu scopul de a elucida localizarea MB si de a determina efectele incapsularii asupra proprietatilor fotofizice ale acestuia, am efectuat masuratori de timpi de viata in starea excitata (vezi **Table 4-1**).

| | τ_1 [ns] | A_1 [%] | τ_2 [ns] | A_2 [%] | χ^2 |
|-------------|---------------|-----------|---------------|-----------|----------|
| MB | 0.4 | 100 | - | - | 1.039 |
| PF127-MB | 0.43 | 98 | 1.26 | 2 | 1.013 |
| Au-PF127-MB | 0.54 | 88 | 1.26 | 12 | 1.046 |

Table 4-1 Parametrii de fluorescenta rezolvata temporal ai MB, PF127-MB si Au-PF127-MB. τ_1, τ_2 – timpi de viata in starea excitata; A_1, A_2 – distributia procentuala a componentelor de timp de viata; χ^2 -parametru statistic indicand calitatea fitului exponential.

In primul rand, s-a observat aparitia unei componente mai lungi de timp de viata, corespunzand moleculelor localizate in segmentele hidrofobe ale Pluronic. Pe de alta parte, componenta mai

scurta, atribuita moleculelor MB aflate in mediul hidrofil, prezinta o crestere fata de MB liber, datorita modificarii microviscozitatii locale din jurul moleculelor. Modificarile favorabile ale proprietatilor fotofizice ale MB observate in urma incapsularii reprezinta un avantaj efectiv in ceea ce priveste utilizarea nanoparticulelor Au-PF127-MB in PDT.

4.2.2. Studiul activitatii fotodinamice a Au-PF127-MB

4.2.2.1. Protectia MB impotriva degradarii enzimaticice

In acest capitol, ne-am propus sa verificam daca Pluronic poate proteja MB impotriva degradarii enzimaticice. In acest experiment am folosit drojdia alimentara ca sursa de enzima, glucoza ca donor de hidrogen, iar MB a avut rolul de acceptor de hidrogen. S-a monitorizat descresterea benzii de emisie a MB la 683 nm timp de 30 min la 40 °C sub agitare magnetica continua (vezi **Figura 4-4**). Rezultatele obtinute indica ca invelisul Pluronic poate proteja MB inglobat impotriva reducerii de catre enzime in mediu biologic. In consecinta nanoparticulele Au-PF127-MB sunt potrivite pentru aplicatii biomedicale.

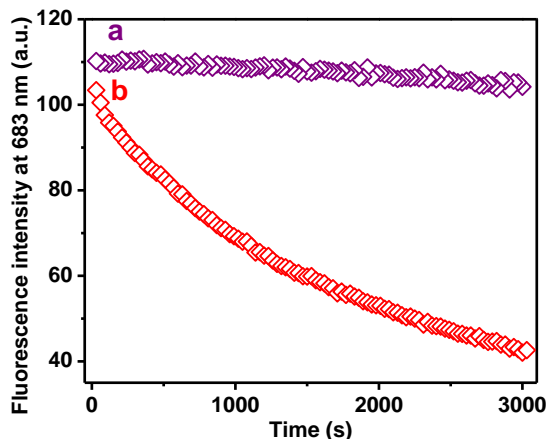


Figura 4-4 Dependenta temporală a emisiei de fluorescență la 683 nm a Au-PF127-MB (a) și MB liber (b) măsurate la 40 °C în prezența drojdiei și a glucozei.

4.2.2.2. Masuratori de generare a oxigenului singlet

In aceasta parte, am investigat potentialul nanohibridilor Au-PF127-MB in PDT, si anume capacitatea moleculelor MB inglobate de a genera specii citotoxice. Pentru aceasta am folosit 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) pentru a evalua eliberarea oxigenului singlet de catre Au-PF127-MB ca urmare a iradierii rezonante a MB. DPBF interactioneaza ireversibil cu oxigenul singlet, determinand scaderea in intensitate a benzii de absorptie a acestuia la 410 nm. Scaderea semnificativa a absorbantei DPBF in prezenta Au-PF127-MB in raport cu proba control indica

capacitatea nanoparticulelor de a genera oxigen singlet, o cerinta cruciala pentru aplicabilitatea PDT.

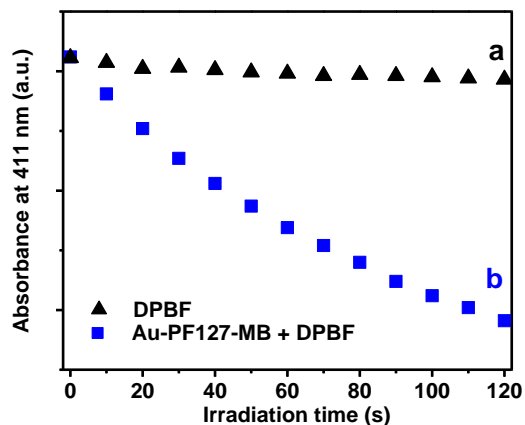


Figura 4-5 Dependenta temporală a absorbantei DPBF la 410 nm în etanol (a) și în prezența nanoparticulelor Au-PF127-MB în etanol (b).

4.3. Utilizarea Au-PF127-MB în imagistica celulară și terapia fotodinamică a celulelor

4.3.1. Studiul internalizării nanoparticulelor Au-PF127-MB în celule prin microscopia în câmp întunecat

În acest studiu, am folosit microscopia în câmp întunecat pentru a monitoriza acumularea nanoparticulelor Au-PF127-MB în celule cancerigene HTB 177 în funcție de timpul de incubare.

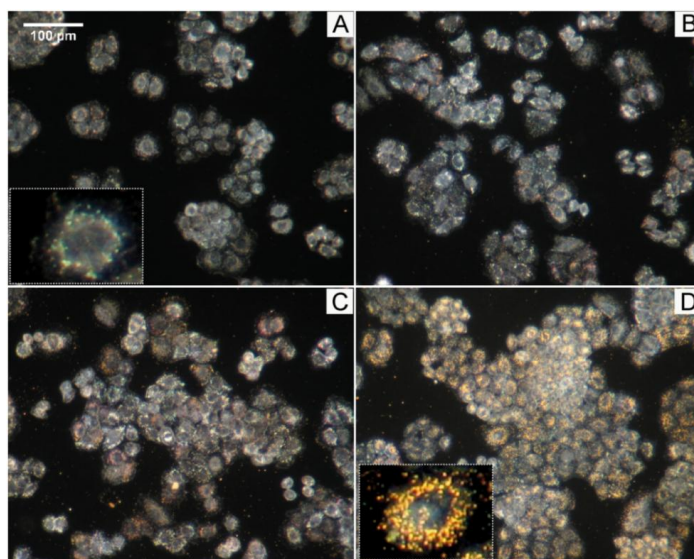


Figura 4-6 Imagini de microscopie în câmp întunecat ale celulelor HTB 177 incubate cu Au-PF127-MB timp de 0, 6, 15 și 24 ore (A, B, C respectiv D).

Figura 4-6 A prezinta imagine de referinta in camp intunecat a celulelor HTB 177 fara nanoparticule. Punctele albastrii in celulele nemarcate se datoreaza imprastierii caracteristice a diferitelor organite celulare (inset **Figura 4-6 A**). Dupa incubare cu nanoparticule timp de 6 ore se observa in cateva celule aparitia unor puncte galbui-portocaliu, indicand o acumulare slaba a nanoparticulelor (**Figura 4-6 B**). O imprasiere mult mai pronuntata se poate vedea in celulele incubate pentru 15 ore (**Figura 4-6 C**), iar incubarea pentru un timp de 24 ore rezulta intr-o marcare completa a celulelor (**Figura 4-6 D**).

Faptul ca punctele stralucitoare vizibile in interiorul celulelor se atribuie amplificarii luminii imprastiate de catre plasmonii de suprafata ai nanoparticulelor internalizate a fost confirmat prin colectarea spectrelor de imprastiere din interiorul celulelor. **Figura 4-7** arata imaginile de microscopie in camp intunecat ale celulelor analizate si spectrele corespunzatoare colectate din zona marcata cu sageti.

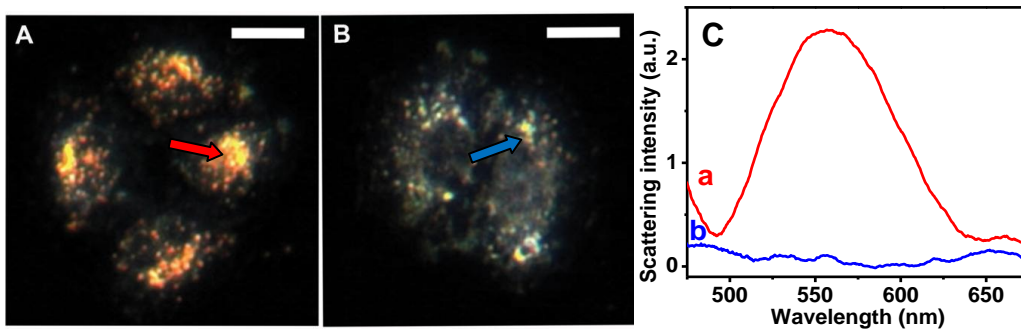


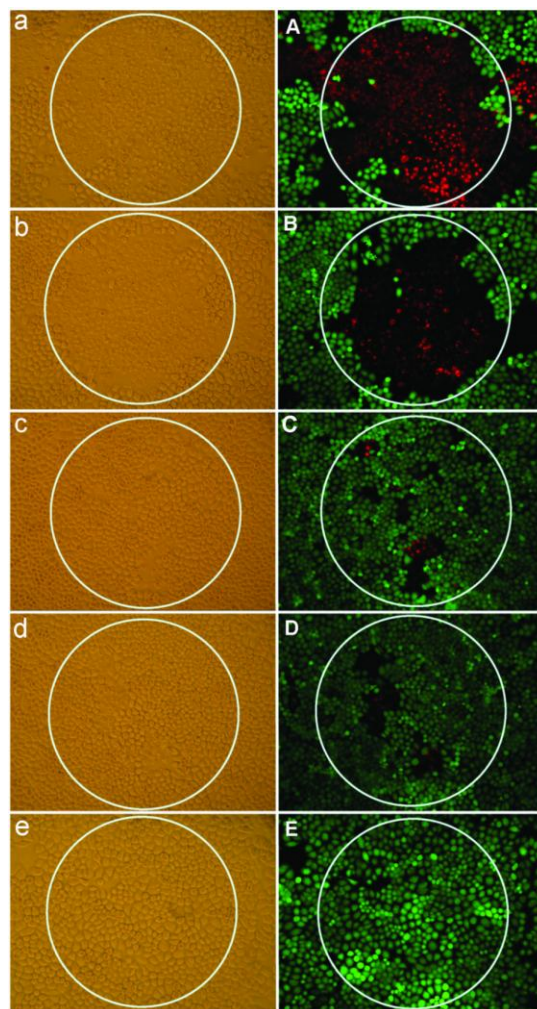
Figura 4-7 Imagini de microscopie in camp intunecat ale celulelor HTB 177 incubate cu Au-PF127-MB timp 24 h (A) si celula de referinta (B). Scala = 20 μm . (C) Spectrele de imprastiere corectate (a, b) colectate din celule de pe imaginile A respectiv B.

4.3.2. Terapia fotodinamica a celulelor cancerigene marcate cu Au-PF127-MB si activate cu LED

Strategia de a incapsula MB in nanoparticulele aur-Pluronic ofera avantaje considerabile cu privire la activitatea fotodinamica a nanoparticulelor nu doar prin faptul ca protejeaza fotosensibilizatorul impotriva factorilor de mediu si mentine forma monomerică a acestuia, ci si prin cresterea probabilitatii de generare a oxigenului singlet. In consecinta, ne permitem utilizarea unei surse de iradiere mai putin invazive decat laserii de mare performanta, si anume o dioda emitatoare de lumina (LED). Celulele HTB 177 incubate cu Au-PF127-MB au fost iradiate cu diferite doze controlate prin modificarea intensitatii luminii si a timpului de iradiere.

Starea celulelor supuse terapiei a fost evaluata la 3 ore dupa iradiere, utilizandu-se tehnica de dubla colorare fluorescanta cu calceina si iodura de propidium, marcand astfel celulele vii, respectiv cele moarte. Imaginile in camp luminos si de fluorescanta ale celulelor incubate cu Au-PF127-MB si iradiate la doze de 780 mW/cm², 640 mW/cm², 520 mW/cm² si 425 mW/cm² sunt prezentate in **Figura 4-8 a-d** respectiv **Figura 4-8 A-D**. Prelucrarea digitala a imaginilor de fluorescanta indica viabilitatea descrescatoare in functie de cresterea dozei de iradiere, ajungand la o viabilitate celulara de 13 % la cea mai mare doza (780 mW/cm²).

Figura 4-8 Imaginile de microscopie in camp luminos (a-d) si de fluorescanta (A-D) ale celulelor HTB 177 incubate cu Au-PF127-MB dupa iradiere la 660 nm cu doze de 780 mW/cm², 640 mW/cm², 520 mW/cm² respectiv 425 mW/cm². Imaginile microscopice in camp luminos (e) si de fluorescanta (E) ale celulelor HTB 177 incubate cu Au-PF127 dupa iradiere cu doza de 780 mW/cm².



5. Imagistica multimodala a celulelor vii utilizand nanoagregate fotoactivabile

5.1. Prepararea probelor

5.1.1. *Prepararea agregatelor de nanoparticule de aur*

Nanoparticulele de aur de forma sferica acoperite cu citrat de sodiu cu un diametru mediu de 14 ± 1 nm au fost sintetizate prin reducerea sarii de aur cu citrat de sodiu prin metoda Turkevich-Frens [21]. Agregarea nanoparticulelor a fost realizata prin destabilizarea sarcinii de pe suprafata acestora cu NaCl in prezenta etanolului. Agregatele formate au fost stabilizate cu Pluronic F127 si purificate prin centrifugare.

5.1.2. *Conjugarea agregatelor cu albastru de metilen*

Conjugarea agregatelor cu MB a fost realizata prin coincubarea acestora la temperatura camerei, urmata de centrifugarea si respundarea in apa ultrapura pentru a elimina moleculele nelegate.

5.2. Caracterizarea nanoagregatelor

5.2.1. *Caracterizarea morfologica si optica*

In **Figura 5-1 A** este prezentata o imagine TEM reprezentativa a nanoagregatelor formate care pune in evidenta mai mult o organizare in lanturi a nanoparticulelor, decat o agregare dezordonata. Majoritatea nanoparticulelor au ramas individuale ($\sim 32.5\%$), 18% din agregatele formate sunt de dimeri si 15% trimeri, de asemenea s-a observat si formarea unor agregate mai mari de nanoparticule (16%). Spectrul de extinctie al nanoparticulelor sferice (a) si cel al agregatelor formate din acestea (b) sunt prezentate in **Figura 5-1 B**. Agregarea nanoparticulelor induce largirea benzii plasmonice si aparitia a doua benzi la lungimi de unda mai mari. Deplasarea de 4 nm a maximului benzii plasmonice inspre lungimi de unda mai mari se atribuie cresterii indicelui de refractie din jurul nanoparticulelor ca urmare a adsorbției polimerului pe suprafata acestora. Atasarea polimerului pe suprafata nanoagregatelor s-a confirmat prin masurarea potentialului Zeta de pe suprafata acestora. Nanoparticulele de aur acoperite cu citrat prezinta un potential Zeta de -44 mV, care a crescut la -23 mV dupa formarea nanoagregatelor si stabilizarea acestora cu Pluronic.

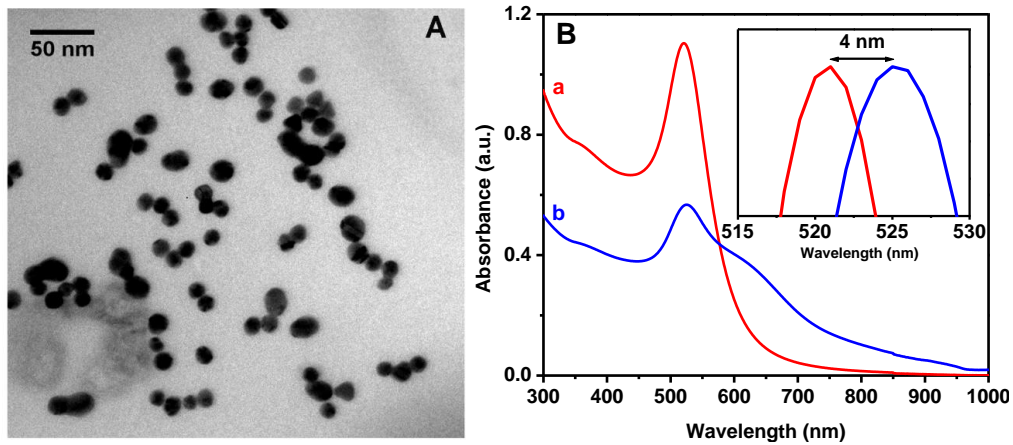


Figura 5-1 (A) Imagine TEM a GNPA si (B) spectrele de extincție ale nanoparticulelor de aur sferice (a) si GNPA (b).

5.3. Caracterizarea nanoconjugatelor

5.3.1. Caracterizarea UV-Vis

Spectrul de absorbție al nanoparticulelor GNPA-MB prezintă o caracteristică spectrală a MB, manifestându-se prin creșterea intensității benzii de absorbție la lungimea de undă corespunzătoare absorbției MB (**Figura 5-2**). Încărcarea nanoparticulelor cu MB este demonstrată și prin deplasarea de 2 nm a maximului rezonantei plasmonice, atribuită modificării indicelui de refracție din jurul nanoparticulelor ca urmare a conjugării cu MB.

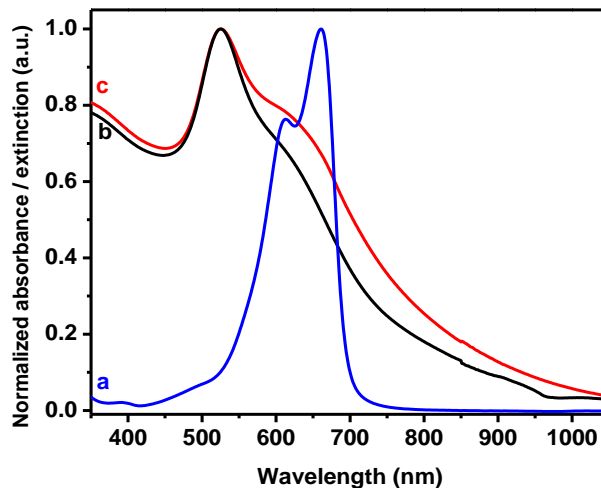


Figura 5-2 Spectrul de absorbție normalizat al MB (a), spectrele de extincție normalizate ale GNPA (b) și GNPA-MB (c).

5.3.2. *Masuratori de fluorescenta rezolvata temporal*

Asa cum am demonstrat anterior in cazul Au-PF127-MB, interactiunea cu Pluronic si nanoparticule de aur modifica semnificativ proprietatile fotofizice ale MB. In mod analog, se observa aparitia unei componente mai lungi (1.27 ns) si lungirea componentei mai scurte (0.53 ns).

5.3.3. *Stabilitatea in diferite conditii de mediu*

Nanoparticulele GNPA-MB s-au dovedit a fi foarte stabile la modificarea ionicitatii solventului, pozitia si largimea benzii plasmonice ramanand aproape nemodificate ca urmare a incubarii in solutie de NaCl timp de 24 h.

5.4. Detectia spectroscopica multimodala in celule vii

5.4.1. *Evaluarea internalizarii nanoparticulelor prin microscopie in camp luminos*

In prima etapa internalizarea nanoparticulelor GNPA-MB in celulele cancerigene a fost evaluata prin microscopia in camp luminos. Celule incubate cu GNPA-MB prezinta niste puncte negre distribuite in interiorul celulei, in regiunea citoplasmatica, atribuite nanoparticulelor acumulate in endosomi (**Figura 5-3**).

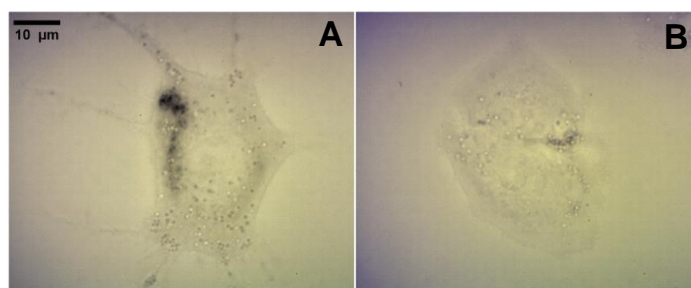


Figura 5-3 Imaginile de microscopie in camp luminos ale celulelor A549 incubate cu nanoparticule GNPA-MB (A) si fara nanoparticule (B).

5.4.2. *Masuratori SERS intracelulare*

Cu scopul de a investiga activitatea SERS intracelulara a GNPA-MB, celulele cancerigene A549 au fost incubate cu nanoparticule timp de 24 ore. Pentru excitarea probelor a fost utilizata linia laser la 633 nm care este in rezonanta cu absorbtia MB, masurandu-se de fapt semnalul Raman rezonant amplificat de suprafata (SERRS). **Figura 5-4 B** prezinta imaginea in

camp luminos a celulelor incubate cu GNPA-MB, punctele stralucitoare fiind atribuite nanoparticulelor de aur internalizate care imprastie puternic a lumina. Spectrul a din **Figura 5-4 A** reprezinta un spectru caracteristic SERRS colectat din zona indicata de sageata din **Figura 5-4 B**, asemanatoare cu spectrul masurat din solutia de GNPA-MB (spectrum b). Nu se observa benzi Raman corespunzatoare componentelor celulare, ceea ce este in buna concordanta cu alte rezultate din literatura, care demonstreaza ca Pluronic inhiba adsorbtiia moleculelor largi, cum ar fi proteinele si lipidele [22].

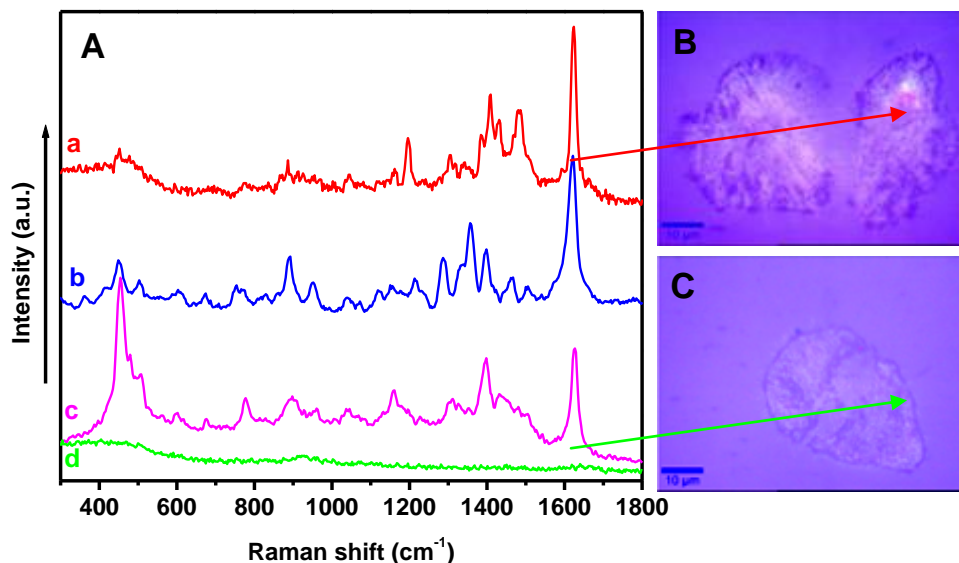


Figura 5-4 (A) spectrul SERRS al GNPA-MB in interiorul celulelor (a), spectrul SERRS al GNPA-MB in solutie (b), spectrul Raman al MB (c) imprastiere Raman din celula de control (d). (B) Imagine in camp luminos a celulelor A549 marcate cu GNPA-MB si (C) Imagine in camp luminos a celulelor A549 fara nanoparticule.

5.4.3. *Imagistica de fluorescanta rezolvata temporal a celulelor incubate GNPA-MB*

Figura 5-5 A prezinta imaginea FLIM a celulelor A549 fara nanoparticule. Se poate observa o autofluorescanta moderata avand un timp de viata mediu de 2.5 ns. In cazul celulelor incubate cu MB liber, imaginea FLIM prezinta o acumulare a moleculelor MB in lizozomi avand un timp de viata scazut la 0.27 ns (**Figura 5-5 B**). Scurtarea timului de viata se atribuie agregarii moleculelor MB ca urmare a concentratiei locale mari.

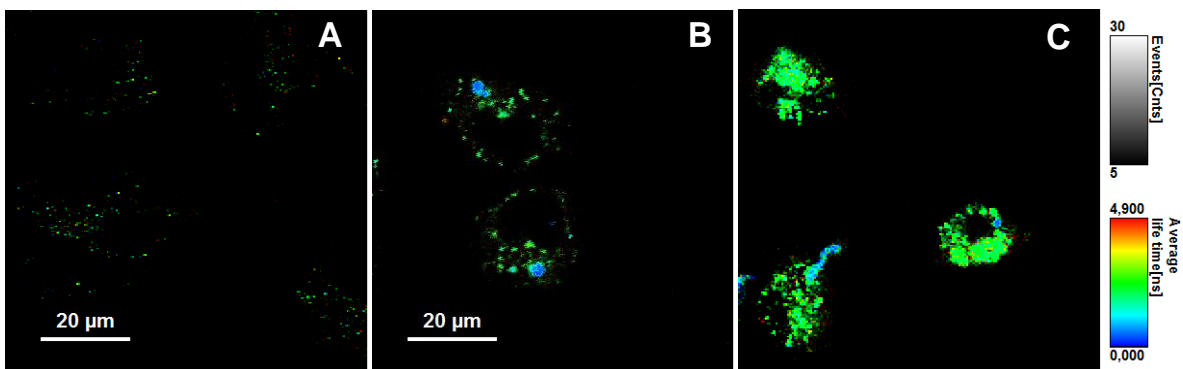


Figura 5-5 Imaginea FLIM a celulelor A549 (A), a celulelor A549 marcate cu MB (B) si a celulelor A549 marcate cu GNPA-MB (C)

Internalizarea GNPA-MB in celulele A549 este confirmata prin **Figura 5-5 C**, prezentand o localizare mult mai uniforma a nanoparticulelor raspandite in regiunile citoplasmatic. O descrestere exponentiala de ordinul doi se poate observa in acest caz, avand timpi de viata 5 ns si 1.3 ns, provenind de la autofluorescenta organelor celulare respectiv GNPA-MB. Cateva puncte asemenatoare acumularii MB liber se pot observa cu timp de 0.25 ns in cazul celulelor cu GNPA-MB, atribuite eliberarii posibile a MB de catre GNPA-MB ca urmare a interactiunii cu biomolecule din celule.

6. Concluzii finale

- ✓ Am fabricat nanoparticule aur-Pluronic stabile si biocompatibile care pot servi ca agenti de contrast in imagistica in camp intunecat a celulelor cancerigene.
- ✓ Am produs nanoparticule hibride Pluronic-aur incarcate cu albastru de metilen pentru imagistica celulara in camp intunecat si terapie fotodinamica activata prin LED a celulelor cancerigene.
- ✓ Am preparat nanoagregate da aur conjugate cu albastru de metilen pentru detectie multimodala prin SERS si FLIM.

REFERINTE

- [1] Y.-C. Yeh, B. Creran, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology," *Nanoscale*, vol. 4, no. 6, pp. 1871–1880, Mar. 2012.
- [2] T. Gallavardin, M. Maurin, S. Marotte, T. Simon, A.-M. Gabudean, Y. Bretonnière, M. Lindgren, F. Lerouge, P. L. Baldeck, O. Stéphan, Y. Leverrier, J. Marvel, S. Parola, O. Maury, and C. Andraud, "Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 1216–1225, Jun. 2011.
- [3] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 36–48, Jan. 2013.
- [4] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic therapy of cancer: An update," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2011.
- [5] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 233–234, pp. 351–371, Nov. 2002.
- [6] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, D. Oliveira, C. Santos, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. de Fátima Turchiello, and M. S. Baptista, "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 3, pp. 175–191, Sep. 2005.
- [7] H. C. Junqueira, D. Severino, L. G. Dias, M. S. Gugliotti, and M. S. Baptista, "Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 4, no. 11, pp. 2320–2328, May 2002.
- [8] W. Tang, H. Xu, E. J. Park, M. A. Philbert, and R. Kopelman, "Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 369, no. 2, pp. 579–583, May 2008.
- [9] X. He, X. Wu, K. Wang, B. Shi, and L. Hai, "Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy," *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5601–5609, Oct. 2009.
- [10] H. J. Hah, G. Kim, Y.-E. K. Lee, D. A. Orringer, O. Sagher, M. A. Philbert, and R. Kopelman, "Methylene blue-conjugated hydrogel nanoparticles and tumor-cell targeted photodynamic therapy," *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 1, pp. 90–99, Jan. 2011.
- [11] S. Link and M. A. El-Sayed, "Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 54, pp. 331–366, 2003.
- [12] Y. Sun and Y. Xia, "Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm," *Analyst*, vol. 128, no. 6, pp. 686–691, Jan. 2003.
- [13] A. Wax and K. Sokolov, "Molecular imaging and darkfield microspectroscopy of live cells using gold plasmonic nanoparticles," *Laser Photonics Rev.*, vol. 3, no. 1–2, pp. 146–158, 2009.

- [14] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes, “Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 55–62, Feb. 2005.
- [15] J. R. Lombardi and R. L. Birke, “A Unified View of Surface-Enhanced Raman Scattering,” *Accounts Chem. Res.*, vol. 42, no. 6, pp. 734–742, Jun. 2009.
- [16] Y. Wang and J. Irudayaraj, “Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, no. 1611, Feb. 2013.
- [17] Y. Zhang, K. Aslan, M. J. R. Prevede, and C. D. Geddes, “Metal-enhanced Singlet Oxygen Generation: A Consequence of Plasmon Enhanced Triplet Yields,” *J. Fluoresc.*, vol. 17, no. 4, pp. 345–349, Jul. 2007.
- [18] K. H. Bae, S. H. Choi, S. Y. Park, Y. Lee, and T. G. Park, “Thermosensitive Pluronic Micelles Stabilized by Shell Cross-Linking with Gold Nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 22, no. 14, pp. 6380–6384, Jul. 2006.
- [19] M. Y. Kozlov, N. S. Melik-Nubarov, E. V. Batrakova, and A. V. Kabanov, “Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes,” *Macromolecules*, vol. 33, no. 9, pp. 3305–3313, May 2000.
- [20] G. K. Sarma, S. SenGupta, and K. G. Bhattacharyya, “Methylene Blue Adsorption on Natural and Modified Clays,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 10, pp. 1602–1614, 2011.
- [21] G. Frens, “Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions,” *Nature*, vol. 241, no. 105, pp. 20–22, Jan. 1973.
- [22] R. J. Green, M. C. Davies, C. J. Roberts, and S. J. B. Tendler, “A surface plasmon resonance study of albumin adsorption to PEO–PPO–PEO triblock copolymers,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, no. 2, pp. 165–171, 1998.

Mulumire:

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/107/1.5/S/76841, cu titlul „Studii doctorale moderne: internaționalizare și interdisciplinaritate”.

LISTA LUCRARILOR PUBLICATE

Articole publicate in reviste cotate ISI:

- 1) **T. Simon**, S. Boca-Farcau, A.M. Gabudean, P. Baldeck, S. Astilean, *LED-activated methylene blue-loaded Pluronic-nanogold hybrids for in vitro photodynamic therapy*, **J. Biophotonics**, 1-10 (2013) doi:10.1002/jbio.201300058, (IF=3.099, IS=0.993);
- 2) **T. Simon**, S. Boca, D. Biro, P. Baldeck, S. Astilean, *Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation*, **J. Nanopart. Res.** 15 (2013) 1578. (IF= 2.175, FRI=0.673);
- 3) **T. Simon**, S. Boca, S. Astilean, *Pluronic-Nanogold hybrids: Synthesis and tagging with photosensitizing molecules*, **Colloids Surf. B** 97 (2012) 77-83. (IF= 3.554, IS=0.772);
- 4) M. Iliut, A.M. Gabudean, C. Leordean, **T. Simon**, C.-M. Teodorescu , S. Astilean, *Riboflavin enhanced fluorescence of highly reduced graphene oxide*, **Chem. Phys. Lett.** (2013), manuscris acceptat (IF=2.145, IS=0.687);
- 5) B. Marta, E. Jakab, M. Potara, **T. Simon**, F. Imre-Lucaci, L. Barbu-Tudoran, O. Popescu, S. Astilean, *Pluronic-coated silver nanoprisms: synthesis, characterization and their antibacterial activity*, **Colloids Surf. A** (2013), doi:10.1016/j.colsurfa.2013.08.076, (IF=2.108, IS=0.585);
- 6) T. Gallavardin, M. Maurin, S. Marotte, **T. Simon**, A. M. Gabudean, Y. Bretonnière, M. Lindgren, F. Lerouge, P. L. Baldeck, O. Stéphan, Y. Leverrier, J. Marvel, S. Parola, O. Maury and C. Andraud, *Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery*, **Photochem. Photobiol. Sci.** 10 (2011) 1216-1225. (IF= 2.584, IS=0.746).

Articole publicate in alte reviste:

- 1) Z. Benyey, E. Vanea, **T. Simon**, S. Cavalu, V. Simon, *Tetracycline loading and release from bioactive glass microspheres*, **STUDIA UBB PHYSICA**, LVI, 2, 2011