



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI, **Facultatea de Fizică**, Cluj-Napoca

**Agenți de contrast pe bază de disprosiu și fier pentru  
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară -  
sinteză și caracterizare**

**REZUMATUL  
TEZEI DE DOCTORAT**

**Doctorand,  
Liviu Chiriac**

Coordonator științific,  
Prof.dr. Simion Simon

## Cuprinsul tezei de doctorat

<b>Capitolul I</b> .....	<b>5</b>
Introducere.....	5
<b>Capitolul II</b> .....	<b>8</b>
Baze teoretice	
Momentul magnetic .....	8
Efectul Zeeman .....	8
Precesia Larmor. Frecvența Larmor .....	9
Magnetizarea longitudinală.....	10
Relaxarea longitudinală .....	11
Magnetizarea transversală.....	11
Relaxarea transversală .....	12
Deplasarea chimică .....	12
Rezonanță magnetică nucleară la unghi magic (MAS-RMN) .....	13
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) .....	15
Gradientul de câmp magnetic .....	15
Localizarea spațială a semnalului .....	17
Contrastul în (MRI).....	18
<b>Capitolul III</b> .....	<b>19</b>
Metode și măsuratori utilizate pentru caracterizarea	
structural a sistemelor studiate.....	19
Analiza termică diferențială (DTA) .....	19
Difracția de raze X (XRD).....	20
Spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR) .....	20
Rezonanța Electronică de Spin (RES) .....	21
Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN).....	21
Spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS).....	22
Potențialul Zeta .....	23
Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	23
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) .....	24
Testele de biocompatibilitate .....	26
<b>Capitolul IV</b> .....	<b>29</b>
Metode de obținere a agenților de contrast .....	29
Metoda sol- gel .....	29
Metoda freeze-drying.....	30
Metoda spray-drying .....	31

<b>Capitolul V .....</b>	<b>34</b>
Rezultate experimentale.....	34
<b>V.1. Rezultate experimentale pentru sistemul cu disprosiu (Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).....</b>	<b>34</b>
Sinteza probelor .....	34
Analiza termică diferențială (DTA) .....	35
Difracția de raze X (XRD).....	38
Spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR) .....	39
Potențialul Zeta .....	40
Spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS).....	42
Rezonanța magnetică nucleară (RMN).....	48
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) .....	56
Biocompatibilitatea .....	62
<b>V.2. Rezultate experimentale pentru sistemul cu fier (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) .....</b>	<b>70</b>
Analiza termică diferențială (DTA) .....	71
Difracția de raze X (XRD).....	73
Spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR) .....	75
Spectroscopie fotoelectronica de raze X (XPS).....	76
Rezonanța electronică de spin (RES).....	77
Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	79
Rezonanță magnetică nucleară (RMN).....	92
Biocompatibilitatea .....	98
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) in vitro .....	100
Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) in vivo.....	103
Histopatologie .....	106
<b>Capitolul VI.....</b>	<b>111</b>
Concluzii .....	111
VI.1. Concluzii pentru sistemul dopat cu disprosiu (Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	111
VI.2. Concluzii pentru sistemul cu fier (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	112
<b>Bibliografie .....</b>	<b>114</b>

***Cuvinte cheie: Agenți de contrast, Imagistică prin Rezonanță Magnetică Nucleară, Teranostic, Disprosiu, Fier, Biocompatibilitate.***

## Scopul lucrării

În ultimele decenii un segment important al cercetărilor științifice a avut ca obiectiv dezvoltarea tehnicilor de diagnostic și tratament în domeniul medical, cu precădere în vederea terapiei cancerului. Imagistica prin Rezonanță Magnetică Nucleară (MRI) se aplică în primul rând pentru diagnosticarea unei game variate de afecțiuni, de la tumori și boli demielinizante la nivelul creierului, până la leziuni meniscale fine sau leziuni ale arterelor și venelor [1-5]. În cazul utilizării agenților de contrast în MRI, s-a dezvoltat ideea de a obține materiale care pe lângă proprietățile de agent de contrast pentru rezonanța magnetică să prezinte și proprietăți pentru efectuarea unui tratament țintit [6]. Aceste substanțe sunt denumite materiale teranostice [7]. Agenții de contrast utilizați în MRI se împart în funcție de ponderea cu care modifică timpii de relaxare în trei mari categorii: agenți de contrast spin-rețea  $T_1$  (agenți de contrast pozitivi) - distribuția acestora va produce în imagini zone cu hipersemnal (zone luminoase); agenți de contrast care afectează timpul de relaxare spin-spin  $T_2$  (agenți de contrast negativi) - prezența lor va induce în imagine zone de hiposemnal (zone întunecate) și agenți de contrast duali - aceștia afectează în ponderi egale și timpul de relaxare spin-rețea și timpul de relaxare spin-spin [8].

**Scopul acestei teze a fost de a cerceta posibile materiale noi de contrast, pe bază de disprosiu și fier, pentru metoda de investigare MRI, și care să poată fi luate în considerare totodată și pentru folosirea lor în tratamente prin hipertermie.**

*Prepararea probelor și investigațiile asociate au fost efectuate în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe și la Centrul Național de Rezonanță Magnetică din cadrul Facultății de Fizică a Universității „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca.*

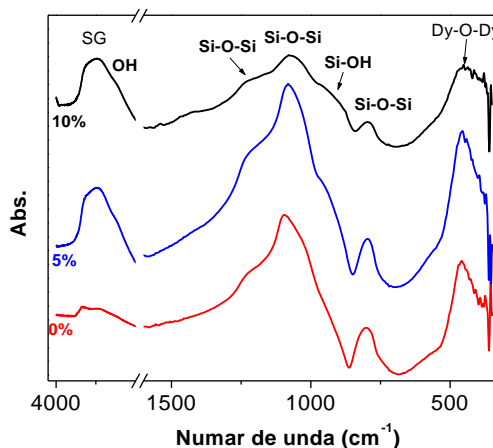
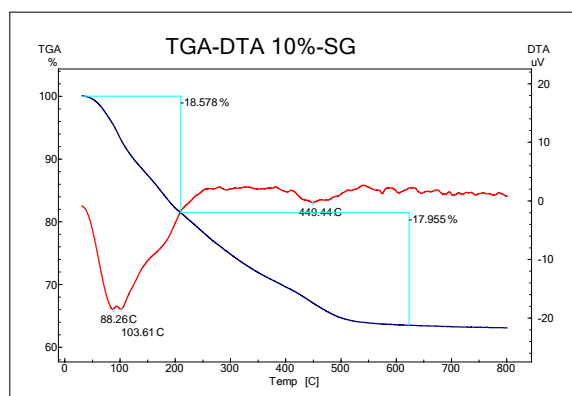
Metoda sol-gel folosită primordial în prepararea probelor studiate în teză este larg utilizată pentru obținerea unei game extinse de materiale noi, cu aplicații într-o serie de domenii, atât tehnologice cât și biomedicale. Procesul sol-gel permite sinteza unor materiale oxidice vitroase de omogenitate ridicată, cu proprietăți dorite de duritate, transparentă optică, durabilitate chimică și rezistență termică, structura acestora fiind de regulă realizată la temperatura camerei, spre deosebire de tehnica convențională de obținere prin răcirea topiturilor, care implică temperaturi mult mai ridicate [9, 10]. Aplicând metoda sol-gel se pot obține materiale într-o varietate largă: pudră ultrafină, filme subțiri, fibre, membrane microporoase, precum și materiale extrem de poroase. De asemenea, pornind de la metoda sol-gel se pot obține probe sub formă de pulbere prin liofilizare sau pulverizare aplicând metoda freeze-drying, respectiv spray-drying.

## Rezultate experimentale pentru sistemul cu disprosiu

A fost sintetizat sistemul  $(100-x)\text{SiO}_2 \cdot x\text{Dy}_2\text{O}_3$  cu diferite concentrații ale oxidului de disprosiu ( $0 \leq x \leq 10$  % mol). Probele obținute prin metoda sol-gel sunt sub formă de pulbere. Pentru realizarea acestora s-a plecat de la precursorul tetraetilortosilicat (TEOS)  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  ca precursor al  $\text{SiO}_2$ , iar pentru oxidul de disprosiu  $\text{Dy}_2\text{O}_3$  s-a folosit ca precursor azotat de disprosiu  $(\text{Dy}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{HO}_2)$ .

Soluțiile astfel obținute s-au împartit în trei părți, pentru a fi utilizate la trei metode diferite de extragere a solventului din porii rețelei formate: (i) gelare și apoi uscare la temperatura de  $35^\circ\text{C}$  (probe notate SG/sol-gel), (ii) gelare urmată de liofilizare (probe notate FD/freeze-drying), (iii) uscare prin pulverizare (probe notate SD/spray-drying). Probele rezultate, cu concentrații molare 0, 5 și 10 %  $\text{Dy}_2\text{O}_3$ , au fost supuse unor tratamente termice și apoi investigate în vederea identificării modificărilor structurale induse de introducerea  $\text{Dy}_2\text{O}_3$  și de tratamentul termic.

S-a efectuat analiza termică și termo-gravimetrică în intervalul de temperatură cuprins între  $20\text{-}800^\circ\text{C}$ , cu o viteză de încălzire de  $10^\circ\text{C}/\text{minut}$ .



Curbele de analiză DTA și TGA pentru proba cu 10%  $\text{Dy}_2\text{O}_3$  -SG

Spectrele FT-IR ale probelor preparate prin metoda SG

Din datele DTA, TGA obținute [11] s-a stabilit efectuarea unui tratament termic la temperatura de  $600^\circ\text{C}$ . Analiza prin difracție de raze X înainte și după tratamentul termic la  $600^\circ\text{C}$  arată că cele trei tipuri de probe SG, FD și SD sunt amorfe.

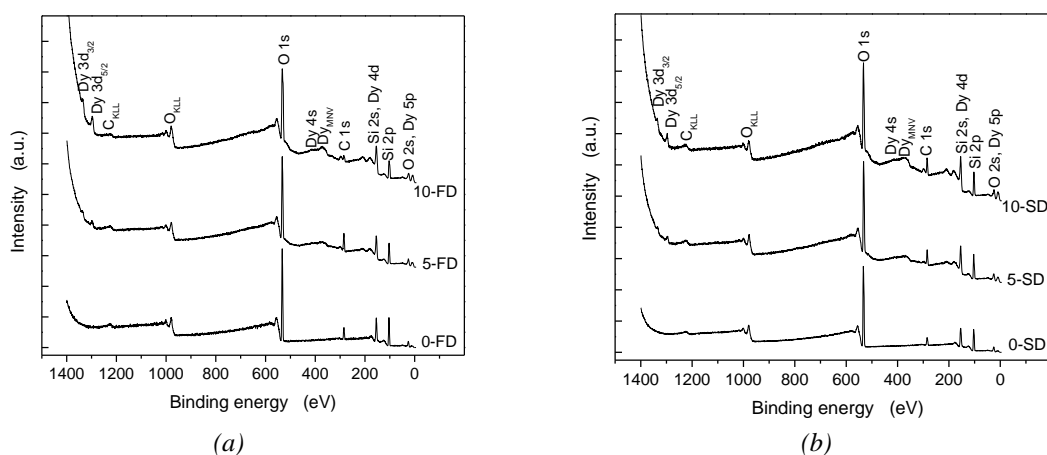
Au fost analizate prin spectroscopie de absorbție în infraroșu probele tratate termic obținute prin cele trei tipuri de metode de sinteză. Spectroscopia FTIR oferă informații suplimentare legate de modificările structurale induse de adăugarea oxidului de disprosiu dar și informații legate de modificările ce apar în urma tratamentului termic.

Banda de la  $450\text{ cm}^{-1}$  este atribuită atât vibrațiilor legăturilor Dy-O-Dy, cât și vibrațiilor de deformare a legăturilor Si-O-Si. La  $590\text{ cm}^{-1}$  se găsește banda atribuită vibrațiilor de întindere simetrică a legăturilor Si-O-Si în unități  $\text{SiO}_4$  de tip  $\text{Q}^4$ , umărul de la  $940\text{ cm}^{-1}$  este asociat vibrațiilor de întindere a legăturilor Si-O în unități  $\text{SiO}_4$  de tip  $\text{Q}^2$ , la  $1080\text{ cm}^{-1}$  se înregistrează

banda atribuită vibrațiilor de întindere antisimetrice a legăturilor Si–O–Si din unități SiO<sub>4</sub> de tip Q<sup>3</sup>, la 1640 cm<sup>-1</sup> banda atribuită apei absorbite, iar la 3500 cm<sup>-1</sup> apare banda atribuită vibrațiilor de întindere a legăturilor O-H.

Mărimea particulelor și potentialul zeta au fost măsurate prin metoda difuziei dinamice a luminii. Conform acestor măsuratori, mărimea medie a particulelor variază între 0,5 și 4 μm, potentialul zeta negativ, cuprins între -16 și -44 mV, indică o bună stabilitate a suspensiilor obținute cu probele studiate.

Analiza prin spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS) evidențiază apariția disprosiului la suprafața acestora proporțional cu cantitatea de Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> introdus în compoziția probelor. Prezența carbonului se datorează contaminării inevitabile cu carbon a tuturor probelor expuse în aer.



Spectrele XPS survey înregistrate în domeniul energiilor de legătură 0-1400 eV pentru probele FD (a) și SD (b)

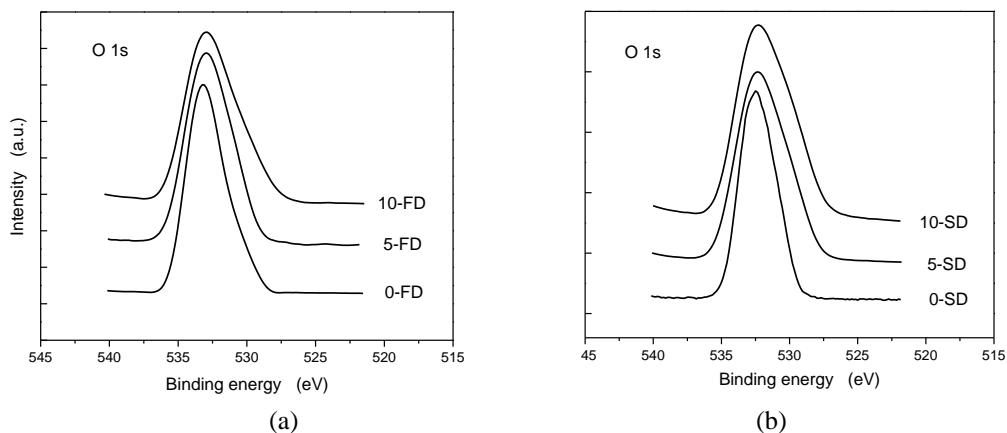
Compoziția elementală teoretică în interiorul probelor (% at), precum și compoziția elementală de pe stratul exterior al probelor determinate experimental din spectrele XPS, cu omiterea carbonului de contaminare, este redată în tabelul următor.

Element x (mol%)		Element			
		O	Si	Dy	Dy/Si
teoretic	0	66.7	33.3	-	-
	5	66.2	30.6	3.2	0.10
	10	65.6	28.1	6.3	0.22
experimental	0-FD	53.3	46.7	-	-
	5-FD	55.3	41.2	3.5	0.08
	10-FD	55.5	38.1	6.4	0.17
	0-SD	53.9	46.1	-	-
	5-SD	54.1	42.0	3.9	0.09
	10-SD	53.0	39.7	7.3	0.18

Compoziția elementală (at %) preconizată în probele presupuse omogene și compoziția de pe stratul exterior al probelor, determinată experimental prin XPS.

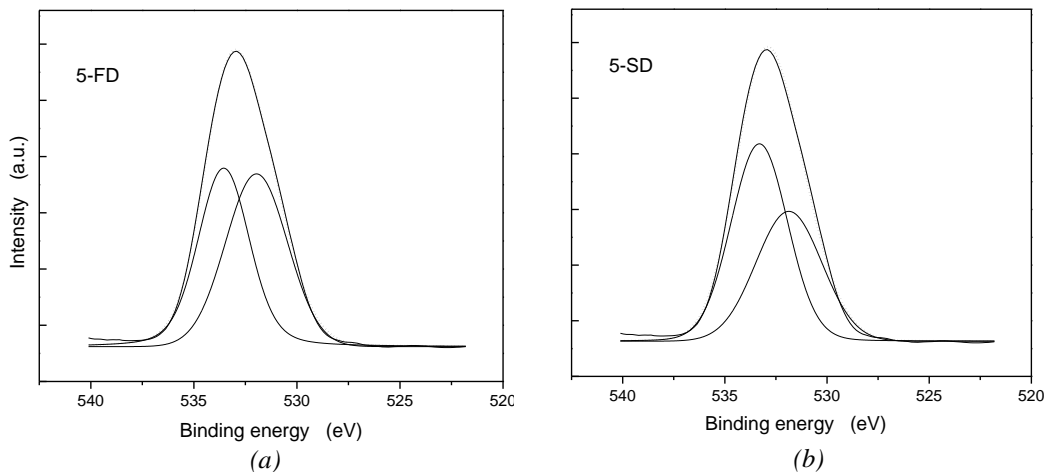
Spetrele de înaltă rezoluție O 1s se înregistrează în domeniul 525-540 eV. Pentru a evalua raportul NBO/BO dintre numărul atomilor de oxigenilor nepunțați (NBO non-bridging oxygen) și punțați (BO - bridging oxygen), într-o prima încercare am inclus toate contribuțiile oxigenilor nepunțați NBO într-o singură componentă.

Deconvoluțiile spectrelor în jurul valorilor de 531 și respectiv 533 eV, arată că raportul dintre atomii de O nelegați/nepunțați și respectiv legați/punțați (NBO/BO) pe suprafața probelor depinde atât de compoziția cât și de metoda de preparare. Componenta BO este atribuită unităților structurale  $Q_4$  în timp ce componenta NBO include contribuțiile de la atomii de oxigen implicați în unități  $Q_n$  cu  $n < 4$ .



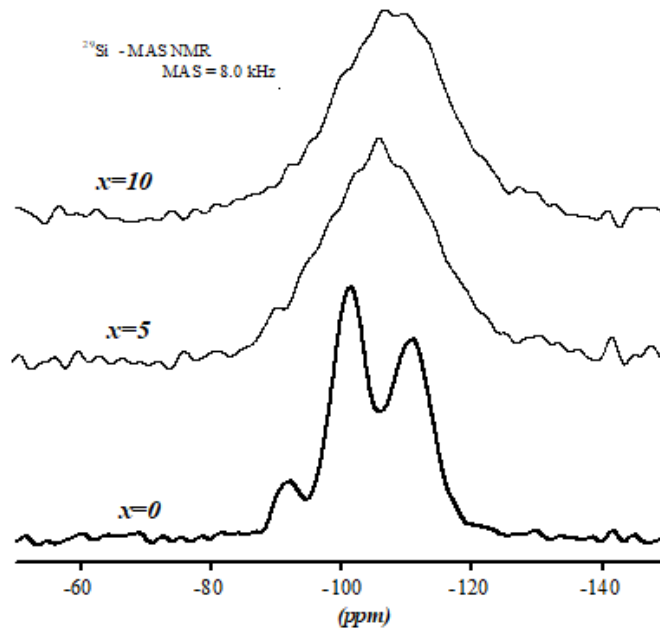
Spectrele XPS O 1s de înaltă rezoluție pentru probele liofilizate FD (a) și pulverizate SD (b).

Analiza spectrelor XPS de înaltă rezoluție Si 2p, reliefiză faptul că energia de legătură a fotoelectronilor Si 2p, este aproape de 103 eV în probele studiate, în timp ce valoarea raportată pentru sticla  $SiO_2$  pură este de 103,6 eV. O ușoară deplasare spre valori mai mici ale energiilor de legătură se observă concomitent cu introducerea  $Dy_2O_3$ .

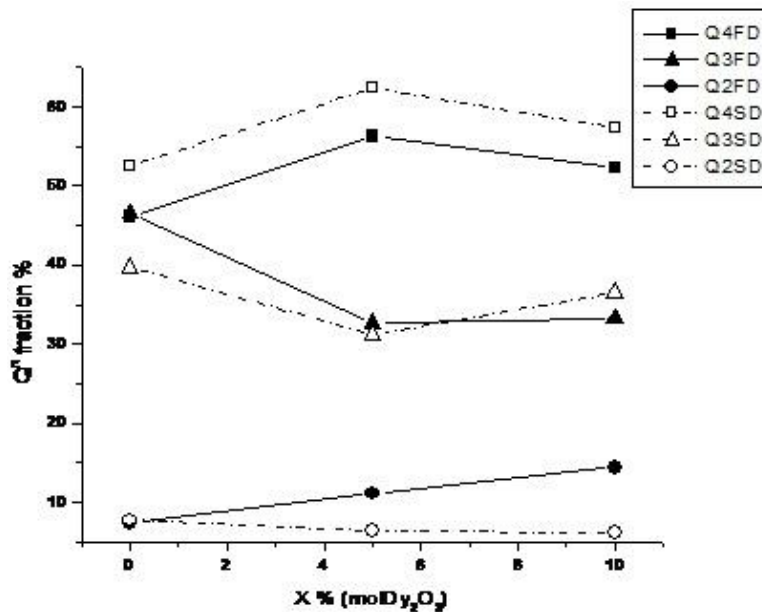


Deconvoluțiile spectrelor de O 1s în BO și NBO pentru probele cu 5%  $Dy_2O_3$  obținute prin liofilizare (a) și pulverizare (b)

Prin creșterea concentrației de oxid de disprosiu și prin tratamentul termic aplicat, modificările structurale care au fost induse la nivelul structurii locale în probe sunt evidențiate și prin modificarea spectrelor  $^{29}\text{Si}$  NMR. Spectrele  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR ale probelor liofilizate, înainte de tratamentul termic prezintă linii largi cuprinse în intervalul 80-130 ppm.



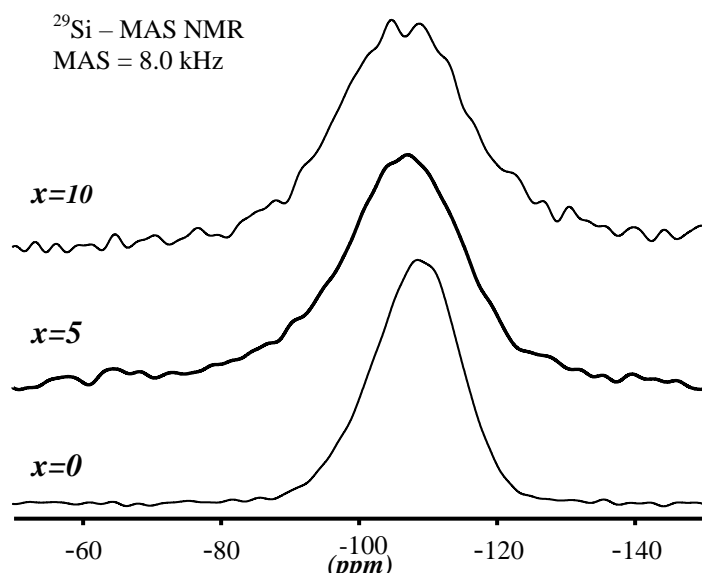
Spectrele MAS RMN  $^{29}\text{Si}$  pentru probele liofilizate netratate termic



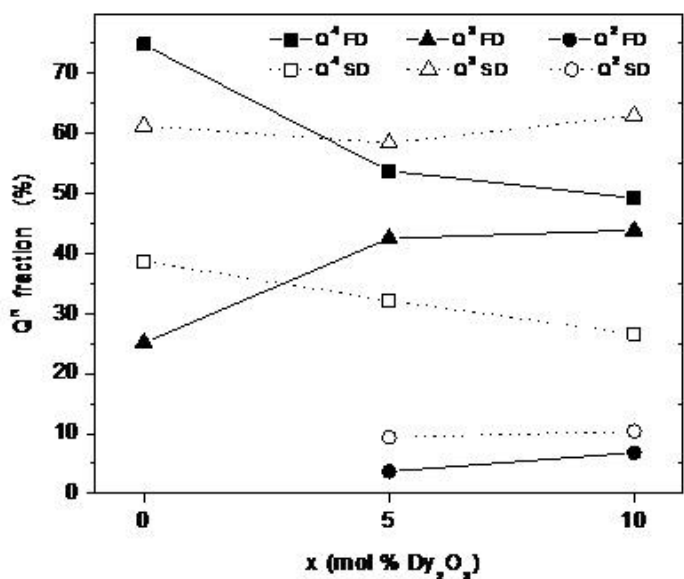
Dependența ponderii unităților  $Q^n$  de concentrația de disprosiu în probele FD și SD netratate termic



Odată cu introducerea oxidului de disprosiu în matricea silicată se observă o polimerizare a rețelei cristaline (deplasare a centrului de greutate a spectrului  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR spre valori ale deplasării chimice mai mari) cât și un efect de dezordine la mică și medie distanță. Astfel liniile de rezonanță sunt mai largi și se suprapun. Investigațiile  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR a celor trei sisteme a mai evidențiat faptul că proba cu  $x=10\%$ , obținută prin metoda sol-gel prezintă aglomerări de centri paramagnetici la un nivel care face imposibilă analiza NMR. Trebuie să ținem cont de faptul că, datorită prezenței ionilor paramagnetici de  $\text{Dy}^{3+}$  în apropierea unor atomi de siliciu, timpul de relaxare caracteristic  $^{29}\text{Si}$  este schimbat în mod dramatic.



Spectrele MAS RMN  $^{29}\text{Si}$  pentru probele liofilizate tratate termic



Ponderea unităților  $Q^n$  în probele tratate termic FD și SD funcție de concentrația de disprosiu

Analiza spectrelor  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR pentru probele FD și SD arată o polimerizare a matricii de silice odată cu adăugarea  $\text{Dy}_2\text{O}_3$ .

*Datele obținute în urma deconvoluțiilor probelor FD (100-x) SiO<sub>2</sub>:x Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> înainte de tratamentul termic*

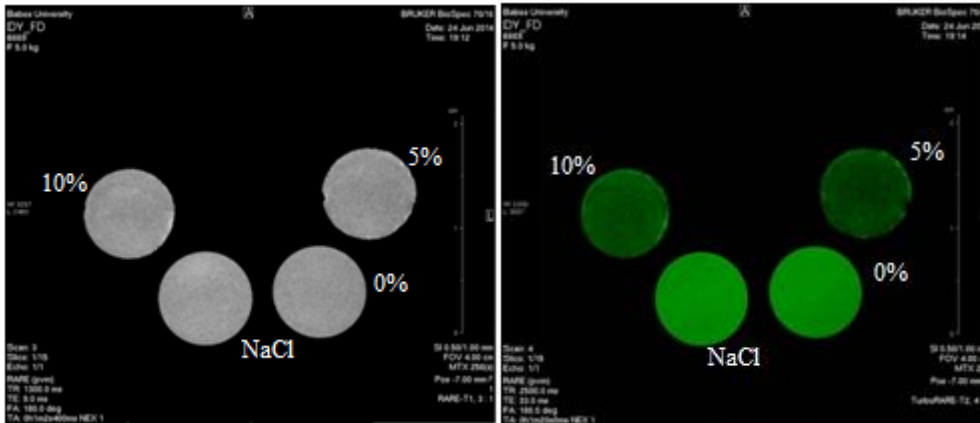
Proba	Q <sup>(n)</sup>	Deplasare chimică (ppm)	Lărgimea liniei (ppm)	Pondere Q <sup>(n)</sup> (%)
100(SiO <sub>2</sub> )	Q <sup>2</sup>	-91.93	4.69	5.34
	Q <sup>3</sup>	-101.11	6.29	46.53
	Q <sup>4</sup>	-110.59	5.58	46.13
95(SiO <sub>2</sub> ) 5(Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Q <sup>2</sup>	-90.50	15.88	11.05
	Q <sup>3</sup>	-103.25	15.05	32.64
	Q <sup>4</sup>	-111.00	16.99	56.29
90(SiO <sub>2</sub> ) 10(Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Q <sup>2</sup>	-91.95	4.94	1.59
	Q <sup>3</sup>	-101.46	14.66	34.31
	Q <sup>4</sup>	-109.41	16.60	64.10

*Datele obținute în urma deconvoluțiilor probelor FD (100-x)SiO<sub>2</sub>:xDy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tratate termic*

Proba	Q <sup>(n)</sup>	Deplasare chimică (ppm)	Lărgimea liniei (ppm)	Pondere Q <sup>(n)</sup> (%)
100(SiO <sub>2</sub> )	Q <sup>2</sup>	-	-	-
	Q <sup>3</sup>	-102.00	15.53	25.15
	Q <sup>4</sup>	-109.55	13.06	54.83
95(SiO <sub>2</sub> ) 5(Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Q <sup>2</sup>	-93.21	5.50	3.51
	Q <sup>3</sup>	-102.35	15.00	42.53
	Q <sup>4</sup>	-111.49	18.06	53.56
90(SiO <sub>2</sub> ) 10(Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Q <sup>2</sup>	-91.92	8.33	1.59
	Q <sup>3</sup>	-102.00	19.11	36.90
	Q <sup>4</sup>	-110.98	24.58	61.31

Rezultatele obținute în urma deconvoluțiilor efectuate pentru spectrele înregistrate pe ambele tipuri de probe, FD și SD, arată că pentru 5% și 10% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> raportul unităților Q<sub>n</sub> este relativ similar indicând, o matrice silicatică asemănătoare pentru cele două metode de sinteză.

Pentru evaluarea capacității de creștere a contrastului în imagistica prin rezonanță magnetică nucleară, respectiv pentru caracterizarea evoluției parametrilor T<sub>1</sub> și T<sub>2</sub> pentru compușii celor trei sisteme s-au efectuat investigații cu protocoale RARE-T<sub>1</sub> și RARE-T<sub>2</sub> (RARE - rapid acquisition with relaxation enhancement pulse sequence / rapid acquisition refocused echo).

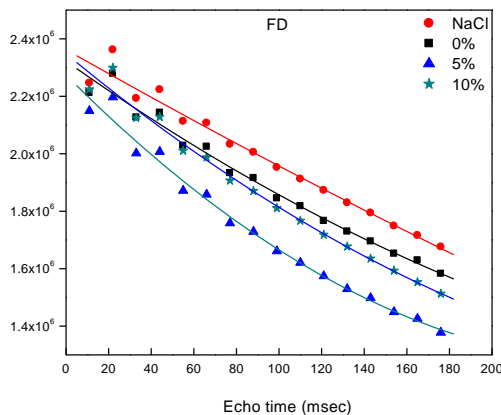


Imagini achiziționate cu protocol IRM Turbo RARE de tip  $T_1$  pe proba FD

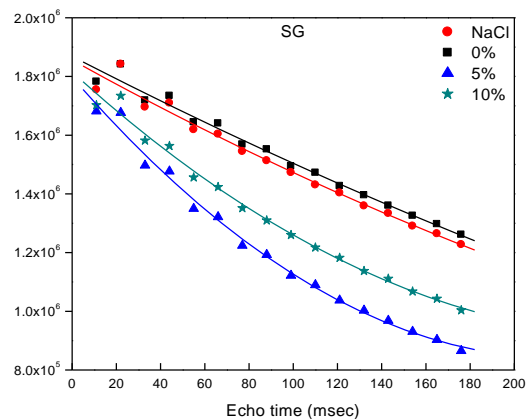
Imagini achiziționate cu protocol IRM Turbo RARE de tip  $T_2$  pe proba FD

Timpul de relaxare  $T_2$  este influențat de fluctuațiile câmpului magnetic local, datorat prezenței centrilor paramagnetici, și de interacțiunile locale. După cum se observă în imaginile de mai sus, obținute cu protocol IRM de achiziție structurală, materialul sintetizat cu disprosiu prezintă caracteristici de agent de contrast pe seama timpului de relaxare  $T_2$ , fapt confirmat și de calculele de relaxometrie.

Pentru verificarea cantitativă, s-au efectuat analize de relaxometrie cu protocolul de tip RARE- $T_1+T_2$ -map, care permite calcularea timpilor de relaxare pentru fiecare timp de ecou al secvenței de pulsuri. Timpul de ecou este timpul dintre momentul excitării unei secțiuni și momentul în care se măsoară semnalul. Timpul de relaxare  $T_2$  s-a măsurat din intensitatea semnalului MRI la diferite valori TE.



Intensitatea semnalului MRI, în u.a., măsurată la diferiți timpi de ecou, pentru probele FD

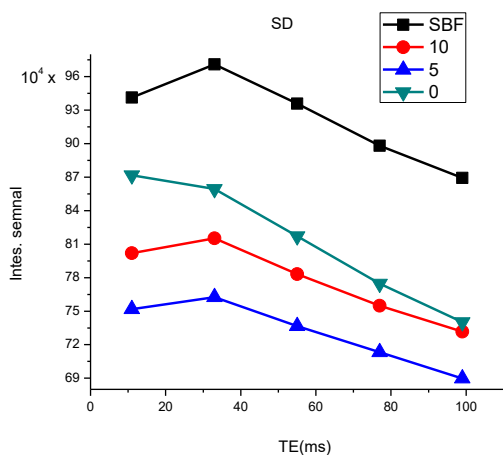


Intensitatea semnalului MRI, în u.a., măsurată la diferiți timpi de ecou, pentru probele SG

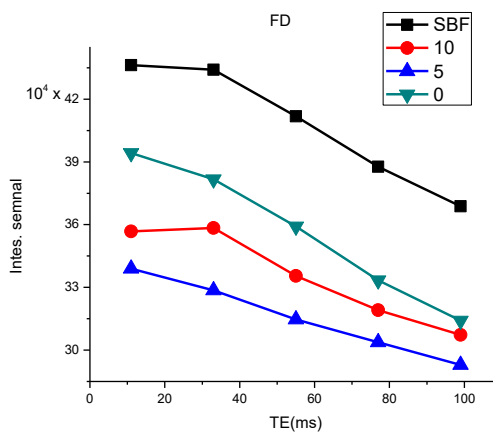
Din evaluările de relaxometrie se poate observa evoluția relaxării  $T_2$ , care este influențată de dimensiunea particulei (în acest caz, nano și micro-metri), de concentrația  $Dy_2O_3$  și de ponderea relativă a unităților  $Q_2$ ,  $Q_3$ ,  $Q_4$ . Pentru probele FD cu 5 și 10%  $Dy_2O_3$  s-a determinat un timp de relaxare  $T_2$  mai mic decât cel obținut pentru soluția de NaCl sau pentru proba fără  $Dy_2O_3$ . Pentru proba cu 5%  $Dy_2O_3$ , datorită faptului că dimensiunea particulelor este de ordin nanometric, o cantitate mai mare de probă va rămâne suspendată în soluție, lucru care se reflectă în valoarea mică a timpilor de relaxare, ceea ce conduce la obținerea unui contrast ridicat.

Pentru metoda SD, cea mai mică valoare a timpului de relaxare  $T_2$  s-a obținut pentru proba fără disprosiu, în timp ce pentru probele cu 5 și 10 %  $Dy_2O_3$  valorile au fost mai mari, ceea ce arată că datorită dimensiunii micrometrică a particulelor, acestea nu rămân în suspensie.

Probele au fost imersate în SBF și păstrate timp de 26 zile la temperatura de 37 °C, după care au fost reanalizate semnalele MRI, utilizându-se protocolul de caracterizare relaxometrică. Soluțiile în care au fost imersate probele au un semnal mai scăzut, deoarece compușii pe bază de disprosiu sunt agenți de contrast negativi. Se observă că valoarea cea mai scăzută a semnalului este dată de proba cu 5%  $Dy_2O_3$ .



Intensitatea semnalului MRI, în u.a., măsurată la diferiți timpi de ecou, pentru probele SD imersate în SBF



Intensitatea semnalului MRI, în u.a., măsurată la diferiți timpi de ecou, pentru probele FD imersate în SBF

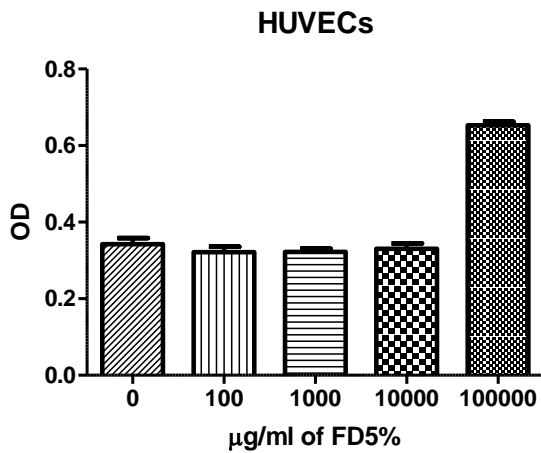
Proba FD cu 5%  $Dy_2O_3$  scade intensitatea semnalului cel mai mult, lucru favorabil deoarece se dorește introducerea în corp a unei concentrații cât mai mici de compuși ce fac parte din clasa pământurilor rare. Rezultatele acestor investigații au condus la nivelul următor de investigare a probei FD cu 5%  $Dy_2O_3$  și anume testele toxicologice pe culture de celule, scopul final fiind investigațiile *in-vivo*.

Testele de biocompatibilitate au fost efectuate la Universitatea de Medicină și Farmacie, Cluj-Napoca, pe celule HUVEC specifice celulelor din cordonul ombilical și pe celule cancerigene specifice cancerului de colon DLD1. Testele au fost repetate de 3 ori pentru o analiză cât mai exactă. Astfel s-a putut observa din setul de teste HUVEC că pentru proba SD fără disprosiu diluțiile cu 100  $\mu\text{g/ml}$  și 10000  $\mu\text{g/ml}$  nu schimbă semnificativ mediul celular, în schimb celelalte două diluții 1000 respectiv 100000  $\mu\text{g/ml}$  sunt nocive. Toate diluțiile probelor

obținute prin metoda SD, cu o concentrație de 5% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, sunt viabile, biocompatibile cu celulele, fără a produce modificări majore asupra acestora, iar pentru probele cu concentrație de 10% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, doar o diluție cu concentrație mare de 100000 μg/ml de probă prezintă toxicitate mare, restul diluțiilor fiind compatibile cu mediul celular.

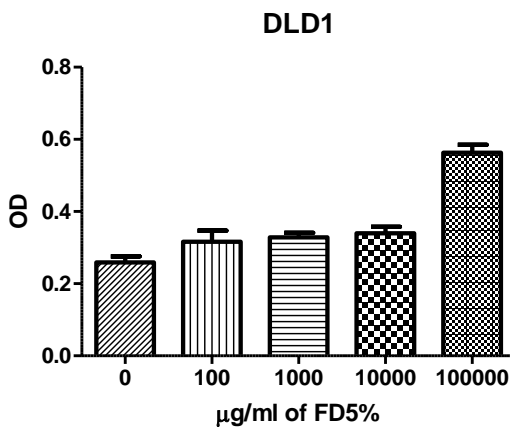
Pentru probele fără disprosiu obținute prin metoda FD, se observă compatibilitate pentru toate diluțiile cu mediul celular, la concentrații de 5% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> doar la diluția de 100000 μg/ml celulele suferă modificări majore, pentru restul diluțiilor biocompatibilitatea fiind bună. Probele FD cu 10% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> modifică mediul celular, nefiind biocompatibile.

Testele pe celulele cancerigene DLD1 specifice cancerului de colon au arătat că în cazul probelor SD fără disprosiu, doar diluția cu 100000 μg/ml distruge celulele, restul diluțiilor neaducând schimbări majore mediului de testare.



0 vs 100000	Yes	***
0 vs 10000	No	ns
0 vs 1000	No	ns
0 vs 100	No	ns

*Testele pe celule HUVEC cu diluții între 100 și 100000 μg/ml de probă FD 5% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*



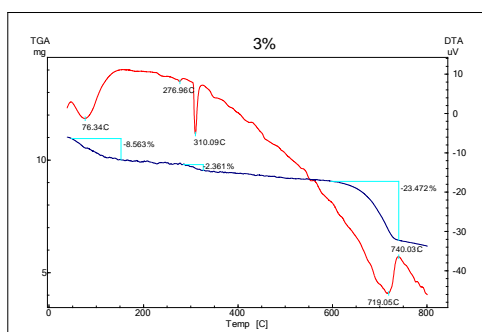
0 vs 100000	Yes	***
0 vs 10000	Yes	**
0 vs 1000	Yes	**
0 vs 100	Yes	*

*Testele pe celule DLD1 cu diluții între 100 și 100000 μg/ml de probă FD 5% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

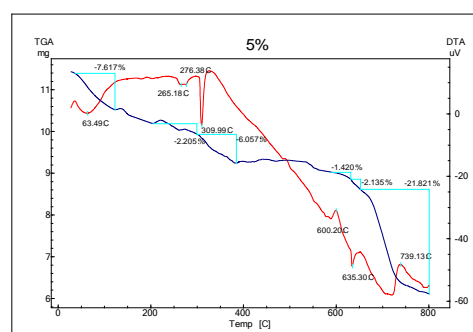
## Rezultate experimentale pentru sistemul cu fier

Sistemul  $(100-x)[0.5\text{SiO}_2 \cdot 0.3\text{Na}_2\text{O}] \cdot x\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $x = 0, 1, 3, 5, 10$  și  $20\%$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) s-a obținut prin metoda sol-gel plecând de la precursorii TEOS (tetraetilortosilicat -  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  pentru  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}(\text{NO}_3)$  și  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  pentru  $\text{Na}_2\text{O}$  și respectiv  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Soluțiile s-au împărțit în două părți, pentru care s-au folosit două metode diferite de extragere a solventului din porii rețelei formate: (i) gelare și apoi uscare la temperatura de  $35^\circ\text{C}$  (SG), (ii) gelare urmată de liofilizare (FD). Probele obținute au fost supuse unor tratamente termice și apoi investigate în vederea identificării modificărilor structurale induse de adăția  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  și  $\text{Na}_2\text{O}$  și de tratamentele termice aplicate.

Din datele DTA, TGA obținute [12] s-a stabilit efectuarea unui tratament termic la temperatura de  $600^\circ\text{C}$  timp de 3 ore.

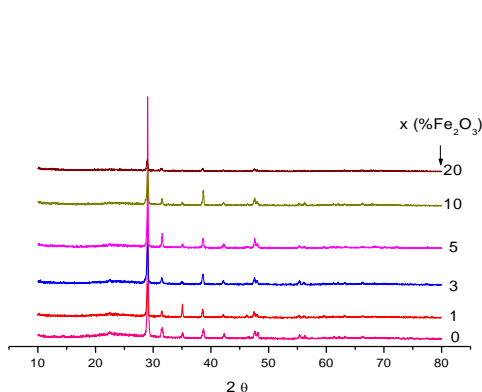


Curbele DTA și TGA  $x=3\%$

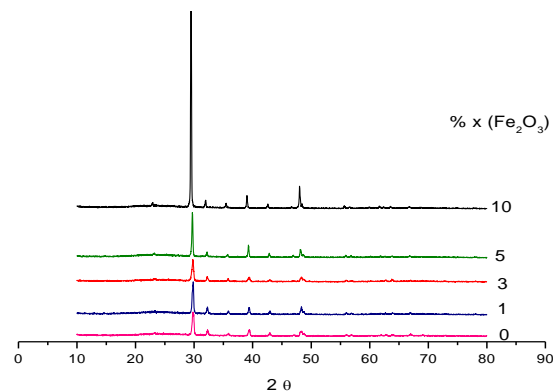


Curbele DTA și TGA  $x=5\%$

În difractogramele de raze X se identifică linii înguste și intense specifice cristalelor de azotați, denotând reziduri nedizolvate din azotații precursori ai  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  și  $\text{Na}_2\text{O}$ .



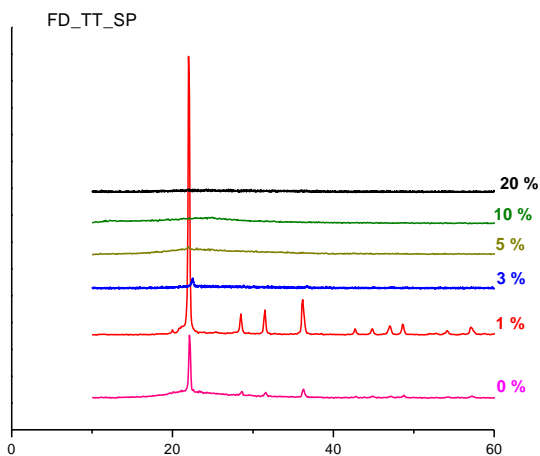
Difractogramele DRX pentru probele cu fier obținute prin metoda FD netratate termic



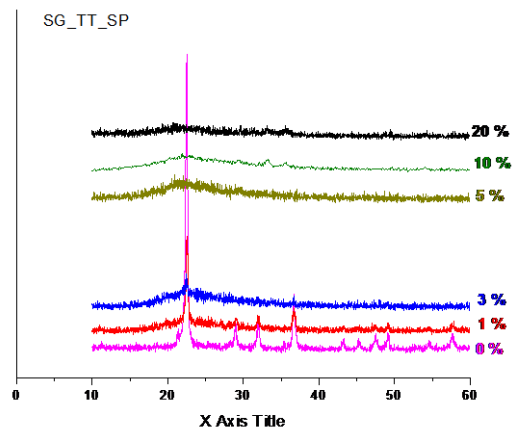
Difractogramele DRX pentru probele cu fier obținute prin metoda SG netratate termic

Pe baza informațiilor obținute din difractogramele de raze X s-a decis spălarea prin agitare a probelor în apă distilată, timp de 1h și 30 min, după care au fost filtrate prin filtre de 100 micrometri. În urma tratării termice și a spălării probelor, analiza prin difracție de raze X arată

că faza cristalină asociată nitraților s-a dizolvat în timpul spălării. Mai mult, pentru probele cu concentrație mare de fier se pune în evidență că după tratament și spălare ele prezintă structură necristalină, în timp ce pentru probele cu concentrație mai mică de fier apare o fază cristalină nouă, evidențiată de liniile înregistrate în intervalul  $20 \leq 2\theta \leq 36^\circ$  specifică oxidului de siliciu sub formă de cristobalit.

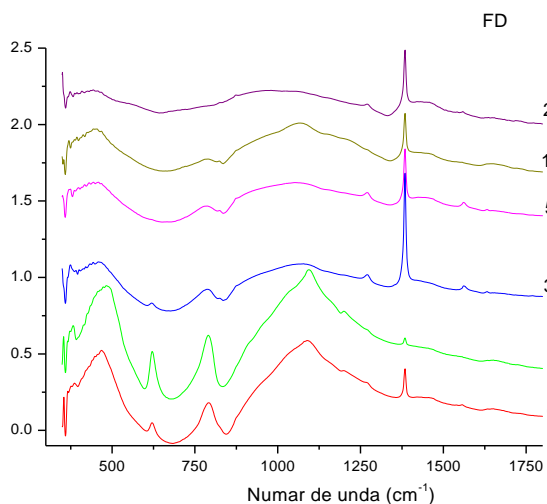


*Difractogramele DRX pentru probele cu fier obtinute prin metoda FD tratate termic*

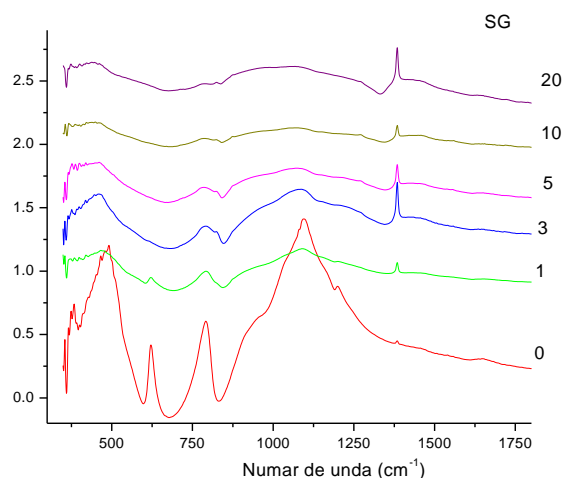


*Difractogramele DRX pentru probele cu fier obtinute prin metoda SG tratate termic*

Aceste diferențe structurale între probele cu până la 3 %  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  și cele cu conținut mai mare de fier sunt observate și prin analiza spectroscopică în infraroșu efectuată pentru probele tratate termic.



*Spectrele FT-IR ale probelor preparate prin metoda FD tratate termic*



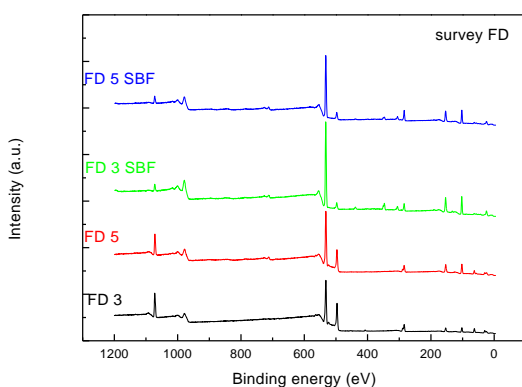
*Spectrele FT-IR ale probelor preparate prin metoda SG tratate termic*

Testarea *in-vitro* a bioactivității probelor s-a făcut după imersarea lor în fluid biologic simulat (simulated body fluid - SBF) pentru o perioadă de 14 zile pentru a observa comportamentul acestora într-un mediu apropiat celui *in-vivo*.

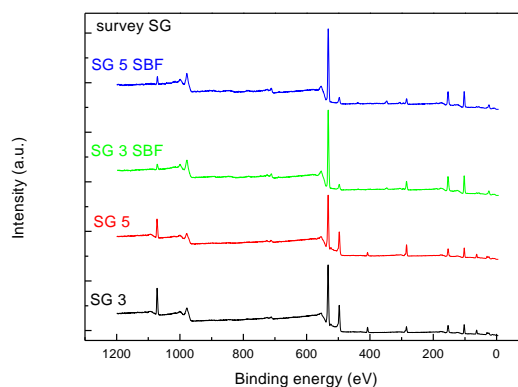
Concentrațiile atomice la suprafața probelor au fost extrase din spectrele XPS. Probele au fost analizate atât înainte cât și după 14 zile de incubare în SBF la 37 °C, în condiții statice. Compoziția chimică pe stratul exterior, determinată prin XPS, și cea determinată de EDXS într-un strat mai profund, a fost investigată atât înainte, cât și după 14 zile de imersie în SBF, pentru probele cu 3 și 5 % biocompatibile cu mediul celular.

*Compoziția elementară (% at) determinată prin analiza XPS înainte și după imersie în SBF*

Elements → Probe ↓		C	O	Si	Na	Fe	N	Ca	P
x=3	Înainte de imersie	19.8	48.1	19.2	10.9	0.6	1.4	-	-
	După imersie	11.0	50.5	30.0	2.6	0.4	1.3	2.9	1.3
x=5	Înainte de imersie	19.6	46.5	23.0	9.2	0.8	0.9	-	-
	După imersie	19.1	46.8	28.2	2.6	0.5	0.7	1.6	0.5



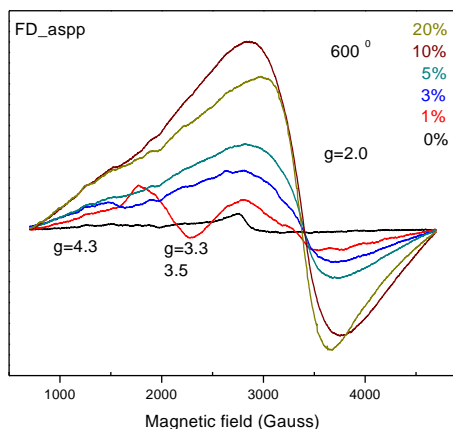
*Spectrele XPS survey pentru probele FD*



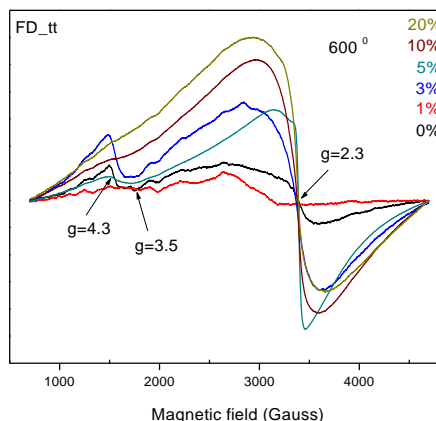
*Spectrele XPS survey pentru probele SG*

Studiile efectuate la temperatură camerei prin rezonanță electronică de spin (RES) pune în evidență linii de rezonanță centrate în jurul valorilor  $g \approx 4.3$  și  $g \approx 2.0$  specifice ionilor  $Fe^{3+}$  din sisteme necristaline. Ponderea lor depinde de conținutul de  $Fe_2O_3$  din probe și de tratamentul termic aplicat.





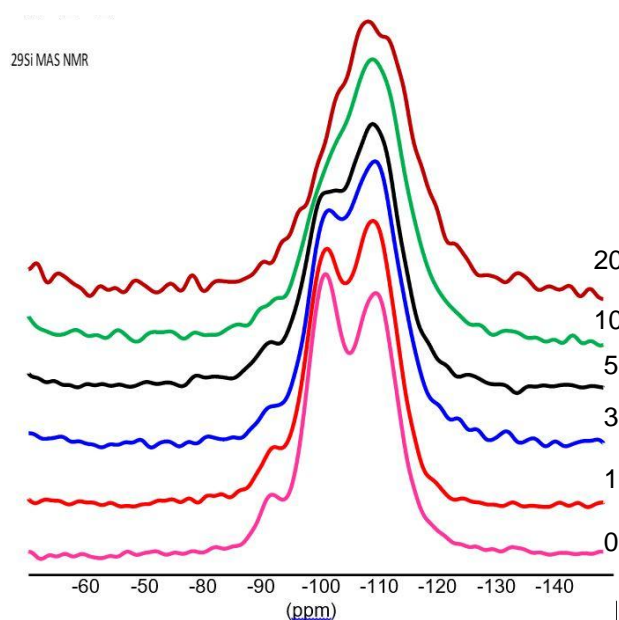
Spectrele  $Fe^{3+}$  EPR pentru probele FD netratate



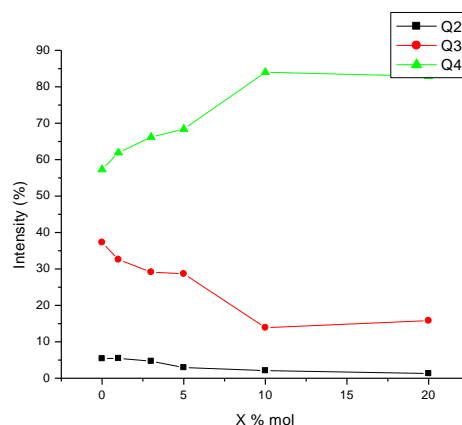
Spectrele  $Fe^{3+}$  EPR pentru probele FD tratate termic

Linia de la  $g \approx 4.3$  se datorează ionilor izolați de  $Fe^{3+}$ , situați în poziții de simetrie scăzută, caracterizate prin câmp cristalin intens. Linia de la  $g \approx 2.0$  este atribuită ionilor  $Fe^{3+}$  dispuși în poziții cu simetrie octaedrică, caracterizate prin câmp cristalin slab, precum și ionilor  $Fe^{3+}$  implicați în interacțiuni dipolare puternice și/sau în interacțiuni de superschimb.

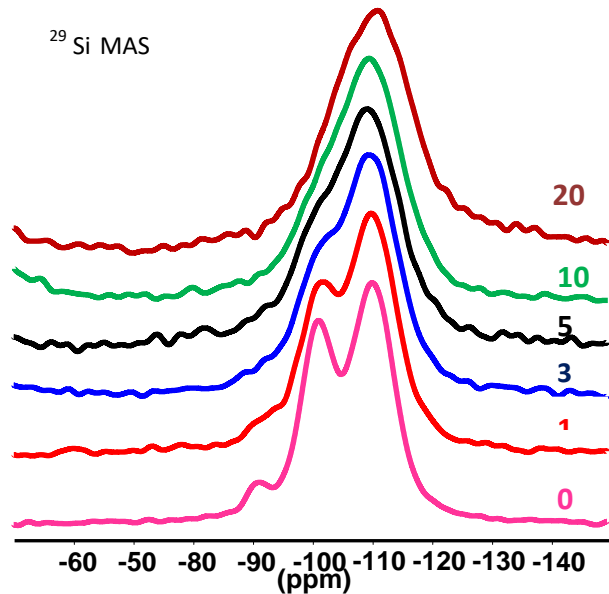
Spectrele  $^{29}Si$  MAS NMR pentru probele netratate termic arată o polymerizare a rețelei silicate (deplasare a centrului de greutate a spectrului  $^{29}Si$  MAS NMR spre valori ale deplasării chimice mai mari) cât și un efect de dezordine la mică și medie distanță, odată cu introducerea fierului în rețea și prin scăderea ponderii unităților  $Q_2$  și  $Q_3$  în favoarea creșterii ponderii unităților  $Q_4$ . În astfel de cazuri deconvoluția spectrelor  $^{29}Si$  MAS NMR nu este unică.



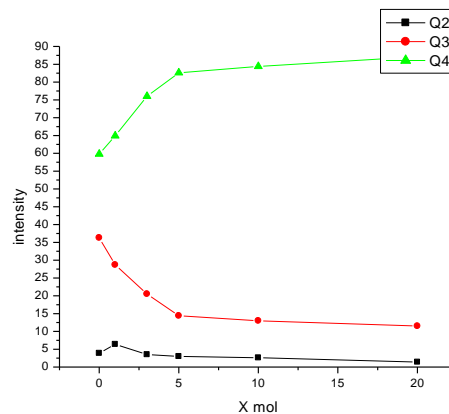
Spectrele  $^{29}Si$  MAS NMR ale probelor FD netratate termic



Ponderea unităților  $Q^n$  în probele FD netratate termic

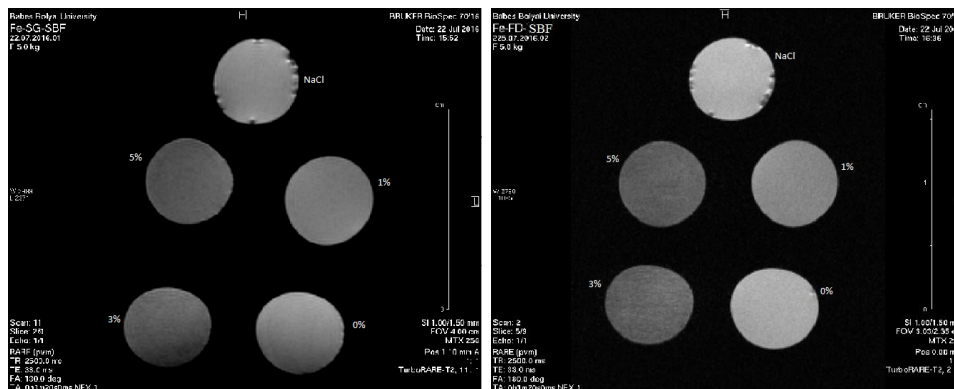


Spectrele  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR ale probelor SG netratate termic



Ponderea unităților  $Q^n$  în probele SG netratate termic

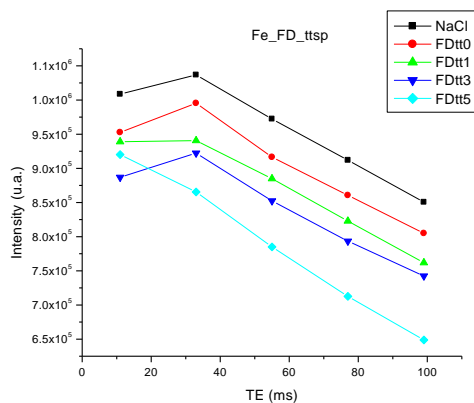
După cum se observă din imaginile MRI *in vitro*, probele cu fier prezintă un comportament de agent de contrast prin  $T_2$ , confirmat și de calculele date de protocolul MRI de relaxometrie. Pentru verificarea cantitativă s-a efectuat analiza de relaxometrie cu protocolul de tip RARE- $T_1+T_2$ -map, ce permite evaluarea timpilor de relaxare  $T_1$  și  $T_2$ .



Imagini achiziționate cu protocolul TurboRARE- $T_2$  pe probele SG (a) și FD (b) după imersare în SBF

Curbele de relaxometrie sunt obținute din imaginile achiziționate cu protocolul dedicat relaxării transversale, Turbo Rare  $T_2$ . După cum se observă în imaginile de mai sus contrastul

crește odată cu creșterea adărierii de fier, și în ambele cazuri concentrația 5% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oferă cel mai bun contrast.

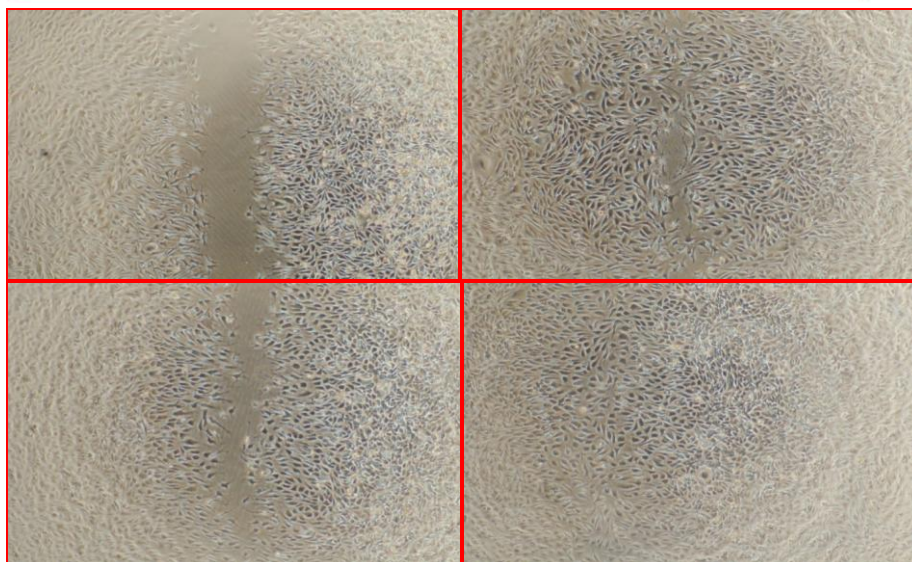
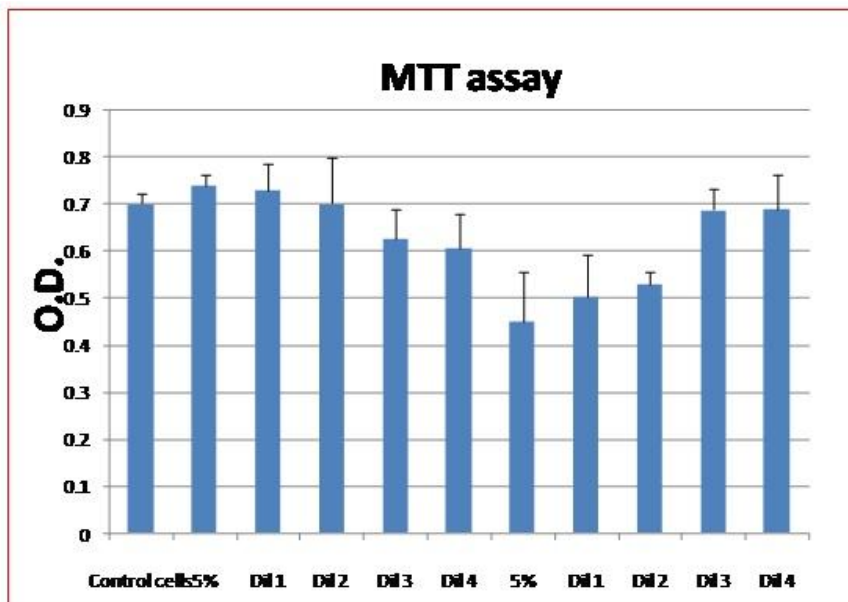


Intensitatea semnalului MRI măsurată la diferiți timpi de ecou pentru probele FD

La fel ca în cazul probelor FD, și pentru probele SG s-a confirmat că odată cu creșterea concentrației ionilor paramagnetici probele se comportă ca agent de contrast negativ, adică scade timpul de relaxare T<sub>2</sub> al întregului sistem în care a fost diluat.

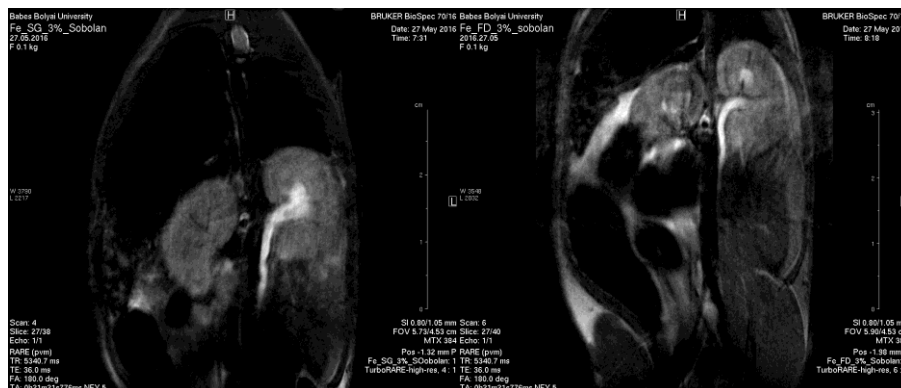
Studiile au fost completate cu teste de verificare a unui posibil efect citotoxic indus de acești compuși, prin monitorizare de celulele control și celule tratate cu diferite concentrații de probe preparate prin SG și FD, cu ajutorul microscopului optic cu contrast de fază. Acest lucru a permis identificarea imediată a morfologiei celulelor și compararea celulelor control cu celulele tratate cu diferite concentrații de substanță. Atât tehnica MTT, test de proliferare în timp real care folosește MTT- bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazoliu, cât și tehnica „wound healing” au condus la următoarele concluzii:

- o concentrație mai mare de 5 % fie probele SG, fie la cele FD afectează viabilitatea și proliferarea celulară, mai mult decât atât aceste concentrații de substanță conduc la moartea celulară.
- dintre toate concentrațiile testate, concentrația de 1%, 3%, 5% și diluțiile aferente au permis obținerea unor date relevante și cu aplicabilitate atât *in vitro* cât și *in vivo*.
- concentrația optimă de 5 % nu a avut efect toxic asupra liniilor celulare alese pentru acest studiu, nu le-a fost afectată morfologia, proliferarea, capacitatea de migrare și refacere a zonei lezate și adeziunea celulară. În urma testelor de biocompatibilitate, care au arătat că probele cu concentrația mai mare, 10% și 20% fier au distrus celulele în totalitate, s-a decis scoaterea acestora din studiile efectuate ulterior, rămânând în studiu doar probele care au trecut testul de biocompatibilitate.



*Testul de citotoxicitate, prin tehnica MTT (sus) și tehnica „wound healing” (jos)*

În urma examinării rezultatelor de biocompatibilitate și a celor de relaxometrie s-a trecut la testarea acestora *in vivo* ca agenți de contrast pentru MRI, alegându-se pentru injectarea în șobolan a probelor cu concentrații de 3% și 5% obținute prin cele două metode, imersate în SBF. Modelul experimental a fost realizat în concordanță cu ghidul privind cazarea și îngrijirea animalelor formulate de Convenția Europeană pentru protecția animalelor vertebrate folosite în scopuri experimentale și în alte scopuri științifice.



*Investigație morfologică MRI pentru evaluarea caracteristicilor de contrast a compușilor cu 3% fier în soluție de NaCl (probă SG – stânga, probă FD – dreapta).*



*Investigație morfologică MRI pentru evaluarea caracteristicilor de contrast a compușilor cu 5% fier în soluție de NaCl (probă SG – stânga, probă FD – dreapta)*



*Imagini pe șobolan martor*

Imaginile au fost înregistrate pentru șobolani injectați cu soluție diluată cu 3% și 5% probă cu fier obținută prin cele două metode de sinteză, în comparație cu o imagine care reprezintă un șobolan martor. Se observă contrastul bun obținut pentru șobolani injectați și că substanța de contrast obținută este dusă prin intermediul sângelui în tot țesutul. Achizițiile MRI au fost efectuate cu protocolul TurboRARE-high-res, dedicat imagisticii pentru timpul de relaxare  $T_2$  și cu protocolul TurboRARE- $T_2$ .

Testele finale de histopatologie au arătat o toxicitate ușoară hepatică, dar nu s-a observat depunerea fierului în hepatocite. Examinarea fragmentelor renale nu a evidențiat modificări histopatologice notabile.

## Concluzii

### pentru sistemul dopat cu Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

S-au obținut microparticule de compoziție  $(100-x)\text{SiO}_2 \cdot x\text{Dy}_2\text{O}_3$  ( $0 \leq x \leq 10$  % mol) cu dimensiuni de 1-4 μm prin trei metode de sinteză sol-gel (SG), liofilizare (FD) și uscare prin pulverizare (SD), tratate apoi termic la 600 °C, pe baza rezultatelor analizei DTA/TGA.

Rezultatele <sup>29</sup>Si MAS-NMR pentru probele obținute prin metoda FD arată o interconectare mai mare a unităților structurale față de cele obținute prin metoda SD și o polimerizare a rețelei silicate odată cu adăugarea oxidului de disprosiu.

Analiza suprafeței microparticulelor efectuată prin XPS arată că disprosiul apare pe stratul exterior al probelor cu 5 % mol Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> în concentrație apropiată de valoarea teoretică, dar pentru proba cu 10 % mol Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se evidențiază o aglomerare parțială a disprosiului la suprafață. Raportul mai mare la suprafață între NBO/BO pe eșantioanele cu 5%, decât pe cele cu 10% Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sprijină ipoteza de aglomerare parțială a disprosiului în proba cu 10 % mol Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> care rupe rețeaua silicatică.

Proprietățile de agent de contrast în MRI testate cu protocoalele RARE –T1 și Rare –T2 indică faptul că probele cu disprosiu au caracteristici de agent de contrast negativ. Curbele de relaxometrie arată că cel mai bun contrast este dat de probele cu o concentrație de 5% mol de Dy<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obținute prin metoda FD, care, după cum arată și testele *in vitro*, oferă un număr sporit de ioni de disprosiu la suprafața microparticulelor, datorită raportului mare suprafață/volum și depolimerizării avansate în matricea gazdă de silică.

Din punct de vedere al biocompatibilității efectuate pe celule de tip HUVEC, celule specifice cordonului ombilical, probele care prezintă biocompatibilitate, obținute prin cele trei metode de preparare, pot fi folosite pentru teste *in vivo*. Cu atât mai mult, testele facute pe celulele cancerigene DLD1, de tip cancer de colon, ne arată că aceleași probe și diluțiile lor, care sunt biocompatibile cu celule HUVEC, distrug în mare parte celulele cancerigene de tip DLD1.

### pentru sistemul cu Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

S-au obținut particulele de compoziție  $(100-x)[0.5\text{SiO}_2 \cdot 0.3\text{Na}_2\text{O}] \cdot x\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $0 \leq x \leq 20$  % mol) prin metoda clasică sol-gel și prin liofilizare, ulterior tratate termic la 600 °C, de dimensiuni micrometrice. Acest sistem poate fi considerat și pentru aplicații în tratamentele prin hipertermie.

Prin metoda de analiza <sup>29</sup>Si MAS-NMR s-a pus în evidență că doparea cu oxid de fier a matricei silicatică și tratamentul termic are ca efect o ușoară depolimerizare a rețelei pentru probele tratate termic.

Liniile de rezonanță electronică de spin centrate în jurul valorilor  $g \approx 4.3$  și  $g \approx 2.0$  sunt influențate de creșterea concentrației de fier și de tratamentul termic, reflectând faptul că în regiunile bogate în fier distribuția ionilor Fe<sup>3+</sup> este neomogenă.

Probele analizate prin microscopie electronică prezintă morfologii diferite în funcție de metoda de preparare respectiv uscare. Probele obținute prin cele două metode au granulație mică și o structură poroasă, cu dimensiuni ale porilor între 30-65 nm pentru probele imersate în SBF.

Diminuarea conținutului de fier pe suprafața probelor după imersia în SBF, evidențiată prin analiza XPS, se datorează atașări pe suprafața probelor a calciului și fosforului care migrează din SBF.

Datele de relaxometrie arată că probele 1, 3 și 5 % Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> au timp de relaxare T<sub>2</sub> mai mic decât cel obținut pentru soluția de NaCl sau pentru proba fără fier. Imaginile MRI pentru teste *in vitro* pun în evidență un contrast mai bun pentru probele cu 5 % Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Testele de biocompatibilitate arată că probele cu 1, 3 și 5 % Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nu determină modificări majore asupra celulelor, fiind astfel recomandate pentru teste *in vivo* pe model animal.

Testele *in vivo* au arătat proprietăți de agent de contrast negativ pentru probele cu concentrații mici de fier.

### Bibliografie selectivă

- [1] M. Mocan, **L. Chiriac**, O. Banc, R. Moldovan, F. Turcu, and S. Simon, Magnetic resonance imaging based assessment of aortic valve area: A methodology proposal and an experimental case study, *Hum. Vet. Med.* 2015, 7 (4) 327–333.
- [2] A. Staicu, R. Popa-Stanila, **L. Chiriac**, D. Gheban, G. Caracostea, F. Turcu, S. Simon, F. Stamatian, Rare renal anomalies described in second trimester fetuses using post mortem MRI case series, *Obstr. Ginecol.* 2015, 63 (3).
- [3] A. Staicu, R. Popa-Stanila, D. Gheban, **L. Chiriac**, F.R.V. Turcu, G. Caracostea, F. Stamatian, Imagistic and histopathological description of a cystic nephroma during early second trimester of gestation, *Med. Ultrason.* 2017, 19 (3) 327-329.
- [4] E. Horvath, A. Hutanu, **L. Chiriac**, M. Dobreanu, A. Oradan, E.-E. Nagy, Ischemic damage and early inflammatory infiltration are different in the core and penumbra lesions of rat brain after transient focal cerebral ischemia, *J. Neuroimmunol.* 2018, 324, 35-42.
- [5] A. Hutanu, E. Horvath, A. Oradan, S. Voidazan, **Chiriac**, D.L. Muntean, M. Dobreanu, Fish-oil preconditioning modulates plasma MCP-1 and TIMP-1 levels after experimental induced transient cerebral ischemia, *Farmacologia* 2018, 66 (4) 602-608.
- [6] P. Prabhu, V. Patravale, The upcoming field of theranostic nanomedicine: An overview, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 6, pp. 859–882, 2012.
- [7] E. Terreno, F. Uggeri, S. Aime, Image guided therapy: The advent of theranostic agents, *J. Control. Release*, 2012, 161 (2) 328–337.
- [8] M.A. Busquets, J. Estelrich, M.J. Sanchez-Martin, Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 140 (10) 1727-1741.
- [9] R.A. Assink, B.D. Kay, Sol-gel kinetics III. Test of the statistical reaction model, *J. Non-Cryst. Solids* 1988, 107 (1), 35-40.
- [10] L.L. Hench, J. K. West, The Sol-Gel Process, *Chem. Rev.* 1990, 90 (1) 33–72.
- [11] **L.B. Chiriac**, D.L. Trandafir, R.V.F. Turcu, M. Todea, S. Simon, Synthesis, structural characterization and *in vitro* testing of dysprosium containing particles as potential MRI contrast enhancing agents, *Appl. Surf. Sci.* 2016, 385, 569-577.
- [12] **L.B. Chiriac**, M. Todea, A. Vulpoi, M. Muresan-Pop, R.V.F. Turcu, S. Simon, Freeze-drying assisted sol-gel-derived silica-based particles embedding iron: synthesis and characterization, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2018, 87 (1) 195-203.