

Universitatea Babeș-Bolyai  
Facultatea de Fizică

Rezumatul tezei doctorale

**Nanoparticule plasmonice marcate cu  
anticorpi cu potențial teranostic împotriva  
Leucemiei Limfoblastice Acute**

de  
Andra-Sorina Tătar

Conducător Științific  
Prof. Dr. Simion Aștilean

CLUJ-NAPOCA  
2019

## CUPRINS

CUPRINS .....	2
CUVANT ÎNAINTE.....	2
<b>1. ABORDĂRI TERAPEUTICE ÎMPOTRIVA LEUCEMIEI LIMFOBLASTICE ACUTE: DE LA METODE CONVENȚIONALE LA NANOMEDICINĂ .....</b>	<b>5</b>
1.1 BAZELE LEUCEMIEI LIMFOBLASTICE ACUTE (ALL).....	5
1.2 ABORDAREA IMUNOLOGICĂ.....	5
1.3 NANOMEDICINĂ PENTRU DETECȚIA ȘI TRATAMENTUL ALL.....	6
1.3.1 Strategii bazate pe nanoparticule pentru îmbunătățirea aplicațiilor biomedicale.....	6
1.3.2 Nanoparticule organice pentru detecția și tratamentul ALL.....	7
1.3.3 Nanoparticule anorganice pentru detecția și tratamentul ALL.....	8
1.4 SIGURANȚA ȘI PROVOCĂRILE PRIVIND TRANSLATAREA NANOMEDICINEI ÎN CLINICĂ .....	8
<b>2. NANOPARTICULE PLASMONICE: SINTEZĂ, BIOFUNCȚIONALIZARE, CARACTERIZARE .....</b>	<b>9</b>
2.1 NANOPARTICULE DE FORMĂ “NANO-STELE” .....	9
2.2 NANOPARTICULE DE FORMĂ “NANO-ARICI” (GNU) .....	10
2.3 NANOPARTICULE DE FORMĂ “NANOSFERE GOALE” (HNS) .....	11
<b>3. IMAGISTICĂ MICROSCOPICĂ INTRACELULARĂ A NANOPARTICULELOR .....</b>	<b>13</b>
3.1 LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A NANO-ARICILOR .....	13
3.1.1 Microscopie în câmp întunecat.....	13
3.1.2 Microscopie Raman confocală .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
3.1.3 Imagistică de Timpi de Viață de Fluorescență .....	15
3.2 LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A NANOSFERELOR GOALE.....	15
3.2.1 Microscopie în câmp întunecat.....	15
3.2.2 Microscopie Raman confocală .....	16
3.2.3 Imagistică de Timpi de Viață de Fluorescență .....	18
<b>4. VALIDAREA PRIN TEM A SPECIFICITĂȚII INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MARCATE CU ANTICORPI CU CELULELE ȚINTĂ .....</b>	<b>18</b>
4.1 SPECIFICITATEA DE INTERACȚIUNE A “NANO-ARICILOR” .....	18
4.2 SPECIFICITATEA DE INTERACȚIUNE A “NANOSFERELOR GOALE” .....	21
<b>5. EFECTUL TERAPEUTIC AL NANO-ARICILOR MARCAȚI CU ANTICORPI .....</b>	<b>21</b>
5.1 CITOTOXICITATEA PARTICULELOR, DETERMINATĂ PRIN NUMĂRAREA CELULELOR.....	21
5.2 ANALIZA CICLULUI CELULAR PRIN CITOMETRIE DE FLUX.....	22
5.3 ACTIVITATEA METABOLICĂ ȘI EVALUAREA STRESULUI OXIDATIV CU TESTUL MTS .....	23
<b>6. CONCLUZII.....</b>	<b>24</b>
<b>REFERINȚE.....</b>	<b>26</b>
<b>DISEMINAREA REZULTATELOR.....</b>	<b>27</b>

**Cuvinte Cheie:** nanoparticule plasmonice, biofuncționalizare, interacțiuni specifice, imagistică multimodală, agent teranostic, leucemie limfoblastică acută

Dezvoltarea Nanomedicinei ca nou domeniu de cercetare axat pe soluționarea unor provocări medicale a fost posibilă datorită recente dezvoltării în Nanotehnologie. Așadar, prin combinarea metodelor convenționale cu nanomateriale, se pot oferi soluții superioare. Această teză urmărește dezvoltarea unor tipuri de nanoparticule capabile să urmărească, să vizualizeze, și în același timp să reducă viabilitatea celulelor de Leucemie Limfoblastică Acută (ALL), concomitant având biocompatibilitate față de celulele sănătoase. Mai precis, prin utilizarea mai multor tehnici de imagistică rapide și non-invazive precum Împrăștiere Raman Amplificată de Suprafață (SERS), microscopie în câmp întunecat, și Imagistica de Timpi de viață de Fluorescență (FLIM), nanoparticulele teranostice dezvoltate sunt urmărite la nivel intracelular ca agenți de detecție și de imagistică. În plus, li se demonstrează efectul citotoxic asupra celulelor maligne prin experimente de Numărare Celulară, efect investigat apoi și prin Analiza ciclului celular prin Citometrie de Flux și testul MTS.

Teza este structurată în 7 capitole. **Capitolul 1** reprezintă o punere în revistă a abordărilor terapeutice împotriva ALL, de la metodele convenționale până la nanomedicină. Conține o descriere aprofundată a bazelor genetice ale ALL, urmată de schițarea protocolului de tratament convențional aplicat în centrele medicale. Prezentarea caracteristicilor imunologice ale celulelor leucemice transferă cititorul spre secțiunea axată pe aplicații ale nanomedicinei în ALL. După explicarea principiilor și prezentarea avantajelor aduse de conceptele nano-medicale, se continuă descrierea experimentelor identificate în literatura de specialitate împotriva ALL. Acestea sunt clasificate în funcție de compoziția chimică în nanoparticule organice și anorganice. La final, se discută siguranța translatării în clinică a nanomedicinei.

Următoarele capitole conțin rezultatele experimentale obținute, fiecare având o scurtă Introducere în subiect, Materiale și Metode, și Rezultate și Discuții. **Capitolul 2** urmărește etapele de sinteză ce conduc la obținerea nanoparticulelor utilizate aici. Se discută controlarea dimensiunii și formei lor, ceea ce dă un răspuns plasmonic în domeniul infraroșu apropiat (NIR), cel mai potrivit pentru aplicații biomedicale, întrucât acolo țesuturile biologice au absorbție minimă. Particulele sunt marcate cu reporteri Raman care vor fi folosiți pentru vizualizarea lor intracelulară prin SERS, și au molecule polimerice grefate pe suprafața lor pentru a le crește stabilitatea și bio-compatibilitatea. Ultima etapă de biofuncționalizare este atașarea anticorpului care conferă sistemului specificitate de interacțiune cu celulele ALL țintite. În cadrul rezultatelor prezentate aici, au fost dezvoltate două clase de nanoparticule: (i) cele asemenea stelelor (din

care am obținut nanostele și nano-arici), dintre care nano-aricii au fost selectați pentru experimente ulterioare, și (ii) nanosfere goale, utilizate pentru aplicațiile de imagistică.

**Capitolul 3** explorează potențialul nano-aricilor și nanosferelor goale pentru imagistică prin mai multe tehnici spectroscopice rapide, neinvazive și nedistructive. Așadar, microscopia în câmp întunecat oferă imagini ale nanoparticulelor internalizate în celulele de ALL, pe baza proprietății lor de împrăștiere a luminii. De asemenea, microscopia Raman confocală permite urmărirea intracelulară a particulelor pe baza semnăturii moleculare a reporterului Raman atașat, a cărui semnal este puternic amplificat prin efectul SERS. În plus, FLIM este o altă tehnică ce poate discerne nanoparticulele de mediul celular pe baza diferenței de timpi de viață de fluorescență dintre acestea. Așadar, capacitatea acestor nanoparticule pentru imagistică multimodală împreună cu specificitatea interacțiunii lor cu ținta le conferă potențialul pentru utilizare ca instrumente de țintire și diagnostic, care ar permite o detecție mai precoce a bolii, crescând șansele de supraviețuire ale pacienților.

**Capitolul 4** oferă o validare a interacțiunii nano-aricilor și nanosferelor goale marcate cu anticorpi cu celulele țintă, bazată pe înalta rezoluție a Microscopiei Electronice de Transmisie (TEM). Folosind mai multe probe control precum nanoparticule ne-țintite, celule fără ținta specifică, și teste de competitivitate, se demonstrează specificitatea nanoparticulelor marcate cu anticorpi pentru celulele de ALL care exprimă antigenul pe suprafața lor.

**Capitolul 5** se concentrează pe efectul citotoxic al nano-aricilor marcați cu anticorpi și le demonstrează potențialul terapeutic. Au fost testate probe control precum nano-arici ne-țintiți și molecule de anticorp libere, iar rezultatele indică un efect amplificat al nanosistemului atunci când componentele sunt conjugate între ele. Analiza ciclului celular prin Citometrie de Flux și testul MTS au fost efectuate pentru a conferi mai multă claritate privind mecanismele de acțiune ale nano-aricilor marcați cu anticorpi împotriva celulelor de ALL, și au evidențiat că inducerea unui nivel înalt de stres oxidativ ar putea fi calea prin care se inițializează fenomenul de apoptoză târzie/post-mitotică.

Așadar, munca prezentată în această teză demonstrează potențialul nanoparticulelor de metale nobile marcate cu anticorpi de a funcționa ca agenți teranostici în lupta împotriva Leucemiei Limfoblastice Acute, și deci, în **Capitolul 6**, voi relua concluziile principale ale tezei.

## **1. Abordări terapeutice împotriva Leucemiei Limfoblastice Acute: de la metode convenționale la nanomedicină**

### **1.1 Bazele Leucemiei Limfoblastice Acute (ALL)**

Leucemia Limfoblastică Acută (ALL) este un tip de cancer de sânge caracterizat de proliferarea necontrolată a celulelor limfoide ce duce la suprapopularea sângelui cu limfoblaste, în detrimentul celulelor sanguine normale. Cu toate că rata de supraviețuire în cazurile pediatrice de ALL s-a îmbunătățit semnificativ în ultimele decenii (de la 57% la 92% <sup>1</sup>), prin perfecționarea stratificării riscului și a preciziei diagnosticului pentru chimioterapie personalizată <sup>2,3</sup>, remisia în cazurile de ALL la adulți atinge doar 30-40%, probabil sub influența altor efecte precum comorbidități specifice adulților și circumstanțe favorabile asociate tinereții.

Clasificarea ALL este bazată pe multiple caracteristici celulare și subcelulare precum morfologie celulară, detalii genetice sau citogenetice, și imunofenotip. Alterările cromosomale grosiere ne-randomice sunt prezente în majoritatea cazurilor de ALL mai ales sub formă de aneuploidii și translocații între fragmente de cromosomi, și sunt combinate cu modificări genetice submicroscopice (inserții-deleții și mutații punctiforme) în oncogene. Distribuția subtipurilor de ALL și a mutațiilor specifice acestora variază între formele pediatrice și adulte (Figura 1.1), ceea ce duce și la diferitele șanse de remisie pentru aceste grupe de vârstă.

De-a lungul anilor, îmbunătățirile din punctul de vedere al terapiei ALL și al ratei de supraviețuire s-au obținut prin intensificarea tratamentelor convenționale sau administrarea unui mix de astfel de medicamente <sup>4</sup>. Însă cercetările recente se focusează pe dezvoltarea unor soluții noi la nivel molecular, și a nanobiotehnologiilor prin utilizarea de nanomateriale și dispozitive de scală nanometrică <sup>5,6</sup>.

### **1.2 Abordarea imunologică**

Tratamentele bazate pe anticorpi monoclonali reprezintă o nouă opțiune terapeutică pentru ALL, întrucât celulele leucemice supraexprimă aproape întotdeauna anumiți antigeni de suprafață care pot fi țintiți cu astfel de anticorpi. Un antigen țintă ideal este supraexprimat pe suprafața celulelor canceroase dar nu apare pe celulele sănătoase, sporind selectivitatea tratamentului și reducând toxicitatea în afara țintei. Câteva proteine de suprafață cu potențial

pentru țintirea ALL al celulelor de tip T sunt CD3 și CD7, iar ALL de tip B este țintit mai ales la nivelul proteinelor CD19, CD20 și CD22. Principalul avantaj al tratamentelor imunologice este localizarea substanței citotoxice la țintă, permițând o reducere a dozei necesare și deci a efectelor secundare nedorite. Chiar și așa, ca urmare a hiperexcitării sistemului imunitar pot apărea simptome negative precum febră, dureri de cap, greață.

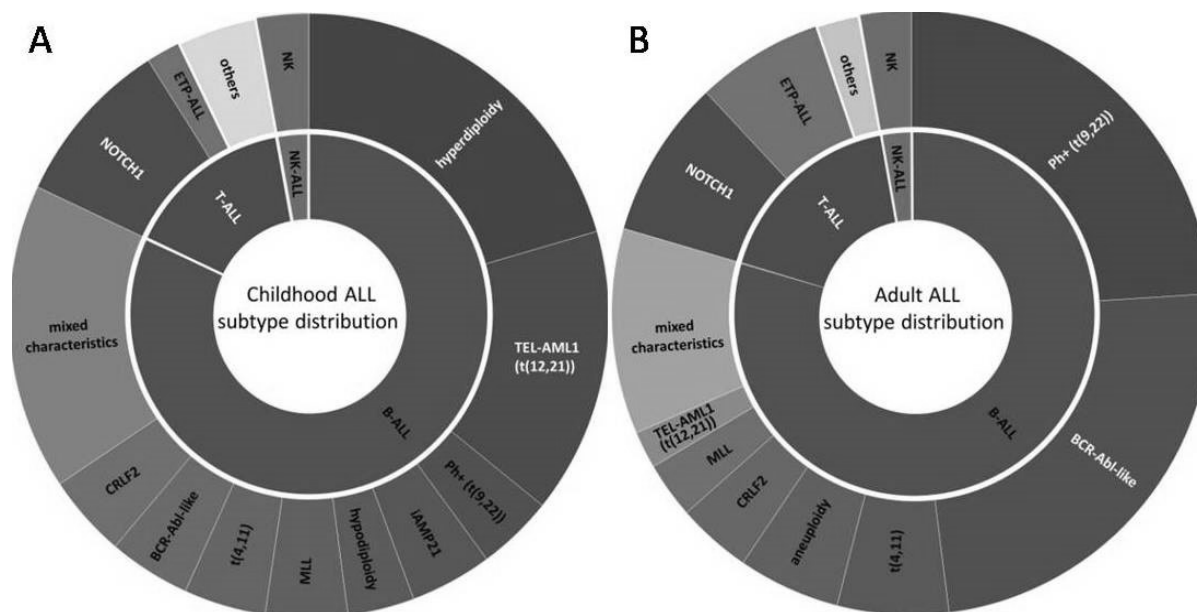


Figura 1.1 Distribuția relativă a subtipurilor de ALL la cazuri (A) pediatrice și (B) adulte

### 1.3 Nanomedicină pentru detecția și tratamentul ALL

#### 1.3.1 Strategii bazate pe nanoparticule pentru îmbunătățirea aplicațiilor biomedicale

Nanomedicina cuprinde mai multe arii aplicative ce folosesc materiale de dimensiuni nanometrice (care coincid întocmai cu dimensiunile din structurile biologice) cum ar fi imagistică *in vivo*, diagnostic *in vitro*, livrarea de compuși activi, și țintirea specifică, dar se extinde și înspre utilizarea biomaterialelor ca implanturi active <sup>7</sup>. Nanomaterialele organice, în forma multor variante de polimeri și lipide, oferă avantaje prin faptul că mimează structurile naturale biologice, iar această biocompatibilitate le permite un timp de circulație prelungit, printre altele. Fiind structuri flexibile, ele pot trece de diferite bariere, joncțiuni, sau membrane celulare. În schimb, nanoparticulele anorganice, precum cele magnetice sau din metale nobile posedă proprietăți fizice deosebite ce pot fi manipulate prin controlarea atentă a compoziției,

dimensiunii și formei nanoparticulelor. Prin combinarea proprietăților optice ale nanoparticulelor anorganice cu diferite tehnici de imagistică apar noi posibilități de imagistică, dar și aspectul terapeutic poate fi îmbunătățit, prin hipertermie sau strategii de eliberare controlată a unor medicamente. Nanoparticulele hibride oferă posibilitatea de detecție a cancerului simultan cu terapia acestuia (teranostică), sau de combinare a două sau mai multe strategii terapeutice diferite (livrare de medicamente, livrare de gene, hipertermie, terapie fotodinamică, livrare secvențială de medicamente etc.), ceea ce poate îmbunătăți considerabil eficacitatea tratamentului <sup>8</sup>.

Față de tratamentele clasice, prin utilizarea de agenți nanostructurați este posibilă o îmbunătățire a gradului de țintire a cancerului, pe baza efectului *de permeabilitate și retenție crescute* (EPR). Acesta duce la o acumulare *pasivă* a nanoparticulelor în zona afectată de cancer, datorită drenajului limfatic local slab și a endoteliului fenestrat din neo-vascularizația tumorală. O formă îmbunătățită a țintirii nanoparticulelor este cea *activă*, bazată pe conjugarea unor liganzi moleculari la suprafața particulelor, ce au rolul de a recunoaște anumiți bio-markeri supraexpriați pe celulele canceroase. Aceste elemente de recunoaștere pot fi anticorpi sau fragmente ale acestora, alte proteine, peptide, ori aptameri <sup>9</sup>. Încă un posibil mod de țintire a nanoparticulelor este cel bazat pe caracteristicile lor fizice, cum ar fi ghidarea nanoparticulelor magnetice spre țintă prin utilizarea unor câmpuri magnetice.

O mare parte a formulărilor de nanoparticule conțin o încărcătură care trebuie eliberată la nivelul cancerului pentru a își îndeplini rolul terapeutic sau de agent imagistic. Această eliberare controlată poate fi declanșată pe baza unor condiții specifice micromediului tumoral, cum ar fi o ușoară creștere a temperaturii locale datorită metabolismului hiper-activ, ori variații de pH sau activitate enzimatică. O eliberare controlată declanșată în mod activ poate fi manipulată cu stimuli externi, precum ultrasunete sau câmpuri magnetice și electrice care pot avea efect hipertermic dacă sunt combinate cu nanoparticule magnetice sau de metale nobile.

### *1.3.2 Nanoparticule organice pentru detecția și tratamentul ALL*

Nanoparticulele organice precum liposomii sau nanoparticulele polimerice se aseamănă din punct de vedere chimic cu structurile biologice, ceea ce le face să fie slab imunogene, biocompatibile, și biodegradabile. Dimensiunea mică, structura poroasă și compoziția chimică permit încărcarea lor cu cantități generoase de molecule hidrofile și hidrofobe. Fiind bogate în grupări funcționale de suprafață, aceste particule sunt ușor de funcționalizat cu elemente de

țintire specifică precum anticorpi, peptide, sau alte molecule organice ce funcționează ca mecanisme cheie-broască cu biomarkeri specifici celulelor de cancer.

### *1.3.3 Nanoparticule anorganice pentru detecția și tratamentul ALL*

Nanoparticulele anorganice prezintă proprietăți fizice diverse și distincte ce depind de dimensiunea și compoziția lor, astfel având potențial de funcționare în aplicații biologice de imagistică celulară și detecție moleculară. În general, acestea sunt folosite în formă hibridă, întrucât componenta organică le oferă proprietăți complementare precum solubilitate în medii fiziologice, situsuri active pentru bioconjugare, biocompatibilitate etc. Nanomaterialele bazate pe forma oxidată a grafenei sunt adecvate pentru aplicații biomedicale datorită naturii lor amfifile și a multitudinii de grupări funcționale utilizate în aplicații precum biosenzoristică, bioimagistică, sau livrare de medicamente.

Nanoparticulele de metale nobile sunt valoroase datorită proprietăților lor optice unice, ca rezonanța plasmonică de suprafață (SPR), un fenomen ce presupune oscilații electronice rezonante care duc la apariția unui câmp electric puternic în vecinătatea particulelor. Aceste particule pot absorbi și împrăști puternic lumina. Întrucât o detecție mai sensibilă a cancerului poate permite un tratament mai rapid și șanse mai bune de recuperare, prin utilizarea Împrăștierii Raman Amplificată de Suprafață (SERS) se pot analiza celulele și țesuturile la nivel molecular și totodată nanoparticulele marcate pot fi folosite ca agenți de contrast pentru imagistică. Nanoparticulele plasmonice cu răspuns în domeniul NIR sunt foarte eficiente în a converti energia luminoasă în căldură, și pot fi folosite pentru tratament prin hipertermie și pentru livrarea controlată la nivel celular a unor medicamente. Având raportul suprafață:volum mare, aceste particule permit încărcarea unei cantități mari de molecule cargo, pentru diferite aplicații.

Elementele de țintire biologică legate la nivelul particulelor pot oferi specificitate de interacțiune cu celulele țintă, și adăugarea de reporteri Raman sau de molecule fluorescente la nanostructuri le permite utilizarea în imagistică și detecție, prin metode rapide și neinvazive. Considerând proprietățile unice și interesante ale nanoparticulelor, acestea par modalități promițătoare pentru diagnosticul, imagistica, și terapia cancerului în viitorul apropiat.

### **1.4 Siguranța și provocările privind translatarea nanomedicinii în clinică**

Riscurile legate de dimensiunile reduse ale nanoparticulelor pot avea efecte de la nivel subcelular și celular, la acumulări în anumite organe, și până la efecte asupra întregului organism. În nucleu, nanoparticulele de aur se pot fixa pe molecula de ADN influențând procese



biologice precum transcrierea, replicarea, expresia proteică, și chiar apoptoza și necroza. S-a dovedit *in vitro* influența negativă a concentrațiilor mari de nanoparticule asupra integrității celulare, motilității, proliferării și adeziunii, și o deteriorare a filamentelor de actină din citoschelet<sup>10</sup>. Stresul oxidativ a fost demonstrat ca alt efect comun al nanoparticulelor<sup>11</sup>. Cu diametre de peste 50 nm, particulele se acumulează în ficat și splină, unde rămân până la 4 luni, iar cele de 10 nm ajung în rinichi, testicule, timus, inimă, plămâni, creier. Cu toate acestea, un număr mare de studii nu au arătat vreun efect toxic al nanoparticulelor, dacă au utilizat concentrații mai mici de  $10^{12}$  particule/ml<sup>12</sup>.

## REZULTATELE CERCETĂRII

### 2. Nanoparticule plasmonice: sinteză, biofuncționalizare, caracterizare

#### 2.1 Nanoparticule de formă “Nano-stele”

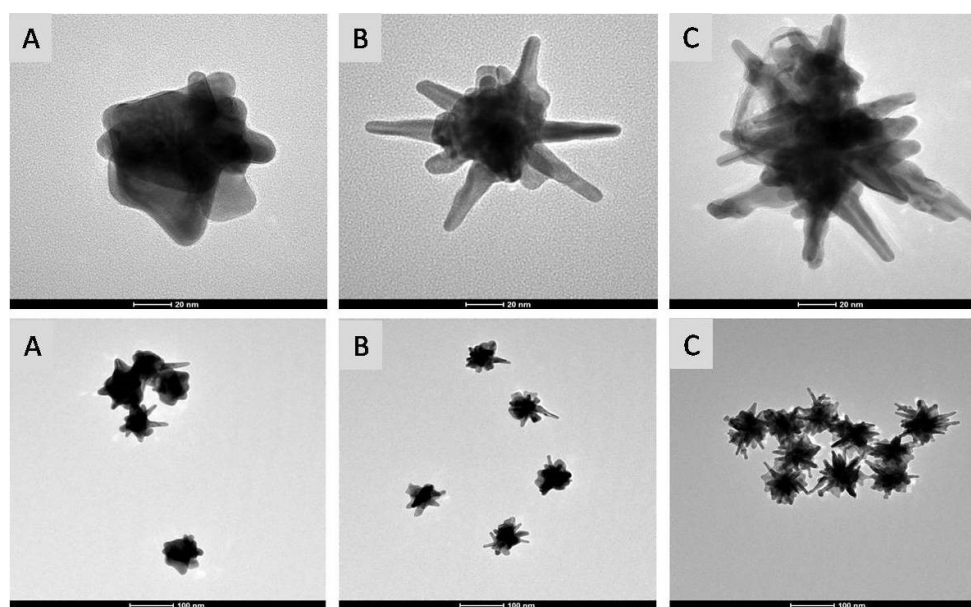


Figura 2.1 Imagini TEM ale probelor: A (A), B (B), și C (C). Scala are 20 nm pe rândul de sus, și 100 nm pe rândul de jos.

Dimensiunea și forma nanosteletelor au fost variate prin optimizarea protocolului de sinteză<sup>13</sup> folosind 3 concentrații diferite de  $\text{AgNO}_3$  și rezultând în 3 probe, identificate cu A (0.5 mM), B (1 mM), și C (2 mM) - Figura 2.1. Spectrele de extincție UV-Vis ale acestor particule acoperă intervalul spectrului electromagnetic de la roșu la infraroșu apropiat, prin deplasarea poziției SPR ca urmare a alungirii spinilor de pe particule. Datele de caracterizare optică, măsurătorile bazate pe imagistica TEM, diametrele hidrodinamice și potențialele zeta ale particulelor sunt prezentate în Tabelul 2.1. O concentrație mare de  $\text{AgNO}_3$  duce la creșterea unor

protuberanțe lungi și chiar la ramificarea acestora, iar o concentrație mai mică permite depozitarea aurului mai ales pe miezul particulei și mai puțin pe spini.

Pentru explorarea proprietăților SERS ale nanostelelor, am testat reporterii Raman NileBlue (NB) și pATP, ale căror mecanisme de interacțiune cu suprafața aurului sunt adsorbția bazată pe electroni *pi* delocalizați și respectiv legătura covalentă tiol (S-Au). Intensitatea semnalelor SERS obținute e prezentată în Tabelul 2.1. Amplificarea NB s-a dovedit a fi cea mai eficientă, cu semnal SERS de până la  $10^5$ , pentru banda vibrației inelului fenoxazinei de la  $595\text{ cm}^{-1}$ , și semnal pATP de  $10^3$  al benzii de întindere C-C și C-S de la  $1075\text{ cm}^{-1}$ . Deplasări de câțiva nanometri înspre roșu a SPR confirmă prezența reporterilor pe suprafața particulelor.

Tabel 2.1 Caracterizarea probelor A, B și C.

		Proba:	A	B	C
<b>UV-Vis</b>	poziția SPR (nm)		642	690	792
	FWHM al SPR (nm)		127	161	254
<b>TEM</b>	diametru miez (nm)		$69.6 \pm 7.2$	$49.3 \pm 6.2$	$55 \pm 13.1$
	lungime spini (nm)		$9.5 \pm 4$	$21 \pm 5.5$	$30.3 \pm 7$
	număr spini (în proiecție 2D)		$4 \pm 1$	$11 \pm 3$	$16 \pm 6$
	dimensiune nanostele (nm)		$88.6 \pm 8.2$	$91.3 \pm 10.4$	$115.6 \pm 21.7$
<b>DLS</b>	diametru hidrodinamic (nm)		101.3	98.3	118
	Zeta-potențial (mV)		-37	-33	-37
<b>intensitate</b>	Nile Blue (kcounts)		17	100	23
<b>SERS</b>	pATP (kcounts)		1.7	1.8	1

După acoperirea cu polimer a particulelor marcate cu reporteri Raman, semnalul lor SERS mai crește puțin, în ciuda etapei suplimentare de spălare. Acest lucru se explică prin confinarea moleculelor de reporter în vecinătatea suprafeței particulelor la atașarea lanțurilor de PEG, proces cunoscut ca ”ecranare sterică,, (steric shielding).

## 2.2 Nanoparticule de formă “Nano-arici” (GNU)

Optimizând mai departe protocolul de sinteză a nanostelelor, am reușit să obținem particule cu banda SPR și mai înspre NIR (la  $900\text{ nm}$ ), cu spini mai lungi (datorită unei concentrații crescute de  $\text{AgNO}_3$ ) și ramificări mai puține (concentrație mai mare de agent reducător), obținând forme ce seamănă cu aricii de mare (Figura 2.2). Măsurătorile bazate pe imagini TEM arată diametre medii ale miezurilor de  $101 \pm 12\text{ nm}$ , lungimi medii ale spinilor de  $31.9 \pm 12.9\text{ nm}$ , și un număr mediu de spini (în proiecție 2D) de  $16.8 \pm 3.5$ . Marcarea Raman a particulelor a produs semnal SERS de 35 kcounts, pentru setări de măsurătoare identice cu cele folosite pentru nanostele. Următorii pași ai conjugării au fost urmăriți și caracterizați pentru

asigurarea unei biofuncționalizări corecte, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.2. Stabilitatea în timp a particulelor a fost monitorizată, iar stratul de polimer pare să ofere suficientă stabilizare sterică chiar și după 6 luni de la biofuncționalizare.

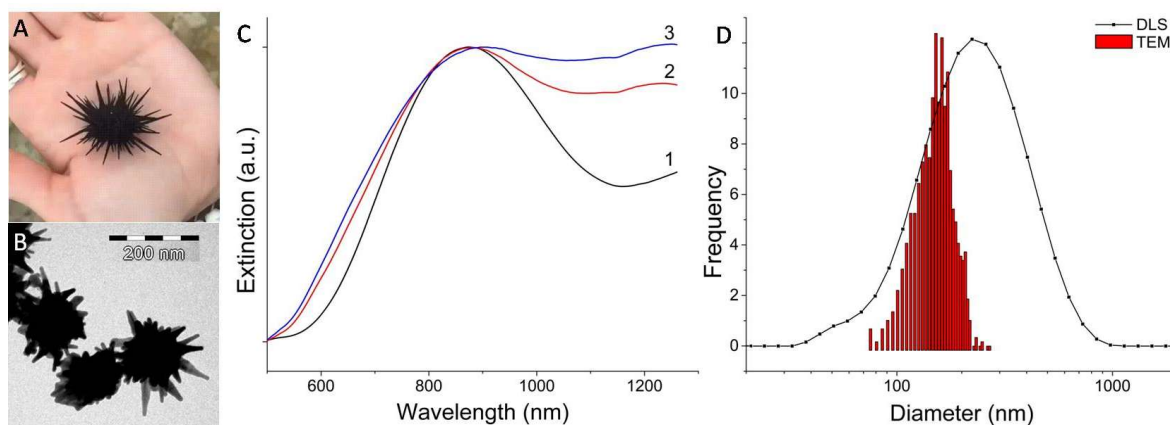


Figura 2.2 A: fotografia unui arici de mare; B: imagine TEM a probei de GNU; C: spectre de extincție a GNU proaspăt sintetizate (1), PEG-NB-GNU (2), și antiCD19-PEG-NB-GNU (3); D: distribuția dimensiunilor GNU bazată pe măsurători DLS și analiza imaginilor TEM.

Tabel 2.2. Valori de Zeta-potențial, intensități ale semnalului SERS a NB, diametre hidrodinamice și indecși de polidispersitate (PDI) caracteristice pentru etapele de funcționalizare a GNU.

	Zeta-potențial (mV)	Intensitate SERS*(kcounts)	diametru hidrodinamic (nm)	PDI
GNU	-39.7±0.7	-	201.5±1.5	0.28±0.03
PEG-NB-GNU	-9.7±0.4	25.5	310.4±0.6	0.3±0.004
antiCD19-PEG-NB-GNU	-10.6±0.7	17.8	372.8±11.1	0.39±0.07

\*intensitate SERS a benzii de vibrație a inelului fenoxazinei specific NB de la 595 cm<sup>-1</sup>

Concentrația de anticorp legat pe GNU după conjugare a fost măsurată indirect prin calcularea diferenței dintre cantitatea totală de anticorp incubat și cea de anticorp nelegat, care a fost cuantificat pe baza unei curbe de calibrare a semnalului de fluorescență a moleculei de FITC (excitație la 495 nm, emisie la 520 nm) conjugată pe anticorpi de către producător. În urma calculelor, s-a obținut că o concentrație finală de antiCD19 de 5.97 μg/ml este atașată pe suprafața PEG-NB-GNU.

### 2.3 Nanoparticule de formă “Nanosfere Goale” (HNS)

Pentru a obține o formă sferică goală pe dinăuntru se folosește metoda înlocuirii galvanice, în care materialul din nano-semițele sferice de argint este oxidat de către aur, care are un potențial reducător mai mare: pentru fiecare ion de  $\text{Au}^{3+}$  din soluție care este redus la  $\text{Au}^0$ , trei  $\text{Ag}^0$  sunt oxidați și dizolvați ca ioni de  $\text{Ag}^+$  (Figura 2.3). Variind controlat forma și dimensiunea matriței de sacrificiu, și porozitatea și grosimea structurii coajă, putem deplasa SPR al particulelor <sup>14</sup>. Aici, nanosferele goale cu răspuns la 720 nm (Figura 2.4A, spectrul 2) au fost alese pentru următoarele experimente datorită efectului lor SERS superior și stabilității structurale <sup>14</sup>. Pașii de biofuncționalizare au fost urmăriți și caracterizați, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.3 și Figura 2.4A, spectrele 3 și 4.

Tabel 2.3 Valori de Zeta-potențial, intensități ale semnalului SERS a NB, diametre hidrodinamice și indecși de polidispersitate (PDI) pentru etapele de obținere a NHS

	Zeta-potențial (mV)	intensitate SERS* (kcounts)	diametru hidrodinamic (nm)	PDI
matrițe de sacrificiu (Ag)		-	69.3 ±0.6	0.59
PEG-NB-HNS	-16	9	82.06±0.8	0.18
antiCD19-PEG-NB-HNS	-24.7	8	91.13±1.52	0.24

\*intensitate SERS a benzii de vibrație a inelului fenoxazinei specific NB de la 595  $\text{cm}^{-1}$

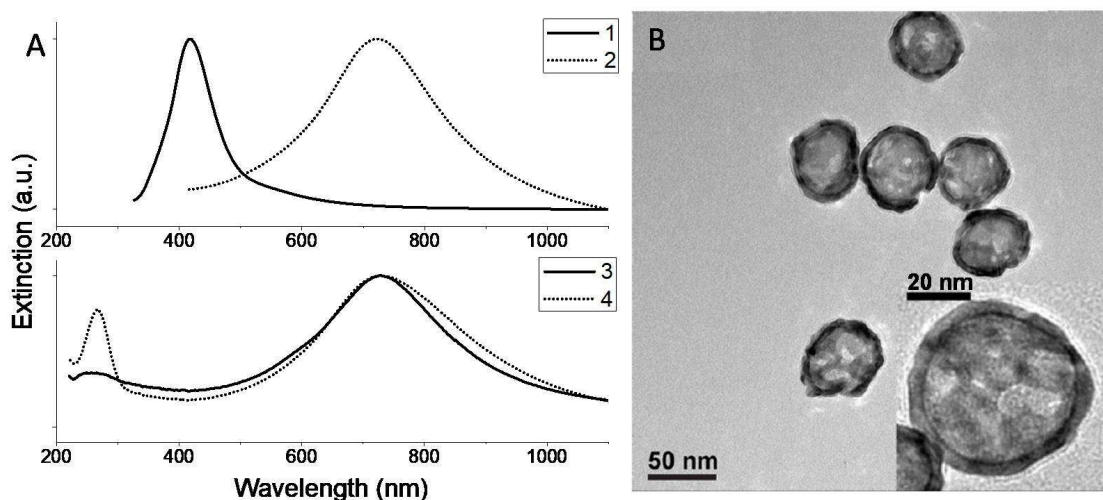


Figura 2.4 A: Spectre de extincție a matrițelor de sacrificiu (1), HNS (2), PEG-NB-HNS (3), antiCD19-PEG-NB-HNS (4); B: imagini TEM ale HNS utilizate în aceste studii.

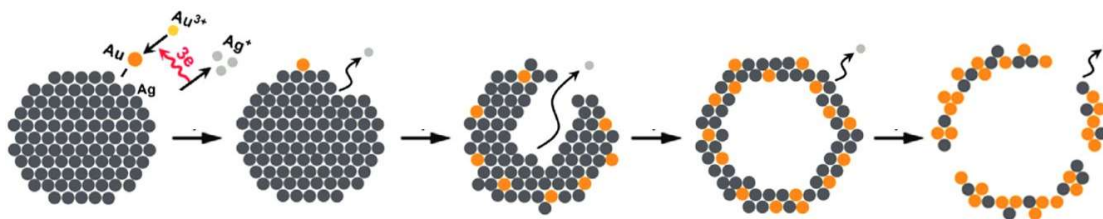


Figura 2.3 Schema metodei înlocuirii galvanice prin care se produc nanosfere goale

Concentrația de anticorp legat la HNS după conjugare a fost cuantificată la fel ca în cazul probei de GNU. Calculele arată o concentrație finală de antiCD19 de 5.7  $\mu\text{g/ml}$  atașată pe suprafața PEG-NB-HNS.

### 3. Imagistică microscopică intracelulară a nanoparticulelor

#### 3.1 Localizarea intracelulară a Nano-aricilor

##### 3.1.1 Microscopie în câmp întunecat

AntiCD19-PEG-NB-GNU au o secțiune eficientă de împrăștiere ce permite vizualizarea lor prin microscopie în câmp întunecat, ca puncte luminoase galbene-portocalii în regiunea periferică a citoplasmei sau pe membrana extensiilor celulare (Figura 3.1A, B). Ca tehnică confocală, microscopia în câmp întunecat confirmă localizarea intracelulară a particulelor la diferite adâncimi în citoplasmă. Rezultatele coroborează cu cele obținute și prin alte tehnici (SERS, TPE-FLIM și TEM) în privința specificității interacțiunii bazate pe antiCD19, cu un raport al numărului de puncte luminoase per celulă de 5:1 pentru celulele tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU *versus* cele tratate cu PEG-NB-GNU.

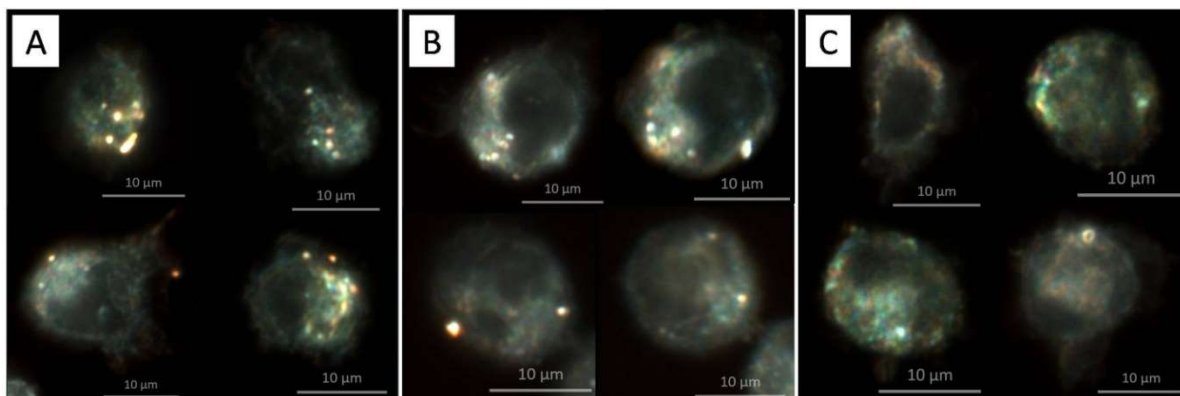


Figura 3.1 Imagini în câmp întunecat ale celulelor tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU (A), PEG-NB-GNU (B) și celule CCRF-SB netratate (C).

### 3.1.2 Microscopie Raman confocală

Hărți Raman ale celulelor incubate cu nanoparticule și ale celulelor control s-au construit prin analiză spectrală univariată (Figura 3.2). În proba incubată cu antiCD19-PEG-NB-GNU, prezența particulelor este confirmată prin semnalul NB de la  $595\text{ cm}^{-1}$  (pixeli cyan), iar pixelii roșii reprezintă banda deformărilor proteice și lipidice  $\text{CH}_2$  și  $\text{CH}_3$  de la  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Intensitatea acestei benzi este crescută de 15 ori față de semnalul ei Raman din proba control (D). Această amplificare afirmă prezența substratelor SERS active, care amplifică nu doar semnalul de NB, ci și cel al moleculelor organice aflate în proximitatea lor. O încercare de atribuire a benzilor, bazată pe literatură<sup>15</sup>, se găsește în Tabelul 3.1

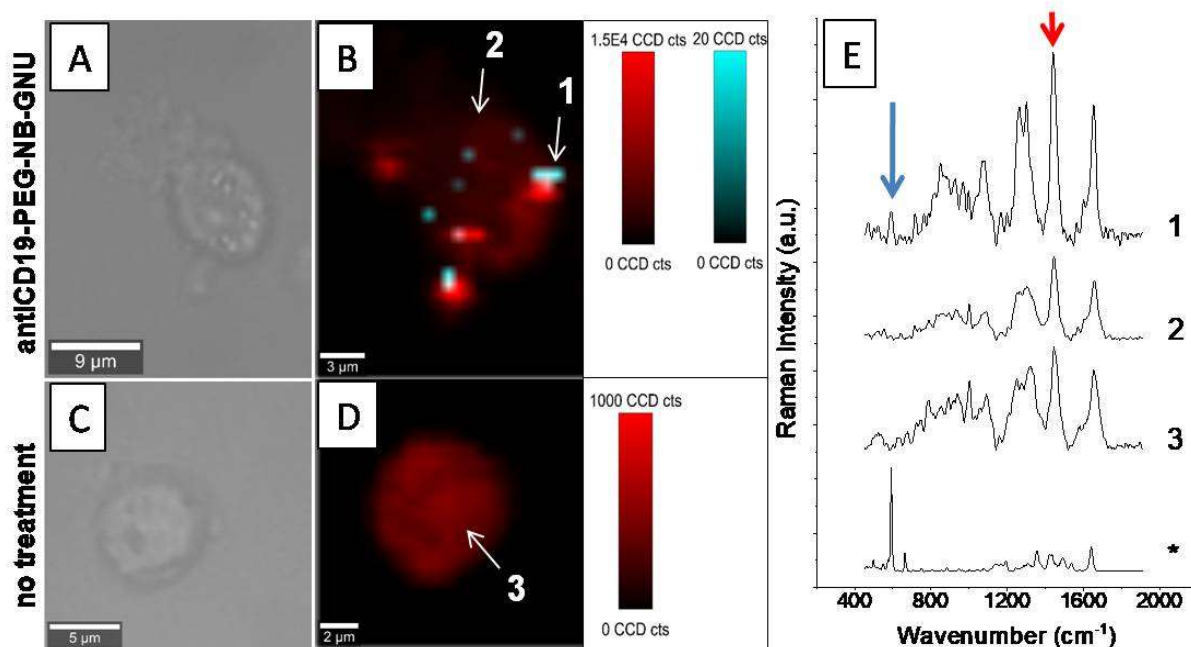


Figura 3.2 Imagini optice (A, C) și hărți spectrale ale celulelor CCRF-SB tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU (B), și netratate (D). Semnal organic (roșu), semnal SERS al NB (cyan). (E): Spectre Raman și SERS extrase din punctele indicate cu săgeți, menținute la scală pentru comparație. Spectrul (\*) corespunde soluției coloidale de antiCD19-PEG-NB-GNU.

Tabel 3.1 Poziția benzilor SERS și tentativă de atribuire a acestora, din: reporterul Raman și mediul celular. Benzile marcate cu \* au fost integrate pentru crearea hărților din Figura 3.2.

	Poziția benzii ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuirea benzii
NB	1360, 1641	Alte vibrații ale inelului
	665	Deformări CCC și NCC în-plan
	595*	Vibrația inelului fenoxazină

<b>Componente celulare</b>	1655	Amida I
	1450*	Benzi de deformare CH <sub>2</sub> și CH <sub>3</sub> din proteine și lipide
	1330-1230	Amida III
	1003	Vibrația inelului fenilalaninei

### 3.1.3 Imagistică de Timpi de Viață de Fluorescență

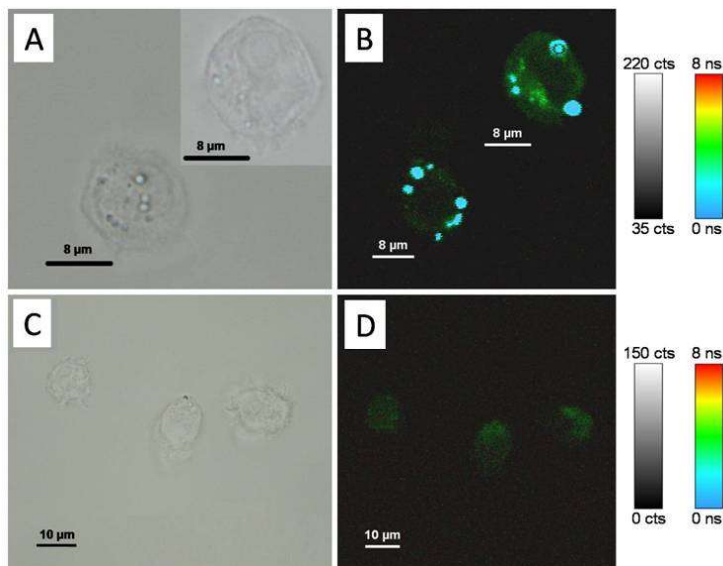


Figura 3.3 Imagini optice și TPE-FLIM ale celulelor CCRF-SB incubate cu antiCD19-PEG-NB-GNU (A, B), și neincubate control (C, D).

FLIM poate să diferențieze molecule fluorescente după timpii de viață de fluorescență diferiți, care au aproximativ 4 ns pentru componentele celulare, și sub 100 ps pentru nanoparticulele metalice<sup>16,17</sup>, datorită unor tranziții directe între electronii din banda de conducție și golurile din banda *d*. Astfel se pot vizualiza clar nanoparticulele în interiorul celulelor țintă (Figura 3.3B), iar secționarea optică dependentă de excitația la doi-fotoni ne confirmă localizarea intracelulară.

## 3.2 Localizarea intracelulară a Nanosferelor Goale

### 3.2.1 Microscopie în câmp întunecat

AntiCD19-PEG-NB-HNS reprezintă un candidat excelent pentru imagistica în câmp întunecat (Figura 3.4). Acest set de imagini a fost obținut prin incubarea celulelor cu antiCD19-PEG-NB-HNS pentru perioade de timp diferite, urmată de fixarea lor cu paraformaldehidă. Se observă un comportament dependent de timp, și anume după primele două ore de la incubare, particulele sunt localizate mai ales pe partea extracelulară a membranei (B, C), urmată de internalizarea unui număr mare de particule în regiunea periferică a citoplasmei (D, E), ca după 24 de ore (F) particulele sa se fi distribuit în întreaga citoplasmă a celulelor.

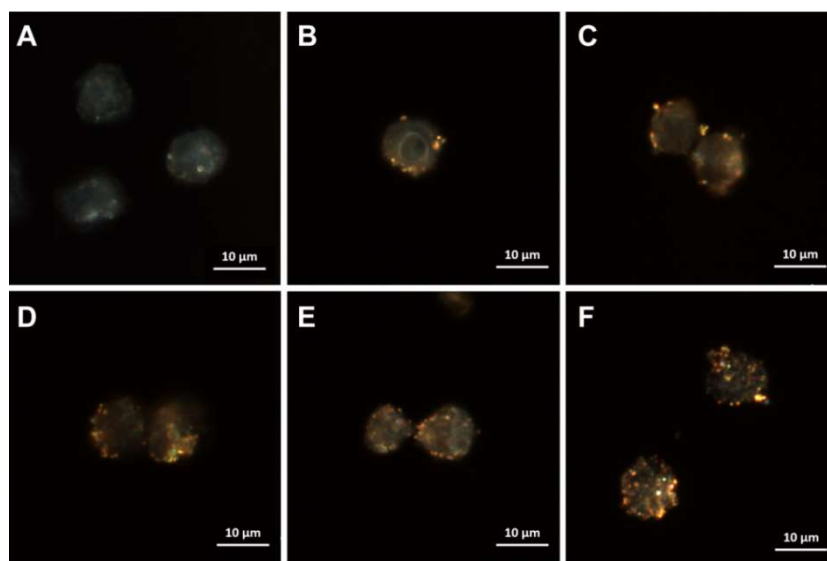


Figura 3.4 Imagini în câmp întunecat ale celulelor SKW6.4 (A) tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU pentru 30 min (B), 2 h (C), 6 h (D), 14 h (E) și 24 h (F)

### 3.2.2 Microscopie Raman confocală

Urmărirea internalizării și distribuției antiCD19-PEG-NB-HNS în celulele țintă s-a realizat cu două linii laser. Cu toate că spectrele SERS ale particulelor coloidale au un semnal destul de bun la  $595\text{ cm}^{-1}$  (\*) pentru ambele linii laser, se observă că hărțile SERS după semnalul NB (cyan) nu au putut fi obținute cu linia de la 785 nm (Figura 3.5), ci doar cu cea de la 633 nm (Figura 3.6). La această lungime de undă linia laser se suprapune cu spectrul de absorbție al NB ducând la o amplificare suplimentară, prin SERS Rezonant (SERRS)<sup>18</sup>. Astfel, semnalul NB de la  $595\text{ cm}^{-1}$  (cyan) se poate detecta și se observă superpoziția lui cu zonele unde semnalului organic de la  $1450\text{ cm}^{-1}$  (roșu) este amplificat de 6 ori față de semnalul Raman din celulele control. Atribuirea benzilor provenite din semnalul celular este sumarizată în Tabelul 3.2<sup>19</sup>.

Table 3.2 Poziția și atribuirea unor benzi specifice compoziției celulare

Poziția benzii ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuirea benzii
1655	Amida I
1450	Benzi de deformare $\text{CH}_2$ și $\text{CH}_3$ din proteine și lipide
1330-1230	Amida III
1126, 1094	Întinderi simetrice și antisimetrice ale grupării fosfat din ADN
1003	Vibrația inelului fenilalaninei
785	Vibrația inelului piridinic și întinderea legăturii fosfodiesterice din ADN



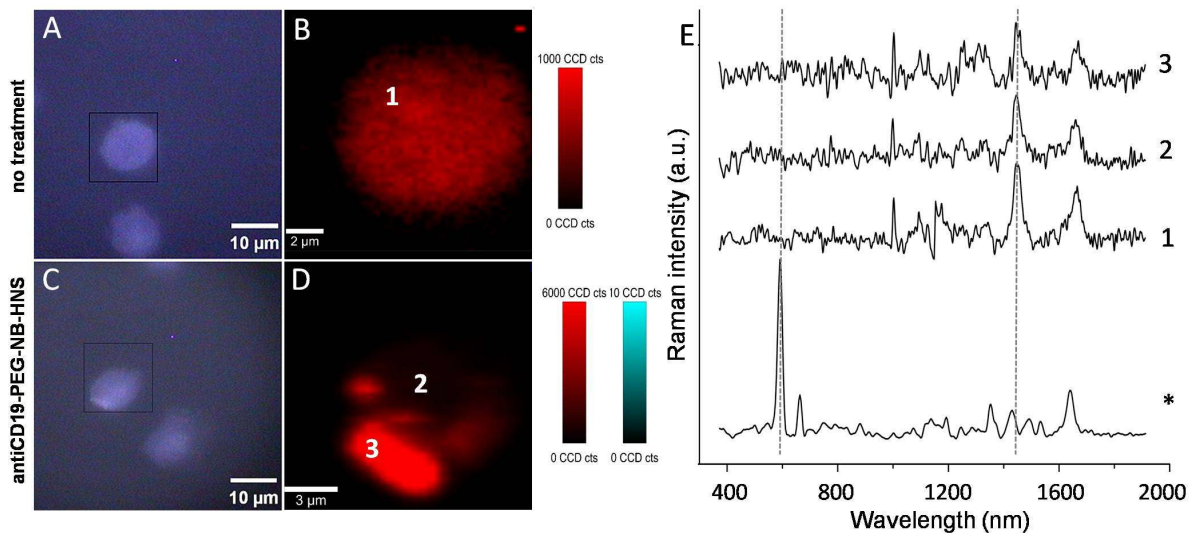


Figura 3.5 Imagini optice (A, C) și hărți spectrale ale celulelor SKW6.4 control (B) și tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU (D), măsurate cu laserul **785 nm**. Semnal organic (roșu), semnal SERS al NB (cyan). (E): Spectre Raman și SERS extrase din punctele indicate cu săgeți, menținute la scală pentru comparație. Spectrul (\*) corespunde soluției coloidale de antiCD19-PEG-NB-HNS.

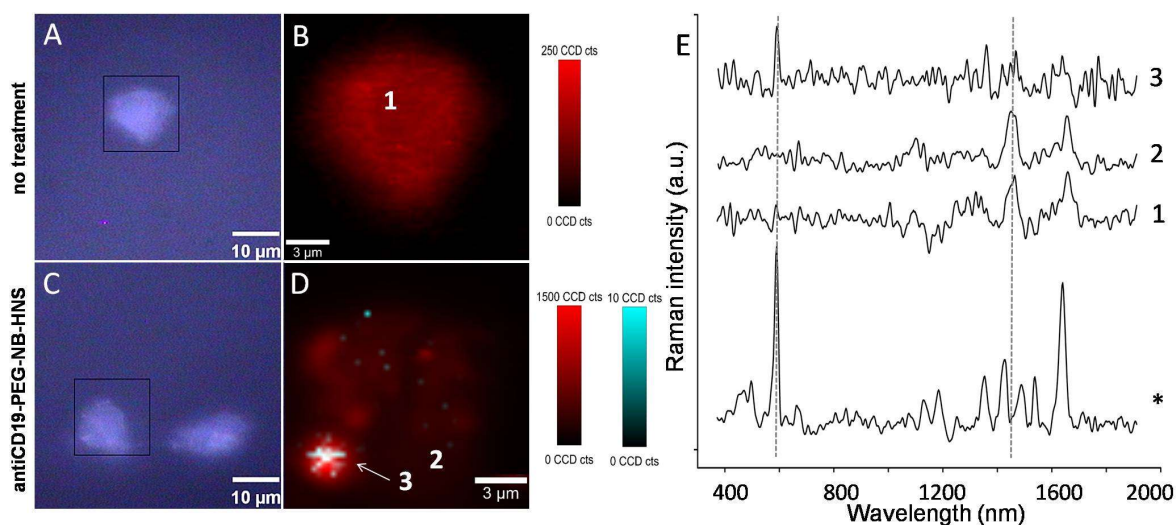


Figura 3.6 Imagini optice (A, C) și hărți spectrale ale celulelor SKW6.4 control (B) și tratate cu antiCD19-PEG-NB-GNU (D), măsurate cu laserul **633 nm**. Semnal organic (roșu), semnal SERS al NB (cyan). (E): Spectre Raman și SERS extrase din punctele indicate cu săgeți, menținute la scală pentru comparație. Spectrul (\*) corespunde soluției coloidale de antiCD19-PEG-NB-HNS.

### 3.2.3 Imagistică de Timp de Viață de Fluorescență

Imaginile de la FLIM și imaginile echivalente obținute în câmp luminos pentru celule netratate și celule incubate cu antiCD19-PEG-NB-HNS sunt prezentate în Figura 3.7. Celulele control au un semnal foarte slab cu un timp de viață de aproximativ 4 ns, iar nanoparticulele se diferențiază cu un timp de viață mult mai scurt, de 100 ps.

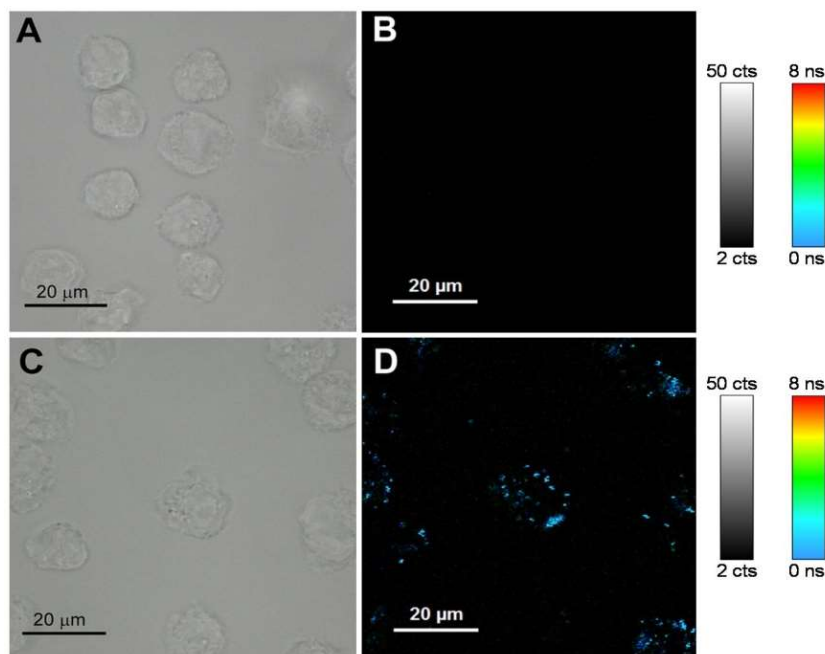


Figura 3.7 Imagini optice și TPE-FLIM ale celulelor SKW6.4 netratate (A, B) și tratate cu antiCD19-PEG-NB-HNS (C, D).

## 4. Validarea prin TEM a specificității interacțiunii nanoparticulelor marcate cu anticorpi cu celulele țintă

### 4.1 Specificitatea de interacțiune a “Nano-aricilor”

În urma incubării antiCD19-PEG-NB-GNU cu celulele țintă, particulele sunt observate în număr mare la nivel intracelular (Figura 4.1A, B), contrar setului de date unde s-a efectuat un test de legare competitivă în cazul căruia celulele au fost incubate în prealabil cu molecule libere de anticorp care au legat și ocupat proteinele CD19 de pe suprafața celulelor, evitând aproape în totalitate legarea particulelor (C, D). Nanoparticulele control nemarcate cu anticorp rămân neinternalizate în cea mai mare parte, cu câteva excepții, când sunt localizate în citoplasmă (E, F). Linia celulară CD19-negativă folosită ca și control, neavând proteina țintă exprimată pe suprafață, nu internalizează particulele țintite (G, H). Aceste probe de control pozitiv și negativ

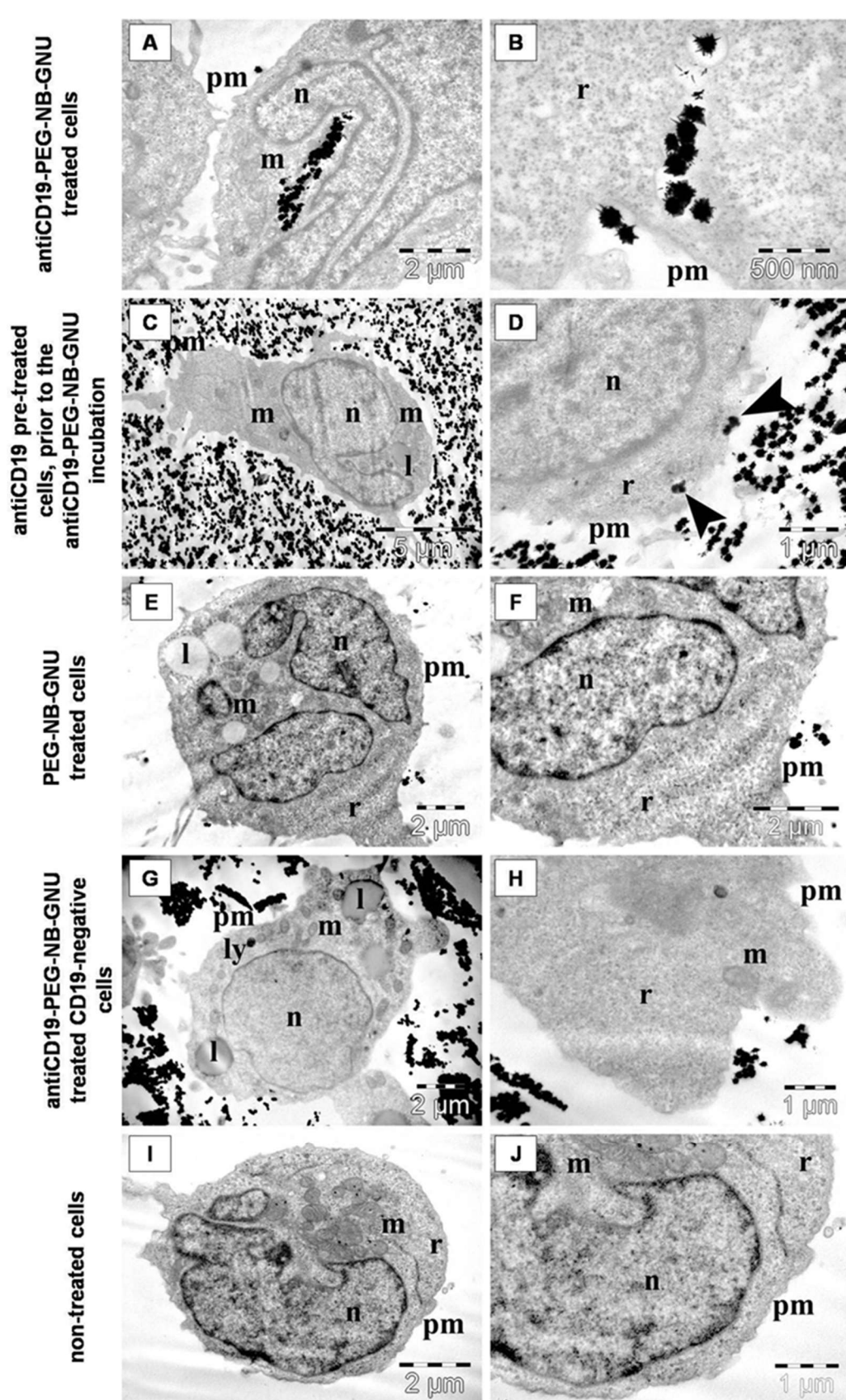


Figura 4.1 Imagini TEM ale celulelor CCRF-SB incubate cu (A,B) antiCD19-PEG-NB-GNU; (C,D) antiCD19 înainte de incubarea cu antiCD19-PEG-NB-GNU; (E,F) PEG-NB-GNU. (G,H) Celule OCI-AML3 CD19-negative incubate cu antiCD19-PEG-NB-GNU. (I,J) celule CCRF-SB netratate. pm: membrana plasmatică; n: nucleu; m: mitocondrie; l: picătură de lipid; ly: lizosom; r: ribosomi; ly: lizosom.

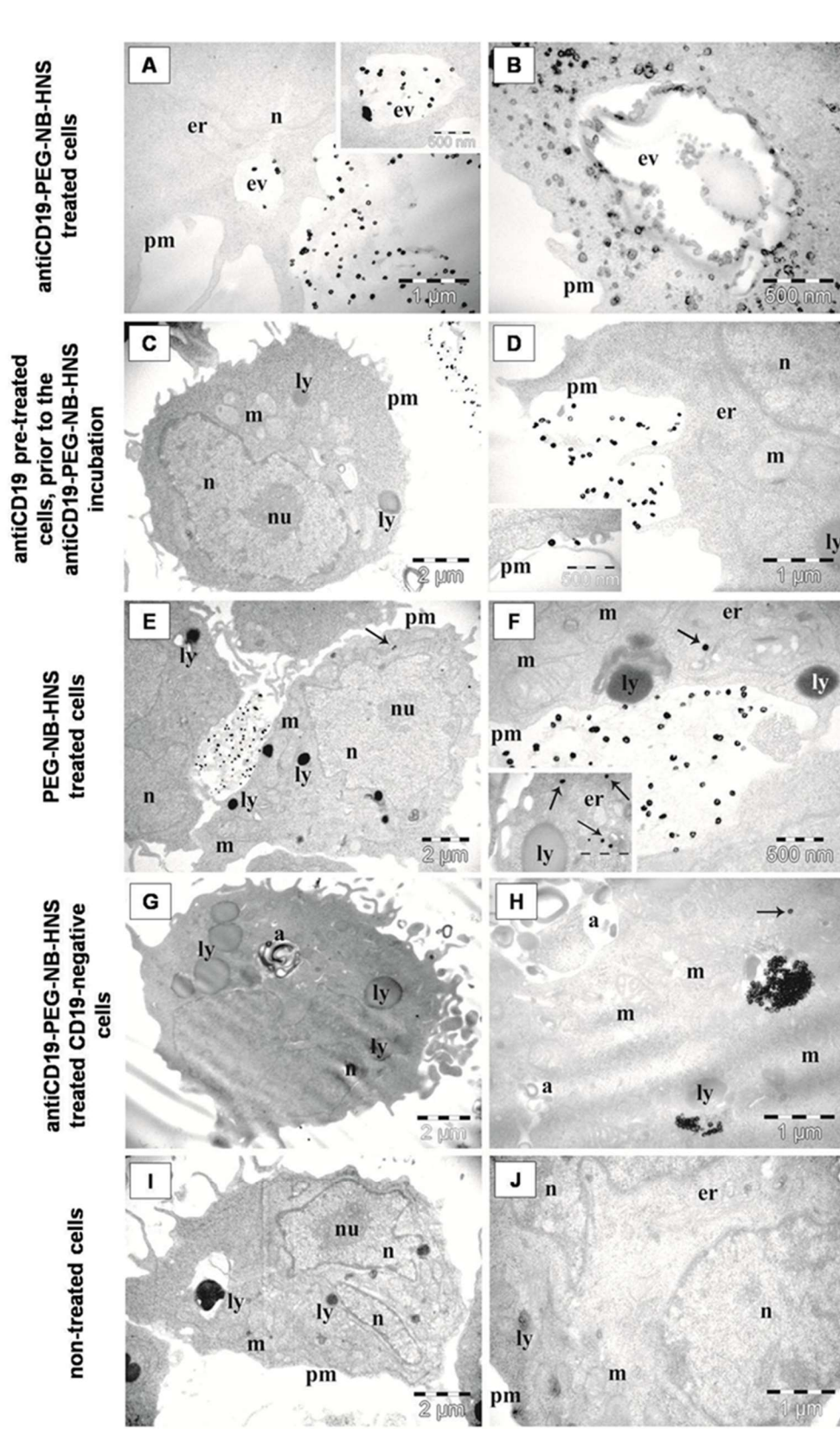


Figura 4.2 Imagini TEM ale celulelor SKW6.4 incubate cu (A,B) antiCD19-PEG-NB-HNS; (C,D) antiCD19 înainte de incubarea cu antiCD19-PEG-NB-HNS; (E,F) PEG-NB-HNS. (G,H) Celule OCI-AML3 CD19-negative incubate cu antiCD19-PEG-NB-HNS. (I,J) celule SKW6.4 netratate. pm: membrana plasmatică; n: nucleoli; nu: nucleu; er: reticul endoplasmatic; m: mitocondrie; ev: veziculă de endocitoză; l: picătură de lipid; r: ribosomi; ly: lizoșomi; a: autofagosom.

demonstrează specificitatea de interacțiune a nano-aricilor cu celulele leucemice CD19-pozitive și ne conduc înspre informația că internalizarea are loc pe baza fenomenului de endocitoză mediată de receptor, printr-o cale de internalizare dependentă de clatrină, întrucât CD19 este cunoscut ca epitop internalizant<sup>20,21</sup>. De asemenea, niciuna dintre probe nu prezintă anormalități structurale în urma tratamentului, în comparație cu celulele netratate (I, J).

#### **4.2 Specificitatea de interacțiune a “Nanosferelor Goale”**

AntiCD19-PEG-NB-HNS au interacționat în număr mare cu celulele țintă, fiind capturate în vezicule de endocitoză la periferia celulelor, dispersate individual în citosol, sau strâns legate pe exteriorul celulelor mai ales la nivelul extensiilor celulare (Figura 4.2A, B). Tratamentul prealabil cu molecule libere de antiCD19 stopează complet internalizarea particulelor și păstrează contactul doar pentru puține particule la nivelul extensiilor celulare (C, D). Particulele PEG-NB-HNS neconjugate sunt aproape complet neinternalizate, cu câteva excepții de particule singulare dispersate în citosol (E, F, săgeți). O proporție foarte mică de celule CD19-negative conțin particule țintite, și acestea în cantități mult reduse comparativ cu celulele țintă. Aici, particulele sunt fie dispersate singular în citoplasmă (asemenea celor nemarcate de mai sus), fie strânse în compartimente endo-lizosomale formate cel mai probabil prin endocitoză nespecifică (G, H). Celulele analizate prezintă o ultrastructură normală, asemenea celulelor netratate (I, J).

### **5. Efectul terapeutic al Nano-aricilor marcați cu anticorpi**

#### **5.1 Citotoxicitatea particulelor, determinată prin numărarea celulelor**

Pentru determinarea citotoxicității tratamentelor aplicate, s-au numărat celulele vii din fiecare probă pe o perioadă determinată, iar viabilitatea s-a exprimat ca procent din viabilitatea probei control. Rezultatele arată reducerea viabilității celulare la jumătate ( $IC_{50}$ ) de către antiCD19-PEG-NB-GNU la concentrații ale anticorpului legat de 0.17 ng/ $\mu$ l (echivalentul unei concentrații de particule de  $0.5 \times 10^{-12}$  M) la a 5-a zi după incubare, iar aceeași concentrație de tratament reduce viabilitatea sub 25% după 7 zile de incubare (Figura 5.1A). De cealaltă parte, moleculele libere de antiCD19 reduc viabilitatea celulară la 50% abea după 7 zile, la concentrații de peste 0.42 ng/ $\mu$ l (B). Așadar, se pare că apare un efect sinergic prin conjugarea anticorpului la suprafața particulelor, iar faptul că în acest format se păstrează mai mult timp corelarea dintre

concentrația tratamentului și efect arată că moleculele sunt protejate de digestie atunci când sunt conjugate în structura nanoparticulelor. La proba de nanoparticule neșintite (C) nu se observă o corelare clară între concentrație și efect, dar concentrații peste  $1.23 \times 10^{-12}$  M devin citotoxice după 7 zile de la incubare.

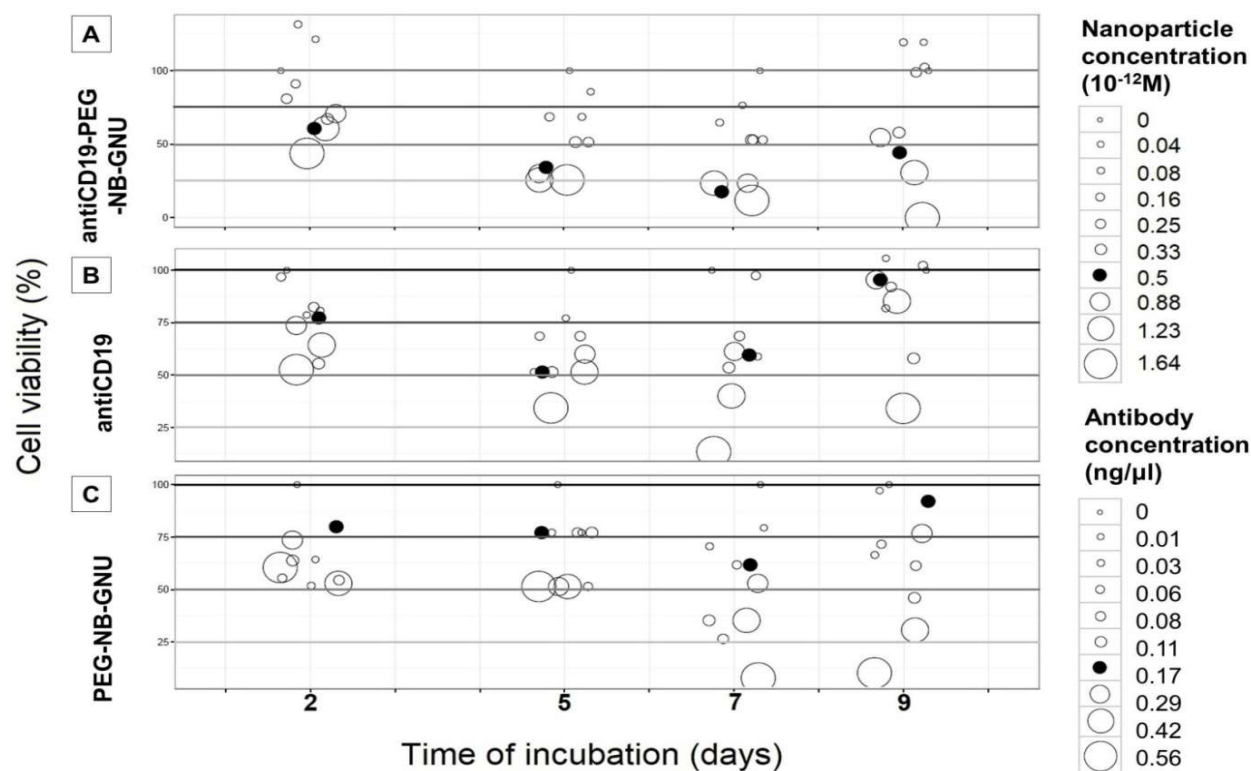


Figura 5.1 Viabilitate celulară calculată la 2, 5, 7, 9 zile de incubare cu (A) antiCD19-PEG-NB-GNU; (B) molecule antiCD19 libere; (C) PEG-NB-GNU. 100% reprezintă viabilitatea probei control. Diametrele cercurilor indică concentrația tratamentului aplicat.

## 5.2 Analiza ciclului celular prin citometrie de flux

După 24 de ore de incubare cu antiCD19-PEG-NB-GNU, distribuția celulelor în diferite faze ale ciclului celular diferă de cea a celulelor netratate, cu o scădere a ponderei fazei S (de sinteză) în favoarea fazelor G (de creștere) (Figura 5.2, coloane negre), situație premergătoare instalării apoptozei<sup>22</sup>. Particulele neșintite induc dereglări similare ale ciclului celular, dar într-o măsură mai redusă (coloane gri închis), întrucât conjugarea anticorpilor pe nanoparticule induce un efect îmbunătățit. În mod contrar, tratarea cu molecule libere de anticorp duce la blocarea celulelor în faza S, probabil prin căi de semnalizare complexe (coloane gri deschis). Întrucât rezultatele indicate aici sunt măsurate la 24 de ore după incubare, iar prin numărarea celulelor

(mai sus) s-a evidențiat o reducere semnificativă a viabilității celulare doar după mai multe zile, putem presupune că mecanismul de toxicitate al acestor particule ar putea fi inducerea unei forme târzii de moarte celulară cunoscută ca apoptoză târzie sau apoptoză post-mitotică <sup>23</sup>.

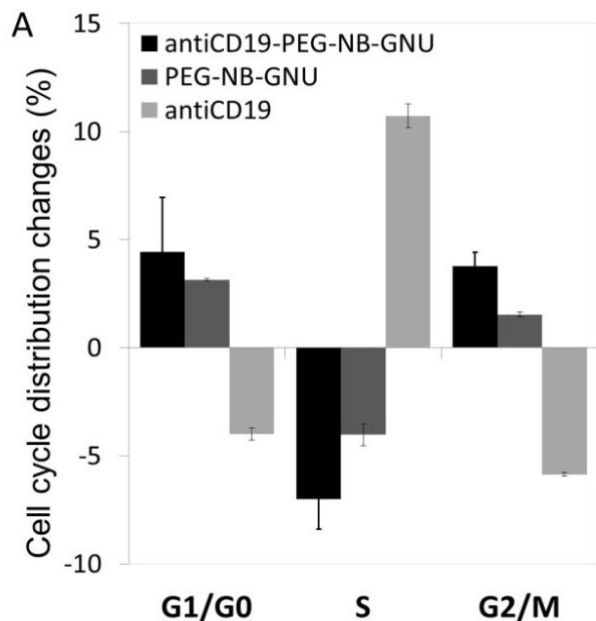


Figura 5.2 Diferența distribuției celulelor CCRF-SB în diferitele faze ale ciclului celular (%) între probele tratate și proba control, la 24 de ore după incubare.

### 5.3 Activitatea metabolică și evaluarea stresului oxidativ cu testul MTS

Acest experiment indică o creștere a gradului de reducere a sării de tetrazoliu MTS de către celule odată cu creșterea concentrației tratamentului (Figura 5.3). Contrar experimentelor de numărare celulară și citometrie de flux, aceste rezultate ridică un semn de întrebare privind toxicitatea particulelor pentru celulele țintă, întrucât o reducere mai puternică a MTS este considerată o măsură a viabilității celulelor. Ideea că testele metabolice bazate pe sări de tetrazoliu nu sunt adecvate pentru măsurarea proliferării celulelor maligne sau cu densitate mare a mai fost discutată în literatură <sup>24</sup>, și corelarea strictă cu activitatea enzimei NAD(P)H dehidrogenază a fost contestată. S-a arătat că radicalul superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) este un element major ce reduce sărurile de tetrazoliu <sup>25</sup>. Așadar, o stare de stres oxidativ puternic în celule, ca cea indusă de prezența unor nanoparticule sau a unor medicamente poate duce la rezultate fals-pozitive din cauza concentrației de  $O_2^{\cdot-}$  <sup>25</sup>. Totuși, pe baza acestui test am obținut o informație valoroasă legată de mecanismul prin care antiCD19-PEG-NB-GNU își induc efectul citotoxic, și anume inducerea unui înalt nivel de stres oxidativ prin acumularea de radical superoxid, fază ce precede inducerea apoptozei <sup>26</sup>.

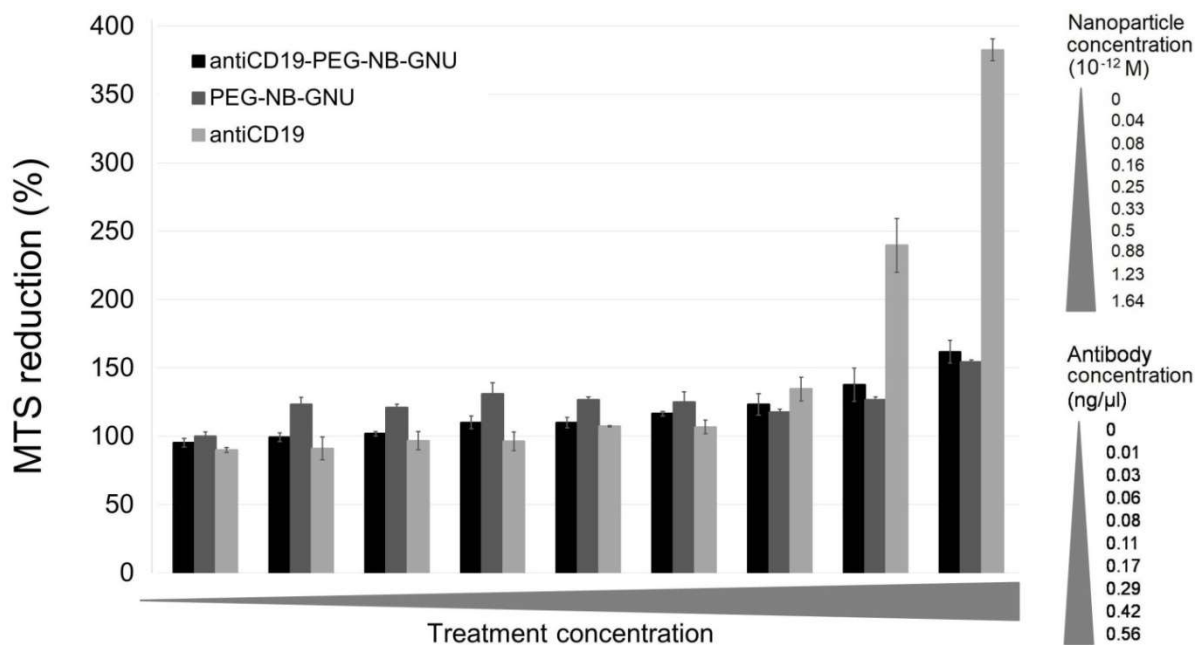


Figura 5.3 Grade de reducere a sării MTS de către celulele CCRF-SB, la 24 de ore după incubarea cu un interval de concentrații de antiCD19-PEG-NB-GNU, PEG-NB-GNU, și anticorp liber, relativ la proba control netratată.

## 6. Concluzii

Aceste rezultate contribuie la domeniul de cercetare bazat pe utilizarea nanoparticulelor pentru aplicații teranostice oncologice, explorând morfologiile particulelor și utilizând un marker celular promițător pentru leucemiile de tip B.

Cancerle hematologice, ca toate tipurile de malignități, ar trebui identificate cât mai rapid, pentru a crește șansele de supraviețuire ale pacientului. Potențialul pentru imagistică demonstrat aici poate reprezenta un pas valoros în acest sens, iar în combinație cu efectul terapeutic conferă nanoparticulelor antiCD19-PEG-NB-GNU proprietăți teranostice.

- În primul rând, am arătat producerea a două tipuri de nanoparticule plasmonice cu răspuns în domeniul NIR, de la etapa de optimizare a sintezei până la marcarea cu reporter Raman, biocompatibilizarea cu polimer și țintirea bazată pe un bio-marker specific.

Nano-aricii sunt formați prin creșterea anizotropică controlată bazată pe ionii de Ag<sup>+</sup> are au afinitate pentru anumite fațete cristalografice ale particulelor de aur.



Nanosferele goale sunt produse prin metoda înlocuirii galvanice, unde argintul din matrițele de sacrificiu este înlocuit de atomi de aur pe baza diferenței de potențial electrochimic dintre cele două elemente.

Eficiența marcării cu reporteri Raman s-a testat cu mai multe molecule, iar pentru experimentele următoare s-a ales varianta cea mai promițătoare.

Învelirea particulelor cu polimer le oferă stabilitate sterică și structurală și previne formarea unei coroane nespecifice de molecule biologice la suprafața lor. În plus, grupările funcționale ale polimerului permit conjugarea anticorpului.

Anticorpul selectat pentru interacțiunea specifică cu leucemiile de tip B a fost atașat covalent la nano-sistem.

- În al doilea rând, potențialul nanoparticulelor plasmonice de metale nobile de a funcționa ca agenți de imagistică multimodală s-a demonstrat prin mai multe tehnici.

Microscopia în câmp întunecat permite vizualizarea particulelor în citoplasmă și la suprafața extensiilor celulare, datorită proprietății lor de împrăștiere a luminii.

Prin imagistică SERS cu excitație în NIR, se confirmă prezența nano-arcilor în celule, pe baza reporterului Raman detectabil în zone ce coincid cu prezența particulelor, care amplifică și semnalul organic din imediata lor vecinătate.

În celulele incubate cu nanosfere goale, s-a obținut semnal SERS cu laserul de la 633 nm, lungime de undă ce coincide cu maximul de absorbție al reporterului, ducând la o interacțiune rezonantă ce explică amplificarea suplimentară.

Ambele tipuri de nanoparticule plasmonice pot fi vizualizate în celule prin tehnica modernă și non-invazivă de Imagistică de Timp de viață de Fluorescență, datorită timpilor lor de viață scurți (sub 100 ps), în contrast cu valorile specifice constituenților celulari (aproximativ 4 ns).

- Apoi, demonstrarea specificității anticorpului, precum și analiza interacțiunilor dintre particule și celule au fost verificate prin TEM cu un set de probe control.

Atât nano-arcii cât și nanosferele goale sunt internalizate eficient și specific de către celulele cu antigenul pereche. Testele de legare competitivă demonstrează legarea anticorp-antigen, iar interacțiunea nespecifică cu particule neșintite a fost, de asemenea, exclusă.

- În ultimul rând, eficiența terapeutică a nano-aricilor a fost demonstrată cu o linie celulară de leucemie de tip B, și teste adiționale au oferit informații legate de modul lor de acțiune.

Prin experimente de numărare a celulelor s-a identificat concentrația de particulele marcate cu anticorp care reduce viabilitatea celulară sub 50% după 5 zile de incubare, și sub 20% după o săptămână.

Citometria de flux a arătat blocarea celulelor tratate cu particule în fazele de Creștere a ciclului celular ( $G_1$  și  $G_2$ ) după 24 de ore, situație care precede inducerea apoptozei. Deși aici deja se observă o deteriorare a celulelor, în experimentele de numărare efectul mai puternic apare doar după mai mult timp, indicând că mecanismul de citotoxicitate este o apoptoză târzie.

Testul MTS arată o corelare între concentrația de nanoparticule aplicată și gradul de reducere a molecule MTS, ceea ce ne indică posibilitatea ca toxicitatea indusă să fie bazată pe un nivel înalt de stres oxidative în celule.

- În concluzie, prin această teză de doctorat am încercat să contribui cu un pas înainte în lupta împotriva Leucemiei Limfoblastice Acute, prin dezvoltarea unor nanoparticule cu răspuns plasmonic în NIR, cu capacitate de imagistică prin tehnici multiple, și cu efect terapeutic.

## Referințe

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 5–29 (2015).
2. Pui, C.-H., Mullighan, C. G., Evans, W. E. & Relling, M. V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* **120**, 1165–1174 (2012).
3. Loghavi, S., Kutok, J. L. & Jorgensen, J. L. B-Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **144**, 393–410 (2015).
4. Basha, R., Sabnis, N., Heym, K., Bowman, W. P. & Lacko, A. G. Targeted Nanoparticles for Pediatric Leukemia Therapy. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
5. Arruebo, M. *et al.* Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications, Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Nanomater. J. Nanomater.* **2009** (2009).
6. Simon, T. *et al.* Design of FLT3 Inhibitor - Gold Nanoparticle Conjugates as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Nanoscale Res. Lett.* **10**, 1–10 (2015).
7. Yeh, Y.-C., Creran, B. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* **4**, 1871–1880 (2012).
8. Pellegrino, T. *et al.* On the Development of Colloidal Nanoparticles towards Multifunctional Structures and their Possible Use for Biological Applications. *Small* **1**, 48–63 (2005).
9. Ruoslahti, E., Bhatia, S. N. & Sailor, M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J. Cell Biol.* **188**, 759–768 (2010).
10. Pernodet, N. *et al.* Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts. *Small* **2**, 766–773 (2006).

11. Jia, H. Y. *et al.* Potential Oxidative Stress of Gold Nanoparticles by Induced-NO Releasing in Serum. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 40–41 (2009).
12. Khlebtsov, N. & Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev* **40**, 1647–1671 (2011).
13. Yuan, H. *et al.* Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology* **23**, 075102 (2012).
14. Nagy-Simon, T. *et al.* Antibody conjugated, Raman tagged hollow gold-silver nanospheres for specific targeting and multimodal Dark Field/ SERS/ Two Photon-FLIM imaging of CD19(+) B lymphoblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2017). doi:10.1021/acsami.7b05145
15. De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenaabeele, P. & Moens, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* **38**, 1133–1147 (2007).
16. Zhang, Y., Yu, J., Birch, D. J. S. & Chen, Y. Gold nanorods for applications in biological imaging. in (eds Achilefu, S. & Raghavachari, R.) 79101H (2011). doi:10.1117/12.877156
17. Zhang, Y., Yu, J., Birch, D. J. S. & Chen, Y. Gold nanorods for fluorescence lifetime imaging in biology. *J. Biomed. Opt.* **15**, 020504-020504–3 (2010).
18. McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Faulds, K. & Graham, D. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. *Appl. Spectrosc.* **65**, 825–837 (2011).
19. Camp Jr, C. H. *et al.* High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nat. Photonics* **8**, 627–634 (2014).
20. Krishnan, V. *et al.* CD19-Targeted Nanodelivery of Doxorubicin Enhances Therapeutic Efficacy in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol. Pharm.* **12**, 2101–2111 (2015).
21. Sapra, P. & Allen, T. M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res.* **62**, 7190–7194 (2002).
22. Bernardi, A. *et al.* The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 711–729 (2013).
23. Halicka, H. D. *et al.* Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **2**, 25–39 (1997).
24. Ng, K. W., Leong, D. T. W. & Huttmacher, D. W. The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Eng.* **11**, 182–191 (2005).
25. Wang, S., Yu, H. & Wickliffe, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **25**, 2147–2151 (2011).
26. Kannan, & Jain, Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* **7**, 153–163 (2000).

## Diseminarea rezultatelor

### • Publicații

- i. **Tatar AS**, Nagy-Simon T, Tomuleasa C, Boca S, Astilean S, Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia, *J. Controlled Release* 238; 123-138 (2016), IF = 7.877. AIS = 1.825.
- ii. Nagy-Simon T, **Tatar AS**, Craciun AM, Vulpoi A, Jurj MA, Florea A, Tomuleasa C, Berindan-Neagoe I, Astilean S, Boca S, Antibody Conjugated, Raman Tagged Hollow Gold–Silver Nanospheres for Specific Targeting and Multimodal Dark-Field/SERS/Two

Photon-FLIM Imaging of CD19(+) B Lymphoblasts, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9(25), 21155-21168 (2017), IF = 8.097, AIS = 1.634

- iii. **Tatar AS**, Jurj A, Tomuleasa C, Florea A, Berindan-Neagoe I, Cialla-May D, Popp J, Astilean S, Boca S, CD19-targeted, Raman tagged Gold Nanourchins as theranostic agents against Acute Lymphoblastic Leukemia (submis la *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*)

• **Participări la conferențe –prezentări orale**

- i. Nagy-Simon T, **Tatar AS**, Craciun AM, Vulpoi A, Jurj MA, Florea A, Tomuleasa C, Berindan-Neagoe I, Astilean S, Boca S, Hollow Gold-Silver Nanospheres for Specific Targeting and Multimodal Imaging of CD19(+) B Lymphoblasts, *European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, September 2017, Amsterdam, Netherlands
- ii. **Tatar AS**, Jurj MA, Nagy-Simon T, Craciun AM, Berindan-Neagoe I, Florea A, Cialla-May D, Astilean S, Boca S, Novel theranostic agents against Acute Lymphoblastic Leukemia: CD19-targeting Gold Nanourchins, *2nd International Conference and Exhibition on Nanomedicine and Drug Delivery*, May 2018, Tokyo, Japan

• **Participări la conferențe – postere**

- i. **Tatar AS**, Nagy-Simon T, Boca S, Astilean S, Fabrication and conjugation of Au nanostars with Raman reporters for application in imaging and detection by SERS, *Raman4Clinics Summer School*, May 2016, Jena, Germany
- ii. **Boca S**, **Tatar AS**, Nagy-Simon T, Tomuleasa C, Astilean S, Spectroscopic active, antibody conjugated gold nanoparticles for acute lymphoblastic leukemia detection and treatment, *SPIE Optics + Photonics*, August 2016, San Diego, California, SUA
- iii. **Tatar AS**, Nagy-Simon T, Jurj MA, Berindan-Neagoe I, Tomuleasa C, Cialla-May D, Astilean S, Boca S, Anti-CD19 Gold Nanostars as New Therapeutic Vectors for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia, *2nd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'17)*, *2nd International Conference on Nanomedicine, Drug Delivery, and Tissue Engineering (NDDTE'17)*, April 2017, Barcelona, Spain
- iv. **Tatar AS**, Nagy-Simon T, Craciun A-M, Jurj MA, Berindan-Neagoe I, Astilean S, Boca S, Specific detection and imaging of Acute Lymphoblastic Leukemia cells using multimodal Gold Nanourchins, *FIRST COST ACTION CA17140 Training School, University of Trieste*, April 2019, Trieste, Italy.

*Cercetarea cuprinsă în această teză a fost suportată financiar de proiectul PN-II-RU-TE-2014-4-2426 (NanoMEDLeuKemist, director proiect Dr. Sanda Boca) și de Fondurile pentru Cercetare – Granturi Doctorale de la Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România.*