

Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Fizică
– Școala Doctorală de Fizică –

Rezumatul tezei doctorale

**Nanoparticule Proteice Încărcate cu
Fluorofori ca Agenți Teranostici pentru
Imagistica Intervențională și Terapia
Multimodală a Cancerului Ovarian**

Raluca Borlan

Conducător Științific
Prof. Dr. Simion Aștilean

Cluj-Napoca
2021

Introducere

La nivel global, cancerul este a doua cauză principală de deces, fiind răspunzător pentru mai mult de 25000 de cazuri noi în fiecare zi. În ciuda progreselor înregistrate în ultimii ani în cercetarea în oncologie, un număr limitat de tehnici noi au schimbat semnificativ cursul acestei boli. Aplicarea nanotehnologiei în medicină anunță o nouă paradigmă în lupta împotriva cancerului, oferind feedback în timp real medicilor oncologi pe parcursul operațiilor chirurgicale, contrar tehnicilor clasice de imagistică preoperatorie care nu pot fi puse în aplicare în sălile de operație. În general, intervenția chirurgicală este cea mai eficientă și totodată prima opțiune de tratament împotriva cancerului, în combinație cu tratamentul sistemic perioperator, cu toate acestea, recidiva acestei boli este o realitate clinică. În plus, dacă în urma operației raportul patologic descrie margini de rezecție pozitive, dată fiind starea postoperatorie precară a pacienților, o a doua intervenție chirurgicală prezintă riscuri majore.

În acest context clinic, în ultimii ani, nanoparticule de ultimă generație încărcate cu fluoroforii ce emit lumină în domeniul infraroșu apropiat (NIR) au câștigat popularitate ca și agenți de contrast fluorescenți pentru imagistica intervențională a cancerului. Implementarea fluoroforilor cu emisie în regiunea NIR a spectrului (700 nm-1200 nm), cunoscută și sub numele de *fereastră de transparență biologică*, oferă avantaje considerabile pentru imagistica tumorilor în timpul intervențiilor oncologice chirurgicale; printre avantajele radiației NIR se numără: autofluorescență scăzută, generând astfel imagini fără semnalul de fundal nespecific și penetrarea țesutului în profunzime. În prezent, la baza agenților de contrast NIR utilizați pentru imagistica de fluorescență stau fluoroforii organici în stare liberă. Însă, din cauza fotostabilității lor scăzute, a randamentului cuantic scăzut, tendinței de agregare în mediu fiziologic, timp de circulație scurt și proprietăți hidrofobe, comunitatea cercetătorilor caută alternative pentru utilizarea în administrare sistemică a fluoroforilor în formă liberă. Astfel, pentru a a-și menține și chiar spori utilitatea pentru o perioadă mai lungă de timp pe parcursul terapiei tumorale și al imagisticii moleculare, o tehnică ce ia amploare este încapsularea agenților terapeutici și fluorescenți NIR în nanopurtători țintiți, evitând astfel efectele citotoxice asupra țesuturilor vii. Nanoparticulele încărcate cu fluorofori, cu un diametru în intervalul optim de mărime, pot circula în sânge pentru o perioadă mai lungă de timp. În plus, datorită capacității mari de încărcare și a proprietăților de protejare a colorantului liber, nanoparticulele încărcate cu fluorofori depășesc fotostabilitatea slabă și alte neajunsuri ale agenților terapeutici și fluorescenți NIR în stare liberă. Un alt avantaj important al implementării nanoparticulelor fluorescente NIR ca agenți terapeutici și fluorescenți în detrimentul fluoroforilor liberi este acumularea lor preferențială în tumori. Acest fenomen poate fi realizat fie prin țintirea pasivă a tumorii mediată de efectul de permeabilitate și retenție îmbunătățită (efectul EPR), sau prin țintirea activă a markerilor specifici cancerului, prin decorarea nanoparticulelor cu anticorpi sau alți liganzi corespunzători. Astfel, prin inovațiile aduse în fabricarea și implementarea nanoparticulelor personalizate, agenții terapeutici și de contrast de

dimensiuni nano pot fi translați cu ușurință în practica medicală de zi cu zi pentru vizualizarea și rezecția tumorii, oferind chiar și asistență în tratamentul cancerului în sine.

În comparație cu performanțele terapeutice ale moleculelor libere, încapsularea agenților fotosensibili și termici în nanopurtători poate avea beneficii valoroase, datorită proprietăților fizice, fotochimice și biologice îmbunătățite. Astfel, nanoparticulele încărcate cu molecule NIR ce prezintă concomitent caracteristici fototermice și fotodinamice au dobândit atenție sporită ca agenți terapeutici duali pentru terapia fotodinamică (PDT) și fototermică (PTT) a cancerului. Mai mult, agenții fototerapeutici de dimensiuni nanometrice pot fi implementați ca adjuvanți în intervenții chirurgicale pentru combaterea acestei boli, sau pot acționa chiar și ca un vaccin capabil să detecteze și să distrugă celulele canceroase, prin activarea unui răspuns sistemic imun de tip antitumoral.

În continuare, teza mea de doctorat este alcătuită din două părți principale: **Prima Parte**, *Nanobiofotonica pentru medicină: Inovații și o scurtă trecere în revistă a literaturii* cuprinzând capitolele 1 și 2 și **A Doua Parte**, *Contribuții originale*, alcătuită din capitolele 3 până la 6.

Pentru a răspunde nevoilor actuale, **Capitolul 1**, *Preocupări oncologice și abordări nanobiofotonice de ultimă generație pentru tratament și imagistică*, rezumă provocările contemporane și soluțiile de top pentru diagnosticarea și tratarea cancerului, cu accent pe imagistica fluorescență NIR, PTT și PDT.

Capitolul 2, *O scurtă trecere în revistă a următoarei generații de nanoparticule proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională de fluorescență NIR a cancerului*, cuprinde progresele recente prezentate în literatură privind tehnicile de imagistică intervențională și subliniază importanța utilizării agenților de contrast NIR. În plus, capitolul 2 include o prezentare generală la zi a biocompatibilității, țintirii specifice și versatilității oferite de nanoparticulele proteice încărcate cu fluorofori NIR utilizate ca și de agenți anti-cancer de ultimă generație. Acest capitol cuprinde și o sinteză a celor mai noi și relevante studii clinice în imagistica de fluorescență intervențională NIR.

În **Capitolul 3**, *Dezvoltarea și caracterizarea nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori*, se concentrează pe proiectarea, fabricarea și caracterizarea fluoroforilor încapsulați în nanoparticulele pe bază de albumină. Astfel, patru molecule fluorescente au fost selectate după cum urmează: doi fluorofori aprobați de Food and Drug Administration (FDA) (Izotiocianat de Fluoresceină- FITC - și Verde de Indocianina- ICG) și doi coloranți fenotiazinici nou sintetizați, cu proprietăți optice ce variază din regiunea vizibilă și până în regiunea NIR a spectrul electromagnetic. Nanoparticulele de albumină au fost fabricate urmând un protocol în două etape, desolvatarea utilizând un solvent organic, anume etanol, și stabilizarea prin reticulare chimică cu glutaraldehidă. Ulterior, este prezentată caracterizarea optică și morfologică a tuturor celor patru tipuri de nanoparticule.

Capitolul 4, Țintirea și internalizarea de către celule de cancer ovarian a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori, se concentrează pe biofuncționalizarea nanoparticulelor nou dezvoltate cu molecule de acid folic sau anticorpi anti-receptorului de folat alpha, pentru a se lega în mod specific de proteina de legare a folatului supraexprimat la suprafața majorității celulelor de cancer ovarian. Acest capitol prezintă caracterizarea în soluție a nanoparticulelor de albumină vizate, alături de studii de stabilitate în timp. În plus, biocompatibilitatea și internalizare de către celule a nanoparticulelor nou sintetizate au fost investigate pe trei linii celulare diferite de cancer ovarian. Astfel, testele de viabilitate MTT au fost efectuate pentru a atesta caracterul necitotoxic al nanoparticulelor, în timp ce capacitățile lor îmbunătățite de țintire și mecanismele preferate de internalizare celulară au fost studiate prin implementarea imagisticii de fluorescență și microscopie electronice prin transmisie (TEM) *in vitro*.

Capitolul 5, Evaluarea și validarea activității fototerapeutice a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori, sublinează aplicabilitatea biomedicală a nanoparticulelor fototerapeutice, prin monitorizarea caracterului lor dual fototerapeutic în soluție, *in vitro*, *in vivo* și *ex vivo*. Investigațiile în soluție au determinat eficiența nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori de a converti lumina în căldură, precum și randamentul cuantic al acestora de a genera oxigen singlet, un produs citotoxic puternic. Efectul fototerapeutic multimodal al nanoparticulelor noastre de albumină a fost studiat *in vitro* utilizând testele MTT, imagistica de fluorescență și investigații de citometrie în flux pentru a determina viabilitatea celulară în urma expunerii la lumină. Pentru a atesta performanța nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori într-un model viu, s-au efectuat investigații *in vivo* și *ex vivo* pe șoareci purtători de tumori dezvoltate din celule umane de cancer ovarian. După administrarea nanoparticulelor, șoarecii au fost expuși la o lampă LED ce emite la lungimea de undă de 660 nm pentru a declanșa proprietățile fotodinamice ale nanoparticulelor și pentru a monitoriza în timp real procesul de tratament fototermic. În plus, în urma rezecției tumorale s-au efectuat examene histopatologice prin colorare xenogrefelor tumorale cu hematoxilină și eozină.

Ultimul capitol, **Capitolul 6, Punerea în lumină a potențialului nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională în timp real a cancerului ovarian**, este primul pas în validarea nanoparticulelor noastre de albumină încărcate cu fluorofori ca agenți de contrast țintiți pentru chirurgia oncologică ghidată prin imagistică de fluorescență în domeniul NIR. În continuare, am folosit trei tehnici de microscopie optică (microscopie de fluorescență convențională, imagistica timpului de viață (FLIM) și microscopie confocală) pentru a studia *in vitro* nanoparticulele noastre încărcate cu fluorofori nou dezvoltate. Capacitatea nanoparticulelor de țintire a celulelor de cancer ovarian a fost dovedită *in vitro* prin imagistica de fluorescență, în timp ce investigațiile FLIM au confirmat o modalitate de internalizare diferită a nanoparticulelor țintite, spre deosebire de nanoparticulele nețintite. Imagistica confocală de fluorescență NIR a fost utilizată pentru a demonstra potențialul nanoparticulelor încărcate cu fluorofori NIR de a fi translatate în viitorul apropiat ca agenți de contrast pentru detectarea *in situ* ghidată prin imagistică NIR, și rezecția țesutului canceros.

Pe scurt, prima parte a tezei mele de doctorat scoate la lumină progresele de ultimă oră făcute către translatarea în context clinic a nanoparticulelor proteice încărcate cu

fluorofori NIR, ca agenți de contrast în detectarea cancerului; în timp ce a doua parte oferă o perspectivă asupra validării nanoparticulelor nou dezvoltate ca agenți fototeranostici multimodali capabili să combine sinergistic imagistica de fluorescență și caracteristicile fototerapeutice duale pentru combaterea cancerului ovarian. Partea finală a rezumatului tezei mele, intitulată **Concluzii finale și perspective**, subliniază câteva dovezi concludente că nanoparticulele noastre personalizate, cu proprietăți optice de la vizibil la regiunea NIR a spectrului, sunt fezabile ca nanoagenți terapeutici și fluorescenți pentru intervenții oncologice în lupta nesfârșită împotriva acestei boli; unele perspective sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol.

“I am among those who think that science has great beauty.”

Marie Curie

Cuvinte cheie: fluorescență, nanoparticule, agenți de contrast fluorescenți, cancer ovarian, terapie fotodinamică, terapie fototermică, imagistică în infraroșu-apropiat.

Cuprins

Partea I. Nanobiofotonica pentru medicină: Inovații și o scurtă trecere în revistă a literaturii	1
Capitolul 1. Preocupări oncologice și abordări nanobiofotonice de ultimă generație pentru tratament și imagistică.....	1
1.1 Situația actuală.....	1
1.2 Agenți fotoactivi pentru imagistica și terapia oncologică	2
Capitolul 2. O scurtă trecere în revistă a următoarei generații de nanoparticule proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională de fluorescență NIR a cancerului	4
2.1 De ce este atât de râvnit domeniul NIR?	4
2.2 Implementarea nanotehnologiei în aplicații biomedicale.....	4
2.3 Nanoparticule proteice	5
Partea II. Contribuții originale	6
Capitolul 3. Dezvoltarea și caracterizarea nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori.....	6
3.1 Strategia de cercetare și fabricarea nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori.....	6
3.2 Caracterizare spectroscopică.....	8
3.3 Proprietăți fizice și randamentul de formare a particulelor	10
3.4 Interacțiunea albumină-colorant și eficiența de încărcare	12
Capitolul 4. Țintirea și internalizarea de către celule de cancer ovarian a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori.....	13
4.1 Biofuncționalizarea nanoparticulelor cu liganzi specifici cancerului ovarian	13
4.2 Caracterizarea în soluție a nanoparticulelor încărcate cu fluorofori și țintite.....	13
4.3 Studiul viabilității celulare	15
4.4 Microscopia de fluorescență pentru monitorizarea internalizării celulare.....	15
4.5 TEM pentru monitorizarea internalizării celulare	16
Capitolul 5. Evaluarea și validarea activității fototerapeutice a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori	18
5.1 Efecte fototerapeutice: investigații în soluție	18
5.2 Efecte fototerapeutice: investigații <i>in vitro</i>	20
5.3 Efecte fototerapeutice: investigații pe model murin.....	23

Capitolul 6. Punerea în lumină a potențialului nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională în timp real a cancerului ovarian.....	24
6.1 Imagistică de fluorescență în domeniul vizibil: nanoparticule de albumină încărcate cu FITC.....	24
6.2 Imagistică de fluorescență în domeniul roșu intens: nanoparticule de albumină încărcate cu phthalonitril Investigații FLIM	25 26
6.3 Imagistică de fluorescență în domeniul NIR: nanoparticule de albumină încărcate cu ICG	29
Concluzii finale și perspective	31
Referințe	35
Diseminare	37

Partea I. Nanobiofotonica pentru medicina: Inovatii si o scurta trecere in revista a literaturii

Capitolul 1. Preocupari oncologice si abordari nanobiofotonice de ultima generatie pentru tratament si imagistica

1.1 Situația actuală

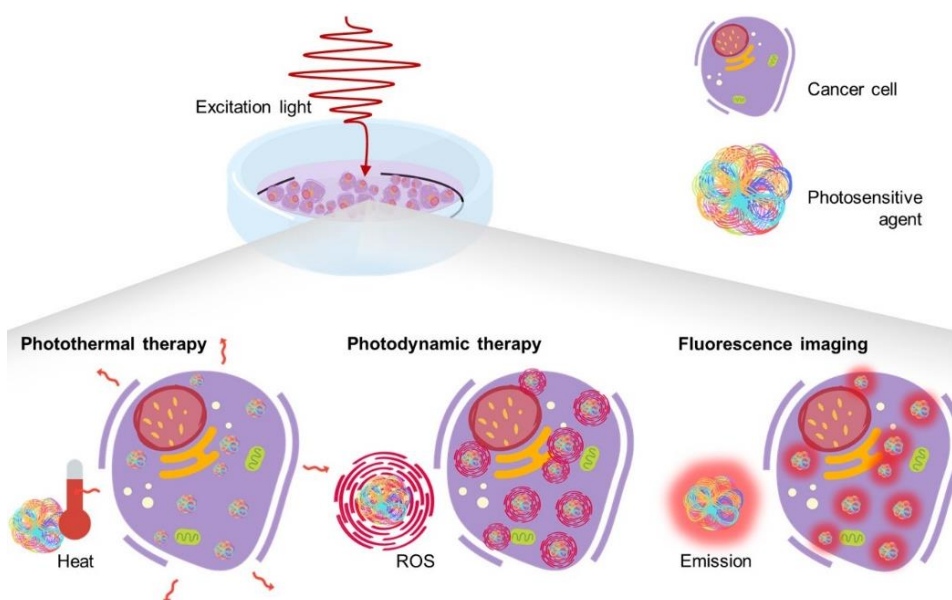
La nivel mondial, cancerul este a doua cauză de mortalitate, atingând până în 2018 un înfricoșător număr total de 9,6 milioane de decese¹, în timp ce până în 2017 1,3% din populația planetei fusese diagnosticată cu această boală². În rândul persoanelor de sex feminin, cancerul ovarian este al 5-lea ca frecvență și al 6-lea ca și cauză de deces de cauză tumorală³, cu peste 200.000 de cazuri fatale în anul 2020. Există trei tipuri de celule ce stau la baza majorității tumorilor ovariene benigne sau maligne: celulele epiteliale, celulele stromale și celulele germinative. Aproape toate tumorile ovariene maligne sunt celule epiteliale la origine. Receptorul de folat alpha (FR α) este o proteină de suprafață supraexprimată în multe tumori maligne epiteliale și în 80% din tumorile maligne epiteliale ovariene, în timp ce expresia sa în țesutul sănătos este în mare parte absentă. Deci, supraexprimarea în acest tip de tumori sugerează faptul că acest antigen ar putea avea potențial ca marker în diagnostic.

Deși un volum enorm de cercetare a fost condus în secolul trecut pentru îmbunătățirea opțiunilor actuale de tratament ale cancerului, nu s-au realizat modificări marcante ale schemelor de tratament standard, și anume intervențiile chirurgicale⁴. Mai mult, niciuna dintre metodele de investigație prin imagistică folosite pentru detecția tumorii și pregătirea preoperatorie, de exemplu tomografia computerizată, tomografia cu emisie de pozitroni, tomografia cu emisie de fotoni individuali, scintigrafie planară, imagistică prin rezonanță magnetică, nu poate fi translatată intraoperator datorită accesibilității reduse în zona de interes chirurgical și a erorilor apărute odată cu modificarea poziției pacientului⁵⁻⁷. De asemenea, chiar dacă ochii cu rezoluție înaltă (50 μm^8) și mâinile chirurgilor pot diferenția ușor structurile anatomice, în timpul rezecției este dificilă deosebirea între țesuturilor sănătoase și a celor maligne, rezultând în ectomia de țesut indemn sau rezecție incompletă. După intervenția chirurgicală, pentru primirea analizei anatomo-patologice timpul de așteptare poate ajunge la 7 zile, iar în cazul unui rezultat nefavorabil (marginii de rezecție pozitive), o reintervenție nu este recomandată, pacientul fiind încă în convalescență^{4,8}. Deci, o nouă strategie în detecția și tratarea cancerului ce oferă simultan și feed-back intraoperator în timp real își face simțită nevoia⁶.

1.2 Agenți fotoactivi pentru imagistica și terapia oncologică

O direcție nouă în tratarea și detectarea țesutului malign este domeniul multidisciplinar al biofotonicii. Biofotonica se axează pe interacțiunea dintre lumină și țesutul biologic și este formată din diferite ramuri științifice, cum ar fi fotonica, optica, biotehnologia și nanotehnologia. Fiind mai puțin nocivă ca terapia genomică, chemoterapia sau alte tratamente uzuale, biofotonica s-a remarcat printre oncologi în ultimii ani ca o tehnică emergentă în tratamentul și chiar detectia cancerului, oferind posibilitatea unei detecții precoce. Mai mult, numeroase tehnici spectroscopice de bază pot fi prompt aplicate ca unelte ale biofotonicii, oferind o mai bună perspectivă în prezent sau chiar în viitor asupra planului de tratament sau a abordărilor de diagnosticare.

În ultimii ani, fototerapia și imagistica de fluorescență au început să se impună în activitatea medicală clinică sub formă de tehnici terapeutice și diagnostice non-invazive în tratamentul oncologic ambulatoriu, oferind feed-back în timp real în timpul rezecției tumorale^{9,10}. Aceste practici fundamentate pe interacțiunea luminii se bazează pe proprietățile moleculelor fotoactive de a absorbi lumina și reveni la starea fundamentală prin i) generare de căldură, ii) încrucișare intersistem (intersystem crossing) și iii) emisie de fluorescență. Fiecare cale de disipare a energiei poate fi atribuită unui tratament specific sau unei metode de diagnostic, respectiv PTT, PDT și imagistica de fluorescență¹¹, după cum este ilustrat și în **schema 1.1**.

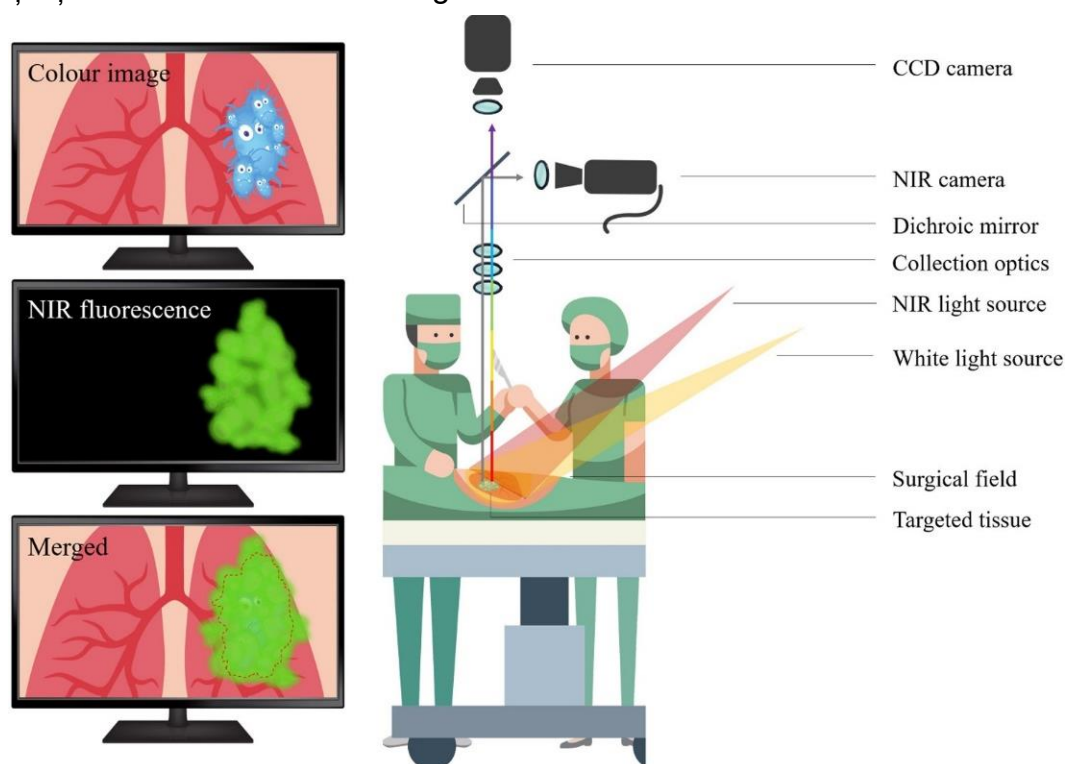


Schema 1.1. Reprezentare schematică a capacităților sinergice fototermice, fotodinamice și de fluorescență ale agenților fotoactivi.

PDT este un tratament alternativ promițător pentru metodele standard preferate în prezent¹², folosit nu numai pentru tratarea curativă a cancerelor în stadii precoce, ci și

ca o alegere eficientă în terapia cancerelor în stadii avansate, adjuvantă intervenției chirurgicale¹³. În prezența oxigenului molecular (O_2), reacția fotochimică dintre agenții fotosensibilizatori și lumină¹⁴ duc la formarea unor specii reactive de oxigen (ROS) puternic citotoxice, în predominantă oxigenul singlet (1O_2) și alți radicali toxici¹⁵⁻¹⁷. Este important de notat că FDA a aprobat deja PDT ca procedură medicală pentru diverse tipuri și stadii de cancer, folosind în general ca agenți fotosensibilizatori molecule de ftalocianină, porfirină, clorină sau bacterioclorină^{9,16}.

O altă terapie oncologică ce are potențial să fie translatată în practica clinică este PTT. Adicional luminii, această terapie implică agenți termici ce absorb și apoi transformă lumina în căldură atunci când radiația electromagnetică este de o lungime de undă corespunzătoare. Ca aplicație biomedicală, aceste tratamente termice se bazează pe încălzirea locală a țesutului sau a organului de interes, într-un spațiu temporal foarte specific. Acest tip de tratament este foarte eficient în teorie, dar în practică prezintă numeroase dezavantaje în folosirea agenților termici în stare liberă, datorită dificultății în a diferenția țesutul sănătos de cel malign^{18,19}.



Schema 1.2. Reprezentare schematică a unui câmp operator și a unui sistem de imagistică de fluorescență NIR ce redă în timp real, simultan, două canale imagistice.

În comparație cu alte metode imagistice convenționale, tehnica de imagistică de fluorescență (**Schema 1.2**) este folosită pentru detecția fotonilor emiși de țesutul indemn, după administrarea unor agenți de contrast țintiți, oferind imagini de o rezoluție înaltă ce pot detecta leziuni chiar și mai mici de 10 μm .

Capitolul 2. O scurtă trecere în revista a următoarei generații de nanoparticule proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională de fluorescență NIR a cancerului

2.1 De ce este atât de râvnit domeniul NIR?

Folosirea coloranților ce absorb și emit lumină în domeniile spectrale roșu intens și NIR au reprezentat punctul de cotitură în a depăși principalele obstacole (de ex. absorbția de către țesut și sânge, împrăștierea luminii sau autofluorescența țesutului) ce limitau imagistica prin fluorescență în regiunea ultraviolet-vizibilă (UV-Vis), făcând posibilă imagistica calitativă a unei singure celule sau unei secțiuni subțiri de țesut. În timp ce proteinele, melanina, hemoglobina și apa au coeficienți mari de absorbție de-a lungul întregului spectru UV-Vis – 200-650 nm²⁰, și colagenul absoarbe la lungimi de undă de peste 1450 nm²⁰, penetrația tisulară este maximă (până la 2 cm⁸) când utilizăm lumină cu lungimi de undă în intervalul 650-1450 nm al spectrului electromagnetic, cunoscut și sub numele de fereastră optică a țesutului biologic. Ca urmare, în ultimii ani, agenții pentru imagistica de fluorescență NIR și agenții fotoactivi NIR implementați în cercetarea preclinică a primit la nivel global atenție substanțială^{6,20}.

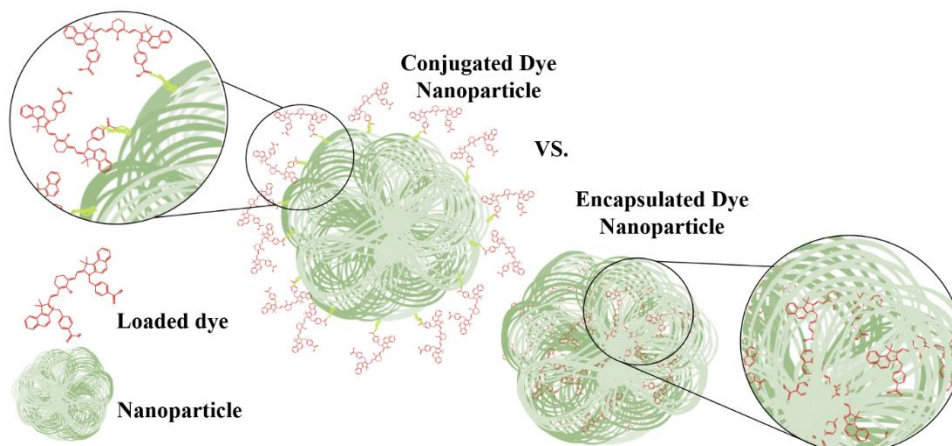
Coloranții organici sunt prima opțiune ca agenți de contrast pentru imagistica biomedicală, și majoritatea pot fi catalogați ca squarine, BODIPY, porfirine, ftalocianine sau cianine^{20,21}. Etalonul și totodată cel mai des utilizat fluorofor, anume ICG, pentru aplicații *in vivo* de succes, continuă să aparțină popularei familii a **cianinelor**. Primul colorant cianinic sintetizat a fost descris ca *un solid albastru* de Williams în 1856 și, de atunci, acești coloranți au fost folosiți într-o gamă largă de domenii, de la vopsele la aplicații biomedicale.

2.2 Implementarea nanotehnologiei în aplicații biomedicale

Pentru a depăși obstacolele întâmpinate în administrarea de coloranți în stare liberă, cum ar fi hidrofobicitatea, tendința de agregare, randamentul cuantic scăzut și fotostabilitatea scăzută, o tehnică inovativă este încapsularea sau conjugarea agenților fluorescenți (**Schema 2.1**) cu diverse nanoparticule (NPs)^{21,22}.

Astfel, pe parcursul ultimilor ani, cercetătorii s-au dedicat implementării NPs ca agenți de contrast sau terapeutici personalizați pentru fototerapie și imagistica medicală, datorită abilității lor de a fi încărcate eficient cu diverși agenți fototeranostici NIR și astfel evitând obstacolele folosirii acestora în stare liberă^{23,24}. Mai mult, unele NPs, cu diametru în intervalul optim, pot traversa bariera hematoencefalică cu ușurință²⁴ și au capacitatea de a se acumula preferențial la nivelul celulelor tumorale, fie prin țintire pasivă, mediată de efectul EPR, fie prin țintire activă, prin conjugarea cu liganzi tumorali specifici^{24,25}. Pe de altă parte, în ciuda numeroaselor studii conduse pentru o mai bună

înțelegere a interacțiunii dintre NPs sintetice și sistemele biologice, numai un mic procent, 2%, s-au implementat în practica clinică¹⁴. Ca urmare, o alternativă atrăgătoare a NPs sintetice este reprezentată de versatile, nontoxicele și biodegradabilele NPs pe bază de proteine, încărcate cu fluorofori NIR, ca agenți de contrast medicali^{14,23}.



Schema 2.1. Reprezentare schematică a NPs proteice conjugate vs. încapsulate cu fluorofori cu emisie în domeniul NIR.

2.3 Nanoparticule proteice

Până în ziua de azi, albumina rămâne la baza NPs proteice, grație biodegradabilității și biocompatibilității ei, dar și datorită capacității de a fi conjugată cu o gamă largă de coloranți, substanțe farmaceutice, fotosensibilizatori sau alți compuși bioactivi^{24,26}. Albumina este cea mai abundentă proteină plasmatică iar în scopuri comerciale poate fi izolată din albușul de ou, ser de șobolan, ser bovin (albumină serică de bovine (BSA)) și ser uman (albumină serică umană (HSA) – aprobată de FDA). Având în vedere similitudinile dintre cele două proteine cu aspect tridimensional de inimă, BSA (583 de aminoacizi, greutate moleculară 69.3 kDa) și HSA (585 aminoacizi, greutate moleculară 66.5 kDa), un număr crescut de nanoparticule pe bază de HSA și BSA se află în studii clinice în acest moment^{23,26}. NPs proteice au câștigat popularitate și ca agenți de contrast medicali, datorită abilității lor de a încapsula sau de a fi conjugate cu un spectru larg de coloranți. Un agent de contrast NIR intens studiat pentru imagistica de fluorescență a numeroase tipuri de cancer sunt versatile, biocompatibilele și biodegradabilele HSA NPs încărcate cu ICG. NPs pe bază de albumină au fost dezvoltate în diverse dimensiuni și au fost funcționalizate cu felurite liganzi cu scopul de a optimiza și studia performanțele acestora de țintire și livrare *in vivo* și *in vitro*, oferind astfel în viitorul apropiat posibilitatea unui tratament superior și personalizat. Chen et al.²⁷ și Sheng et al.²⁸ au studiat *in vivo* acumularea și biodistribuția HSA NPs încărcate cu ICG, administrate intravenos șoricilor purtători de tumori, după inocularea subcutanată cu celule 4T1 (carcinom mamar murin). Ambele studii au demonstrat un timp de viață prelungit al HSA NPs încărcate cu ICG comparativ cu cel al ICG liber,

probabil datorită țintirii pasive mediată de efectului EPR, luând în considerare dimensiunea mai mare a HSA NPs în comparație cu moleculele de colorant liber.

Pe final, nevoia tot mai mare de a implementa în studiile clinice o nouă generație de agenți fototeranostici, pentru o mai bună internalizare intratumorală a produsului farmaceutic de interes sau un contrast tumoral intraoperator superior, bazată pe aceleași sau alte molecule NIR, dar încărcate în nanostructuri cum ar fi NPs, este de necontestat. Mai mult, este important de reținut că dintre cele mai mult de 60 de NPs aprobate în prezent de către FDA pentru utilizare în studii clinice²⁹, majoritatea celor implicate în studii oncologice sunt NPs organice³⁰. Deci, cu diametru în intervalul potrivit țintirii pasive (10-300 nm³¹) mediate de efectul EPR, având o chimie de suprafață versatilă ce permite țintirea activă a celulelor tumorale, și cu numeroase studii preclinice ce atestă biocompatibilitatea și eficiența lor ca agenți de fluorescență, NPs proteice fluorescente NIR prezintă un potențial strălucitor ca agenți de contrast pentru imagistica de fluorescență NIR în timp real a cancerului în studii clinice.

Acest articol review a fost publicat în revista International Journal of Nanomedicine, 16 (March 2021): 2147–71.

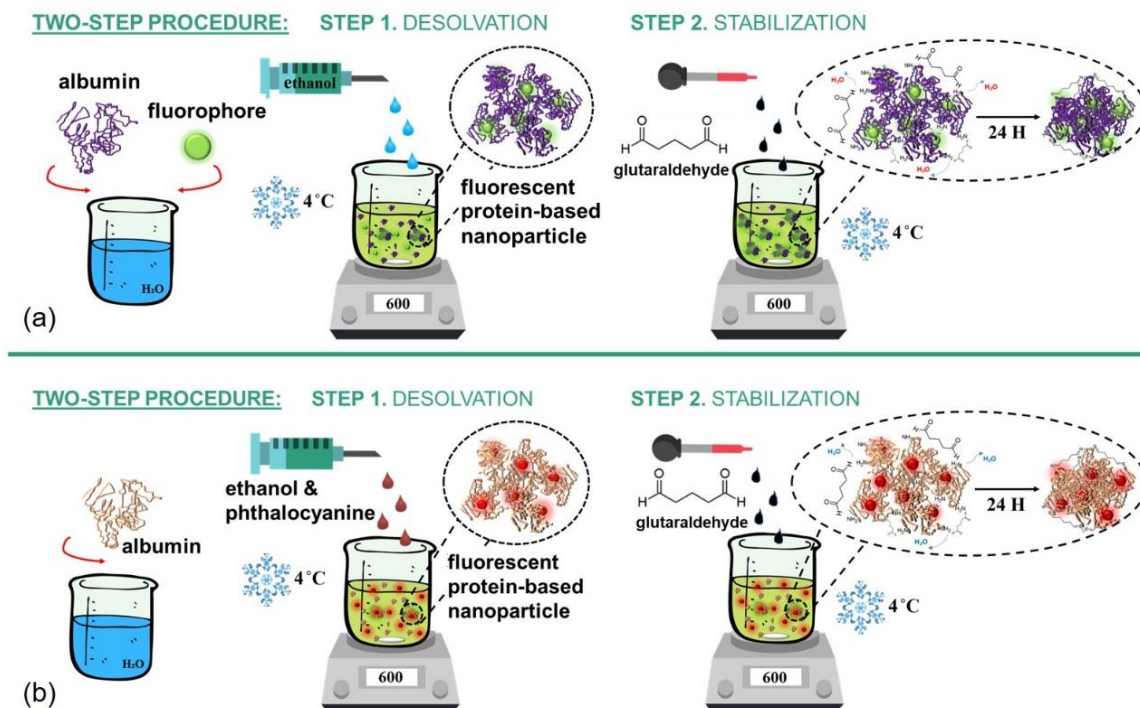
Partea II. Contributii originale

Capitolul 3. Dezvoltarea și caracterizarea nanoparticulelor de albumina încărcate cu fluorofori

3.1 Strategia de cercetare și fabricarea nanoparticulelor de albumină încărcate cu fluorofori

Având în vedere că se investesc eforturi semnificative în dezvoltarea și optimizarea agenților fototerapeutici și a celor de contrast pentru imagistica de fluorescență, dorindu-se implementarea lor în aplicații medicale relevante, scopul tezei mele de doctorat este de a proiecta agenți de dimensiuni nano inovativi pentru imagistica în timp real și / sau PTT și PDT a cancerului. Pentru a depăși dezavantajele utilizării în administrarea sistemică a coloranților liberi, cum ar fi instabilitatea în mediu apos, timpul scurt de circulație, fotodegradarea rapidă și randamentele cuantice reduse de fluorescență, primul obiectiv a fost proiectarea NPs proteice, mai exact BSA și HSA, și încărcarea lor cu patru coloranți diferiți, selectați astfel încât răspunsurile optice ale acestora să fie cuprinse de la regiunea vizibilă la regiunea NIR a spectrului electromagnetic. Concret, am fabricat într-o manieră reproductibilă NPs proteice încărcate cu fluorofori (**Schema 3.1**) urmând un procedeu în două etape modificat și

adaptat: i) desolvatarea utilizând un solvent organic, etanol și ii) stabilizarea prin reticulare chimică cu glutaraldehidă (Gal) ^{32,33}.



Schema 3.1. Reprezentarea schematică a procesului de sinteză în doi pași a NPs pe bază de albumină fluorescente.

Mai exact, întrucât chirurgia ghidată prin fluorescență poate fi în viitorul apropiat un instrument fezabil pentru detectarea în timp real a diferitelor tipuri de cancer⁸, doi coloranți fluorescenți aprobați de FDA, și anume FITC (maxim de emisie: 522 nm) și ICG (maxim de emisie: 811 nm), au fost folosiți mai departe pentru încărcarea lor în NP de albumină. Mergând mai departe, unitatea fenotiazinică este un element de construcție versatil în proiectarea fotosensibilizatorilor promițători de a doua generație ³⁴ pentru terapia fotodinamică³⁵ și fototermică ³⁶. Comparativ cu alți fluorofori ce emit în domeniile roșu intens / NIR, ftalocianinele prezintă chimio- și fotostabilitate excelentă, toxicitate scăzută în absența luminii, randament cuantic bun de a genera ¹O₂ ³⁷, însă, limitarea lor principală este solubilitatea scăzută și tendința de agregare în apă. Astfel, pentru a suprima neajunsurile administrării agenților fototeranostici în starea lor liberă, moleculele nou sintetizate phthalONO₂ (maxim de emisie: 690 nm) și phthalONH₂ (maxim de emisie: 796 nm) au fost încapsulate în NPs de albumină pentru studii de imagistică de fluorescență și aplicații terapeutice multimodale ulterioare. Cei doi coloranți din familia ftalocianinelor au fost selectați deoarece, în forma lor liberă, echilibrul fin dintre cele trei funcții intrinseci ale moleculelor NIR le permite să acționeze în același timp ca agenți fotosensibili, termici și de contrast. În secțiunile următoare, m-

am concentrat asupra proiectării și caracterizării NPs de HSA încărcate cu: FITC (denumite în continuare HSA&FITC NPs), phthaloNO₂ (denumite în continuare HSA&phthaloNO₂ NPs) și ICG (denumite în continuare HSA&ICG NPs) și NPs de BSA încărcate cu phthaloNH₂ (denumite în continuare BSA&phthaloNH₂ NPs). Apoi, am decorat NPs nou fabricate cu liganzi ai cancerului ovarian și s-au efectuat studii *in vitro*. Aplicațiile lor biomedicale, anume imagistica intervențională de fluorescență și efectul terapeutic multimodal al NPs de albumină au fost studiate *in vitro* și pe modele murine.

3.2 Caracterizare spectroscopică

Benzile de absorbție ale FITC dezvăluie sensibilitatea colorantului la mediul înconjurător, după cum se poate observa în **figura 3.1 (a)**. În urma încapsulării colorantului, dar înainte de stabilizare cu Gal a HSA&FITC NPs, se poate observa o deplasare batocromă a maximului benzii de absorbantă specifice fluoroforului FITC (maxim de absorbție: 498 nm), în timp ce pentru HSA&FITC NPs în forma lor finală (maxim de absorbție: 491 nm) se poate distinge o deplasare hipocromă, în comparație cu soluția FITC liberă (maxim de absorbție: 494 nm).

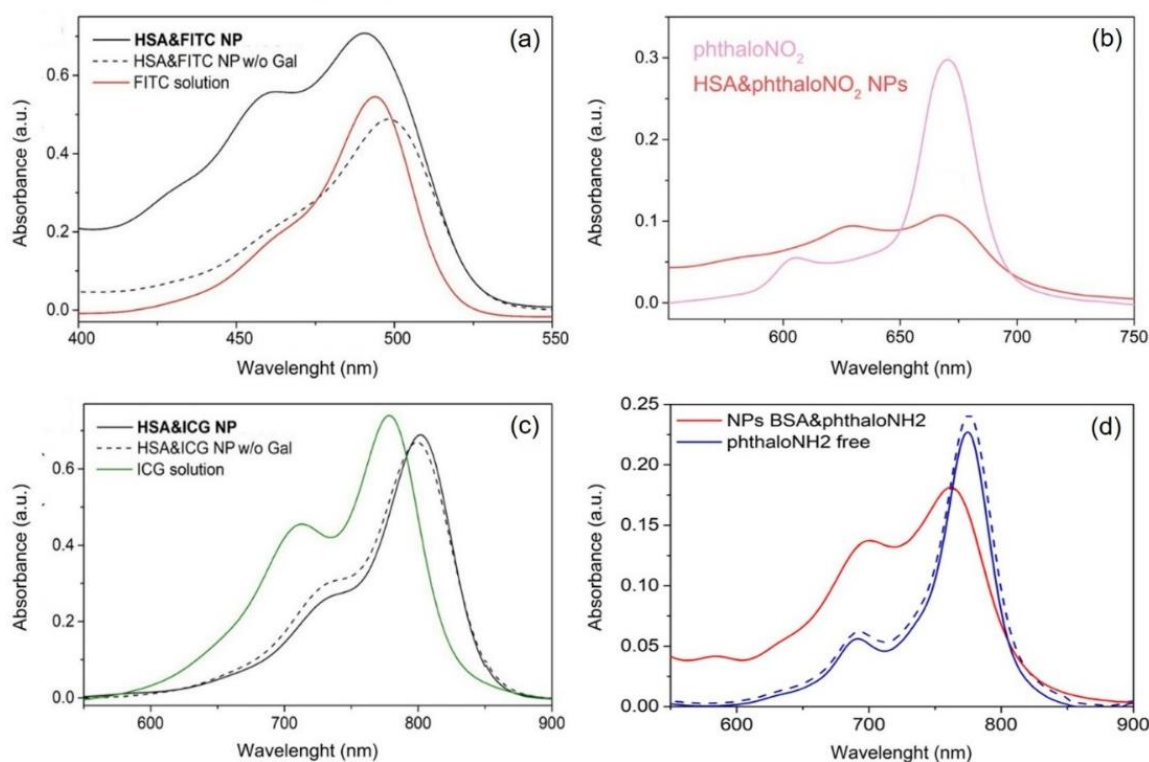


Figura 3.1. Spectrele de absorbantă ale (a) soluției de FITC liber (roșu) și HSA&FITC NPs înainte (linie întreruptă) și după (linie continuă) stabilizare cu Gal; (b) soluției de phthaloNO₂ liber (roz) și HSA&phthaloNO₂ NPs; (c) soluției de ICG liber (verde) și HSA&ICG NPs înainte (linie întreruptă) și după (linie continuă) stabilizare cu Gal; și (d) soluției de phthaloNH₂ liber (albastru) și HSA&phthaloNH₂ NPs, la 25 °C (linie întreruptă) și la 37 °C (linie continuă).

Un alt indicator al formării de HSA NPs fluorescente este împrăștierea Rayleigh prezentă în regiunea albastră a spectrului de absorbantă a HSA& FITC NPs. Maximul de emisie al soluției de FITC liber (maxim de emisie: 522 nm) prezintă deplasări spre roșu de 2, respectiv 3 nm în comparație cu HSA&FITC NPs fără Gal (maxim de emisie: 524 nm) și HSA&FITC NPs în starea lor finală (maxim de emisie: 525 nm) (**Figura 3.2 (a)**).

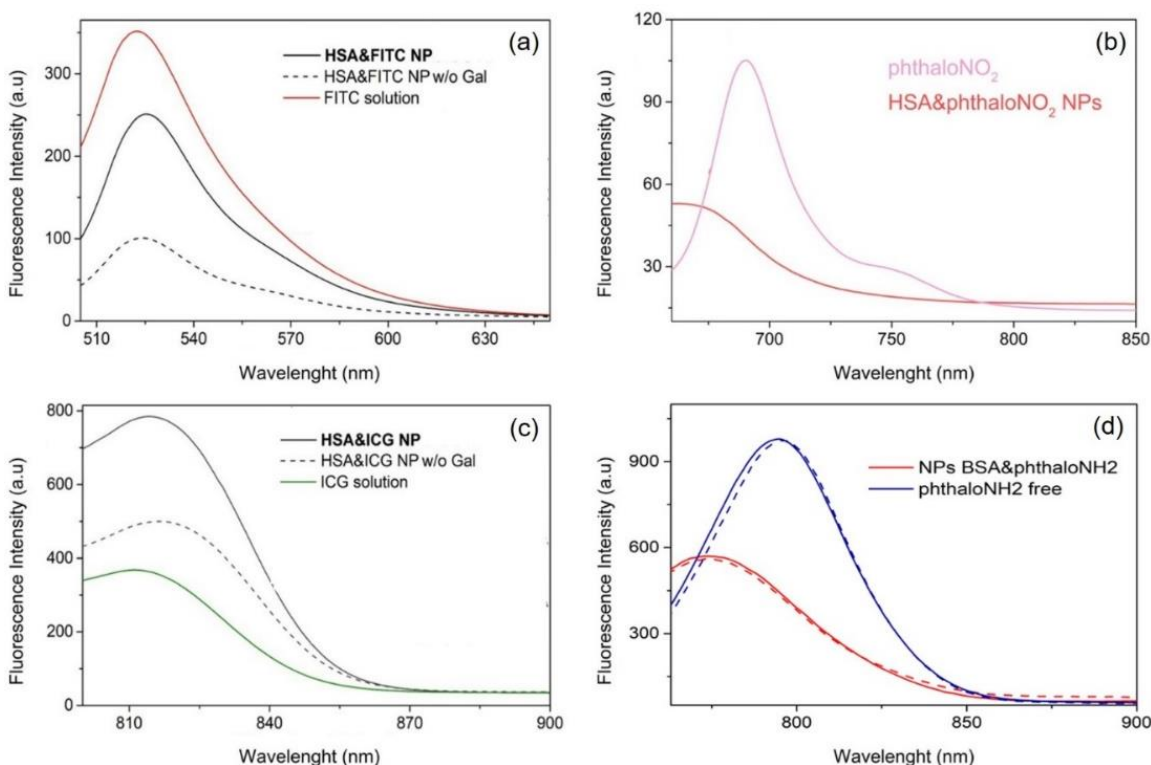


Figura 3.2. Spectre de emisie de fluorescență steady-state ale (a) soluției de FITC liber (roșu) și HSA&FITC NPs înainte (linie întreruptă) și după (linie continuă) stabilizare cu Gal; (b) soluției de phthaloNO₂ liber (roz) și HSA&phthaloNO₂ NPs; (c) soluției de ICG liber (verde) și HSA&ICG NPs înainte (linie întreruptă) și după (linie continuă) stabilizare cu Gal; și (d) soluției de phthaloNH₂ liber (albastru) și HSA&phthaloNH₂ NPs, la 25 °C (linie întreruptă) și la 37 °C (linie continuă).

În paralel cu NPs fluorescente de HSA menționate mai sus, formarea HSA&phthaloNO₂ NPs a fost confirmată de deplasarea hipocromică de 2 nm ce poate fi remarcată în spectrele de absorbție (**Figura 3.1 (b)**); dar și o deplasare spre albastru de 27 nm prezentă în spectrele de emisie de fluorescență (**Figura 3.2 (b)**) ale phthaloNO₂ după încapsularea în HSA NPs. O modificare semnificativă în aspectul spectrelor de absorbantă a phthaloNO₂ poate fi observată înainte și după încapsulare în NPs proteice, sugerând un comportament susceptibil al moleculei la schimbări în mediul său imediat. Mai mult decât atât, scăderea intensității fluorescenței și a deplasării

hipocromice a fluoroforului phthaloNO₂ după formarea HSA NPs indică încărcarea fluoroforului în buzunarele proteinei HSA.

Având în vedere că comportamentul fotofizic al colorantului ICG poate fi ușor influențat de schimbările din mediu, după formarea HSA&ICG NPs, intensitatea fluorescenței complexului a fost puternic crescută (**Figura 3.2 (c)**); o deplasare batocromică de 24 nm (**Figura 3.1 (c)**) a benzii de absorbantă a HSA&ICG NPs atribuită moleculei ICG (maxim de absorbție: 802 nm) în raport cu banda de absorbantă a soluției de ICG liber în apă (maxim de absorbție: 778 nm) poate fi observată. Similar cu ICG, deși se poate remarca o deplasare de doar 3 nm înspre roșu (**Figura 3.1 (c)**) între banda de absorbantă a HSA&ICG NP fără Gal (maxim de absorbție: 799 nm) și HSA&ICG NPs, există o creștere notabilă a intensității de fluorescență a HSA&ICG NPs (maxim de emisie: 814 nm) în comparație cu HSA&ICG NPs fără Gal (maxim de emisie: 816 nm) (**Figura 3.2 (c)**), indicând o configurație favorabilă emisie de fluorescență a colorantului în interiorul HSA NPs după stabilizare prin reticulare chimică cu Gal.

Pasul următor a fost să comparăm phthaloNH₂ liber cu BSA&phthaloNH₂ NPs sintetizate anterior la temperatura camerei, 25 ° C și la o temperatură relevantă din punct de vedere biologic, 37 ° C, pentru a confirma adaptabilitatea NPs în aplicații biomedicale. În spectrele de absorbție (**Figura 3.1 (d)**) și emisiile de fluorescență (**Figura 3.2 (d)**) am prezentat măsurători ale spectrelor atât la 25 ° C, cât și la 37 ° C. Putem observa că maximele de absorbție și emisie pentru BSA&phthaloNH₂ NPs nu se modifică odată cu creșterea temperaturii, fiind constante atât la 25 ° C (linie punctată), cât și la 37 ° C (linie continuă). Urmând același model, spectrele de absorbantă (**Figura 3.1 (d)**) ale phthaloNH₂ liber au același maxim de absorbție atât la 25 ° C (linie punctată) cât și la 37 ° C (linie continuă), anume 775 nm, însă putem observa o ușoară scădere în intensitate pe măsură ce temperatura crește. Emisia de fluorescență a BSA&phthaloNH₂ NPs prezintă modificări în comparație cu phthaloNH₂ liber datorită schimbărilor din mediu imediat înconjurătoare a moleculelor de phthaloNH₂ odată încapsulate în BSA NPs.

3.3 Proprietăți fizice și randamentul de formare a particulelor

După cum se poate observa și în **figura 3.3**, dimensiunile NPs de albumină încărcate cu fluorofori nou dezvoltate, relevate prin investigații TEM, sunt în concordanță cu diametrele medii hidrodinamice al NPs de albumină determinate prin măsurători de Împrăștiere Dinamică a Luminii (DLS) (**Tabel 3.1**). Toate cele patru tipuri de NPs de albumină încărcate cu fluorofori au prezentat suprafețe încărcate negativ, după cum s-a evidențiat prin măsurători ale potențialului zeta (**Tabelul 3.1**). Mergând mai departe, așa cum s-a sugerat deja în reprezentarea schematică (**Schema 3.1**) a sintezei în doi pași a NPs fluorescente, Gal a fost utilizat ca un reactiv carbonil agresiv ce condensează aminele, ducând la o scădere de 69.3% și 69.4% în diametru pentru HSA & FITC și

HSA & ICG NPs și o scădere de 2.5, respectiv 4.3 mV în măsurătorile potențialului zeta. Aceste rezultate sunt rezumate în **tabelul 3.1**.

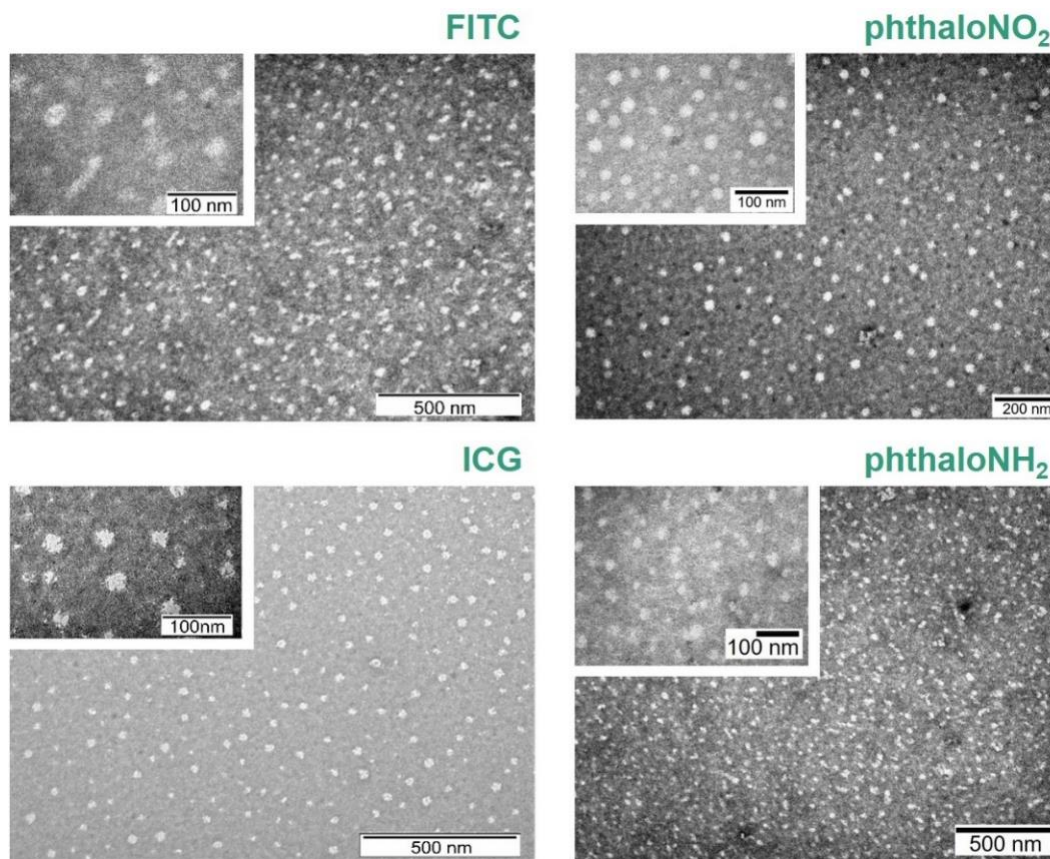


Figura 3.3. Imagini TEM reprezentative ale HSA&FITC, HSA&phthalONO₂, HSA&ICG și BSA&phthalONH₂ NPs, la magnificări mari și mici.

Tabel 3.1. Măsurători de potențial-zeta și DLS ale HSA&FITC, HSA&phthalONO₂, HSA&ICG și BSA&phthalONH₂ NPs.

	zeta-potential (mV)	diameter (nm)	PDI	decrease in diameter after stabilization with Gal (%)
HSA&FITC NPs	-12.9 ± 0.4	31.26 ± 0.53	0.23 ± 0.01	69.3
before stabilization with Gal	-10.4 ± 0.2	101.40 ± 2.12	0.23 ± 0.01	
HSA&phthalONO₂ NPs	-13.8 ± 1.2	21.3 ± 0.20	0.19 ± 0.02	–
HSA&ICG NPs	-15.1 ± 1.6	25.86 ± 0.17	0.25 ± 0.01	69.4
before stabilization with Gal	-10.8 ± 0.2	84.85 ± 1.18	0.23 ± 0.01	
BSA&phthalONH₂ NPs	-12.6 ± 0.9	28.54 ± 0.42	0.19 ± 0.03	–

Pentru a calcula randamentul de formare a particulelor în cazul NPs de albumină încărcate cu fluorofori nou dezvoltate a fost efectuată o curbă de calibrare pentru mai multe soluții de albumină de diferite concentrații (1, 2, 3, 4 și 5%) și densitatea optică de absorbantă a acestora înregistrată la 277 nm. Soluțiile stoc utilizate pentru diluțiile seriale ale soluțiilor apoase de albumină standard au avut aceleași concentrații precum soluțiile stoc utilizate în fabricarea NPs de albumină încărcate cu fluorofori. Randamentele de formare a particulelor pentru NPs de HSA și BSA au fost calculate ca procent din concentrația proteinei la momentul inițial al sintezei. Aceste rezultate (**Tabelul 3.2**) confirmă o rată de formare a particulelor impresionantă, alături de buna reproductibilitate a sintezei. Erorile standard au fost calculate pentru măsurători înregistrate în triplicat.

Tabel 3.2. Randamentul de formare a particulelor pentru HSA&FITC NPs, HSA&phthaloNO₂ NPs, HSA&ICG NPs și BSA&phthaloNH₂ NPs.

	FITC	phthaloNO ₂	ICG	phthaloNH ₂
Particle yield (%)	77.6 ± 4.1	73.7 ± 3.9	77.9 ± 6.1	75.8 ± 1.3

3.4 Interacțiunea albumină-colorant și eficiența de încărcare

Ulterior, s-au calculat curbe de calibrare pentru cei patru fluorofori, utilizând soluții de concentrații diferite (FITC @ PBS (7 x 10⁻⁶ până la 10⁻⁴ M), phthaloNO₂@DMSO (7.5 x 10⁻⁷ până la 2.5 x 10⁻⁵ M), ICG (10⁻⁶ până la 10⁻⁴ M) și phthaloNH₂@DMSO (7.5 x 10⁻⁷ până la 2.5 x 10⁻⁵ M)) și densitatea optică de absorbantă înregistrată la 504 nm pentru FITC, 672 nm pentru phthaloNO₂, 795 nm pentru ICG, respectiv 774 nm pentru phthaloNH₂. Soluțiile stoc utilizate pentru diluțiile seriale ale soluțiilor de colorant standard au avut aceleași concentrații ca soluțiile stoc utilizate în fabricarea NPs de albumină. Am determinat eficiența de încărcare a FITC și ICG rezolvând **ecuația 3.1**, în timp ce eficiența de încărcare a phthaloNO₂ și phthaloNH₂ a fost calculată prin rezolvarea **ecuației 3.2**. Aceste rezultate (**Tabelul 3.3**) afirmă cantitatea mare a celor patru coloranți reținuți în interiorul NPs de albumină și, fără îndoială, eficiența excelentă de încărcare a NPs noastre de albumină. Pentru a calcula erorile standard, măsurătorile au fost înregistrate în trei exemplare.

$$\text{loading efficiency (\%)} = \frac{\text{amount of dye in NPs}}{\text{initial amount of dye}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{loading efficiency (\%)} = \frac{\text{initial amount of dye} - \text{amount of dye in pellet}}{\text{initial amount of dye}} \times 100 \quad (3.2)$$

Tabel 3.3. Eficiența de încărcare a colorantului pentru HSA&FITC NPs, HSA&phthaloNO₂ NPs, HSA&ICG NPs și BSA&phthaloNH₂ NPs.

	FITC	phthaloNO ₂	ICG	phthaloNH ₂
Loading efficiency (%)	31.4 ± 3.1	87.8 ± 0.2	49.8 ± 4.5	91.1 ± 1.5

Coloranții din familia ftalocianinelor nou sintetizați au fost dezvoltați de colegii de la Centrul de Heterochimie Fundamentală și Aplicată, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș Bolyai, Cluj-Napoca, România.

Rezultatele cercetărilor prezentate în acest capitol au fost publicate în revistele *Nanotechnology*, 31, no. 31 (July 2020): 315102, *Biomaterials Science*, 9 (July 2021): 6183-6202 și *Molecules*, 26(15) (August 2021): 4679.

Capitolul 4. Tintirea și internalizarea de către celule de cancer ovarian a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori

4.1 Biofuncționalizarea nanoparticulelor cu liganzi specifici cancerului ovarian

În timp ce livrarea NPs fără elemente de țintire specifice se bazează pe țintirea pasivă mediată de EPR, prin funcționalizarea NPs cu molecule ce vizează specific cancerul putem obține o țintire activă a celulelor de interes și astfel o internalizare celulară îmbunătățită. Astfel, HSA NPs încărcate cu fluorofori au fost conjugate covalent fie cu molecule de acid folic (FA), fie cu anticorpi anti-FR α (denumite în continuare AB), pentru a se lega în mod specific de proteina FR α supraexprimată pe majoritatea celulelor de cancer ovarian. Biofuncționalizarea cu FA și AB a fost efectuată prin bine-cunoscuta metodă de activare cu N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimidei (EDC) / N-hidroxisuccinimidei (NHS). Probele control au fost pregătite urmând același protocol, dar fără adăugarea moleculelor de FA și AB.

4.2 Caracterizarea în soluție a nanoparticulelor încărcate cu fluorofori și țintite

Diametrul hidrodinamic al HSA&FITC NPs control, 25.18 ± 0.20 nm și PDI 0.22 ± 0.01 , a crescut cu aproximativ 9 nm odată ce FA a fost conjugată covalent de HSA&FITC NPs (denumite în continuare HSA&FITC-FA NPs), 33.70 ± 0.29 nm și PDI 0.23 ± 0.01 (**Tabelul 4.1**). Deoarece conjugarea HSA NPs cu FA activat are loc prin intermediul grupărilor amino situate la suprafața NPs, și FA are la rândul său la capătul distal o

grupare amino, nu s-au observat diferențe majore între potențialele zeta ale HSA&FITC NPs control, -15.3 ± 2.6 mV și HSA&FITC-FA NPs, -18.0 ± 0.5 mV (**Tabelul 4.1**).

Tabel 4.1. Măsurători de potențial-zeta și DLS ale HSA&FITC-FA NPs, HSA&phthaloNO₂-FA NPs și HSA&ICG-FA NPs.

	HSA&FITC NPs		HSA&phthaloNO ₂ NPs		HSA&ICG NPs	
	with targeting	without targeting	with targeting	without targeting	with targeting	without targeting
diameter (nm)	33.7 ± 0.3	25.2 ± 0.2	28.3 ± 1.2	21.3 ± 0.2	26.6 ± 0.2	22.3 ± 0.3
increase in diameter (nm)	8.5		7.0		4.3	
PDI	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.32 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.01
zeta-potential (mV)	-18.0 ± 0.5	-15.3 ± 2.6	-9.4 ± 0.2	-13.8 ± 1.2	-14.2 ± 0.8	-12.9 ± 0.6
difference in zeta-potential (mV)	2.7		4.4		1.3	

Apoi, având un diametru hidrodinamic mediu final de 28.3 ± 1.2 nm și PDI de 0.32 ± 0.05 (**Tabelul 4.1**), creșterea cu 7 nm în dimensiune a HSA&phthaloNO₂-AB NPs reprezintă o dovadă că HSA&phthaloNO₂ NPs au fost decorate cu succes cu AB. Deoarece pH-ul mediului înconjurător, și anume PBS (pH 7,4), este foarte aproape de punctul izoelectric al AB³⁸ și, implicit, sarcina netă a AB este aproape de zero, doar o modificare ușoară poate fi observată în potențialul zeta (**Tabelul 4.1**) al HSA&phthaloNO₂ NPs după biofuncționalizarea cu AB (HSA&phthaloNO₂-AB NPs zeta-potențial: -9.4 ± 0.2 mV). Mai apoi, în mod similar comportamentului observat pentru HSA & FITC-FA NPs, diametrul hidrodinamic al HSA&ICG NPs control, 22.31 ± 0.34 nm și PDI 0.31 ± 0.01 , a crescut cu aproximativ 5 nm odată cu conjugarea covalentă a FA activat și HSA&ICG NPs (denumite în continuare HSA&ICG-FA NPs), 26.63 ± 0.22 nm și PDI 0.24 ± 0.01 . Nu s-au observat diferențe semnificative între potențialele zeta ale HSA&ICG NPs control, -12.9 ± 0.6 mV și HSA&ICG-FA NPs, -14.2 ± 0.8 mV (**Tabelul 4.1**).

Mai mult, HSA&FITC-FA și HSA&ICG-FA NPs prezintă o stabilitate excelentă din punct de vedere a dimensiunii și a fotostabilității. La finalul celor 15 zile ale studiului, fluorescența HSA&FITC-FA NPs își păstrează 91.6% din intensitatea de emisie inițială, pe când fluorescența HSA&ICG-FA NPs este amplificată, la 111.2% (**Figura 4.1**). Datele DLS ale HSA&FITC-FA NPs măsurate proaspete și la o lună după ce au fost fabricate indică o stabilitate excelentă în ceea ce privește dimensiunea lor, fiind observată o creștere neglijabilă de 1 nm pentru HSA&ICG-FA NPs (28.40 ± 0.17 nm și PDI 0.23 ± 0.02 - după 1 lună), și, respectiv, o creștere de 3 nm pentru HSA&FITC-FA NP (37.15 ± 0.06 nm și PDI 0.30 ± 0.01 - după 1 lună). Din punct de vedere a fluoroforilor în stare liberă, ambele soluții tind să își piardă caracteristicile de

fluorescență în timp, însă proprietăți de fluorescență ale soluției de FITC liber prezintă o stabilitate net superioară soluției de ICG.

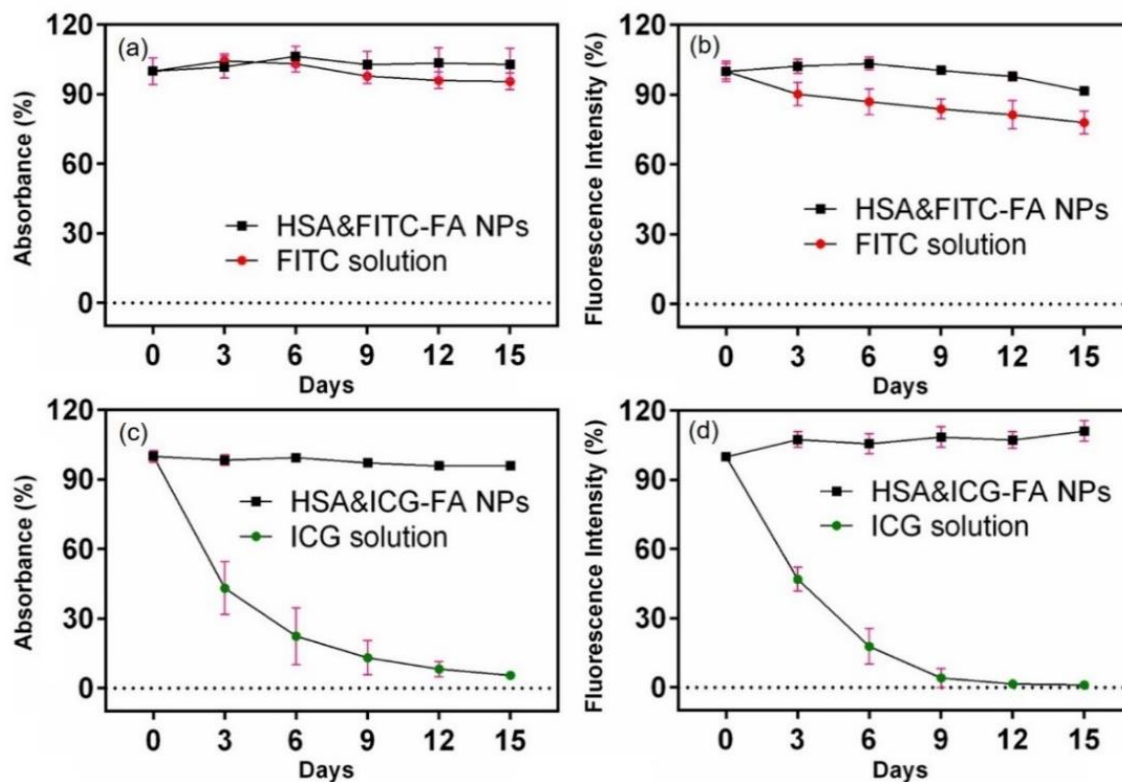


Figura 4.1. Măsurători ale intensității absorbantei – (a) și (c) – și ale fluorescenței – (b) și (d) – pe o perioadă de 15 zile pentru soluții de ICG liber (buline verzi) și FITC liber (buline roși) în comparație cu HSA-FA NPs fluorescente (pătrate negre), reprezentate ca procente din fluorescența inițială.

4.3 Studiul viabilității celulare

Primul pas către translatarea *in vivo* a celor patru tipuri NPs proteice încărcate cu fluorofor a fost confirmarea biocompatibilității lor *in vitro*, pe trei linii celulare de cancer ovarian (NIH: OVCAR3, A2780 și A2780 Cis), prin implementarea testului MTT. Deși soluțiile de phthalONO₂ și phthalNH₂ în stare liberă au redus viabilitatea celulelor tratate într-o manieră dependentă de concentrație, în urma încapsulării celor patru tipuri de fluorofori în NPs de albumină acestea nu au prezentat efecte citotoxice.

4.4 Microscopia de fluorescență pentru monitorizarea internalizării celulare

Pentru o perspectivă mai bună asupra internalizării de către celule a NPs țintite și nețintite de albumină încărcate cu FITC și ICG au fost achiziționate imagini de

microscopie de fluorescență (**Figura 4.2**). Astfel, putem confirma internalizarea celulară îmbunătățită pentru HSA&FITC-FA NPs, datorită biofuncționalizării NPs de albumină cu molecule ce vizează cancerul ovarian.

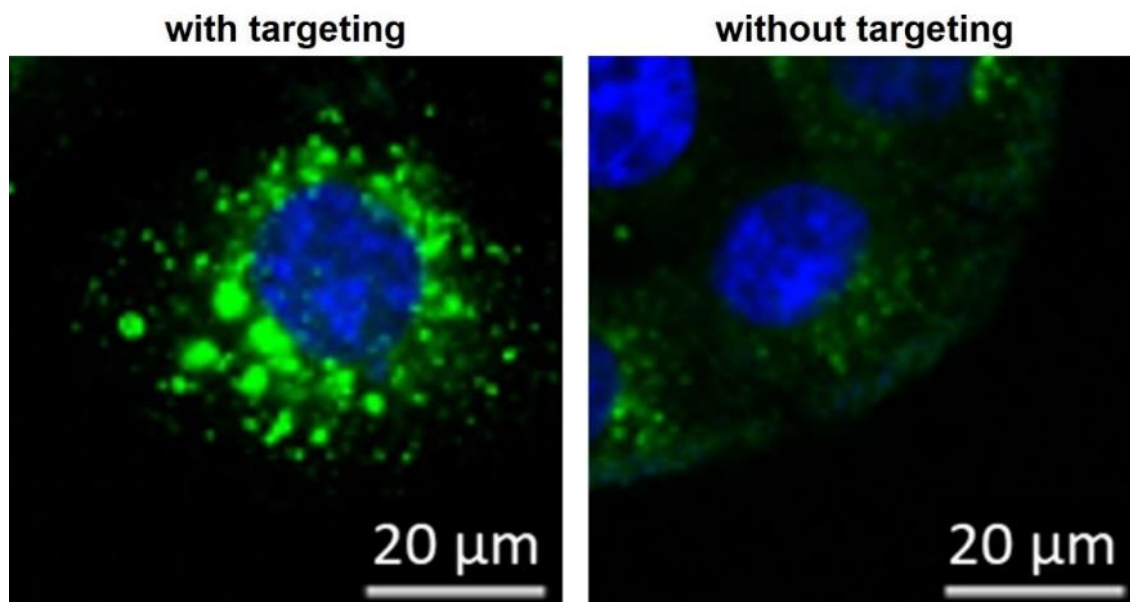


Figura 4.2. Imagini de microscopie de fluorescență ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu HSA&FITC NPs țintite (stânga) și nețintite (dreapta). Celulele au fost marcate cu DAPI (albastru).

4.5 TEM pentru monitorizarea internalizării celulare

Mai departe, pentru o mai bună înțelegere a mecanismului de internalizare celulară a HSA NPs s-au efectuat investigații TEM *in vitro* (**Figura 4.3**). Celulele tratate cu HSA NPs prezintă o ultrastructură comparabilă cu celelalte grupuri, inclusiv numărul mare de organite și autofagozomi (**Figura 4.3 (c)**) și se pot observa și vezicule ce conțin NPs (insertie **figura 4.3 (c)**). Aceste vezicule conțin NPs mai puține la număr și de dimensiuni reduse, spre deosebire de celulele tratate cu HSA-FA NPs; în plus, veziculele care conțin NPs de albumină s-au găsit într-un număr mai mic de celule comparativ cu grupul de celule tratate cu HSA-FA NPs. Veziculele ce conțin NPs pot fi identificate și în celulele tratate cu FA + HSA-FA NPs – grup de control competitiv (**Figura 4.3 (d)**). Cu toate acestea, veziculele prezente în celulele grupului FA + HSA-FA NPs sunt mai mici comparativ cu cele observate în celulele celorlalte grupuri tratate, iar NPs sunt mai puțin dens împachetate în interiorul acestora (insertie **figura 4.3 (d)**).

Aceste rezultate validează încă o dată internalizarea îmbunătățită a HSA-FA NPs datorită țintirii eficiente a FR α supraexprimat la suprafața celulelor din linia celulară NIH: OVCAR3.

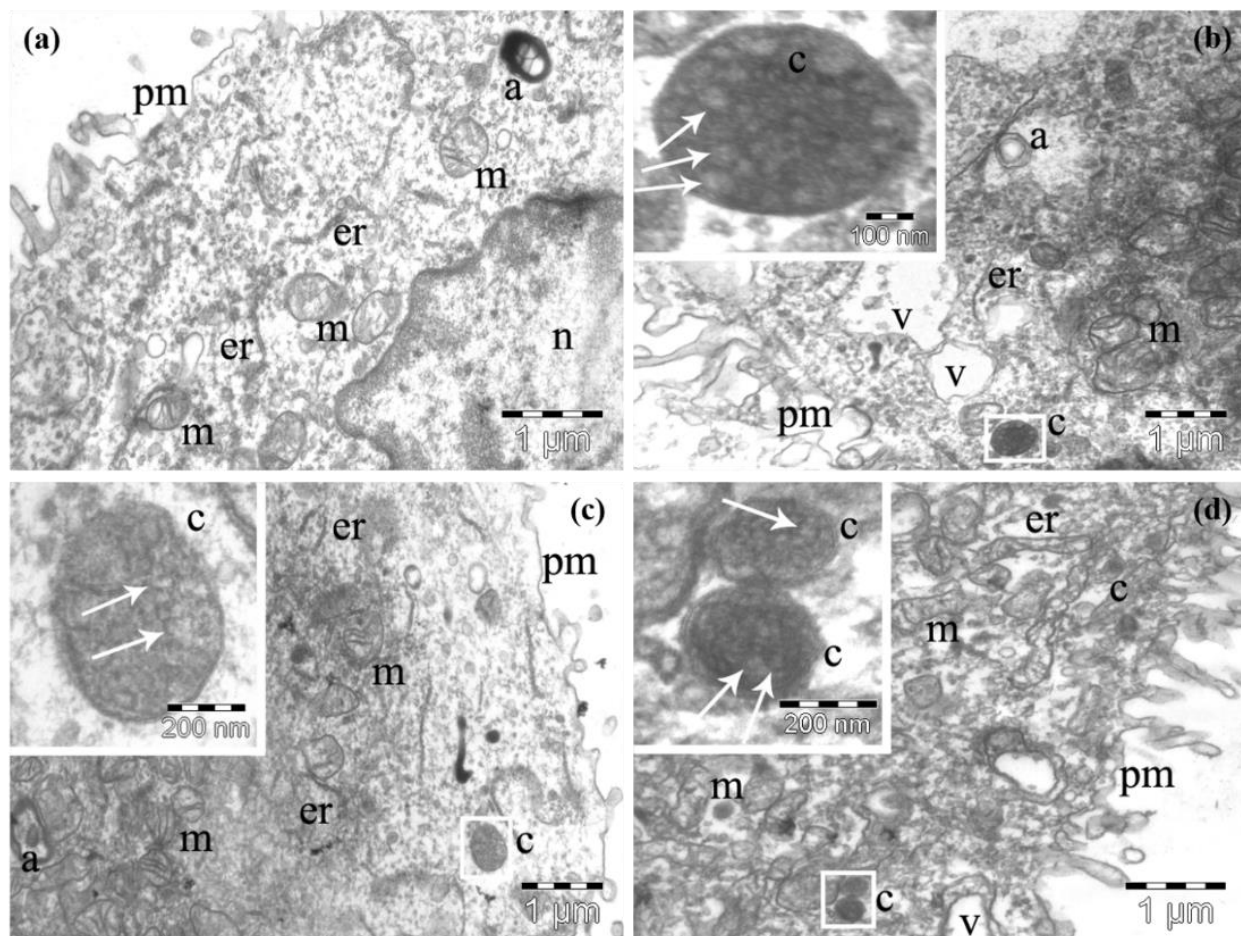


Figura 4.3. Imagini TEM ale celulelor NIH:OVCAR3 selectate pentru cele patru grupuri studiate. Celule din grupul control cu aspect caracteristic (a). NPs localizate în interiorul caveozomilor în interiorul celulelor tratate cu HSA-FA NPs (b), HSA NPs (c), și FA + HSA-FA NPs (d). a – autofagozomi; c – caveozomi; er – reticul endoplasmatic; m – mitocondrie; n – nucleu; pm – membrană plasmatică; v – vacuole

All in vitro studies were performed in collaboration with the Department of Radiobiology and Tumor Biology, Oncology Institute “Prof. Dr. Ion Chiricuta”, Cluj-Napoca, Romania.

Rezultatele cercetărilor prezentate în acest capitol au fost publicate în revistele Nanotechnology, 31, no. 31 (July 2020): 315102, Biomaterials Science, 9 (July 2021): 6183-6202 și Molecules, 26(15) (August 2021): 4679.

Capitolul 5. Evaluarea și validarea activității fototerapeutice a nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori

5.1 Efecte fototerapeutice: investigații în soluție

O metodă inovativă de tratare a cancerului este PDT. Pentru ca această terapie să funcționeze, trei elemente sunt indispensabile: un agent fotosensibilizator, lumină excitatoare de lungimi de undă potrivită fotosensibilizatorului și oxigen intracelular. Prin combinarea celor 3 elemente, acestea produc reacții fotochimice ce conduc la generarea de specii reactive de oxigen (ROS) cu efect citotoxic, mai ales $^1\text{O}_2$. Aceste ROS pot declanșa sistemul imunitar al pacienților, pot închide vasculatura din jurul tumorii și, cel mai important, pot provoca distrugerea celulelor canceroase^{3,39}. O altă terapie utilizată împotriva cancerului ce implică utilizarea radiațiilor electromagnetice este PTT. Atunci când în urma absorbției de fotoni agenții fototermici ating o stare excitată, aceștia reveni la starea de echilibru prin generare de căldură¹². Dacă temperatura de 40 °C⁴⁰ sau mai mare este atinsă în mediul înconjurător imediat lor, celulele canceroase sunt distruse prin ablație termică¹⁵.

Capacitatea modestă a BSA&phthalonNH₂ NPs de a genera $^1\text{O}_2$ a fost validată în soluție, obținând un randament de 6%. Studiile fototermice efectuate în prezența BSA&phthalonNH₂ NPs au fost un succes, înregistrând o creștere în temperatură de 10 °C după 15 min de iradiere cu laserul NIR 785 nm (eficiență de conversie fototermică de 20%), comparativ cu phthalonNH₂ liber în prezența căruia temperatura a crescut cu 11 °C după doar 9 min de iradiere, dar mai apoi atinge un punct de saturație iar la minutul 15 de iradiere temperatura sa scade la 9°C. În plus, BSA&phthalonNH₂ NPs prezintă o fotostabilitate excelentă după 3 cicluri On/Off de iradiere (atingând 67.9% din temperatura maximă înregistrată în primul ciclu), comparativ cu phthalonNH₂ liber care se încălzește cu doar 44.2% din temperatura maximă atinsă în primul ciclu (**Figura 5.1 (a)**). Mai departe, eficiența calculată în soluție a HSA&phthalonNO₂ NPs de a transforma lumina în căldură, 2.6%, este apropiată de valorile raportate în literatură pentru colorantul aprobat de FDA, ICG. Mai mult, pentru HSA&phthalonNO₂ NPs s-a calculat un randament cuantic de generare de $^1\text{O}_2$ de 43%.

Ulterior, am studiat diametrul hidrodinamic a BSA&phthalonNH₂ NPs înainte și după iradiere. Din **figura 5.1 (a)** putem observa că, deși BSA&phthalonNH₂ NPs scad în intensitate după iradiere, diametrul hidrodinamic rămâne relativ constant. Înainte de iradiere, NPs proteice au un diametru hidrodinamic de 28.54 ± 0.42 nm și PDI 0.194 ± 0.027 , iar după expunerea la linia laser NIR, acestea prezintă un diametru hidrodinamic de 30.66 ± 1.30 nm și PDI 0.185 ± 0.062 , creșterea insignifiantă de 2 nm confirmând încă o dată stabilitatea bună din punct de vedere a dimensiunii a NPs noastre de BSA&phthalonNH₂.

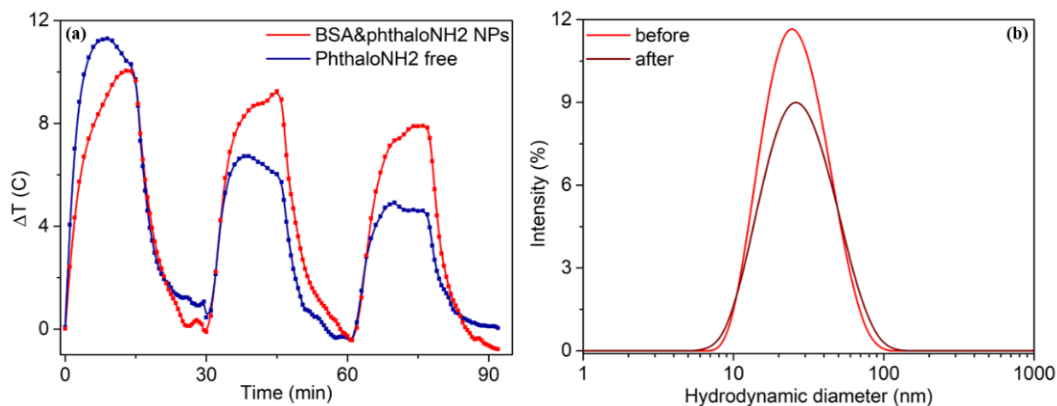


Figura 5.1 (a) Curbele termice ale BSA&phthalonH₂ NPs (roșu) și phthalonH₂ liber (albastru) realizate pentru 3 cicluri de iradiere On/Off. (b) Spectrele DLS ale BSA&phthalonH₂ NPs înainte (roșu) și după (maro) iradiere.

Stabilitatea fototermică a HSA & phthalonO₂ NPs a fost și ea evaluată în trei cicluri de încălzire/răcire (**Figura 5.2**). Astfel, după fiecare ciclu valoarea maximă a temperaturii a fost ușor redusă, cu 9% după al doilea ciclu și cu 20% după ultimul ciclu; această scădere în temperatură poate fi datorată unei ușoare fotodegradări din timpul ciclurilor de încălzire a moleculei de phthalonO₂.

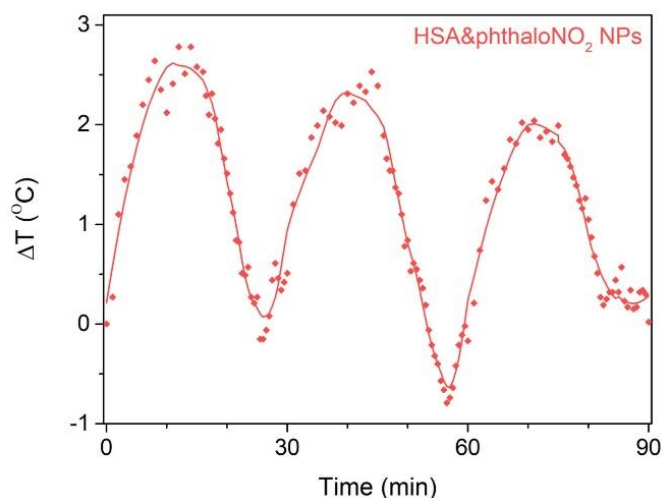


Figura 5.2. Curbele termice înregistrate în timp ale HSA&phthalonO₂ NPs pe parcursul a 3 cicluri de încălzire/răcire, utilizând o lampă LED 660 nm pentru iradiere.

Capacitatea HSA&phthalonO₂ NPs de a proteja agentul fototerostatic de denaturare după expunere prelungită la lumină a fost evaluată prin măsurători de spectroscopie de fluorescență steady-state. Spectrele de fluorescență ale HSA&phthalonO₂ NPs și soluției de phthalonO₂ liber au fost înregistrate înainte și după cele 15 min de iradiere continuă cu o lampă LED de 660 nm (**Figura 5.3**). După expunerea la lumină

intensitatea emisiei de fluorescență a soluției de phthaloNO₂ liber a fost redusă cu 67.1%, în timp ce fluorescența HSA&phthaloNO₂ NPs a scăzut cu doar 30.4%, evidențiind efectele fototerapeutice îmbunătățite ale moleculei de phthaloNO₂ odată încapsulată în HSA NPs.

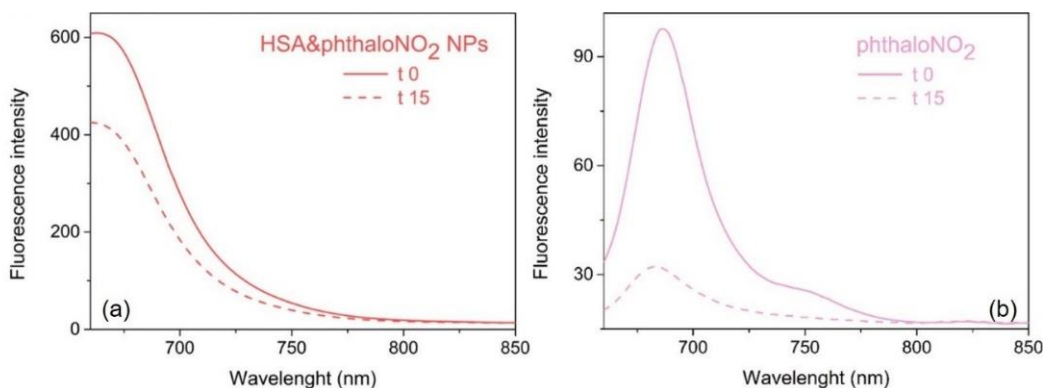


Figura 5.3. Spectre de emisie de fluorescență ale (a) HSA&phthaloNO₂ NPs și (b) phthaloNO₂ liber, la timpul inițial (linie continuă) și la 15 min după iradiere (linie întreruptă) cu o lampă LED de 660 nm.

5.2 Efecte fototerapeutice: investigații *in vitro*

Prin expunerea celulelor de cancer ovarian A2780 la o lampă LED de 660 nm au fost studiate efectele terapeutice multimodale *in vitro* ale HSA&phthaloNO₂-AB NPs prin intermediul testelor MTT, a microscopiei de fluorescență și testelor de citometrie în flux. În toate cele trei cazuri, timpii mai lungi de iradiere au dus la scăderea viabilității celulare, supraviețuirea celulelor fiind influențată într-un mod dependent de timp. Testele MTT (**Figura 5.4**) au arătat că după primele 5 min de iradiere a celulelor tratate cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs, viabilitatea celulelor a fost redusă la 18%, în timp ce după 15 min de iradiere viabilitatea a scăzut la 5% în comparație cu grupul control netratat, confirmând astfel eficiența acestor NPs în a induce moartea celulară prin expunerea acestora la iradiere.

În schimb, tratamentul cu phthaloNO₂ liber în combinație cu expunerea la iradiere pentru 5 min a redus viabilitatea celulelor la 72%, iar după 15 min la 45%, colorantul în stare liberă dovedindu-se a fi mai puțin eficient în distrugerea celulelor canceroase în comparație cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs. Aceste rezultate sunt în concordanță cu valorile randamentelor cuantice de a genera ¹O₂ calculate în soluție pentru HSA&phthaloNO₂ NPs și phthaloNO₂ liber, în *secțiunea 5.1*. Probele control păstrate la întuneric (fără iradiere) au prezentat o modificare neglijabilă a viabilității celulare. Mai mult, testul MTT validează că supraviețuirea celulelor este afectată într-o manieră dependentă de timp, timpii de iradiere mai lungi rezultând într-o viabilitate celulară redusă, după cum era de așteptat.

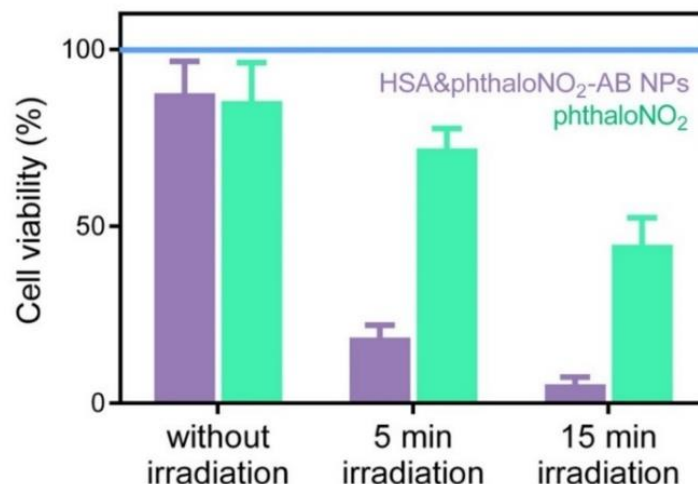


Figura 5.4. Teste MTT realizate pe linia celulară A2780 pentru a studia eficiența terapiei multimodale a HSA&phthaloNO₂-AB NPs (violet) și soluției de phthaloNO₂ liber (verde), în lipsa iradierii și după 5 și 15 min de iradiere; grupul control este reprezentat de linia orizontală albastră (viabilitate 100%).

Pentru o vizualizare mai clară a efectelor terapeutice sinergistice al HSA&phthaloNO₂-AB NPs asupra liniei celulare A2780 a fost implementată imagistica de fluorescență (**Figura 5.5**). Anexina V este un colorant capabil să detecteze procesul apoptotic timpuriu, în timp ce iodura de propidiu (PI) colorează nucleeele celulelor care și-au pierdut integritatea membranei plasmatică, aceasta fiind o caracteristică a necrozei. La 4 ore de incubare de la tratamente, imaginile prezintă câteva celule colorate doar cu anexaină V – celule apoptotice, câteva celule pozitive pentru PI – celulele necrotice, și un număr mic de celule care nu au fost colorate cu nici unul dintre coloranți (celule viabile). În schimb, majoritatea celulelor au fost colorate atât cu anexina V, cât și cu PI, sugerând că moartea celulară a fost indusă de apoptoză sau necroză.

Mai departe, pentru a cuantifica efectele fototerapeutice ale HSA&phthaloNO₂-AB și phthaloNO₂ liber, s-au efectuat teste de citometrie în flux. Concret, celulele tratate cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs au fost iradiate timp de 5 min și, respectiv, 15 min cu lampa LED de 660 nm și, după 4 ore de incubare, celulele au fost colectate, colorate cu kit-ul de apoptoză Vybrant Annexin V-PI și analizate prin citometrie în flux (**Figura 5.6**). 5 min de iradiere a celulelor tratate cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs a dus la un procent de 6.88% celule pozitive pentru anexina V (celule apoptotice), 14.83% celule colorate cu PI (celule necrotice) și 58.78% celule au prezentat colorare dublă (celule moarte). Iradierea pentru 15 min a celulelor tratate cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs a dus la 1.92% dintre celule pozitive pentru anexaină V, 7.28% pentru PI și majoritatea, 88.23% dintre celule au fost pozitive atât pentru anexina V, cât și pentru PI.

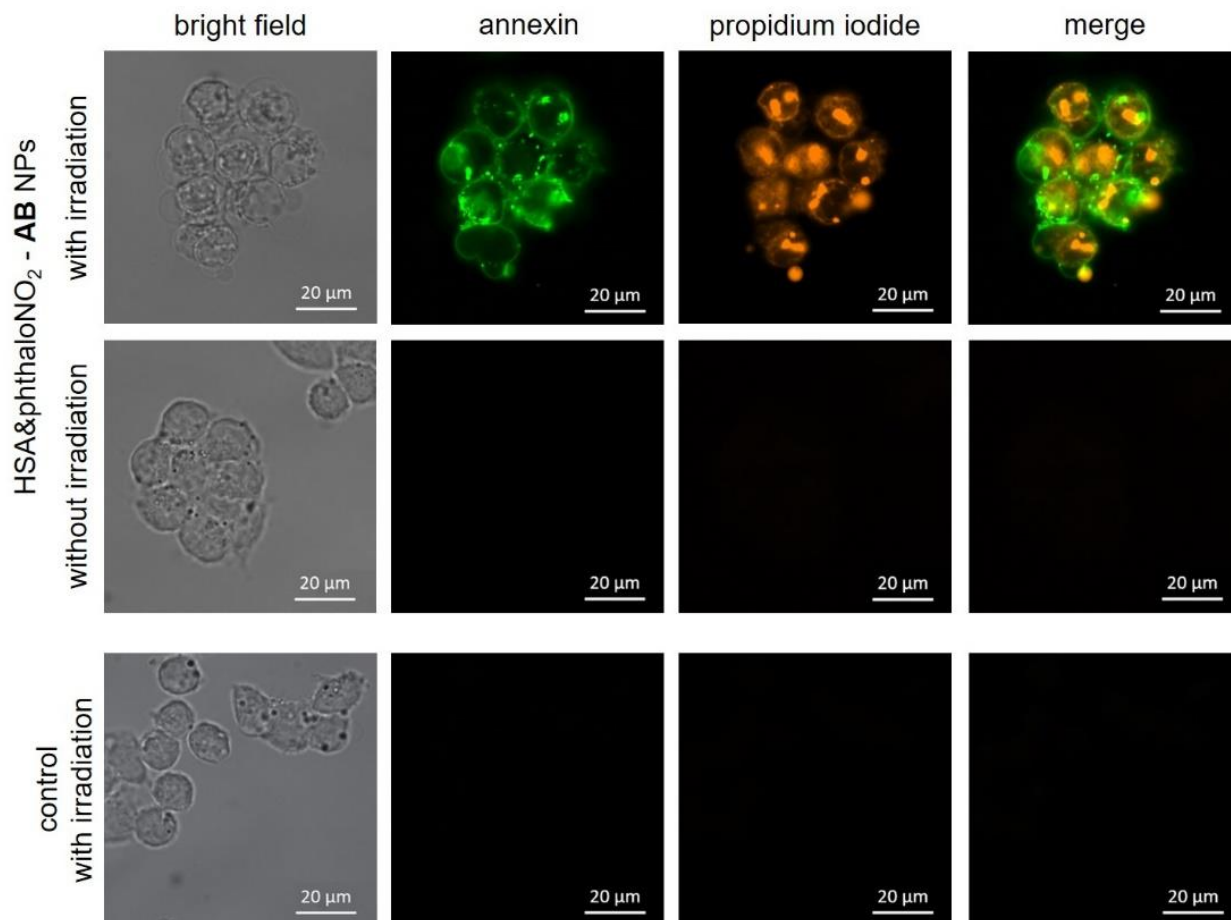


Figura 5.5. Studiul terapiei fotoinduse asupra celulelor A2780 tratate cu HSA&phthalONO₂-AB NPs și un grup control iradiat. Celulele au fost marcate cu Annexin V (verde) și PI (portocaliu) și observate prin intermediul microscopiei de fluorescență sau în transmisie. Magnificare de 63x.

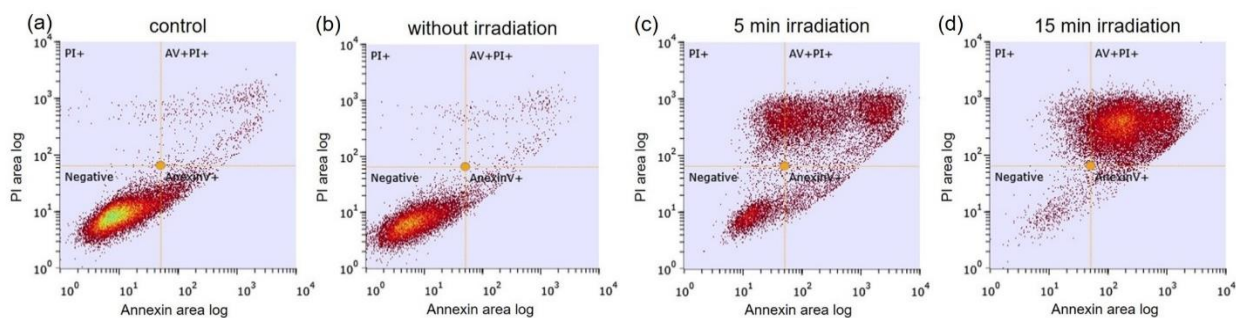


Figura 5.6. Teste de citometrie în flux ale celulelor A2780 (a) fără tratament dar iradiate pentru 15 min cu un LED de 660 nm și tratate cu HSA&phthalONO₂-AB NP (b) dar fără iradiere, (c) după 5 min de iradiere și (d) după 15 min de iradiere. Celulele au fost marcate cu Annexin V și PI.

Aceste rezultate sunt bine corelate cu rezultatele obținute în urma testelor MTT, precum și cu imaginile obținute prin microscopia de fluorescență, sugerând încă o dată că tratamentul combinat reprezintă o modalitate eficientă pentru distrugerea celulelor de cancer ovarian. Rezultatele noastre sunt similare cu cele obținute pe linia celulară de cancer ovarian OVCAR3 de către Doshi et al.⁴¹, în urma tratării celulelor cu NPs polimerice funcționalizate cu FA. Așadar, putem concluziona că eficiența tratamentului poate fi modulată prin schimbarea concentrației de agent teranostic administrat sau a energiei transmise prin iradiere, pentru a avea ca și rezultat final distrugerea celulelor canceroase.

5.3 Efecte fototerapeutice: investigații pe model murin

În cele din urmă, performanța terapeutică duală *in vivo* a HSA&phthaloNO₂-AB NPs, administrate peri- și intra-tumoral, a fost investigată. Imaginile termice *in vivo* înregistrate în timp real (**Figura 5.7**) în timpul expunerii șoricilor tratați cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs la o lampă LED de 660 nm (0.05 W cm⁻²) pentru 10 min prezintă o creștere maximă a temperaturii cu 3.9 °C.

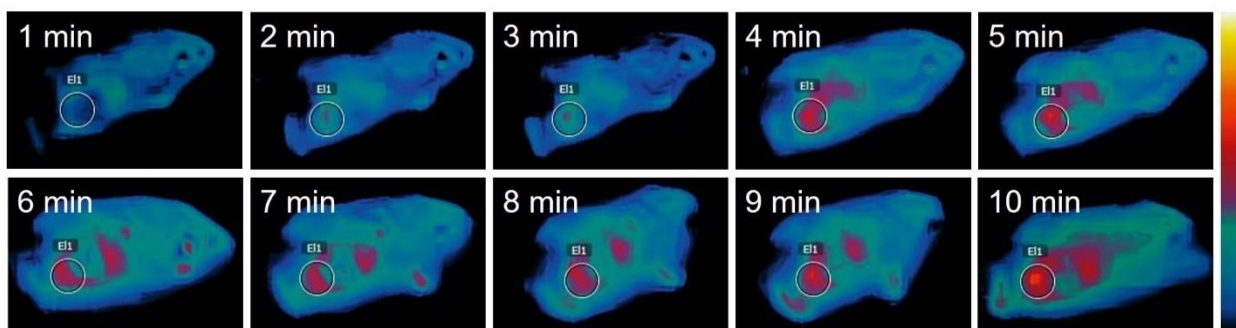


Figura 5.7. Imagini termice ale șoricilor purtători de tumori de celule de cancer ovarian NIH:OVCAR3, la 4 h după administrarea peri- și intra-tumorală a HSA&phthaloNO₂-AB NPs, și expunerea la lampa LED de 660 nm, pentru 10 min (0.05 W cm⁻²); cercul alb marchează zona restrânsă a tumorii pentru care a fost înregistrată temperatura medie.

Raportul testelor histopatologice *ex vivo* (**Figura 5.8**) au confirmat atipii celulare proeminente, imagini apoptotice frecvente și zone mari de necroză în cazul șoricilor iradiați cărora li s-au administrat HSA&phthaloNO₂-AB NPs, spre deosebire de grupul control netratat. Așadar, este de necontestat faptul că NPs noastre proteice încărcate cu molecule terapeutice, fluorescente cu emisie în domeniul roșu intens și funcționalizate cu liganzi specifici cancerului ovarian reprezintă o abordare eficientă în terapia cancerului.

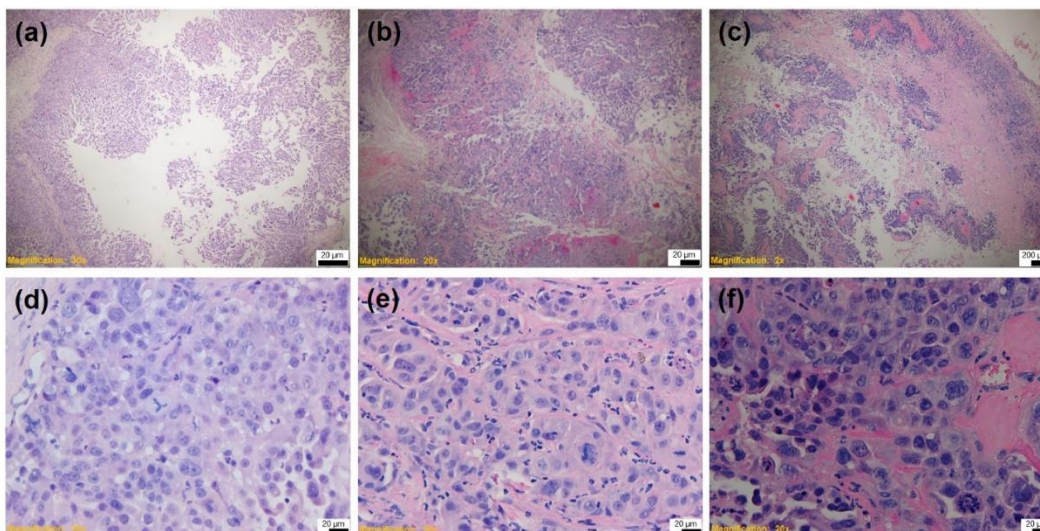


Figura 5.8. Marcarea cu hematoxină și eozină a tumorilor excizate la 24 h după terapie: (a) și (d) grupuri control, (b) și (e) cu administrare de HSA&phthaloNO₂-AB NPs, dar fără iradiere, (c) și (f) cu administrare de HSA&phthaloNO₂-AB NPs și iradiere; magnificare de x40 pentru (a) - (c) și x400 pentru (d) - (f).

Toate studiile in vitro și in vivo au fost efectuate în colaborare cu Laboratorul de Radioterapie, Radiobiologie și Biologie Tumorală și Laboratorul de Genomică Funcțională, Proteomică și Patologie Experimentală de la Institutul Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, România și Departamentul de Boli Infecțioase, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, România.

Rezultatele cercetărilor prezentate în acest capitol au fost publicate în revistele Biomaterials Science, 9 (July 2021): 6183-6202 și Molecules, 26(15) (August 2021): 4679.

Capitolul 6. Punerea în lumina a potențialului nanoparticulelor proteice încărcate cu fluorofori pentru imagistica intervențională în timp real a cancerului ovarian

6.1 Imagistică de fluorescență în domeniul vizibil: nanoparticule de albumină încărcate cu FITC

După cum se poate observa în **figura 6.1**, după tratamentul cu HSA&FITC-FA NPs, se poate observa o creștere a semnalului fluorescent în regiunea perinucleară a celulelor NIH:OVCAR3, posibil în reticulul endoplasmatic, spre deosebire de tratamentul cu FITC liber și HSA&FITC NPs nețintite. Internalizarea nucleară nedorită a soluției de FITC liber, datorată dimensiunilor reduse ale moleculelor libere (mai mică decât diametrul mediu al porului nuclear al celulelor umane, aproximativ 5 nm), poate fi observată în

figura 6.1. În caz contrar, când celulele au fost tratate cu HSA&FITC-FA NPs și HSA&FITC NPs putem remarca lipsa emisiei de fluorescență din interiorul nucleului.

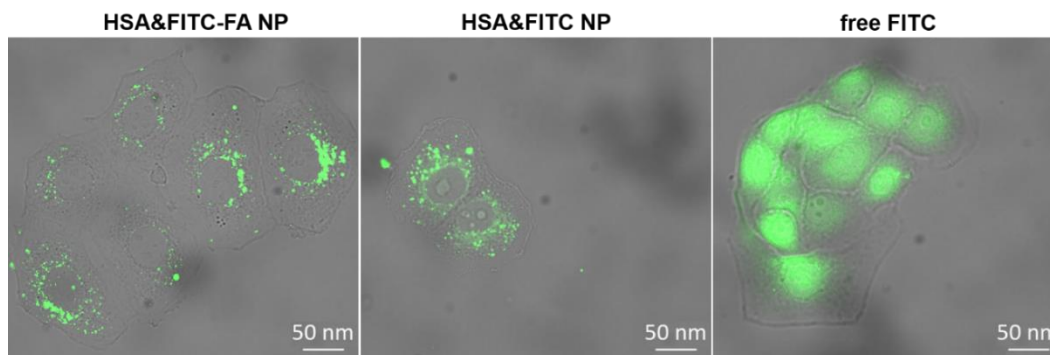


Figura 6.1. Imagini de microscopie de fluorescență ale celulelor NIH:OVCAR3 la 6 h după tratamentul cu HSA&FITC-FA NPs, HSA&FITC NPs și soluție de FITC liber.

6.2 Imagistică de fluorescență în domeniul roșu intens: nanoparticule de albumină încărcate cu phthaloNO₂

Microscopia de fluorescență a fost implementată și pentru a studia internalizarea de către celule de cancer ovarian A2780 a phthaloNO₂ liber, la 24 h de la incubare. După cum se poate remarca în **figura 6.2**, semnalul de fluorescență al fluoroforului este distribuit uniform în citoplasmă, în afara nucleului. Grupul control nu prezintă semnal fluorescent.

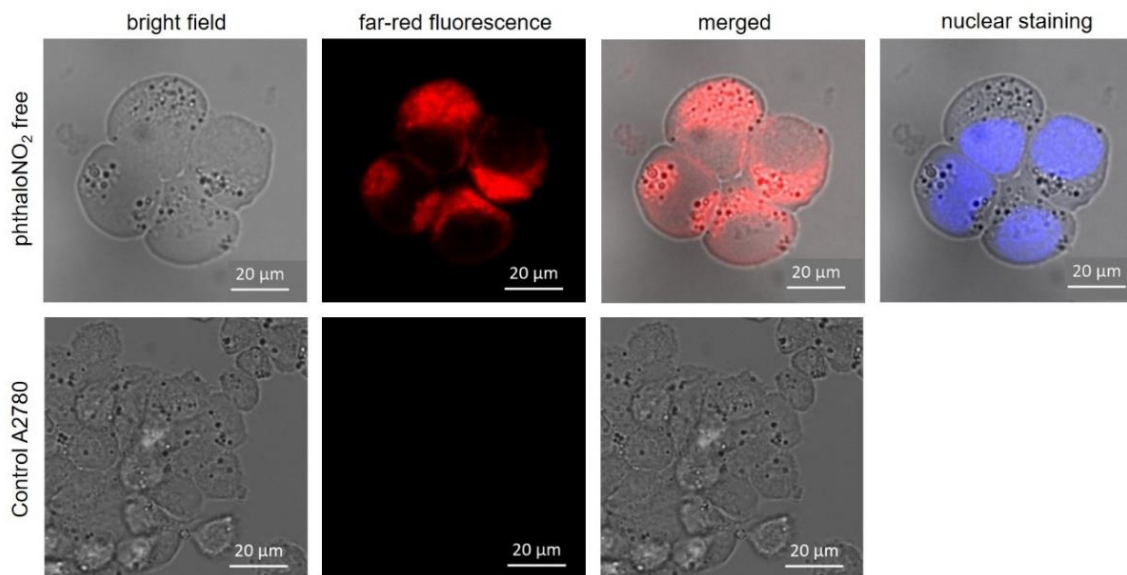


Figura 6.2 Imagini de fluorescență ale celulelor A2780 tratate și incubate pentru 24h cu soluție de phthaloNO₂ liber (sus) și un grup control netratat (jos). Celulele tratate cu phthaloNO₂ au fost marcate cu 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Apoi, pentru o mai bună înțelegere a capacității de țintire a HSA&phthaloNO₂-AB NPs, am utilizat imagistica de fluorescență *in vitro* pentru a monitoriza direct internalizarea celulară a HSA&phthaloNO₂ NPs țintite în comparație cu cele nețintite. Pentru aceste studii au fost folosite două linii celulare: A2780, cunoscută pentru supraexpresia FR α la suprafața celulelor, și A2780 Cis, folosită ca și control negativ. În cazul liniei celulare A2780 se observă o mai bună internalizare pentru HSA&phthaloNO₂-AB NPs atât la 1 h, cât și la 4 h de incubare, spre deosebire de internalizarea nespecifică remarcată pentru celulele tratate cu HSA&phthaloNO₂ NPs. În mod contrar, intensitatea semnalului de fluorescență înregistrat pentru linia A2780 Cis după tratamentul cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs poate fi corelată la ambele intervale de timp cu intensitatea celulelor tratate cu HSA&phthaloNO₂ NPs nedecorate cu AB (**Figura 6.3**). Aceste rezultate confirmă capacitatea de țintire activă a proteinei FR α , supraexprimată frecvent la suprafața celulelor de cancer ovarian, de către HSA&phthaloNO₂ NPs decorate cu AB. În niciunul din cazuri nu a fost observată internalizare nucleară a HSA&phthaloNO₂ NPs sau HSA&phthaloNO₂-AB NPs.

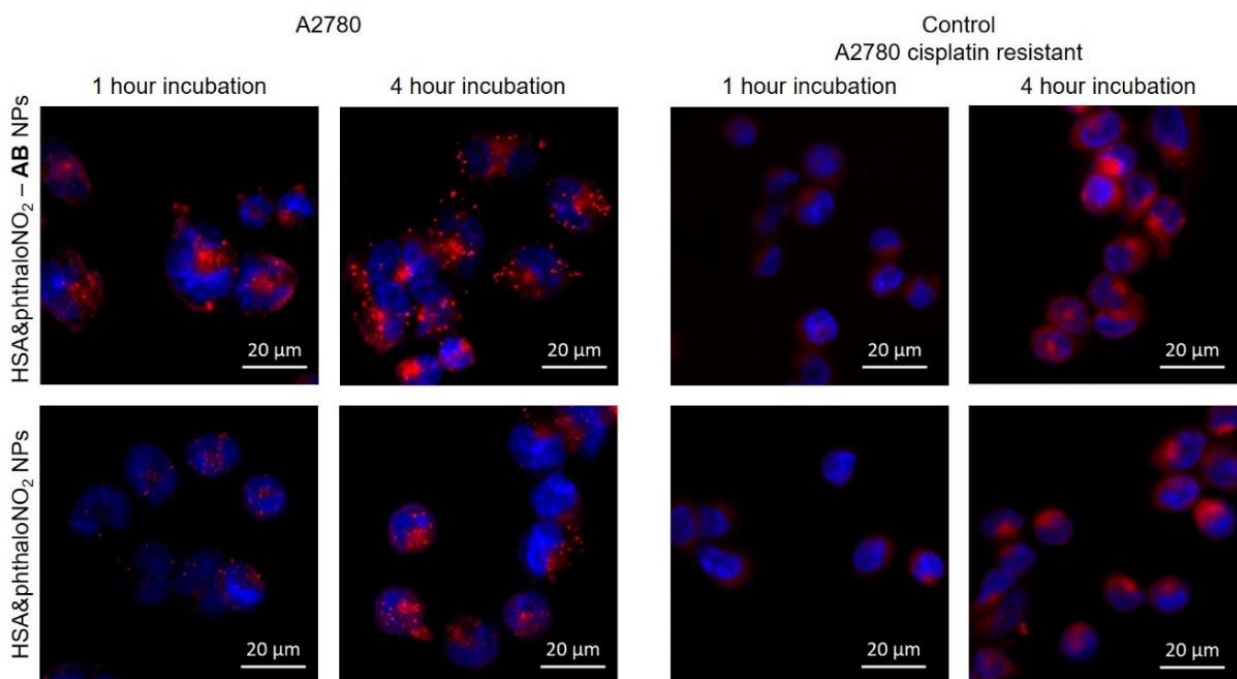


Figura 6.3. Imagini de fluorescență ale celulelor A2780 (stânga) și celulele control A2780 Cis (dreapta) la 1 h și 4 h după tratamentul cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs (sus) și HSA&phthaloNO₂ NPs (jos). Celulele au fost marcate cu DAPI.

Investigații FLIM

Mai mult, prin intermediul măsurătorilor de fluorescență rezolvate în timp și spațiu, tehnica FLIM este capabilă să detecteze interacțiunile locale ale moleculelor fluorescente de phthaloNO₂, atât în stare liberă cât și încapsulate în HSA NPs, dar și

localizarea lor intracelulară. Astfel, investigațiile FLIM *in vitro* au fost implementate pentru a determina timpul de viață al fluorescenței în funcție de localizarea după internalizarea de către celulele canceroase A2780 a HSA&phthalONO₂-AB NPs, HSA&phthalONO₂ NPs și phthalONO₂ liber (**Figura 6.4**).

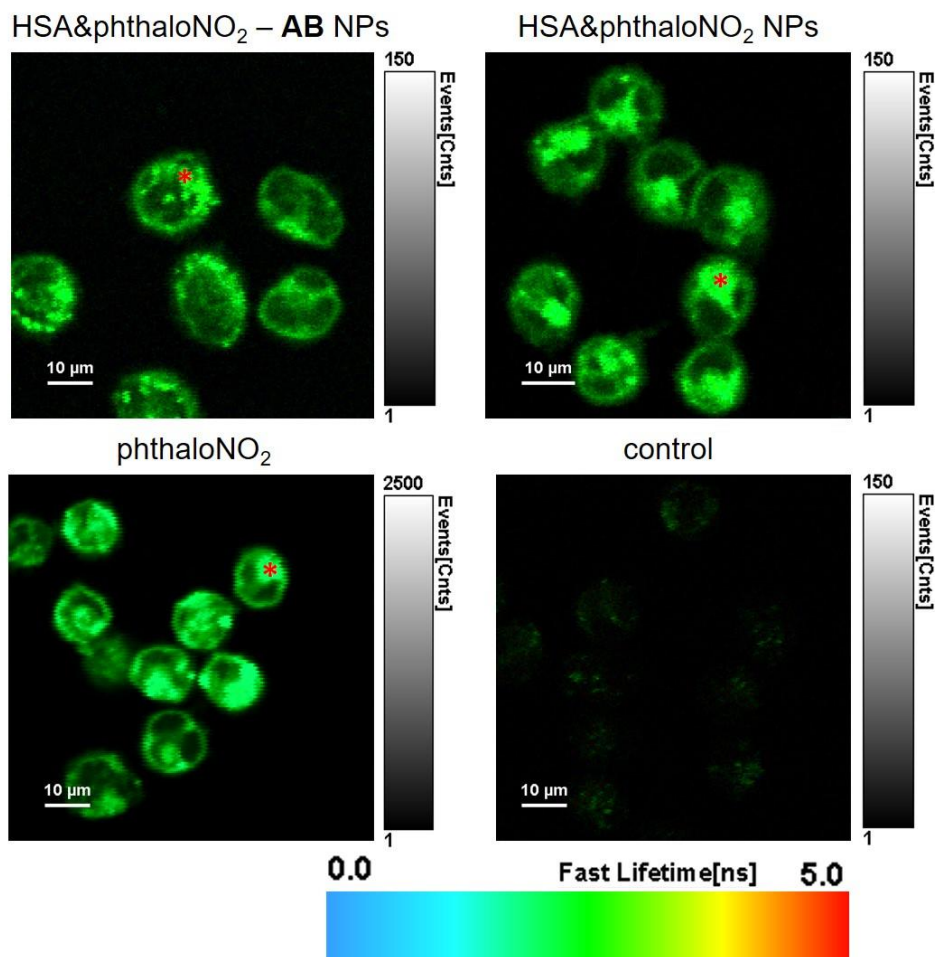


Figura 6.4. Imagini FLIM ale celulelor A2780 la 4 h după tratamentul cu HSA&phthalONO₂-AB NPs, HSA&phthalONO₂ NPs, phthalONO₂ și celule control fără tratament. Marcajul roșu indică locul de unde au fost extrase curbele de decay ale timpului de viață de fluorescență.

Mai exact, celulele de cancer ovarian A2780 au fost tratate și incubate timp de 4 h cu HSA&phthalONO₂-AB NPs, HSA&phthalONO₂ NPs și phthalONO₂ liber, iar profilurile de timp de viață și histogramele agentului fototeranostic au fost înregistrate (**Figura 6.5**, **tabelul 6.1**); celulele A2780 control, fără tratament, au fost, de asemenea, investigate. Curbele de decay ale timpului de viață de fluorescență extrase din locul marcat cu roșu în **figura 6.4**, și anume din matrice citoplasmatică a celulelor, prezintă o creștere de 0.18 ns a $T_{AV\ int}$ a phthalONO₂ odată încapsulată în HSA NPs (**Figura 6.5**), sugerând că moleculele fototeranostice sunt încapsulate în proteina HSA. Mai mult, creșterea cu 0.23 ns a $T_{AV\ int}$ a HSA&phthalONO₂-AB NPs în comparație cu HSA&phthalONO₂ NPs

nedecorate cu AB poate fi atribuită localizării diferite a agentului fototeranostic în interiorul celulelor¹⁰, odată ce calea de internalizare a HSA&phthaloNO₂-AB NPs este mediată de FR α . Astfel, prin monitorizarea timpului de viață a NPs fluorescente țintite în sisteme biologice, celulele ce supraexprimă FR α la suprafața membranelor pot fi distinse într-un mod simplu și elegant. Celulele control au prezentat auto-fluorescență neglijabilă.

Tabel 6.1. Decay-urile timpului de viață și procente de populație ale HSA&phthaloNO₂-AB NPs, HSA&phthaloNO₂ NPs și phthaloNO₂ după internalizarea de către celulele A2780 (perioadă de incubare de 4 h).

	$T_{AV \text{ int}} \text{ (ns)}$	$A_1 \text{ (\%)}$	$\tau_1 \text{ (ns)}$	$A_2 \text{ (\%)}$	$\tau_2 \text{ (ns)}$	χ^2
HSA&phthaloNO ₂ -AB NPs	2.31 ± 0.01	59	2.66 ± 0.04	41	1.16 ± 0.03	1.04
HSA&phthaloNO ₂ NPs	2.08 ± 0.01	57	2.41 ± 0.01	43	1.01 ± 0.01	1.01
phthaloNO ₂	1.90 ± 0.01	53	2.25 ± 0.02	47	1.10 ± 0.01	1.21

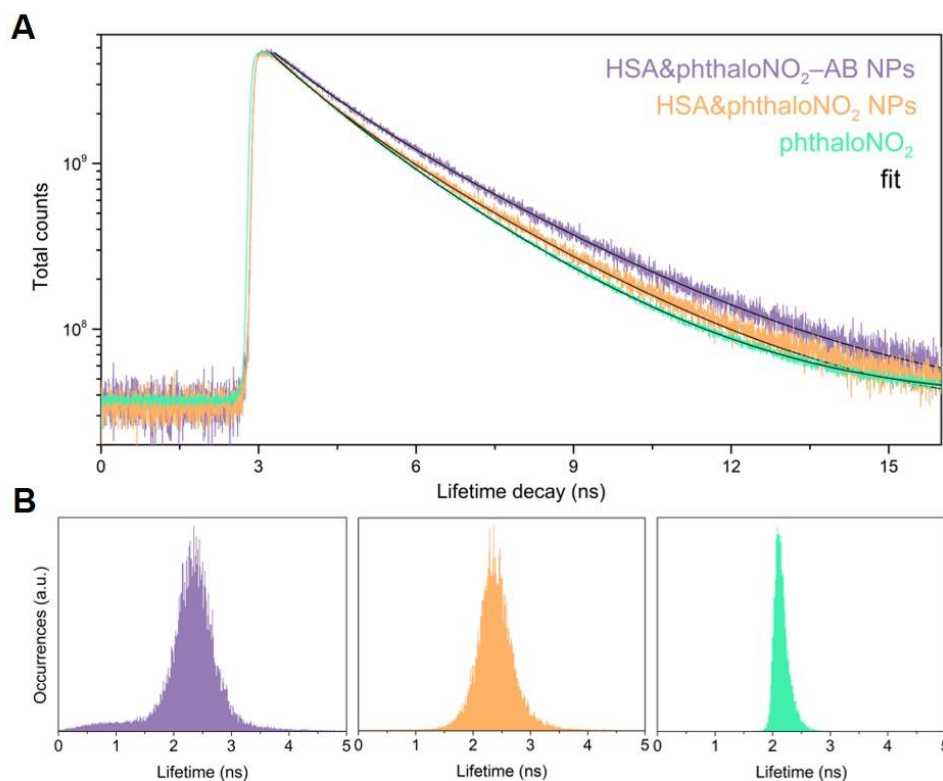


Figura 6.5. (A) Curbele de decay ale timpului de viață extrase din locul marcat cu roșu în figura 6.4, și (B) histogramele înregistrate pentru agenții fototeranostici în citoplasmul celulelor A2780, la 4 h de la tratamentul cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs (violet), HSA&phthaloNO₂ NPs (galben), și soluție de phthaloNO₂ (verde).

6.3 Imagistică de fluorescență în domeniul NIR: nanoparticule de albumină încărcate cu ICG

Pentru a confirma internalizarea de către celulele de cancer ovarian NIH:OVCAR3 a HSA&ICG NPs și ICG în stare liberă au fost colectate imagini de fluorescență NIR, după 24 h de incubare (**Figura 6.6**). Atât HSA&ICG NPs, cât și celulele tratate cu ICG, nu prezintă internalizare nucleară, în timp ce în cazul fluoroforului liber se poate observa o dispersie uniformă în citoplasma celulară. Mai mult, în cazul celulelor tratate cu HSA&ICG NPs se poate distinge apariția unor vezicule puternic fluorescente (probabil caveosomi).

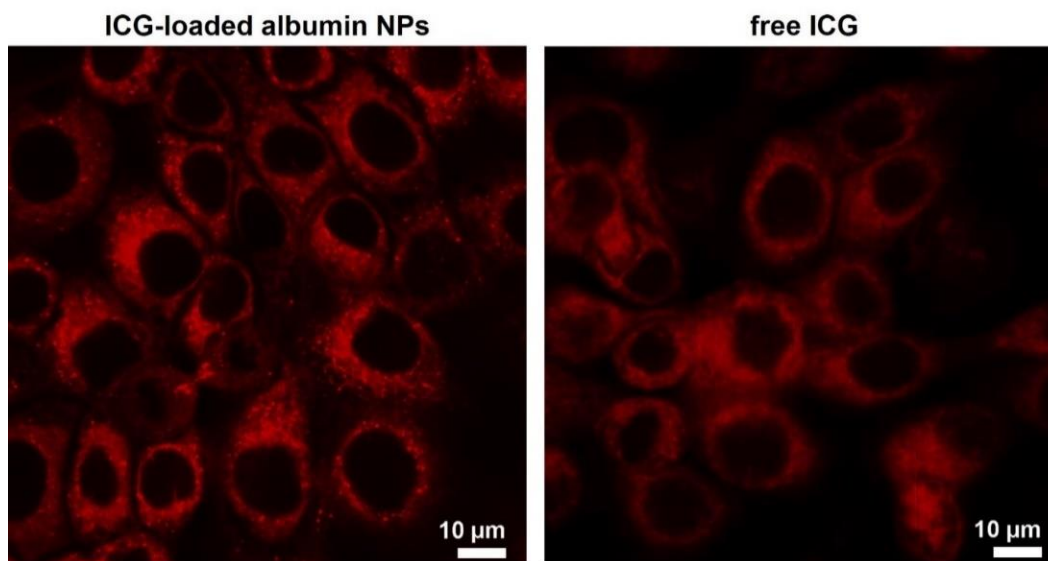


Figura 6.6. Imagini de microscopie de fluorescență ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu HSA&ICG NPs vs. ICG liber.

Prin urmare, aceste studii incipiente de imagistică de fluorescență prezentate în acest capitol stau la baza unui proiect de cercetare mai amplu (număr proiect PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0142, în cadrul PNCDI III). Scopul proiectului se concentrează pe dezvoltarea unor NPs încărcate cu fluorofori NIR și țintite, precum și atestarea lor ca agenți de contrast pentru intervenții chirurgicale oncologice ghidate prin imagistica de fluorescență, prin implementarea *in vivo* și *ex vivo* (pe modele murine și țesuturi colectate de la pacienții cu cancer) a imagisticii NIR, după administrare sau tratarea cu NPs încărcate cu fluorofori.

În concluzie, datorită dimensiunii, a chimiei de suprafață și a capacității de a fi funcționalizate cu liganzi specifici cancerului pentru țintire activă, NPs proteice încărcate cu diferiți fluorofori NIR oferă posibilitatea unui timp prelungit de circulație în sânge și o acumulare sporită în zona tumorală. Fezabilitatea și biocompatibilitatea NPs proteice fluorescente ca agenți de contrast pentru imagistica intervențională de fluorescență NIR

În timp real a cancerului a fost testată anterior de un număr notabil de studii preclinice pe animale. Așadar, se poate spune că NPs proteice încărcate cu fluorofori au potențialul de a fi translatate în viitorul apropiat ca agenți de contrast pentru intervenția chirurgicală oncologică ghidată în timp real prin imagistica de fluorescență NIR.

Toate studiile in vitro au fost efectuate în colaborare cu Laboratorul de Radioterapie, Radiobiologie și Biologie Tumorală de la Institutul Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță", Cluj-Napoca, România.

Rezultatele cercetărilor prezentate în acest capitol au fost publicate în revistele Nanotechnology, 31, no. 31 (July 2020): 315102 și Biomaterials Science, 9 (July 2021): 6183-6202.

Concluzii finale si perspective

“Science is not only a disciple of reason but also one of romance and passion.”

Stephen Hawking

În vederea îmbunătățirii rezultatelor postoperatorii și calității vieții pacienților cu cancer, este nevoie de o abordare inovativă și o generație nouă de nanoinstrumente capabile să vindece cancerul. Așadar, teza mea de doctorat își propune să proiecteze noi agenți fototeranostici de dimensiuni nano cu potențial în a depăși limitele metodelor clasice utilizate în prezent în detectarea cancerului și în planificarea chirurgicală. În consecință, am fabricat agenți fototeranostici noi cu caracteristici optice în fereastra biologică a spectrului electromagnetic, prin încapsularea în NPs de albumină biocompatibile și țintite a doi fluorofori aprobați de FDA și doi coloranți nou sintetizați din familia ftalocianinelor, pentru imagistica de fluorescență și terapia duală și sinergică a cancerului ovarian.

Pentru început, NPs pe bază de albumină, mai exact HSA și BSA, încărcate fie cu coloranți aprobați de FDA, FITC și ICG, sau coloranți fenotiazinici nou sintetizați, phthalONO₂ și phthalNH₂, sunt fabricate cu succes în urma unui protocol în doi pași: desolvatare folosind etanol și stabilizare prin reticulare chimică cu Gal.

- Buna reproductibilitate a sintezei și randamentul mare de formare a particulelor, de peste 75%, au fost dovedite pentru toate cele patru clase de NPs pe bază de albumină încărcată cu fluorofori.
- Caracterizarea spectroscopică a NPs pe bază de albumină confirmă conservare excelentă a emisiei de fluorescență pentru toți cei patru coloranți după încapsularea în NPs pe bază de albumină.
- Monodispersitatea și diametrul mediu, de 27 nm, ale NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori sunt investigate și dovedite atât prin imagistica TEM, cât și prin măsurători DLS; investigațiile de potențial zeta confirmă că suprafețele celor patru clase de NPs sunt încărcate negative (-12 până la -15 mV)

Ulterior, pentru țintirea specifică a FR α supraexprimat la suprafața a aproape tuturor liniilor celulare de cancer ovarian, precum și liniile celulare NIH:OVCAR3 și A2780 selectate aici pentru studii *in vitro*, NPs nou sintetizate pe bază de albumină încărcate cu fluorofori sunt decorate prin conjugarea covalentă cu FA și AB.

- Prin implementarea măsurătorilor DLS și investigațiilor de potențial zeta, se confirmă biofuncționalizarea de succes a NPs pe bază de albumină cu cei doi liganzi ce țintesc cancerul ovarian.
- Buna stabilitate din punct de vedere a dimensiunilor NPs pe bază de albumină, la 7 zile după sinteză, este confirmată prin măsurători DLS.
- HSA&FITC și HSA&ICG NPs prezintă o stabilitate a fluorescenței în timp excelentă, ce se menține chiar și la 15 zile după sinteză: 92% și, respectiv, 111% din intensitatea emisiei de fluorescență inițială.

Mai apoi, trei linii celulare de cancer ovarian, și anume NIH:OVCAR3, A2780 și A2780 Cis, sunt utilizate pentru a testa și confirma biocompatibilitatea NPs proteice încărcate cu fluorofori. Capacitatea de țintire îmbunătățite a NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori și țintite este testată *in vitro* prin imagistica de fluorescență și TEM.

- Viabilitatea celulelor tratate cu NPs proteice nou fabricate este confirmată prin teste MTT.
- După cum se poate observa prin imagistica TEM, eficiența de internalizare celulară prin endocitoza mediată de FR α în celulele de cancer ovarian este îmbunătățită odată cu bioconjugarea NPs proteice cu molecule ce țintesc specific cancerul.

Eficiența ca agenți terapeutici duali în aplicații biomedicale a NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori este investigată în detaliu. Efectele lor fotodinamice și fototermice sunt evaluate mai întâi în soluție și, datorită capacităților lor terapeutice promițătoare, sunt efectuate diferite studii *in vitro* pe linia celulară A2780.

- Randamentul cuantic mare de generare a $^1\text{O}_2$, 43%, al HSA&phthalNO $_2$ NPs, eficiența bună de conversie lumină-căldură, 8,5%, și fotostabilitate excelentă a HSA&phthalNH $_2$ NPs sunt calculate și studiate în soluție, prin expunerea la o lampă LED de 660 nm.
- Efectul lor citotoxic datorat conversiei luminii în căldură și generării de ROS este validat și *in vitro* prin utilizarea investigațiilor de imagistică de fluorescență, MTT și de citometrie în flux.
- Testele de citometrie în flux au relevat că 97% dintre celulele canceroase tratate cu HSA&phthalNO $_2$ NPs și expuse la iradiere cu o lampă LED de 660 nm sunt distruse.

În plus, translatarea studiului nostru pe modele murine ne permite analiza *in vivo* a viabilității celulare și a caracteristicilor fototerapeutice ale HSA&phthalNO $_2$ -AB NPs nou dezvoltate. NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori și funcționalizate sunt administrate cu succes prin injecții peri- și intra-tumoral șoricelilor purtători de tumori de cancer ovarian, cu 4 h înainte de iradiere cu o lampă LED de 660 nm (0.05 W cm $^{-2}$).

Linia celulară de cancer ovarian NIH:OVCAR3 a fost selectată pentru aceste experimente.

- Schimbarea temperaturii de suprafață a șoriceilor este monitorizată cu ușurință în timp real pe parcursul a celor 10 min de expunere la lampa LED.
- În cazul șoriceilor injectați cu HSA&phthaloNO₂-AB NP se înregistrează un maxim de 3.9 °C în creșterea temperaturii în zona tumorală; pentru grupul control nu se observă modificări de temperatură.
- Investigațiile histopatologice raportează imagini apoptotice, zone mai mari de necroză și atipii celulare proeminente pentru grupul tratat cu HSA&phthaloNO₂-AB NPs și expus la lumină, spre deosebire de grupul control, neiradiat.

Proprietățile de fluorescență și bioconjugarea cu succes cu FA și AB ale HSA&FITC și HSA&phthaloNO₂ NPs sunt studiate cu atenție atât în soluție, cât și *in vitro*, după internalizarea de către celulele de cancer ovarian NIH:OVCAR3 și A2780.

- Internalizarea îmbunătățită a NPs pe bază de albumină și conjugate cu AB este confirmată prin intermediul imagisticii de fluorescență; linia celulară A2780 Cis este studiată ca și control negativ al supraexprimării FR α .
- Investigațiile FLIM evidențiază diferența în timpul de viață de fluorescență a NPs proteice țintite (2.31 ns) și nețintite (2.08 ns), datorată unei metode de internalizare diferită pentru cele două grupuri de NPs pe bază de albumină încărcată cu fluorofori, confirmând astfel și metoda de internalizare mediată de FR α a NPs proteice decorate cu AB.
- Prin studiul timpului de viață de fluorescență a HSA&phthaloNO₂-AB NPs în sisteme biologice prinde viață o nouă perspectivă pentru a discerne celulele canceroase care supraexprimă FR α la suprafață.

Astfel, prin acceptarea progresului nanotehnologic în rândul științelor medicale, cercetătorii activi în domeniul terapiei și imagisticii oncologice caută o nouă strategie terapeutică inovatoare capabilă să scadă recurența cancerului și să ofere un prognostic mai bun pentru pacienți. În lucrarea de față, cu scopul diminuării efectelor adverse nedorite, a fotostabilității reduse și pentru a evita acumularea nespecifică a colorantului liber, NPs pe bază de albumină sunt elaborate astfel încât să încapsuleze și livreze țintit cele 4 tipuri de molecule fluorescente selectate către celule de cancer ovarian. Acești agenți de dimensiuni nano prezintă o bună biocompatibilitate, biostabilitate în medii apoase, activitate fototermică ridicată, cât și un randament bun de formare a ROS. Pentru țintirea activă a țesutului malign de interes și suprimarea eliminării rapide a agenților fotosensibili din cavitatea peritoneală, NPs sunt funcționalizate cu liganzi specifici cancerului ovarian. Comparativ cu majoritatea nanoplatformelor teranostice dezvoltate până în prezent, NPs noastre fototeranostice de ultimă generație prezintă simultan caracteristici fototermice, fotodinamice și de imagistică de fluorescență. În concluzie:

- *Am dezvoltat cu succes patru clase de NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori, biocompatibile, ce prezintă o eficiență de încărcare ridicată (variind între 91% pentru phtaloNH₂, 88% pentru phtaloNO₂, 50% pentru ICG și peste 30% pentru FITC) și își păstrează proprietățile de fluorescență emisivă atât în soluție, cât și în țesutul tumoral.*
- *Am demonstrat acumularea intracelulară crescută a NPs proteice nou sintetizate după bioconjugarea lor cu molecule ce țintesc specific FR α , ce este supraexprimat la suprafața celulelor cancerului ovarian.*
- *Am pus în lumină și validat proprietăți fototeranostice de interes ale tuturor celor patru clase de NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori, mai ales pentru HSA&phtaloNO₂ și HSA&phtaloNH₂ NPs, ce prezintă un potențial real în fototerapie duală PDT-PTT.*
- *Studiile preliminare de microscopie confocală NIR, realizate pe microscopul confocal re-scan nou instalat, confirmă fezabilitatea HSA&ICG NPs ca potențiali agenți de contrast în imagistica de fluorescență NIR pentru ghidarea imagistică în timp real a chirurgiei cancerului.*
- *Așadar, NPs pe bază de albumină încărcate cu fluorofori și funcționalizate, prezintă rezultate promițătoare ca agenți terapeutici și de fluorescență pentru imagistica și terapia țintită a cancerului ovarian.*

Ca perspective, dintre cei doi fluorofori cu proprietăți optice în domeniul vizibil, NPs pe bază de albumină încărcate cu phtaloNO₂ pot fi investigate suplimentar datorită proprietăților fototerapeutice duale și de imagistică fluorescentă. În ceea ce privește fluoroforii cu emisie în NIR, luând în considerare noutatea și performanțele îmbunătățite în urma încapsulării coloranților în NPs proteice, phtaloNH₂ poate fi implementat în viitorul apropiat în studii preclinice, sau chiar clinice. Mai mult, datorită rezultatelor încurajatoare obținute în urma studiilor *in vivo* pe model murin, noi direcții de cercetare pot fi luate în calcul:

- *Evaluarea PTT in vivo și examene histopatologice pentru modelele murine tratate cu HSA&ICG și BSA&phtaloNH₂ NPs.*
- *Funcționalizarea NPs proteice încărcate cu fluorofori cu molecule de țintire specifice altor tipuri de cancer.*
- *Co-funcționalizarea NPs proteice încărcate cu fluorofori cu diverse medicamente împotriva cancerului, spre exemplu Abraxane, Cytosan, Doxil, Taxol.*
- *Imagistica prin microscopia de fluorescență in vivo pe model murin în urma administrării celor patru clase de NPs proteice nou sintetizate.*
- *Investigații de imagistică ex vivo a țesutului excizat de la pacienți cu cancer și incubat cu NPs încărcate cu fluorofori NIR*

Referinte

1. Copur, M. S. State of Cancer Research Around the Globe. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **33**, 181–185 (2019).
2. Roser, M. & Ritchie, H. Cancer. *Our World in Data* (2015).
3. Baydoun, M. *et al.* Photodynamic Therapy Using a New Folate Receptor-Targeted Photosensitizer on Peritoneal Ovarian Cancer Cells Induces the Release of Extracellular Vesicles with Immunoactivating Properties. *JCM* **9**, 1185 (2020).
4. Zhang, R. R. *et al.* Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 347–364 (2017).
5. van Driel, P. B. A. A. *et al.* Characterization and Evaluation of the Artemis Camera for Fluorescence-Guided Cancer Surgery. *Mol Imaging Biol* **17**, 413–423 (2015).
6. Haque, A., Faizi, Md. S. H., Rather, J. A. & Khan, M. S. Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **25**, 2017–2034 (2017).
7. Solomon, S. B. & Silverman, S. G. Imaging in Interventional Oncology. *Radiology* **257**, 624–640 (2010).
8. de Boer, E. *et al.* Optical innovations in surgery: Optical innovations in surgery. *Br J Surg* **102**, e56–e72 (2015).
9. Silindir-Gunay, M., Sarcan, E. T. & Ozer, A. Y. Near-infrared imaging of diseases: A nanocarrier approach. *Drug Dev Res* ddr.21532 (2019) doi:10.1002/ddr.21532.
10. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B. & Hamblin, M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **3**, 2516–2539 (2011).
11. Chen, C. *et al.* Calixarene-Based Supramolecular AIE Dots with Highly Inhibited Nonradiative Decay and Intersystem Crossing for Ultrasensitive Fluorescence Image-Guided Cancer Surgery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 10008–10012 (2020).
12. Alves, C. G., Lima-Sousa, R., de Melo-Diogo, D., Louro, R. O. & Correia, I. J. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. *International Journal of Pharmaceutics* **542**, 164–175 (2018).
13. Chen, H., Tian, J., He, W. & Guo, Z. H₂O₂-Activatable and O₂-Evolving Nanoparticles for Highly Efficient and Selective Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1539–1547 (2015).
14. Sandra, F., Khaliq, N. U., Sunna, A. & Care, A. Developing Protein-Based Nanoparticles as Versatile Delivery Systems for Cancer Therapy and Imaging. *Nanomaterials (Basel)* **9**, (2019).
15. Pan, G.-Y. *et al.* Dual Channel Activatable Cyanine Dye for Mitochondrial Imaging and Mitochondria-Targeted Cancer Theranostics. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 3596–3606 (2017).
16. Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G. & Gomes-da-Silva, L. C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1872**, 188308 (2019).
17. Campu, A. *et al.* ICG-loaded gold nano-bipyramids with NIR activatable dual PTT-PDT therapeutic potential in melanoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **194**, 111213 (2020).
18. Gao, Q. *et al.* Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 647905 (2021).
19. *Advances in Nanotheranostics I*. vol. 6 (Springer Berlin Heidelberg, 2016).
20. Pansare, V. J., Hejazi, S., Faenza, W. J. & Prud'homme, R. K. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. *Chem. Mater.* **24**, 812–827 (2012).

21. Yu, J. *et al.* Near-infrared fluorescence imaging using organic dye nanoparticles. *Biomaterials* **35**, 3356–3364 (2014).
22. Chu, L. *et al.* Biocompatible near-infrared fluorescent nanoparticles for macro and microscopic in vivo functional bioimaging. *Biomed. Opt. Express* **5**, 4076 (2014).
23. Madamsetty, V. S., Mukherjee, A. & Mukherjee, S. Recent Trends of the Bio-Inspired Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Front. Pharmacol.* **10**, 1264 (2019).
24. Tarhini, M., Greige-Gerges, H. & Elaissari, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *Int J Pharm* **522**, 172–197 (2017).
25. Wang, E. C. & Wang, A. Z. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative Biology* **6**, 9–26 (2014).
26. Gou, Y. *et al.* Bio-Inspired Protein-Based Nanoformulations for Cancer Theranostics. *Front. Pharmacol.* **9**, 421 (2018).
27. Chen, Q., Liang, C., Wang, C. & Liu, Z. An Imagable and Photothermal “Abraxane-Like” Nanodrug for Combination Cancer Therapy to Treat Subcutaneous and Metastatic Breast Tumors. *Adv. Mater.* **27**, 903–910 (2015).
28. Sheng, Z. *et al.* Smart Human Serum Albumin-Indocyanine Green Nanoparticles Generated by Programmed Assembly for Dual-Modal Imaging-Guided Cancer Synergistic Phototherapy. *ACS Nano* **8**, 12310–12322 (2014).
29. Hu, Z., Chen, W.-H., Tian, J. & Cheng, Z. NIRF Nanoprobe for Cancer Molecular Imaging: Approaching Clinic. *Trends in Molecular Medicine* **26**, 469–482 (2020).
30. Egloff-Juras, C., Bezdetnaya, L., Dolivet, G. & Lassalle, H.-P. NIR fluorescence-guided tumor surgery: new strategies for the use of indocyanine green. *IJN Volume* **14**, 7823–7838 (2019).
31. Borlan, R. *et al.* Design of fluorophore-loaded human serum albumin nanoparticles for specific targeting of NIH:OVCAR3 ovarian cancer cells. *Nanotechnology* **31**, 315102 (2020).
32. Cohen, S. & Margel, S. Engineering of near IR fluorescent albumin nanoparticles for in vivo detection of colon cancer. *J Nanobiotechnol* **10**, 36 (2012).
33. Weber, C., Coester, C., Kreuter, J. & Langer, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **194**, 91–102 (2000).
34. Wong, R. C. H., Lo, P.-C. & Ng, D. K. P. Stimuli responsive phthalocyanine-based fluorescent probes and photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews* **379**, 30–46 (2019).
35. Li, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews* **379**, 147–160 (2019).
36. Zheng, B.-D., He, Q.-X., Li, X., Yoon, J. & Huang, J.-D. Phthalocyanines as contrast agents for photothermal therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **426**, 213548 (2021).
37. Ishii, K. Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews* **256**, 1556–1568 (2012).
38. Molecular weight and isoelectric point of various immunoglobulins. <https://www.agrisera.com/en/info/molecular-weight-and-isoelectric-point-of-various-immunoglobulins.html>.
39. Champeau, M., Vignoud, S., Mortier, L. & Mordon, S. Photodynamic therapy for skin cancer: How to enhance drug penetration? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **197**, 111544 (2019).
40. Ruhi, M. K., Ak, A. & Gülsoy, M. Dose-dependent photochemical/photothermal toxicity of indocyanine green-based therapy on three different cancer cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **21**, 334–343 (2018).
41. Doshi, M. *et al.* Conducting polymer nanoparticles for targeted cancer therapy. *RSC Adv.* **5**, 37943–37956 (2015).

Diseminare

Publicații

Publicații relevante tezei

‘Fluorescent Phthalocyanine-Encapsulated Bovine Serum Albumin Nanoparticles: Their Deployment as Therapeutic Agents in the NIR Region’

Raluca Borlan, Daria Stoia, Luiza Gaina, Andreea Campu, Gabriel Marc, Maria Perde-Schrepler, Mihaela Silion, Dana Maniu, Monica Focsan and Simion Astilean

Molecules, 26(15) (**August 2021**): 4679, IF: 4.411 and AIS: 0.694

DOI: [10.3390/molecules26154679](https://doi.org/10.3390/molecules26154679)

‘Antibody Functionalized Theranostic Protein Nanoparticles for Synergistic Deep Red Fluorescence Imaging and Multimodal Therapy of Ovarian Cancer’

Raluca Borlan, Monica Focsan, Maria Perde-Schrepler, Olga Soritau, Andreea Campu, Luiza Gaina, Eموke Pall, Bogdan Pop, Oana Baldasici, Claudia Gherman, Daria Stoia, Dana Maniu and Simion Astilean

Biomaterials Science, 9 (**July 2021**): 6183-6202, IF: 6.843 and AIS: 1.102

DOI: [10.1039/D1BM01002F](https://doi.org/10.1039/D1BM01002F)

‘Interventional NIR Fluorescence Imaging of Cancer: Review on Next Generation of Dye-Loaded Protein-Based Nanoparticles for Real-Time Feedback During Cancer Surgery’

Raluca Borlan, Monica Focsan, Dana Maniu, and Simion Astilean

International Journal of Nanomedicine, 16 (**March 2021**): 2147–71, IF: 6.400 and AIS: 0.953

DOI: [10.2147/IJN.S295234](https://doi.org/10.2147/IJN.S295234)

‘Design of Fluorophore-Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles for Specific Targeting of NIH:OVCAR3 Ovarian Cancer Cells’

Raluca Borlan, Andra-Sorina Tatar, Olga Soritau, Dana Maniu, Gabriel Marc, Adrian Florea, Monica Focsan, and Simion Astilean

Nanotechnology, 31(31) (**July 2020**): 315102, IF: 3.874 and AIS: 0.680

DOI: [10.1088/1361-6528/ab8b90](https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab8b90)

‘NIR Fluorescence Captures Clear Images of Cancerous Tumors During Surgery’

Raluca Borlan, Monica Focsan, Patriciu Achimas-Cadariu and Simion Astilean

Biophotonics magazine, **September 2021**

Publicații în coautorat

'Folic Acid Functionalized Gold Nanoclusters for Enabling Targeted Fluorescence Imaging of Human Ovarian Cancer Cells'

Hada, Alexandru-Milentie, Ana-Maria Craciun, Monica Focsan, Raluca Borlan, Olga Soritau, Milica Todea, and Simion Astilean

Talanta, 225 (**April 2021**): 121960, IF: 6.057 and AIS: 0.830

DOI: [10.1016/j.talanta.2020.121960](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121960)

'ICG-Loaded Gold Nano-Bipyramids with NIR Activatable Dual PTT-PDT Therapeutic Potential in Melanoma Cells'

Andreea Campu, Monica Focsan, Frederic Lerouge, Raluca Borlan, Leopold Tie, Dumitrita Rugina, and Simion Astilean

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 194 (**October 2020**): 111213, IF: 5.268 and AIS: 0.711

DOI: [10.1016/j.colsurfb.2020.111213](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111213)

Participări la conferințe

Prezentări orale

'Design of protein-based nanoparticles loaded with FDA approved fluorophores for specific targeting of ovarian cancer cells'

Raluca Borlan, Andra-Sorina Tatar, Olga Soritau, Dana Maniu, Monica Focsan, and Simion Astilean

Conferinței Naționale a Doctoranzilor de la Facultățile de Fizică din cadrul Universităților din Consorțiul Universitaria, **October 2020**, Iasi, Romania

'Sinteza și caracterizarea spectroscopică a unor nanoparticule proteice încărcate cu verde de indocianină pentru aplicații biomedicale'

Raluca Borlan, Andra-Sorina Tatar, Olga Soritau, Dana Maniu, Monica Focsan, and Simion Astilean

Conferinței Naționale a Doctoranzilor de la Facultățile de Fizică din cadrul Universităților din Consorțiul Universitaria, **December 2019**, Bucharest, Romania

Prezentări poster

'Resveratrol-therapeutic agent delivered and localized via fluorescent polyelectrolyte microsystems inside living cells'

Daria Stoia, Roxana Popan, Madalina Nistor, Raluca Borlan, Dumitrita Rugina and Monica Focsan

18th International Conference on Nanoscience & Nanotechnologies, July 2021, Thessaloniki, Greece

'Indocyanine green-loaded protein nanoparticles for near infrared imaging and targeting of ovarian cancer cells'

Raluca Borlan, Andra-Sorina Tatar, Dana Maniu, Olga Soritau, Eva Fischer, Monica Focsan, Achimas-Cadariu Patriciu and Simion Astilean

18th European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, August 2019, Dublin, Ireland

Participare în proiecte de cercetare

- New Targeted Optical Imaging Nanoprobes for Near-Infrared (NIR) Real-Time (RT) Image-Guided Surgery of Ovarian Cancer, Project director: Prof. Dr. Simion Astilean, UEFISCDI Project number: PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0142 (member)
- Emerging Molecular Technologies Based on Micro and Nano-Structured Systems with Biomedical Applications, Leader UBB: Prof. Dr. Simion Astilean, UEFISCDI Project number: PN-III-P1-1.2-PCCDI2017-0010 (member)
- Theranostic Microplatforms for Multimodal Therapy in Human Eye Diseases, A New Paradigm for The Biomedical Applications, Leader UBB: CS I. Dr. Monica Focsan, UEFISCDI Project number: PN-III-P2-2.1-PED-2019-4558 (member)

Această teză a fost susținută financiar de proiectul de cercetare NANOSONDE OPTICE CU ȚINTIRE TUMORALĂ SPECIFICĂ PENTRU GHIDAREA ÎN TIMP REAL A INTERVENȚIILOR CHIRURGICALE ÎN CANCERUL OVARIAN PRIN IMAGISTICA DE CONTRAST ÎN DOMENIUL INFRAROȘU APROPIAT (PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0142) în cadrul PNCDI III (director de proiect prof. dr. Simion Aștilean) și de Fondurile pentru Cercetare – Granturi Doctorale de la Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România.