***Raport științific***
*privind implementarea proiectului* ***cod: PN-III-P1-1.1-TE-2019-1671***
***„Nanostructuri magnetice co-încapsulate pentru aplicații de tip teranostic în cancerul mamar: studii in vivo și in vitro”***
***pe toată perioada de execuție (septembrie 2020-septembrie 2022)***

## 1. Prezentarea succintă a proiectului

Cancerul reprezintă principala cauză de decese la nivel mondial, înregistrând milioane de decese anual, cancerul mamar fiind cel mai frecvent tip de cancer la femei [1]. Terapiile actuale (chirurgia, chimioterapia și radioterapia) prezintă rezultate promițătoare dar sunt încă limitate datorită: i) lipsei de selectivitate, ii) a rezistenței celulelor tumorale la medicamente și iii) a efectelor secundare toxice severe [2]. În acest context, numeroase cercetări s-au îndreptat către dezvoltarea terapiilor antitumorale bazate pe nanotehnologii [3], deoarece acestea se pot constitui ca alternative sigure la chimioterapie și radioterapie pentru multe tipuri de cancer mamar [4]. O modalitate de abordare a tratamentelor specifice se orientează tot mai mult către utilizarea *nanosistemelor de tip teranostic* ce sunt reprezentate de structuri inteligente capabile să elibereze în mod controlat și țintit agenți chimioterapeutici simultan cu posibilitatea de diagnosticare ridicată prin tehnici imagistice [5].

Sistemele de tip teranostic bazate pe nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier funcționalizate (denumite generic în literatura de specialitate *SPIONs*), ar putea reprezenta o alternativă fiabilă datorită proprietăților magnetice adecvate și a toxicității reduse, evidențiate prin teste *in vitro* și *in vivo* [6]. Studii recente dedicate dezvoltării SPIONs-urilor funcționalizate pentru abordări teranostice ale cancerului mamar au raportat rezultate promițătoare [7,8]. O motivație importantă pentru alegerea nanosistemelor magnetice de tip teranostic este reprezentată și de siguranța și complianța pacientului [9] Funcționalitatea magnetică poate fi dublu exploatată atât pentru diagnostic cât şi pentru tratament. SPIONs-urile pot fi utilizate în imagistica de rezonanţă magnetică (IRM) iar abordarea terapeutică poate fi realizată prin utilizarea uneia dintre tehnicile descrise mai jos sau prin îmbinarea avantajelor celor trei: i) folosind ghidarea mediată de câmpul magnetic este posibilă creșterea specificității și a selectivității terapiei, reducând efectele secundare [10]; ii) prin conjugarea cu agenți de țintire, eficacitatea terapeutică poate fi îmbunătățită prin acumularea în zone specifice [11]; iii) SPIONs-urile funcționalizate pot încorpora o varietate mare de agenți chimioterapeutici (Doxorubicină, Docetaxel etc.).

Una dintre cele mai mari provocări în chimioterapie și un impediment major al modalităților actuale de terapie a cancerului de sân este reprezentată de rezistența la medicamente (MDR) [12]. În acest sens s-a propus administrarea concomitentă a două sau mai multe medicamente pentru a valorifica potențialele efecte sinergetice ale acestora folosind un sistem nanometric multifuncțional [13]. Din categoria taxanelor, Docetaxel și Paclitaxel sunt utilizate în tratamentul cancerului de sân metastatic și a cancerului de sân în stadiu incipient [14], dar solubilitatea lor scăzută în mediul apos și MDR limitează aplicațiile lor clinice, aceste medicamente putând fi expulzate din celule prin glicoproteina P (P-gp). Clorhidratul de doxorubicină prezintă cardiotoxicitate severă și poate fi expulzată din celulele canceroase, în special de celula tumorală cu glicoproteina P supraexprimată [15]. Verapamil, un antagonist al canalelor de calciu, este primul medicament testat clinic pentru reducerea MDR [16].

Având în vedere aspectele menționate anterior, acest proiect propune co-încapsularea Verapamilului împreună cu Docetaxel sau Doxorubicină într-un nanosistem magnetic funcționalizat în scopul utilizării acestuia pentru a reduce MDR în celulele tumorale mamare. Aceste particule

"inteligente" au o structură complexă: 1) un miez magnetic (magnetită- are rolul de a direcţiona particulele către zona biologică de interes precum şi a oferi oportunităţi de imagistică); 2) un material de acoperire biocompatibil (N-palmitoil chitosanul biotinilat – asigură stabilitate în mediu fiziologic dar şi multi-funcţionalitate); 3) agenți chiomioterapeutici (adsorbți/ găzduiți în cavităţile interne ale nanoparticulelor); şi 4) o componentă de recunoaştere a celulelor tumorale (reprezentată de un receptor).

## 2. Obiectivele proiectului

Obiectivul principal al acestui proiect este de a furniza cunoştinţe teoretice şi practice în vederea obţinerii unor nanostructuri magnetice co-încapsulate pentru aplicații de tip teranostic în cancerul mamar. *Obiectivele derivate* din acest proiect sunt reprezentate de: O1. Sinteza și caracterizarea unor noi nanosisteme magnetice de tip teranostic; O2. Evaluarea nanosistemelor magnetice de tip teranostic. Studii *in vitro*; O3. Evaluarea *in vivo* a functionalității nanosistemelor magnetice de tip teranostic folosind animale model.

## 3. Raport sintetic al rezultatelor preliminare obţinute în Etapa 1 (2020)- Sinteza si caracterizarea unor noi nanosisteme magnetice de tip teranostic.

In etapa I a proiectului TE, care s-a desfășurat în perioada septembrie – decembrie 2020, s-au sintetizat nanosisteme magnetice pe bază de N-palmitoil chitosan biotinilat (BPCs) și magnetită hidrofobă (acoperită cu oleat de sodiu - codificată Mag-NaOl) în care s-a încapsulat Docetaxel (DTX), codificate NM-D și respectiv nanoparticule martor, preparate în absența agentului chimioterapeutic (codificate NM). Metodele de sinteză pentru N-palmitoil chitosan biotinilat-BPCs și magnetită acoperită cu oleat de sodiu (Mag_NaOl) au fost detaliate anterior în referințele [17,18].

Compoziția nanosistemelor a fost confirmată prin spectroscopie în infraroșu. Spectrele IR ale nanoparticulelor martor (NM), nanoparticulelor NMD și ale magnetitei (Mag_NaOl) sunt detaliate în Fig. 1. Spectrele IR ale nanoparticulelor martor -NM prezintă benzi caracteristice pentru polimer şi anume: 2921 $cm^{-1}$ și 2851 $cm^{-1}$ (vibrații de întindere ale grupării metilenice), 1636 $cm^{-1}$ și 1549 $cm^{-1}$ (benzi reprezentative pentru amida primară și secundară) și 1094 $cm^{-1}$ (vibraţiile grupării C-O-C) și pentru magnetită (576 $cm^{-1}$). Spectrul IR al Docetaxelului, detaliat în literatură, [19] prezintă benzi caracteristice pentru vibrațiile de întindere ale legaturilor N-H și respectiv O-H în zona 3480 $cm^{-1}$ și respectiv 3338 $cm^{-1}$, vibrații de intindere ale C=O la 1740 $cm^{-1}$ și vibrații de deformare în plan ale legăturii N-H la 1632 $cm^{-1}$.

În spectrul nanosistemelor NMD se constată o intensificare a benzii de la 3434 $cm^{-1}$ și o alungire a formei acesteia datorate legăturilor de hidrogen nou formate ca urmare a interacțiunii medicamentului cu polimerul. De asemenea se poate observa o scădere a intensității benzii caracteristice magnetitei (581 $cm^{-1}$) în spectrele nanoparticulelor martor și a celor cu medicament, fapt datorat scăderii cantității de magnetită din nanosisteme (spectrele au fost înregistrate cantitativ). Din analiza rezultatelor de spectroscopie se confirmă obţinerea cu succes a nanoparticulelor încărcate cu agent chimioterapeutic.

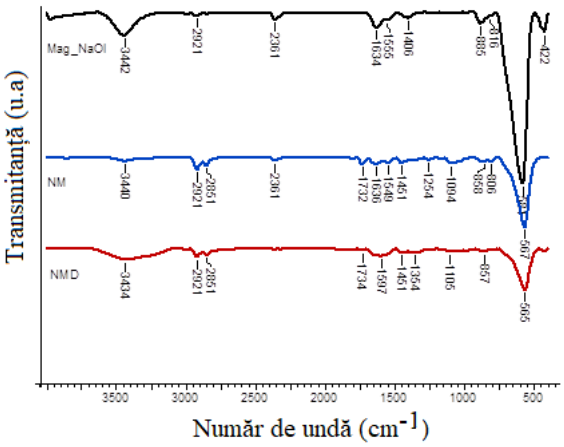


Fig. 1. Spectre IR ale magnetitei, nanoparticulelor martor și ale nanoparticulelor NMD

Aceste nanosisteme au fost ulterior evaluate, în etapa II a proiectului, din punct de vedere al comportamentului *in vitro*. În același timp, în etapa II a proiectului, s-au preparat și evaluat un al doilea lot de nanoparticule magnetice pe bază de N-palmitoil chitosan biotinilat, care conțin magnetită hidrofilă (acoperită cu Pluronic F127) și 2 principii active hidrofile (Doxorubicină și Verapamil).

**4. Raport sintetic al rezultatelor preliminare obținute în Etapa II (2021)- Evaluarea nanosistemelor magnetice de tip teranostic. Studii in vitro.Diseminarea rezultatelor.**

Etapa II-2021, desfășurată în perioada ianuarie-decembrie 2021, a cuprins următoarele activități, conform planului de realizare al proiectului:

A 2.1. Optimizarea caracteristicilor nanosistemelor magnetice de tip teranostic;

A 2.2. Analiza critică a rezultatelor si evaluarea semnificației parametrilor implicați în procesele de preparare;

A2.3. Evaluarea *in vitro* a nanostructurilor magnetice ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor;

A2.4. Evaluarea *in vitro* a degradabilității nanosistemelor magnetice în lichide biologice simulate;

A 2.5. Analiza critică a rezultatelor si evaluarea semnificației parametrilor implicați în procesele de eliberare si biodegradare;

A2.6. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității nanosistemelor magnetice de tip teranostic;

A2.7. Evaluarea *in vitro* a hemocompatibilității nanosistemelor magnetice;

A.2.8. Formularea nanosistemelor magnetice de tip teranostic ca suspensii injectabile;

A.2.9. Evaluarea *in vitro* a capacității nanosistemelor magnetice de a fi utilizați în imagistică;

A 2.10. Management proiect. Diseminarea rezultatelor. Raport intermediar.

Loturile **Mag_NaOl** (magnetită hidrofobă), **NM** (nanoparticule martor-fără medicament), și **NMD** (nanoparticule încărcate cu Docetaxel)

Magnetizarea nanoparticulelor NMD a fost măsurată folosind un magnetometru cu probă vibrantă (Lakeshore VSM 7400 System), la 25°C și ± 20000 G câmp magnetic aplicat. Curba de magnetizare obținută, a evidențiat că nanoparticulele au prezentat un comportament superparamagnetic (nu s-a înregistrat histerezis iar magnetizarea reziduală și forța coercitivă au fost nule) și o magnetizare de saturație ridicată, cu o valoare de 40 emu/g. Caracteristicile superparamagnetice și magnetizarea de saturație ridicată sunt parametri importanți pentru nanoparticulele magnetice utilizate în aplicații biomedicale.

Cinetica de eliberare a Docetaxelului din nanosistemele magnetice (NMD) a fost studiată în soluție tampon acetat pH=5.5, care mimează mediul celulelor tumorale. O cantitate de nanosisteme magnetice a fost redispersată în soluție tampon acetat pH=5.5, și introduse într-o membrană de dializă (Mw=14000 Da) care a fost plasată în soluție tampon (volum final 25ml). Cinetica de eliberare a fost condusă într-un incubator, la 37 ◦C, timp de 72 ore. La intervale stabilite de timp, s-a prelevat 1ml de soluție pentru analiză spectrofotometrică ( λ=229 nm) și s-a înlocuit cu 1ml de soluție tampon. Cantitatea de medicament eliberat s-a determinat pe baza unei curbe etalon, realizată anterior.

Din analiza rezultatelor obținute (Fig.3) se observă că profilul de eliberare al Docetaxelului a evidențiat un comportament bifazic: o eliberare rapidă în primele 6 ore, urmată de o a doua fază corespunzătoare unei eliberări susținute de medicament de până la 72 de ore. Efectul inițial de eliberare rapidă (burst effect) ar putea fi atribuit difuziei chimioterapeuticului absorbit pe suprafața nanoparticulelor sau slab interacționat cu nucleele hidrofobe ale nanoparticulelor magnetice biotinilate, în timp ce în următoarea etapă de eliberare treptată, are loc difuzia medicamentului încapsulat în domeniile hidrofobe interioare ale nanostructurilor.

Pentru testele de citotoxicitate, s-a utilizat linia celulară MDA-MB-231 cultivată conform protocolului producătorului. Pe scurt, celulele au fost crescute în mediu DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 µg / ml streptomicină și 100 UI / ml penicilină. Pentru aceste studii, $5x10^3$ celule / godeu au fost cultivate în plăci de cultură cu 96 de godeuri la o temperatură de 37° C într-o atmosferă umidificată conținând 5% CO2. Nanoparticulele magnetice (martor și cu medicament) au fost suspendate în mediu, concentrații (50 µg / mL). Celulele au fost incubate timp de 48 de ore iar testul MTT standard a fost efectuat folosind Tecan Sunrise Plate Reader, la 570 nm. Rezultatele sunt exprimate ca valoare medie ± deviație standard (SD) (n = 3).

Din analiza datelor de viabilitate celulară a liniei MDA-MB-231 la 48 de ore, după incubarea cu nanoparticulele magnetice preparate în absența medicamentului (NM) se constată ca acestea nu sunt citotoxice, indicând o viabilitate mai mare de 90% din celulele active metabolic. Pentru lotul cu docetaxel (NMD), viabilitatea celulară a scăzut la 65%, datorită eliberării medicamentului. Teste suplimentare de evaluare a acestor nanoparticule vor continua, în etapa următoare a acestui proiect.

Loturile **Mag_PF127** (magnetită hidrofilă), **NP** (nanoparticule martor-fără medicament), NP-DOX, nanoparticule încărcate cu Doxorubicină) NP-VER (nanoparticule încărcate cu Verapamil), NP-DOX-VER) și NMD (nanoparticule încărcate cu cu Doxorubicină și Verapamil)

Materiale, reactivi și aparatura utilizată

Materialele și reactivii utilizați: N-palmitoil chitosan biotinilat (**BPCs**), magnetită hidrofilă, acoperită cu Pluronic F127 (**Mag_PF127**), Doxorubicină (**DOX**), Verapamil (**VER),** și solvenții (acid acetic, alcool etilic). Aparatura: Omogenizator cu ultrasunete Sonopuls HD 2200; Agitator mecanic. Metodele de sinteză pentru N-palmitoil chitosan biotinilat-BPCs și magnetită hidrofilă (**Mag-PF127**), au fost detaliate anterior în referințele [17, 20].

Pentru încapsularea medicamentelor, s-au ales condițiile de sinteză pentru lotul NP martor, acesta prezentând cele mai mici dimensiuni (365 nm).

Caracterizarea fizico-chimică a nanosistemelor magnetice

Nanosistemele magnetice au fost caracterizate din punct de vedere compoziţional, al dimensiunilor şi al potenţialului Zeta. Dimensiunea medie a particulelor magnetice a fost determinată cu un aparat de tip Malvern Zetasizer NanoS, utilizând tehnica numită DLS - Dynamic Light Scattering. Potențialul Zeta a fost măsurat cu același aparat (Zetasizer Malvern NanoS). Spectrele IR s-au realizat cu Spectroscopul FT-IR Bruker Vertex 70 (100 de scanări între 4000 - 400 $cm^{-1}$, cu o rezoluţie de 4 $cm^{-1}$).

Compoziția lotului NP martor a fost confirmată prin spectroscopie IR (Fig. 5A). Spectrul IR al lotului NP martor prezintă benzile reprezentative pentru polimer în intervalul 1640-1550 $cm^{-1}$ (amida primară și secundară) și la 1094 $cm^{-1}$ (C-O-C) și pentru magnetită (576 $cm^{-1}$). În spectrele IR ale nanoparticulelor încărcate cu medicamente nu se observă modificări notabile ale benzilor reprezentative, probabil datorită faptului că polimerul și medicamentele prezintă aceleași benzi. Morfologia nanosistemelor a fost investigată cu un microscop electronic cu scanare Verios G4 UC (Thermo Scientific) care funcționează în modul STEM la 30 kV, cu un detector STEM 3+ (Bright-Field Mode) (Fig. 3). Probele au fost analizate pe grile de cupru acoperite cu carbon. Nanosistemele dispersate în apă (0,1%) au fost plasate pe grile și apoi solventul a fost îndepărtat sub vid. Imaginile SEM (Fig. 6) confirmă încorporarea magnetitei (zonele negru închis) în structura nanosistemelor care se aglomerează în urma îndepărtării solventului. Magnetizarea nanoparticulelor NP-DOX a fost măsurată folosind un magnetometru cu probă vibrantă (Lakeshore VSM 7400 System), la 25°C și ± 20000 G câmp magnetic aplicat. Curba de magnetizare obținută (Fig. 7), a evidențiat că nanoparticulele au prezentat un comportament superparamagnetic și o magnetizare de saturație ridicată, cu o valoare de 68 emu/g.

Cinetica de eliberare a medicamentelor din nanosistemele magnetice (NP-DOX-VER) a fost studiată în două medii ce simulează mediile biologice: soluții tampon fosfat cu pH=7.4 și respectiv tampon acetat pH=5.5. O cantitate de nanosisteme magnetice a fost redispersată în cele două soluții tampon și introduse într-o membrană de dializă (Mw=14000 Da) care a fost plasată în soluții tampon (volum final 25ml). Cinetica de eliberare a fost condusă într-un incubator, la 37 ◦C, la întuneric, timp de 72 ore. La intervale stabilite de timp, s-a prelevat 1ml de soluție pentru analiză spectrofotometrică ( $\lambda$=278 nm pentru Verapamil, și $\lambda$=480 nm pentru Doxorubicină) și s-a înlocuit cu 1ml de soluție tampon. Cantitatea de medicament eliberat s-a determinat pe baza curbelor etalon, realizate anterior pentru cele 2 tipuri de medicamente.

Din analiza cineticii de eliberare a medicamentelor din lotul NP-DOX-VER, se poate observa că o cantitate mai mare de agent chimioterapeutic (Doxorubicină) se eliberează în mediu acid (pH=5.5) comparativ cu mediu neutru, aspect care este favorabil, datorită faptului că celulele tumorale au pH acid în timp ce Verapamilul se eliberează în cantitate mai mare în mediu cu pH=7.4. Aceste profile de eliberare sunt în bună corelație cu alte rezultate publicate în literatura de specialitate [22].

Chitosanul și derivaţii săi, sunt expuşi, în corpul uman degradării chimice și enzimatice, ultima dintre ele realizându-se în special de către lizozim și enzimele bacteriene [23]. În cele mai multe dintre studiile raportate, chitosanul a fost degradat şi uşor excretat din organism. Mecanismul de biodegradare nu este clarificat pe deplin, dar unele etape au ca rezultat diverşi produşi de degradare precum oligomeri ai chitosanului, N-acetil D-glucozamină și respectiv D-glucozamină [18].

Evaluarea *in vitro* a biodegradabilităţii nanosistemelor magnetice s-a realizat în două medii biologice simulate (soluții tampon fosfat pH=7.4 și respectiv 5.5), în prezenţa lizozimului, timp de 14 zile, iar concentraţia în produşii de degradare a fost determinată prin metoda fericianurii de potasiu. O cantitate de nanoparticule a fost redispersată în cele două soluții tampon într-o membrană de dializă (Mw=12 400 Da) care a fost plasată în soluții tampon fosfat (volum final 25 ml), într-un incubator, la 37◦C. La intervale de timp, s-a prelevat 1 ml de soluție pentru analiză spectrofotometrică (la 420 nm) și s-a înlocuit cu 1 ml de soluție tampon. Peste proba prelevată s-au adăugat 4 ml soluţie de fericianură de potasiu, s-a pus la fiert timp de 15 minute, după care s-a răcit şi s-au adăugat 5 ml soluţie tampon fosfat şi s-a citit absorbanţa la spectrofotometru. După 3 zile, mediul a fost complet îndepărtat și înlocuit cu mediu proaspăt. O curbă de calibrare realizată cu N-acetil-D-glucozamină a fost utilizată pentru a evalua cantitatea de unități reducătoare rezultate în urma degradării polimerului.

Rezultatele au confirmat capacitatea nanoparticulelor de a fi degradate în organismul uman, lizozimul fiind o enzimă care se regăsește în diferite fluide biologice și țesuturi, inclusiv în celulele canceroase mamare [24]. Din analiza cineticii de eliberare și a rezultatelor obținute în urma testelor de biodegradare în prezența lizozimului se poate observa că profilele de eliberare ale Doxorubicinei sunt dependente și de procesele de biodegradare ale structurilor.

Viabilitatea celulara (testul ToxiLight)

Viabilitatea celulară a lotului NP și a magnetitei au fost evaluate utilizand kitul ToxiLight (Lonza). Kitul ToxiLight a fost utilizat pentru analiza toxicității celulare din supernatant (mediul de cultură) prin determinarea cantitativă a adenilate-kinasei (AK) eliberate de celulele apoptotice. Utilizând protocolul ToxiLight, AK a fost determinat prin luminescență cu ajutorul cititorului de plăci POLARstar Omega (BMG Labtech). Cantitatea de AK produsă de celulele apoptotice este direct proporționala cu gradul de citotoxicitate celulară. Astfel, din datele de citotoxicitate se observă că viabilitatea celulară nu este influentata de concentratia de NP martor, indicand o viabilitate ridicata (fara modificari semnificative), similara cu cea a probelor control si un bun comporament celular in culturile cu celulele de linie MCF-7. In acelasi timp pentru Mag-PF127 datele obtinute pentru citotoxicitate celulara indica un comportament asemanator cu probele control, o viabilitate ridicata fara modificari semnificative comparabila cu cea a probei control. Concluzionand, datele de citotoxicitate celulara (metoda ToxiLight) evidentiaza un raspuns favorabil cu o viabilitate celulara crescuta similara cu cea a probei control pentru ambele sistemele (NP si Mag-PF127). Analiza statistica a fost efectuata utilizand ANOVA unifactorială (One-way ANOVA) corelata cu analiza posthoc Dunnett's folosing software-ul GraphPad.

Evaluarea citotoxicității prin Testul MTS

Pentru evaluarea citotoxicității s-a utilizat testul MTS (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, SUA). Pe scurt, după aplicarea suspensiilor de nanoparticule in concentratii din intervalul 0.05-50 µg/ml, timp de 24h, mediul de cultură a fost îndepărtat din fiecare godeu, spălat cu PBS și înlocuit cu 100µL de soluție MTS (raport 100:20:1) mediu de cultură, MTS și respectiv PBS. Placa de 96 de godeuri a fost incubată timp de 30 de minute la 37 °C într-o atmosferă umidificată 99% de 5% v/v) $CO_2$. Absorbanța a fost măsurată direct de pe placă cu ajutorul unui cititor de microplăci (Infinite M200, Tecan) la 490nm.

Din analiza rezultatelor se constată că în intervalul de concentrații testate loturile de nanoparticule nu prezintă efecte citotoxice. Odata cu creșterea concentrației de suspensii de nanoparticule, în intervalul 1- 50µg/ml pentru loturile NP-DOX și NP-DOX-VER se constată o scădere a viabilității celulare, efect care este mai pronunțat în cazul celulelor MDA-MB-231. În același interval de concentrații, NP goale și lotul NP-VER nu au manisfestat efecte citotoxice.

Pentru a studia efectele nanosistemelor magnetice în contact cu sângele, s-au realizat teste convenţionale de coagulare care au constat în măsurarea timpului de protrombina (PT), a timpului de tromboplastină parțial activat (APTT) și determinarea cantității de fibrinogen (kitul PT-Fibrinogen HS PLUS), după contactul cu suspensii de NP martor și NP-DOX. Rezultatele obținute confirmă că nanoparticulele nu influenteaza procesul de coagulare. Testele de redispersie s-au realizat în două medii comune care se folosesc ca soluţii injectabile și anume: serul fiziologic 0,9 % NaCl şi soluţia de glucoză 10 %. Pentru a evalua potențialul acestor nanoparticule de a fi utilizate în imagistică celulară s-a optat pentru atașarea pe suprafața polimerică a unui marker fluorescent (Cy5.5). Cy5.5 (tetrametilindo(di)-carbocianină) este un colorant sintetic din clasa cianinelor, utilizat pentru etichetarea grupărilor peptidice, a proteinelor, a oligonucleotidelor și în imagistica biomedicală. Analiza imaginilor de microscopie confirmă atașarea markerului pe nanoparticule. Teste suplimentare de evaluare a acestor nanoparticule vor continua, în etapa următoare a acestui proiect.

**5.Raport sintetic al rezultatelor preliminare obținute în Etapa III (2022)- Evaluarea in vivo a functionalitatii nanosistemelor magnetice de tip teranostic folosind animale model.Diseminarea rezultatelor.**

*Etapa III-2022,* desfășurată în perioada ianuarie-septembrie 2022, a cuprins următoarele activități, conform planului de realizare al proiectului:

A 3.1 - Analiza critica a rezultatelor. Selectia loturilor de particule magnetice

A 3.2 - Dezvoltarea modelelor tumorale animale

A 3.3 - Evaluarea impactului chimioterapeuticelor prin dozarea markerilor specifici. Teste imunohistochimice

Act 3.4 - Analiza critică a rezultatelor. Management proiect. Diseminarea rezultatelor. Raport final

A3.1. Analiza critica a rezultatelor. Selectia loturilor de particule magnetice

Etapa III a proiectului a debutat cu o analiză critică a rezultatelor obținute în etapele anterioare și s-au formulat următoarele concluzii. Nanoparticulele obținute în etapele anterioare au înregistrat dimensiuni variabile, de ordinul a 250nm și 350nm, această caracteristică fiind dependentă de condițiile de sinteză. Compoziția chimică și structura moleculară a nanoparticulelor obținute a fost confirmată prin spectroscopie IR. Curbele de magnetizare, au evidențiat că nanoparticulele au prezentat un comportament superparamagnetic și o magnetizare de saturație ridicată. Studiile de eliberare *in vitro* au confirmat abilitatea acestor nanoparticule de a fi utilizate ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, având sensibilitate la pH, caracteristică a mediului tumoral. Studiile de degradare *in vitro*, desfășurate în două medii biologice simulate, au demonstrat susceptibilitatea la degradare enzimatică provocată de lizozim, pH-ul influențând de asemenea procesul de biodegradare. Din analiza rezultatelor testelor de citotoxicitate s-a constatat că în intervalul de concentrații cuprins între 0.05 µg/ml și 0.5 µg/ml, loturile de nanoparticule nu prezintă efecte citotoxice, dar odată cu creșterea concentrației de nanoparticule, în intervalul 1- 50µg/ml se constată o scădere a viabilității celulare. În același interval de concentrații, NP goale nu au manisfestat efecte citotoxice.

A 3.2 - Dezvoltarea modelelor tumorale animale

Următoarea activitate din cadrul proiectului a fost reprezentată de dezvoltarea modelului tumoral animal. Activitățile de evaluare *in vivo* a functionalitatii nanosistemelor magnetice de tip teranostic folosind animale model aferente proiectului intitulat "Nanostructuri magnetice co-încapsulate pentru aplicații de tip teranostic în cancerul mamar: studii in vivo" au fost realizat după obținerea autorizației nr. 51/18.03.2022 acordate de către Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Iași. Studiile privind toxicitatea și eficiența nanostructurile magnetice co-încapsulate au fost realizate pe model de cancer mamar utilizând 60 de animale experimentale femele specia șobolani Wistar cu o greutate cuprinsă între 130-170 g. Numărul total al animalelor testate a fost de 60 împărțite în 8 loturi a câte 6 animale pentru materialele testate (nanostructuri martor, nanostructuri funcționalizate, nanostructuri funcționalizate cu agent de țintire, nanostructuri funcționalizate cu agent chimioterapeutic 1, nanostructuri funcționalizate cu agent chimioterapeutic 2, nanostructuri cu 2 agenți chimioterapeutici co-incapsulați, nanostructuri cu marker fluorescent, nanostructuri multifuncționale), un lot martor și un lot control.

Au fost efectuate 2 tipuri de inducere a tumorii de cancer de sân, și anume metoda de injectare a celulor de tip LLC-WRC 256 (ATCC® CCL-38TM), și metoda chimică utilizând carcinogenul - DMBA (7,12-dimetil-benzantracen, Sigma Aldrich, M=256,34 g/mol).

Act 3.4 - Analiza critică a rezultatelor. Management proiect. Diseminarea rezultatelor. Raport final

În cadrul proiectului s-au sintetizat, noi tipuri de nanoparticule magnetice funcționalizate care să conțină 2 principii active. Aceste particule "inteligente" au o structură complexă: 1) un miez magnetic (magnetite); 2) un material de acoperire biocompatibil (N-palmitoil chitosanul biotinilat – asigură stabilitate în mediu fiziologic dar şi multi-funcţionalitate); 3) agenți chiomioterapeutici (adsorbți/ găzduiți în cavităţile interne ale nanoparticulelor); 4) o componentă de recunoaştere a celulelor tumorale (reprezentată de biotină) și 5) marker fluorescent. Compoziția chimică și structura moleculară a nanoparticulelor obținute a fost confirmată prin spectroscopie IR. Nanoparticulele au prezentat un comportament superparamagnetic și o magnetizare de saturație ridicată, abilitatea de a elibera în mod controlat principiile active, de a degrada în mediul biologic și de a induce efecte citotoxice în contact cu linii celulare tumorale mamare. Teste in vivo, realizate pe modele tumorale animale au confirmat capacitatea acestor nanostructuri de a reduce volumul tumorii mamare.

Rezultatele ştiintifice obţinute în cadrul etapei proiectului, cod PN-III-P1-1.1-TE-2019-1671 au fost valorificate prin publicarea a 3 articole în reviste internaționale de specialitate cu factor ISI, 1 articol indexat în baza de date internaționale IEEE, 2 articole în volumele unor conferințe naționale, și prin participarea cu 5 lucrări la 5 conferinţe internaţionale, 2 lucrări la conferințe naționale, organizarea unui workshop și respectiv redactarea unei lucrări de dizertație și a 2 lucrări de diplomă.

Pagina web a proiectului - https://coteran.grant.umfiasi.ro/

**Articole**

**1.**V. Balan, G. Dodi, C.T. Mihai, A.M. Serban, V.C. Ursachi. *Biotinylated chitosan macromolecule based nanosystems: A review from chemical design to biological targets*. International Journal of Biological Macromolecules 188 (2021) 82–93. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.197. **FI= 6.953.**

**2.**B.E.B. Crețu, G. Dodi, A. Shavandi, I. Gardikiotis, I.L. Șerban, V. Balan. *Imaging Constructs: The Rise of Iron Oxide Nanoparticles*. Molecules 2021, 26, 3437. https://doi.org/10.3390/ molecules26113437. **FI= 4.927.**

**3**. I Gardikiotis, FD Cojocaru, CT Mihai, V Balan, G Dodi, *Borrowing the Features of Biopolymers for Emerging Wound Healing Dressings: A Review*, International Journal of Molecular Sciences 2022, 23 (15), 87782022, https://doi.org/10.3390/ijms23158778, **FI=6.208.**

**4.** V.C. Ursachi, C.T Mihai, A. Nastuta, C.D. Dimitriu, L. Verestiuc, V. Balan. *In Vitro Evaluation of Paclitaxel Loaded Magnetic Nanoparticles for Breast Cancer Therapy*. IEEE Proceedings of 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021, Web Conference, Romania, November 18-19, 2021.

**5.** Ș.Sandu, A-A.Grigoraș, A-M. Șerban, V.Bălan, *Nanoparticule magnetice pe bază de n-palmitoil chitosan biotinilat pentru aplicații biomedicale.* Volumul Conferinței Naționale de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri cercetători, ediția a XXIV–a, 2022.

**6.** R-I.Grigoriciuc, A.Lazăr, V.Bălan, *Evaluarea hemocompatibilității unor nanoparticule magnetice.* Volumul Conferinței Naționale de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri cercetători, ediția a XXIV–a, 2022.

**Conferințe internaționale**

**1.** V. Ursachi, G. Dodi, F.D. Cojocaru, A.M. Serban, B.E. Cretu, C.T. Mihai, V. Balan. *Docetaxel loaded magnetic nanoparticles based on functionalized chitosan with potential theranostic applications: synthesis, characterization and in vitro studies.* WG 2 Online Conference on Characterisation of nanomaterials towards safe and efficient nanodrugs, June 22-23, 2021, **poster.**

**2.** V. Balan, V.C. Ursachi, G. Dodi, F.D. Cojocaru, B.E. Cretu, C.T. Mihai, L. Verestiuc. *Development of magnetic nanoparticles based on biotinylated N-palmitoyl chitosan loaded with Doxorubicin.* 18th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN21), 6-9 July 2021, Thessaloniki, Greece, **poster.**

**3.** V.C. Ursachi, C.T Mihai, A. Nastuta, C.D. Dimitriu, L. Verestiuc, V. Balan. *In Vitro Evaluation of Paclitaxel Loaded Magnetic Nanoparticles for Breast Cancer Therapy*. 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021, Web Conference, Romania, November 18-19, 2021, **prezentare orală.**

**4.** V. Balan, S. Sandu, F.D. Cojocaru, A. Luca, G. Dodi, B.E. Cretu, L. Verestiuc. *Co-encapsulated magnetic nanostructures based on functionalized chitosan for theranostic applications*, 9th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices-BIOMMEDD'2022, Bucharest (Romania), July 20-22th, 2022, **prezentare orală.**

**5.** V. Balan, V.C. Ursachi, F.D. Cojocaru, G. Dodi, C.T. Mihai, B.E. Cretu, L. Verestiuc. *Design and preliminary in vitro evaluation of magnetic nanoparticles based on biotinylated N-palmitoyl chitosan for breast cancer applications.* 19th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN22), 5-8 July 2022, Thessaloniki, Greece, **poster.**

**Conferinte nationale**

**1.Workshop -** *Metode și tehnici in vitro de simulare a transferului transdermal***,** CONFERINȚA NAȚIONALĂ DE BIOINGINERIE PENTRU STUDENȚI ȘI TINERI CERCETĂTORI, Ediția a XXIV –a, 14– 17 Aprilie 2022, SL. dr. bioing. Vera Bălan.

**2.** Ș.Sandu, A-A.Grigoraș, A-M. Șerban, V.Bălan, *Nanoparticule magnetice pe bază de n-palmitoil chitosan biotinilat pentru aplicații biomedicale.* Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri cercetători, ediția a XXIV–a, 2022, **poster.**

**3.** R-I.Grigoriciuc, A.Lazăr, V.Bălan, *Evaluarea hemocompatibilității unor nanoparticule magnetice.* Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri cercetători, ediția a XXIV–a, 2022, **poster.**

**Referințe** **1.** F. Bray et al. CA CANCER J CLIN 68: 394–424, 2018; **2**. S. Chowdhury et al. J. Photochem. Photobiol. B, Biol. 164: 151–159, 2016; **3.** B. Conte, L. Del Mastro. Minerva Ginecol. 69: 350-356, 2017; **4**. Y. Kong et al. Bioorg. Med. Chem 25 : 2226–2233, 2017; **5.** X. Li et al. Adv Mater. 29(23): 2017; **6.** L. Zhao et al. Mater. Sci. Eng., C 67 611–622, 2016; **7.** A.S. Semkina et al. Nanomedicine: NBM, 14, 1733–1742, 2018; **8.** P. Dadras et al. Eur J. Pharm Sci 97: 47–54, 2017; **9**. S. Sengupta, V.K. Balla . J Adv Res. 14: 97–111, 2018; **10.** L. Pan et al. Chemical Society Reviews, 18 (2018); **11**. F. Tian et al. Acta Biomaterialia 75: 398–412, 2018; **12**. X. Cheng, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 181: 185–197, 2019; **13.** J. Park, et al. J Breast Cancer; 20(4): 347-355, 2017; **14.** Guo et al. Colloids Surf. B 151 (2017) 119–127; **15.** P. Li et al. Biochem Biophys Res Commun 516, 183-188, 2019; **16.** F. Wang et al. Biomaterials 32, 9444–9456, 2011; **17. V. Balan et al. Chem. Eng. J. 279, 188–197, 2015; 18. V. Balan et al. Eur. Polym. J. 81, 284–294, 2016; 19.** A. Jain et al. Int. J. Biol. Macromol. 69 (2014) 546–553. **20. V. Balan, et al. J. Nanopart. Res. 14 (2012) 1–14. 21.** G. Unsoy et al. Eur. J. Pharm. Sci. 62 (2014) 243–250. **22.** M. Qin, et al. Macromol. Biosci. 2014, 14, 1106–1115. **23.** T. Kean, M. Thanou. Adv. Drug Deliver. Rev. 62 (2010) 3–11. **24**. F. Vizoso, et al. Ann. Surg. Oncol. 8 (2001) 667–674.

**Director Proiect,**
**Sl.dr.bioing. Vera Bălan**