

PLATFORME TERANOSTICE ANTITUMORALE PE BAZĂ DE CARBON DOTS ÎN MATRICE POLIMERICE

Cod proiect: PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083

Contract finanțare: 37PCCDI/2018

Director proiect: Acad. Bogdan C. Simionescu

Raport de activitate științifică

Etapa IV (2021)

(a) Rezumat

În cadrul etapei 2021 au fost definitive cercetările privind obținerea unor platforme teranostice având atât acțiune anti-tumorală cât și rol în diagnosticarea prin tehnici de imagistică RMN. Astfel au fost efectuate studii *in vitro* teste comparative în imagistică prin tehnica de rezonanță magnetică (MRI) a platformelor teranostice pe bază de Carbon Dots dopați cu Gd^{3+} , Mn^{2+} și Fe^{3+} sintetizate în cadrul planului experimental aferent proiectului. Studiile experimentale demonstrează proprietăți superioare ale Carbon Dots- Mn^{2+} comparativ cu Carbon Dots- Gd^{3+} și Carbon Dots- Fe^{3+} precum: toxicitatea scăzută la nivelul celulelor normale, proprietăți antitumorale, proprietăți superioare a contrastului obținut în investigarea RMN. În fapt, performanțele obținute cu Carbon Dots imidici dopați cu Mn^{2+} sintetizați în cadrul proiectului se situează sau depășesc chiar performanțele unor agenți de contrast utilizați în prezent pe scară largă precum Gadovit, având și avantajul suplimentar a micorării toxicității dublat de acțiunea anti-tumorală specifică. Prin urmare, nanostructurile de tip Carbon Dots obținute din N-Hidroxifitalimid și dopate cu Mn^{2+} pot fi utilizate ca platforme teranostice eficiente în tratamentul anti-tumoral și imagistic medical RMN. În concluzie, datele experimentale demonstrează proprietățile superioare ale CD-NHF- Mn^{2+} atât ca agent de contrast cât și ca efect antitumoral, obiectivul principal al proiectului fiind astfel îndeplinit. Alte activități finalizate în această etapă au fost stabilirea unor metode de control a calității precursorilor, a nanostructurilor obținute și evaluarea reproductibilității procesului de obținere la scară pilot a nanostructurilor de tip Carbon Dots din precursori imidici precum și stabilirea protocoalelor de analize fizico-chimice ale Carbon Dots obținute. Protocolul elaborat a permis obținerea cu reproductibilitate înaltă, la scară pilot, a CDs, randamentul mediu fiind cca. de 77%. În cadrul etapei au fost publicate/ acceptate la publicare/ trimise pentru publicare 5 lucrări ISI și a fost înregistrat la OSIM o propunere de brevet invenție.

(b) Descriere științifică și tehnic

Activități 4.1-2. Investigarea in vivo a activității antitumorale a formulărilor pe bază de complexi Carbon Dots - Gd³⁺ pe model animal cu tumori induse (finalizarea studiului)
Evaluarea in vitro imagistică prin tehnica de rezonanță magnetică (MRI) a platformelor teranostice pe bază de complexi Carbon Dots - Gd³⁺, Carbon Dots-NHF-Mn²⁺ și Carbon Dots-Fe³⁺.

Definirea unor recomandări preliminare de utilizare a formulărilor propuse ca platforme teranostice în tratamentul tipurilor de tumori investigate (finalizare A.3.4)

Testările *in vitro* au fost planificate pentru a evalua potențialul noilor CD-NHF dopați cu Gd³⁺, Mn²⁺ și Fe³⁺ preparați ca agenți de contrast RMN, prin determinarea valorilor relaxivității longitudinale și transversale, r_1 și respectiv r_2 , calculate din timpii de relaxare T1 și T2 corespunzător. Din fiecare compus s-a preparat o soluție stoc de 5 mg / ml, prin dizolvarea a 20 mg pulbere în 4 ml PBS 0,01M, la pH fiziologic (7,4). Probele pentru scanare RMN au fost preparate prin dispersarea a 10 ÷ 60 μ L soluției stoc în 10 ml gel de agaroză 1% proaspăt preparat, la aproximativ 50° C pentru a obține șase concentrații pentru fiecare compus testat, după cum urmează : 0,005, 0,01, 0,015, 0,02 , 0,025 și 0,03 mg / ml. Măsurătorile T1 și T2 au fost efectuate folosind un instrument de 1 Tesla pentru animale mici de (nanoScan PET-MRI, Mediso LTD), având în vedere câmpul magnetic B0 și calibrarea bobinei la o frecvență de protoni de apă. Flacoanele de sticlă care cuprind probele care trebuie analizate au fost poziționate orizontal pe patul de achiziție a corpului șobolanului, în centrul câmpului vizual al bobinei. Timpii de relaxare T1 au fost determinați printr-o metodă de estimare în două puncte, printr-o secvență de ecou gradient stricat 2D (T1 GRE), în timp ce pentru măsurătorile T2 am utilizat secvența de ecou de spin standard multiecho 2D (T2 SE). Din datele obținute se observă capacitatea compusului Mn²⁺ de a scurta atât T1 cât și T2, cu creșterea concentrațiilor de la C1 (0.005 mg/mL) la C6 (0.03 mg/mL). Compusul pe bază de Gd³⁺ și Fe³⁺ au o acțiune mai discretă și aceasta variază mai puțin cu concentrația, în condițiile de lucru testate (**Figura 1**)

În 2021 s-a realizat în procent de 100% retestarea imagistică *in vitro* a Carbon Dots-NHF-Gd³⁺, Carbon Dots-NHF-Mn²⁺, Carbon Dots-NH-Fe³⁺ și a capacității de folosire a acestora ca agenți de contrast. Datele experimentale demonstrează proprietăți superioare ale Carbon Dots-Mn²⁺ comparativ cu Carbon Dots-Gd³⁺ și Carbon Dots-Fe³⁺ cum ar fi:

- Toxicitatea scăzută la nivelul celulelor normale;
- Proprietăți antitumorale;
- Agent de contrast cu proprietăți superioare compuşilor Carbon Dots-Gd³⁺ și Carbon Dots-Fe³⁺.

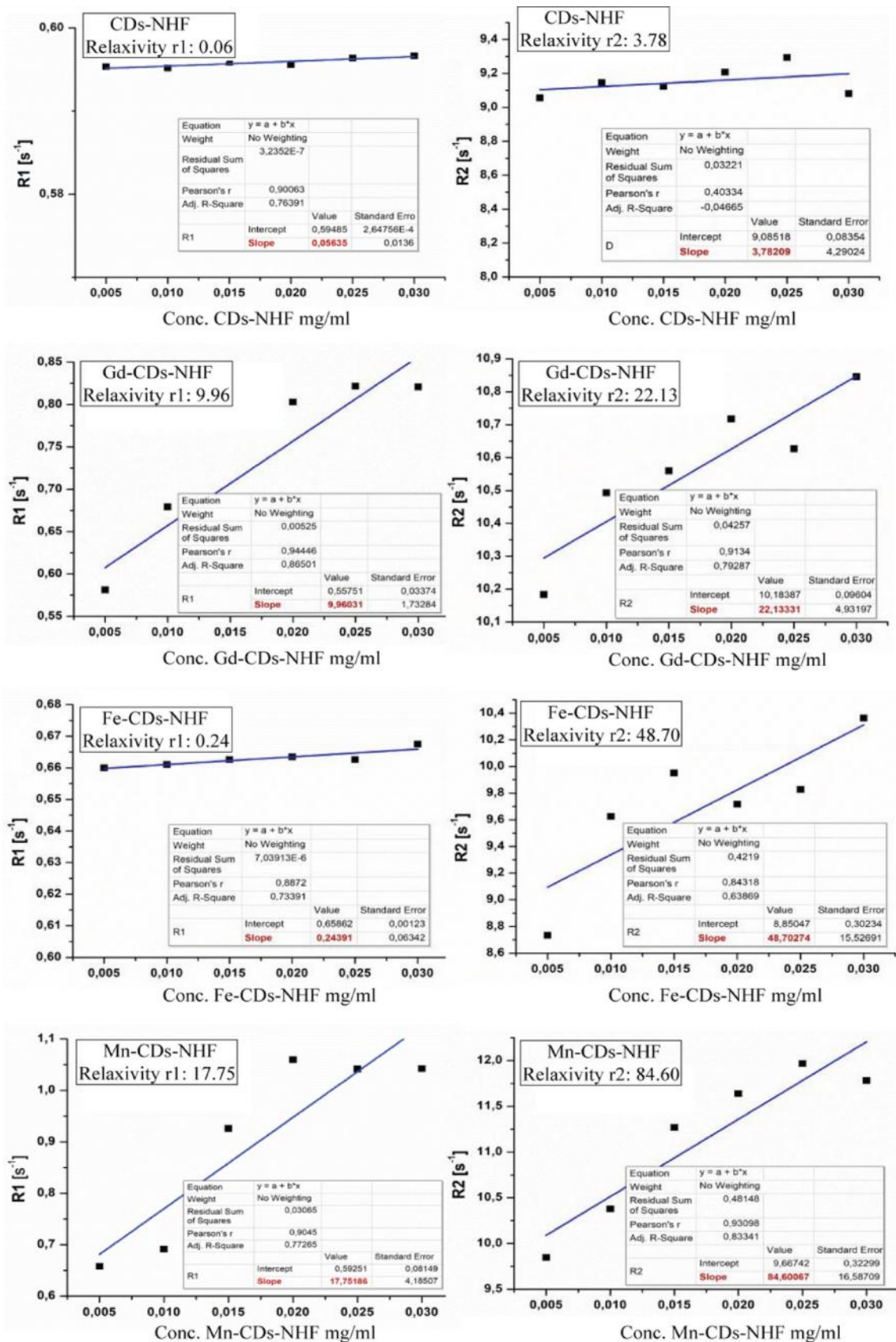


Figura 1 Relaxivitățile r1 și r2 ale CD-NHF (control negativ), Gd-CD-NHF (control pozitiv), Fe-CD-NHF și Mn-CDs-NHF

- **Investigarea *in vivo* a activității antitumorale prin tehnica de rezonanță magnetică (MRI) a platformelor teranostice pe bază de complexi Carbon Dots-NHF-Mn²⁺ pe model animal cu tumori induse**

În această etapă din cadrul activității am evaluat efectul CD-NHF-Mn²⁺ *in vivo* pe model animal cu tumori mamare induse. Imagistica prin rezonanță magnetică (RMN) rămâne una dintre cele mai valoroase tehnici pentru investigațiile *in vivo*, datorită proprietăților sale neinvazive, care pot furniza atât date anatomice, cât și funcționale.

În prima etapă s-au testat în oareci natiți (fără tumori) calitatea imagistică a compusului Carbon Dots-NHF-Mn²⁺ prin comparație cu compusul comercial Gadovist. Imaginile obținute arată abilitatea ridicată a compusului Mn-CDs-NHF ca agent de contrast RMN comparativ cu Gadovist, (agent comercial de contrast RMN) (Figura 2). Imaginile au fost obținute folosind aceleași secvențe, efectuate la 2 ore după administrarea *i.p.*

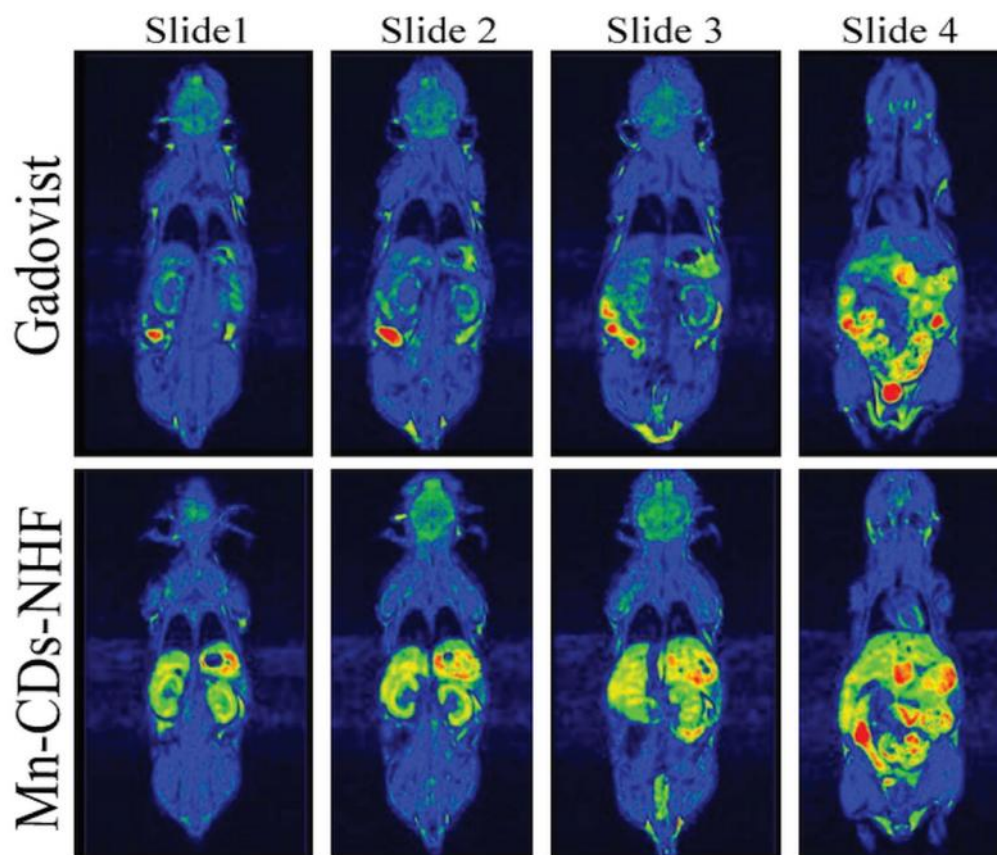


Figura 2 Imagini comparative RMN ale oarecilor sâni tratați cu Gadovist (randul de sus) și Mn-CDs-NHF (randul de jos)

În a doua etapă două grupuri de oareci purtători de tumori (femele din specia Balb/c), cuprinzând 6 oareci per grup, au fost investigați odată pe săptămână prin scanare RMN: un grup numit „Tratat” care a primit Mn-CDs-NHF ca agent teranostic prin administrare intraperitoneală (*i.p.*) și un alt grup numit „Control”, primind doar Gadovist, un agent de

contrast comercial. Atât Mn-CD-NHF, cât i Gadovist au fost administrate prin injectare i.p, cu 2 ore înainte de examenul RMN.

Șoarecii au fost anesteziați utilizând un sistem de administrare a sevofluranului conectat la o cameră transparentă la o concentrație de 3,5-4% amestec de aer și oxigen. După anestezie, șoarecii au fost transferați pe patul scannerului nanoScan PET / MRI (Mediso®, Budapesta, Ungaria) și anestezia de întreținere a fost ajustată la 2%. Animalele au fost supuse scanării RMN folosind secvența TIGRE, planuri coronale și axiale. Această secvență a fost selectată datorită timpului scurt de investigație, 22 de minute pentru ambele avioane. Parametrii au fost după cum urmează : TR = 13,1; TE = 3,8 / 2,2; FA = 30 °; NSA = 4; grosimea feliei = 1 mm. Datele brute de imagistică au fost procesate utilizând software-ul Carimas (v. 2.10), care a permis calculul, inclusiv volumul tumorii, în afară de imagini 2D pentru fiecare secțiune.

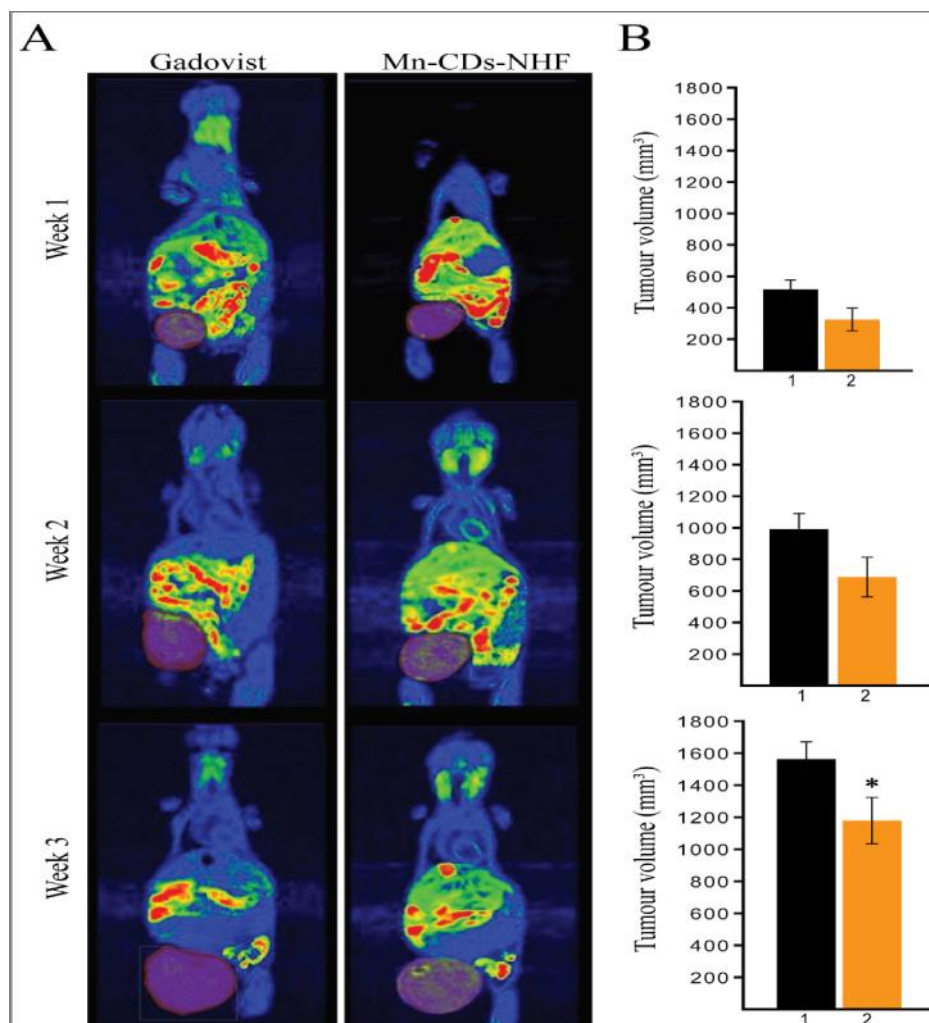


Figura. 3 Imagini reprezentative RMN și scorizare a șoarecilor purtători de tumori tratați cu Gadovist sau Mn-CDs-NHF. (A) Imagine RMN (B) Scorizarea volumului tumorii primare pentru fiecare grup tratat. 1. Gadovist, Mn-CDs-NHF 2. * p <0,05.

În plus față de capacitățile îmbunătățite de contrast RMN ale Mn-CDs-NHF relativ la agentul comercial Gadovist, este de asemenea esențial să observăm că, în comparație cu grupul de control (Figura 3_Gadovist), volumul tumorilor primare este redus în Mn -Grup tratat cu CD-NHF (Figura 3_Mn-CD-uri-NHF) a a cum este rezumat în Figura 3B. Aceste date demonstrează că agentul teranostic propus Mn-CDs-NHF îndeplinește în același timp rolul de a crește contrastul RMN, precum și caracteristicile antitumorale.

Deoarece metastazele pulmonare sunt foarte frecvente în cazul modelului tumoral 4T1 s-a efectuat și o evaluare RMN în vederea observării metastazelor pulmonare (Figura 4). Imagistica RMN a cavității toracice în a treia săptămână arată țesut nou format, sugerând prezența metastazelor pulmonare (cercurile galbene indic prezența metastazelor).

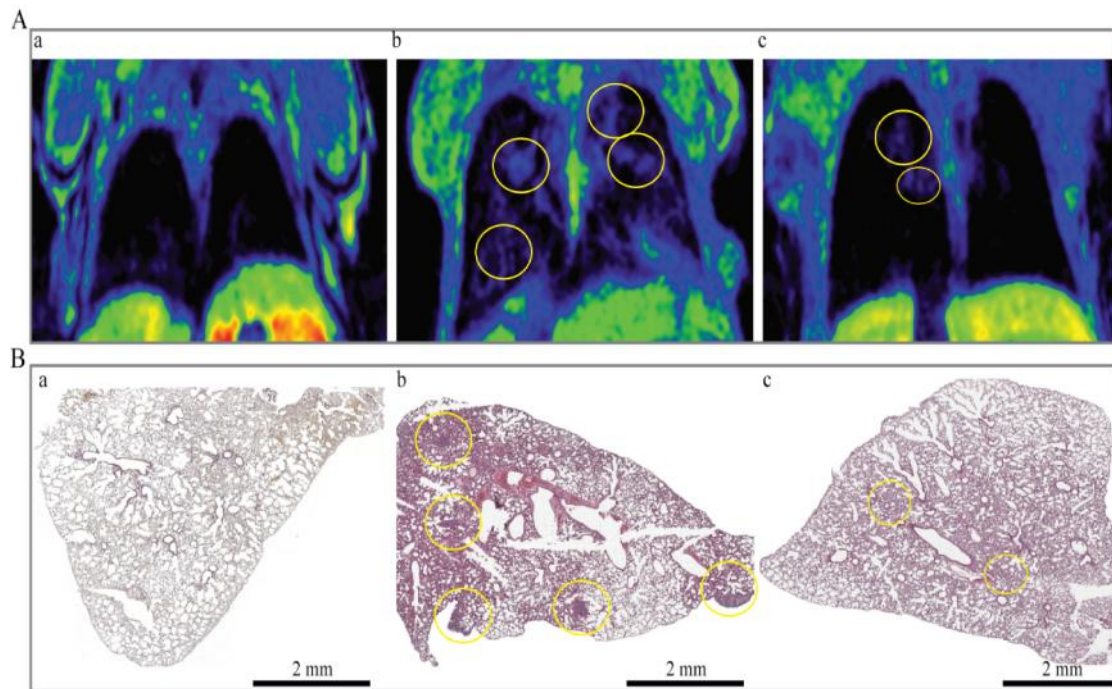
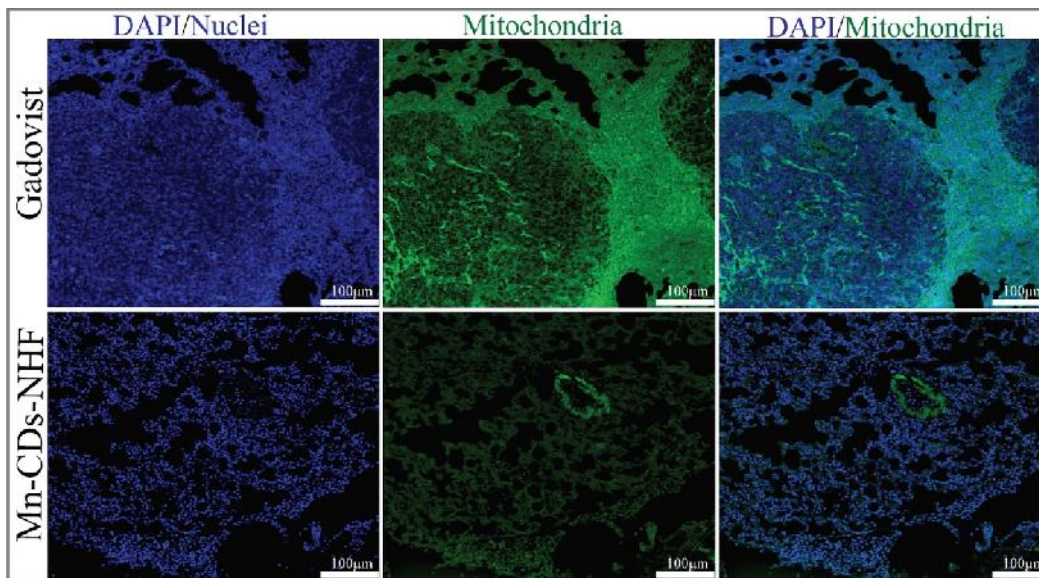


Figura 4 Investigația metastatică la nivelul plămânilor. (A). Imagini RMN, (B). Colorare HE.

Imagini achiziționate la 20x.

Conform datelor RMN, prevalența metastazelor pulmonare a fost mai mare în grupul de control (Figura 4Ab) relativ la grupul tratat cu Mn-CDs-NHF (Figura 4Ac). Aceste date se corelează cu rezultatele colorării hematoxilinei și eozinei (HE) a probelor încorporate în parafină (Figura 4B). Datele HE ale grupului tratat cu Mn-CDs-NHF (Figura 4Bc) arată un număr redus și dimensiunea metastazelor pulmonare și o arhitectură asemănătoare mai normală a țesutului pulmonar, cu pereți alveolari mai puțin îngroșați.

Datele noastre anterioare *in vitro* au arătat o activitate mitocondrială redusă la tratamentul cu CD-NHF. Noile date *in vivo* (Figura 5) demonstrează că doparea CD-NHF cu Mn²⁺ nu afectează capacitatea CD-NHF de a reduce numărul de mitocondrii din celulele canceroase.



Figur6 5 Colorarea prin imunofluorescență a mitocondriilor în specimene de plămâni murine încorporate în parafin . Imagini achiziționate la 20x

Apoptoza sau moartea celular programat este un program biologic care are un rol crucial în controlul prolifer rii celulare, al homeostaziei țesuturilor și în eliminarea celulelor care nu mai sunt necesare. Dereglarea mecanismelor de apoptoz contribuie la apariția diferitelor patologii, cum ar fi cancerul. În studiul actual, am desf șurat investigația TUNEL pentru a ar ta celulele apoptotice/moarte (Figura 6). Datele obținute arat prezența unui numar redus de celule apoptotice la nivel pulmonar în grupul de oareci control (Figura 6, panoul superior). Num rul de celule apoptotice este crescut masiv în metastazele pulmonare ale grupului tratat cu Mn-CDs-NHF (Figura 6, panoul inferior).

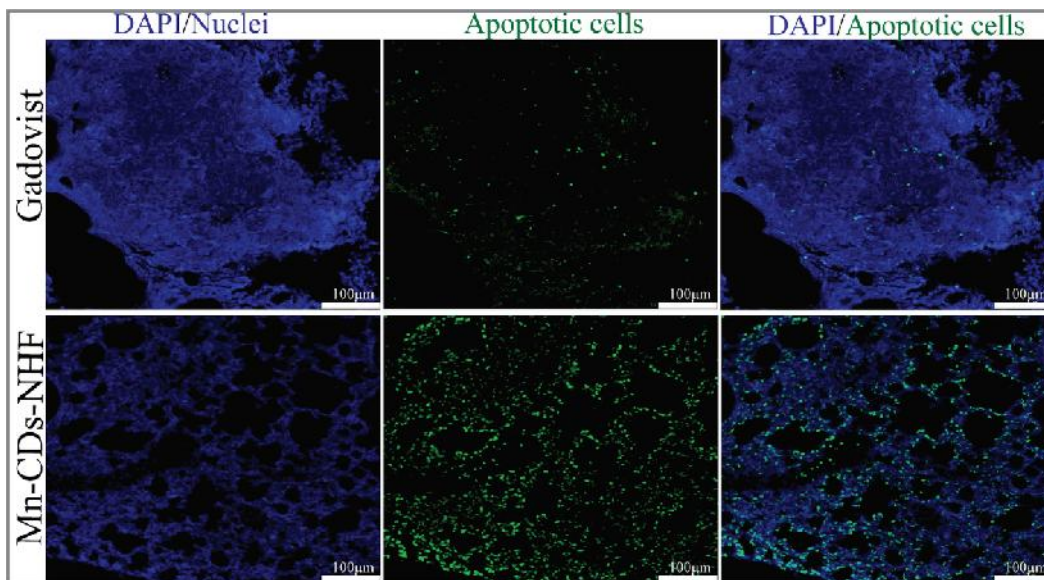


Figura 6 Colorarea prin imunofluorescență a celulelor apoptotice în specimene pulmonare murine încorporate în parafin . Imagini achiziționate la 20x.

Aceste date susțin datele de viabilitate celulară *in vitro* care au demonstrat reducerea viabilității celulelor în grupul tratat cu Mn-CDs-NHF comparativ cu grupul tratat cu Gadovist.

Interleukin-6 (IL-6) este o citokină care joacă un rol crucial atât în fiziologia umană normală, cât și în diferite patologii. Interleukina 6 (IL-6) mediază semnale pro-supraviețuire în cancer și inflamații. Investigațiile noastre *in vitro* arată că nivelurile de ARNm IL-6 în celulele canceroase tratate cu Mn-CDs-NHF sunt semnificativ reduse față de celulele tratate cu Gadovist (Figura 7A).

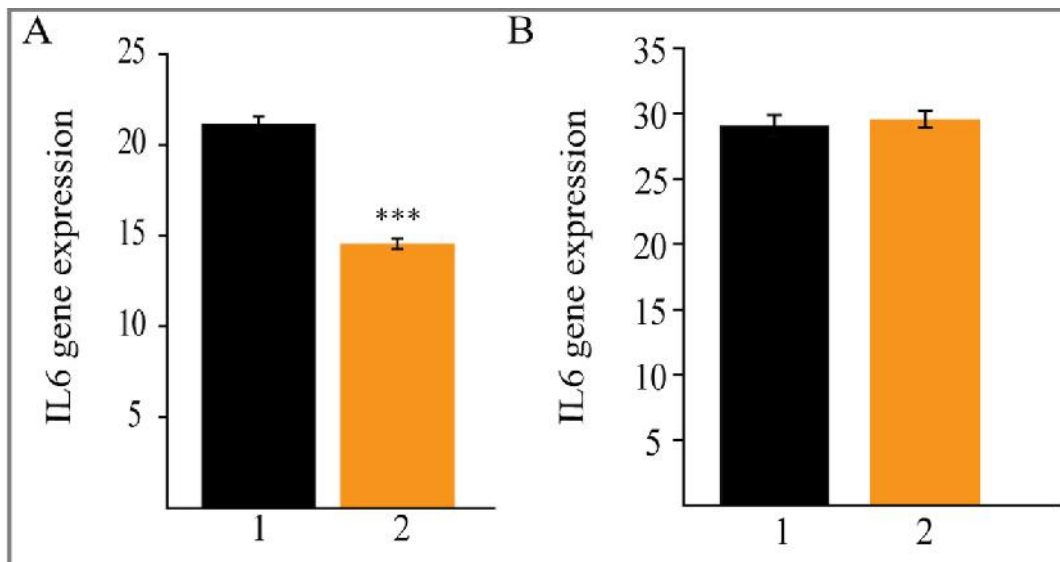


Figura 7 Expresia mRNA-ului IL-6 în cultura celulară (A) și probe de plămâni murine (B). 1: grup tratat cu Gadovist, 2. Grup tratat cu Mn-CDs-NHF.

Cu toate acestea, nu s-au observat aceste modificări la specișele pulmonare murine (Figura 7B) probabil datorită diluării mRNA-ului exprimat de celulele canceroase din metastaze comparative cu celulele normale.

Imagistica prin rezonanță magnetică (RMN) rămâne una dintre cele mai valoroase tehnici pentru investigațiile *in vivo*, datorită naturii sale neinvazive, care poate furniza atât date anatomice, cât și funcționale. Majoritatea substanțelor de contrast RMN se bazează pe gadoliniu (Gd³⁺). Cu toate acestea, datorită faptului că Gd³⁺ este asociat cu diferite efecte secundare a fost necesar să se găsească alternative.

Nanoparticulele tip Carbon Dot dopate cu Mn²⁺ realizate în cadrul proiectului reprezintă o alternativă promițătoare datorită toxicității lor mai mici comparativ cu Gd³⁺. Datorită faptului că nu există date preclinice cu privire la toxicitatea *in vitro* și *in vivo* a NP-urilor pe bază de Mn²⁺, aceste compoșii reprezintă o variantă viabilă la Gd³⁺.

În anul 2021 în cadrul lucrării publicate (doi: 10.3390/ijms22083873) rezultatele obținute prin tehnicile de IF (imunofluorescență) și/sau IHC (imunohistochimice) au fost

validate și prin tehnica de western blot (Figura 8) folosind echipamente achiziționate în cadrul acestui proiect. Moleculele investigate sunt membri cheie a unor căi metabolice cruciale în evoluția glioblastomului.

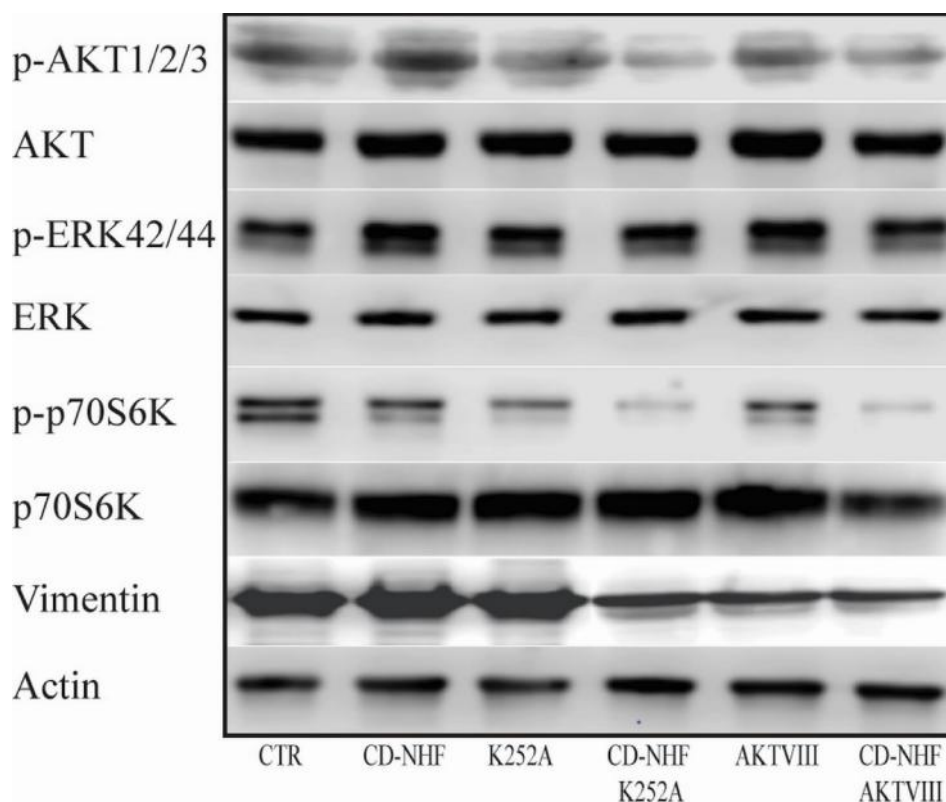


Figura 8 Evaluarea Western blot a moleculelor reprezentative în linia celulară U87

În concluzie, datele experimentale demonstrează proprietățile superioare ale CD-NHF-Mn²⁺ atât ca agent de contrast cât și ca efect antitumoral.

Activitate 4.3. Stabilirea unor metode de control a calității precursorilor, a Carbon Dots obținute și a reproductibilității procesului (finalizare); *Protocoale de analize fizico-chimice ale Carbon Dots obținute la scară pilot*

În cadrul ultimei etape a proiectului nr. 37 PCCDI/2018 – Teradot, s-au desfășurat o serie de activități privind:

- (i) evaluarea **reproductibilității procesului fizic** de obținere a Carbon Dots (CDs),
- (ii) evaluarea **reproductibilității efectelor antitumorale** ale acestui tip de compuși asupra unei linii celulare tumorale,
- (iii) elaborarea și **înregistrarea unui brevet de invenție națională**.

În cadrul activităților aferente s-a evaluat gradul de reproductibilitate al procesului de sinteză a CDs pornind de la un derivat imidic, n-hidroxisuccinimida, și un antitumoral natural, Paclitaxel (Taxol). Evaluarea reproductibilității procesului de sinteză presupune sinteza a trei

probe în condiții identice. După tratamentele termice corespunzătoare aplicate precursorilor de reacție, s-a procedat la efectuarea de:

- (i) m sur tori cantitative ale produșilor de reacție ale celor trei probe, inclusiv după filtrarea mecanică a acestora,
- (ii) m sur tori de fluorescență,
- (iii) m sur tori dimensionale (DLS) și
- (iv) m sur tori de viabilitate celulară pe o linie tumorală umană.

Protocolul de lucru utilizat a permis obținerea cu **reproductibilitate înaltă**, la scară pilot, a CDs, randamentul mediu al reacției de transformare termică pentru cele trei probe fiind de 79% înainte de filtrarea produșilor de reacție și de 77% după filtrarea acestora. Din punct de vedere cantitativ, valorile obținute pentru cele trei probe au fost foarte apropiate între ele, diferența procentuală maximă, după filtrare, fiind de 3,1% (între probele P1 și P2), iar cea minimă de 0,7% (între probele P2 și P3). În concluzie, din punct de vedere al maselor de reacție obținute prin ardere, procesul de sinteză arată o **foarte bună reproductibilitate**. De asemenea, graficele spectrelor de fluorescență ale probelor au prezentat poziții foarte apropiate ale vârfurilor maximelor de intensitate. Măsurătorile DLS arată o deviație standard scăzută a valorilor dimensiunilor medii ale CDs, indicând o reproductibilitate înaltă a procesului de sinteză. În final, testele *in vitro* efectuate pe celule tumorale de osteosarcom uman arată că efectele toxice ale celor trei probe au fost înalt reproductibile. De asemenea, în cadrul acestei etape a proiectului, a fost redactat și înregistrat un brevet național.

În acord cu Planul de realizare al proiectului, această activitate s-a desfășurat în colaborare cu partenerul P2, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași, **INCDFI-IFT Iași** focalizându-se în principal pe evaluarea:

- (a) **reproductibilitatea și procesul fizic** de obținere a Carbon Dots (CDs) și, respectiv, asupra
- (b) **reproductibilității și efectelor antitumorale** ale acestui tip de compuși asupra unei linii celulare de osteosarcom uman.

Evaluarea reproductibilității și procesului fizic de obținere a CDs la scară pilot presupune utilizarea de *N-hidroxisuccinimida*, ca precursor imidic, și *Paclitaxel*, un antitumoral utilizat în tratamentul cancerului.

Paclitaxelul, comercializat sub denumirea de Taxol, este un antitumoral natural cu hidrofobicitate înaltă, fiind, prin urmare, greu solubil în medii apoase, inclusiv în mediul sangvin. Prin tratarea termică a acestuia împreună cu o moleculă suport (*N-Hidroxisuccinimida*) s-a dorit transformarea în CDs hidrofilii care să păstreze caracteristicile antitumorale inițiale ale substanței antitumorale (Taxol). În urma tratamentelor termice preliminare, efectuate separat pentru fiecare precursor, s-a observat că *N-hidroxisuccinimida*

se transformă cu ușurință în CDs, formând împreună cu mediul de dispersie o structură de tip gel care se solidifică la temperatura camerei. Pe de altă parte, tratamentul termic separat al Taxolului conduce la structuri cu dimensiuni foarte mari care nu pot fi utilizate *in vivo*. Totuși, s-a observat că CDs derivați din Taxol pot fi sintetizați și distribuiți omogen în structura de tip gel a N-hidroxisuccinimidei dacă tratamentul termic este aplicat simultan celor doi precursori amestecați și dizolvați în prealabil în etanol. Practic, prin distribuirea moleculelor de Taxol în matrice de n-hidroxisuccinimid, se împiedică formarea de conglomerate mari de CDs derivați, în principal, din Taxol în timpul procesului de transformare termică a acestuia.

Pentru evaluarea reproductibilității procesului fizic de obținere a CDs la scară pilot s-a utilizat următorul protocol: N-hidroxisuccinimida (cca. 900 mg) și Taxol (cca. 29 mg) au fost dizolvate împreună în 3 ml alcool etilic (98 %) și ultrasonate 3 min. Pentru **asigurarea celei mai bune calități a precursorilor**, proba ultrasonată a fost filtrată printr-un filtru cu dimensiunea porilor de 220 nm, iar apoi a fost introdus în instalația automatizată **pentru sinteza de nanostructuri de carbon la scară pilot**, obținut în etapa anterioară a proiectului. Tratamentul termic a fost realizat la 200°C timp de 40 min. Imediat după oprirea încălzirii proba a fost răcit rapid cu apă ultrapur și colectat din reactorul de reacție. Procedul s-a repetat în mod identic pentru încă două probe.

1. *Măsurători cantitative*

Probele au fost măsurate cantitativ (Tabelul 1) pentru a evalua pierderile de masă rezultate în urma procesului de ardere. S-a observat că, în medie, pierderea de masă a fost de cca 21%. Deviația standard între cele trei probe a fost de ±12,48, ceea ce s-ar putea traduce, raportat la valoarea masivă medie (Tabelul 1), ca o variație procentuală medie de cca 1,7% sau, dacă luăm în considerare deviația medie, atunci variația procentuală medie a masei obținute ar fi de cca. 1,25%.

Tabelul 1. Masele precursorilor și ale produselor de reacție (inclusiv după filtrarea prin filtru de 220 nm).

	Probe			Deviația standard (SD)	Valoarea medie (mg)	Deviația medie (AD)
	P1	P2	P3			
Masa inițială a (mg)	928,2	928,4	928,5	±0,15	928,36	±0,11
Masa produsului după transformare termică (mg)	723,6	730,8	747,9	±12,48	734,10	±9,20
Masa rămasă după filtrare (mg)	698,4	720,9	715,5	±11,74	711,60	±8,80

Pentru a îndepărta produsele cu dimensiuni micrometrice rezultate în urma arderii, s-a procedat la filtrarea celor trei probe prin filtre de 220 nm. După uscarea și cântărirea filtrelor, s-a determinat masa de substanță reținută în filtre prin raportare la masa inițială a acestora. În medie, pierderea medie de masă rezultat după filtrarea probelor a fost de 3%. După filtrare, deviația standard **între cele trei probe** a scăzut la $\pm 11,74$, variația procentuală medie a maselor celor trei probe fiind de cca. 1,6% sau, dacă luăm în considerare deviația medie ($\pm 8,8$), de cca. 1,2%. Prin urmare, din punct de vedere cantitativ, valorile obținute pentru cele trei probe au fost foarte apropiate între ele, **diferența procentuală maximă, după filtrare, fiind de 3,1% (între probele P1 și P2) și cea minimă de 0,7% (între probele P2 și P3)**. În concluzie, din punct de vedere al maselor de reacție obținute prin ardere, **procesul de sinteză arată o foarte bună reproducibilitate**. În plus, randamentul reacției (79%) a fost unul bun.

2. Măsurători de fluorescență

În Figura 9 și Tabelul 2 sunt prezentate spectrele de emisie și respectiv vârfurile de emisie ale acestora înregistrate în intervalul de excitație 350–390 nm (pas de 10 nm) pentru cele trei probe tratate termic la 200°C. CDs prezintă o emisie dependentă de excitația caracteristică.

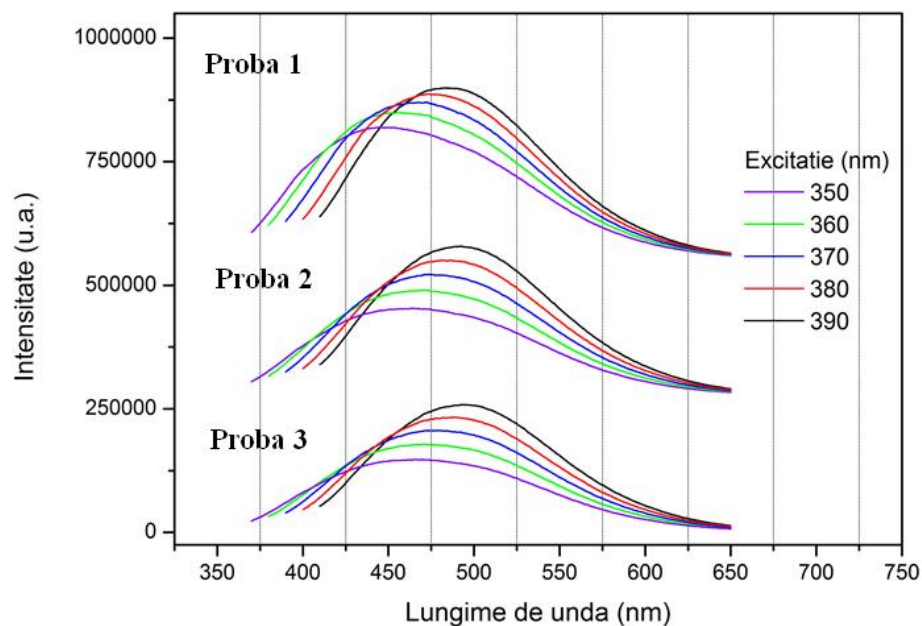


Figura 9. Spectre de emisie înregistrate în domeniul de excitație 350-390 nm pentru CDs dispersate în apă ultrapură.

După cum se poate remarca, vârfurile de emisie se schimbă pentru *Proba 1* de la 443 la 484 nm, pentru *Proba 2* de la 464 la 493 nm, iar pentru *Proba 3* de la 465 la 495 nm, în intervalul de excitație utilizat. Intensitatea maximă de emisie este atinsă la 390 nm excitație, vârfurile de

emisie corespunzatoare fiind situate între 484 i 495 nm, în limita superioară a regiunii albastre a spectrului vizibil. Deviațiile standard pentru vârfurile de emisie (Tabelul 2) au variat între $\pm 2\%$ pentru vârful de emisie de la 474 nm (valoare medie) și $\pm 14,57\%$ pentru vârful de la 459 nm (valoare medie). Deviațiile medii au variat între $\pm 1,33$ și $\pm 10,89$.

Tabel 2. Vârfurile de emisie ale spectrelor de fluorescență ale probelor P1, P2 și P3.

	Probe			Valoarea medie (nm)	Deviația standard (SD)	Deviația medie (AD)	Excitație (nm)
	P1	P2	P3				
Vârful de emisie (nm)	471	464	443	459	$\pm 14,57$	$\pm 10,89$	350
	465	470	455	463	$\pm 7,63$	$\pm 5,56$	360
	476	474	472	474	$\pm 2,00$	$\pm 1,33$	370
	489	487	473	483	$\pm 8,71$	$\pm 6,67$	380
	496	493	484	491	$\pm 6,24$	$\pm 4,67$	390

3. Măsurători dimensionale

Diametrul hidrodinamic mediu și distribuția după dimensiuni ale celor trei probe de CD2 (Figura 10) au fost măsurate prin tehnica DLS (Dynamic light scattering) cu ajutorul unui analizor de particule (Microtrac/Nanotracs252) după dispersia nanoparticulelor prin ultrasonare.

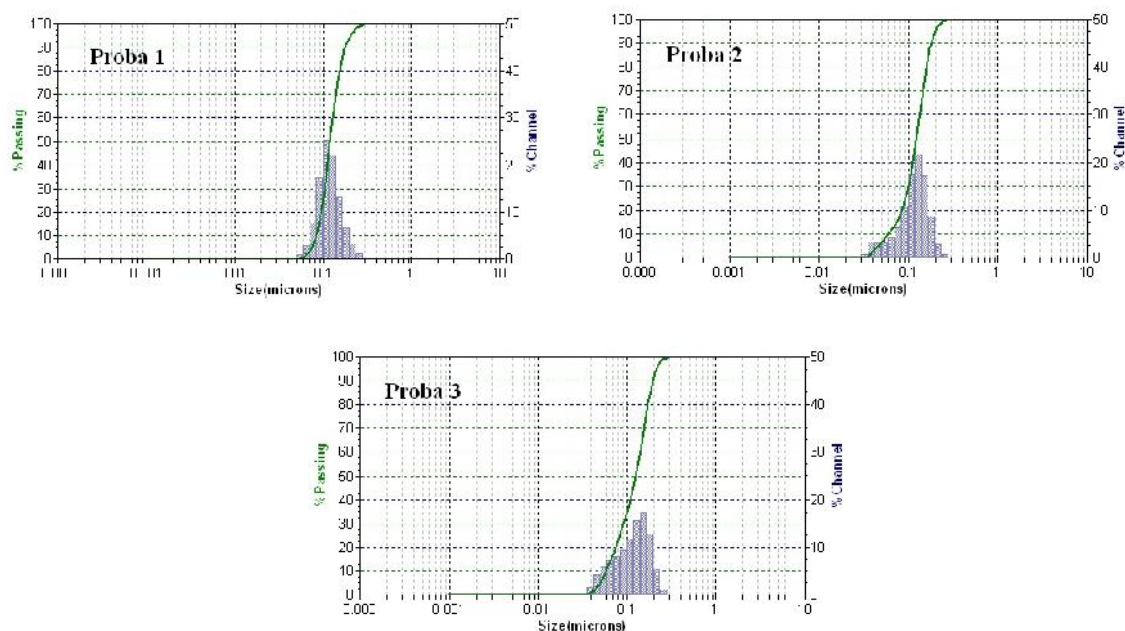


Figura 10. Măsurători DLS ale probelor sintetizate.

Dimensiunile medii ale CDs au fost de 118 nm (Proba 1),

122 nm (Proba 2) și 125 nm (Proba 3)

Conform datelor rezultate din măsurătorile DLS, procesul de sinteză al CDs a fost înalt reproductibil din punct de vedere dimensional. Astfel, cele trei probe au arătat valori foarte apropiate între dimensiunile medii ale nanoparticulelor, deviația standard fiind de $\pm 3,51$. De asemenea, distribuțiile după mărime au fost apropiate, domeniile de dimensiuni fiind cuprinse între 60÷240 nm (Proba P1), 36÷290 nm (Proba P2) și 43÷290 nm (Proba P3).

4. *Măsurători de viabilitate celulară*

Evaluarea reproductibilității efectelor antitumorale induse de cele trei probe s-a realizat utilizând o linie celulară de osteosarcom uman (OS). Influența CDs asupra viabilității celulare a fost cuantificată prin testul MTT (bromura 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolium).

Pentru efectuarea testului de viabilitate, 3 plăci de cultură (cu 96 de godeuri) au fost înșămânțate cu OS la o densitate de 1×10^5 celule/godeu și incubate 24 de ore la 37°C (95% umiditate, 5% CO₂). Peste celule au fost adugate în mod separat, în triplicat, cele trei probe. S-au folosit două concentrații diferite (0,12 g/ml și 0,24 mg/ml) pentru fiecare probă. Plăcile au fost incubate pentru 24 de ore, apoi au fost scoase din incubator și transferate în hotă sterilă. Mediul de cultură din fiecare godeu a fost îndepărtat și înlocuit cu 200 μl de mediu de cultură (DMEM) peste care s-a adăugat 20 μl soluție MTT (5 mg/ml în PBS). Plăcile au fost agitate ușor pentru omogenizarea suspensiei și incubate timp de 3 ore la 37°C (95% umiditate, 5% CO₂). Apoi, supernatantul (DMEM + MTT) a fost aspirat din fiecare godeu și înlocuit cu 200 μl DMSO/godeu pentru lizarea membranei celulare și dizolvarea cristalelor albastre de formazan formate în prezența MTT. Plăcile au fost agitate timp de 5 min. pe un agitator orbital. În final, plăcile au fost citite cu un spectrofotometru (Synergy HTX multi-mode reader Elta 90 MR), la lungimea de undă incidentă de 570 nm.

Rezultatele testelor de viabilitate (Figura 11) au arătat că **efectele antitumorale ale CDs** produse de proba P1 (viabilitate 87,32%, conc. 0,12 mg/ml) **au fost reproduse cu mare acuratețe** de probele P2 (viabilitate 85,87%; conc. 0,2 mg/ml) și P3 (viabilitate 88,18%; conc. 0,12 mg/ml), deviația standard, SD, fiind foarte scăzută ($\pm 1,17$). Aceiași reproductibilitate foarte înaltă s-a observat și pentru cea de-a doua concentrație (0,24 mg/ml), deviația standard fiind, de asemenea, foarte scăzută ($\pm 1,37$). În Figura 11 sunt prezentate graficele de viabilitate ale celulelor tumorale pentru cele trei probe în funcție de cele două concentrații de CDs testate. Se poate observa că, odată cu dublarea concentrației de CDs, viabilitatea celulară a scăzut în medie cu 9%. Efectul anti-tumoral al CDs derivați din n-hidroxisuccinimid și Taxol este cel mai probabil rezultatul efectelor anti-proliferative ale grupelor funcționale r-mase parțial stabile după transformarea termică a precursorilor. Pe de altă parte, CDs obținuți sunt hidrofilii, distribuindu-se foarte bine în soluții apoase, spre deosebire de Taxol nemodificat care este puternic hidrofob. Prin urmare, compușii de tip CDs

obținuți se pot dispersa foarte bine în mediul sanguin, putând fi astfel transportați eficient în toate zonele din organism afectate de tumori sau marcate de un potențial tumorigen crescut. Efectul antitumoral intrinsec al CDs sintetizați poate fi legat de creșterea speciilor reactive de oxigen, urmat de depleția glutatationului intracelular, având ca rezultat apoptoza celulară prin activarea caspazei, după cum *Melone i colab.* au subliniat pentru un alt derivat imidic, în anume n-hidroxițialimida [*L. Melone, P. Tarsini, G. Candiani and C. Punta, RSC Adv., 2016, 6, 21749*].



Figura 11. Viabilitatea celulelor tumorale în funcție de cele două concentrații ale probelor testate.

Prin urmare, obținerea de carbon dots s-a dovedit a fi înalt reproductibil, atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ, fapt dovedit inclusiv prin testele de viabilitate celulară efectuate pe o linie tumorală umană. Sinteza efectuată la scară pilot are, de asemenea, avantajul unei eficiențe crescute, este simplă, controlabilă prin ajustarea temperaturii de lucru, fiind ușor de realizat. Activitățile desfășurate au condus la:

- **stabilirea reproductibilității** procesului de sinteză al CDs. Protocolul utilizat a permis obținerea cu **reproductibilitate înaltă**, la scară pilot, a CDs cu un randament de 79%, metoda fiind foarte versatilă și susceptibilă la modificări în ceea ce privește compoziția finală a produselor de reacție ca urmare a aplicării de tratamente termice unor amestecuri de medicamente antitumorale aflate sub formă de suspensii lichide. De asemenea, **efectele antitumorale** ale CDs sintetizați **au fost înalt reproductibile**;
- **stabilirea unei soluții tehnice de purificare a precursorilor reacției**, dizolvați în soluții alcoolice, prin utilizarea de filtre cu dimensiuni nanometrice ale porilor.

Lucrări ISI publicate / acceptate / trimise spre publicare:

[1] Luta G, Butura M, Tiron A, Tiron CE. Enhancing Anti-Tumoral Potential of CD-NHF by Modulating PI3K/Akt Axis in U87 Ex Vivo Glioma Model. *Int J Mol Sci.* 22(8): 3873, 2021, doi: 10.3390/ijms22083873.

[2] Angela Danila, Emil Ioan Muresan, Sorin-Alexandru Ibanescu, Alina Popescu, Maricel Danu*, Carmen Zaharia, Gizem Ceylan Türkoglu, Gokhan Erkan, Adela-Ioana Staras, Preparation, characterization, and application of polysaccharide-based emulsions incorporated with lavender essential oil for skin-friendly cellulosic support, *International Journal of Biological Macromolecules* 191, pp.405–413, 2021.

[3] Diana-Andreea Blaj, Mihaela Balan-Porcarasu, Brindusa Alina Petre, Valeria Harabagiu, Cristian Peptu, MALDI mass spectrometry monitoring of cyclodextrin-oligolactide derivatives synthesis, *Polymer* 124186, 2021 (accepted).

[4] Adrian Tiron, Corneliu S. Stan, Gabriel Luta, Cristina Mariana Uritu, Irina-Cezara Vacarean-Trandafir, Gabriela Dumitrita Stanciu, Adina Coroaba and Crina Elena Tiron. Manganese doped N-Hydroxyphthalimide derived Carbon Dots – Theranostics applications in experimental breast cancer models. Submisă în *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (submitted NANOMED-S-21-00977)

[5] Corina-Lenuta Savin (Logigan), Corneliu S. Stan¹, Bogdan Simionescu, Constanta Ibanescu, Catalina A. Peptu*, Adrian Tiron, Gabriel Luta, Mihail Butura, Crina Elena Tiron*, Mariana Pinteala, Daniel Herea, Carbon Dots/Doxorubicin Loaded Liposomes as Complex Synergetic Nano Delivery System for Antitumor Applications (submitted Elsevier - *Biomedical Journal*)

[6] Tudor Vasiliu, Bogdan Florin Florin Craciun, Andrei Neamtu, Lilia Clima, Dragos Lucian Isac, Stelian Maier, Mariana Pinteala, Francesca Mocci and Aatto Laaksonen, In silico study of PEI-PEG-squalene-dsDNA polyplex formation: The delicate role of PEG length to the binding of PEI to DNA, *Biomater. Sci.*, Issue 19, 2021

Propunere brevet invenție național înregistrat OSIM:

[1] Herea D.D., Mihai M.M., Loiso A.V., Gherca D., Borhan A.I. and Lupu N., *Instalație automatizată pentru sinteza de nanostructuri de carbon din compuși imidici pentru aplicații biomedicale*, nr. înregistrare OSIM a 2021 00309 / 03.06.2021.

30.09.2021

Director proiect

Academician Bogdan Simionescu

