

PLATFORME TERANOSTICE ANTITUMORALE PE BAZĂ DE CARBON DOTS ȘI 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 II (2019)

(a) Rezumat

Activitățile etapei 2019 specifice celor 3 proiecte componente, au fost îndeplinite în totalitate. Astfel, în cadrul **P1** platformele teranostice pe bază de Carbon Dots imidici au fost investigate *in vitro* pe liniile celulare selectate dar și *in vivo* pentru activitatea antitumorală pe model animal cu tumori induse. De asemenea, au fost făcut pași importanți în elucidarea mecanismelor de acțiune anti-tumorală a Carbon Dots. Rezultatele obținute indică faptul că gelurile încărcate cu CD-NHF (concepute și caracterizate fizico-chimic în etapa anterioară) prezintă activități de modulare celulară complexe și interesante, relevante pentru controlul tumoral cu potențiale aplicații clinice. De asemenea, lipozomi pe bază de fosfatidilcolina și colesterol încărcăți cu CDs sau cu CDs precum și formulări complexe lipozomi încărcăți cu CDS și doxorubicină au fost testate din punctul de vedere al acțiunii lor antitumorale pe linii celulare canceroase mamare și pulmonare. Datele experimentale din acest studiu demonstrează că încapsularea Carbon Dots în lipozomi a avut un efect pronunțat antitumoral comparativ cu Carbon Dots simpli. Aceste rezultate indică faptul că administrarea potențială a CDs împreună cu terapii deja consacrate poate diminua efectele secundare ale chimioterapeuticelor prin reducerea concentrațiilor și a fenomenelor de rezistență la medicamente. Pentru a evalua influența CDs în evoluția tumorii și diseminarea metastazelor, celule canceroase mamare murine s-au injectat ortotopic (în glanda mamară) în șoareci din specia Balb/c. În cadrul acestei activități s-a demonstrat faptul că prezența CD-NHF diminuează progresia cancerului mamar și metastazarea, nanostructurile testate (CD-NHF) pot interacționa în diferite scenarii moleculare cu diverse molecule cheie esențiale în reducerea fenomenelor de invazivitate și metastazare. O activitate importantă din cadrul P1 a fost reprezentată de prepararea unor complecși Carbon Dots – Gd^{3+} în scopul extinderii posibilităților de diagnostic prin utilizarea de tehnici RMN. Astfel, pentru prepararea nanostructurilor de tip Carbon Dots dopate cu Gd^{3+} s-a recurs la obținerea prealabilă a unui complex N-Hidroxifitalimidă cu Gd^{3+} care apoi a fost procesat pirolitic în condiții controlate. Cercetările privind obținerea unor Carbon Dots pe bază de precursori imidici care să permită utilizarea acestora în imagistica RMN, obținându-se astfel o platforma teranostică, au fost extinse prin investigarea unor Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} care prezintă o emisie fotoluminescentă intensă dependentă de prezența moleculelor de apă în mediul de dispersie.

În cadrul proiectului component **P2** s-a efectuat un studiu privind influența unor matrici polimerice asupra platformei teranostice antitumorale și optimizarea biocompozitelor pentru obținerea eficacității maxime. S-a realizat și selecția materialelor polimerice muco-adezive și a metodelor de preparare pentru obținerea bio-compozitelor nanoparticulate ce includ Carbon Dots imidici. Pentru acest an de derulare se raportează siunțea a trei sisteme diferite toate încărcate cu CDs: nanocapsule pe baza de poli(ϵ -caprolactona), nano/micro particule pe bază de hidroxizi dubli lamelari (LDHs) intercalați cu CDs și lipozomi pe bază de fosfatidil colina și colesterol încărcăți cu CDs. Toate aceste tipuri de formulări au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice și al abilităților lor ca potențiale platforme antitumorale.

În ceea ce privește proiectul component **P3** s-a dezvoltat o metodă de obținere în stare uscată a CDs printr-o metodă sol-gel modificată, având la bază protocolul realizat în cadrul P2,

nanostructurile de carbon fiind rezultatul unui proces pirolitic inițiat la 250°C. CDs au fost testate pentru evaluarea acțiunii biologice antitumorale pe culturi celulare tumorale (osteosarcom uman) și celule normale (fibroblaști derivați din piele umană), rezultatele arătând că CDs derivați din n-hidroxifthalimidă au activitate antitumorală cu cel puțin un ordin de mărime mai crescut decât n-hidroxifthalimida nemodificată. În plus, structura carbonică a permis legarea eficientă pe suprafață a unui antitumoral de uz clinic, mitoxantrona, amplificându-se semnificativ acțiunea biologică antitumorală a acestuia. În final, a fost proiectată și realizată la scară micro-pilot o stație de autoclavare pentru sinteza CDs imidici la presiuni și temperaturi înalte.

Toate activitățile proiectului complex pentru etapa 2019 au fost îndeplinite integral, iar indicatorii propuși au fost respectați și depășiți.

(b) Descriere științifică și tehnică

Proiect component: 1 (P1)

Activitatea 2.1 - Evaluarea in vitro pe liniile celulare selectate a platformelor teranostice pe bază de Carbon Dots imidici; Realizat : 100%

1. Efectul C-Dots încorporați în geluri

Pornind de la tendința Carbon Dots de a face conglomerate, în lucrarea „*Entrapment of N-Hydroxyphthalimide Carbon Dots in Different Topical Gel Formulations: New Composites with Anticancer Activity. Pharmaceutics, 2019, 11, 303; doi:10.3390/pharmaceutics11070303,*” s-a investigat *in vitro* posibilitatea administrării lor prin încorporarea în diferite tipuri de geluri care ar stabiliza Carbon Dots prevenind formarea aglomeratelor. CD-NHF (Carbon-Dots sintetizati prin piroliza N-Hydroxyphthalimide) incluși în 3 tipuri diferite de geluri, unul comercial și două dezvoltate de partenerii din proiect (P1- TUIasi).

Liniile celulare testate normale (HDMVECn - celule endoteliale microvasculare dermice primare umane; Balb / c-5064 - celule endoteliale microvasculare dermice de șoarece) și tumorale (4T1 - cancer mamar de șoarece; MDA-MB-231 - cancer mamar uman; A375 - melanom malign uman, B16F10 -melanom malign murin) au fost tratate cu Carbon Dots NHF (CD-NHF) înglobați în geluri precum și cu geluri simple pentru a evalua impactul biologic/anticancerigen a prezenței gelului în cultură. Testele au fost realizate atât pe sisteme 2D (celule cultivate în plăci de plastic normale) cât și 3D (Matrigel). În sistemul **2D** s-a observat că viabilitatea celulelor HDMVECn tratate cu geluri simple (CARB-F2, AS-F5 și CMC-F3) precum și cu geluri încărcate cu CD-NHF 5% (CARB-F4, AS-F6 și CMC-F6) nu a fost afectată, excepție făcând gelul AS-F6 (Fig.1A). Activitatea de proliferare a liniilor celulare tumorale de melanom uman și murin nu a fost afectată de prezența gelurilor simple (Fig.1Ba), în timp ce gelurile încărcate cu CD-NHF au redus semnificativ viabilitatea celulară (Fig.1B b,c).

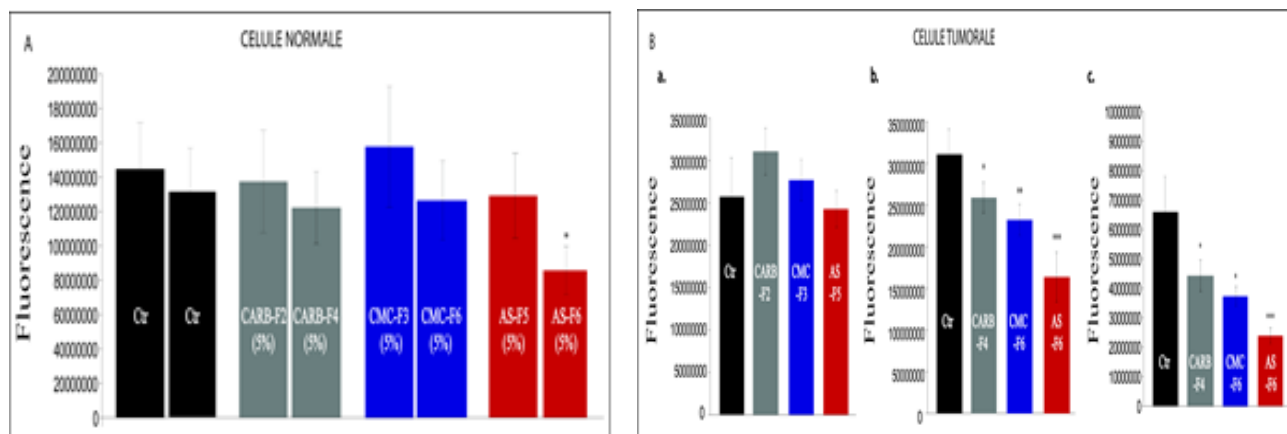


Fig. 1. Viabilitatea celulelor normale dermale vs tumorale dermale. **A.** Viabilitatea celulelor normale dermale cu geluri simple și încărcate cu CD-NHF. **B.** Melanom malign murin și uman (a)

geluri simple; **(b,c)** geluri încărcate cu CD-NHF (conc. 5%). **(a)** Melanom; **(b)** Melanom murin (B16F10); **(c)** melanom uman (A375); Ctr (Control)*** $p = 0.0003$, ** $p = 0.01$, * $p = 0.04$

În sistemul **3D** s-a constatat că gelurile încărcate cu CD-NHF (CRB-F4, CMC-F6, AS-F6) prezintă capacitatea de a reduce numărul, dimensiunea și organizarea celulară a sferoizilor, având, de asemenea, un impact semnificativ asupra capacității individuale a celulelor tumorale de a prolifera și a forma sferoizi/tumosfere. Rezultatele obținute indică faptul că gelurile încărcate cu CD-NHF prezintă activități de modulare celulară complexe și interesante, relevante pentru controlul tumoral cu potențiale aplicații clinice.

2. Efectul C-Dots încapsulați în lipozomi (LPs)

În acest studiu biocompozitele (lipozomi, LPs) au fost sintetizate de Coordonator CO, iar partenerul P2 a evaluat acțiunea lor antitumorală pe linii celulare canceroase mamare și pulmonare.

În oncologie, nanostructurile aprobate clinic sunt vectori/purtători de tratamente concepute pentru a îmbunătăți administrarea de medicamente tumorale și includ lipozomi, nanoparticule anorganice țesuturile normale etc. Mărimea acestor nanostructuri le face incapabile să pătrundă în țesutul normal, în timp ce în tumoră pot ieși cu ușurință din circulația sistemică și intra în spațiul extracelular.

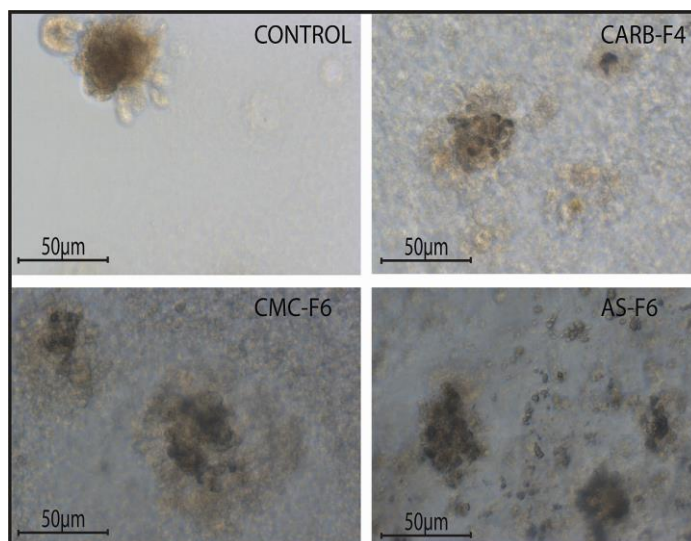


Fig. 2. Aspectul morfologic al sferoizilor sub influența gelurilor simple sau încărcate cu CD-NHF

Nanomaterialele purtătoare de medicamente sunt păstrate/absorbite în mod preferențial în tumori și excluse de țesuturile normale. Tipurile de lipozomii utilizați în testările noastre s-au diferențiat prin capacitatea acestora de a încapsula diferite principii active cum ar fi: **a.** LPs încărcăți cu Carbon Dots-NHF (Carbon dots preparați prin piroliza N-hydroxyphthalimidei (LPs-CD-NHF)); **b.** LPs încărcăți cu Doxorubicină (LPs-DOX); **c.** LPs încărcăți cu Carbon Dots și Doxorubicina (LPs-CD-NHF-DOX) pentru a investiga *in vitro* îmbunătățirea metodei de livrare și implicit reducerea dozelor terapeutice utilizate. Datele experimentale din acest studiu demonstrează că încapsularea Carbon Dots în lipozomi au avut un efect pronunțat antitumoral (Fig. 3A-B, coloanele 8-10) comparativ cu Carbon Dots simpli (Fig. 3 A-B, coloanele 5-7).

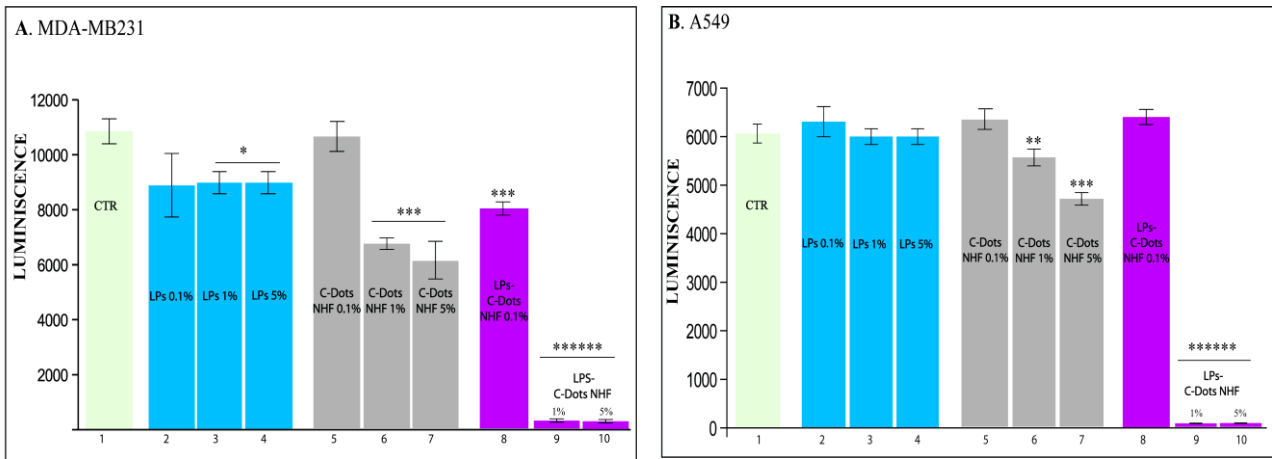


Fig. 3. Efectul lipozomilor (LPs) încărcăți cu CD-NHF. **A.** MDA-MDB231 (celule canceroase mamare umane); **B.** A549 (celule canceroase pulmonare umane); 1. Celule netratate; 2-4 Celule tratate cu lipozomi simpli; 5-7 Celule tratate cu CD-NHF simpli; 8-10 Celule tratate cu CD-NHF încapsulați în lipozomi. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; ***** $p < 0.00000005$

Unul dintre cei mai populari agenți anticanceroși, Doxorubicina (DOX), este utilizată pentru tratamentul diferitelor tipuri de cancer precum: de ovar, sân, prostată sau plămân, însă efectele ei adverse sunt greu tolerabile de către pacient. În prezentul studiu am testat concentrații scăzute de doxorubicina comparativ cu dozele clasice utilizate în studiile clinice tocmai pentru a putea testa eventuala potentare a efectului ei biologic prin co-administrarea de CD-NHF. Scăderea dozei de doxorubicina s-ar reflecta prin scăderea efectelor adverse asupra pacientului și implicit o mai bună tolerare a tratamentului de către pacient. Experimentele efectuate au demonstrat că doxorubicina încorporată în lipozomi (LPs-DOX, Fig.4 A-B, 5-7) prezintă un efect antitumoral mai ridicat în comparație cu doxorubicina neîncapsulată în lipozomi (DOX, Fig.4 A-B, 2-4).

De asemenea, lipozomii încărcăți atât cu Carbon Dots cât și cu Doxorubicina (LPs-CD-NHF-DOX Fig. 4 A-B 8-10) au prezentat o activitate antitumorală similară cu cea a lipozomilor încărcăți doar cu Doxorubicina (LPs-DOX Fig. 4A-B, 5-7) ceea ce sugerează că administrarea lor concomitentă în același lipozom favorizează interacții fizice ce anulează efectul Carbon Dots.

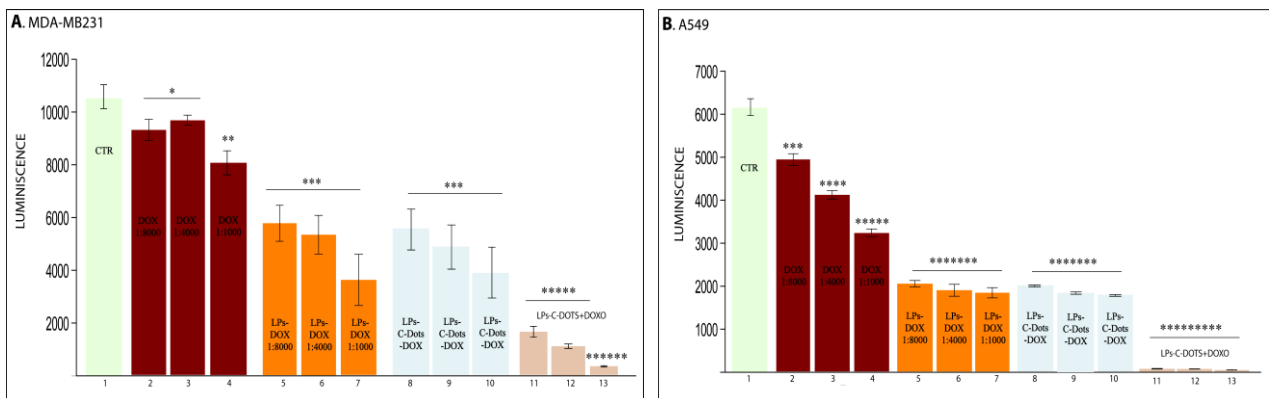


Fig. 4. Efectul lipozomilor (LPs) încărcăți cu Doxorubicina. **A.** MDA-MDB231 (celule canceroase mamare umane); **B.** A549 (celule canceroase pulmonare umane); 1. Celule netratate; 2-4 Celule tratate cu Doxorubicina solubilă (DOX); 5-7 Celule tratate cu doxorubicina încapsulată în lipozomi (LPs-DOX); 8-10 Celule tratate cu carbon dots și doxorubicina încapsulate în lipozomi (CD-NHF-DOX); 11-13 Celule tratate cu carbon dots încapsulați în lipozomi (LPs-CD-NHF) și doxorubicina solubilă (LPs-CD-NHF-DOX)* $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$; ***** $p < 0.00000005$; ***** $p < 0.000000005$.

Administrarea aceluiași doze de Carbon Dots incluși în lipozomi concomitent cu administrarea dozei scăzute de Doxorubicina neîncapsulată în lipozomi a avut un efect dramatic asupra viabilității celulelor tumorale (Fig. 4 A-B, 11-13).

În cadrul acestui plan experimental celulele au fost supuse tehnicii de imunofluorescență pentru a investiga căile metabolice implicate în medierea acestor efecte. Diverse căi de semnalizare, cum ar fi PI3K/AKT/mTOR și EGF/RAS/RAF/MEK/ERK sunt pivotante în progresia cancerului precum și rezistența la medicamente în diferite tipuri de cancer uman. Astfel s-au investigat formele active (fosforilate) ale celor 3 izoforme de Akt (Akt1, Akt2 și Akt3) forma activă (fosforilată) a mTOR și forma fosforilată a Erk1/2. Aceste molecule reprezintă puncte cheie, esențiale în cele 2 căi mari metabolice implicate în diferențierea celulară, supraviețuire, proliferare, ciclul celular etc. În linia celulară triplă negativă mamara (MDA-MB 231) precum și în carcinomul pulmonar cu celule mici (A549) nivelul de pAkt (1,2,3) este ridicat (Fig.5Aa, Ba).

Prezența de 5% CD-NHF în acele linii celulare foarte agresive reduce nivelul de expresie al pAkt atât în cancerul mamar cât și în cel pulmonar (Fig.5 Ab, Bb). Pe de altă parte, tratamentul cu doxorubicină a schimbat fenotipul ambelor tipuri de celule, făcându-le mai mari în special pe cele canceroase pulmonare (Fig. 5 Bc). Lipozomii încărcăți cu CD-NHF împreună cu doxorubicina solubilă au redus și mai mult nivelurile pAkt. Similar cu nivelul pAkt, nivelul pmTOR a fost redus prin prezența CD-NHF (Fig. 6 Ab, Bb). Mai mult decât atât, lipozomii încărcăți cu CD-NHF împreună cu doxorubicina solubilă, au redus expresia pmTOR (Fig. 6 Ad, Bd).

Calea PI3K/Akt/mTOR este o cale intracelulară complicată și inhibitorii ai acestei căi la diferite niveluri pot fi folosiți în combinație cu alți agenți farmacologici pentru a aborda heterogenitatea tumorilor. Calea de semnalizare MAPK cunoscută sub numele de RAS-RAF-MEK-ERK reprezintă o țintă promițătoare în terapiile anticancerigene.

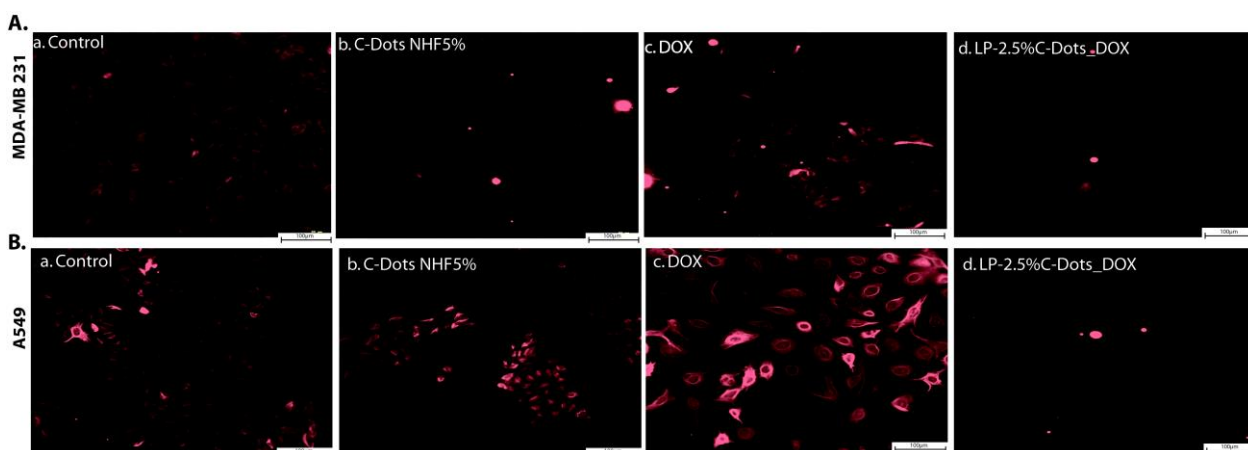


Fig. 5. Nivelul de expresie a pAkt (1,2,3). **A.** MDA-MB231 cells; **B.** A549 cells; **Aa-Ba** Netratate; **Ab-Bb** Tratate cu CD-NHF neîncapsulati; **Ac-Bc** Tratate cu doxorubicina; **Ad-Bd** Tratate cu CD-NHF 2.5% încapsulati și doxorubicina neîncapsulata.

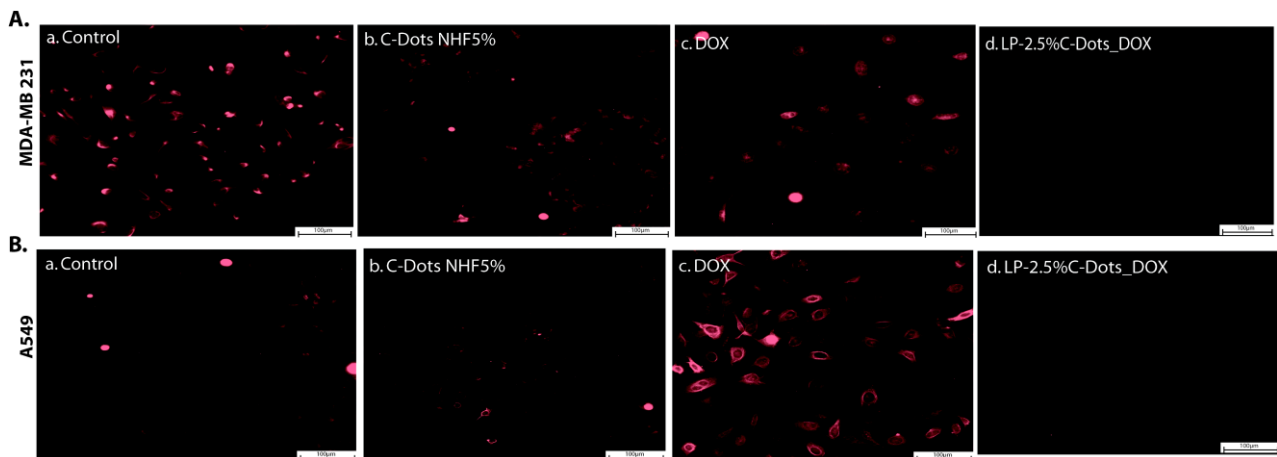


Fig. 6. Nivelul de expresie a pmTOR. **A.** MDA-MB231 cells; **B.** A549 cells; **Aa-Ba** Netratate; **Ab-Bb** Tratate cu CD-NHF neincapsulati; **Ac-Bc** Tratate cu doxorubicina; **Ad-Bd** Tratate cu CD-NHF 2.5% incapsulati si doxorubicina neincapsulata.

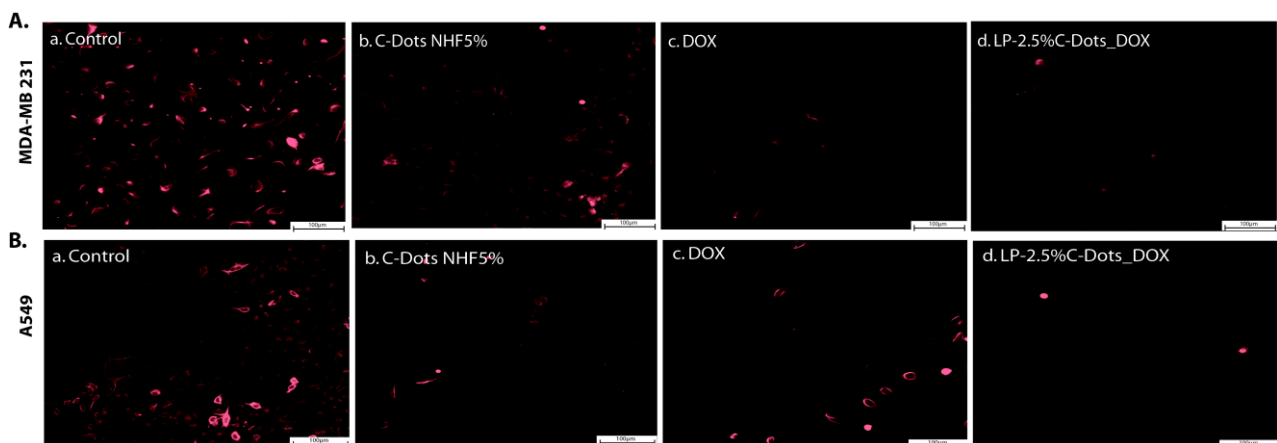


Fig. 7 Nivelul de expresie a pERK1/2. **A.** MDA-MB231 cells; **B.** A549 cells; **Aa-Ba** Netratate; **Ab-Bb** Tratate cu CD-NHF neincapsulati; **Ac-Bc** Tratate cu doxorubicina; **Ad-Bd** Tratate cu CD-NHF 2.5% incapsulati si doxorubicina neincapsulata.

Liniile de celule canceroase mamare și pulmonare utilizate în experimentele noastre au un nivel ridicat de pERK1/2, iar prin aplicarea unui tratament cu CD-NHF a redus semnificativ expresia pERK (Fig. 7 Ab, Bb). Important de menționat este faptul că, lipozomii încărcăți CD-NHF administrați concomitent cu doxorubicina solubilă au redus și mai mult expresia de pERK1/2 (Fig. 7 Ad, Bd). Nanostructurile cresc absorbția, eficiența terapiei și scad efectele adverse ale medicamentelor. Lipozomii sunt folosiți pe scară largă ca sisteme de administrare și reprezintă o abordare importantă în tratamentul oncologic. Toate aceste rezultate indică faptul că administrarea potențială a CD-NHF împreună cu terapii deja consacrate poate diminua efectele secundare ale chimioterapeuticilor prin reducerea concentrațiilor și a fenomenelor de rezistență la medicamente.

În concluzie, prin rezultatele obținute au fost îndepliniți toți indicatorii acestei etape și avem toate argumentele pentru a aprofunda acest plan de cercetare în configurația propusă inițial.

Activitatea 2.2 - Investigarea in vivo a activității antitumorale a formulărilor pe bază de Carbon Dots pe model animal cu tumori induse; Realizat : 100%

Deoarece mortalitatea cauzată de cancer este dată de complicațiile metastatice, am evaluat mai întâi *in vitro* dacă prezența CD-NHF afectează invazia și migrația diferitelor tipuri de celule

canceroase mamare. Pentru a elucida deplin acest aspect s-au efectuat teste efective de masurare directă a celor 2 procese. Acesta cuprinde: **1.** linie tumorală mamara umană triplu pozitivă (MCF7); **2.** linia umană triplu negativă (MDA-MB231); **3.** linie triplu negativă omoloagă de șoarece (4T1) și **4.** linie mamară normală (HMEC). **Migrația** celulelor de la tumora primară la organele secundare presupune modificări metabolice și structurale celulare ce permit delasarea celulelor către o țintă (în cazul testului efectuat de noi, celulele au trecut prin porii unei membrane de 8 micrometri).

Abilitatea de migrare a celulelor canceroase a fost scăzută de tratamentul cu Carbon Dots comparativ cu grupele netratate (Fig 8a 3-8), în timp ce celulele normale nu au fost afectate (Fig. 8a 1-2).

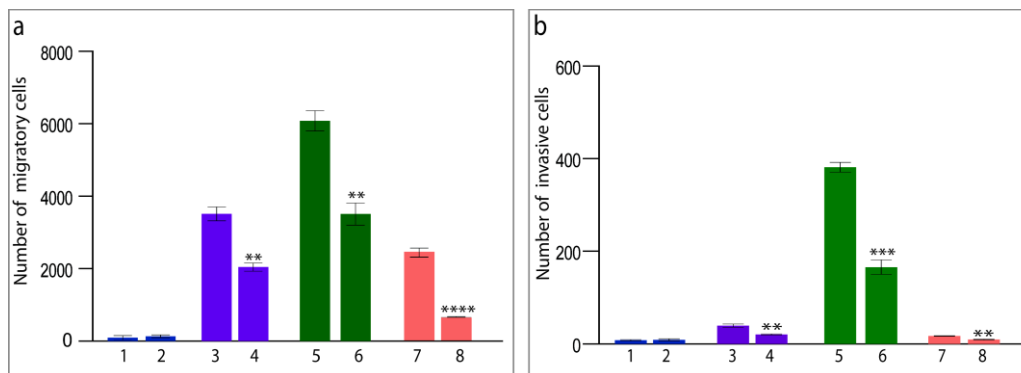


Fig. 8 Efectul Carbon Dots NHF în procesele de Migrație și Invazie. **a. Migrație; b. Invazie.** **1,2-** HMEC (1-netratat, 2-tratat cu Carbon Dots NHF 5%); **3,4-**MDA-MB-231(3-netratat, 4-tratat cu Carbon Dots NHF 5%); **5,6-**4T1 (5-netratat, 6-tratat with Carbon Dots NHF 5%); **7,8-**MCF7 (7-netratat, 8-tratat cu Carbon Dots NHF 5%). N=4 migrație/invazie/experiment. **p< 0.005, ***p< 0.0005, ****p< 0.000005

În cazul **invaziei**, celulele trebuie să degradeze activ un matrix ce are proprietăți similare matricei extracelulare și abia apoi să migreze pe cealaltă față a membranei. Procesul este activ și mai complex decât migrația, iar prezența Carbon Dots a redus semnificativ și acest proces. Analiza invaziei celulelor de carcinom mamar prin matrixul extracelular (Matrigel) arată o reducere a capacității celulelor canceroase de a invada în prezența CD-NHF 5% (Fig. 8b 3-8).

Cancerul de sân provine și este susținut de o mică parte din celulele inițiatore de tumori, numite celule stem canceroase (CSC) care sunt responsabile pentru progresia tumorii, metastazare, rezistența la terapie și recurența. Formarea de mamosfere este un test frecvent utilizat pentru propagarea CSC-urilor mamare *in vitro*. Tratamentul cu 5% Carbon Dots a redus dramatic numărul și dimensiunea mamosferelor create de către celulele tumorale fără a afecta mamosferele formate de celulele normale, necanceroase (Fig. 9).

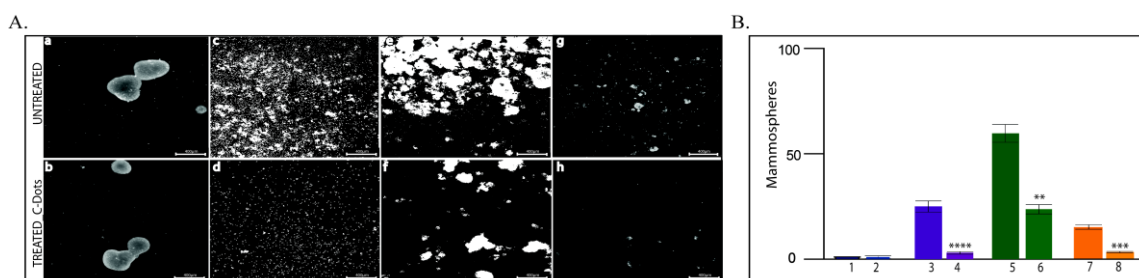


Fig. 9. Efectul Carbon Dots NHF formarea mamosferelor. **A.** Aspect morfologic **a,b-**HMEC; **c,d-** MDA-MB-231; **e,f-**4T1; **g,h-**MCF7. **B.** Numărul de mamosfere **1,2** Celule mamare normale (HMEC, Mcf-10a) (1-netratate, 2-tratate cu Carbon Dots NHF 5%); **3,4** MDA-MB231 (3-netratate, 4-tratate cu Carbon Dots NHF 5%); **5,6** 4T1 (5-netratate, 6-tratate cu Carbon Dots NHF 5%); **7,8** MCF7 (7-netratate, 8-tratate with Carbon Dots NHF 5%).10X, N=3 mamosfere/experiment. **p< 0.005, ***p< 0.0005, ****p< 0.000005

Studiile *in vitro* (culturi celulare) nu pot înlocui complexitatea organismului și de aceea evaluările *in vivo* (model animal) au un rol major în testările preclinice. Pentru a evalua influența

CD-NHF în evoluția tumorii și diseminarea metastazelor, celulele canceroase mamare murine s-au injectat ortotopic (în glanda mamară) în șoareci din specia Balb/c. Modelul animal ales este frecvent utilizat în studiul cancerului mamar deoarece redă complexitatea interacțiilor tuturor sistemelor (hormonal, imunitar, nervos etc). În acest studiu s-a indus modelul mamar tumoral prin injectarea celulelor liniei murine triplu negative 4T1 în glanda mamară (1 milion celule/șoarece). Linia de celule de cancer mamar murin (4T1) este extrem de invazivă și metastazează la nivelul ganglionilor limfatici, plămânilor, creierului, ficatului, osului, ovarului similar cancerului uman de sân triplu negativ în stadiul IV. La 2 săptămâni după injectare când tumorile primare sunt vizibile s-a început administrarea CD-NHF. Animalele au fost împărțite în:

1. grupul cu model tumoral indus dar fără nici un tratament adițional în vederea evaluării dezvoltării tumorale (tumora primara și metastaze)
2. grupul cu model tumoral indus și 10% Carbon Dots per volum sanguin (administrat prin injectare intraperitoneală);
3. grupul cu model tumoral indus și 20% concentrație de Carbon Dots;
4. grupul fără model tumoral indus, dar cu administrare de Carbon Dots în vederea evaluării toxicității (N=9 șoareci/grup). Prezența metastazelor în organe este reflectată de creșterea greutateii organelor comparativ cu lotul fără tumori induse. Tratamentul cu CD-NHF cu 10% și 20% a redus rata de creștere a tumorii primare și diseminarea metastazelor (Fig. 10, 11).

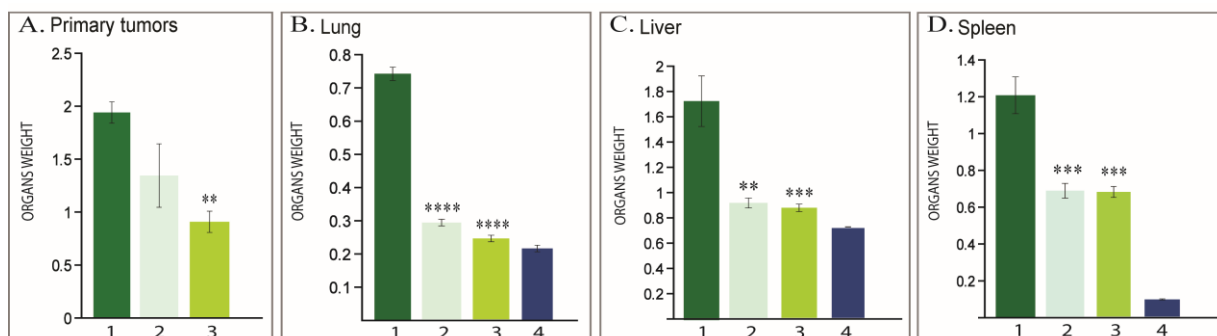


Fig. 10. Greutate organe/grame. **A.** Tumora primară. **B.** Plămân. **C.** Ficat **D.** Splina. **1.** Șoareci cu tumori induse netratați cu CD-NHF; **2.** Șoareci cu tumori induse tratați cu 10% CD-NHF; **3.** Șoareci cu tumori induse tratați cu 20% CD-NHF; **4.** Organe de la șoareci fără tumori. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.00005$

După sacrificarea animalului, organele excizate au fost pregătite pentru analize suplimentare. Pentru analiza histologică ne-am concentrat asupra tumorilor primare și a plămânilor, plămânul reprezentând ținta metastatică principală a liniei celulare 4T1, iar dezvoltarea metastazelor în acest organ este dificil de abordat clinic. Analiza histologică a arătat metastazarea excesivă la nivelul plămânilor de la șoareci cu tumori netratate 4T1 (Fig. 11a), în timp ce șoarecii tratați cu 10% și 20% Carbon Dots NHF au arătat reducerea formării metastazelor pulmonare (Figura 11b, c).

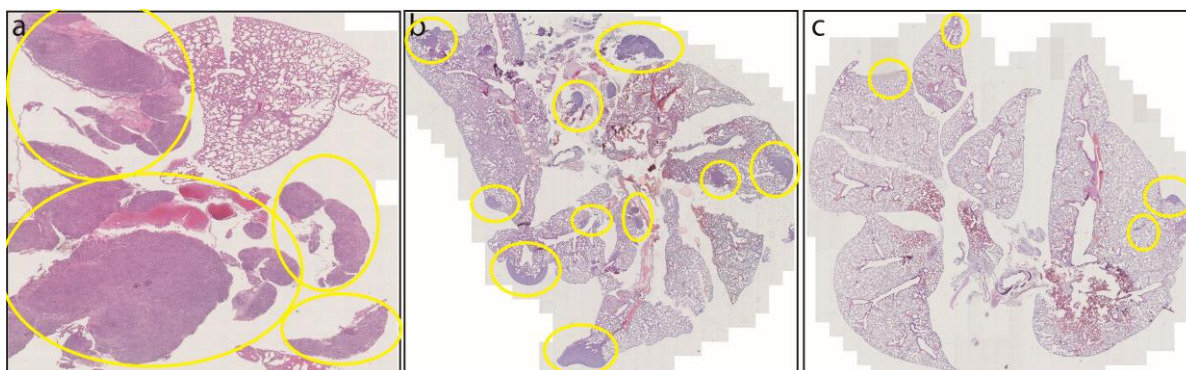


Fig. 11. Aspectul microscopic al metastazelor pulmonare. **a.** netratați **b.** tratați cu 10% Carbon Dots NHF; **c.** tratați cu 20% Carbon Dots NHF.

De asemenea, am urmărit contribuția tratamentelor CD-NHF 10%, respectiv 20% în ceea ce privește durata de supraviețuire (Fig. 12).

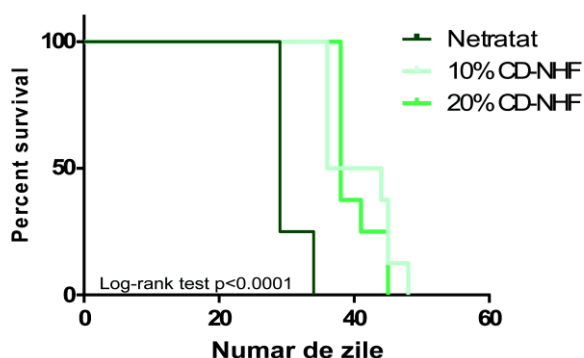


Fig. 12 Analiza supraviețuirii între grupurile netratate și tratate cu CD-NHF 10%, respectiv 20% (Univariate survival analysis, Log-rank test).

În general, profilul de supraviețuire a fost semnificativ prelungit în ambele grupuri tratate cu CD-NHF 10%, respectiv 20% (Fig. 12). Profilul de supraviețuire se corelează cu reducerea tumorii primare, reducerea numărului și a dimensiunilor metastazelor din organele colectate.

Demonstrăm aici că prezența CD-NHF diminuează progresia cancerului mamar și metastazarea. Rezultatele noastre demonstrează că nanostructura testată (CD-NHF) poate interacționa în diferite scenarii moleculare cu diverse molecule cheie esențiale în reducerea fenomenelor de invazivitate și metastazare. Datele experimentale obținute în această etapă se regasesc în **manuscrisul** „NHF-derived Carbon Dots – Prevalidation Approach in Breast Cancer Treatment” *submis la revista „Cancer Research and Treatment” având „Manuscript ID : 19970”*

Indicatorii acestei etape au fost asadar îndepliniți în conformitate cu cerințele etapei.

Activitatea 2.3 - Elucidarea mecanismelor de acțiune anti-tumorală a Carbon Dots; Realizat : 100%

S-a evaluat efectul C-Dots NHF *in vitro* (culturi celulare) și *ex vivo* (organe recoltate de la șoarecii Balb/c). Procesul prin care celulele canceroase invadează în țesuturile înconjurătoare și migrează către organele îndepărtate, metastazarea, este responsabil pentru 90% din mortalitatea cauzată de cancer. Metastazarea este un proces complex caracterizat prin detașarea de celule tumorale de stratul epitelial, intravasare, supraviețuirea în fluxul sanguin, extravazare și creșterea tumorii secundare la organul țintă. Multe molecule implicate în progresia tumorii sunt supraexprimate în celulele canceroase ceea ce le face biomarkeri utili în diagnosticul cancerului. Diverse căi de semnalizare, sunt esențiale în oncogeneză și sunt asociate cu progresia cancerului și rezistența la medicamente în diferite subtipuri de cancer uman.

În studiul cu privire la lipozomii încărcăți cu CD-NHF s-a investigat influența nanostructurilor pe bază de CD-NHF în două căi metabolice:

1. PI3K/AKT/mTOR;
2. EGF/RAS/RAF/MEK/ERK

Acestea sunt 2 căi foarte importante în progresia cancerului precum și rezistența la medicamente. Astfel s-au investigat formele active (fosforilate) ale celor 3 izoforme de Akt (Akt1, Akt2 și Akt3) forma activă (fosforilată) a mTOR și forma fosforilată a Erk1/2 în 2 modele tumorale cu patologii distincte, mamar și pulmonar (Fig. 5-7 din **Activitatea: Act 2.1** - Evaluarea *in vitro* pe liniile celulare selectate a platformelor teranostice pe bază de Carbon Dots imidici).

În studiul „NHF-derived Carbon Dots – Prevalidation Approach in Breast Cancer Treatment” *submis la revista „Cancer Research and Treatment” având „Manuscript ID : 19970”* s-a urmărit progresia tumorală sub influența CD-NHF, iar *ex vivo* s-a investigat una dintre cele mai fundamentale caracteristici ale celulelor canceroase **replicarea** care oferă o informație importantă despre prognosticul pacientului. Proliferarea necontrolată reprezintă o caracteristică importantă a malignității și activitatea proliferativă a tumorilor este utilizată pentru a determina fracția de

creștere a populațiilor de celule canceroase. Tumorile solide includ un subset de celule, celule stem canceroase (CSCs), care se caracterizează prin potențialul lor de auto-reînnoire și capacitatea cea mai mare de a crește în diferite modele tumorale. Reducerea numărului de celule care exprimă molecula Ki-67 indică o capacitate redusă de formare a tumorii, ceea ce sugerează că Ki-67 este necesar pentru a menține nișa celulelor stem canceroase. În studiul efectuat, expresia Ki-67 a fost redusă semnificativ atât în tumorile primare, cât și în metastazele pulmonare la grupurile tratate cu 10% și 20% CD-NHF comparativ cu grupul control (Fig. 13).

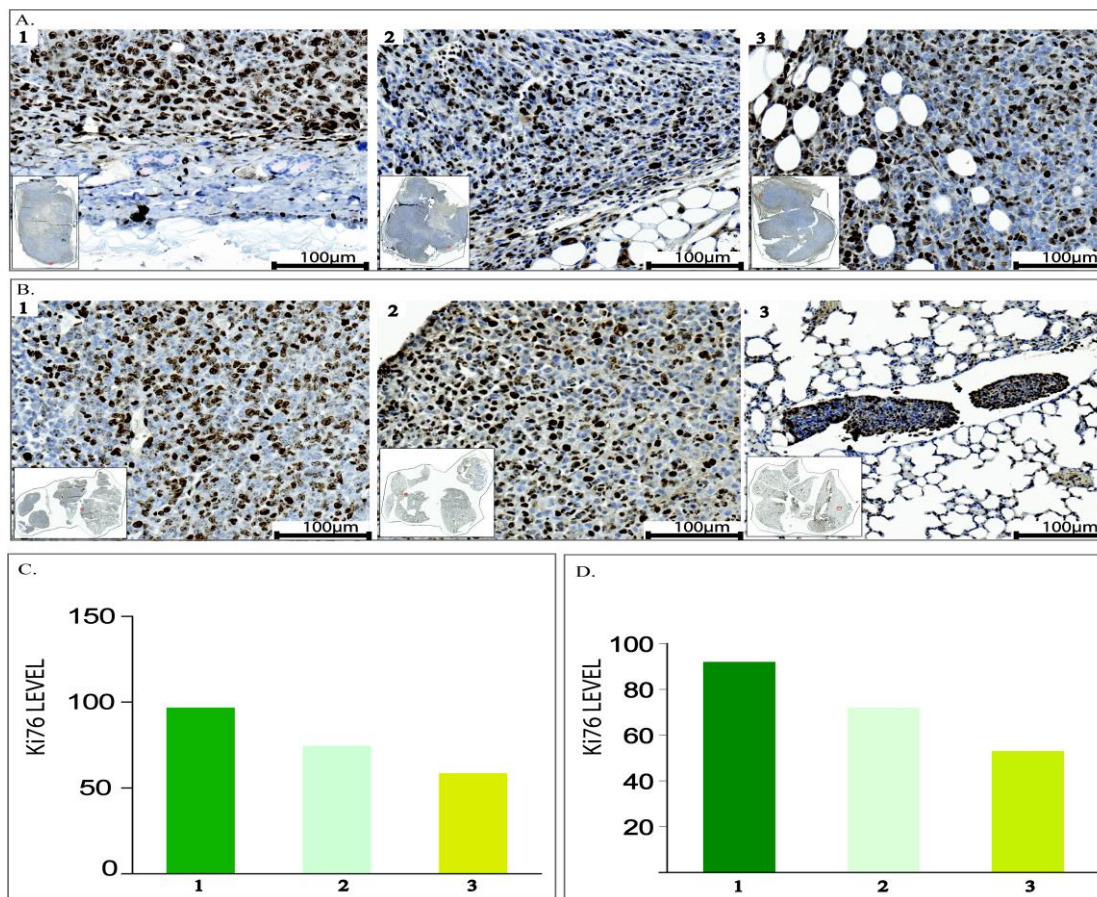


Fig. 13. Expresia de Ki67. **A.** Tumora primara ; **B.** Metastaze pulmonare ; **C.** Cuantificarea expresiei de Ki67 in tumorile primare ; **D.** Cuantificarea expresiei de Ki67 in metastazele pulmonare. 1. netratat ; 2. tratat cu 10% CD-NHF ; 3. tratat cu 20% CD-NHF. Poze achizitionate la 20x

În cancerul de sân, proliferarea celulară a fost corelată cu reglarea genelor HSPs legate de stres. HSP90 joacă un rol important în procesele multiple care duc la progresia tumorii, invazia, metastaza și răspunsul imunitar al tumorii. Rezultatele noastre arată că nivelul de HSP90 a fost afectat, similar cu Ki67, în prezența nanostructurilor testate (Fig. 14). S-a demonstrat că prezența CD-NHF diminuează progresia tumorală și metastazarea.

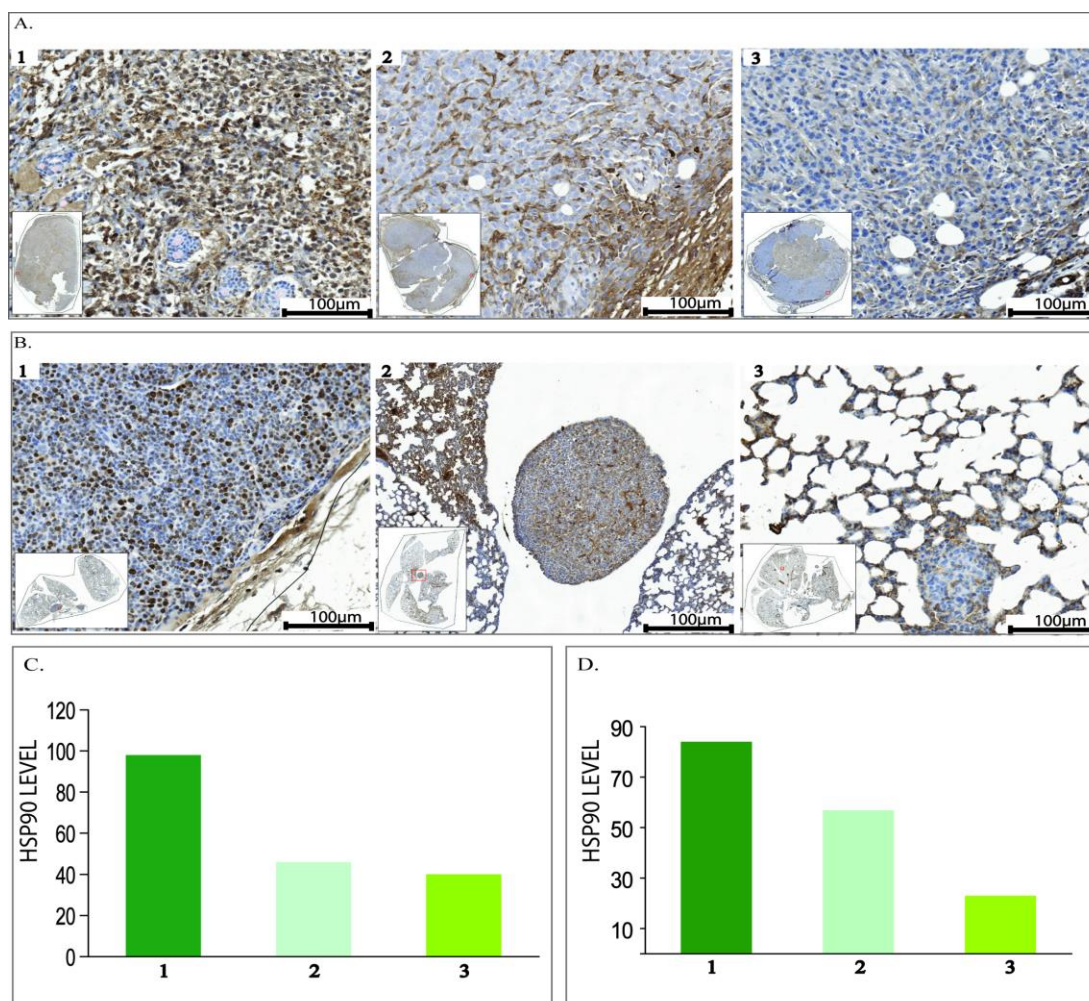
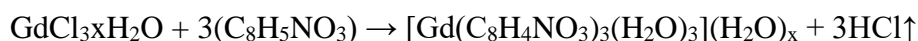


Fig. 14. Expresia de HSP90. **A.** Tumora primara; **B.** Metastaze pulmonare; **C.** Cuantificarea expresiei de Ki67 in tumorile primare; **D.** Quantificarea expresiei de Ki67 in metastazele pulmonare. 1. netratat ; 2. tratat cu 10% CD-NHF ; 3. tratat cu 20% CD-NHF. Poze achizitionate la 20x.

Toate aceste date demonstrează rolul terapeutic al CD-NHF atât in modelele *in vitro* cât și in cele *in vivo* și indică căile moleculare prin care își exercită acțiunea antitumorală.

Activitatea 2.4 - Prepararea unor complexe Carbon Dots – Gd³⁺ pentru extinderea posibilităților de diagnostic prin utilizarea de tehnici RMN; Realizat: 100%

Pentru prepararea nanostructurilor de tip Carbon Dots dopate cu Gd³⁺ s-a recurs la obținerea prealabilă a unui complex N-Hidroxifitalimidă cu Gd³⁺ care apoi este procesat pirolitic în condiții controlate. Reacția de complexare decurge într-un mediu format din 40% apă și 60% alcool etilic apos sub agitare, la temperatura de 85-90⁰ C, timp de 2-3 ore într-un balon de sticlă dotat cu refrigerent de reflux. Procesele de complexare decurg conform reacției:



În urma reacției de complexare rezultă complexul sub formă de precipitat. Purificarea complexului se realizează prin adăugarea sub agitare magnetică de apă bi-distilată la temperatura de cca. 3-4^o C, urmată de centrifugare în vederea eliminării supernatantului. Operația de purificare se repetă de cca. 2-3 ori pentru eliminarea completă a compușilor solubili (complex parțial coordonat, reactanți, HCl). Precipitatul umed rezultat după purificare este înghețat la -30^o C ÷ -40^o C și apoi liofilizat pentru obținerea în stare uscată. Pentru utilizarea compușilor de coordinație astfel preparați

ca precursorii de obținere a nanostructurilor de tip "Carbon Dots" printr-un procedeu pirolitic, este necesară o etapă de pre-condiționare termică care implică eliminarea moleculelor de apă (H_2O)_x situate în sfera exterioară de coordinare a cationului Gd^{3+} . Pre-condiționarea termică trebuie să evite destructurarea complexelor și pierderea moleculelor de apă situate în prima sferă de coordinare a cationului central. Ca urmare a evaluării treptelor de descompunere termică rezultate în urma investigațiilor termogravimetrice, pre-condiționarea implică expunerea termică sub vacuum timp de 36-48 ore a complexului uscat prin liofilizare, la o temperatură de 105÷110° C. Complexul pre-conditionat termic astfel rezultat este în continuare procesat pirolitic în condiții asemănătoare celor stabilite la prepararea nanostructurilor Carbon Dots din N-hidroxifitalimida, procedeu studiat și detaliat în etapa precedentă de desfășurare a proiectului de cercetare.

Cercetările privind obținerea unor Carbon Dots pe bază de precursori imidici care să permită utilizarea acestora în imagistica RMN, obținându-se astfel o platforma teranostică, au fost extinse prin investigarea unor Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} . Studiile efectuate în această direcție au condus la rezultate foarte interesante în ceea ce privește structura și proprietățile unice ale acestor noi tipuri de nanostructuri. Au fost obținuți Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} care prezintă o emisie fotoluminescentă intensă dependentă de prezența moleculelor de apă în mediul de dispersie.

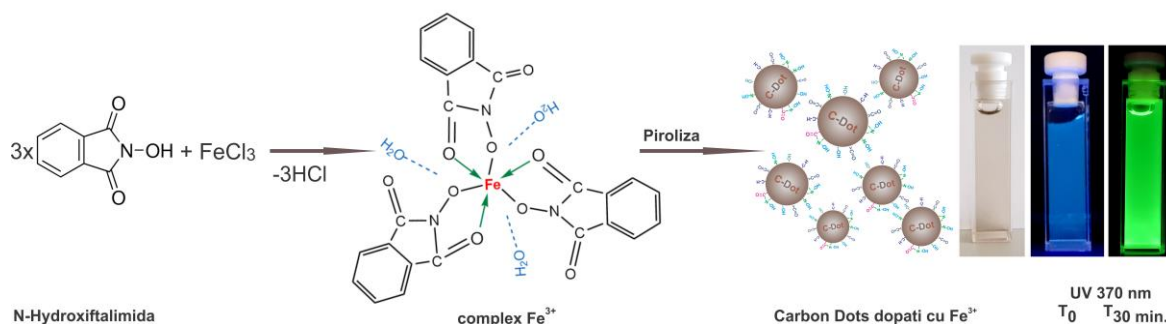


Fig. 15. Obținerea Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} și emisia fluorescența după dispersia inițială în mediul apos (emisie în zona albastră) și după 30 min. de expunere la radiație UV (emisie în zona verde a spectrului vizibil)

În Figura 16 sunt prezentate spectrele de emisie ale Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} înregistrate imediat după dispersia în apă (a), respectiv spectrele de emisie înregistrate după 30 min. de expunere la UV (b).

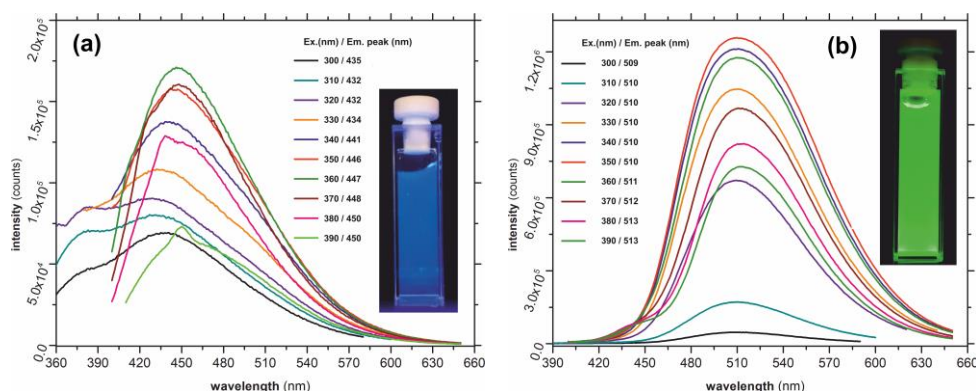


Fig 16. Spectrele de emisie fluorescența ala Carbon Dots dopați cu Fe^{3+} înregistrate într-un interval de excitație 300-390 nm

Nanostructurile Carbon Dots dopate cu Fe^{3+} au fost investigate morfo-structural prin XPS, FT-IR, TG, HR-TEM, AFM, DLS, proprietățile de emisie fluorescență fiind studiate prin fluorescența steady state, PLQY și timp de viața a stărilor excitate. În Figura 17 este prezentată o

microfotografie HR-TEM obținută la investigarea acestor noi tipuri de nanostructuri. Prepararea Carbon Dots dopati cu Fe³⁺ implică o etapă preliminară de obținere a unui complex N-Hidroxuftalimida cu Fe³⁺ conform urmatoarei reacții:

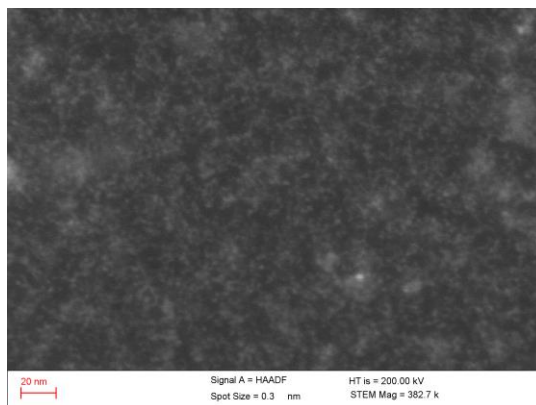
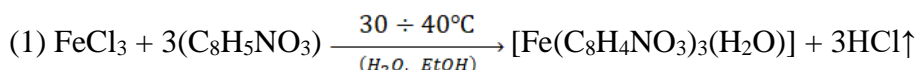


Fig 17. Imagine HR-TEM înregistrată la investigarea nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Fe³⁺

Complexul este preparat la un raport de combinare metal/ligand de 1/3 în urma reacției dintre clorura ferică (FeCl₃) și N-Hidroxuftalimida (C₈H₅NO₃) într-un mediu de reacție format din 60% apă - 40% alcool etilic. Procesul de complexare decurge conform reacției (1) la temperatura de 30÷40°C, sub agitare moderată timp de 24 ore. Precipitatul rezultat în urma reacției de complexare este separat de mediul de reacție prin centrifugare la 2000-3000 RPM timp de 10 min. După centrifugare, se elimină supernatantul, precipitatul umed fiind colectat într-un vas de sticlă.

Purificarea complexului se realizează prin adăugarea sub agitare magnetică de apă bi-distilată, urmată de centrifugare și re-colectarea precipitatului rezultat. Operația de purificare se repetă de 3 ori pentru eliminarea completă a compușilor solubili (complecși parțial coordinați, reactanți, HCl).

Complexul purificat este uscat la vid și depozitat într-un recipient etanș pentru evitarea retenției de apă. Prepararea nanostructurilor de carbon dopate cu Fe³⁺ se realizează prin piroliza parțială a complexului la o temperatură de 200÷210°C, în atmosferă de azot. Procesul pirolitic se desfășoară într-un recipient de cuarț, expunerea termică la temperatura menționată fiind de 7 min.

Produsul rezultat în urma procesului pirolitic prezintă o structură compusă dintr-un miez grafitic la care sunt atașate grupe chimice reziduale de tipul C=O, C-N-O-Fe, N-OH etc. Dopantul (Fe³⁺) se regăsește localizat atât în miezul grafitic cât și legat la grupele funcționale reziduale atașate. După terminarea procesului pirolitic, masa de reacție este inundată brusc cu apă la temperatura de 3÷4°C rezultând o dispersie de nanostructuri de carbon dopate cu Fe³⁺. Dispersia de nanostructuri de carbon este centrifugată la 15000 RPM timp de 15 min. Supernatantul rezultat este colectat și recentrifugat în aceleași condiții, obținându-se o dispersie apoasă de nanostructuri de carbon dopate cu Fe³⁺.

Proiect component : 2 (P2)

Act 2.5 - Studiul influenței matricilor polimerice selectate asupra platformei teranostice antitumorale și optimizarea biocompozitelor pentru obținerea eficacității maxime. Realizat : 100% și Act 2.6 - Selecția materialelor polimerice muco-adezive (polizaharide și/sau polimeri sintetici) și a metodelor de preparare pentru obținerea bio-compozitelor nanoparticulate ce includ Carbon Dots imidici (și/sau complecși Carbon Dots - Gd³⁺). Realizat : 100%

În cadrul acestor activități au fost realizate teste pe o serie de polimeri recunoscuți ca având proprietăți de biocompatibilitate, biodegradabilitate și mucoadezivitate. Pentru o bună înțelegere a deciziilor ce au fost luate pentru derularea activităților din cadrul proiectului 2, sunt câteva aspecte ce trebuie a fi menționate. Este din punctul nostru de vedere esențială obținerea unor sisteme de tip capsulă, întrucât sistemele de tip sferă plină nu vor putea asigura doza necesară de CDs pentru obținerea unui efect optim. În consecință, luând în considerare faptul că CDs sunt suspendați în apă și că proprietățile acestora se modifică dramatic dacă ar fi suspendați în orice alt solvent, plaja de posibilități se reduce la utilizarea de polimeri insolubili în apă. După un studiu atent al proprietăților sale s-a ales a testa posibilitatea utilizării de poli((ε-caprolactona) (PCL) în vederea obținerii de nanocapsule cu scopul încapsulării de CDs în scop terapeutic și/sau de diagnostic.

De asemenea partenerul P2 a preparat cu succes noi biocompozite nano/micro particulate pe bază de hidroxizi dubli lamelari (LDHs) intercalați cu Carbon Dots imidici (CDots), complecși cu acțiune antitumorală, ce urmează a fi utilizate în scop terapeutic și/sau de diagnostic.

Poli(ε-caprolactona) este un poliester alifatic semicristalin, ce prezintă un punct de topire scăzut (59-64⁰ C), biodegradabil, biocompatibil, cu o excelentă solubilitate în diverși solvenți, stabilitate termică și proprietăți reologice bune. Toate aceste avantaje ale PCL, combinate și cu un preț relativ scăzut au condus la diverse studii cu privire la utilizarea polimerului ca și biomaterial în diverse aplicații precum inginerie tisulară și sisteme de transport pentru diferite principii active.

Pentru activitățile în curs, s-au realizat un studiu preliminar în vederea obținerii de nanocapsule având la bază polimerul PCL prin metoda nanoprecipitării raportată de Khoobdel M. și colaboratorii săi [1].

Pe scurt, metoda de obținere a nanocapsulelor a presupus următoarele etape: a fost pregătită faza organică formată din PCL solubilizat în acetonă, în care a fost adăugat un tensioactiv și anume Span 20 (surfactant neionic). S-au dizolvat 120 mg de PCL și 88 mg Span 20 în 24 ml de acetonă. În continuare, s-a adăugat faza organică în picături cu ajutorul unei seringi, în faza apoasă (50 ml) conținând Tween 80 (tensioactiv hidrofil, 150 mg) sub agitare ultrarapidă timp de 10 min. Ulterior, suspensia de nanocapsulele obținută a fost menținută sub agitare magnetică moderată pentru cca. 24 h la temperatura camerei pentru a permite evaporarea completă a solventului (acetona). După evaporarea completă a acetonei, nanocapsulele obținute au fost purificate prin spălare cu apă și centrifugare la 7830 rpm la temperatura camerei. După finalizarea etapei de purificare, nanocapsulele au fost supuse etapei de uscarea prin liofilizare. Nanocapsulele obținute au fost caracterizate din punct de vedere morfologic prin microscopie electronică de baleiaj (HITACHI SU 1510) figura 18. Din aceste rezultate preliminare se poate concluziona că această metodă de obținere a nanocapsulelor este promițătoare, iar pe viitor va fi supus studiului influența a diferiți parametri de sinteză asupra formei, dimensiunii, structurii și a capacității de încapsulare a CDs-NHF.

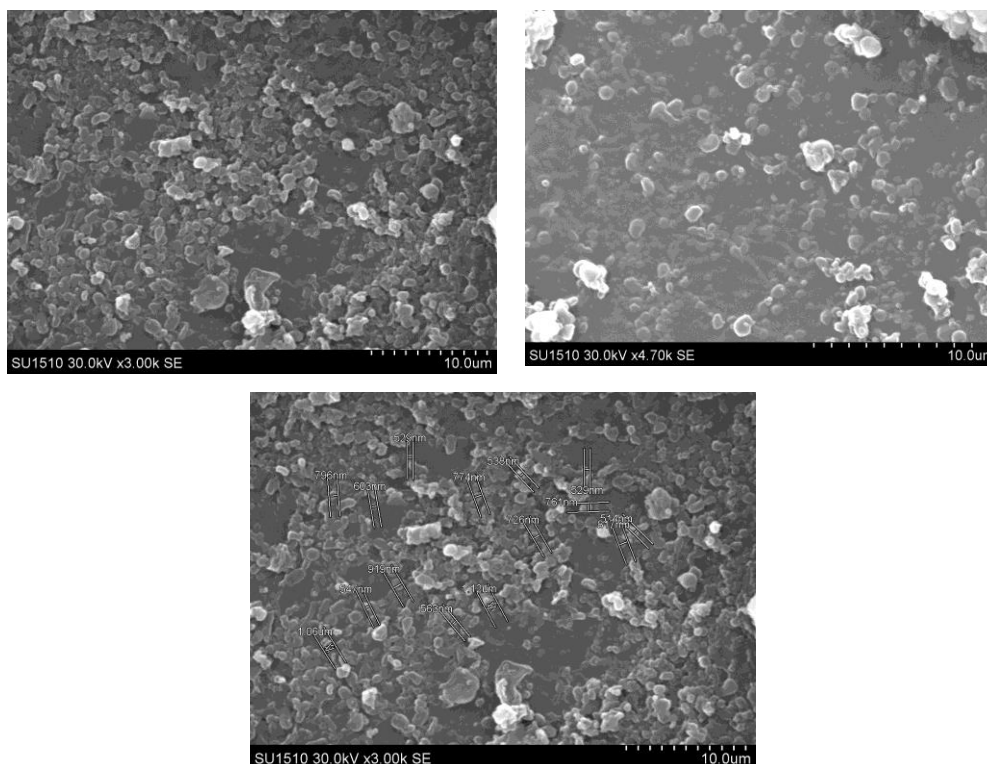


Fig. 18 Nanocapsule pe bază de PCL

Cea de-a doua direcție selectată cu scopul de a încapsula CD-NHF este cea a hidroxizilor dubli lamelari. Aceștia au fost selectați drept componentă gazdă, anorganică, pentru noile platforme teranostice datorită numeroaselor avantaje pe care le prezintă precum: posibilitatea folosirii unor materiale ieftine, cu proprietăți și proceduri de sinteză controlabile, biocompatibile și bine tolerate de organismul uman.

Carbon Dots imidici au fost sintetizați și furnizați de către coordonatorul Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, iar înainte de a fi folosiți la prepararea biocompozitelor teranostice antitumorale nano/micro particulate, au fost analizați cu ajutorul tehnicii XPS.

Importanța asigurării transportului la nivel celular a numeroase medicamente și molecule bioactive a determinat apariția și dezvoltarea unui nou domeniu, care combină chimia, biologia și știința materialelor. Astfel, investigarea LDHs în diverse aplicații farmaceutice, biologice și medicale, (tratamentul cancerului, traumatisme osoase și musculare, artrite, reducerea sau chiar eliminarea infecțiilor, tratarea ulcerărilor stomacale și chiar a unor alergii) este în plină ascensiune, iar cercetarile în direcția biocompozitelor nano/micro particulate cuprind o arie din ce în ce mai mare [2].

LDHs reprezintă o clasă de materiale caracterizată printr-o structură lamelară stratificată, în care lamelele sunt înărcate pozitiv, iar stabilitatea împachetării stratificate este asigurată de anionii care leagă electrostatic strâns lamelele adiacente.

Cele mai importante proprietăți ale acestor materiale, în baza cărora s-au obținut o gamă largă de materiale hibride cu aplicații practice în diverse domenii sunt: suprafața specifică mare ($100 \pm 300 \text{ m}^2/\text{g}$); proprietățile bazice; efectul de memorie, proprietate în baza căreia, oxizii micști rezultați în urma calcinării LDH-ilor, pot reface structura lamelară prin simpla lor imersare în soluții apoase ce conțin anionul de compensație; capacitatea de schimb anionic ridicată [3].

LDHs s-au dovedit a fi sisteme biocompatibile ceea ce a condus la utilizarea lor în diverse tehnologii farmaceutice, precum și în medicină, în stocarea, transportul și eliberarea controlată a moleculelor active la locul de acțiune.

Pentru ca un medicament să aibă eficiența dorită, trebuie să acționeze asupra „target-ului”, fără interacțiuni nedorite cu alte centre celulare, fapt ce presupune adsorbția cantității corecte de medicament în corpul uman și transportul său controlat, prin organism, la locul de acțiune [4].

Studiile efectuate, uneori chiar *in vivo*, au arătat că medicamentele intercalate în structura

lamelară a LDHs pot fi eliberate lent aceasta, printr-un simplu proces de de-intercalare, aspect ce dovedește eficiența LDHs în stocarea, transportul și eliberarea controlată a moleculelor active la locul de acțiune. Un alt aspect important obținut prin intercalarea moleculelor active în LDHs este îmbunătățirea solubilității, solubilitatea jucând un rol cheie în eliberarea, adsorbția și biodisponibilitatea acestora [5]. Mai mult, s-a observat creșterea semnificativă a stabilității termice a unor medicamente încorporate în structuri LDHs, comparativ cu analogii lor ne-intercalați.

Unii compuși folosiți în terapia unor forme de cancer au un timp de viață scurt în plasma sanguină, ceea ce determină administrarea de doze crescute, pentru a produce efectul terapeutic dorit, fapt ce ar conduce, în timp la rezistența celulelor la acțiunea ulterioară a acestora, precum și la mărirea efectelor adverse. S-a observat că prin intercalarea în LDHs a unor compuși folosiți în terapia unor forme de cancer (de ex. acidul folinic și methotrexate) s-a reușit protejarea acestora împotriva deteriorării în timpul transportului prin plasma sanguină, și mai mult, obținerea unei eliberări controlate și creșterea solubilității [6].

În vederea obținerii de noi platforme teranostice pe baza de Carbon Dots imidici, s-au folosit diferite matrici LDHs, cu rolul de a proteja CDots împotriva deteriorării în timpul administrării, precum și creșterea solubilității și obținerea eliberării lor controlate. Carbon Dots imidici folosiți în acest scop, au fost preparați prin procesarea termică a precursorului N-Hidroxifalimidă (NHF) la diferiți timpi de piroliză (5, 10, 20 și 40 minute) de către partenerul Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași.

Obținerea și caracterizarea materialelor de tip LDHs

Principalele etape în obținerea materialelor de tip LDHs sunt:

- Precipitarea cationilor metalici divalenți și trivalenți prin adăugarea unei soluții bazice (NaOH) la soluția acidă de săruri metalice $Mg(NO_3)_2$, $Zn(NO_3)_2$ și $Al(NO_3)_3$, prin picurarea lentă a reactivilor menținuți sub atmosferă de azot și agitare puternică. S-a menținut pH-ul constant în jurul valorii de 9–10 pentru probele cu magneziu $MgAlLDHs$ și 7-8 pentru probele cu zinc LDHs. S-a lucrat la o temperatură constantă care diferă funcție de precursorii folosiți în sinteză.
- Îmbătrânirea precipitatului, prin termostatarea acestuia la cald ($50^\circ C$) timp de 4 ore;
- Spălarea precipitatului cu apă decarbonată, de minim 3 ori;
- Separarea precipitatului prin centrifugare;
- Redispersarea precipitatului în mediul de reacție (H_2O sau CH_3OH);
- Maturarea precipitatului timp de 4-6 zile la temperatura camerei;
- Liofilizarea precipitatului timp de 24 ore.

Schema protocolului experimental pentru obținerea LDHs prin metoda coprecipitării directe la pH constant este prezentată în Fig. 19.

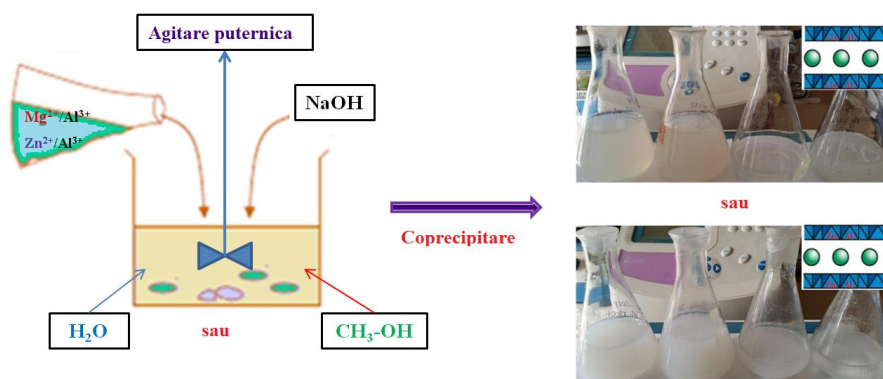


Fig. 19. Schema protocolului experimental de obținere a LDHs prin metoda coprecipitării

În funcție de tipul de LDHs preparat au fost menținute anumite condiții de lucru: pH, temperatură, viteza de agitare, atmosferă de azot, etc (Tabelul 1).

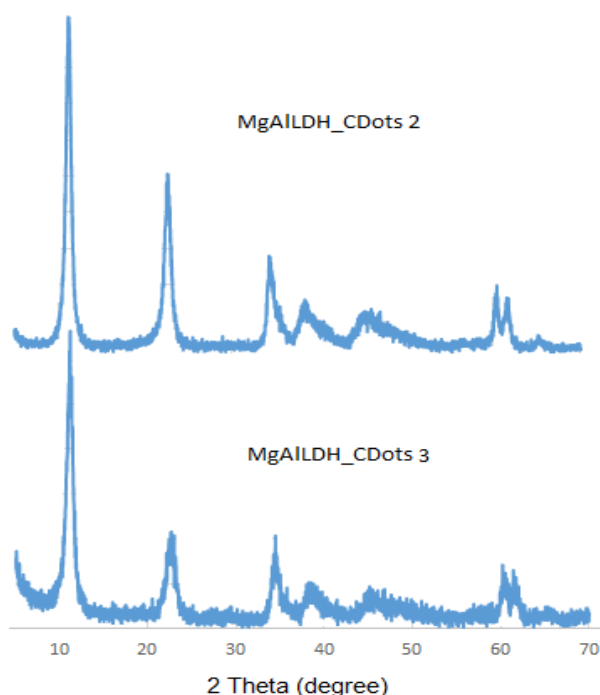
Tabelul 1. Parametrii de sinteză a precursorilor de tip LDHs

LDHs	M ^{II} / M ^{III}	M		NaOH	pH	Mediul de reacție	T, °C
		M ^{II} (NO ₃) ₂	Al(NO ₃) ₃				
MgAlNO-CH ₃ OH	2	1.2	0.6	0.6	10	CH ₃ OH	40-50 °C
	3	0.6	0.2	0.4	9.5		
ZnAlNO-CH ₃ OH	2	0.5	0.25	0.6	7.5	CH ₃ OH	40-50 °C
	3	0.3	0.1	0.4	8		
MgAlNO-H ₂ O	2	1.2	0.6	0.6	9.5	H ₂ O	40-50 °C
	3	0.6	0.2	0.4	9.5		
ZnAlNO-H ₂ O	2	0.5	0.25	0.6	7.5	H ₂ O	40-50 °C
	3	0.3	0.1	0.4	7.5		

Caracterizarea structurală și morfologică a precursorilor LDHs a fost realizată folosind următoarele tehnici: difracția cu raze X (XRD), spectroscopia infraroșu (FTIR), microscopia electronică prin transmisie (TEM) și difuzia dinamică a luminii (DLS).

Obținerea și caracterizarea biocompozitelor pe bază de LDHs și NHF

În vederea preparării biocompozitelor pe bază de LDHs și NHF s-a folosit metoda schimbului ionic. Pentru aceasta s-a folosit pentru fiecare biocompozit câte aproximativ 0,50 g de pulbere LDH care a fost amestecat cu 12,5 ml apă ultrapură conținând o anumită cantitate (0,01-0,03g) de NHF5 și NHF10. Amestecul a fost agitat timp de 2 ore, separat prin centrifugare, spălat cu apă ultrapură de minim trei ori și liofilizat timp de 24 de ore. Biocompozitele astfel obținute au fost caracterizate prin DRX și FTIR (Fig. 20 și 21), urmând să fi analizate prin XPS, TEM și DLS și testate *in vitro*.

**Fig. 20.** Difractogramele DRX pentru două biocompozite pe bază de MgAlLDHs și NHF10

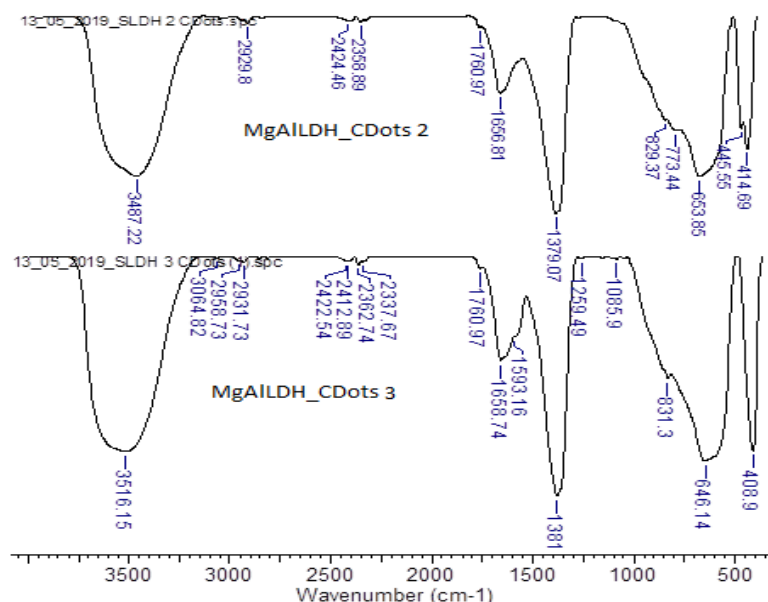


Fig. 21. Spectrele FTIR pentru două biocompozite pe bază de MgAILDHs și NHF10

Din aceste rezultate preliminare se poate concluziona că structura de tip LDH se menține pentru toate biocompozitele pe bază de NHF10, dar modificările apărute după intercalare nu sunt foarte evidente. Pe viitor se vor realiza și alte sinteze în care cantitatea de NHF să fie mai ridicată.

O a treia direcție pe care o considerăm a fi cea mai bună a fost utilizarea lipozomilor ca și sisteme biocompozite pentru încapsularea de CDs cu proprietăți antitumorale. Avantajele utilizării lipozomilor sunt pe lângă biocompatibilitate și biodegradabilitate și capacitatea mare de includere a principiilor active și mai ales posibilitatea obținerii lor la dimensiunile impuse de aplicație. Unii cercetători susțin faptul că dimensiunea acestor nanostructuri le face incapabile să pătrundă în țesutul normal, în timp ce în cazul tumorilor pot ieși cu ușurință în circulația sistemică și intra în spațiul extracelular, la nivelul vasculaturii dezorganizate a tumorii. Lipozomii (LPs) considerați în studiul nostru, sunt vezicule mici sferice ce constau dintr-un dublu strat lipidic obținut din colesterol și / sau fosfolipide naturale netoxice care înconjoară un miez apos. S-a arătat că, în comparație cu alte sisteme de administrare, LPs-urile au proprietăți bune precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, toxicitatea scăzută, caracterul hidrofob și hidrofil, care facilitează încorporarea și eliberarea țintită a moleculelor lipofile și/sau hidrofile. În acest studiu lipozomi (LPs-CD-NHF) încărcăți cu CDs-NHF au redus viabilitatea celulelor canceroase mamare și pulmonare la doze mai mici comparativ cu C-Ds singuri. Acest efect a fost potențat în continuare prin asocierea LPs-CD-NHF cu doxorubicină. Lipozomii încărcăți cu NHF Dots influențează expresia moleculelor majore implicate în oncogeneză precum AKT, mTOR și ERK. Diverse căi de semnalizare, cum ar fi PI3K / AKT / mTOR și EGF / RAS / RAF / MEK / ERK sunt esențiale în oncogeneză, asociate cu progresia cancerului și rezistența la medicamente în diferite tipuri de cancer uman.

Pentru acest studiu au fost preparate patru tipuri de formulări și anume: lipozomi control (LPs); lipozomi încărcăți cu CDs (LPs-CDs-NHF), lipozomi încărcăți cu doxorubicină (LPs-DOX) și lipozomi încărcăți cu CDs și DOX (LPs-CDs-NHF-DOX). Pentru prepararea lipozomilor a fost utilizată metoda de evaporare cu fază inversă conform unui protocolului modificat raportat de Xue și colab. În principiu, fosfatidil colina (PC - phospholipon 90G) și colesterolul (CHOL) au fost dizolvate în dietileter într-un anumit raport într-un balon cu fundul rotund. Prin adăugarea unei anumite cantități de apă se formează o emulsie care este apoi ultrasonicată și supusă evaporării dietileterului la 35°C. Suspensia de lipozomi obținută este apoi vortexată și lăsată pe baie de ultrasunete pentru încă 30 de minute în scopul eliminării defectelor structurale și a eliminării complete a urmelor de solvent. Pentru obținerea unor lipozomi de dimensiuni în jurul valorii de 100 nm și cu indice de polidispersitate redus, suspensia este apoi extrudată (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) în mod repetat și succesiv prin membrane de 400 nm, 200nm și 100 nm. În final,

toate formulările au fost supuse unui proces de purificare prin dializa timp de 5 zile prin membrane de dializă cu limită de 12400 Da.

Pentru a avea un control riguros asupra proprietăților formulărilor obținute, dar și pentru determinarea cantitativă a dozelor optime ce au fost utilizate pentru testarea *in vitro* a acestora a fost necesară elaborarea unor curbe de calibrare după cum urmează:

- Pentru determinarea a concentrației suspensiilor de lipozomi după purificare, dar și pentru determinarea raportului de tip *drug/lipid* (DOX sau CDs raportat la cantitatea de lipidă) s-a utilizat metoda Stewart datorită următoarelor avantaje: capacitatea fosfolipidelor de a forma un complex de culoare roșie între fosfolipide cu ferotiocianatul de amoniu care poate fi cuantificat utilizând spectrofotometria UV-VIS după extragerea acestora în soluție organică (cloroform).
- Determinarea cantității de CDs incluse în lipozomi s-a realizat prin spectrometrie de fluorescență, după realizarea unei curbe de calibrare
- Determinarea cantității de DOX incluse în lipozomi (eficiența de încapsulare) s-a realizat prin spectrometrie UV-VIS

Toate cele 3 curbe de calibrare sunt redată în figura 22 de mai jos:

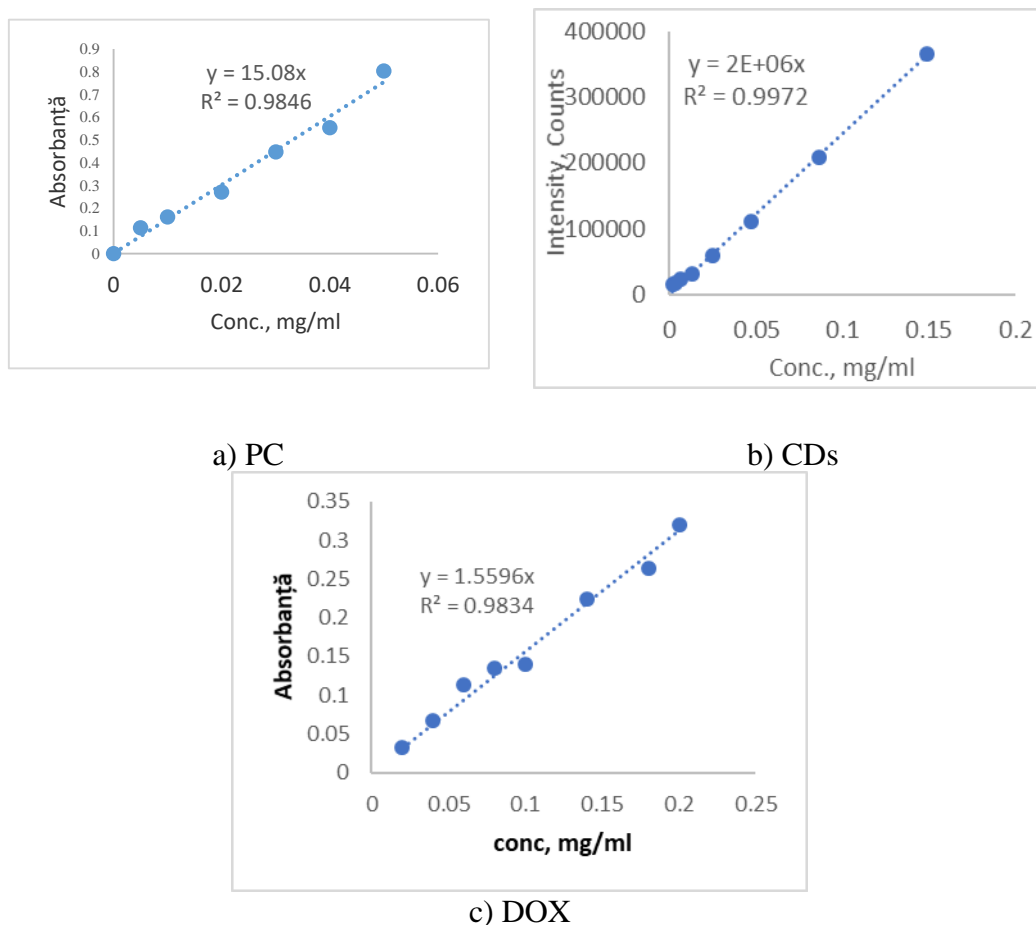


Figura 22. Curbele de calibrare utilizate pentru determinarea cantitativă a a) PC; b) CDs-NHF; c) DOX

Sistemele obținute au fost caracterizate din punct de vedere morfologic prin microscopie electronică de baleiaj (HITACHI SU 1510 - utilizând sistem Peltier de înghețare a probelor intrucat lipidele nu sunt stabile), microscopie electronică de transmisie (Philips CM200 LaB6 microscope HR-TEM). Exemple de fotomicrografii de microscopie electronică sunt redată în figurile de mai jos:

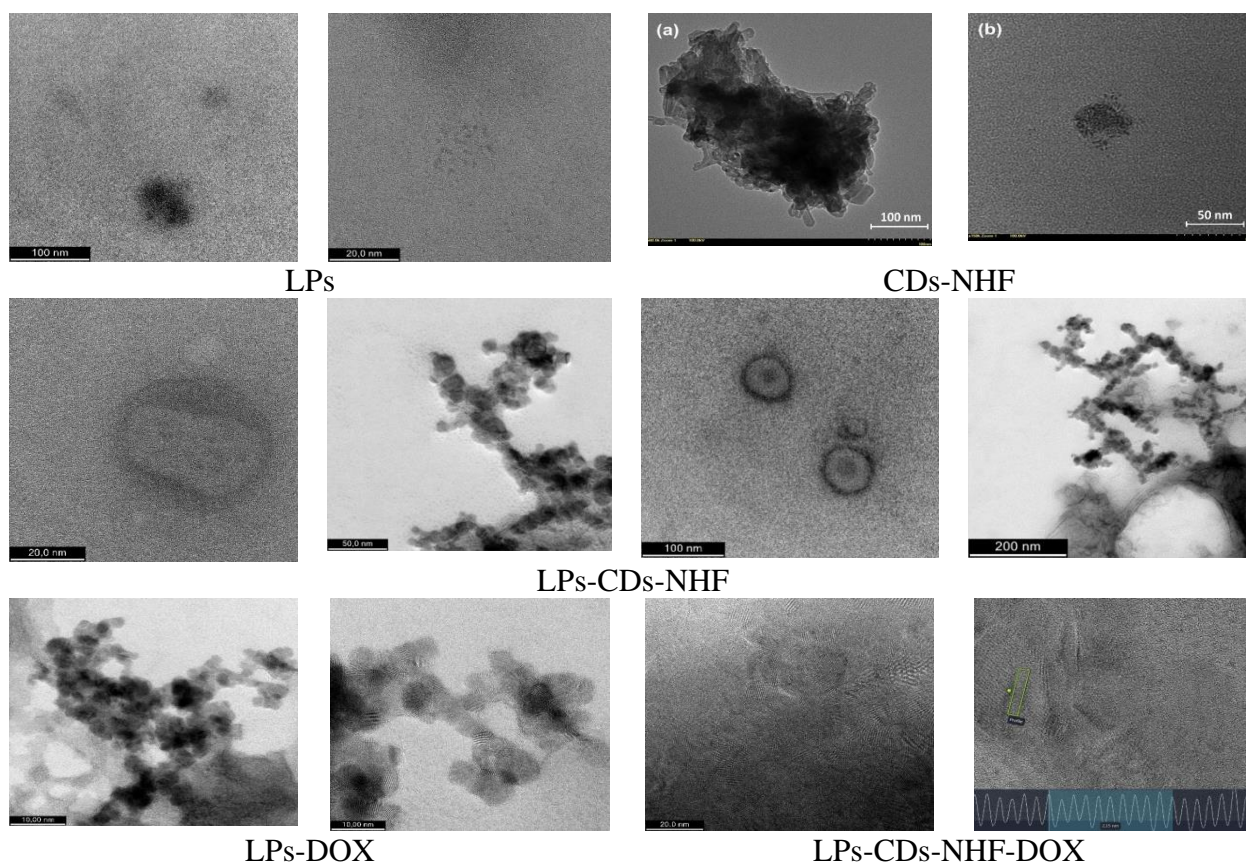


Figura 23. Imagini HR-TEM pentru formulări pe bază de lipozomi

Aceste imagini de TEM confirmă faptul că CDs au fost incluși în LPs care la rândul lor deși sunt elastici și au fost supuși unor procese de extrudare și-au pastrat forma sferică

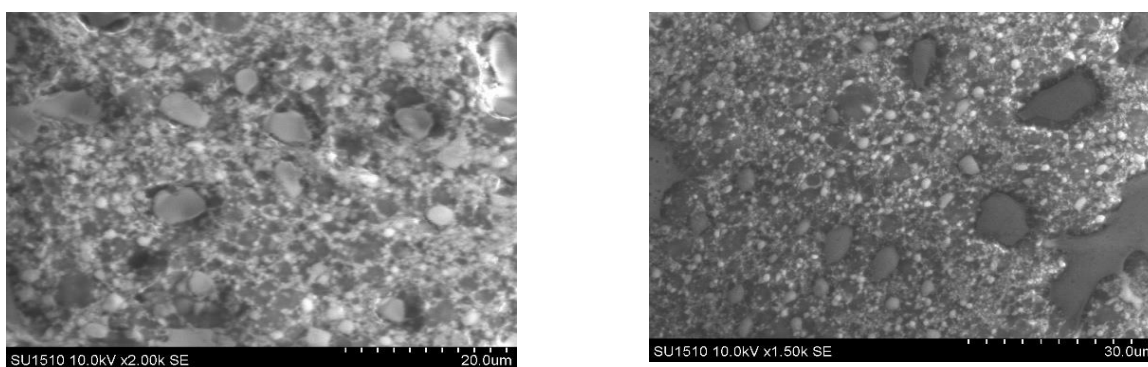
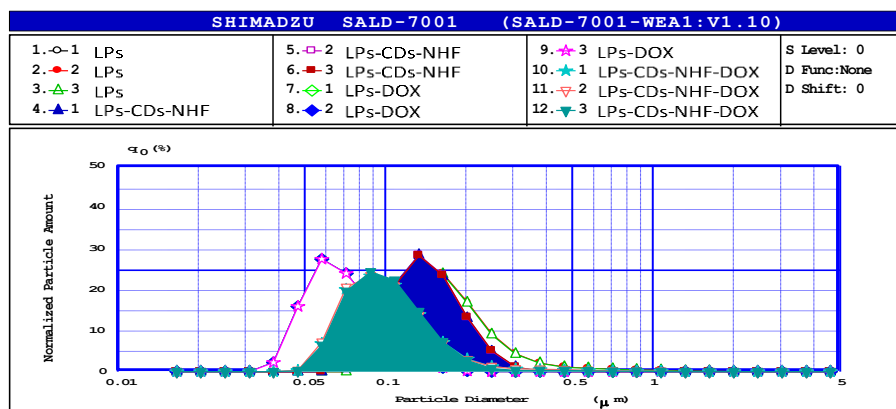


Figura 24. Imagini de microscopie electronic de baleiaj pe probe de LPs înghețate

De asemenea, pentru determinarea dimensiunii lipozomilor din diferitele formulări au fost realizate teste de difractometrie laser cu ajutorul echipamentelor Shimadzu SALD și Malvern Zetasizer Nano ZS. În tabelul de mai jos și în imaginea alăturată sunt redată valorile dimetrelor medii ale lipozomilor din diferitele formulări precum și curbele de distribuție dimensională.

Nr. crt.	Sample ID	Diameter (SALD ± SD), nm
1.	CDs-NHF	44
2.	LPs	130 / 155
3.	LPs-CDs-NHF	115 / 112
4.	LPs-DOX	55 / 79
5.	LPs-CDs-NHF-DOX	77 / 82



Testele de fluorescență realizate au evidențiat faptul că lipozomii fără încărcătură nu au emisie fluorescentă în comparație cu CDs-NHF și cu lipozomii încărcăți. În cazul CDs-NHF intensitatea maximă a fost observată la 447 nm în timp ce pentru LPS-CDs-NHF și LPS-CDs-NHF-DOX intensitatea maximă a fost determinată la 408 nm, respectiv 405 nm (tabelul 2 și figura 25). Aceste rezultate indică faptul că emisia fluorescentă a lipozomilor încărcăți cu CDs-NHF scade cu aproximativ 50%. Acest fenomen ar putea fi cauzat de membrana fosfolipidică care interferă și blochează emisia luminii albastre.

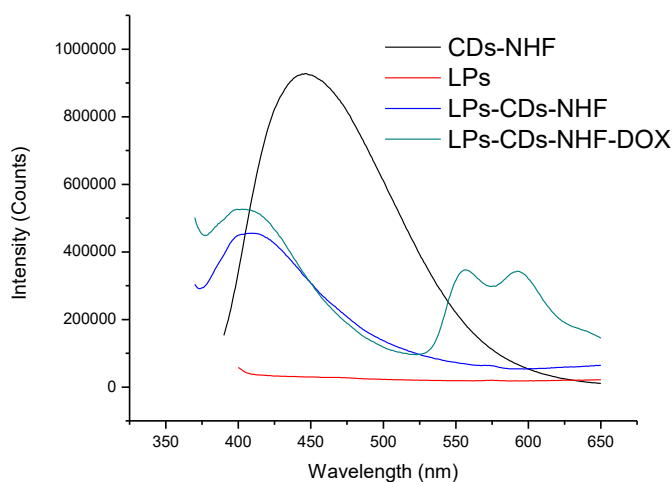


Figura 25. Spectrele de emisie ale CDs-NHF, LPS, LPS-CDs-NHF și LPS-CDs-NHF-DOX

Sample ID	Excitation (nm)	Emission peaks (nm)	Intensity (Counts)
CDs-NHF		447	9.27641x10 ⁵
Blank LPS		0	0
LPS-CDs-NHF		408	4.55403 x10 ⁵
LPS-CDs-NHF-DOX		405	5.26137 x10 ⁵ (CDs-NHF)
		557	3.46898x 10 ⁵ (DOX)
	370	593	3.42876x 10 ⁵ (DOX)

Tabel 2 - Fluorescence results obtained for CDs-NHF, LPS, LPS-CDs-NHF and LPS-CDs-NHF-DOX formulations

Au fost realizate teste calitative de determinare a proprietăților de fotoluminiscentă ale formulărilor realizate la lumina zilei și la lumină UV utilizând o lampă Philips UVA TL4WBLB ce prezintă o emisie maximă în intervalul 370-390 nm la 50mW. Rezultatele sunt prezentate în imaginile de mai jos:

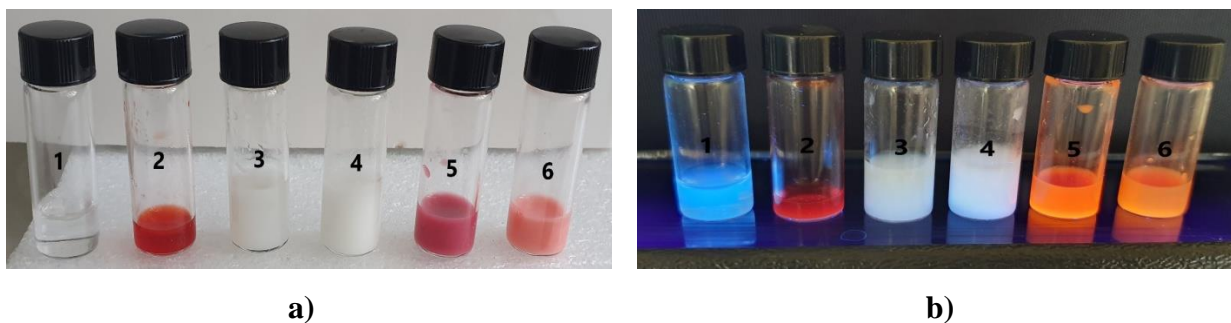


Figura 26. Fotografii ale 1) CDs-NHF; 2) DOX; 3) LPs; 4) LPs-CDs-NHF; 5) LPs-DOX și 6) LPs-CDs-NHF-DOX la a) lumina zilei și b) iluminare UV

Rezultatele obținute au condus la concluzia ca s-au preparat cu succes diferite formulări stabile de LPs încărcate cu diferite principii active prin metoda de evaporării în fază inversă. În urma rezultatelor diferitelor tipuri de caracterizări formulările de lipozomii optimi au fost selectați pentru evaluarea *in vitro* de către partenerul P2. Rezultatele *in vitro* obținute (activitatea 2.1, proiect component 1) au evidențiat faptul că sistemul LP-CDs-NHF posedă activități de modulare celulare complexe și interesante, relevante pentru controlul cancerului și, de asemenea, potențial pentru aplicarea clinică.

Proiect component: 3 (P3)

În cadrul celei de a doua etape a proiectului nr. 37 PCCDI/2018 – TERADOT, INCDFT-IFT Iași (P3) a fost implicat într-o serie de activități privind: (i) stabilirea unui protocol pentru obținerea de compozite pe bază de carbon dots (CDs) cu eficacitate maximă, (ii) evaluarea unor soluții tehnice de separare, selecție dimensională și obținere în stare uscată a CDs, (iii) evaluarea unor soluții tehnice privind dispersia primară a masei de reacție și a impactului asupra caracteristicilor fizico-chimice ale CDs, precum și (iv) testarea și validarea metodei de preparare și a soluțiilor tehnice alese pentru obținerea CDs imidici utilizabili ca platforme teranostice antitumorale.

Toate activitățile specifice etapei aferente anului 2019 au fost îndeplinite cu succes.

În cadrul proiectului component P2 s-a elaborat și testat un protocol de obținere a unui compozit magnetic pe bază de CDs, derivați din n-hidroxifitalimidă, și nanoparticule magnetice.

Protocolul permite obținerea cu randament de aproape 100% a unei nanostructuri de carbon magnetice.

În cadrul proiectului component P3 s-a dezvoltat o metodă de obținere în stare uscată a CDs printr-o metodă sol-gel modificată, având la bază protocolul realizat în cadrul P2, nanostructurile de carbon fiind rezultatul unui proces pirolitic inițiat la 250°C. CDs au fost testate pentru evaluarea acțiunii biologice antitumorale pe culturi celulare tumorale (osteosarcom uman) și celule normale (fibroblaști derivați din piele umană), rezultatele arătând că CDs derivați din n-hidroxifitalimidă au activitate antitumorală cu cel puțin un ordin de mărime mai crescut decât n-hidroxifitalimida nemodificată. În plus, structura carbonică a permis legarea eficientă pe suprafață a unui antitumoral de uz clinic, mitoxantrona, amplificându-se semnificativ acțiunea biologică antitumorală a acestuia. În final, a fost proiectată și realizată la scară micro-pilot o stație de autoclavare pentru sinteza CDs imidici la presiuni și temperaturi înalte.

Act 2.7 - Evaluarea unor soluții tehnice de dispersie primară a masei de reacție și a impactului asupra caracteristicilor fizico-chimice ale Carbon Dots imidici după finalizarea procesului pirolitic

Dispersia masei de reacție obținută în urma procesului de ardere violentă s-a realizat prin mojarare, urmată de ultrasonare. Însă ultrasonarea, alături de sterilizare, pot afecta diferite caracteristici fizico-chimice ale Carbon Dots precum sarcina electrică, dimensiunile și, implicit, stabilitatea coloidală a nanoparticulelor. Sterilizarea particulelor s-a realizat prin autoclavare la 120°C, 1,5 atm., timp de 20 min. Evaluarea potențialului zeta și a dimensiunilor s-a efectuat cu ajutorul unui analizor de mărime a particulelor Delsa™ Nano Zeta și a unui analizor al mărimii particulelor submicronice (Beckman Coulter).

Variațiile dimensiunii particulelor, potențialului zeta și a indicelui de polidispersitate a particulelor de carbon au fost evaluate înainte și, respectiv, după ultrasonare și sterilizare. Potențialul zeta a scăzut de la -18,8 la -20, diametrul hidrodinamic a scăzut de la 782 nm la 710 nm, în timp ce indicele de polidispersitate a scăzut de la 0,912 la 0,521 (variație de 57%). Prin urmare, în urma sterilizării și ultrasonării stabilitatea coloidală a fost ușor îmbunătățită, în special datorită scăderii aglomerării și creșterii ușoare a valorii absolute a potențialului zeta, ceea ce a dus în final la o legătură ionică îmbunătățită a medicamentului antitumoral (mitoxantrona) încărcat pozitiv. În etapa următoare a proiectului se va evalua și posibilitatea ca masa uscată de reacție să fie dispersată prin intermediul unei mori cu bile, procesul de măcinare urmând a fi optimizat în funcție de numărul de bile utilizate, timpul de măcinare, intensitatea măcinării.

Act. 2.8 - Investigarea unor soluții tehnice de separare, selecție dimensională și obținere în stare uscată a CDs

Deficiențele actuale în terapia cancerului necesită un efort concertat pentru obținerea de noi tratamente bazate pe nanostructuri inovatoare și eficiente din punct de vedere chimioterapeutic, cu caracteristici fizico-chimice și biologice îmbunătățite, cu focalizare specială pe capacitatea de dispersie în apă, gradul de permeabilitate prin membrana celulară, caracteristicile de biocompatibilitate și non-toxicitate. Aceste cerințe pot fi îndeplinite de așa numitele „Carbon dots” (CDs), nanostructuri fotoluminescente care pot fi folosite eficient în procesul de transport al medicamentului, pentru a îmbunătăți solubilitatea acestuia, dar și pentru a-i crește timpul de înjumătățire și acumularea în tumoră [7] Datorită funcționalizării versatile și a suprafeței ultra-crescute, heterostructurile pe bază de carbon și derivații acestora sunt transportori de medicamente foarte eficienți. Pe de altă parte, în ultimii 10-15 ani, nanoparticulele magnetice din oxizi de fier (IONPs) au atras, de asemenea, atenția pentru aplicațiile în domeniul medical. Prin urmare, combinația dintre nanostructurile de carbon de tip CDs și IONPs nu numai că împiedică oxidarea și aglomerarea nanoparticulelor de oxid de fier, dar oferă și posibilitatea funcționalizării ulterioare a C-dots precum și conferirea de proprietăți magnetice compozitului astfel format.

Obținerea în stare uscată a Carbon Dots. Protocol pentru obținerea compozitului cu eficacitate maximă

Heterostructura CDs/GQDs@Fe₂O₃ a fost sintetizată într-o singură etapă folosind o metodă sol-gel modificată, denumită metoda sol-gel cu auto-aprindere și răcire bruscă (SG-AARB). Noua metodă dezvoltată, care include o reacție de carbonizare și un proces de activare fizică, permite controlul mărimii particulelor și al chimiei suprafeței și, implicit (i) reglarea stabilității, (ii) conferirea de diferite funcționalități suprafeței, (iii) activarea unor mecanisme specifice care permit eliberarea medicamentului folosind inclusiv proprietățile magnetice ale oxidului de fier, nanocompozitul putând fi folosit fie în scop teranostic pentru imagistică (de exemplu, RMN), fie pentru tratamentul cancerului.

Pentru sinteza compozitului magnetic, cantitatea necesară de sare metalică (Fe(NO₃)₃ • 9H₂O) (Merck) a fost amestecată în proporții stoichiometrice cu o soluție de glicină (C₂H₅NO₂) (Merck) ca agent de combustibil, și o soluție de N-hidroxifitalimidă (NHPI) ca sursă de carbon, în raport molar 1:3:3. pH-ul soluției a fost ajustat alcalin pentru a evita precipitarea. Gelificarea s-a

produs după 2 ore de încălzire la 75°C sub agitare magnetică. Auto-aprinderea violentă cu flacără a gelului uscat a început la 250°C, după 3 h de tratament termic pe o baie de nisip. Paharul de reacție cu produsul arzând a fost supus unui proces de răcire prin accident, prin plasarea în apă rece (4°C). Răcirea bruscă a avut ca scop activarea nanostructurilor de carbon din heterostructură. Separarea și selecția dimensională a CDs/GQDs@Fe₂O₃ obținuți s-a realizat prin centrifugarea produsului pirolizat după mojarare și ultrasonare prealabilă, utilizând o centrifugă Sigma 1-14K. Ultrasonarea s-a realizat cu un omogenizator ultrasonic (Hielscher UP50H) la amplitudine de 90%.

Act. 2.9 - Testarea și validarea metodei de preparare și a soluțiilor tehnice alese pentru obținerea Carbon Dots imidici utilizabili ca platforme teranostice antitumorale

Testarea și validarea metodei de preparare a CDs cu proprietăți antitumorale s-a efectuat prin utilizarea unei linii celulare tumorale de osteosarcom uman și a unei linii de celule normale de fibroblaști umani. Influența particulelor de CDs asupra viabilității celulare a fost cuantificată prin testul MTT, ca expresie a activității dehidrogenazei mitocondriale. În Figura 27 sunt prezentate graficele de viabilitate ale celulelor tumorale și normale în funcție de concentrația CDs.

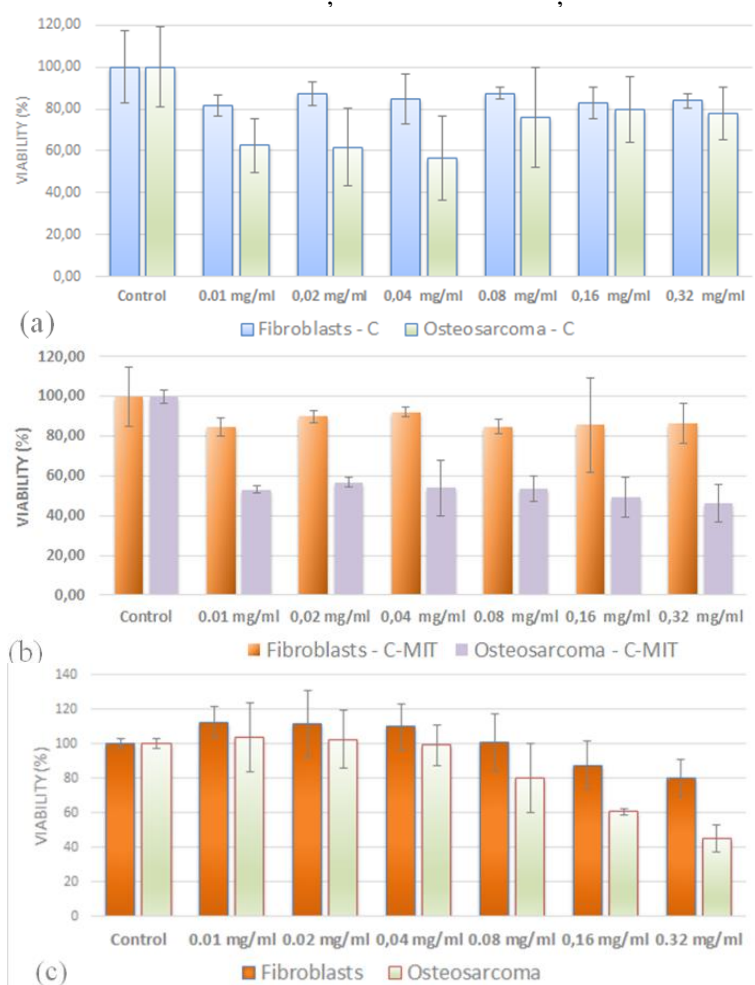


Figura 27. Viabilitatea celulelor tumorale și normale în funcție de concentrație, incubate cu: (a) particule de CDs derivate din n-hidroxiftalimidă; (b) particule de CDs derivate din n-hidroxiftalimidă acoperite de MIT; (c) n-hidroxiftalimidă pentru 24 de ore.

Fibroblast -C = fibroblaști incubati cu CDs; Fibroblaști-C-MIT = fibroblaști incubati cu CDs și mitoxantronă; Osteosarcoma-C = celule tumorale de osteosarcom incubate cu CDs; Osteosarcom-C-MIT = celule tumorale de osteosarcom incubate cu CDs și mitoxantronă.

La concentrații crescătoare de CDs, variind de la 0,01 mg/ml până la 0,32 mg/ml, după 24 de ore viabilitatea celulară a variat între 82% și 92% pentru fibroblaștii incubati cu CDs funcționalizați sau nu cu mitoxantronă (MIT). Dimpotrivă, celulele de osteosarcom au prezentat o scădere marcantă a

viabilității, în special pentru CDs funcționalizate cu MIT, până la 46%. Cu toate acestea, a fost interesant de observat că până și CDs fără MIT au reușit să afecteze puternic celulele tumorale, cu un efect toxic maxim la 0,04 mg/ml, când 44% din celulele de osteosarcom au fost afectate ireversibil.

Cu toate acestea, pentru concentrații mai mari, efectul a fost mai puțin intens, cel mai probabil datorită unei încărcări reduse a particulelor de carbon de către celule, dat fiind că la o concentrație mai mare particulele au tendința de ușoară aglomerare. Astfel de aglomerări ar fi avut nevoie probabil de mai mult de 24 h pentru a fi încărcate cu celule și să inducă apoptoza acestora. Pentru particulele acoperite cu MIT, efectul toxic celular a fost mai pronunțat, ceea ce a dus la moartea a 64% din celulele de osteosarcom pentru cea mai mare concentrație a particulelor, adică 0,32 mg/ml. Prin comparație, doar 15% din fibroblaști au fost afectați de particulele acoperite cu MIT (Figura 27b).

Efectul anti-tumoral al CDs derivați din n-hidroxitlimalimidă este cel mai probabil rezultatul efectelor anti-proliferative ale grupelor funcționale N-OH ale NHPI, care au rămas parțial stabile după arderea NHPI. Caracterizarea FT-IR, atât a particulelor de carbon derivate NHPI cât și a NHPI, a confirmat această presupunere. Pe de altă parte, întrucât CDs conțin părți hidrofobe rezultate în urma arderii glicinei-NHPI, proprietățile lipofile dobândite accelerează procesul de captare a acestora de către celule, așa cum s-a raportat anterior pentru NHPI modificată cu radicali lipofili [8]. Practic, arderea glicinei-NHPI a dus la derivați de NHPI, unii dintre ei având efect anti-tumoral, așa cum a fost subliniat de Melone *și colab.* [8].

Pentru a compara efectul antitumoral al CDs derivați din NHPI cu efectul indus de NHPI nemodificată, a fost efectuată o evaluare comparativă a citotoxicității. Testele au confirmat rezultatele obținute de Melone *și colab.* [8] referitor la efectul antitumoral al NHPI asupra celulelor de osteosarcom numai în doze mari. În cadrul studiului nostru, s-au obținut scăderi de viabilitate identice cu cele obținute de Melone, însă la concentrații mai mici de NHPI, deoarece am folosit o densitate mai mică de celule de osteosarcom, adică 10^4 pe godeu, în experimentul nostru, față de $1,5 \times 10^4$ în experimentul lui Melone. La cea mai mică concentrație, adică 0,01 mg/ml, NHPI nu are efect citotoxic asupra celulelor de osteosarcom (Figura 27c). Cu toate acestea, pentru aceeași concentrație, în prezența particulelor de carbon sau a particulelor acoperite cu MIT, celulele tumorale au murit în proporție de 37% (față de 18% celule normale) sau respectiv 47% (vs. 16% celule normale). Aceasta este o indicație clară că particulele de carbon în sine sunt selectiv toxice, cu un impact mai mare asupra celulelor de osteosarcom, datorită lipofilității crescute și a grupărilor active N-OH rămase. Mitoxantrona a sporit efectul anti-tumoral cu aproximativ 10%.

Efectul antitumoral intrinsec al CDs sintetizați poate fi cauzat de creșterea speciilor reactive de oxigen, urmată de depleția glutatationului intracelular care duce la apoptoza celulară prin activarea caspazei, după cum Melone *și colab.* au subliniat pentru derivații de NHPI modificați chimic cu grupări lipofile [8]. Cu toate acestea, modificările chimice asupra NHPI realizate de Melone *și colab.* pentru a crește capacitatea moleculelor de NHPI de a fi mai ușor preluate de celule, au la baza un proces chimic complex și nu foarte accesibil. În cadrul proiectului, **am dezvoltat o metodă nouă, mai convenabilă și mai avantajoasă pentru a amplifica proprietățile anti-tumorale ale NHPI prin utilizarea de NHPI ca precursor de CDs, glicină ca inițiator de ardere și azotat de fier ca precursor pentru nanoparticule magnetice dispersate în structura carbonică.**

Importanța metodei dezvoltate constă în potențialul său de a fi utilizată în producerea de compuși pentru aplicații teranostice, datorită (i) efectului anti-tumoral al CDs conjugat cu capacitatea relativ crescută de încărcare a acestora cu medicamente antitumorale, cât și (ii) capacității de a îmbunătăți contrastul imaginii de rezonanță magnetică nucleară (RMN) prin intermediul nanoparticulele magnetice încorporate. Mai mult, heterostructura sintetizată ar putea îmbunătăți puternic efectul anti-proliferativ terapeutic împotriva celulelor tumorale dacă este corelat cu tratamentele de hipertermie magnetică. De asemenea, procesul de ardere elimină necesitatea sterilizării separate a compusului.

În concluzie, compozitul de carbon derivat din NHPI, ale cărui proprietăți sunt puternic dependente de regimul de temperatură, poate îndeplini cele mai bune condiții de activitate selectivă

împotriva celulelor tumorale comparativ cu cele normale în termeni de citotoxicitate, fie prin conjugarea suplimentară cu medicamente anti-tumorale, fie ca atare, neconjugat.

Procedeu de obținere la scară pilot a CDs și dispozitiv de producere a acestora

Date fiind unele limitări ale metodei de obținere în stare uscată a CDs prin metode de combustie/pirolitice, incluzând întregul lanț de operații prin care CDs uscați sunt dispersați în medii apoase, selecționați în funcție de mărime prin metode de ultracentrifugare (rezultatul fiind că doar o fracție redusă de CDs poate fi colectată în domeniul nanometric) și redispersați în mediile de cultură celulare, în cadrul proiectului s-a dezvoltat și un procedeu de obținere a CDs prin metode hidrotermale la presiuni și temperaturi înalte (250-300°C), prin care CDs au fost obținuți dispersați direct în mediul apos, reducându-se considerabil aglomerarea acestora în timpul procesului de formare. Metoda are avantajul unui randament crescut, este simplă, controlabilă în funcție de temperatură, ușor de utilizat de orice operator/tehnician, putând fi utilizată cu succes la scară micro-pilot.

Proiectarea, realizarea și testarea unui dispozitiv pentru prepararea hidrotermală a CDs

Pentru sinteza hidrotermală, în cadrul INCDFE-IFT Iași a fost proiectat și realizat un autoclav, care permite sinteza CDs într-un regim de temperaturi cuprins între 180°C și 320°C, în condiții de presiune de maxim 3 kbar, ținând cont de diagrama presiune-temperatura și de gradul de umplere a autoclavului (Figura 28).

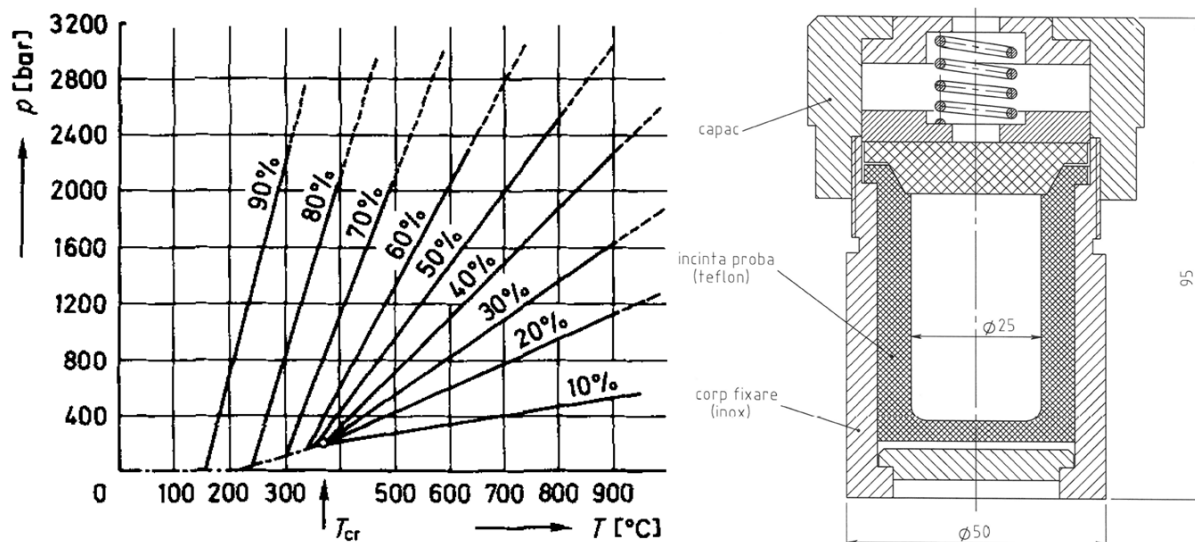


Figura 28. (a) Diagrama presiune-temperatură pentru apa pură, în funcție de gradul de umplere al autoclavului [3]. Factorul de umplere este de obicei între 50 și 80% și presiunea între 200 și 3000 bar. Linia punctată reprezintă linia de echilibru a vaporilor și lichidului, T_{cr} fiind temperatura critică; (b) Schema de ansamblu a autoclavului realizat la INCDFE-IFT Iași.

Pentru sinteza hidrotermală, diagrama presiune-temperatură a apei [9] devine foarte importantă. Presiunea rezultată în timpul procesului hidrotermal este determinată de gradul de umplere a autoclavului. La un grad de umplere de peste 32%, meniscul fluid-gaz este curbat în sus, iar vasul de reacție este complet umplut cu lichid atunci când temperatura se menține sub cea critică de 374°C (în cazul apei pure). De exemplu, acest lucru se întâmplă la un grad de umplere de 80% a autoclavului la 245°C [9].

Pentru realizarea autoclavului (Figura 29), s-a utilizat oțel inoxidabil. Cuvă în care are loc procesul de preparare hidrotermală a CDs a fost realizată din teflon (punct de topire 327°C), având un volum util de 17 ml. Autoclavul este prevăzut și cu un arc de presiune, însă, pentru regimul de temperatura utilizat autoclavul poate fi utilizat în siguranță și fără arc.

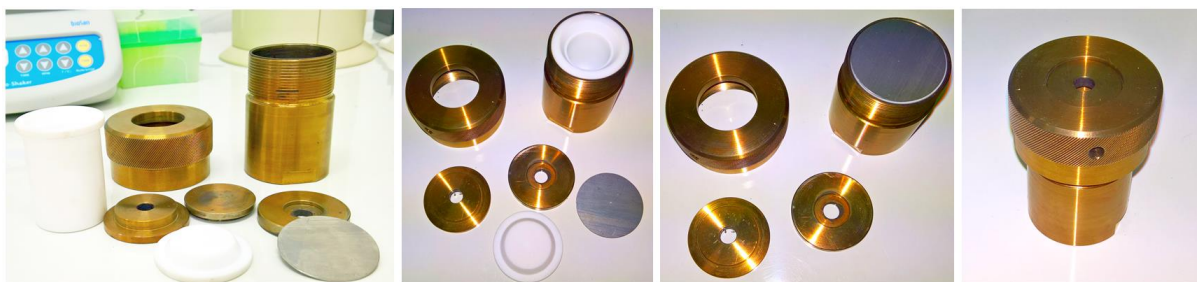


Figura 29. Autoclav realizat la INCDFT-IFT Iasi. Imaginile prezintă componentele dispozitivului și pașii (de la stânga la dreapta) de asamblare a acestuia. Imaginile au fost realizate după prepararea hidrotermală a CDs, culoarea metalului schimbându-se în galben-brun în urma tratamentelor termice aplicate.

Pentru prepararea CDs prin aceasta metodă, s-a utilizat o concentrație de NHPI de 10 mg/ml, gradul de umplere al cuvei de teflon fiind de 15%. Mediul de dispersie al NHPI a fost apa deionizată. Suspensiunile au fost supuse tratamentului hidrotermal la temperaturi de 200°C, 250°C, 280°C și 300°C, timp de 17 ore. După tratament, s-a observat că, la temperaturi mai mari de 250°C, o fracție importantă din NHPI s-a depus pe pereții cuvei de teflon, aceasta fiind o indicație a faptului ca mediul de dispersie s-a transformat integral în stare de vapori (conform diagramei din Figura 30), iar CDs formați au aderat la pereții cuvei. După ultrasonare, CDs au fost redispersați în apa deionizată, iar proprietățile lor de fluorescență au fost evaluate cu ajutorul unui spectrofluorometru Horiba Fluoromax 4P.

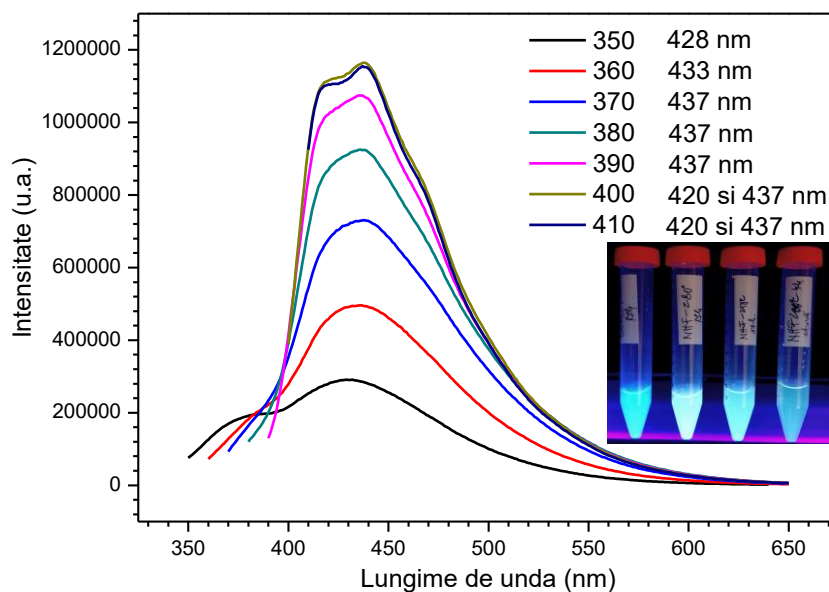


Figura 30. Spectre de emisie înregistrate în domeniul de excitație 320-420 nm pentru CDs dispersate în apă deionizată. Inset: CDs sub excitație ultravioletă.

În Figura 30 sunt prezentate spectrele de emisie înregistrate în intervalul de excitație de 320÷420 nm (pas de 10 nm) pentru proba obținută la 300°C (cu fluorescența cea mai ridicată – prima probă din stânga în inset-ul Figurii 30). CDs prezintă o emisie dependentă de excitația caracteristică. După cum se poate remarca, vârfurile de emisie se schimbă de la 428 la 437 nm în intervalul de excitație 350-420 nm. Intensitatea maximă de emisie este atinsă la 400 nm excitație, vârful de emisie fiind situat la 437 nm în regiunea albastră a spectrului vizibil. Prin urmare, pentru un tratament hidrotermal efectuat 17 ore la 300°C, am obținut CDs cu cea mai ridicată fluorescență.

Concluzii

Toți partenerii au realizat cu succes toate activitățile în care au fost implicați în cadrul acestei etape a proiectului. Activitățile desfășurate au condus la :

Rezultatele experimentale cu privire la evaluarea *in vitro* pe liniile celulare selectate a platformelor teranostice pe bază de Carbon Dots imidici au evidențiat faptul că liniile de celule canceroase mamare și pulmonare utilizate au un nivel ridicat de pERK1/2, iar prin aplicarea unui tratament cu CD-NHF a redus semnificativ expresia pERK. Important de menționat este faptul că, lipozomii încărcăți CD-NHF administrați concomitent cu doxorubicina solubilă au redus și mai mult expresia de pERK1/2.

Rezultatele investigației *in vivo* a activității antitumorale a formulărilor pe bază de Carbon Dots pe model animal cu tumori induse au demonstrat că prezența CD-NHF diminuează progresia cancerului mamar și metastazarea. Rezultatele obținute demonstrează că nanostructura testată (CD-NHF) poate interacționa în diferite scenarii moleculare cu diverse molecule cheie esențiale în reducerea fenomenelor de invazivitate și metastazare. Datele experimentale obținute în această etapă se regasesc în **manuscrisul** „*NHF-derived Carbon Dots – Prevalidation Approach in Breast Cancer Treatment*” *submis la revista „Cancer Research and Treatment” având „Manuscript ID : 19970”*

CO coordonator și partener P1 au realizat studii preliminare cu privire la obținerea de noi biocompozite sub formă de nanocapsule pe bază de PCL, LDHs, respectiv lipozomi în care au fost încorporați Carbon Dots imidici de tipul NHF. Precursorii NHF, PCL, Fosfolipon 90G, LDHs și biocompozitele au fost caracterizate prin XRD, FTIR, TEM și DLS. Toate aceste tehnici au demonstrat formarea compușilor de tip nanocapsule, LDH și lipozomi, cu dimensiuni variabile între 20 și 1000 nm. De asemenea, în urma rezultatelor diferitelor tipuri de caracterizări formulările de lipozomii optimi au fost selectați pentru evaluarea *in vitro* de către partenerul P2.

CO și P3 au realizat cu succes stabilirea unui protocol pentru obținerea de compozite magnetice pe bază de carbon dots (CDs), cu eficacitate maximă.

Astfel, protocolul a permis obținerea CDs cu un randament de aproape 100% printr-o metodă foarte flexibilă, susceptibilă la modificări în ceea ce privește : (i) compoziția finală a produsului prin arderea simultană a diferitelor cocktail-uri de medicamente antitumorale, (ii) magnetizația de saturație a compusului final prin utilizarea de nanoparticule magnetice cu magnetizație de saturație mare, (c) dimensiunea nanocompozitului printr-un proces optimizat de măcinare în moara cu bile, etc.

Stabilirea unor soluții tehnice de separare, selecție dimensională și obținere în stare uscată de CDs. S-a observat că centrifugarea este cea mai potrivita metodă de separare și selecție dimensională, iar prin utilizarea unei noi metode sol-gel modificată, denumită metoda sol-gel cu autoaprindere și răcire bruscă, CDs au fost sintetizați în stare uscată într-o singură etapă.

Stabilirea unor soluții tehnice privind dispersia primară a masei de reacție și a impactului asupra caracteristicilor fizico-chimice ale CDs.

Rezultatele au arătat că prin mojarare și ultrasonare, masa de reacție poate fi dispersată cu succes, urmând ca în etapa următoare a proiectului să se evalueze și posibilitatea ca masa uscată de reacție să fie dispersată prin intermediul unei mori cu bile, procesul de măcinare urmând a fi optimizat în funcție de numărul de bile utilizate, timpul de măcinare, intensitatea măcinării, etc. De asemenea, în urma dispersiei, sterilizării și ultrasonării masei de reacție, caracteristicile fizico-chimice ale CDs au fost ușor îmbunătățite în ceea ce privește potențialul zeta, dimensiunile și indicele de polidispersitate.

Proiectarea, realizarea și testarea unui dispozitiv/stații pentru prepararea hidrotermală a CDs imidici fluorescenți, utilizabili ca și platforme teranostice antitumorale.

Astfel, s-a proiectat și realizat un autoclav care a permis sinteza CDs într-un regim de temperaturi cuprins între 180°C și 320°C, în condiții de presiune de maxim 3 kbar. CDs obținuți au fost testați din punct de vedere al proprietăților de fluorescență de către coordonatorul proiectului. Cele mai bune caracteristici s-au obținut pentru CDs sintetizați la 300°C.

Bibliografie

- [1] Khoobdel M; Ahsaei, S M; Farzaneh, M. Entomological research 2017 v.47 no.3 pp. 175-184.
- [2] V. Rives et al., Applied Clay Science, 88–89:239-269, 2014; X. Mei et al., Nano Res., 11: 195-205, 2018; Y. Li et al., J. Mater. Chem. B, 7:5583-5601, 2019
- [3] F.Cavani et al., Catalysis Today 11, 2:173-301, 1991
- [4] C.R. Gardner, Biomaterials 6:153, 1985
- [5] V. Ambrogi et al., J Pharm Sci., 92(7):1407-18, 2003
- [6] J.H. Choy et al., Biomaterials, 25(15):3059-64, 2004
- [7] S. Li, L. Wang, C.C. Chusuei et al., Chemistry of Materials 2015, 27, 1764-1771.
- [8] L. Melone, P. Tarsini, G. Candiani and C. Punta, RSC Adv. 2016, 6, 21749.
- [9] A. Rabenau, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 1985, 24, 1026-1040.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obținute în cadrul Etapei II a proiectului au fost valorificate prin redactarea și trimiterea spre publicare a 5 lucrări, înregistrarea la O.S.I.M. a două propuneri de brevet de invenție, respectiv prezentarea unor comunicări la manifestări științifice.

Lucrări ISI publicate sau acceptate pentru publicare:

1. Corneliu S. Stan, Adina Coroaba, Laura Ursu, Marius S. Secula, Bogdan Simionescu, *Fe(III) doped Carbon Dots with intense green photoluminescence and dispersion medium dependent emission*, **Nature-Scientific Reports**, accepted, in press, dec. 2019.
2. Sorin Alexandru Ibănescu, Maricel Danu, Bogdana Simionescu, Constanța Ibănescu, *Dynamic rheological behavior of chitosan/collagen mixtures*, **Revista de Chimie**, 2019

Lucrări ISI trimise spre publicare:

1. Adrian Borhan, Dumitru Daniel Herea, Daniel Gherca, Cristina Stavila, Anca Emanuela Minuti, Marian Grigoras, Camelia Mihaela Danceanu, Luminita Labusca, George Stoian, Gabriel Ababei, *Cornel Stan, Nicoleta Lupu, Horia Chiriac, Sol-gel synthesis of magnetic carbon composite with antitumor properties*, **Angewandte Chemie**, 2019.
2. Crina E. Tiron, Gabriel Luta, Mihail Butura, Florin Zugun-Eloae, Corneliu S. Stan, Adina Coroaba, Elena L. Ursu, Gabriela D. Stanciu, Adrian Tiron, *NHF-derived Carbon Dots – Prevalidation Approach in Breast Cancer Treatment*, **Cancer Research and Treatment** Manuscript ID: 19970, 2019.
3. Maricel Danu, Angela Danila; Sorin-Alexandru Ibanescu; Carmen Zaharia; Emil Ioan Muresan; Alina Popescu; Vlad Rotaru, *Stability study and rheological behavior of oil/water lavender emulsions with potential application in skin care products*, **Industrial Crops and Products**

Propuneri brevet invenție înregistrate O.S.I.M.

1. **A00747/15.11.2019.** Corneliu S. Stan, Marius Secula, Adina Coroaba, Bogdan Simionescu, Aerogel Fotoluminescent Higrosensibil pe Baza de Nanostructuri de Carbon
2. **A00751/15.11.2019.** Corneliu S. Stan, Marius Secula, Bogdan Simionescu, Hidrogel Fluorescent pe Baza de Nanostructuri de Carbon pentru Protectia la Radiatii UV Solare

Postere

The 2nd International Conference on Composite Materials Science and Technology (ICCMST 2019)

1. *Photoemissive Cryogels with Tunable Porosity Obtained Through Embedding Carbon Dots in Poly(2-hydroxyethylmethacrylate)*. **Autori:** Cornel S. Stan, Iolanda Fustes-Damoc, Constanta Ibanescu, Bogdan C. Simionescu
2. *Photonic Conversion Mediums Based on Imide Derived Carbon Dots in Polymer Matrices*. **Autori:** Iolanda Fustes-Damoc, Corneliu S. Stan, Bogdan C. Simionescu
3. *Carbon dots in Liposomes New Approach in Cancer Therapy*. **Autori:** Corina L. Savin, Corneliu S. Stan, Crina E. Tiron, Dumitru-Daniel Herea, Bogdan C. Simionescu, Cătălina A. Peptu
4. *Carbon Dots Embedded in A Carbomer Gel: A Novel Composite with Antitumoral Activity*. **Autori:** Corina Lenuta Savin, Catalina Anisoara Peptu, Corneliu Sergiu Stan, Constanta - Ibanescu, Bogdan - Simionescu, Crina Elena Tiron

Conferința Internațională Anuală a Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară (25-27 Septembrie Iași 2019)

1. *Imide derived Carbon Dots – a new Promising Approach in Cancer Treatment*. **Autori:** Gabriel Luta, Crina Tiron, Corneliu S. Stan, Adrian Tiron, Catalina A. Peptu, Florin E. Zugun, Bogdan C. Simionescu. **Acest poster a obținut diploma pentru cel mai bun poster.**
2. *Entrapment of N-Hydroxyphthalimide Carbon Dots in Different Topical Gel Formulations: New Composites with Anticancer Activity*. **Autori:** Mihail Butura, Corina-Lenuta Savin, Crina Tiron, Eugen Carasevici, Corneliu S. Stan, Sorin Alexandru Ibanescu, Bogdan C. Simionescu, Adrian Tiron, Catalina A. Peptu

Conferința Internațională CONFER, organizată de Institutul Regional de Oncologie Iași desfășurată la Iași în perioada 21-23 Noiembrie 2019

1. *Carbon Dots derivati din N-hidroxifalimida – studiu preclinic in cancerul mamar*. **Autori:** Gabriel Luta, Mihail Butura, Adrian Tiron, Florin E. Zugun, Corneliu S. Stan, Crina E. Tiron (22.11.2019 Sesiune postere 1, Nr.21)
2. *Îmbunătățirea efectului antitumoral al nanostructurilor de carbon NHF (CD-NHF) încărcate în lipozomi*. **Autori:** Mihail Butura, Catalina A. Peptu, Corina Savin, Corneliu S. Stan, Adrian Tiron, Florin E. Zugun, Crina E. Tiron (22.11.2019 Sesiune postere 1, Nr. 5).

Prezentarea valorificării/ îmbunătățirii competențelor/ resurselor existente la nivelul consorțiului (cecuri)

Partenerii P1, P2 și P3 au avut prevăzute sume pentru valorificarea competențelor în domeniul lor de competență. În acest sens, sumele au fost utilizate prin cecuri de tip A1, ținând cont de faptul că toate instituțiile din consorțiu sunt din Iași. Au fost astfel realizate o serie de analize în conformitate cu obiectivele proiectului și cu contractele încheiate între instituțiile implicate.