Universitatea Babes Bolyai, Cluj Napoca
Facultatea de Chimie si Ingineri Chimica

Sinteza si caracterizarea nanosistemelor multifunctionale cu aur pentru aplicatii in medicina

Conducator Stiintific
Porf.Dr Mircea Diudea

Doctorand:
Anamaria Ioana Orza

2011

Studiu de literatura

Introducere 3
Bazele teoretice alepreparării nanomaterialelor.....7
I.1 Nucleatia.....9
I.1.1 Cinetica nucleatiei.....10
I.1.2 Factori care influenteaza nucleatia.....13
I.2 Echilibru de formarea a germenilor, Raza critica.....17
I.3 Viteza de crestere a germenilor.....19
I.4 Stabilitatea sistemelor coloidale.....21
I.4.1 Forte de adeziune.....22
I.4.2 Stabilitate electrostatica.....25
I.4.3 Teoria DVLO.....27
I.4.4 Influenţa macromoleculelor asupra stabilitatii.....29
I.5 Adsorbtia.....30
I.5.1 Capacitatea de adsorbtie.....32
I.5.2 Factori care influenteaza adsorbtia.....33
II. Sinteza Nanoparticulelor de aur.....35
Introducere.....35
II.1 Teoria reducerii metalelor in solutie.....37
II.2 Reducerea in mediu apos si emulsie.....39
II.3 Factorii care influenteaza marimea particulelor.....40
III.Funcţionalizarea sistemelor coloidale.....46
III.1 Funcţionalizarea directa.....47
III.2 Modificarea ligandului existent pe suprafata prin reactii de cuplare.....48
III.3 Inlocuirea liganzilor existenti cu liganzi ce contin grupe functionale.....49
III.3.1 Factori care influenteaza schimbul de ligand.....51
III.3.2 Funcţionalizarea nanoparticulelor cu biomolecule.....52
IV. Purificarea nanoparticulelor functionalizate.....58
V. Proprietatile si aplicatiile nanoparticulelor de aur.....61
V.1 Capacitatea de adsorbtie a plasmonilor.....62
V.1.1 Aplicatii datorate capacitatii de adsorbtie.....64
V.2 Reflexia luminii determinate de plasmoni.....65
V.2.1 Aplicatii datorate proprietatii de reflexie.....66
V.3 Proprietati catalitice si aplicatii.....66
VI. Tehnici de caracterizare a sistemelor coloidale.....68
VI.1 Metode spectroscopice.....68
VI.1.1 Spectroscopie IR si FTIR.....68
V.I.1.2 Spectroscopie UV-VIS.....69
VI.2 Metode Microscopice.....71
VI.2.1 Microscopie TEM si SEM.....71
VI.2.2 Microscopie AFM…….....72
Concluzii 75

Contributii Originale

I. Funcţionalizarea Nanoparticulelor de aur.....78
I.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu Aminoacizi.....83
I.1.1 Influenta pH-ului şi concentraţ iei aminoacizilor asupra funcţ ionalizarii nanoparticulelor de aur.....83
I.1.1.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu glicina.....87
I.1.1.2 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu alanina.....91
I.1.1.3 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu lizină.....94
I.1.1.4 Funcţ ionalizarea nanoparticulelor de aur cu cisteina.....97
I.1.1.5 Funcţ ionalizarea nanoparticulelor de aur cu metionina..... 100
I.1.2 Nanostructuri uni-dimensionale pe bază de Nanoparticule Aur-Aminoacid.....103
I.1.2.1 Prepararea şi caracterizarea nanostructurilor 1D lizină/histidina-GNP.....103
I.1.2.2 Prepararea şi caracterizarea nanostructurilor 1D Aspartat-GNP…….....106
I.1.3 Nanostructuri bi-dimensionale pe bază de Nanoparticule de Aur-Aminoacid.....110
I.1.3.1 Prepararea nanostructurilor 2D……...111
I.1.3.2 Caracterizarea nanostructurilor 2D.....112
I.1.3.2.1 Caracterizarea morfologica şi optică a nanostructurilor 2 D……..112
I.1.3.2.2 Caracterizarea electrică a nanostructurilor 2D…….....116
Concluzii……..……118
I.2 Funcţionalizarea Nanoparticulelor de aur cu protein…….....121
I.2.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu proteine serice (BSA,HSA)……...124
I.2.1.1 Influenta concentraţ iei BSA şi a electrolitului asupra interacţ iunii cu GNP……. ……123
I.2.1.2 Influenţ a pH-ului asupra interacţ iunii GNP-HSA……..131
I.2.2 Funcţ ionalizarea nanoparticulelor de aur cu colagen…….135
I.2.2.1 Influenţa pH-ului şi agentului reducător asupra funcţ ionalizarii colagenului.....136
I.2.2.2 Caracterizarea fizico-chimică a fibrelor de colagen functionalizate.....141
I.2.3 Aplicaţ iile nanoparticule de aur functionalizate cu collagen….....146
Concluzii.....167
I.3 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur prin schimb de liganzi……...172

I.3.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu PEG-OH……..172
I.3.1.1. Prepararea nanoparticulelor de aur……172
I.3.1.2. Schimbul de liganzi……...174
I.3.2. Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu PEG-COOH……177
I.3.3 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu fosfine.....178
Concluzii.....180
I.4 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu medicamente…….....181
I.4.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu temozolomide……182
I.4.2. Funcţ ionalizarea nanoparticulelor de aur cu cisplatin, doxorubicina si capecitabine……191
I.4.3 Aplicaţ ii ale nanoparticulelor de aur funcţ ionalizate cu cisplatin, capecitabine şi doxorubicina în terapia cancerului.....199
I.4.4 Aplicaţ ii ale nanoparticulelor de aur funcţ ionalizate cu temodal în terapia cancerului de glinoame…….....212
Concluzii.....219
II. Distrugerea controlată a structurilor subcelulare în terapia cancerului…….....221
II.1 Distrugerea controlată a structurilor subcelulare cu nanoparticule de aur activate cu laser…….....223
II.1.1 Influenţ a concentraţ iei si puterii laserului nanoparticulelor de aur asupra mortalitatii celulare.....230
II.1.2 Influenţ a timpului de expunere la iradiere…….....234
Concluzii.....242
Bibliografie……..245
Anexe.....273
Lista lucrarilor publicate.....299

Abstract

In cadrul tezei de doctorat sunt prezentate principale aspecte teoretice si contributiile personale referitoare la prepararea sistemelor de aur coloidal , functionalizarea acestuia cu diferite molecule in vederea utilizarii in scopuri biomedicale.

Partea teoretica abordeaza principalele aspecte ale nucleatiei, cresterii germenilor, stabilitatea si purificarea acestora. Contributiile personale contin elemente referitoare la functionalizarea GNP cu aminoacizi, proteine si medicamente. Functionalizarea a fost demonstrata prin analize specifice: TEM, AFM, FTIR, XPS, UV-VIS. Nanostructurile preparate au fost folosite ca vectori in tratamentul cancerului hepatic si de glinoame precum si in diferentierea celulara. Rezultatele obtinute prefigureaza noi cai de tratament a cancerului si procedee avansate de diferentiere celulara.

The main topic of the thesis describes the preparation of colloidal gold systems and their functionalization with different molecules for biomedical purposes.

In the theoretical part are summarized the main aspects of nucleation, growth, stability and purifications. The Personal contributions contain elements related to GNP functionalization with amino acids, proteins and drugs. Functionalization was demonstrated by specific analysis such as: TEM, AFM, FTIR, XPS, UV-VIS. The prepared aminoacids based-nanostructures were used as vectors to treat liver cancer and glioblastoma multiform tumor. The protein based-nanostructure were used to prepare nanosubstrate that sustain cell differentiation into neuronal and cardiac lines. The results obtained offer a new chemotherapy strategy for patients diagnosed with unresectable recurrent malignant gliomas and hepatocarcenoma and advanced cellular differentiation processes.

Introducere

Unul dintre domeniile care au revoluţionat dezvoltarea ştiinţifică şi tehnică în ultimul timp îl reprezintă nanotehnologia. La scara nano materialele au cu totul alte proprietăţi decât cele la scara macro, iar secretul obţinerii de astfel de materiale constă în stăpânirea modului de asamblare a nanoclusterilor, ceea ce le ofera proprietăţi electronice, structurale şi chimice caracteristice.

Nanomaterialele (particulele cu diametru între 1-100 nm) pot fi formate din orice substanţa incluzând metale[1-2], semiconductori[3-4], oxizi metalici (pigmenţi metalici), polimeri organici. [5-9]

Dezvoltarea nanomaterialelor a a permis aparitia în domeniul biomedical a unor noi metode de sesizare şi diagnosticare rapidă a diferitor maladii, noi metode de tratament, precum şi a unor noi materiale cu proprietăţi curative superioare.

Un alt domeniu în care nanomaterialele s-au impus şi au revoluţionat este cel al electronicii şi electrotehnicii. În acest sens pot fi amintite nanotuburile de carbon care datorită proprietăţilor deosebite (conductibilitate electrică şi termică mare, rezistenta mecanică şi chimică înalta) au dus la dezvoltarea de noi aplicaţii: conductorii electrici[10], materiale plastice cu conductivitate electrică ridicată[11], combustibili şi electrozi pentru celule electrice[12]. Astfel după datele institutului NIST[13] peste 60% din cantitatea de nanomateriale pe bază de carbon sunt utilizate ca suport de catalizatori în industria chimică.

Coloizii de aur constituie unul dintre cele mai vechi subiecte ştiinţifice studiate. Aurul a fost folosit încă din antichitate în estetică şi în scopuri curative. În secolul al 17-lea aurul a fost utilizat în colorarea sticlei şi ceramicii, aplicaţii similare continuând până în prezent[22]. În 1600 Paracelsus publică prepararea primului coloid de

aur ’’aurum potable, oleum auri; quinta essentia auri’’ prin condensarea clorurii aurice ($AuCl_3$) într-un extract alcoolic din plante[23], acesta fiind considerat primul medicament sintetic. Printre primele aplicaţii medicale a coloizilor de aur în diagnosticare amintim utilizarea lor în diagnosticarea sifilisului, dar fără rezultate semnificative. Mai mult, efectele sale curative au fost contestate, afirmându-se ca tinctura aurică este lipsită de orice valoare medicală sau terapeutică.

Apariţia nanomaterialelor a deschis noi căi de cercetare ştiinţifică (fundamentală/aplicativa) în domeniul biomedical cum ar fi: măsurarea concentraţiilor mici de bacterii, imagistica cu ajutorul rezonantei magnetice[17], descoperirea de noi vectori medicamentoşi[18], detecţia de anumite proteine[19], separare şi purificare de celule şi molecule[20]. Nanoparticulele de aur sunt intens utilizate în confecţionarea de biosenzori cu o specificitate foarte mare.

În lucrarea de faţă mi-am propus cercetarea şi dezvoltarea unor aspecte importante, teoretice şi practice, care apar la aplicarea în scopuri biomedicale a nanostructurilor pe bază de aur coloidal, conţinutul tezei fiind structurat în două părţi distincte.

O parte teoretică, pe baza literaturii de specialitate, în care sunt abordate aspecte prind fenomenologia sistemelor coloidale, prepararea şi proprietăţile acestora. În partea două sunt prezentate contribuţiile persona;le referitoare la prepararea nanoparticulelor de aur, functionalizarea lor cu diferite biomolecule precum şi aplicaţiile biomedicale ale acestora.

Teza a fost structurata pe VI capitole teoretice si II capitolele practice continanad contributiile originale.Rezultatele stiintifice s-au concretizat in ...pagini ale tezei care contine ***81*** figuri, ***18*** tabele, si ***239*** referinte bibliografice din care ***2*** sunt referinte bibliografice personale.

Mentionez ca in cadrul rezumatului sunt mentinute atat numerotarea capitolele cat si trimiterile bibliografice asa dupa sunt prezentate in teza.

CONTRIBUŢII ORIGINALE

I. Functionalizarea Nanoparticulelor de aur

Cercetarile experimentale interprinse in cadrul tezei a avut ca obiectiv prepararea de sisteme coloidale pe baza de aur care prin functionalizare cu diferite molecule activ biologice (aminoacizi, proteine, medicamente) sa conduca la nanostructuri cu aplicabilitate in domeniul biomedicale. Am urmarit obtinerea de nanostructuri in vederea aplicarii lor in calitate, vectori de transport al medicamentelor, nanosuporturi in realizarea biosenzori si a diferentierii celulare.

I.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu aminoacizi

În cadrul acestui capitol am abordat functionalizarea nanoparticulelor de aur cu aminoacizi în calitate de liganzi precum şi modul în care principalii factori (pH, concentraţia) influenţează tăria legăturii ligand-nanoparticulă.

I.1.1 Influenta pH-ului şi concentraţiei aminoacizilor asupra funcţionalizarii nanoparticulelor de aur

Dintre aminoacizii esenţiali si neesentiali, în cadrul lucrării de fata s-au ales pentru studiu glicina, alanina, cisteina, metionina şi lizina. Această alegere s-a efectuat în funcţie de numărul de grupări $–NH_2$, -SH şi de lungimea lanţului hidrocarbonat.

Modificările care au loc asupra cuplării aminoacid-GNP au fost urmărite experimental prin spectroscopie UV-VIS, folosind un spectrometru JASCO V-570. S-a măsurat absorbanţa la diferite valori ale pH–ului şi diferite concentraţii ale ligandului.

Mod de lucru:

C***aracterizarea nanoparticulelor de aur***

Mărimea particulelor a fost evaluată folosind Microscopia Electronică de Transmisie (TEM), şi arată un diametru mediu de 32 nm. (***Fig. 2***)

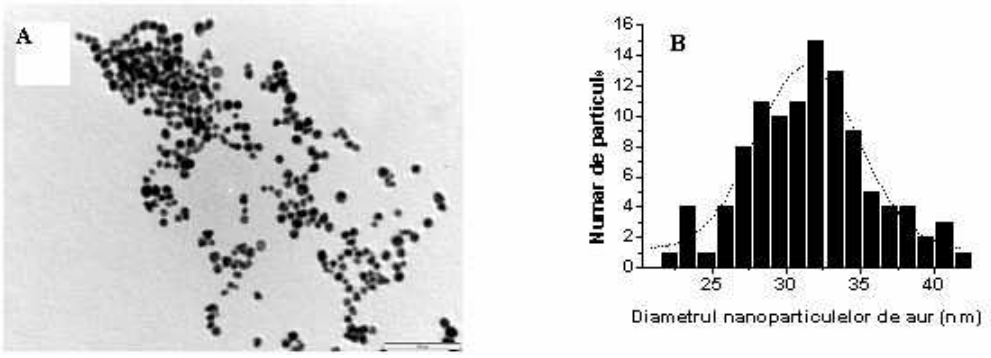


Fig.2*. Imaginea TEM a nanoparticulelor de aur de 32 nm (**A**) impreuna cu histograma distributiei lor (**B**), scala de 200 nm (peste 100 de nanoparticule au fost analizate)*

Influenta concentratiei si pH-ului asupra functionalizariiGNP cu aminoacizieste prezentata in tabelele 1-5

Tab.1- Valorile absorbanţ ei Gly/GNP pentru diferite pH-uri în funcţ ie de concentraţ ie

pH-2		pH-4		pH-6		pH-8	
Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)	Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)	Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)	Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)
0,29	0,2,	0,336	0,6	0,32	0,3	0,644	0,3
0,238	0.7	0,317	2,6	0,3	1,3	0,601	1,2
0,173	1,7	0,28	7,6	0,262	3,3	0,516	2,1
0,133	2,7	0,242	12,6	0,229	5,3	0,44	3
		0,2	22,6	0,195	8,3	0,375	3,9
				0,168	12	0,330	4,8
				0,148	15,3	0,296	5,7
						0,270	6,6
						0,248	7,5
						0,226	8,4
						0,214	36,3
						0,185	50

Tab.2 *: Valorile absorban*ţ*ei Ala/GNP pentru diferite pH-uri in func*ţ*ie de concentra*ţ*ie*

pH-2		pH-4	
Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)	Abs (u.a)	C x10 $^{-4}$ (M)
0,206	2,0	0,271	2,0

0,185	**3,0**	**0,242**	**3,0**
0,234	**1,0**	**0,303**	**1,0**
0,166	**4,0**	**0,217**	**4,0**
0,151	**5,0**	**0,194**	**5,0**
0,138	**6,0**	**0,171**	**7,0**
0,128	**7,0**	**0,152**	**9,0**
0,115	**8,0**	**0,134**	**11**

Tab.3- valorile absorbanţei lys-GNP, la pH=2

pH-2		
Abs (u.a)		**C x10 $^{-4}$ (M)**
λ_1=532 nm	**λ_1=640 nm**	
0,179	**0,17**	**3,0**
0,153	**0,161**	**6,0**
0,138	**0,152**	**9,0**
0,127	**0,139**	**19,0**
0,114	**0,124**	**39,0**
0,100	**0,105**	**69,0**
0,086	**0,092**	**119**

Tab.4 - *Valorile absorbanţei cisteina-GNP, la diferite valori ale pH-ului*

pH-2		**pH-4 8**		**pH-6**			**pH-8**	
Abs (u.a)	**C x10 $^{-4}$ (M)**	**Abs (u.a)**	**C x10 $^{-4}$ (M)**	**Abs (u.a)**		**C x10 $^{-4}$ (M)**	**Abs (u.a)**	**C x10 $^{-4}$ (M)**
				λ_1=532	**λ_2**			
0,256	**1,0**	**0,246**	**1,0**	**0,241**		**1,0**	**0,224**	**1,0**
0,205	**2,0**	**0,227**	**2,0**	**0,212**		**2,0**	**0,190**	**2,0**
0,188	**4,0**	**0,209**	**3,0**	**0,195**		**2,6**	**0,163**	**3,0**
0,166	**5,0**	**0,183**	**5,0**	**0,185**		**3,2**	**0,138**	**4,0**
0,139	**10**	**0,155**	**8,0**	**0,172**		**2,8**		
		0,131	**12**	**0,151**		**4,8**		
		0,105	**17**	**0,139**		**5,8**		
		0,079	**27**					

Tab.5 - *Valorile absorbanţ ei diferitor concentratii de met-GNP, la pH=2*

pH-2		
Abs (u.a)		**C x10 $^{-4}$ (M)**
λ_1=532 nm	**λ_1=640 nm**	
0,144	**0,145**	**1,0**
0,122	**0,134**	**2,0**
0,109	**0,127**	**3,0**

0,075	**0,087**	**10**

Tăria legăturii şi modul de legare ligand-nanoparticulă este puternic influenţată de pH. La concentraţie mare a ionilor de hidroniu, pH=2 forma amfiionica a aminoacidului trece în formă cationica, gruparea NH_3^+ constituie un centru atractiv pentru GNP, purtător de sarcină negativă. La pH intermediar (peste punctul izoelectric) şi bazic aminoacidul se află sub forma anionica. Între nanoparticula de aur încărcată negativ şi sarcina negativă a aminoacidului se vor manifesta forţe de repulsie, astfel cuplarea aminoacid-nanoparticulă are loc prin forţe slabe de tip Van der Waals slabe.

Se constată că odată *cu creşterea concentraţiei de aminoacid* creşte cantitatea aminoacidului adsorbit pe suprafaţa nanoparticulelor iar plasmonii acestora sunt compensaţi de către protonii din grupările amino ale ligandului (glicina), astfel că, absorbanţa scade, picul aplatizându-se tot mai mult.

Reprezentând absorbanţa în funcţie de pH, (**Abs/pH**) pentru diferite concentraţii ale soluţiei de aminoacizi, în toate cazurile se constată o modificare a pantei dreptei în apropierea punctului isoelectric,adsorbtia fiind maxima la punctul izoelectric.

Se constată că odată cu crestera concentratiei de cisteina se produce o deformare a picului în comparatie cu glicina. Pe măsură ce concentraţia lizinei creşte, absorbanţa scade, concomitent cu accentuarea deformării picului, astfel încât de la o concentraţie c_{lys}=9 x10^{-4} M apar două lungimi de undă la care se produce absorbţia, λ_1=532 nm respectiv λ_2=640 nm. Apariţia celui de-al doilea maxim este determinat de aglomerarea nanoparticulelor sub formă de lanţuri.

I.1.2 Nanostructuri uni-dimensionale pe bază de Nanoparticule de Aur-Aminoacizi

În ultimul timp, nanoparticulele de aur sunt intens studiate datorită proprietăţilor optice care dau un mare potenţial de aplicare în biomedicina. Nanoparticulele de aur pot fi uşor asamblate în nanostructuri unidimensionale (1D) utilizând biomolecule (aminoacizi, ADN, colagen) [190 -193] în calitate de agent de captare.

Utilizarea aminoacizilor ca şi agenţi de captare este determinată de uşurinţa acestora de a forma forma agregate cu diferite nanoparticule metalice[194-198]. Capacitatea ridicată de captare se datorează grupărilor funcţionale: *tiolice, α-carboxilice, α-aminice* pe care acestea le deţin.

I.1.2.1 Prepararea şi caracterizarea nanostructurilor 1D lizină/histidina-GNP

Reactivi utilizaţi: $HAuCl_4$, $NaBH_4$, L-lizină, histidină, de puritate p. a. livraţi de firma *Sigma Aldrich.*

Protocol de lucru:

Prepararea GNP s-a efectuat prin reducerea aurului dintr-o soluţie de $HAuCl_4$ cu borohidrura în prezenta lizinei/histidinei. S-a preparat soluţie 0,001% $HAuCl_4$ peste care s-a adăugat 1 ml soluţie lizină c=0,075% dizolvată în apă *bi*-distilata. După amestecarea intensă timp de 15 min s-a adăugat 1 ml din soluţia agentului reducător, $NaBH_4$ c=0,075%. S-a continuat agitarea intensă încă 5 min, după care s-au supus purificării prin spălări succesive cu apă *bi*-distilata şi centrifugare timp de 15 min la 10000 rpm.

Caracterizarea nanostructurilor lizină-GNP

În soluţii slab acide pH=5, gruparea *α-aminică* are pK_a=8,9, iar ce terminală, pK_a=10,28, astfel că acestea sunt protonate, în timp ce gruparea carboxilica cu pK_a=2,2 este disociata (având sarcina negativă). În această situaţie moleculele de lizina captează nanoparticulele de aur cu gruparea amino terminală.

Cuplarea prin intermediul grupării *α-aminice* nu este posibilă întrucât apar forţe de repulsie între plasmonii particulei de aur şi gruparea carbonil. Distanţă mică între gruparea carboxilica şi α-aminica determină formarea unui moment de dipol la suprafaţa particulei. Acest moment de dipol induce asamblarea nanoparticulelor de aur sub formă de lanţuri (***Fig16).***

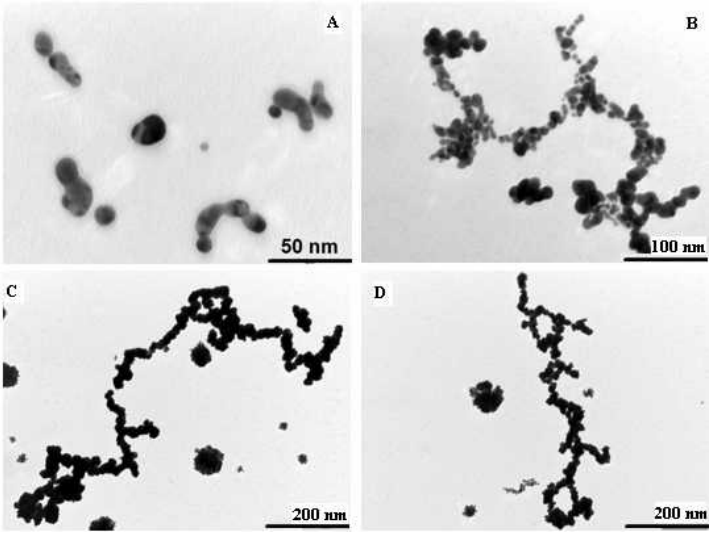


Fig16 A-D: *Imagini TEM ale nanostructurilor de lizina-GNP dupa A) 15 min B) 8h C-D) 24h*

Microscopia TEM arata că imediat după preparare lizina captează nanoparticulele de aur şi formează aglomerate care pentru început au lungime şi mărime de ordinul nanometrilor (***Fig 16 A)***. Datorită interacţ iunilor electrostatice care se manifesta între grupările α-amino şi carboxilice ale nanoparticulelor, acestea se unesc după planul {111} sub formă de lanţ uri, care după 24 h ajung de ordinul de ordinul micronilor (***Fig16 B-D).***

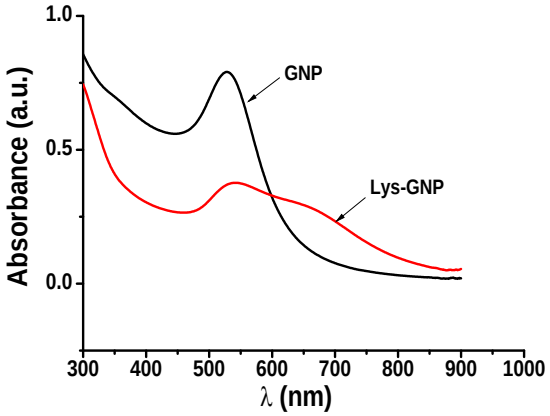


Fig17. *Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor de aur nefunctionalizate (culoarea neagra) comparativ cu cel al nanoparticulelor functionalizate cu lizina (rosu)*

Se observă că nanoparticulele de aur absorb la 530 nm şi au un maxim al absorbanţ ei în jur de 0.8 (a.u). În cazul nanostructurilor 1D lizină-GNP se produce o deplasare a lungimii de undă la 550 nm, iar absorbanta

are valori mai mici cu 0,45 a.u.. Autoasamblarea sub formă de fire a nanoparticulelor lizină-GNP determina apariţ ia unui de-al doilea maxim la 630 nm determinat de vibraţ iile longitudinale. Atenuarea accentuată a absorbanţ ei cu 0,28 u. a, poate fi explicată prin absorbţ ia puternica a lizinei la suprafaţ a nanoparticulelor de aur, ceea ce atenuează vibraţ ia electronilor de la suprafaţ ă.

I.1.2.2 Prepararea şi caracterizarea nanostructurilor 1D Aspartat-GNP

Utilizarea acidului aspartic in calitate de agent reducator cat si de agent de functionalizare conduce la structuri si morfologii diferite ale nanoparticulelor de aur.

În mediu slab acid, gruparea amino a acidului aspartic are pK_a=9,6, în timp ce gruparea α-carboxilica are pK_a =1,8, ceea ce face ca gruparea amino să fie protonată în timp ce gruparea carboxilică se află in formă disociază

În funcţ ie de concentraţ ia acidului aspartic, nanostructurile 1D formate pot avea diverse morfologii (***Fig .19 a-d***):Triunghiulare, Bastonaşe, Fir

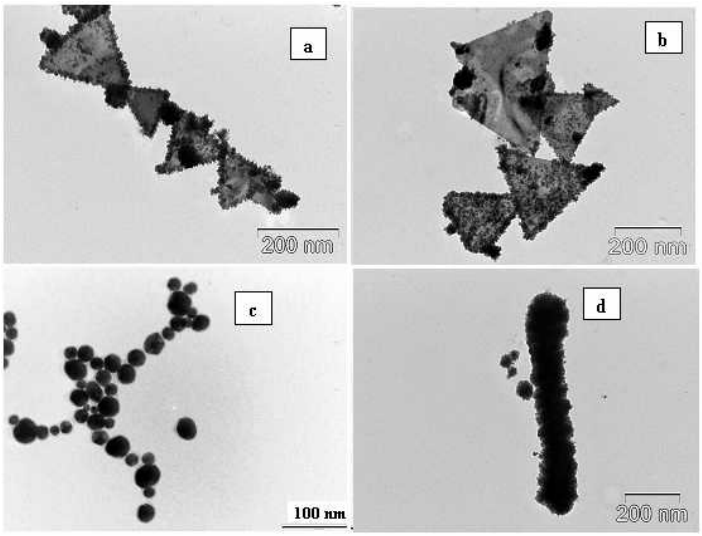


Fig .19 a-d :Imagini TEM pentru diferite morfologii ale L-aspartic-GNP: a,b) raport $HAuCl_4$/Acid aspartic-1:3 dupa 9h respective 24h, c) $HAuCl_4$/Acid aspartic:1:1 (dupa 24 h), d) $HAuCl_4$/Acid aspartic-1:1,25 (dupa 24 h)

I.1.3 Nanostructuri bi-dimensionale pe bază de Nanoparticule de Aur-Aminoacid

Structurile bi-dimensionale (2D) obţ inute prin asamblarea nanoparticulelor metalice cu diverse biomolecule, în particular aminoacizi, este un subiect intens studiat datorită vastelor posibilităţ i de aplicare

în: microelectronica, optoelectronica, biosenzori[201-205]. Nanostructurile de metale nobile sunt folosite ca elemente cheie în asamblarea aminoacizilor pe diferite substraturi. Proprietăţ ile nanostructurilor 2D depind de mărimea nanoparticulelor, agentul de cuplare şi modul în care se face asamblarea.

I.1.3.2.1 Caracterizarea morfologica şi optică a nanostructurilor 2D

Functionalizarea GNP-ului cu aminoacizii s-a efectuat prin schimb de liganzi. Ligandul utilizat în calitate de stabilizator, citratul, a fost îndepărtat de pe suprafaţ ă, iar nanoparticulele de aur au fost asamblate cu aminoacid (L-lizina, L-cisteina) după schema din ***Fig.21.***

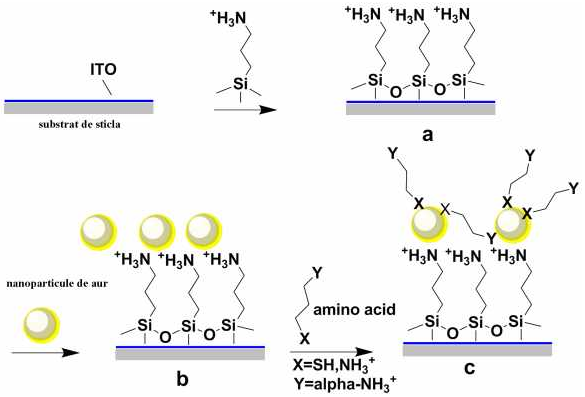


Fig.21 a-c: Mecanismul de asamblare a aminoacizilor cu GNP pe substrat ITO: **a**) silanizarea suprafeţ ei cu APTMS, **b**) ataşarea nanoparticulelor de aur pe substrat, **c**) cuplarea aminoacizilor pe monostratul de GNP

Nanostructurile de aur depuse pe sticlă ITO se asamblează în agregate mari, având dimensiuni între 40-200 nm (***Fig.23 A),*** mai mult, contactul dintre acestea este foarte slab ceea ce se reflectă prin valori ridicate ale rezistenţ ei electrice a GNP/ITO, determinată prin curbele Curent-Tensiune. După imersarea în soluţ ie de aminoacid (L-lizina sau L-cisteina) de $c=10^{-3}$M timp de 18 h se constată o schimbare semnificativă a morfologiei (***Fig.23 B).***

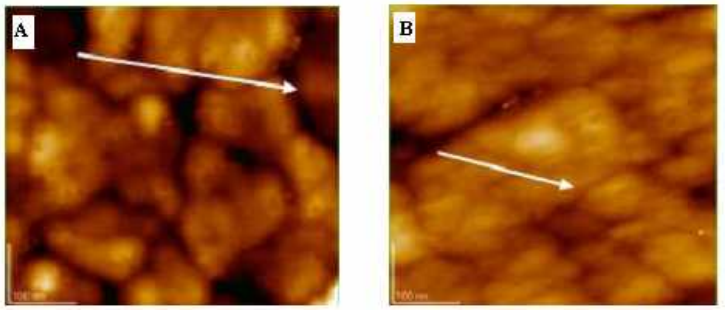


Fig.23 A, B *Imagini AFM în Modul Tapping™: **A**) Monostratul GNP pe sticlă silanizată **B**) Stratul de L-lysine/GNP pe sticlă silanizată ITO; scala 100 nm*

I.1.3.2.2 Caracterizarea electrică a nanostructurilor 2D

Potenţ ialele utilizări a nanostructurilor aminoacid-GNP/ITO se pot regăsi în electronică şi biosenzori., ceea ce presupune caracterizarea lor din punct de vedere electric.

Proprietăţ ile electrice a substratului GNP asamblat pe sticlă ITO silanizata au fost investigate prin măsurători I-V (***Fig.25).***

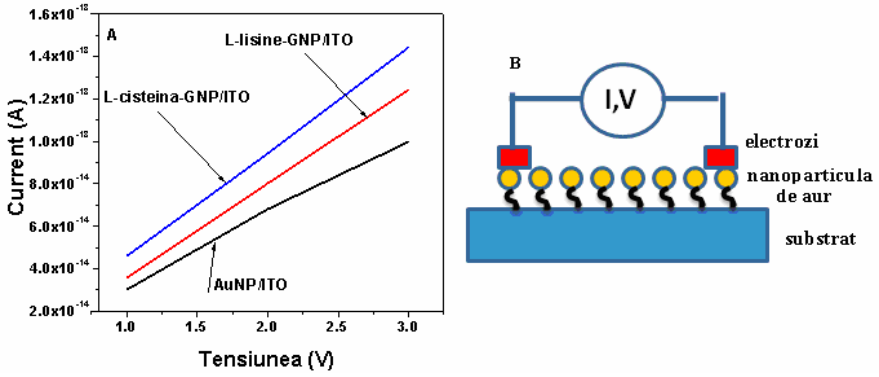


Fig.25A,B *Caracteristicile I-V a monostraturilor de GNP, L-Lizina-GNP şi L-cisteina-GNP pe sticlă ITO silanizată (**A**a), Schema instalaţ iei de măsurare (**B**)*

Se observă din ***Fig.25A,*** ca la valori mici ale curentului s-a obţ inut, pentru toate cazurile intensităţ i foarte mici ale curentului 10^{-14}, 10^{-13} A. După cum era de aşteptat rezistentele electrice au valori foarte mari (2-2,8 x10^{13} Ω), după cum rezultă din ***Fig.26***

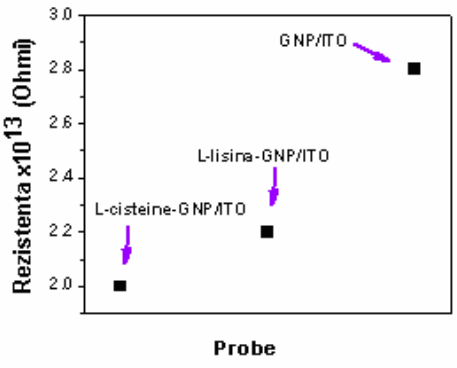


Fig.26 *Rezistenta electrica a monostraturilor de GNP respectiv aminoacid-GNP pe sticla silanizata*

Nanostructurile GNP realizate pe sticlă ITO silanizată nefuncţionalitate cu aminoacizi prezintă rezistenta cea mai mare, ceea ce se explică prin asamblarea neuniforma cu multe spaţii libere între agregate. Odată cu funcţionalizarea cu aminoacizi, rezistenta electrică scade semnificativ până la 2, 2 x 10^{13} Ω pentru asamblurile cu lizină şi 2 x 10^{13}Ω pentru ansamblurile cu cisteină. Valorile mai mici ale rezistenţei nanostructurilor realizate cu cisteina faţă de cele cu lizina se explică prin adsorbţia puternică a acesteia la suprafaţă; densitatea de electroni este mai mare, ceea ce determina o rezistenţă mai mică.

Modificarea rezistenţei electrice a nanostructurilor funcţionalizate arata că modul de asamblare, suportul şi liganzii utilizaţi, pot să conducă la o gamă largă de nanostructuri cu proprietăţi electrice specifice diferitor domenii de utilizare

I.2 Funcţionalizarea Nanoparticulelor de aur cu proteine

În cadrul acestui capitol sunt prezentate rezultatele privind interacţiunea nanoparticulelor de aur cu proteine, şi anume cu albumina serică umană (HSA- Human Serum Albumin) cu albumina serică bovina (BSA- Bovin Serum Albumin) şi Colagen. Voi evidenţia influenţa pe care o are modul de preparare a nanoparticulelor (agentul stabilizator, natura sării aurice, natura reducătorului) precum şi influenţa pH-ului asupra interacţiunii proteină-GNP.

I.2 Funcţionalizarea nanoparticlor de aur cu colagen

Unul dintre materialele cel mai des folosite în medicina regenerativă este colagenul. Este biocompatibil cu organismele vii şi are un randament mărit de biointegrare şi biodegradabilitate. Mai mult, în funcţie de scopul utilizării, proprietăţile lui pot fi îmbunătăţite prin diferite tratamente precum: reacţii chimice cu gluteraldehidă, izocianati, epoxizi, bis-imide, etc, precum şi prin tratamente de iradiere cu UV sau raze-γ. Cuplat cu nanoparticulele de aur se crează o structură capabilă de a accepta la suprafaţă diferite molecule şi anume: peptide, medicamente, factori de creştere fără ca structura lui să fie alterată[208]. În prezent există puţine studii privind capacitatea de proliferare a celulelor stem pe suporturi nanostructurate[209].

I.2.1 Influenta pH-ului şi agentului reducător asupra funcţionalizarii colagenului

Succesiunea transformărilor şi operaţiilor la metalizarea colagenului este prezentată în ***Fig.35***. La început se observă o schimbare de culoare ceea ce indică acoperirea firelor de colagen cu nanoparticule de aur, care trece de la galben la roz, care în timp (3-5 min) se intensifică spre roz închis şi chiar roşu, culoarea finală fiinddeterminată de mărimea particulelor de aur.

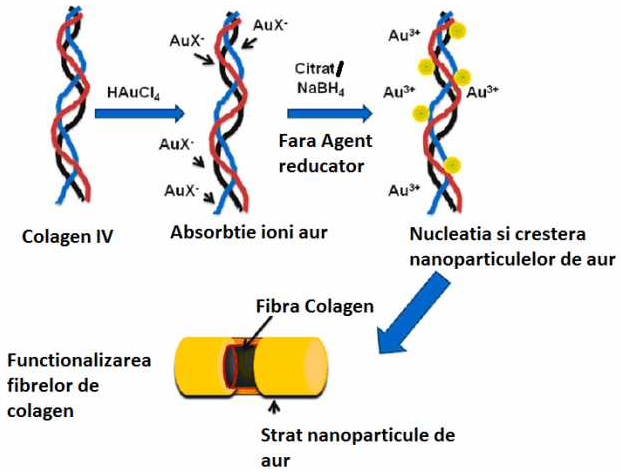


Fig.35. *Reprezentarea schematică a procesului de funcţionalizare a colagenului, rezultând nanofibre de colagen acoperite cu un strat subţire de nanoparticule de aur.*

Când nu se foloseşte agent reducător, Au (III) este redus la Au (0) de către

grupările funcţionale ale colagenului cu potenţial de reducere. De precizat că reducerea directă (fără reducător) se realizează numai în mediu acid.

PH-ul soluţiei influenţează nucleaţia şi creşterea nanoparticulelor de aur pe suprafaţa colagenului. Diferiţi autori au efectuat reducerea aurului la diferite pH-uri utilizând diverşi agenţi de reducere[210].

Prin simpla manipulare a condiţiilor de asamblare am generat nanofibre de colagen de diferite dimensiuni ca diametru şi lungime[211]. Pin creşterea pH-ului de la 3,5 la 11 şi prin diminuarea vitezei de agitare firele de colagen au abilitatea de a se cupla sub formă de nanofibre a căror lungime şi diametru a variat în limitele: 1-2 µm pentru lungime şi 20-60 nm în diametru.

Folosind ca şi agent de reducere citratul de sodiu, raport molar $HAuCl_4$/colagen/citrat de sodium 1:1:1 (w/w) şi pH=3,5 am obţinut fire scurte (400 nm) şi diametru de 40 nm, în care nanoparticulele de aur au fost uniform distribuite (***Fig.35a***). În aceeaşi condiţii, dar pH=5.5-6.5, se formează nanofibre de dimensiuni mai mari (***Fig.*****35** ***b,c***). La pH neutru şi slab alcalin, (pH 7.0-9.0) am obţinut fibre lungi dar cu o distribuţie a nanoparticulelor neomogena (***Fig.35d,e***). În mediu puternic alcalin, pH>9 fibra de colagen se distruge datorită procesului de hidroliza alcalina a acestuia (***Fig.35*****f**).

În cazul utilizării $NaBH_4$ in calitate de agent de reducere nanofirele rezultate au aproximativ aceeaşi lungime (1.2-1.8µm) ca şi în cazul citratului de sodiu (vezi ***Fig.*****35** ***b,c***) dar diametrul lor este mai mic, întrucât dimensiunea nanoparticulelor de aur este mai mică (***Fig.*****35** ***g,h)***. In cazul reducerii cu citrat, diametrul a fost de 60-65 nm si 20-27 nm cand reducerea s-a facut cu borohidrura.

În absenţa agentului reducător, la pH=5,5, rezulta nanofibre având diametrul de 30-35 nm şi lungimea de 1-2 µm (***Fig.*****35*****i***). Capacitatea de adsorbţie este mai mare în mediul acid (pH 3.5-5.5), condiţiile slab acide favorizând reducerea ionilor de Au (III).

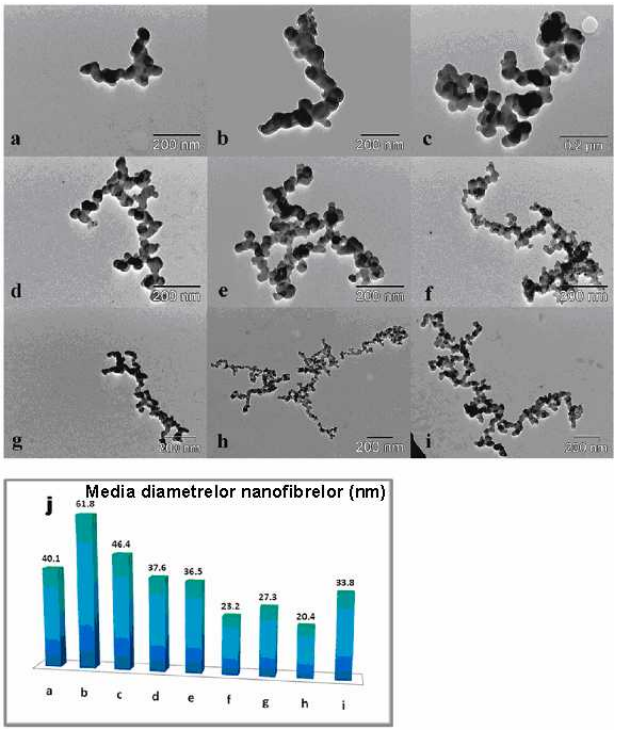


Fig.*35 *a-j : Imagini de microscopie de transmisie electronică (TEM) împreună cu histograma de distribuţ ie a nanoparticulelor de aur în fibră de colagen. Imaginile TEM ale colagenului metalizat cu şi fără agent reducător la diferite pH-uri: folosind citrat de sodiu (***a***) - fibre scurte la pH=3.5; (***b***) nanofibre medii pH=5.5, nanofibre lungi la (***c***) pH=6.5, (***d***) pH=7, (***e***) pH=9, (***f***) pH=11. Borohidrura de sodiu- fibre lungi pH=5.5, (***g***) fibre lungi pH=7. Nefolosind reducător- (***i***) fibre lungi pH=5.5 (***j***) Histograma reprezentativă a nanofibrelor de colagen metalizate obţ inute în diferite condiţ ii.

I.2.2 Caracterizarea fizico-chimică a fibrelor de colagen funcţ ionalizate

Nanofibrele de colagen obţ inute după condiţ iile arătate mai sus au fost caracterizate prin tehnici de spectroscopie UV-VIS şi FTIR, microscopie de transmisie electronică (TEM), şi conductibilitate electrică.

Spectroscopia UV-VIS confirmă formarea şi adsorbţ ia nanoparticulelor de aur în structura macromoleculei de colagen. Spectrul a fost monitorizat la 30 min (***Fig.36A***) şi 24 ore (***Fig.36B***) după funcţ ionalizare.

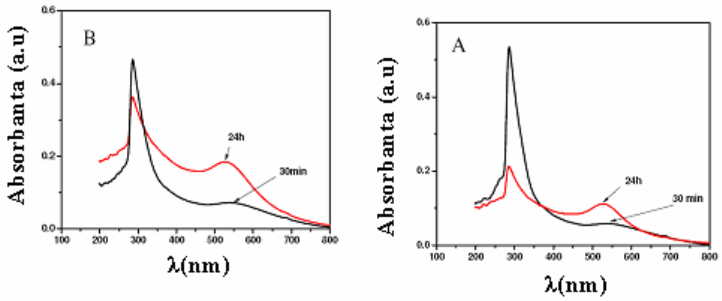


Fig.36A, B. *Spectrul de absorbţ ie UV-VIS a structurilor de colagen metalizate la pH=5 după 30 min respectiv 24 h (**A**) când NaBH4 s-a folosit ca reducător (**B**) când nu s-a folosit nici un reducător.*

Spectroscopia UV-VIS este o metodă excelentă pentru studiul formării şi aglomerării nanofirelor funcţ ionalizate. Se evidenţ iază o deplasare şi în acelaşi timp o lărgire a benzii plasmonice, dar şi apariţ ia unui nou pic datorită asamblării longitudinale în structura filiforma a nanofibrelor de colagen. În spectrul UV-VIS a colagenului funcţ ionalizat se observă că apar două picuri: la 300 nm, care arata existenţ a $HAuCl_4$ în soluţ ie şi 520-540 nm, banda caracteristică nanoparticulelor de aur. Intensitatea benzii creşte în timp, ceea ce indică functionalizarea completă a nanoparticulelor de aur.

Comparând cele două metode de funcţ ionalizare, cu şi fără reducător, se poate spune că, atunci când reducerea se realizează cu un agent de reducere, procesele de nucleare şi creştere sunt foarte rapide, nanoparticulele fiind uniform distribuite, iar aglomerarea lor este evitată. În cazul în care nu se foloseşte agent reducător, reducerea are loc în timp cu viteza mica. Datorită fenomenelor difuzionale se produce aglomerarea nanoparticulelor de aur care nu mai sunt uniform distribuite pe toată suprafaţ a, reducerea realizându-se practic pe nuclee deja existente. Picul din jurul valorii de 520-540 nm sugereaza aglomerarea nanoparticulelor (Figura 1B).

Confirmarea cuplării nanoparticulelor pe suprafaţ a colagenului este deasemenea confirmată de către spectroscopia FTIR (***Fig.37).***

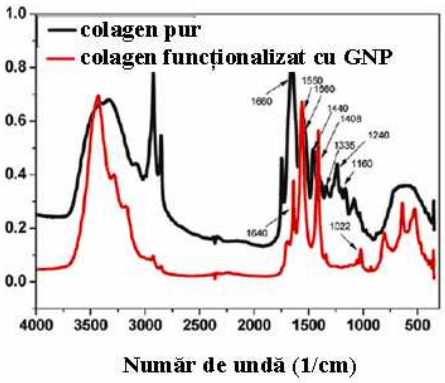


Fig.37 *Spectrul FTIR a structurilor de colagen (**negru**)comparativ cu cel al colagenului metalizat (**rosu**)*

Unele picuri caracteristice colagenului metalizat şi-au schimbat poziţ ia în timp ce altele au dispărut după funcţ ionalizare. Schimbări majore s-au produs în domeniu 3750-2750 cm^{-1}. Vibraţ iile corespunzătoare legăturii C-H au dispărut, această dispariţ ie datorându-se lungimii mari ale fibrei de colagenului, fibră cu o orientare paralelă cu suprafaţ a nanoparticulelor, orientare care joacă rolul unei bariere pentru procesul de transfer ion-electron[212]. Astfel se explica dispariţ ia benzii corespunzătoare legăturii C-H. Mai mult, banda caracteristică amidei I (vibraţ iilor C=O) îşi schimbă poziţ ia de la 1660 la 1640 cm^{-1}, iar pentru amida II (vibraţ iile N-H) în afara planului precum şi cele corespunzătoare legăturii C-N se deplasează la valori mai mari, de la 1550-1560 cm^{-1}. Amida III, pentru vibraţ iile C-N şi N-H în plan, se deplasează de la 1240 la 1022 cm^{-1} din cauza interacţ iunii cu nanoparticulele de aur. Deasemenea se poate observa că vibraţ iile corespunzătoare grupărilor COOH şi CO din hidroxiprolina sau partea glicozidica a colagenului se deplasează de la 1440 la 1408 cm^{-1}.

Pentru a demonstra posibilitatile de utilizare ca substrat conductor în diferenţ ierea celulară, am investigat proprietăţ ile electrice ale nanofibrelor de colagen, prin măsurători curent-tensiune. Functionalizarea omogena a fibrelor de colagen, vizualizată prin microscopie electronică, sugerează că nanofibrele pot fi bune conducătoare de electricitate. Curbele curent-tensiune (I-V) a fibrei de colagen metalizate având iniţ ial rezistenta electrică de 2.36 MΩ sunt prezentate în ***Fig.38.***

.

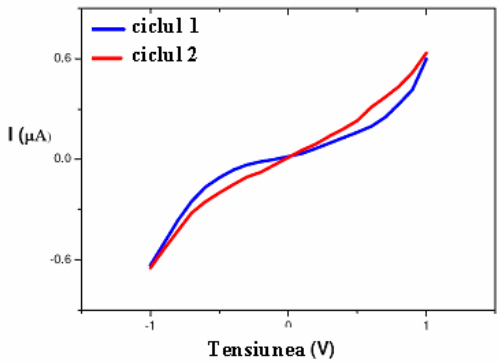


Fig.38 *Curbele curent-tensiune (I-V) a fibrei de colagen metalizate*

După cum se poate observa, forma curbe pentru prima măsurătore I-V (**ciclul 1**) nu este una ohmica. Cele două platouri ale curbelor nu sunt simetrice şi sunt centrate în jurul tensiunii de zero, ceea ce indică existenţ a unor bariere probabil graniţ e între granulele de aur, conducţ ia între aceste granule are loc prin tunelare.

Schema mecanismului prin care este condus curentul electric în cazul formării de astfel de tunele este prezentat în ***Fig.39***. Discontinuităţ ile apărute în nanofibră sunt determinate de existenţ a unor spaţ ii libere din structura colagenului. Astfel se creează meandre de curent ce evită regiunile izolatoare deoarece prin acestea nu este posibilă tunelarea. Altfel spus se poate afirma că conducţ ia electrică are caracter percolativ, purtătorii de sarcină căutând drumurile ce au legături slabe cu rezistenţ ă minimă.

I.2.3 Aplicaţ iile nanoparticulelor de aur functionalizate cu collagen

Nanostructurile colagen-nanoparticule de aur au fost utilizate pentru prepararea de substraturi metalizate, colagen-metalizat (GCNFs) care au fost folosite *în vivo* pentru diferenţ ierea celulelor stem mezenchimale în celule stem miocardice şi neuronale. Metoda care stă la baza prepării substratelor este *metoda strat cu strat*, metodă în care fiecare strat susţ ine stratul următor. Diferenţ ierea pe aceste tipuri de substrate nu au fost studiată până în prezent.

Celulele cultivate pe substrat de colagen metalizat au capacitatea de a internaliza colagenul metalizat în primele ore. În acest sens, în literatura s-a publicat capacitatea celulelor mezenchimale de a internaliza colagen prin proteinele Upar şi uPARAP/Endo180. Domeniul FnII fiind responsabil pentru internalizare. Procesul prin

care are loc internalizarea este un proces endocitotic, cu o acumulare progresivă în special în regiunea perinucleara după câteva săptămâni, nearătând nici un semn de citotoxicitate (***Fig.41)*** demonstrează biocompatibilitatea mărită a substratului de colagen metalizat cu celulele stem, arătând totodată internalizarea acestuia.

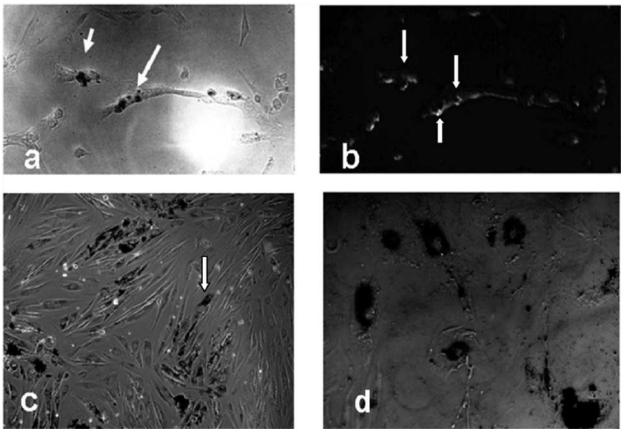
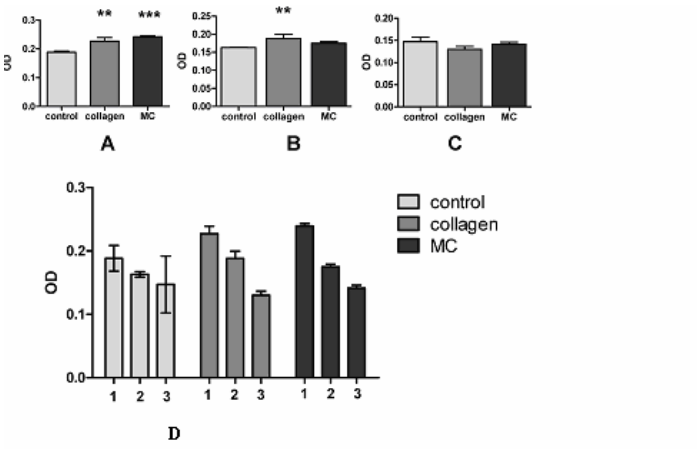


Fig.41a-d Celule mezenchimale choreon cultivate pe substrat de colagen metalizat, arătând internalizarea intracelulara a fibrelor metalizate **a**) după 3 zile de cultivare, imagine în lumină albă, **b**) în lumina neagră, (magnificarea 200X), **c**) după 13 zile de cultivare în prezenţ a de mediu de diferentiere miocardic **d**) după 1 lună de cultivare în prezenţ a de mediu de diferenţ iere miocardic, imagine în lumină albă (magnificarea 400x).

Pentru a demonstra biocompatibilitatea substraturilor cu celulele stem adulte am folosit tehnica de analiza MTT şi fluorometrie FDA. Celulele Choreon-MSCs (Ch-MSC) au fost cultivate în diferite condiţ ii pe mai multe tipuri de substraturi: (1) în mediu de celule stem, care menţ ine celulele în stare nediferenţ iată; (2) celule expuse la mediu de diferenţ iere neuronală; (3) celule expuse la o doză de 5AZA pentru 24 h. Rezultatele testului MTT este prezentat în ***Fig.42A-D.***



Testul MTT pentru celulele MSC in raport cu substratul si protocolul de diferentiere:
1. mediu de celule stem
2.mediu de diferentiere neuronala
3. mediu de diferentiere miocardica

Fig.42A-D Testul de proliferare MTT pentru Ch-MSCs cultivate 7 zile în: mediu de celule stem, stare nediferenţiată (control) (***A***), în prezenţa mediului de diferenţiere neuronală (***B***) în prezenţa de mediu de diferenţiere miocardică (***C***), cu şi fără substrat. (***D***) Analiza statistică ANOVA comparison Bonferroni post-test datelor MTT grupate în relaţie cu substratul şi protocolul de diferenţiere (***D***).

Datele din ***Fig.42A-D*** arată că analiza rezultatelor prin metoda ‘’One way ANOVA’’ este semnificativă statistic pentru control vs substrat de colagen (coll) respectiv colagen metalizat (MC), (semnificaţia statistică a fost setată la $p < 0.05$). Comparând viabilitatea şi proliferarea folosind ’’two-way ANOVA Bonferroni post-test’’ pentru celulele Ch-MSCs folosind MTT-ul, diferenţele între substrate ale protocolului de diferenţiere nu sunt semnificative, nu se observă nici o semnificaţie statistică între control vs colagen şi substratul MC ***Fig.42D***. Când nu s-a folosit nici un mediu de diferenţiere analiza statistică ‘’one way ANOVA’’ (setată la $p < 0.05$) arată o creştere semnificativă a proliferării celulare pentru substratele de colagen şi colagen metalizat în comparaţie cu controlul (fără substrat) (***Fig.42A***). Când celulele au fost cultivate în mediu de cultură pentru diferenţierea neuronală şi cardiacă, proliferare mai mare s-a observat în cazul colagenului (***Fig.42B***). Aceasta scădere a proliferării în cazul substratului metalizat sugerează începerea procesului de diferenţiere. În cazul diferenţierii miocardice (***Fig.42C***), nu se observă nici o diferenţă statistică între cele trei substraturi.

Cultivarea celulelor Ch-MSCs pe substrat de colagen metalizat arata morfologii în

care se poate clar evidenţ ia internalizarea firelor de colagen-aur (după 2-4 săptămâni) din substratul de colagen metalizat (***Fig.43E,F***).

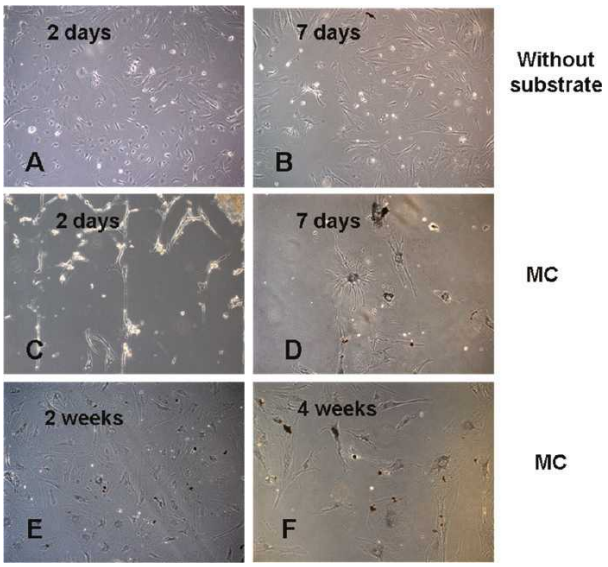


Fig.44 A-F. Imagini optice în lumină albă a celulelor MSCs cultivate în prezenţ a de mediu de diferenţ iere neuronală după 2 şi 7 zile, respectiv 2 şi 4 săptămâni. (magnitudine 100x). (***A, B***) celulele cultivate fără substrat (control) (***C-F***) celulele MSC cultivate pe substrat de colagen metalizat MC.

Pentru a demonstra procesul de diferenţ iere neuronală celulele stem derivate din placenta au fost supuse testelor de imunohistochimie. Rezultatele obţ inute sunt prezentate în ***Fig.45 A-I***. Am urmărit expresia markerilor: expresia GFAP şi a neurofilamentelor (NF). GFAP a fost a fost exprimat în celulele cultivate fără substrat (***Fig.45C***), şi deasemenea pe toate substratele folosite: colagen, colagen metalizat, (***Fig.45 F,I***). Expresia neurofilamentelor a fost observată în toate celulele diferenţ iate pe toate substratele (colagen şi MC), celulele neuronale exprima mai puternic NF (***Fig.45 B,E,F***). Substratul de colagen metalizat induce schimbări dramatice în morfologia celulelor dând o expresie puternică a NF (***Fig.45 H***), şi având acumulări de nanofibre în special în spaţ ial perinuclear. Mai mult, în cazul celulelor cultivate pe substrat de colagen şi colagen metalizat, celulele s-au orientat în aceeaşi direcţ ie (***Fig.45 A,D,G***).

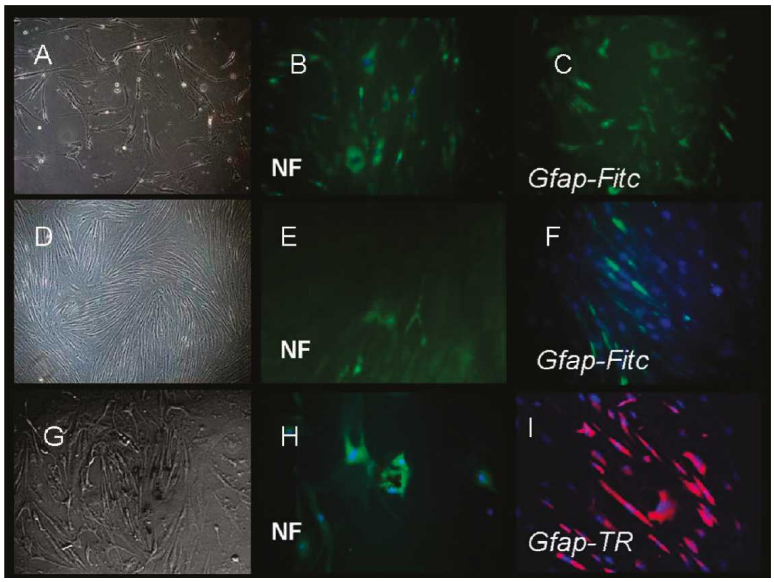


Fig.45 A-I Celule mezenchimale MSC cultivate în mediu de diferenţiere neuronal. Pozele de sus: fără substrat, din mijloc substrat de colagen, iar jos substrat de colagen metalizat. (***A***) Control fără substrat – pentru celule cultivate timp de 18 zile în mediu de diferenţiere neuronal (lumină albă 100x). (***B***) Imunohistochimie pentru GFAP-FITC ale Ch-MSC cultivate fără substrat după 4 săptămâni în mediu de diferenţiere neuronal (imunofluorescenţa, magnificarea 200x) (***C***) imunochimie pentru NF-FITC al celulelor mezenchimele cultivate fără substrat după 4 săptămâni de expunere în mediu de diferenţiere neuronal (imunofluorescenţa, 200 x magnificare), (***D***) Imaginea în lumină albă a celulelor mezenchimele cultivate pe substrat de colagen (lumină albă, 100x) (***E***) Imaginile de imunofluorescenţa a celulelor cultivate pe substrat de colagen pentru colorația cu NF-FITC (200x magnificarea).
(***F***) Imunocolorația pentru GFAP-FITCa celulelor Ch-MSC cultivate pe substrat de colagen (colorația DAPI, 200x magnificarea)
(***G***) Chorion- MSCs cultivate în mediu de diferenţiere neuronal pe substrat de colagen metalizat (lumina albă, 200x). (**H**) Imunocolorația pentru NF-FITC a celulelor mezenchimele cultivate pe substrat de colagen metalizat – acumularea de nanoparticulele vizibilă în domeniul perinuclear (imunofluorescenţa 44x- colorat DAPI, (**I**) colorația GFAP-TR pentru celulele cultivate pe substrat de MC (imunofluorescenţa 200, colorant DAPI)

Se pare că această combinaţ ie de nanoparticulele de aur şi colagen duce la substratul cel mai favorabil care ajută celulele stem spre o diferenţ iere avansată. Există unele studii în vitro privind diferenţ ierea celulară neuronala, migrarea neuronală şi expansiunea acestora în prezenţ a de componente ale matricei extracelulare cum ar fii: colagen, fibronectina, laminina[218-220].

Un alt scop al acestui studiu a fost de a investiga potenţ ialul celulelor mezenchimale stem de a se diferenţ ia în cardiomiocite folosind substratele: colagen, colagen metalizat şi control, fără substrat. Pentru a induce diferenţ ierea celulelelor au fost cultivate în mediu standard de celule stem pentru 4 săptămâni şi tratate cu 5-azacitidina (10 μM) timp de 24h (un ciclu de expunere pe săptămână). Diferenţ ierea a fost demonstrată folosind imunocitochimia (***Fig.46 A-F***) cu markerii de expresie cardiaci specifici şi anume: proteină NKx, hormonul cardiac ANP (atrial natriuretic peptide), precum şi actina F pentru rearanjarea filamentelor actinice (actina F). Celulele mezenchimale au adoptat o morfologie poligonală, morfologie tubică, după cum a raportat şi Martin Rendon[221]. Această structură poate fi explicata prin asamblarea şi remodelarea miofibrelor când celulele sunt expuse la actina, celule care sunt stresate de activitatea acesteia şi iau o structură poligonala. Aspectele morfologice pot fi observate în ***Fig.46D,E.***

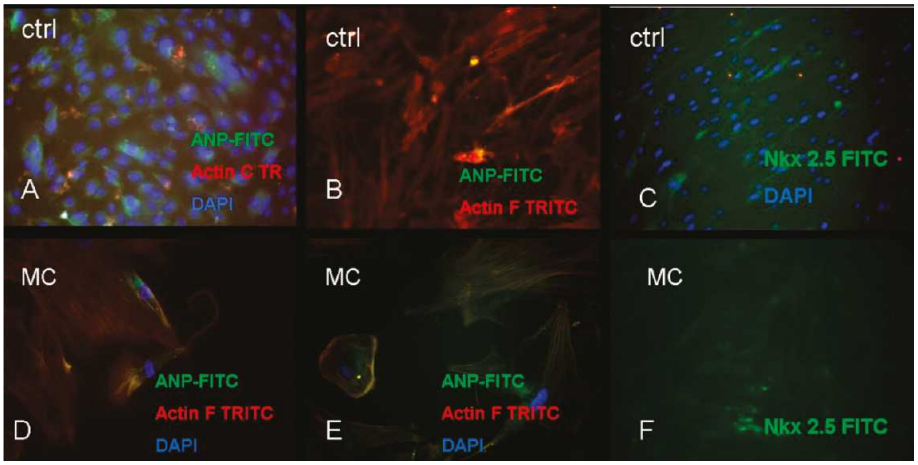


Fig.46 A-F Celule mezenchimele derivate din placenta cultivate în mediu de diferenţ iere miocardic. (***A***) Coloraţ ii pentru cardiomiocite folosind marcarii ANP-FITC+actin F+DAPI) a controlului fără substrat, 31 zile (imunofluorescenţ a, 200X), (***B***) Coloraţ ii

ANP-FITC şi TRITC pentru control cultivare fără substrat (imunofluorescenţ a, 200x), (***C***) Expresia Nkx 2.5 FITC a celulelor cultivate fără substrat (imunofluorescenţ a, 100x), (***D***) Coloraţ ie ANP-FITC şi TRITC pentru celulele cultivate pe substrat de colagen metalizat (imunofluorescenţ a, 400x), (***E***) Coloraţ ie ANP-FITC şi TRITC pentru celulele cultivate pe substrat de colagen metalizat (imunofluorescenţ a, 400x), (***F***) Expresia Nkx 2.5 FITC a celulelor cultivate pe substrat de colagen timp de 4 săptămâni (imunofluorescenţ a, 100x),

Analiza imunocitochimiei arată că celulele sunt pozitive pentru Nkx 2.5 chiar şi în absenţ a substratului (***Fig.46 C***). Morfologiile de fibră a celulelor cultivate fără substrat a fost observată după expunerea la actina F (***Fig.46 B,C***). Cultivarea celulelor MSC în prezenţ a de substrat metalizat arata localizării intracelulare a Nkx 2.5 (***Fig.46F***).

Diferenţ ierea spre miocard activată pe substrat de colagen –aur a fost extrem de pozitivă pentru expresia ANP chiar şi la numai 3 săptămâni de la cultivare, în comparaţ ie cu controlul (***Fig.47A,B***).

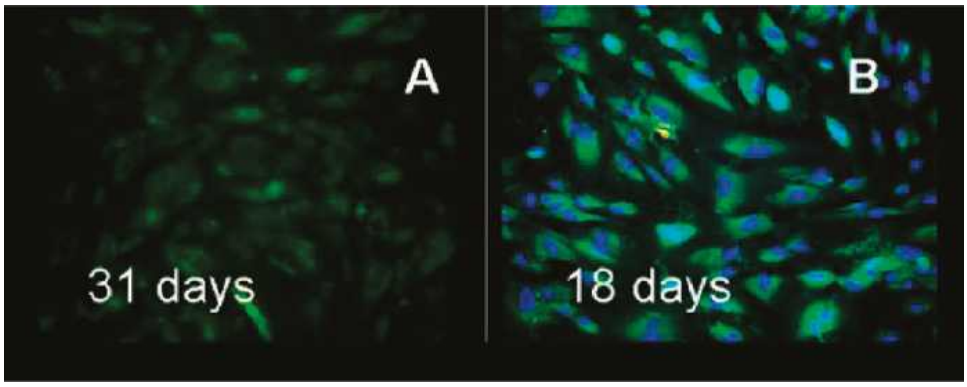


Fig.47A,B Diferenţ ierea spre miocard pe substrat de colagen–aur pozitivă pentru expresia ANP chiar şi la numai 3 săptămâni de la cultivare (***B***) în comparaţ ie cu controlul 31 (***A***)

Efectul 5-azacitidinei în diferenţ ierea celulară poate sa nu fie specific deoarece aceasta are capacitatea de a induce diferite schimbări în fenotip prin activarea unui număr mare de gene. Mai mult, tratamentul cu azacitidină nu este suficient pentru a reprograma celulele MSC pentru a diferenţ ia în cantitatea de cardiomiocite necesară pentru regenerarea miocardică. Descoperirea unei alte strategii care conferă atât o stimulate mecanică cât şi una pe cale biochimica sau electrică este necesară pentru a obţ ine un

fenotip matur diferenţ iat. Substratul de colagen metalizat îndeplineşte toate dintre aceste condiţ ii.

Celulele mezenchimale au fost expuse stimulării electrice cu un stimulator folosit în clinică, celulele au fost concomitent supuse tratamentului de diferenţ iere în celule neuronale şi cardiomiocite, în mediu de diferenţ iere necesar. Stimularea electrică accelerează diferenţ ierea înspre neuronal încă din prima zi de stimulare, ***Fig.48A-F.***

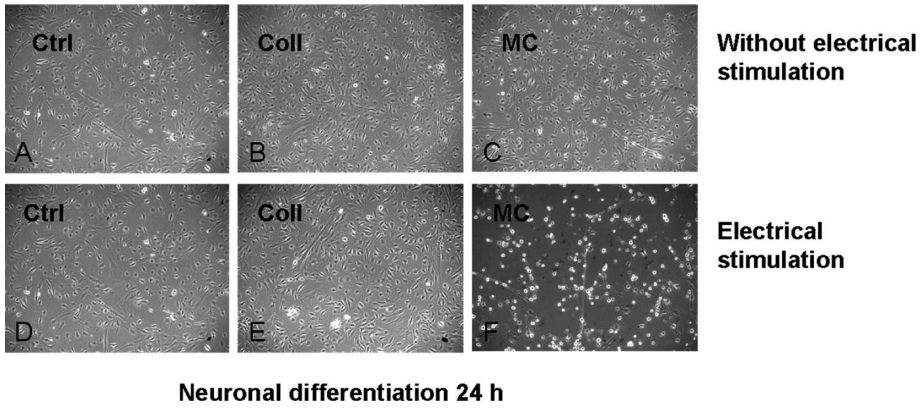


Fig.48A-F. Imagini în lumină albă pentru diferenţ ierea neuronală după 24 h de tratament a celulelor MSC expuse mediului de diferenţ iere neuronal fără electrostimulare (***A, B, C***): (***A***)- control fără substrat, (***B***) pe substrat de colagen, (***C***) pe substrat de colagen metalizat, în timp ce fără stimulare electrică (***D, E, F***): (D)fără substrat (***E***) pe substrat de colagen, (***F***) pe substrat de colagen metalizat.

Deasemenea din ***Fig.49A-D*** se observă că celulele au o orientare identică după 2 zile de tratament. Celulele MSC îşi schimbă rapid morfologia şi exprima genele specifice celulelelor cardiace (troponin, Nkx 2.5, şi GATA-4) atunci când acestea au fost analizate cu PCR-ul. Morfologia specifică celulelor diferentiate inspre neuronal respectiv cardiac este prezentată în ***Fig.49A-D.***

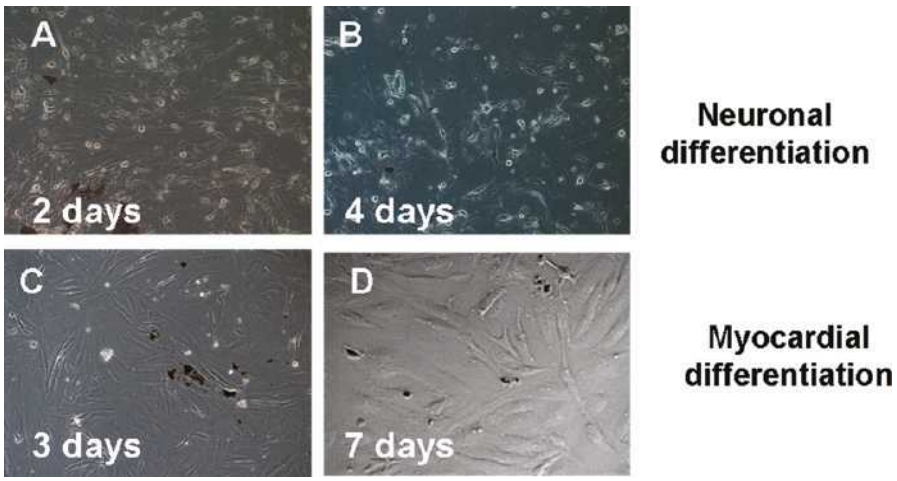


Fig.49A-D Imagini de microscopie optică preluate în lumină albă a celulelor cultivate pe substrat de colagen metalizat fiind expuse la stimulare electrică în mediu de diferenţiere spre neuronal: (***A, B***) MSc după 2 zile şi (***B***) după 4 zile de stimulare electrică (magnificarea 100x); (***C, D***) celule MSC după 3 zile (***C***), respectiv 7 zile de expunere (***D***).

I.4.1 Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu temozolomide

Temozolomide este un agent de alchilare folosit în tratamentul cancerului de glinoame şi melanoame. Medicamentul are proprietate de a alchila ADN-ul, cel mai adesea la poziţiile N-7sau 0-6 a guaninei. Această alchilare a ADN–ului duce la apoptoza celulelor canceroase. Prin functionalizarea acestui medicament cu nanoparticulele de aur dorec să îmbunătăţesc eficienta medicamentului în gradul III şi IV al tumorii. Am arătat în ***I.4.4*** că, compusul rezultat în urma funcţionalizarii este internalizat în concentraţii mai mari de către celulele canceroase în comparaţie cu cele normale datorită neovascularitatii mărite. Această proprietate a noanostructurii aur-medicament conferindu-i proprietăţi terapeutice superioare.

Mod de lucru: Nanosparticulele de aur de aur funcţionalizate cu acid aspartic (**cap I.1.2.2**) au fost supuse unei reacţii de cuplare cu medicamentul. Peste 10 ml soluţie de nanostructuri triunghiulare, aur-acid aspartic, sintetizate după metoda descrisa la **cap I.1.2.2,** s-a adăugat sub agitare intensă pe baie de gheaţă, 200 µl TMZ (50 µl/ml). S-a continuat agitarea timp de 1 oră, după care s-a trecut la purificare prin centrifugări (15000 rpm timp de 1 oră) şi spălări succesive cu PBS. După purificare compusul rezultat a fost

redispersat în PBS la concentraţ ia de 5 µg/ml.

Mecanismul de funcţ ionalizare propus este reprezentat schematic în Figura 56.

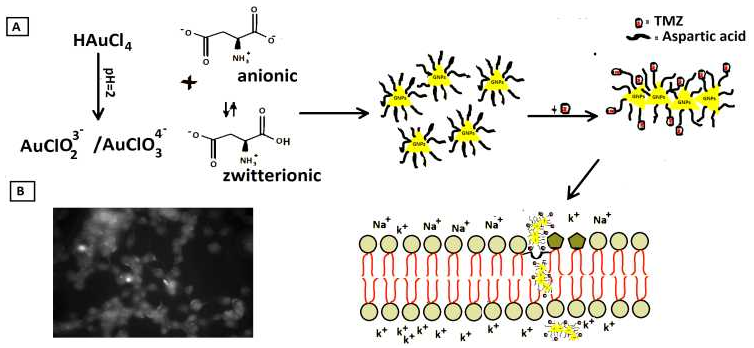


Fig.56.A,B- *Funcţionalizarea nanostructurilor de aur cu temozolomide. Formarea nanostructurii GNPs-L-Asp-TMZ (**A**), Internalizarea acestora în celulele stem glioblastomice (**B**).*

Natura legăturii medicament - L-Aspartic-GNPs este un element important cu un impact semnificativ asupra stabilităţ ii sistemului. În prima etapă s-a sintetizat nanostructura de aur, L-Aspartic-GNPs, reducerea HAuCl4 efectuându-se în mediu acid, pH=2, în prezenţ a moleculelor de L-Aspartate . Acidul cloroauric în mediu acid formează complecşii: $AuCl_2O_2^{-3}$ şi $AuClO_3^{4-}$ care se adsorb pe suprafaţ a moleculelor de aspartat, reducându-se la Au(0). Nanoparticulele de aur formate sunt în continuare stabilizate printr-o legătură chimică covalentă care se realizează între gruparea NH_2 a aminoacidului şi acestea. În etapa următoare se efectuează cuplarea nanostructurii aur-acid aspartic cu medicamentul (TMZ). Cuplarea medicamentului cu acidul aspartic se realizează prin legături electrostatice, cel mai probabil între grupările COOH ale aminoacidului şi NH_2 ale medicamentului.

Structurile nou create ale medicamentului cu nanostructura de aur au fost caracterizate prin tehnici ce au presupus măsurători de: microscopie electronică de transmisie (TEM), spectroscopia FTIR şi XPS. Rezultatele analizei TEM alături de histograma de distribuţ ie a mărimii particulelor este prezentat în ***Fig.57a-c.***

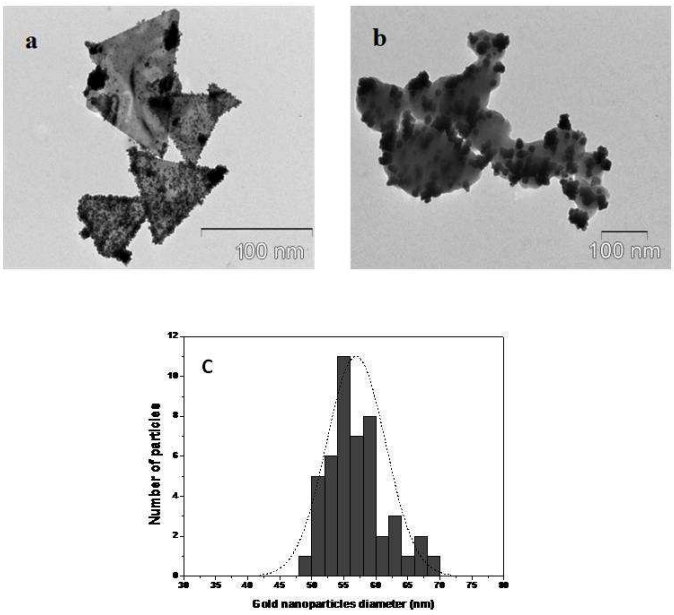


Fig.57.a, b, c*. Imaginile TEM ale (**a**)Nanostructurii GNPs-L-Aspartat (**b**) Nanostructura funcţ ionalizată cu temozolomide, a sistemului GNPs-L-Aspartate-TMZ (**c**) Histograma distribuţ iei nanoparticulelor de aur.*

Imaginile TEM confirma funcţ ionalizarea nanostructurilor de aur cu temozolomide, un strat subţ ire de medicament acoperind suprafaţ a lanţ urilor de nanostructuri, cu diametru mediu de 55 nm şi lungime medie de sute de µm (***Fig.57.a, b***). De precizat faptul că nanostructurile astfel funcţ ionalizate au o stabilitate mărită, nu apare nici un semn de agregare chiar şi după un an de la preparare.

Funcţ ionalizarea cu temozolomide a nanostructurilor de aur este confirmată şi de spectroscopia FTIR, spectrul obţ inut este reprezentat în ***Fig.58***

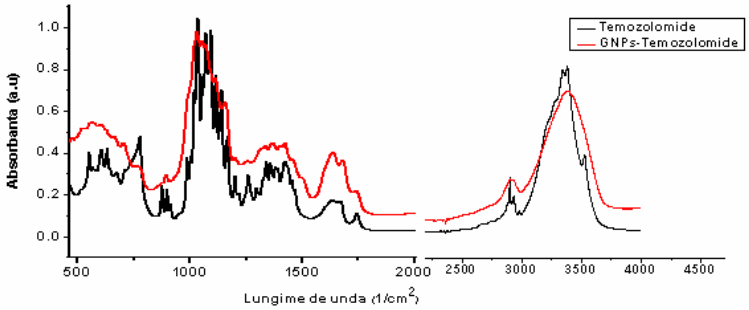


Fig.58 *Spectrul FTIR al medicamentului pur (**negru**) în comparaţ ie cu cel al*

*nanostructurii cuplate (GNPs-Temozolomide),(**rosu**)*

Spectrul FTIR al medicamentului pur, temozolomide, prezintă trei benzi la 3339, 3381 si 3526 cm^{-1} date de vibraţiile gruparilor NH_2 şi OH, în timp ce alte două benzi în jur de 2935 cm^{-1} şi 2899 cm^{-1} sunt date de către vibraţiile grupărilor alifatice metilenice. După funcţionalizare cu nanostructura de aur în această regiune apar doar două benzi: la 3389 cm^{-1} dată de vibraţiile grupei $NH3^{+}$ şi 2934 cm^{-1} pentru vibraţiile C-H şi CH_3. Această schimbare se datorează interacţiunilor electrostatice între aceste grupări cu nanostructura de aur.

La 1746 cm^{-1} apare banda caracteristică inelului cetonic care este similară cu ceea a medicamentului pur. Amida I este indirect influenţată de către gruparea aminică, NH_2-nanostructura având un pic poziţionat la 1682 cm^{-1}, în timp ce picul MTZ-ului pur apare la 1672 cm^{-1}.

I.4.2. Funcţionalizarea nanoparticulelor de aur cu cisplatin, doxorubicina si capecitabine

Cisplatinul, doxorubicina şi capecitabinele sunt la ora actuală cele mai folosite medicamente anticancer. Administrarea directă a acestor antitumorale micşorează capacitatea de internalizare în tumoare, biodistribindu-se în toate celulele ceea ce are ca rezultat un efect terapeutic diminuat si o amplificare a efectelor secundare[228].

Mecanismul reacţiilor de cuplare a nanostructurilor de aur, este acelaşi ca şi în cazul funcţionalizarii cu temozolomide, cu deosebirea că în acest caz nanoparticulele au formă sferică. (***Fig.61***)

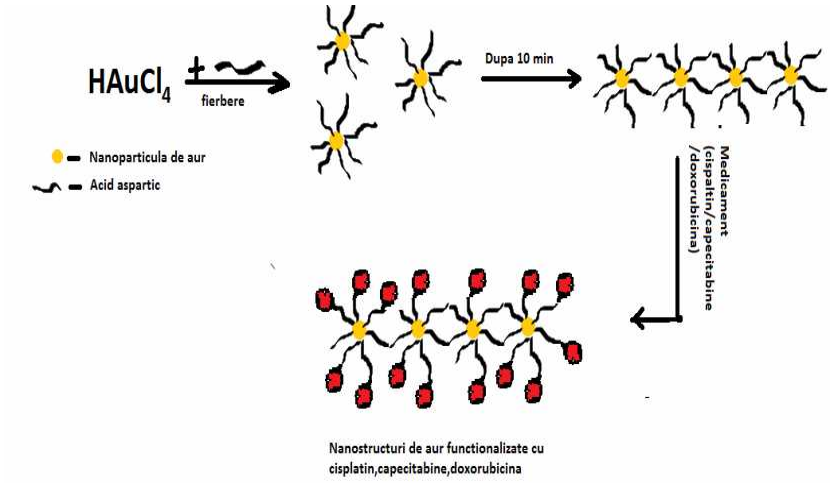


Fig.61: *Funcţ ionalizarea nanoparticulelor de aur stabilizate cu acid aspartic cu cisplatin, capecitabine şi doxorubicina*

Caracterizarea fizico-chimică si morfologica a produşilor rezultaţ i s-a efectuat prin microscopia electronică de transmisie, spectroscopia FTIR.

Imaginile TEM sunt prezentate in ***Fig.62a-d,*** si evidenţ iază ataşarea de medicament pe suprafaţ a nanoparticulelor stabilizate, pelicula de medicament acoperă în întregime nanoparticula.

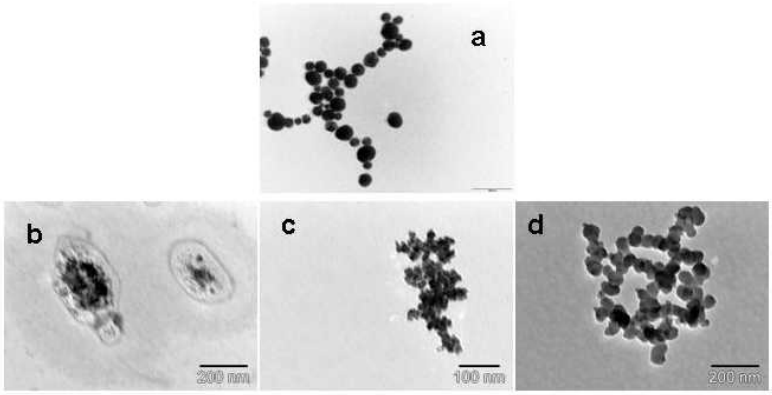


Fig.62a-d: Imaginile TEM ale nanoparticulelor funcţ ionalizate cu nanoparticule stabilizate cu acid aspartic (a), cisplatin (b), capecitabine(c), doxrubicina (d).

Interacţ iunea dintre medicament şi nanostructura de aur-acid aspartic este dependenta de natura medicamentului precum şi de grupările funcţ ionale ale acestuia.

Aşa după cum rezultă din imaginile TEM, nanoparticulele se rearanjează şi îşi modifica dimensiunile, rămânând insă tot în domeniul nanometrilor.

Grupările prin intermediul cărora s-a realizat functionalizarea au fost investigate prin analiza de spectroscopie FTIR, rezultatele fiind prezentate în ***Fig.63a-c.***

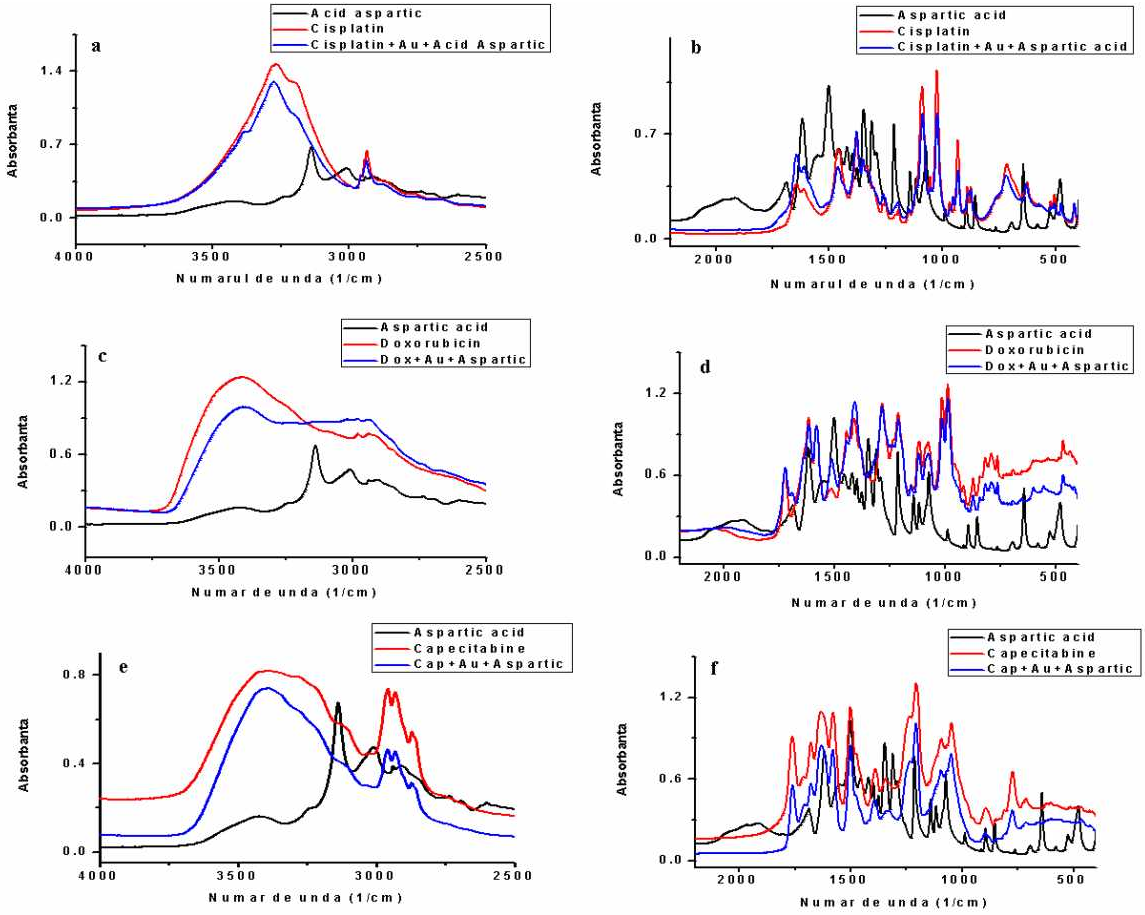


Fig.63a,b,c,d *Spectrul FTIR al medicamentului pur(**negru rosu**) în comparaţ ie cu cel al nanostructurii cuplate (GNPs-cisplatin),(**albastru**). Spectrul de culoare **neagra** fiind spectrul ligandului de la suprafata nanoparticulelor de aur .Sus-cisplatin, mijloc-doxorubicina, jos-capecitabine*

În cazul funcţionalizarii nanoparticulelor de aur cu doxorubicina, ***Fig.63c,d*** remarcam faptul că toate picurile şi-au schimbat poziţia cu excepţia benzii date de gruparea fenil. Banda largă din intervalul 3200–3700 cm^{-1} este caracteristica grupărilor N–H, –OH ataşate pe suprafaţa nanostructurii de aur. Banda corespunzătoare vibraţiilor C-H se deplasează sper valori mai mici, de la 2980 cm^{-1} la 2978 cm^{-1}. Deasemenea apariţia legăturilor de hidrogen între grupările N-H, C=O, $C-H_2$, O-H din molecula de doxorubicina şi nanostructura de aur determina schimbarea frecvenţei de la 1722 cm^{-1} la 1721 cm^{-1}. Banda de la 1580 cm^{-1} specifică inelului aromatic apare în spectru nemodificata.Vibraţiile grupărilor carboxilice din doxorubicina sunt vizibile în regiunea 1400–1445 cm^{-1} împreună cu întinderea grupărilor C–O–C asimentrice. O altă schimbare de poziţie, de la 1076 la 1073 cm^{-1} este atribuită grupărilor alifatice CH_X din structura doxorubicinei.

Spectrele funcţionalizarii nanoparticulelor cu cisplatin respectiv capecitabine sunt prezentate în ***Fig.63a,be,f.*** După funcţionalizare benzile corespunzătoare cisplatinului apar deplsate dar menţinându-şi forma iniţială (***Fig.63a,b***). Vibraţiile simetrice şi asimetrice grupării $N-H_x$ sunt suprapuse şi apar în intervalul 3388 cm^{-1}-3186 cm^{-1}. Deformaţiile simetrice datorită mişcării vibraţie şi de rotaţie, atât în plan cât şi în afara planului, apar între 1642 cm^{-1}-715 cm^{-1}. Regiunea 628 - 415 cm^{-1} corespunde vibraţiilor simetrice şi asimetrice a legăturii -N-Pt.

În ***Fig.63e,f*** sunt prezentate spectrele caracteristice funcţionalizarii cu capecitabine. Un pic extins apare la 3385 cm^{-1} datorită grupărilor O–H/N–H atribuite aurului. Banda la 1678 cm^{-1} apare datorită grupărilor carbonil pirimidinice, în timp ce vibraţiile corespunzătoare carbonil din uratan apar la 1757 cm^{-1}. Benzile caracteristice legăturii C-F precum şi cele datorate de prezenţa inelului tetrahidrofuran apar la 1045 şi 1205 cm^{-1}.

I.4.3 Aplicaţii ale nanoparticulelor de aur funcţionalizate cu cisplatin, capecitabine şi doxorubicina în terapia cancerului hepatic

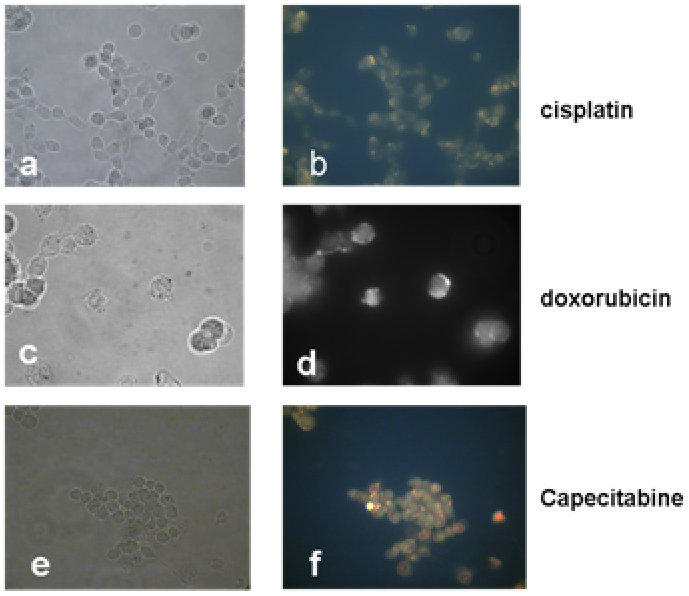
Hepatocarcenomul (cancerul de ficat), reprezintă în prezent una din cele mai răspândite tumori care provoacă pe plan mondial 500000 de decese[229-230]. În ultimul timp s-a încercat tratamentul acestuia prin utilizarea ca vectori transportori a diferitelor nanomateriale precum: polimeri, dendrimeri, lipozomi nanotuburi de carbon, şi alte

nanomateriale la scara nano[235].

Rezultate şi discuţ ii

Internalizarea nanostructurilor de aur-medicamente.

Gradul de absorbţ ie a medicamentului în celule influenţ ează efectele terapeutice ale acestuia. Confirmarea capacităţ ii de adsorbţ iei a nanostructurilor funcţ ionalizate cu citostatice este foarte importantă pentru a evidenţ ia rolul nanoparticulelor. Celulele incubate cu diferite combinaţ ii de medicamente au fost internalizate şi analizate prin microscopie optică (microscopie în lumină albă, fluorescenta la 488 nm) şi electronică (TEM). Imaginile de microscopie optică au fost luate cu ajutorul unui microscop Zeiss Axiovert. Achiziţ ie de imagine a fost efectuat cu o cameră AxioCam MRC.Rezultatele sunt prezentate în ***Fig.64a,f***.



.***Fig.64a,f*** *Internalizarea nanostructurilor de aur funcţ ionalizate cu citostatice în celulele stem canceroase (CSC): cisplatin (**a**)-imagine în lumină albă, (**b**) -imagini în lumina florescenţ a doxorubicina (**c**) -imagine în lumină albă, (**d**)- imagine în lumina florescenţ a, capecitabine (**e**) -imagine în lumină albă, (**f**)- imagine în lumina florescenţ a. Magnitudine 1000x.*

Imaginile de microscopie optică atât în lumină albă cât şi în florescenţ a arata clar că

nanoparticulele de aur sunt distribuite individual în interiorul celulelor. Datorită proprietăţilor optice ale aurului acesta emite la 563-410. [237] In cazul de fata emisia maximă a apărut la 488 nM datorită dimensiunii nanoparticulelor dar şi datorită funcţionalizarii lor.

Mai mult microscopia electronica confirma si ea internalizarea, ***Fig.65a-f***.

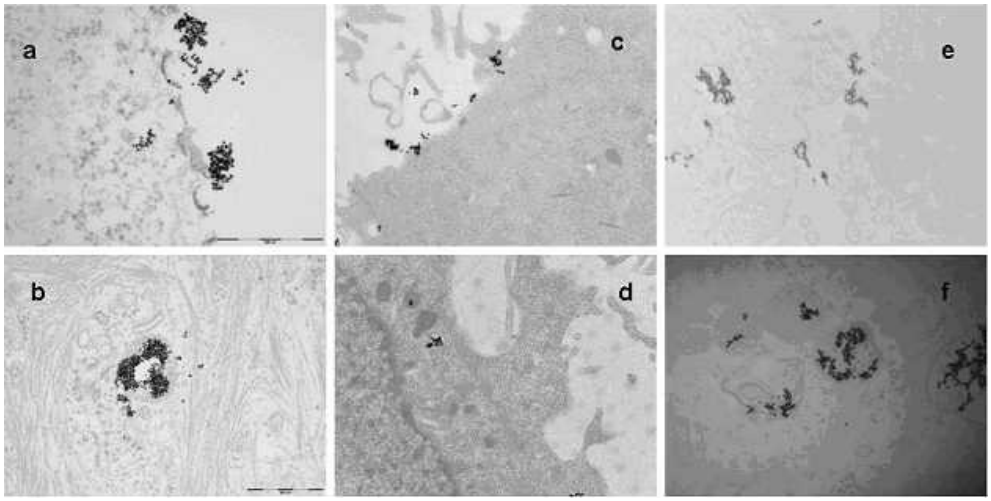


Fig.65a-f *Imagini TEM ale nanastructurilor de au functionalizate internalizate in celule CSC: (**a, b**) cisplatin, (**c, d**)capecitabine, (**e,f**) doxorubicina*

Nanostructurile funcţionalizate se internalizeaza în celule prin intermediul endocitozei. Iniţial acestea se ataşează pe membrana celulară şi apoi se internalizeaza cu ajutorul endozomilor. Cantitatea de nanoparticule internalizate creşte cu creşterea timpului de incubare.

Testul de citotoxicitate MTT

Concentraţiile medicamentelor funcţionalizate testate au fost folosite după protocolul PIAF: Doxorubicina a fost adăugată în concentraţie de 0,5 µg /ml, cisplatinul 0,25 µg/ml, capecitabine 30 µg / ml şi ribavirină5µg/ml. În ambele probe (medicament pur, medicament funcţionalizat cu aur) s-a adăugat ribavirina a cărei concentraţie a fost 2 µg /ml (Protocolul PIAF folosit în Institutul Oncologic ''Ion Chiricuţă'', Cluj Napoca).

Fig.66 prezintă diferenţe de intensitatea a culorii MTT între liniile CSC, LIV şi HepG2 celule, când acestea au fost tratate cu medicament pur şi respectiv functionalizat cu nanostructuri de aur.

Fig.66 *- Diferenţa între intensitatea culorilor la diferite linii de celule: CSC, LIV şi Hep G2, atunci când acestea au fost tratate cu medicamente funcţionalizate.*

Este evidentă diferenţa de intensitate a culorii celulelor canceroase HepG2 şi cele CSC (stemuri canceroase), medicamentul funcţionalizat este mai eficient, culoarea are intensitate mai scăzută decât în cazul culorii celulelor normale Liv. Aceste diferenţe vizibile macroscopic au fost confirmate şi de valorile testului MTT(***Fig.67A-F***).

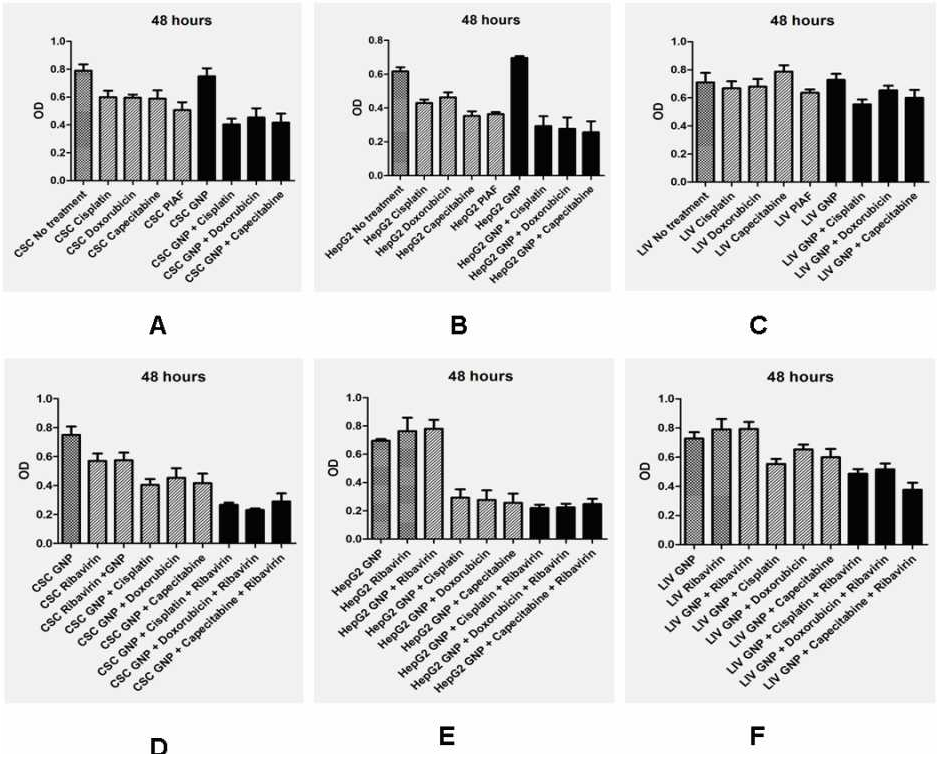


Fig.67 A-F *Rezultatele testului MTT după 48 h de tratament cu medicament*

funcţ ionalizat şi control (medicament pur) pe liniile de celule canceroase HepG2, CSC, Liv.

Din graficele din ***Fig.67 A-F*** rezultă că celulele stem,CSC, în comparaţ ie cu celulele HepG2, sunt rezistente la medicamentele pure, dar atunci când se adaugă nanostructurile de aur funcţ ionalizate cu medicament, rezultatele arată o supravieţ uire redusă a celulelor tumorale, atât HepG2 cât mai ales CSC. De asemenea se constată că celulele normale hepatice sunt afectate foarte puţ in.

Analiza celulelor apoptice şi necrotice prin Citometria de flux

Testele de apoptoză s-au realizat cu ajutorul unui chit specific. Acest test are la bază o reacţ ie de culoare cu ajutorul annexin V- FITC (florescenţ a) şi PI (roşu). Testul s-a efectuat pe celule normale LIV şi canceroase stem CSC cu un aparat flowcitometru, după ce acestea au fost expuse timp de 24 h la tratamentul cu o combinaţ ie de nanostructuri funcţ ionalizate precum şi medicament pur (conform protocolului PIAF). Apoptoza celulelor a fost mare chiar şi în control, cel mai probabil datorită tripsinizarii şi timpului scurs de la pregătirea probelor până în momentul analizei, deşi au fost menţ inute pe baie de gheaţ ă.

În cazul tratamentului cu medicament funcţ ionalizat procentul de celule apoptotice totale (celule apoptotice tinere care dau răspuns pozitiv numai pentru annexin V + celule apoptotice târzii au răspuns pozitiv atât pentru annexin V cât şi PI) arată un indice de moarte celulară mult mai mare atât pentru pentru toate liniile de celule (cât şi pentru control -40,1%) în comparaţ ie cu medicamentul nefuncţ ionalizat.

Procentul de celule moarte apoptotice este prezentat în ***Tab.8.***

Tab.8*: Procentul de celule moarte apoptotice folosind protocolul PIAF pentru medicamentul pur, funcţ ionalizat şi control*

Probe	Celule apoptotice tinere (%)	Celule apoptotice târzii (%)	Total cellule moarte
LIV control	**4.1**	**36.0**	**40.1**
LIV tratate cu GNP-PIAF	**1**	**60.3**	**61.3**
LIV tratate cu PIAF	**3.7**	**41.2**	**44.9**
CSC control	**9.7**	**6.2**	**15.9**
CSC tratate cu GNP-PIAF	**8**	**27.9**	**35.9**
CSCtratate cu PIAF	**0**	**26.1**	**26.1**

I.4.4 Aplicaţ ii ale nanoparticulelor de aur funcţ ionalizate cu temodal în terapia cancerului de glinoame

Testul de citotoxicitate MTT

Nanostructurile de aur utilizate în acest experiment s-a făcut după metoda de reducere şi funcţ ionalizare cu acid aspartic descrisă în capitolul în **I.4.1.**

Am investigat interacţ iunea şi comportamentul de celule stem canceroase gliale atunci când acestea sunt în contact cu sistemul, GNP-L-Aspartat-TMZ..Internalizarea GNP-L-Aspartat-TMZ a fost monitorizată după 24 ore de la tratament folosind un microscop optic Zeiss. Rezultatele sunt prezentate in ***Fig.69b*** Analizand rezultatele obtinute am constatat ca medicamentul intra in celulele inca dupa prima ora de tratament După 24 h de tratament celulele au fiind afectate, schimbările drastice ale morfologie sugerează ca acestea se afla intr-o etapă de pre-apoptotoza cu o acumulare de nanoparticule in spatiul perinuclear.

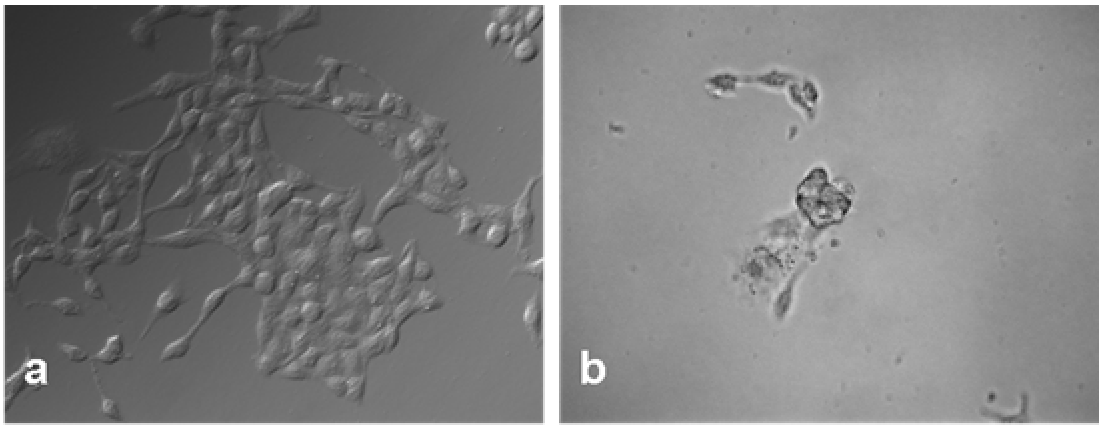


Fig.69a,b Internalizarea GNP-L-aspartat-TMZ după 24 ore (a) Celule Stem maligne, control, (microscopie in lumină alba, contrast de fază PlasDIC, mărire 400x), (b) Internalizarea gnp-L-aspartat-TMZ după 24 ore, (PlasDIC contrast de fază, mărire 400x)

Mod de lucru:

Cultura de celule precum, testul de citotoxicitate s-a făcut după o procedură similară descrisă în **I.4.3** pe celulele hepatice (capitol de la aplicaţ ii hepatic).

Celulele stem gliale iniţ ial prezentau rezistenta la chimioterapie cu medicament nefuncţ ionalizat, dar atunci când i s-a adăugat nanostructura GNPs-Aspartat-TMZ

rezultatele arată o supravieţuire redusă a acestora. Rezultatele au fost analizate statistic cu ajutorul programului Graph Prism 5, semnificaţia statistică a activităţii medicamentului funcţionalizat este de 0.5345 în raport cu cel nefuncţionalizat 0.09214 (95% CI , P<0.05). Rezultatele testului de citotoxicitate sunt prezentate în ***Fig.69.***

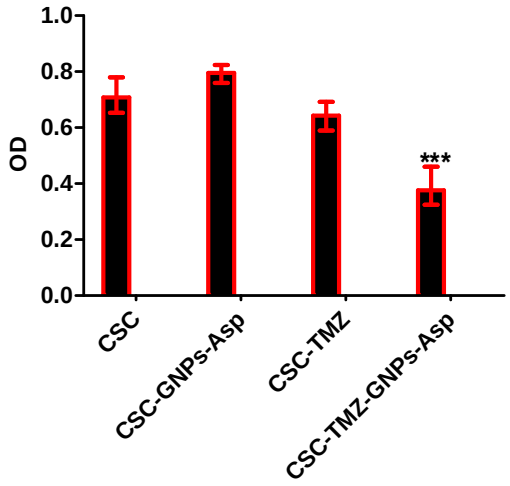


Fig.69 Rezultatele testului MTT după 48 h de tratament cu medicament funcţionalizat (TMZ-GNPs-Asp) şi control (medicament pur- TMZ) pe liniile de celule canceroase stem gliale.

Datorită populaţiei mici de celule stem gliale maligne, glioblastomul are un răspuns negativ la diferite tratamentele convenţionale. Eficienţa tratamentului cu nanostructura funcţionalizată cu TMZ este cu aproximativ 50% mai mare decât cu temozolomida pură. Rezultatele obţinute relevă că e posibilă o elaborarea unei noi metodologii de tratament pentru pacienţii diagnosticaţi cu cancer de glinoame.

II. Distrugerea controlată a structurilor subcelulare în terapia cancerului

Iradierea cu laser de puteri mici a celulelor canceroase care conţin nanoparticule de aur în endosomi, determina rupturi ale acestora şi migrarea nanoparticulelor în citoplasma.

Fenomenul de distrugere a celulelor canceroase poate fi controlat simultan prin mai multe căi: puterea laserului, timpul de expunere la iradiere, diametrul particulelor şi concentraţia lor. Dintre aceşti factori, în cadrul studiului interprins, parametrii studiaţi s-

au redus la: puterea laserului, timpul de expunere la laser, concentraţ ia nanoparticulelor de aur. Observaţ iile au fost făcute in urma anlizelor TEM şi de microscopie optică, iar viabilitatea celulelor am testat-o cu testul de viabilitate celulară utilizând reactivul – ''tryptan blue'' .

Analiza TEM care demonstraza atat internalizarea nanoparticulelor cat si modul in care celulelel au fost distruse si s-a efectuat la 3 min respective 23 min după iradiere.

Fig.71 prezintă imaginile TEM la 3 min – 24 min după radiere în comparaţ ie cu celulele neiradiate.

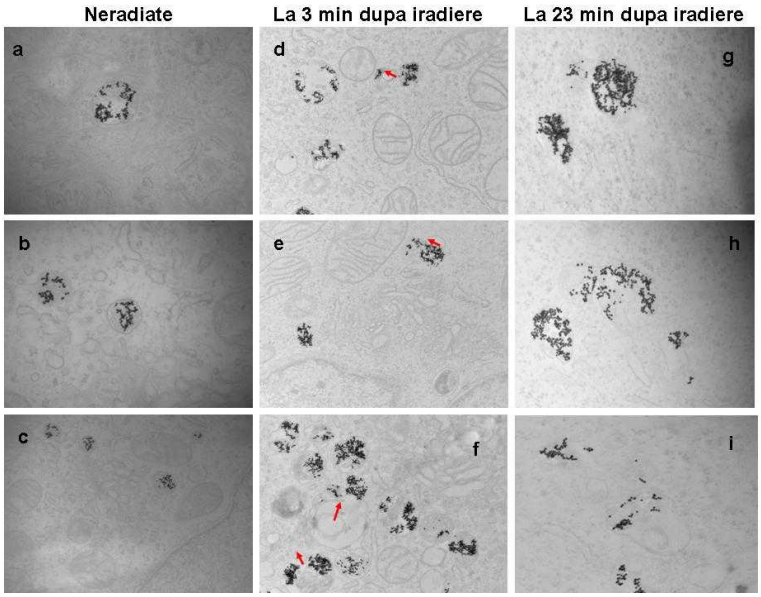


Fig.71*: Imagini TEM ale celulelor Hella conţ inând nanoparticule de aur, celule incubate timp de 9h;* ***(a,b,c****)-neiradiate,* ***(d,e,f)*** *la 3 min după iradiere şi* ***(g,h,i)*** *la 23 min după iradiere.*

II.1.1 Influenţ a concentraţ iei si puterii laserului asupra mortalitatii celulare

Aşa după cum rezultă din măsurătorile experimentale rezultate concentraţ ia nanoparticulelor de aur internalizate în celule joacă un rol important în procesul de distrugere a celulelor canceroase. Concentraţ ia nanoparticulelor este dependenta de timpul de incubare. În cadrul studiului interprins am determinat concentraţ ia nanoparticulelor după 1h, 3h, 9h, 24h de incubare.

Modul de lucru: După timpii de incubare indicaţ i, celulele au fost spălate de 3 ori cu

soluţ ie de PBS pentru a îndepărta excesul de nanoparticule neinternalizate. Masa de celule rezultate a fost tratată cu apă regală pentru dizolvarea aurului apoi a fost supusă analizei elementare prin analiza ASP. Rezultatele sunt prezentate în ***Tab.9.***

Tab.9: Concentraţ ia nanoparticulelor de aur internalizate după diferiţ i timpi de incubare.

Timp de incubare	**Concentratia de nanoparticule internalizata**
1Hr	0.865ppm
3Hr	1.074ppm
9Hr	3.409ppm
24Hr	3.488ppm

Puterea radiaţ iei are o influenţ ă majoră atât asupra vitezei de distrugere cât şi a numărului final de celule moarte. Pentru a evidenţ ia intensitatea radiaţ iei asupra modului şi gradului de distrugere a celulelor canceroase s-a lucrat la trei puteri ale laserului: 0,5w, 1 w şi 1,5 w timpul de iradiere folosit în toate cazurile fiind de 2 minute.
Rezultatele obţ inute sunt prezentate în ***Fig.74 a, b,c***.

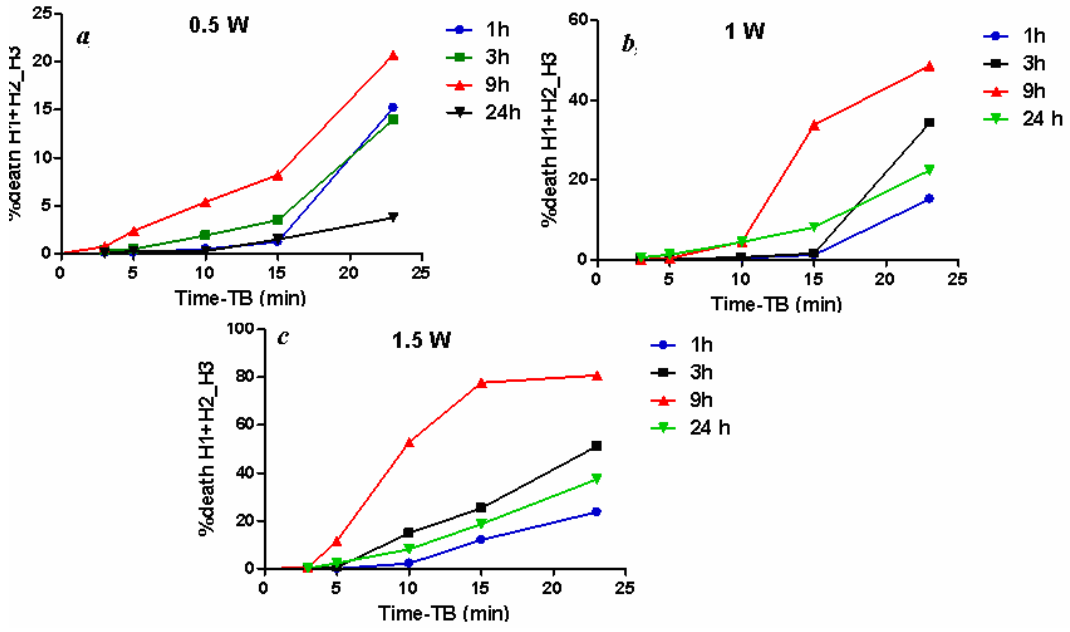


Fig.74 a, b,c*.- Dinamica distrugerii celulelor canceroase în funcţ ie de puterea laserului*

*şi concentraţ ia de nanoparticule corespunzătoare timpilor de incubare (**a**) 0, 5 w la 1, 3,9,24 h (**b**) 1 w la 1, 3,9,24 h (**c**) 1,5 w la 1, 3,9,24 h*

În toate cazurile punctele din diagrame reprezintă media a trei măsurători paralele, a căror valori sunt prezentate în banca de date.

Analiza datelor din ***Fig.74 a, b,c***. arată că la concentraţ ii mici ale aurului (1h) indiferent de puterea laserului utilizat gradul de distrugere are valori foarte mici nedepăşind 20% (la puterea de 1,5 w şi concentraţ ia corespunzătoare 1h de incubare). De asemenea timpul de inducţ ie, adică timpul după care apar primele celule moarte scade de la 10 minute, corespunzătoare puterii de 0,5 w şi timp de incubare 1 h, la 5 minute pentru putere de 1,5 w.

Odată cu creşterea concentraţ iei de nanoparticule internalizate (concentraţ ie corespunzătoare incubării de 3 h) tot la putere mică de iradiere, 0,5 w, gradul de distrugere descreşte atingând valori finale de 13,96%. Această descreştere se datorează erorilor care apar la puteri mici ale laserului. Timpul de inducţ ie scade şi el de la 10 minute pentru puterea de 1w la 5 minute pentru puterea de 1,5 w. La puteri mici ale laserului saltul privind mortalitatea nu se modifica semnificativ la concentraţ ii corespunzătoare timpilor de inducţ ie de 9 respectiv 24h. Anomaliile rezultate în ***Fig.74 a*** pot fi puse pe seama erorilor de măsurare dar mai ales pe capacitatea celulelor de apărare.

Un salt foarte mare privind gradul de distrugere se constata pentru o putere a laserului mai mare de 1 w şi o concentraţ ie a particulelor c de 1, 3 h. Pentru puterea de 1 w curbele din care rezultă gradul de mortalitate sunt foarte apropiate la 9 şi la 24 h, practic au aceeaşi panta, ceea ce arata distrugerea acestora după aceeaşi mecanism. La puterea de 1,5 w practic cele două curbe corespunzătoare 9-24h se suprapun după 10 minute. Pentru aceste condiţ ii în prima porţ iune curbele au o pantă ridicată ceea ce arata că reacţ ia chimică dintre radicalii liberi şi membrana celulară se desfăşoară cu viteză mare.

Comparând rezultatele pentru puterile 1w repectiv 1.5 w, după 10 minute de la iradiere se constată o creştere a gradului de mortalitate astfel: pentru 1 w - concentraţ ia de 9h- creşte de la de la 4.53% (1w) la 48.61% în timp ce pentru 1.5 w –concentarie 9h de la 52.89%-80.82%. De asemenea pentru concentraţ ia corespunzătoare la 24 ore de incubare sunt aproape identice, diferenţ a fiind doar de ordinal unităţ ilor.

În ***Fig.75*** sunt prezentate rezultatele privind influenta concentraţ iei (24 h de incubare) la cele trei puteri utilizate, 0.5 w, 1w şi respectiv 1,5 w.

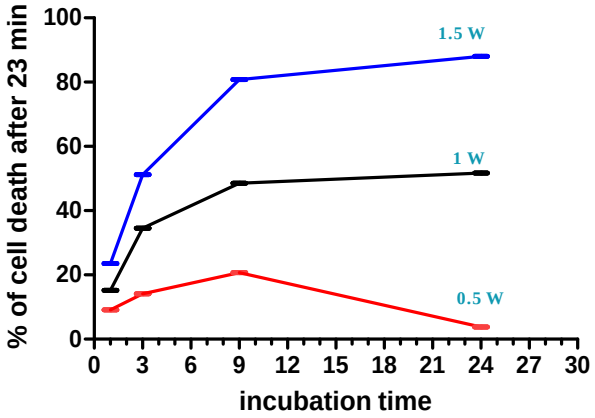


Fig.75: Influenta concentraţ iei asupra gradului de mortalitate

După 9h gradul de mortalitate un se mai modifica cu concentraţ ia, acesta creşte odată cu puterea laserului. Acesta demonstrează că după 9h se atinge echilibru de internalizare.

II.1.2 Influenţ a timpului de expunere la iradiere

Am văzut în subcapitolul anterior că intensitatea radiaţ iei joacă un rol hotărâtor în dinamica mortalităţ ii celulelor canceroase. Odată cu creşterea puterii radiaţ iei practic creşte energia electronilor de pe nivelul Fermi, se crează astfel condiţ iile ca un număr mare de electroni să participe la reacţ ie de formare a radicalilor liberi, astfel că se formează un număr mai mare de astfel de radicali. Energia transmită electronilor fiind dependenţ a şi de timpul de expunere la radiaţ ii, ea creşte cu timpul de expunere. Rezultatele privind influenta timpului de radiere asupra gradului de mortalitate a celulelor sunt prezentate în ***Fig.76,*** rezultatele fiind media a trei măsurători realizate în paralel. Detalii privind dinamica mortalităţ ii sunt prezentate în suportul de informaţ ii.

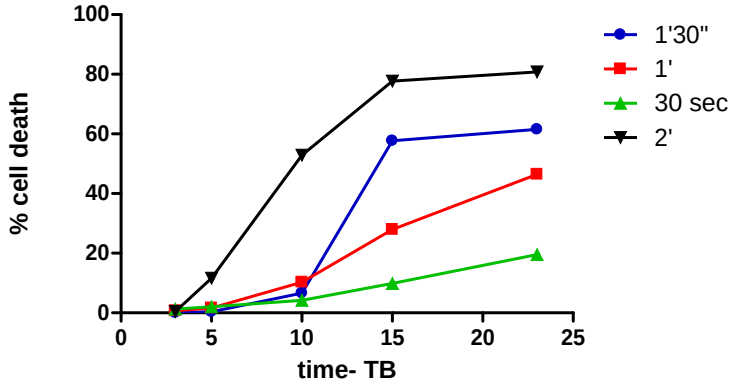


***Fig.76**: Influenta timpului de iradiere asupra dinamicii mortalităţ ii pentru puterea de 1,5 w şi concentraţ ie corespunzătoare incubării de 9h*

După primele 3 minute rezultatele sunt neconcludente, ca urmare a sistemului de autoapărare a celulelor, totuşi se poate afirma că timpul de inducţ ie, timpul după care apar primele celule moarte este de 3 min. Pentru timpi de expunere de până la 1 min 30 sec rezultate relevante privind moartea celulară după 10 minute. Creşterea este aproape liniara pentru timpi mici de radiere, 30 sec şi 1 min, în timp ce la timpi mari de iradiere 1.5, 2 min constata o creştere exponenţ ială. La timpul de iradiere de 2 min mortalităţ i semnificative se observă deja după 5 min dela iradiere. Distrugerea se realizează după după o curbă cu pantă constantă mare (viteză mare de reacţ ie) până la 15 min. După 15 min panta curbei este aproape nulă, mortalitatea modificându-se foarte puţ in.

Bibliografie

1) Ebbesen T, Ajayan P. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. Nature 1992;358(6383):220-222.

2) Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. Nature 1993;363(16): 603 – 605

3) Bethune D, Klang C, De Vries M, Gorman G, Savoy R, Vazquez J, et al. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 1993;363(16): 605 – 607.

4) Kratchmer W, Lamb L, Fostiropoulos K, Huffman D. Solid C60: a new form of carbon. Nature 1990;347(12):354-358.

5) Seraphin S. Single-walled tubes and encapsulation of nanocrystals into carbon clusters, J. Electrochem.Soc. 1995;142(10):290–297.

6) Thess A, Lee R, Nikolaev P, Dai H, Petit P, Robert J, et al. Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. Science 1996;273(5274):474-483.

7) Journet C, Maser W, Bernier P, Loiseau A, Lamy de La Chapelle, M., Lefrant S, et al. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. Nature 1997;388(6644):756-757.

8) Kong J, Cassell AM, Dai H. Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon nanotubes. Chem Phys Lett 1998;292(4-6):567-574.

9) Cassell AM, Raymakers JA, Kong J, Dai H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. J Phys Chem B 1999;103(31):6484-6492.

10) Pan L, Shoji T, Nagataki A, Nakayama Y. Field emission properties of titanium carbide coated carbon nanotube arrays. Adv Mat 2007;9(7):584-587.

11) Xiao R, Cho SI, Liu R, Lee SB. Controlled electrochemical synthesis of conductive polymer nanotube structures. J Am Chem Soc 2007;129(14):4483-4489.

12) Yan Y, Zheng W, Su L, Mao L. Carbon Nanotube Based Glucose/O2 Biofuel Cells. Adv Mater 2006;18(19):2639-2643.

13) S. A. Hooker, R. Geiss, R. Schilt, A. Rand Kar, ''Elevated temperature QCM for nanotube quality control'', Amer. Cer. Soc, 1997;58(1):43-58,

14) Suh DJ, Kwak C, Kim JH, Kwon SM, Park TJ. Removal of carbon monoxide from hydrogen-rich fuels by selective low-temperature oxidation over base metal added

platinum catalysts. J Power Sources 2005;142(1-2):70-74.

15) Li H, Rosario A, Davis S, Glass T, Holland T, Davis R, et al. Network formation of vinylester-styrene composite matrix resins. J Adv Mater 1997;28(4):55-62.

16) Klabunde KJ, Richards R. Nanoscale materials in chemistry. Poly and Mater, 2002;11(2):121-167.

17) Artemov D, Mori N, Okollie B, Bhujwalla ZM. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles. Mag Res Med 2003;49(3):403-408.

18) Forbes ZG, Yellen BB, Barbee KA, Friedman G. An approach to targeted drug delivery based on uniform magnetic fields. Magnetics, IEEE Transactions 2003;39(5):3372-3377.

19) Cao YC, Jin R, Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Raman dye-labeled nanoparticle probes for proteins. J Am Chem Soc 2003;125(48):14676-14677.

20) Molday RS, Mackenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. J Immunol Methods 1982;52(3):353-367.

190) Thomas KG, Zajicek J, Kamat PV. Surface binding properties of tetraoctylammonium bromide-capped gold nanoparticles. Langmuir 2002;18(9):3722-3727.

191) Selvakannan P, Mandal S, Phadtare S, Pasricha R, Sastry M. Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. Langmuir 2003;19(8):3545-3549.

192) Ongaro A, Griffin F, Beecher P, Nagle L, Iacopino D, Quinn A, et al. DNA-templated assembly of conducting gold nanowires between gold electrodes on a silicon oxide substrate. Chemistry of materials 2005;17(8):1959-1964.

193) Graham JS, Miron Y, Grandbois M. Assembly of collagen fibril meshes using gold nanoparticles functionalized with tris(hydroxymethyl)phosphine-alanine as multivalent cross-linking agents. J Mol Recognit. 2011;24(3):477-82

194) Zhong Z, Patskovskyy S, Bouvrette P, Luong JHT, Gedanken A. The surface chemistry of Au colloids and their interactions with functional amino acids. The Journal of Physical Chemistry B 2004;108(13):4046-4052.

195) Zhong Z, Luo J, Ang TP, Highfield J, Lin J, Gedanken A. Controlled organization of Au colloids into linear assemblies. The Journal of Physical Chemistry B 2004;108(47):18119-18123.

196) Shao Y, Jin Y, Dong S. Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride. Chem.Commun. 2004(9):1104-1105.

197) Zhong Z, Subramanian AS, Highfield J, Carpenter K, Gedanken A. From discrete particles to spherical aggregates: a simple approach to the self-assembly of Au colloids Chemistry 2005;11(5):1473-1478.

198) Polavarapu L, Xu QH. A single-step synthesis of gold nanochains using an amino acid as a capping agent and characterization of their optical properties. Nanotechnology 2008;19(2):075601.

201) Barnes WL, Dereux A, Ebbesen TW. Surface plasmon subwavelength optics. Nature 2003;424(6950):824-830.

202) Tang Z, Kotov NA. One-Dimensional Assemblies of Nanoparticles: Preparation, Properties, and Promise. Adv Mater 2005;17(8):951-962.

203) Cohen-Karni T, Timko BP, Weiss LE, Lieber CM. Flexible electrical recording from cells using nanowire transistor arrays. Process Nat Acad of Sci 2009;106(18):7309.

204) Kiely C, Fink J, Zheng J, Brust M, Bethell D, Schiffrin D. Ordered colloidal nanoalloys. Adv Mater 2000;12(9):640-643.

205)Lin S, Li M, Dujardin E, Girard C, Mann S. One-Dimensional Plasmon Coupling by Facile Self-Assembly of Gold Nanoparticles into Branched Chain Networks. Adv Mater 2005;17(21):2553-2559.

208) Castaneda L, Valle J, Yang N, Pluskat S, Slowinska K. Collagen cross-linking with Au nanoparticles. Biomacromolecules 2008;9(12):3383-3388.

209) Mahl D, Greulich C, Meyer-Zaika W, Köller M, Epple M. Gold nanoparticles: dispersibility in biological media and cell-biological effect. J.Mater.Chem. 2010;20(29):6176-6181.

210) Harris JR, Reiber A. Influence of saline and pH on collagen type I fibrillogenesis in vitro: fibril polymorphism and colloidal gold labelling. Micron 2007;38(5):513-521.

211) Orza A, Soritau O, Olenic L, Diudea M, Florea A, Rus Ciuca D, et al. Electrically Conductive Gold-Coated Collagen Nanofibers for Placental-Derived Mesenchymal Stem

Cells Enhanced Differentiation and Proliferation. ACS Nano 2011;5(6):4490-503

229) Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi GM, et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Gut 2010;59(7):953.

230)Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. International Journal of Cancer 2001;94(2):153-156.

235) Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. N Engl J Med. 2010;363(25):2434-2443

CURRICULUM VITAE

Nume: Anamaria Ioana Orza
Departamentul: : Departamentul de chimie organica
E-mail:, ioanna_orza@yahoo.com
Adresa : Arany Janos Str. no. 11 Cluj Napoca
Data Nasterii: September 30, 1986
Locul Nasterii: Sighetu-Marmatiei
Nationalitatea: Romana

EDUCATIE:

***2008-prezent*:**

Student PhD (chimie) –Universitatea Babes-Bolyai, Facultatea de Chimie si Inginerie Chimica

Proiect Cercetare:

Sinteza si caracterizarea nanosostemelor multifunctionale cu aur pentru aplicatii in medicina

Experienta de cercetare:

- Prepararea si functionalizarea cu biomolecule a diferitor nanostructure metalice (nanoparticule, aur, argint, fier, si hibride ale acestora), caracterizarea acestora prin tehnici UV-VIS, FTIR, TEM (inclusiv TEM pe cellule), RMN, caracteristici I-V.
- Culturi celulare precum si tehnici de analiza ca MTT, FDA, flowcitometrie, teste de imunohistochimie si tehnici de preghetire a celulelor pentru microscopie (inrasinarea celulelor, microtomie)

Conferinte

- ***Nationale***

'' Natural and Synthesized products applied in medicine '', 25 novembrie 2009, Cluj Napoca, Romania

Poster ''Collagen supported metallic nanowires'' , Anamaria Orza, Stela Pruneanu, Liliana Olenic, Adrian Florea, Mircea Diudea

Poster: ''Biomolecules with applications in molecular electronics'', Stela Pruneanu, Liliana Olenic, Anamaria Orza, A.Houtlon, B.R.Horracks

- ***Internationale***

1. **RomPhyschem14, 2-4 july 2010, Bucharest, Romania**

Poster*:* 'Single-step synthesis of gold nanowires using biomolecules as capping agent/template. Applications for tissue engineering''**,** A. Orza, C. Tomuleasa O. Soritau, A. Florea , S. Pruneanu, L. Olenic[d] M. Diudea.

2. **7th International Conference on Applied Mathematics (ICAM7) in Nano-ERA", 1-4 septembrie 2010, Cluj-Napoca Romania**

Prezentare Orala '' Highly Efficient Gold Nanoparticles Drug Delivery for *in Vivo* Therapy of malignant gliomas''Anamaria Orza, Olga Soritau, Ciprian Tomuleasca

3. **4th European Conference for Clinical Nanomedicine, May 23-25 2011, congres center Basel, Basel Switzerland**

Poster: ''Selectiv targeting of liver cancer via insulin growth factor based-gold nanoparticles vector'', Anamaria Orza, Lucian Mocan, Ariana Stir, Rares Stiutuc, Iulia Ferencz, Florin Zaharia, Teodora Mocan, Dana Iancu, Cornel Iancu

- ***Workshosp*:**

III European Workshop in Drug Synthesis, 23rd to 27th May, 2010 Siena, Italy

Poster si Prezentare orala, ''Synthesis Characterization and Synergetic Effect of Gold Nanoparticle-Cisplatin/ Doxorubicin/ Capecitabine Vectors on Hepatic Cancer Stem Cells ,Anamaria Orza[1], Ciprian Tomuleasca[2,3], Olga Soriţ ău[2], Olenic Liliana[4], Stela Pruneanu[4], Mircea Diudea[1]

Lucrari publicate:

1. **Morphological and electrical characteristics of amino acid–AuNP nanostructured two-dimensional ensembles,** Anamaria Orza, Olenic Liliana, Stela Pruneanu, Florina Pogacean, Alexandru Biris***, Chemical Physics, 2010;373(3):295-299***

2. **Conductive Collagen-based Gold Nanoparticles for Placental-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation,** Anamaria Orza, Olga Soritau, Liliana Olenic, Mircea Diudea, Adrian Florea, Dan Rus Ciuca,Carmen Mihu, Daniel Casciano, Alexandru S. Biris, **ASC Nano, 2011;5(6):4490-503**

3. **Enhanced LASER thermal ablation for *in vitro* liver cancer destruction by specific delivery of multi wall carbon nanotubes functionalized with human serum albumin,** Cornel Iancu ,Constantin Bele, Cornel Catoi, Anamaria Orza, Flaviu A. Tabaran Rares Stiufiuc, Ariana Stir, Cristian Matea, Dana Iancu[1], Florin Zaharie, Teodora Mocan, Lucian Mocan, ***International Journal of Nanomedicine*, 2011 6: 129–141**

4. **Selective ex-vivo photothermal ablation of human pancreatic cancer with albumin functionalized multiwalled carbon nanotubes,** Lucian Mocan, Flaviu A Tabaran,Teodora Mocan, Constantin Bele, Anamaria Ioana Orza, Ciprian Lucan, Rares Stiufiuc, Ioana Manaila, Ferencz Iulia, Iancu Dana, Florin Zaharie, Gelu Osian, Liviu Vlad, Cornel Iancu, ***International Journal of Nanomedicine 2011:6 915–928***

5. **Effect of gold nanoparticles conjugated with various anti-cancer drugs on lowering the chemoresistence of hepatic cancer stem-like** cells, Anamaria Orza[1,] Ciprian Tomuleasa[2], Olga Soritau[2], Olenic Liliana[3], Ioan Bratu[3], Mircea Diudea,[1] Sergiu Susman[2], Emoke Pall[5], Daniel Casciano[6], Alexandru S. Biris[6] ***-in pending ACS Nano***

6. **Temozolomide-loaded gold nanoparticles as an alternative chemotherapy option for inoperable recurrent malignant gliomas-** Anamaria Orza , Ciprian

Tomuleasa, Liliana Olenic, Olga Soriţ ău, Adrian Florea, Ovidiu Pana,Ioan Bratu, Mircea Diudea, Alexandru S. Biris***, in pending ACS Nano***

Patente:

1. **Sinteza si caracterizarea acidului aspartic raceemic folosit in scopuri biomedicale si tehnice,** Anamaria Orza, Mitre Viorel, Mitre Ioana-**OSIM Pat.No.A/01075**
2. **Process for obtaining ultra short functionalized MWCNTs by controlled oxidation,** Matea Cristian Tudor, Bele Constantin, Iancu Cornel, Mocan Lucian, Orza Anamaria-Ioana-**OSIM Pat.No.A/ 01134**

2004 – 2008

- ***Universitatea*** Babes- Bolyai , Facultatea de Chimie si Inginerie Chimica**, BSc (Chemie) Degree - Result: A**

Proiectul de cercetare final:

Titlul: Sinteza, functionalizarea and characterizarea a unor compusi metalici terpiridinici
Analize: H1-RMN, C13-RMN, Spectroscopie de masa

- ***Universitatea*** Babes- Bolyai, Facultatea de Studii Europene, Managementul Institutiilor Europene

2000-2004

- Liceul Regele Ferdinand, Matermatica Informatica, Sighetu-Marmatiei, Maramures