

Raport stiintific final pentru perioada mai 2018-aprilie 2020 aferent proiectului cu titlul

« Biomateriale obtinute din emulsii neapoase si incarcate cu medicamente » (NABIOMAT)

Contract Nr. 2/2018

Prezentarea succinta a proiectului

Sistemele de eliberare controlata a medicamentelor ofera numeroase avantaje în comparatie cu formele conventionale de dozare, inclusiv îmbunatatirea eficientei, toxicitate redusa si o mai buna toleranta din partea pacientului, prin urmare, o gama larga de nanoparticule (NP) au fost preparate. NP încărcate cu medicament sunt preparate direct din polimeri preformați sau prin polimerizare în emulsie care are avantajul obtinerii unui latex cu un continut ridicat in solid fara nicio etapa suplimentara de concentrare si un control mai bun al dimensiunii particulelor. În cazul mecanismelor de polimerizare sensibile la apa, cum ar fi polimerizarea anionică cu deschidere de ciclu (ROP) a ϵ -caprolactonei (CL), o polimerizare în emulsie neaposa este necesara.

Noi biomateriale pe baza de NP vor fi preparate prin polimerizare în emulsie. In aceste emulsii, stabilizarea va fi realizata prin utilizarea unor copolimeri dibloc bine definiti. Doua medicamente anticanceroase, unul hidrofoab și altul hidrofil, vor fi încapsulate în NP în timpul polimerizarii. O extensie o reprezinta sinteza unor biomateriale bifazice prin foto-polimerizarea fazei continui. Viteza de eliberare a medicamentului va fi determinată în funcție de caracteristicile NP. In plus, teste de citotoxicitate in vitro vor fi realizate pe trei linii de celule canceroase, cum ar fi: piele, san si pulmonare.

Obiectivele proiectului

Primul obiectiv general al acestui proiect este dezvoltarea de noi sisteme de eliberare a medicamentelor cu dimensiune controlata a particulelor bazate pe nanoparticule biocompatibile de PCL și PNVP preparate printr-o polimerizare in emulsie neaposa. In acest tip de emulsie, denumita in mod obisnuit emulsie ulei-in-ulei (o/o), picaturile de monomer sunt dispersate într-un ulei nemiscibil si stabilizarea poate fi realizata prin utilizarea copolimerilor bloc. S-a arătat că bloc copolimerii pot asigura o stabilitate mai mare pentru emulsiile o/o fata de surfactantii conventionali deoarece au o cinetică de desorbție mult mai lenta la interfata picaturilor.

Al doilea obiectiv major va fi studiul sistemului în care nu numai faza dispersata este polimerizabila, ci si faza continua. Pentru această abordare, care conduce la biomaterialele cu

două faze, se va utiliza un ulei biocompatibil PDMS funcționalizat (PDMS-DGE) și cele două faze ale emulsiei vor fi polimerizate prin două mecanisme distincte. Caracteristicile de biomaterial vor fi determinate atât pentru cele două tipuri de nanoparticule cât și pentru materialul bifazic.

Proiectul s-a desfășurat pe parcursul a 5 etape și și-a propus realizarea mai multor activități cu rezolvarea mai multor sarcini. În cele ce urmează sunt prezentate principalele rezultate obținute în urma îndeplinirii activităților proiectului, precum și modul lor de valorificare.

Etapa I : Sinteza și caracterizarea copolimerilor pe baza de PDMS

Activitate 1.1 : Sinteza copolimerilor pe baza de PDMS

1.1.1 Obținerea de PDMS-Br plecând de la un PDMS-OH

În vederea obținerii PDMS-ului funcționalizat cu o grupare terminală de tip Br s-a realizat următoarea reacție (Fig 1):

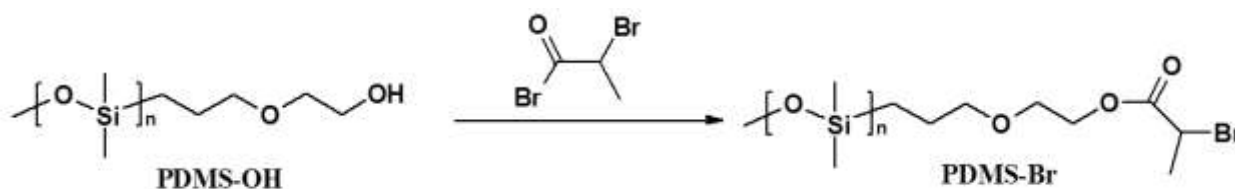


Fig.1 : Funcționalizarea PDMS-ului plecând de la un PDMS-OH

Pentru obținerea acestui produs s-a utilizat următorul mod operator: într-un balon de 500 ml s-au amestecat 4.22 mmol PDMS-OH ($M_n = 4600$ g/mol) cu 200 ml THF anhidru sub flux continuu de N_2 . Apoi s-au adăugat 21.1 mmol trietilamina $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ și balonul a fost introdus într-o baie de gheață (0°C). După 30 minute s-a picurat o soluție de 12.66 mmol $(\text{CH}_3)_2\text{CBrCOBr}$ (bromurii de isobutil) în 50 ml THF anhidru. După adăugarea completă a soluției de bromură, reacția a fost lăsată de temperatura ambianță timp de 20 ore. După acest timp, soluția a fost filtrată, THF a fost evaporat sub vid și produsul obținut a fost solubilizat în diclorometan și spălat de trei ori cu o soluție concentrată de carbonat de sodiu hidrogenat. Produsul obținut a fost uscat pe MgSO_4 , filtrat și solventul evaporat sub vid. La final s-a obținut un ulei galbui care va fi caracterizat prin RMN și SEC.

1.1.2 Obținerea de PDMS-xantat și PDMS- N_3 plecând de la un PDMS-Br

În vederea obținerii PDMS-ului funcționalizat cu o grupare terminală de tip xantat sau N_3 s-a folosit un PDMS-Br, anterior preparat. În Figura 2 este descrisă reacția de obținere a macroradicalului PDMS-xantat.

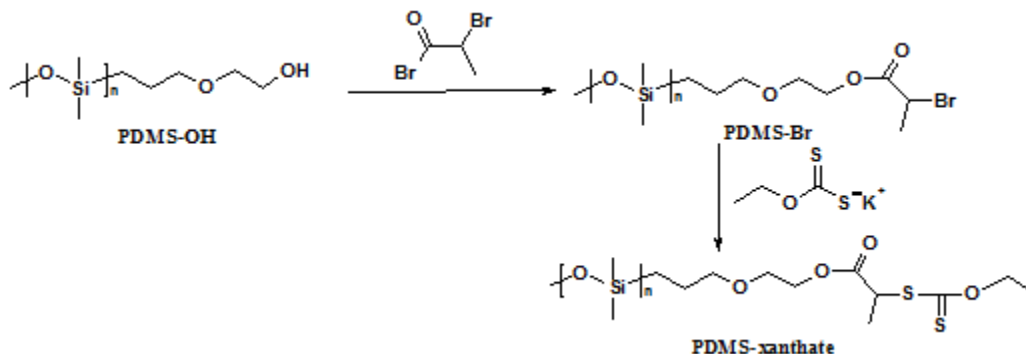


Fig. 2 : Prepararea PDMS-xantat plecând de la un PDMS-Br

Pentru obținerea acestui produs s-a utilizat următorul mod operator: într-un balon de 250 ml s-au amestecat 3.2 mmol (15 g) PDMS-Br ($M_n = 4600$ g/mol) cu 50 ml CH_2Cl_2 . Apoi s-au adăugat 6.4 mmol potasiu O-etilxantat (1.06 g) și balonul, sub flux continuu de N_2 , a fost introdus într-o baie de gheață ($0^\circ C$). Reacția a fost lăsată la temperatura ambiantă timp de 20 ore. După acest timp, soluția a fost filtrată, produsul obținut a fost spălat de 3 ori cu CH_2Cl_2 care apoi a fost evaporat sub vid. Produsul obținut a fost solubilizat în diclorometan și spălat de trei ori cu apă și apoi a fost uscat pe $MgSO_4$, filtrat și solventul evaporat sub vid. La final s-a obținut un ulei galben care va fi caracterizat prin RMN și SEC.

PDMS- N_3 a fost obținut în felul următor: într-un balon de 250 ml s-au cântărit 16.06 mmol (18.8 g) PDMS-Br și 21.41 mmol (0.35 g) NaN_3 ; s-au adăugat 15 ml DMF și temperatura a fost fixată la $60^\circ C$. După 20 de ore, în soluția răcită s-a adăugat o rezină care a captat excesul de NaN_3 . În soluția filtrată s-au adăugat 70 ml acetat de etil și apoi aceasta a fost spălată cu 3x70 ml apă și 3x70 ml soluție saturată de NaCl. După aceste spălări, apa a fost îndepărtată prin uscare pe $MgSO_4$ iar solventul organic prin evaporare sub vid. La final s-a obținut un ulei galben care va fi caracterizat prin RMN și SEC.

1.1.3 Sinteza copolimerilor pe baza de PDMS

Pentru sinteza copolimerilor PDMS-PCL, s-a folosit un procedeu de tip „click-chemistry” plecând de la un PDMS- N_3 și un precursor PCL funcționalizat în capătul lanțului polimeric cu o grupare alchil (tripla legătură), conform figurii 3. Precursorul PCL alchil a fost sintetizat prin procedeul următor: într-un tub Schlenk echipat cu un agitator magnetic s-au adăugat 0.5 ml (5.42

mmoli) 4-pentil-1-ol în 100 ml de toluen. S-au introdus apoi 0.54 ml de TEA1 (1.97 mmoli), urmat de 20 ml (0.18 mol) de CL. Polimerizarea a fost lăsată să se proceseze timp de 2 ore la 50°C. Amestecul de reacție s-a concentrat și polimerul s-a precipitat în metanol rece, s-a filtrat și s-a uscat pentru a se obține o pulbere albă. Homopolymer PCL: M_n (SEC) = 3.700 g/mol, PDI= 1.02. Randament CL = 91%. M_n (^1H NMR) = 3400 g/mol. ^1H NMR (CDCl_3 at 25 °C): 2 ppm (1H, t, $\text{CH}\equiv$), 3.65 ppm (2H, t, OH- CH_2), 4.2 ppm (2H, t, CH_2O -), 4.08 ppm (2H, t, CH_2O -), 2.33 ppm (2H, t, C=O), 1.64 ppm (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.40 ppm (2H, m, CH_2).

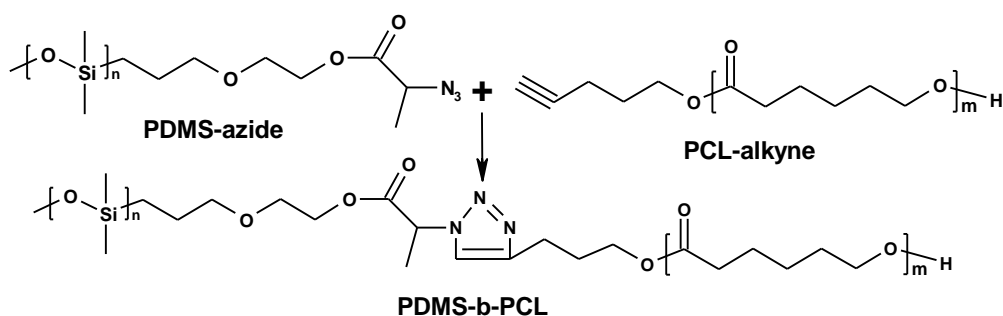


Fig. 3: Sinteza copolimerului PDMS-PCL

Pentru sinteza acestui copolimer s-a utilizat urmatorul mod operator: într-un tub Schlenk s-au amestecat 1.06 mmol (5 g) PDMS- N_3 ($M_n = 4700$ g/mol), 1.33 mmol (4g) PCL-alkil ($M_n=3000$ g/mol) cu 50 ml THF. Apoi s-au adaugat 0.3668 g PMDETA si 0.3041 g CuBr iar balonul a fost trecut sub flux continuu de N_2 timp de 30 minute. Reactia s-a desfasurat la 60°C timp de 24h. Dupa acest timp, s-a introdus o rezina azida de tip Amberlite pentru a elimina excesul de PCL-alkil. Solutia a fost filtrata iar copolimerul recuperat prin precipitare va fi caracterizat prin RMN si SEC.

Sinteza copolimerului PDMS-PVP s-a realizat printr-o polimerizare controlata de tip RAFT-Madix plecand de la un macro-precursor PDMS functionalizat cu o grupare xantat, conform figurii 4:

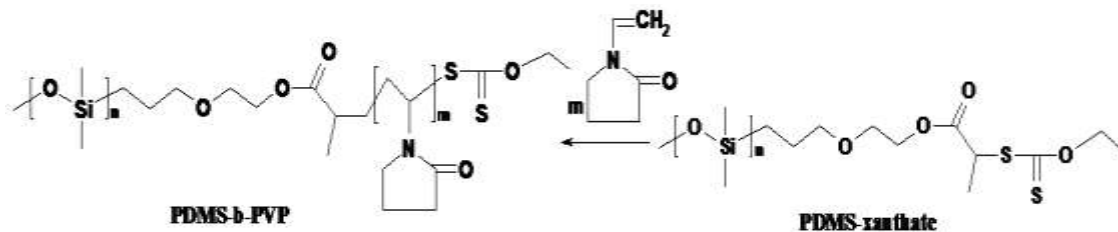


Fig. 4: Sinteza copolimerului PDMS-b-PVP

Pentru sinteza acestui copolimer s-a realizat urmatorul mod de lucru: intr-un tub Schlenk s-au introdus 2.13 mmol (10 g) PDMS-xantat ($M_n=4700$ g/mol), 0.096 mole (10.65 g) VP, 0.426 mmol (70 mg) AIBN ($[Raft]/[AIBN]=5$) si 50 ml THF. Dupa 3 cicluri de inghet/dezghet sub vid, reactia s-a desfasurat la 60°C pentru 24h. Solventul a fost evaporat sub vid si apoi s-a adaugat acetona si solutia a fost precipitata in metanol. Copolimerul recuperat va fi caracterizat prin RMN si SEC.

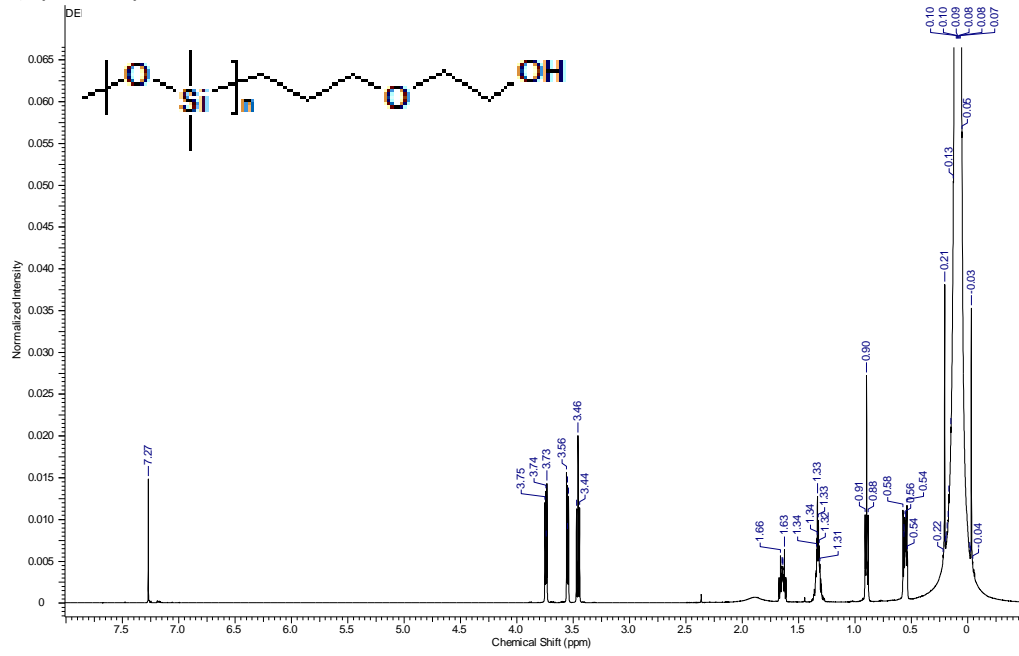
Activitate 1.2 : Caracterizarea fizico-chimica a copolimerilor pe baza de PDMS

Caracterizarea fizico-chimica a produsilor obtinuti a fost efectuata prin cromatografie de exclusiune sterica (SEC) si rezonanta magnetica nucleara (RMN).

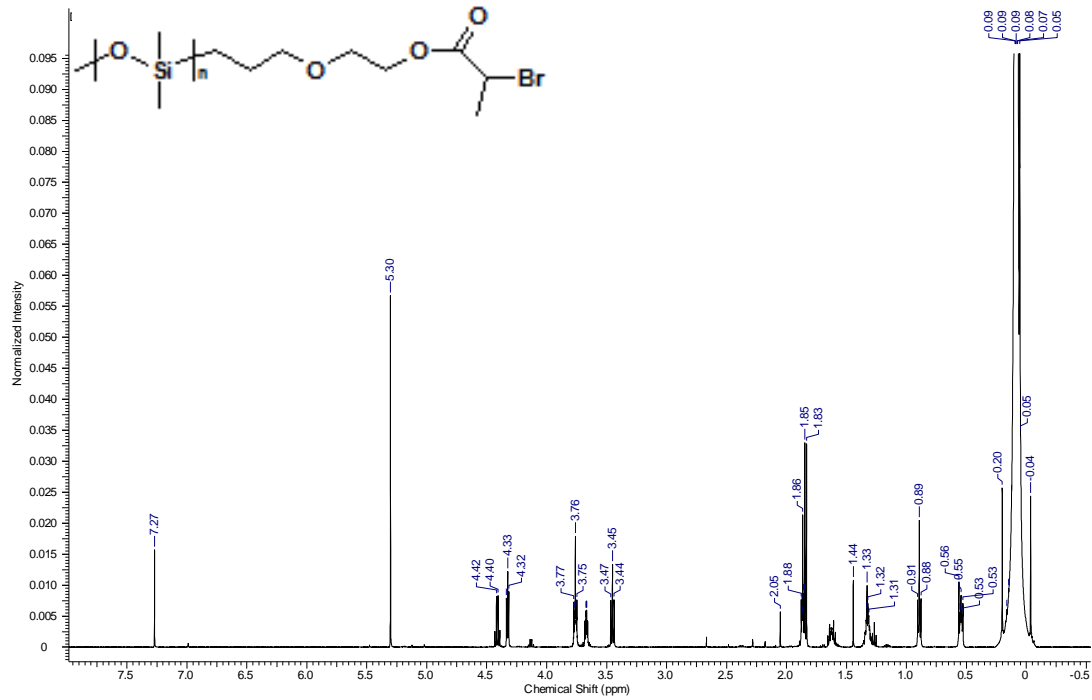
1.2.1 Caracterizarea precursorilor de PDMS

In Figura 5 este prezentat spectrul RMN proton al produsului (a) PDMS-OH, (b) PDMS-Br, (c) PDMS-xantat si (d) PDMS- N_3 . Principalele caracteristici moleculare au fost determinate utilizând un aparat Bruker AC-400F care funcționează la 400 MHz în cloroform deuterat (CDCl_3) la temperatura camerei. Picurile caracteristice sunt urmatoarele: 0.05-0.09 ppm (m, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-$); 0.53-0.58 ppm (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 0.88-0.91 ppm (m, CH_3-CH_2-); 1.31-1.34 ppm (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 1.63-1.66 ppm (m, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 1.83-1.88 ppm (m, $-\text{Si}-\text{CH}_2-$), 3.44-3.47 ppm (m, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3.75-3.77 ppm (t, $-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3.97-3.99 ppm (t, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 4.32-4.35 ppm (t, CH_2-Br); 4.62-4.66 ppm (m, $\text{S}-\text{O}-\text{CH}_2-$).

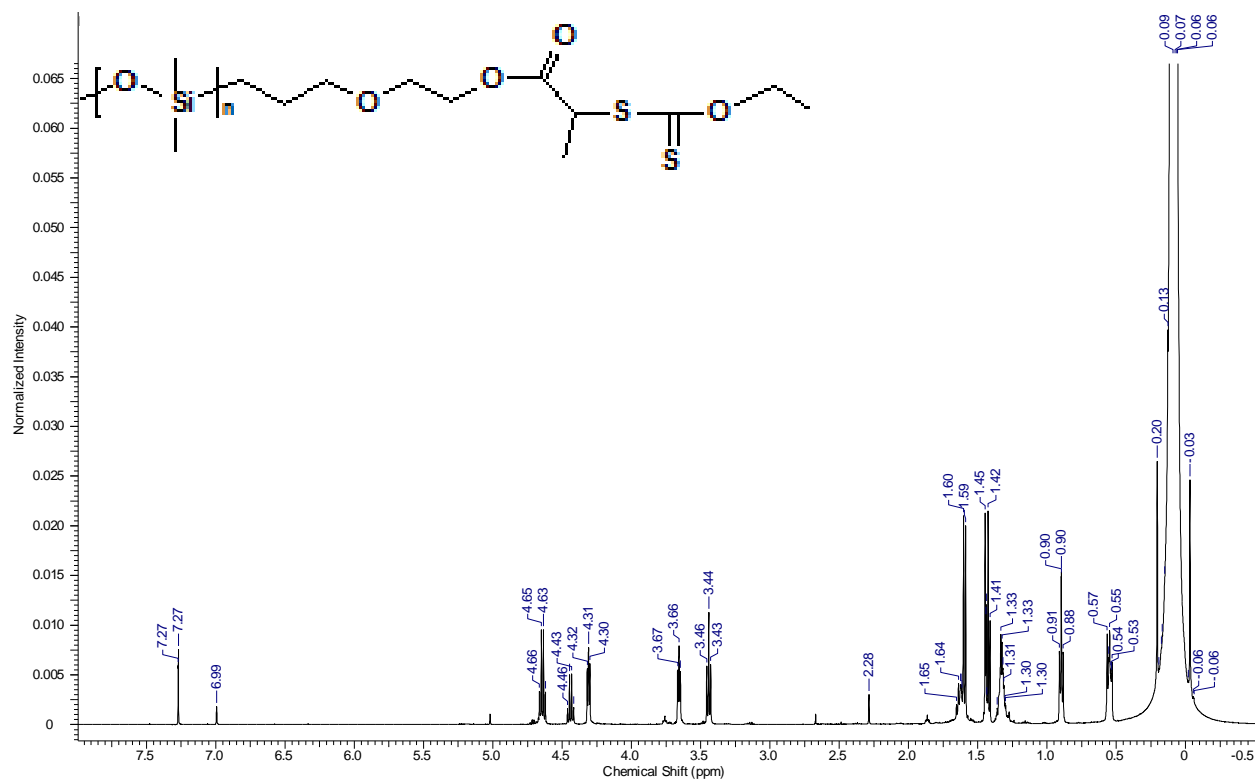
a) Spectrul produsului PDMS-OH



b) Spectrul produsului PDMS-Br



c) Spectrul produsului PDMS-xantat



d) Spectrul produsului PDMS-N₃

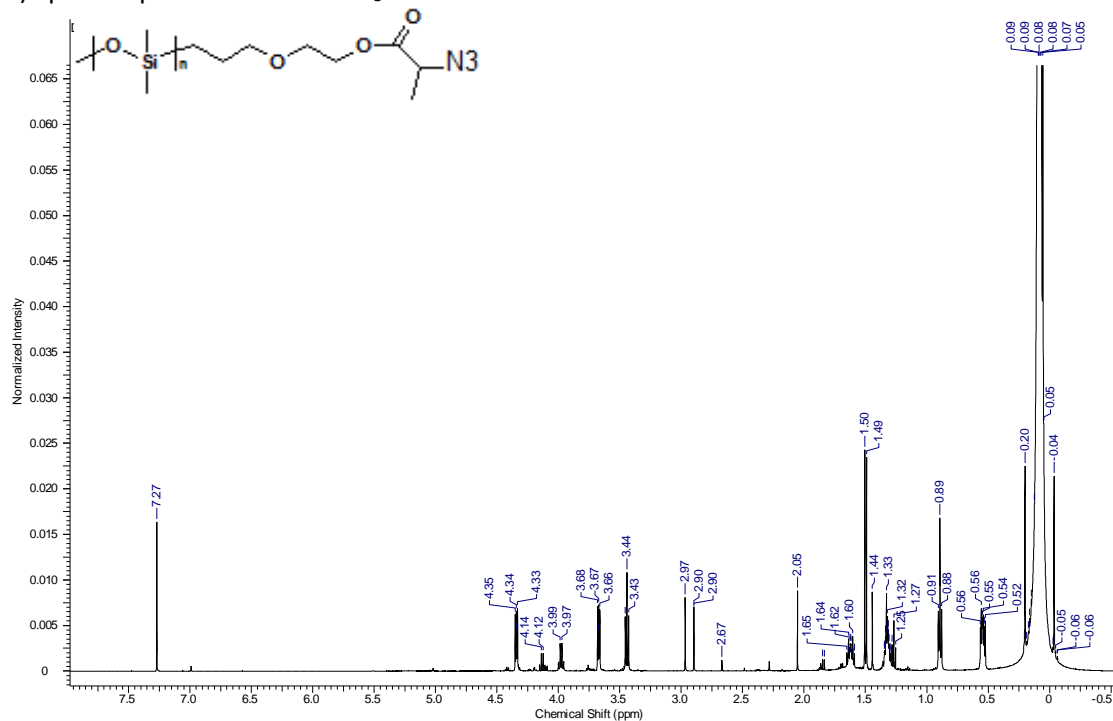


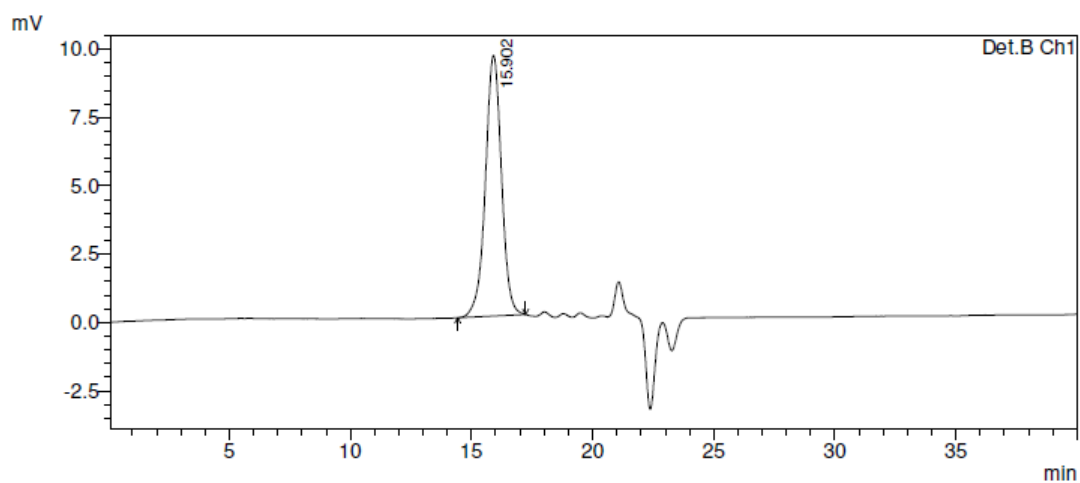
Fig. 5: Spectrele RMN ale precursorilor PDMS

Cromatografia de exclusiune sterica face posibilă determinarea dispersiei (\mathcal{D}) și a masei moleculare (M_n) a produsilor sintetizați în echivalent polistiren. Masa moleculară obținută prin

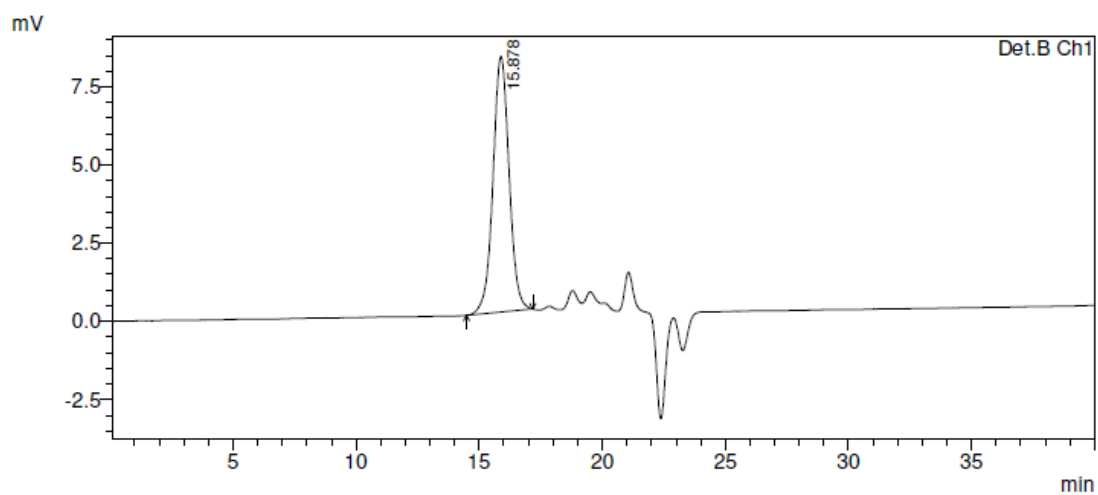
SEC nu corespunde cu masa molară reală deoarece este calculată în echivalent PS. Cu toate acestea, M_n calculat din spectrul 1H RMN este estimat cu o marjă de eroare tolerabilă ($\pm 5\%$).

În Figura 6 prezintă cromatogramele SEC pentru produsele (a) PDMS-OH, (b) PDMS-Br, (c) PDMS-N₃ și (d) PDMS-xantat iar valorile masei moleculare și a dispersiei sunt redată în Tabelul 1.

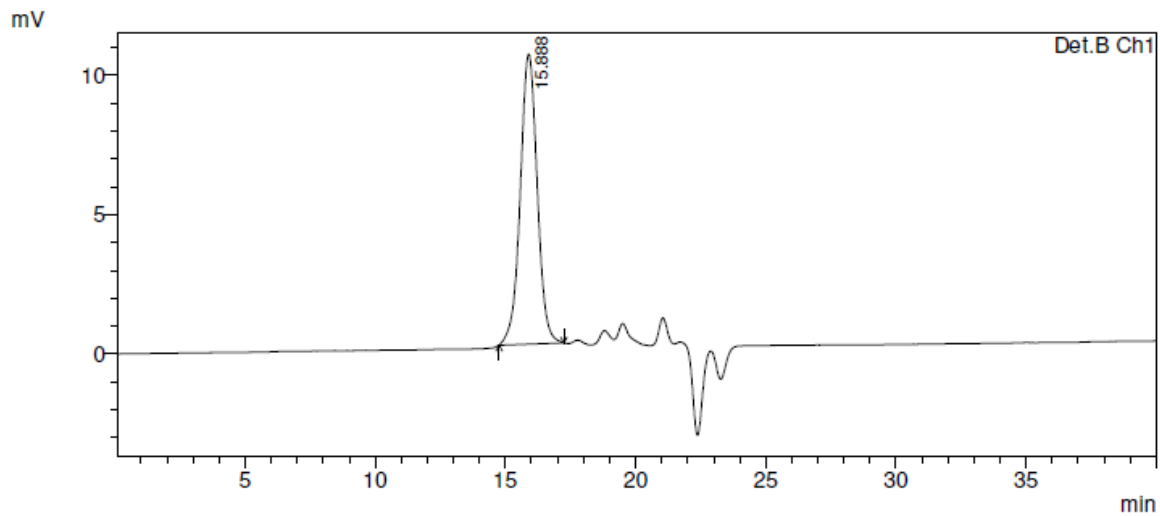
a)



b)



c)



d)

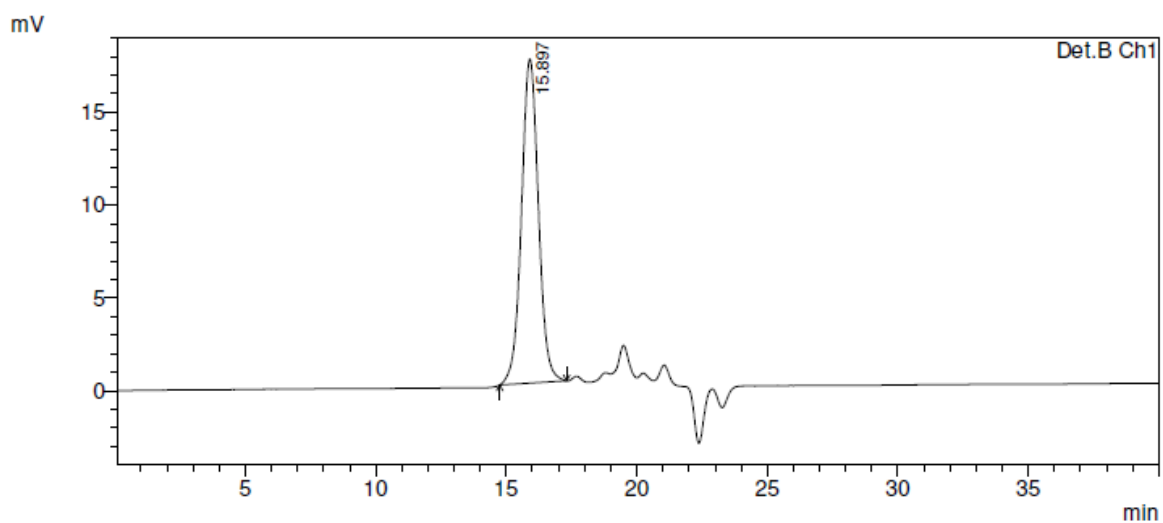


Fig. 6: Cromatogramele SEC ale precursorilor PDMS

Din aceasta figura se observa ca distributiile sunt monomodale si ca timpii de elutie sunt foarte apropiati.

Tabel 1: Masa moleculara si dispersia esantioanelor de PDMS.

Precursor	Mn (g/mol, echivalenti PS)	Đ (Mw/Mn)
PDMS-OH	5770	1.09
PDMS-Br	5670	1.05
PDMS-N3	5680	1.09
PDMS-xantat	5480	1.09

Din acest tabel se observa ca masele moleculare in echivalenti PS au valori foarte apropiate si ca modificarile efectuate nu au distrus lanturile de PDMS. De asemenea, se observa ca dispersia masei moleculare este foarte mica.

Tabelul 2 prezinta caracteristicile moleculare ale precursorilor PCL-alchil.

Tabel 2: Masa moleculara si dispersia precursorilor PCL-alchil.

Precursor	Mn SEC	Mn RMN	Đ
PCL-alchil1	3 700	3 400	1.02
PCL-alchil2	6 300	7 100	1.02

Acesti precursori se vor folosi pentru sinteza copolimerilor PDMS-PCL.

1.2.2 Caracterizarea copolimerilor pe baza de PDMS

Similar cu precursorii, copolimerii obtinuti au fost caracterizati cu ajutorul tehnicilor RMN si SEC. In Figura 7 este prezentat spectrul RMN pentru copolimerul PDMS-PCL (ALI1).

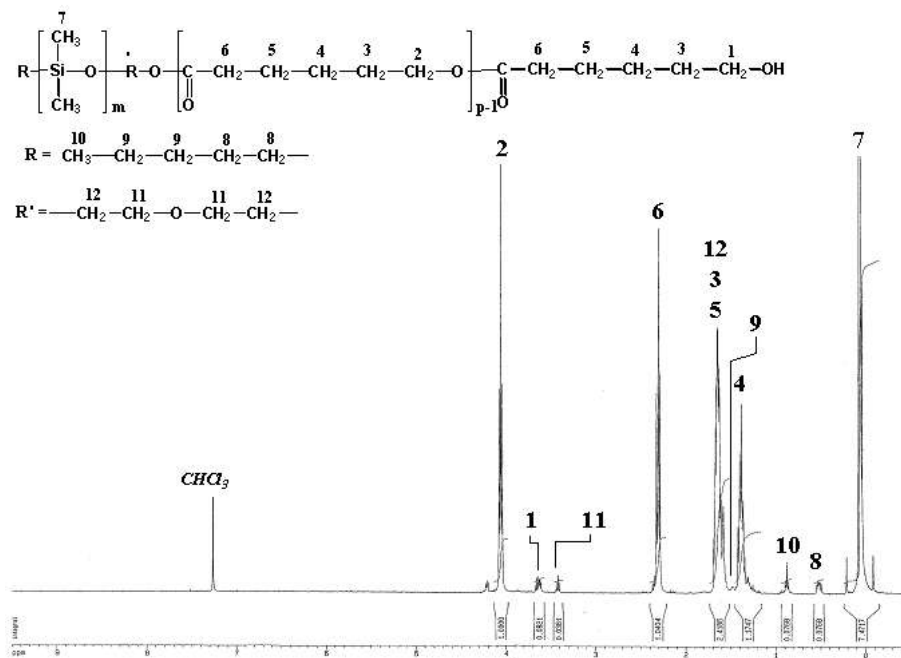


Fig. 7: Spectrul RMN al esantionului ALI1

Picurile caracteristice sunt urmatoarele: RMN ^1H (CDCl_3 400MHz) δ (ppm) : 1. 3.63 (t, $-\text{CH}_2\text{-OH}$), 2. 4.06 (t, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 3. 1.62 (m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4. 1.42 (m, $-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 5. 1.62 (m, $-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 6. 2.30 (t, $-\text{CO-CH}_2\text{-}$), 7. 0.07 (m, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-}$), 8. 0.53 (m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 9. 1.48 (m, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 10. 0.88 (m, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 11. 3.42 (m, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 12. 1.62 (m, $-\text{Si-CH}_2\text{-}$).

In Tabelul 3 sunt prezentate caracteristicile moleculare ale copolimerilor PDMS-b-PCL si PDMS-b-PVP.

Tabel 3: Caracteristicile moleculare ale copolimerilor pe baza de PDMS

Copolimer	M_n PDMS	M_n PCL ($^1\text{H-RMN}$)	M_n PVP ($^1\text{H-RMN}$)	M_n copolimer ($^1\text{H-RMN}$)	M_n copolimer (SEC)	\bar{D}
ALI1	5680	3400	-	9100	9100	1.17
ALI2	5680	7100	-	12400	12600	1.14
ALI3	5480	-	2500	7150	7300	1.21
ALI4	5480	-	6500	11500	12000	1.31

Din acest tabel se observa o buna corelatie intre masa moleculara determinata prin SEC si cea determinata prin RMN. De asemenea, observa ca valorile dispersiei masei moleculare sunt inferioare valorii de 1.3 ceea ce semnifica faptul ca copolimerii nostrii sunt bine definiti.

1.2.3 Auto-asamblarea copolimerilor

Interesul crescând asupra copolimerilor bloc în diferite domenii ale cercetării științifice este legat de structura lor moleculară specială, care le conferă proprietăți exploatabile unice pentru aplicațiile industriale.

Auto-asamblarea copolimerilor bloc în solvenți selectivi este un fenomen bine cunoscut și studiat pe scară largă. De exemplu, într-un mediu apos, micelizarea este în general datorată prezenței blocurilor complet hidrofobe.

Micelizarea copolimerilor bloc și eficacitatea lor ca stabilizatori de emulsie sunt bine documentate în literatură. Copolimerii bloc sunt nu numai stabilizatori ai emulsiilor apă/ulei și ulei/apă, dar și a emulsiilor neapoase de tip ulei/ulei, emulsii obținute cu doi solvenți organici nemiscibili și pentru care copolimerul joacă rolul de de stabilizator steric.

În această etapă, am examinat prin difuzie dinamică a luminii (DLS) auto-asamblarea acestor copolimeri într-un ulei siliconic nefuncționalizat. Pentru copolimerii PDMS-b-PCL și PDMS-b-PVP s-a observat formarea unor sisteme micelare cu un diametru hidrodinamic de circa 30 nanometri.

Etapa II: Prepararea și caracterizarea emulsiilor neapoase pe baza de PDMS

Activitate 2.1: Prepararea și caracterizarea emulsiilor neapoase în absența medicamentelor

În cursul etapei II au mai fost sintetizați 3 copolimeri pe baza de PDMS și s-a început prepararea și caracterizarea emulsiilor neapoase ulei-in-ulei în absența și în prezența copolimerilor. Caracteristicile moleculare ale copolimerilor obținute sunt date în tabelul 4:

Tabel 4: Caracteristicile moleculare ale copolimerilor pe baza de PDMS

Copolimer	M_n PDMS	M_n PCL ($^1\text{H-RMN}$)	M_n copolimer ($^1\text{H-RMN}$)	M_n copolimer (SEC)	\bar{D}
ALI5	3000	2000	5200	5100	1.20
ALI6	3000	4000	7400	7600	1.24
ALI7	10000	10000	21150	23000	1.35

În această primă fază s-au testat 3 uleiuri de silicon având vâscozități diferite, așa cum sunt indicate în tabelul 5. Vâscozitatea a fost testată la 2 temperaturi și 5 viteze de rotație cuprinse între 10 și 100 rpm.

Tabel 5: *Vascozitatea uleiurilor de silicon*

Ulei de silicon	Vascozitate (cSt)	furnizor	Vascozitate experimentală (cSt)*	
			25°C	60°C
SO3	3		4.5	3.4
SO50	50		116.2	30.7
SO350	350		386.3	230.0

*determinată cu vascozimetrul Brookfield prin extrapolare la o viteză de rotație nulă

Uleiurile de silicon au fost denumite în funcție de valoarea viscozității dată de producător, de exemplu SO3 are o viscozitate de 3 cSt.

Într-un prim test, s-au preparat emulsiile neapoase în absența copolimerilor. Volumul total al unei emulsii a fost fixat la 10 ml și s-au variat rapoartele dintre cele două faze, 90/10; 80/20 și 70/30 vol/vol. Faza continuă a fost reprezentată de uleiurile de silicon iar faza dispersată de către monomerii VP și ϵ -CL. Emulsiile au fost preparate prin emulsificare cu un Ultraturax 18 la o viteză de 3000 rpm timp de 5 minute la temperatura ambiantă.

Stabilitatea acestor emulsii a fost verificată vizual prin determinarea timpului t_{25} care reprezintă timpul în care 25% din volumul fazei dispersate s-a separat de faza continuă (tabel 6).

Tabel 6: *Stabilitatea (t_{25}) emulsiilor neapoase în absența copolimerilor*

Faza dispersată	Raportul fazelor vol/vol	t_{25} (min)		
		SO3	SO50	SO350
VP	70/30	4	6	8
	80/20	3	5	6
	90/10	2	3	5
ϵ -CL	70/30	5	6	9
	80/20	3	4	6
	90/10	2	3	5

Din Tabelul 6 se observa ca cele doua faze uleioase nu sunt miscibile si ca aparitia separatiei de faza apare intr-un timp foarte scurt (< 10 min).

Activitate 2.2 : Prepararea si caracterizarea emulsiilor neapoase in prezenta medicamentelor

Cele doua medicamente, cisplatin si paclitaxel, au fost solubilizate in ambii monomeri, VP si CL, pana o concentratie de 20 mg/ml si s-a studiat stabilitatea acestor solutii in functie de timp si temperatura. Timp de o luna (30 zile) nu s-a observat o precipitare a medicamentelor din solutiile de monomeri. In plus, o temperatura de 60°C nu a produs efecte nefavorabile asupra solutiilor de medicamente. In etapa urmatoare se va utiliza o concentratie de medicament cuprinsa intre 10 si 20 mg/ml.

In **Tabelul 7** este prezentata stabilitatea emulsiilor in functie de tipul de copolimer utilizat la o concentratie in copolimer de 5wt% in faza continua. Volumul total al unei emulsii a fost fixat la 10 ml si s-a folosit un raport de 80/20 vol/vol pentru cele doua faze. Faza continua a fost reprezentata de uleiurile de silicon iar faza dispersata de catre monomerii VP si E-CL. Emulsiile au fost preparate prin emulsificare cu un Ultraturrax 18 la o viteza de 3000 rpm timp de 5 minute la temperatura ambianta.

Tabel 7: Stabilitatea (t_{25}) emulsiilor neapoase in prezenta copolimerilor la o concentratie de 5 wt% in faza continua.

Faza dispersata	Copolimer	Emulsie	t_{25}		
			SO3	SO50	SO350
VP	AL1	EVPL1	15 min	20 min	23 min
	AL2	EVPL2	15 min	20 min	25 min
	AL3	EVPL3	5 min	10 min	10 min
	AL4	EVPL4	5 min	10 min	12 min
	AL5	EVPL5	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile
	AL6	EVPL6	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile
	AL7	EVPL7	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile

ε-CL	AL1	ECLL1	10 min	10 min	10 min
	AL2	ECLL2	8 min	9 min	10 min
	AL3	ECLL3	20 min	25 min	30 min
	AL4	ECLL4	22 min	25 min	30 min
	AL5	ECLL5	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile
	AL6	ECLL6	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile
	AL7	ECLL7	> 30 zile	> 30 zile	> 30 zile

Din Tabelul 7 se observa ca emulsiile cele mai stabile si deci care au diametrul cel mai mic al picaturilor dispersate sunt emulsiile obtinute cu copolimerii AL5, AL6 si AL7.

In faza dispersata a emulsiilor EVP5, EVP6, EVP7, ECLL5, ECLL6 si ECLL7 s-au solubilizat cele doua medicamente intr-o concentratie de 20 mg/ml si s-a observat ca stabilitatea emulsiilor nu a fost afectata de prezenta medicamentelor.

Etapa III: Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a dispersiilor neapoase de nanoparticule

Activitate 3.1: Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor obținute prin polimerizare în emulsie neapoasă

La începutul acestei etape au fost efectuate mai multe teste preliminare în vederea stabilirii condițiilor optime pentru realizarea polimerizării în emulsie neapoasă. În urma acestor teste s-a constatat că emulsiile PDMS/VP preparate în prezența uleiului de silicon SO50 ca fază continuă reprezintă sistemul ideal pentru obținerea dispersiilor neapoase de nanoparticule de PNVP. Acest ulei de silicon are o vâscozitate de 50 cP la 25°C și de 38 cP la o temperatură de 40°C; indicele de refracție este de 1.402. Toate aceste caracteristici au fost necesare pentru realizarea determinărilor dimensiunilor prin difuzie dinamică a luminii utilizând aparatul Nanotrak.

Înainte de realizarea reacțiilor de polimerizare, a fost necesară realizarea emulsiilor VP în SO50. În această etapă au fost studiate 2 rapoarte între cele două faze, de 10/90 și 20/80. Pentru stabilizarea acestor emulsii s-a folosit copolimerul AL5 la două concentrații diferite în fază PDMS continuă, respectiv de 1 și 3 wt%. Prima etapă în realizarea emulsiilor a constat în

solubilizarea copolimerului AL5 in volumul cerut de PDMS si la concentratia dorita. Volumul total al emulsiilor a fost de 50 ml iar in faza VP dispersata s-a solubilizat initiatorul (4,4'-cianopentanoicacid-ACPA), la o concentratie de 2 wt% fata de monomerul VP si agentul de reticulare (N,N'-metilenbisacrilamida-MBAA), la o concentratie de 3 wt% fata de monomerul VP. Monomerul VP a fost purificat inainte de etapa de emulsificare prin trecere printr-o coloana de alumina (AlO). Pentru emulsificare s-a folosit un ultra-omogenizator de tip Ultraturax IKA T25 cu o viteza de rotatie de 10 000 rpm, timp de 5 minute. Prin difuzia luminii a fost posibila determinarea dimensiunii picaturilor de VP dispersate in SO50. Pentru aceasta determinare a fost necesara dilutia emulsiei care s-a realizat prin adaugarea a 3 picaturi de emulsie la un volum de 5 ml de SO50 si agitare usoara.

Polimerizarea monomerului VP s-a realizat sub flux de argon intr-un reactor prevazut cu un motor de agitare cu o tija tip ancora si un refrigerent, la o temperatura de 60°C, timp de 5 ore si la o viteza constanta de rotatie de 150 rpm. Reactia de polimerizare s-a incheiat prin expunerea la aer si imersarea reactorului intr-o baie de apa cu gheata.

Dupa terminarea polimerizarii, o parte din dispersia neapoasa a fost precipitata in hexan, filtrata, spalata de mai multe ori cu hexan si uscata timp de 24 ore in etuva sub vid. S-a utilizat hexanul deoarece s-a constatat in urma unor teste preliminare ca uleiul de silicon SO50 este solubil in acest solvent iar PNVP-ul este insolubil. Conversia monomerului s-a determinat printr-o metoda gravimetrica.

Tabelul 8 prezinta toti parametrii experimentali care au fost folositi pentru obtinerea dispersiilor neapoase de PNVP.

Tabel 8: Parametrii experimentali utilizati la polimerizarea in emulsie neapoasa a vinilpirolidonei timp de 5 ore la o temperatura de 60°C

Proba	Raportul fazelor (VP/PDMS) (vol/vol)	Concentratia in stabilizant (copolimer) (wt%)^a	Concentratia in agent de reticulare (wt%)^b	Gradul de conversie (%)
PNVP1	20/80	3	3	85

PNVP2	20/80	1	3	82
PNVP3	10/90	3	3	88
PNVP4	30/70	1	3	70
PNVP5	20/80	3	2	79
PNVP6^c	20/80	3	2	81
PNVP7	20/80	3	1	85
PNVP8	30/70	3	3	70
PNVP9	5/95	1	1	75
PNVP10^c	5/95	1	1	78

^a – concentrația copolimerului în fața continuă

^b – concentrația agentului de reticulare față de monomer

^c – nanoparticulele au fost obținute în prezența cisplatinului

Cum se poate observa în Tabelul 8, au fost variați mai mulți parametri, cum ar fi: raportul fazelor, concentrația stabilizantului și concentrația în agent de reticulare. De asemenea, se poate observa că gradul de conversie este mai mare de 70%, indiferent de experiment.

După purificarea prin spălare cu hexan, obținerea particulelor reticulate de PNVP în prezența MBAA (Figura 8) a fost confirmată prin analizele RMN și FTIR. În Figura 9 este prezentat un spectru RMN tipic pentru proba PNVP1.

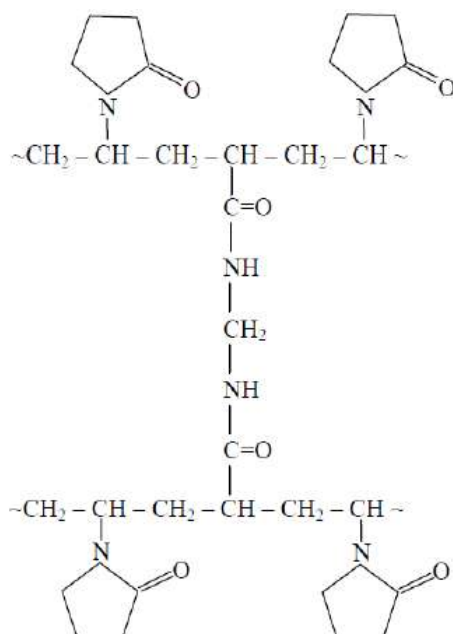


Figura 8: Structura chimica a PNVP-ului reticulat cu MBAA

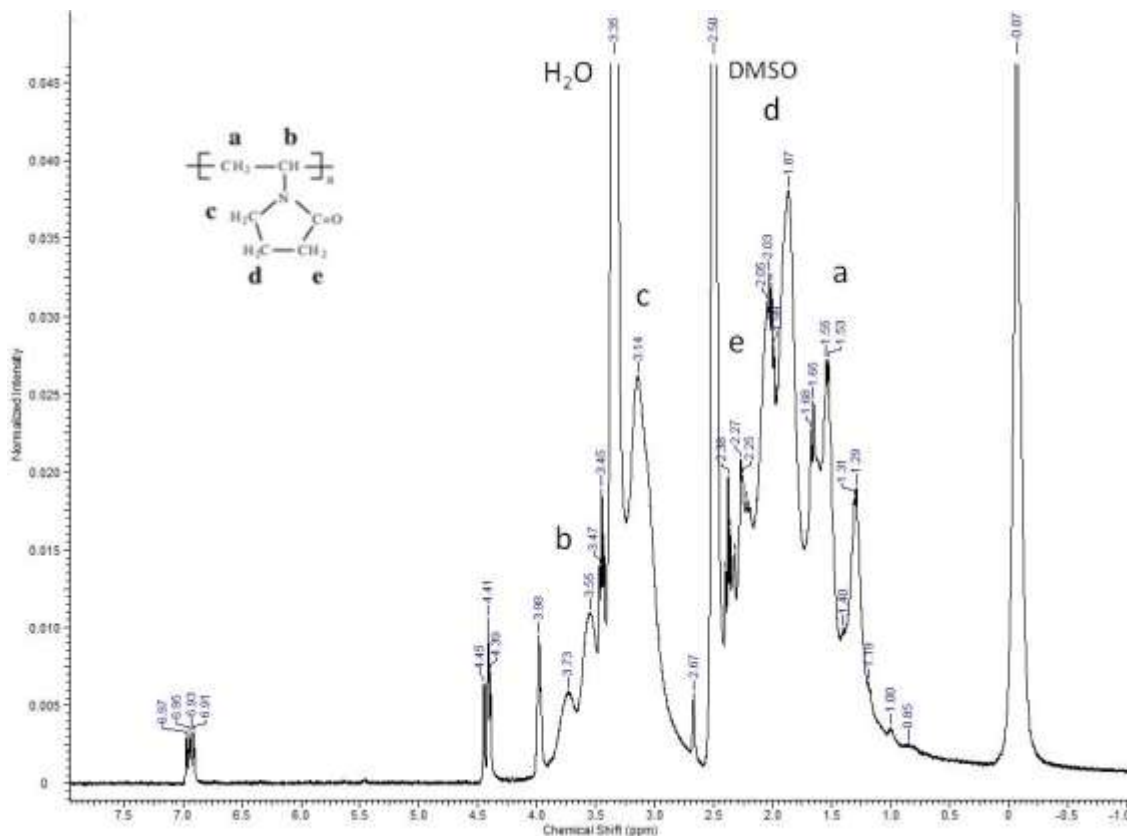


Figura 9: Spectru ¹H RMN in DMSO-d₆ pentru proba PNVP1

Din spectru prezentat in Figura 9 se poate observa existenta picurilor caracteristice polimerului PNVP si anume: (a) 1.3-1.8 ppm; (b) 3.5-3.9 ppm; (c) 3.1-3.5 ppm; (d) 1.8-2.1 ppm si (e) 2.1-2.5 ppm. Se observa, de asemenea, un pic la 0.07 ppm ce poate fi atribuit uleiului de silicon SO50 in care s-a realizat polimerizarea. Picurile de la 4.39-4.41 ppm si 6.91-6.97 ppm apartin gruparilor CH₂ si NH din structura agentului de reticulare MBAA.

Figura 10 prezinta un spectru tipic FTIR pentru aceeasi proba PNVP1.

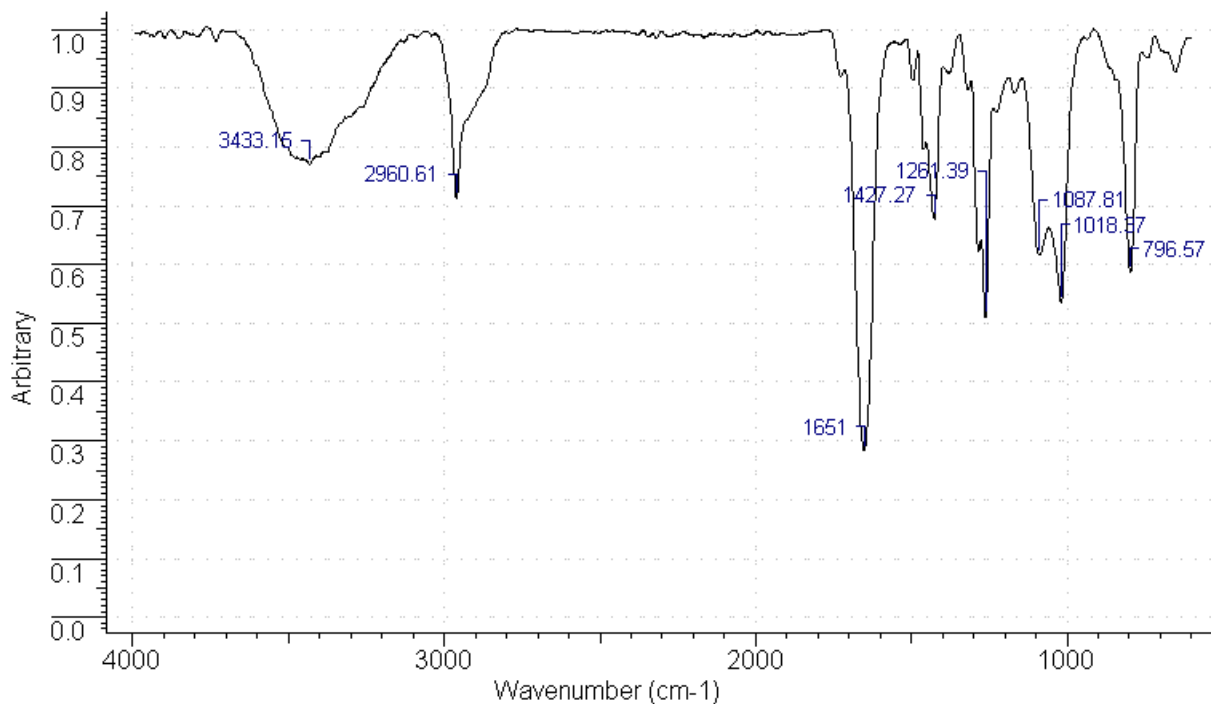


Figura 11: Spectru FTIR pentru proba PNVP1

Atribuirea picurilor din spectrul FTIR este prezentata in Tabelul 9.

Tabel 9: Atribuirea picurilor din spectru FTIR al probelor pe baza de PNVP

Lungime de unda (cm ⁻¹)	Grupare chimica
3433.15	O-H
2960.61	C-H asimetric
1651	C=O
1427.27	CH ₂
1261.39	C-N
1087.81	Si-O-Si
796.57	Si-(CH ₃) ₂

Analizele FTIR au demonstrat, de asemenea, polimerizarea monomerului VP si obtinerea polimerului PNVP reticulat.

Particulele de PNVP obtinute au fost caracterizate, de asemenea, prin analize termice, de tipul DSC si ATG. **Tabelul 10** prezinta valorile temperaturii de topire T_m pentru toate probele obtinute iar un exemplu tipic este prezentat in Figura 12. Experimentele au fost realizate intr-un domeniu de temperatura care a variat de la -50 la 300°C cu o viteza de 10°C/min.

Tabel 10: Valorile de T_m pentru probele PNVP obtinute

Proba	T_m (°C)
PNVP1	94.0
PNVP2	100.7
PNVP3	98.2
PNVP4	100.3
PNVP5	100.0
PNVP6	99.4
PNVP7	95.6
PNVP8	101.0
PNVP9	99.5
PNVP10	100.1

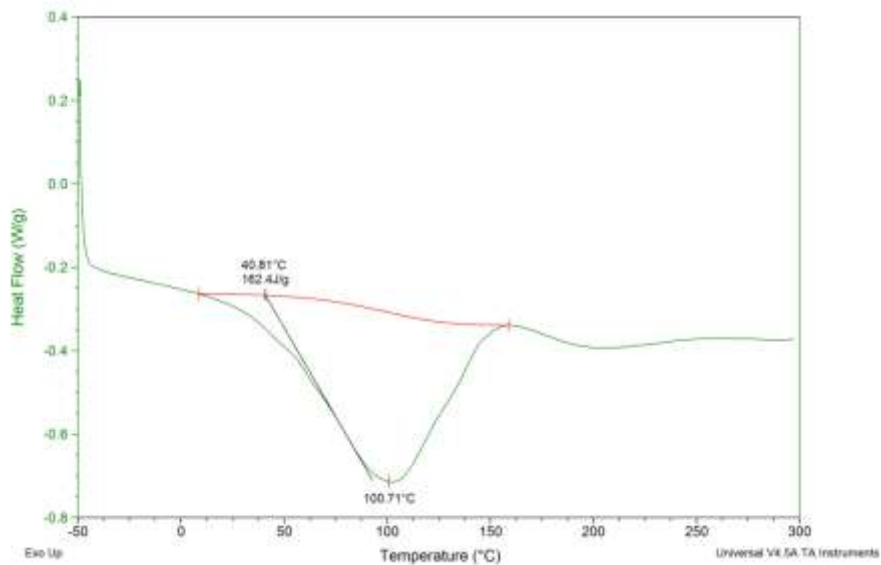


Figura 12: Curba DSC pentru proba PNVP2

Din analizele DSC se poate nota faptul ca toate probele au o valoare a temperaturii de topire in jurul valorii de 100°C, ce reprezinta valorile de referinta pentru un homopolimer de tipul PNVP. De asemenea, se observa ca prezenta cisplatinului nu are o influenta marcanta asupra valorii Tm.

In **Figura 13** este prezentat un spectru ATG tipic pentru particulele de PNVP.

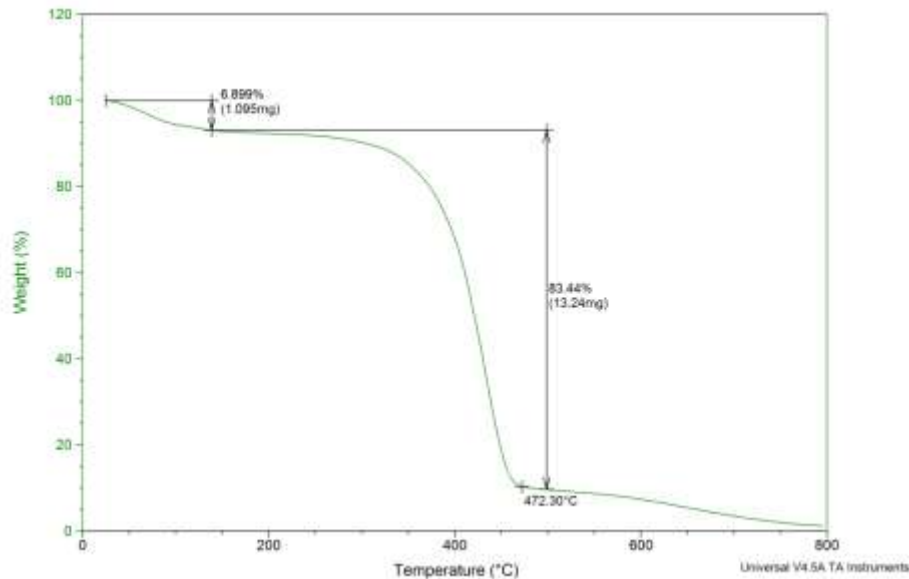


Figura 13: Spectru ATG pentru proba PNVP3

Din spectrele ATG se observa doua puncte de tranzitie; primul corespunde pierderii de apa si are loc in jur de 100°C in timp ce al doilea corespunde degradarii totale a polimerului (peste 470°C).

Prin difuzia dinamica a luminii (DLS), utilizand aparatul Nanotrak, a fost posibila determinarea dimensiunilor atat a picaturilor dispersate de monomer VP in uleiul de silicon SO50 cat si determinarea dimensiunilor particulelor de PNVP dispersate in SO50 obtinute prin procesul de polimerizare in emulsie neapoasa.

In Tabelul 11 sunt prezentate datele obtinute prin DLS atat pentru emulsiile de plecare cat si pentru dispersiile neapoase obtinute in urma procesului de polimerizare. Pentru realizarea acestor determinari prin DLS s-au folosit urmatoorii parametri: $\eta(\text{SO50}) = 50 \text{ cP}$ la 20°C; $\eta(\text{SO50}) = 38 \text{ cP}$ la 40°C; indice de refractie $n_{25} = 1.402$ si s-a realizat urmatoarea dilutie: 2 picaturi de emulsie

sau de dispersie neapoasa au fost adaugati in 5 ml de SO50 iar dispersia a fost realizata printr-o agitare usoara.

Tabel 11: Dimensiunea picaturilor de VP si a particulelor de PNVP in uleiul de silicon determinate la o temperatura de 25°C

Proba	Dv (nm)		Di (nm)		PDI Dispersii neapoase
	Emulsii	Dispersii neapoase	Emulsii	Dispersii neapoase	
PNVP1	117.7 ±2	132.6 ±0.5	129.6 ±1.8	137.4 ±0.8	0.05 ±0.01
PNVP2	142.4 ±1.2	143.8 ±1	144.0 ±1	146.3 ±0.8	0.18 ±0.05
PNVP3	118.3 ±1.5	144.5 ±2	130.7 ±1.6	145.9 ±2.1	0.02 ±0.01
PNVP4	353.4 ±1.3	394.0 ±1.1	354.1 ±1.1	401.2 ±0.8	0.30 ±0.05
PNVP5	121.2 ±2	128.3 ±1.5	130.6 ±1.7	135.2 ±1.3	0.02 ±0.01
PNVP6^c	142.0 ± 1.8	148.0 ± 1.5	140.5 ± 1.0	150.2 ± 1.1	0.03 ± 0.01
PNVP7	122.5 ±0.9	126.3 ±1.0	132.1 ±1.1	136.7 ±1.5	0.03 ±0.01
PNVP8	295.7 ± 0.9	225.3 ±1.1	300.8 ±1.4	331.1 ±1.2	0.28 ±0.05
PNVP9	258.2 ±0.5	279.1 ±0.8	261.1 ±0.3	287.2 ±0.9	0.40 ±0.03
PNVP10^c	297.5 ±0.8	312.4 ±0.5	302.8 ±0.5	329.5 ±0.5	0.40 ±0.04

Din Tabelul 11 se poate observa ca dimensiunea nanoparticulele de PNVP obtinute prin polimerizare in emulsie neapoasa prezinta o lejera crestere in comparatie cu dimensiunile emulsiei de plecare. Aceasta este o dovada clara a faptului ca emulsia initiala a ramas stabila pe toata durata polimerizarii si ca copolimerul folosit este un stabilizant eficient. De asemenea, se poate nota faptul ca scaderea concentratiei in stabilizant duce la cresterea atat a dimensiunilor picaturilor emulsiei cat si a dimensiunilor nanoparticulelor de PNVP. In plus, o crestere a dimensiunilor nanoparticulelor est observata in prezenta medicamentului. Totusi, se poate constata o diferenta importanta intre particulele obtinute in prezenta unei concentratii in stabilizant (copolimerul binedefinit pe baza de PDMS) de 1 si 3 %. Cresterea concentratiei de stabilizant duce la scaderea dimensiunii particulelor, asa cum era de asteptat. Pentru toate emulsiile preparate in prezenta unei concentratii de 3 wt% stabilizant, nanoparticulele rezultate au o polidispersitate inferioara valorii de 0.1, ceea ce corespunde unui sistem monodispers.

Figura 14 prezinta superpozitia curbelor de distributie in volum obtinute prin DLS pentru proba PNVP1 (emulsia initiala si nanoparticulele de PNVP).

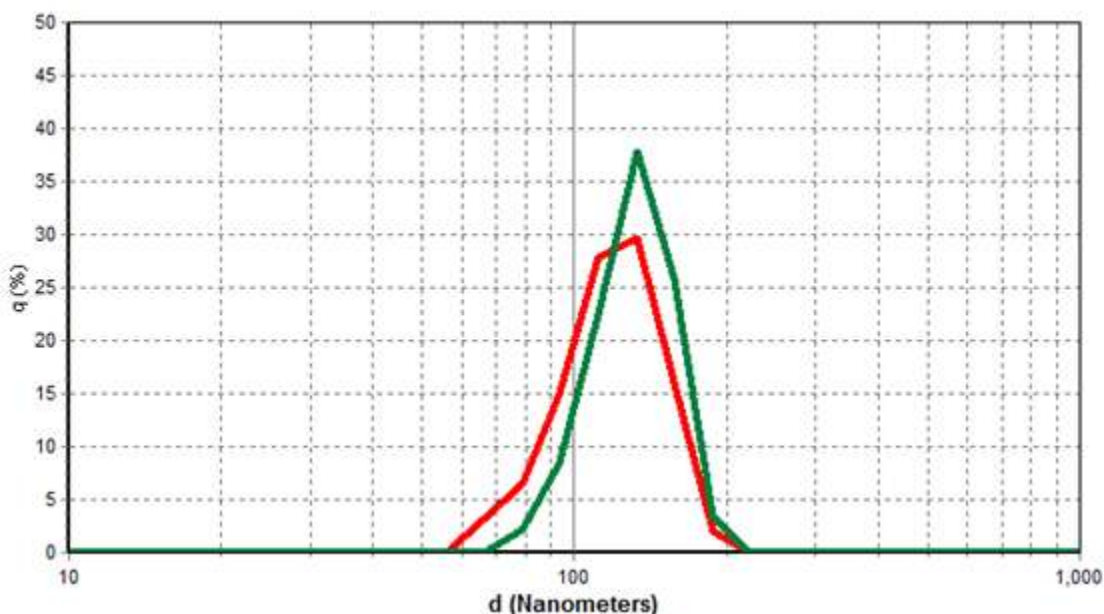


Figura 14: Curbele de distributie in volum obtinute prin DLS pentru proba PNVP1; emulsia initiala este in rosu iar curba corespunzatoare nanoparticulelor de PNVP este data in verde.

Aceste nanoparticule au fost analizate si prin microscopie electronica de baleiaj (MEB) iar pozele obtinute sunt prezentate in **Figura 15a**, pentru proba PNVP1, si **15b**, pentru proba PNVP2.

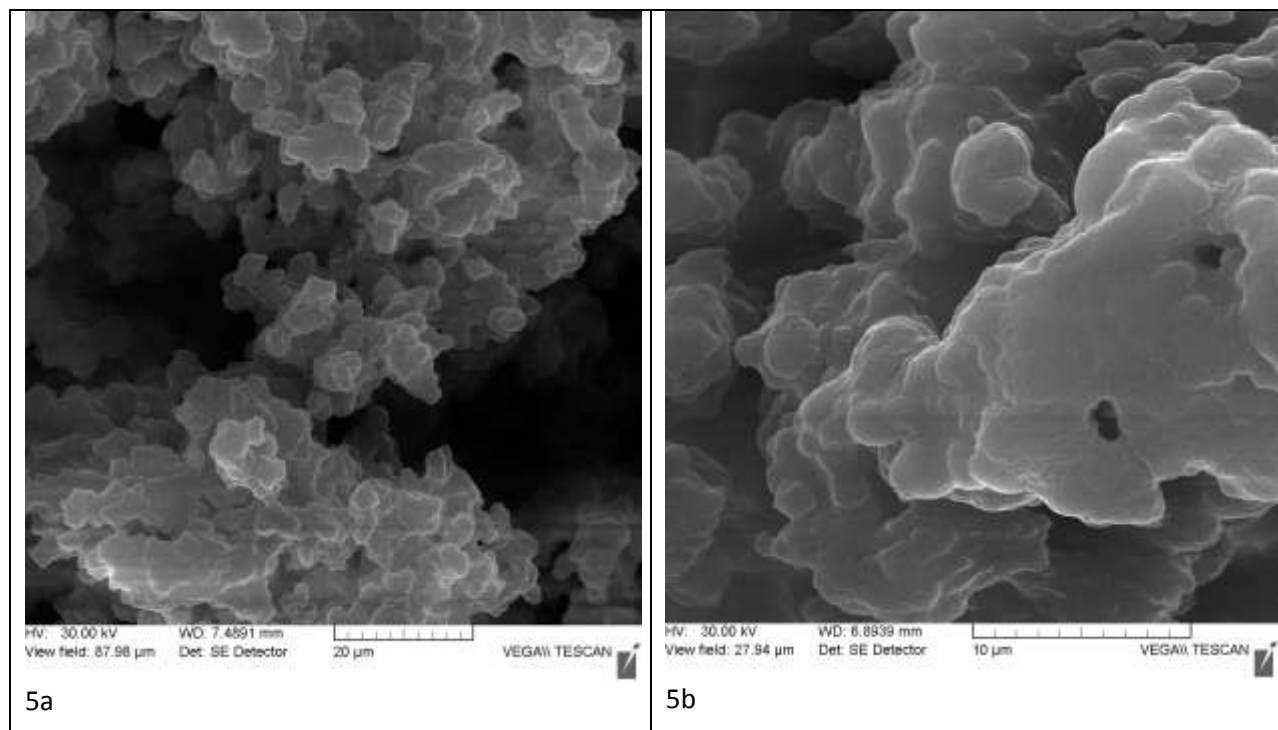


Figura 15: Analizele MEB pentru probele PNVP1 si PNVP2.

Din aceste clisee, se poate observa prezenta unor nanoparticule aglomerate intr-o matrice. Asa cum reiese si din spectrele RMN, spalarea cu hexan nu a indepartat in totalitate uleiul de silicon SO50, de aceea se poate presupune ca matricea observata prin MEB corespunde acestui ulei de silicon.

In afara nanoparticulelor de PNVP, s-au obtinut si o serie de nanoparticule de PCL. Sinteza acestor nanoparticule a avut loc printr-o polimerizare in emulsie neapoasa care s-a desfasurat timp de 4h la o temperatura de 40°C. Volumul total al emulsiei a fost pastrat la 50 ml si s-a folosit acelasi raport intre cele doua faze, 20/80 CL/SO50. De asemenea, s-a folosit acelasi copolimer AL5, la o concentratie de 3 wt%. Intr-un exemplu tipic s-au folosit 40 ml SO50 in care s-a adaugat copolimerul AL5 la o concentratie de 3 wt%, 10 ml CL in care s-au solubilizat 0.576 g PTA. Dupa polimerizare, nanoparticulele obtinute au fost purificate cu dietil eter si

metanol si caracterizate prin DLS, FTIR, DSC si ATG. **Tabelul 12** prezinta toti parametrii experimentali care au fost folositi pentru obtinerea dispersiilor neapoase de PCL.

Tabel 12: Parametrii experimentali utilizati la polimerizarea in emulsie neapoasa a CL si caracteristicile moleculare ale produsilor obtinuti

Proba	Raportul fazelor (CL/PDMS) (vol/vol)	Concentratia in stabilizant (copolimer) (wt%) ^a	Dv (nm)		PDI Dispersii neapoase	Mn (g/mol)	Tm (°C)
			Emulsii	Dispersii neapoase			
PCL1	20/80	1	429.0 ±2.1	453.3 ±0.9	0.50 ±0.05	8500	65.2
PCL2	10/90	1	289.5 ±0.9	301.8 ±0.5	0.41 ±0.09	7800	62.4
PCL3	5/95	1	253.1 ±1.1	268.4 ±1.5	0.45 ±0.1	6800	62.5
PCL4	20/80	3	120.9 ±3	132.1 ±0.8	0.04 ±0.01	5800	60.9
PCL5	10/90	3	231.4 ±1.5	275.1 ±1.0	0.51 ±0.1	8600	63.7
PCL6	5/95	3	205.7 ±1.1	221.0 ±0.9	0.35 ±0.1	7400	61.8
PCL7	30/70	3	312.8 ±1.8	336.9 ±1.1	0.5 ±0.05	5900	60.5
PCL8^b	20/80	3	142.0 ±1.8	148.0 ±1.5	0.03 ±0.01	5900	61.2

^a – concentratia copolimerului in fata continua

^b – nanoparticulele au fost obtinute in prezenta cisplatinului

Din acest tabel se poate nota ca nanoparticulele de PCL cu dimensiuni inferioare la 200 nm se obtin doar cand concentratia in stabilizant este de 3% si pentru un volum al fazelor in prezenta de

20/80. De asemenea, se poate observa ca prezenta medicamentului duce la o usoara crestere a dimensiunii nanoparticulelor de PCL.

Pentru aceste particule nereticulate, a fost posibila determinarea masei molare prin SEC. Valorile corespunzatoare Mn prezentate in Tabelul 12 indica faptul ca s-a obtinut un homopolimer cu o masa molară relativ scazuta; valoarea maxima fiind de 8600 g/mol.

Analizele DSC au permis determinarea temperaturii de topire a particulelor de PCL obtinute si asa cum se poate vedea in Tabelul 5, aceste valori oscileaza intre 60 si 65°C, ceea ce corespunde cu valorile teoretice din literatura. O termograma tipica DSC este prezentata in **Figura 16**.

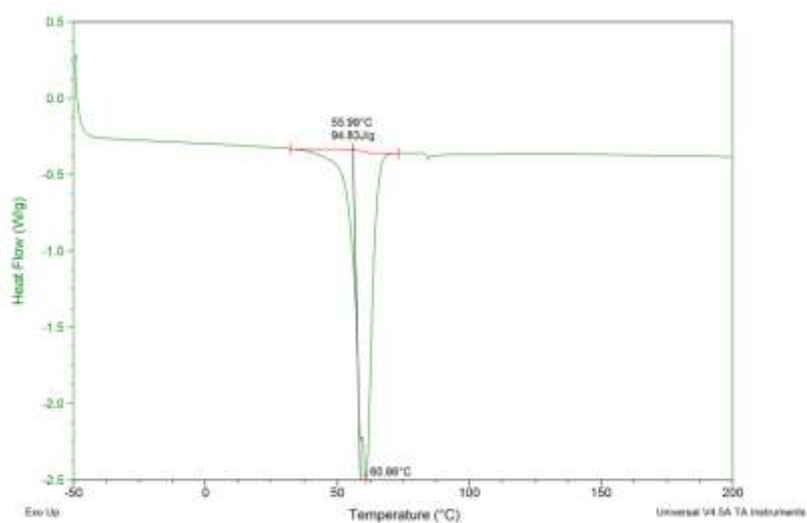


Figura 16: Curba DSC pentru proba PCL4

Atribuirea picurilor din spectrele FTIR ale particulelor de PCL este prezentata in Tabelul 13.

Tabel 13: Atribuirea picurilor din spectru FTIR ale probelor pe baza de PCL

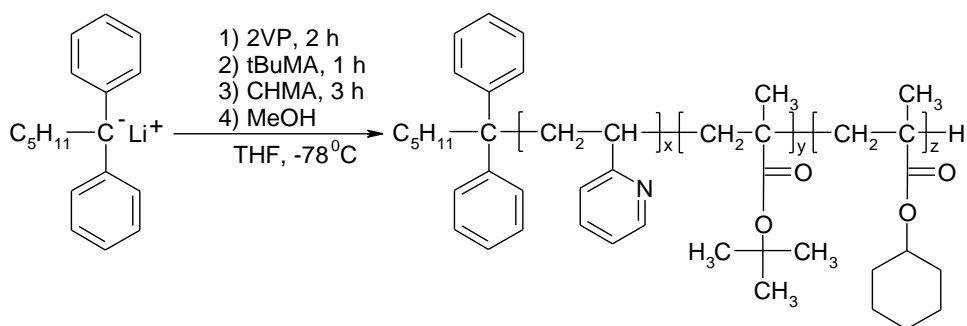
Lungime de unda (cm ⁻¹)	Grupare chimica
3433.15	O-H
2864-2944	C-H
1721	C=O
961-1471	CH ₂

Analizele FTIR au demonstrat, de asemenea, polimerizarea monomerului CL.

In urma analizelor fizico-chimice efectuate, se poate concluda ca s-au obtinut nanoparticule de PNVP si de PCL. Nanoparticulele cu dimensiunea mai mica de 200 nm vor fi folosite in etapa urmatoare in vederea determinarii proprietatilor biologice.

Cercetarile realizate pana in prezent in cadrul acestui proiect au deschis noi perspective privind domeniul copolimerilor dibloc. In acest context, s-a realizat sinteza unor serii de copolimeri bine definiti si s-a studiat auto-asamblarea lor in mediu neapos.

Copolimerii sintetizati au fost de tipul P2VP-b-PCHMA si P2VP-b-PtBuMA-b-PCHMA conform reactiei date in **Figura 17**:



Dupa incheierea polimerizarii, acesti copolimeri au fost precipitati in metanol, filtrati si uscati la etuva de vid iar apoi au fost analizati prin RMN si SEC. Caracteristicile lor moleculare sunt prezentate in **Tabelul 14**.

Tabel 14: Caracteristicile moleculare ale copolimerilor sintetizati

Proba	Mn (g.mol ⁻¹)			Mn total (g.mol ⁻¹)	P2VP (fractie molară)	Đ
	P2VP	PtBuMA	PCHMA			
V ₄₇ -C ₂₆₀	4900	-	43600	48500	0.15	1.24
V ₂₅ -T ₁₂ -C ₁₇₃	2600	1700	29000	33300	0.12	1.10
V ₄₈ -T ₅ -C ₃₁₆	5000	700	53700	59000	0.13	1.11
V ₁₀₇ -T ₅₂ -C ₆₀₄	11200	7400	101400	120000	0.14	1.20

Caracteristicile lor coloidale au fost determinate într-un solvent organic model, de tipul metilciclohexan iar rezultatele obtinute sunt date in **Tabelul 15**. Solutiile micelare au fost obtinute prin disolutie directa in solventul organic utilizat.

Table 16: *Caracteristicile coloidale ale solutiilor organice de copolimeri*

Proba	Rh (nm)	[η] (ml.g⁻¹)	k_{Huggins}	M_{micela} (10⁶ g.mol⁻¹)	Z
V₂₅-T₁₂-C₁₇₃	17.9	16.9	0.939	2.14	65
V₄₇-C₂₆₀	24.7	21.9	0.892	4.34	89
V₄₈-T₅-C₃₁₆	27.7	26.6	0.815	5.04	85
V₁₀₇-T₅₂-C₆₀₄	42.4	32.9	0.816	14.6	122

Ca o tendință generală, se poate observa că caracteristicile micelare, cum ar fi: dimensiunea micelilor Rh, viscozitatea intrinsecă și numărul de agregare Z cresc, în limitele de eroare experimentală, cu creșterea valorii gradului de polimerizare DP_n a segmentului insolubil P2VP precum și cu lungimea lanțului PCHMA.

In continuare s-a analizat prin DLS stabilitatea acestor solutii micelare in timp. Din rezultatele tipice prezentate in **Tabelul 16** se poate constata ca dimensiunea acestor micide nu varieaza timp de 30 de zile, cel putin, si deci se poate afirma cu certitudine ca aceste solutii micelare sunt stabile.

Tabel 16: *Stabilitatea in timp a solutiilor micelare*

Proba	Rh (nm)			
	0 zile	1 zi	15 zile	30 zile
P₄₇-C₂₆₀	24.7	24.8	24.9	24.8
P₁₀₇-T₅₂-C₆₀₄	42.4	42.2	42.0	42.7

Din literatura s-a putut constata faptul ca un complex interpolimeric poate fi format intre copolimerii pe baza de P2VP si cei pe baza de PAA. In acest context, am studiat formarea complexilor intre copolimerii PCHMA-b-PAA si PCHMA-b-P2VP intr-un solvent organic

comun (1,4 dioxan). In **Figura 18** este reprezentata schematic acest mecanism de complexare care duce la formarea unor micle.

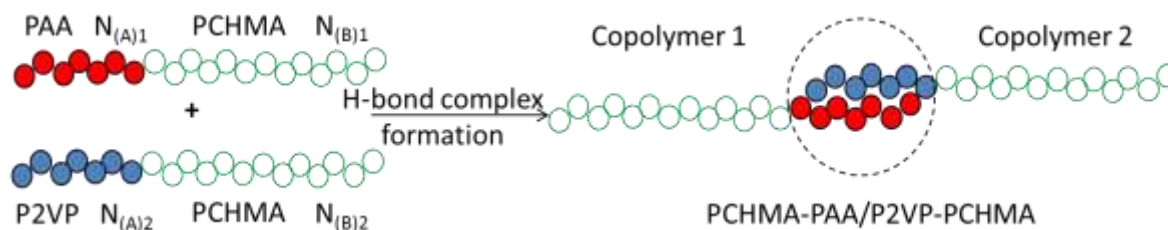


Figura 18: *Reprezentarea schematica a complexului interpolimeric format intre PCHMA-b-PAA si PCHMA-b-P2VP in 1,4 dioxan*

De asemenea, s-au corelat dimensiunile micelare ale acestor complexi interpolimerici cu caracteristicile moleculare, cum ar fi DPn a copolimerilor de pornire, si s-a observat o corelatie liniara intre aceste date. In **Tabelul 17** sunt prezentate dimensiunea micelilor formate dar si valorile viscozitatii intrinseci.

Tabel 17: *Caracteristicile coloidale ale complexelor interpolimerici*

Copolimer 1	Copolimer 2	Rh (nm)	$[\eta]$ (ml.g ⁻¹)
C ₁₀₀ -A ₃₂	V ₂₅ -T ₁₂ -C ₁₇₃	15.0	18.3
C ₁₆₈ -A ₃₄	V ₂₅ -T ₁₂ -C ₁₇₃	15.7	20.5
C ₅₂₀ -A ₂₁₄	V ₂₅ -T ₁₂ -C ₁₇₃	19.7	23.4
C ₅₂₀ -A ₂₁₄	V ₄₇ -C ₂₆₀	22.6	28.4
C ₅₂₀ -A ₂₁₄	V ₄₈ -T ₅ -C ₃₁₆	22.0	31.4
C ₁₀₀ -A ₃₂	V ₁₀₇ -T ₅₂ -C ₆₀₄	24.5	37.8
C ₅₂₀ -A ₂₁₄	V ₁₀₇ -T ₅₂ -C ₆₀₄	29.6	44.0

Etapa IV: Studiul privind evaluarea caracteristicilor biologice ale nanoparticulelor

In cadrul etapei IV au fost analizate probele E1, E4, E5, E6 și E8 iar caracteristicile acestora sunt prezentate in **Tabelul 18**. Aceste probe au fost selectionate deoarece prezinta caracteristicile optime din punct de vedere al dimensiunii particulelor.. Nanoparticulele de PVP s-au obtinut

printr-o polimerizare, la 60°C timp de 5h, plecand de la o emulsie neapoasa de tipul NVP in PDMS cu un volum total de 50 ml (40 ml PDMS/10 ml NVP) stabilizata de un copolimer pe baza de PDMS la o concentratie masica de 3 %; concentratia in initiator (ACPA) a fost pastrata constanta si egala cu 2 % iar concentratia in reticulant a fost variata intre 1 si 3%. Pentru obtinerea nanoparticulelor cu medicament, acesta a fost solubilizat in faza dispersata (NVP) la o concentratie de 8 mg/ml NVP.

Nanoparticulele de PCL au fost obtinute printr-o polimerizare, la 40°C timp de 4 h, plecand de la o emulsie neapoasa de tipul CL in PDMS cu un volum total de 50 ml (40 ml PDMS/10 ml CL) stabilizata cu un copolimer de tipul PDMS-PCL la o concentratie masica de 3%. Medicamentul a fost solubilizat in faza dispersata CL la o concentratie de 8 mg/ml CL.

Tabel 18: Caracteristicile nanoparticulelor pe baza de PVP si PCL analizate in etapa IV

Proba	Polimer	Concentratia de reticulant (%)	Medicament	Dv (nm)
E5	PNVP5	1	-	128.3
E7	PNVP7	1	Cisplatin	148.0
E6	PNVP6	2	Cisplatin	130.1
E1	PNVP1	3	-	132.6
E4	PCL4	-	-	132.1
E8	PCL8	-	Cisplatin	148.8

Activitate 4.1 : Studiul eliberării medicamentelor din nanoparticulele pe baza de PCL sau PVP

Intr-o prima etapa din cadrul acestei activitati a fost studiat gradul de umflare al nanoparticulelor pe baza de PVP reticulat (E1, E5 si E6) la doua valori de pH si 37°C. Pentru particulele de PCL nu a fost necesar acest studiu deoarece acestea au o natura hidrofoba si nu se umfla in mediu apos.

4.1.1 Umflarea nanocapsulelor de PVP în soluții apoase

Gradul de umflare (Q) al nanoparticulelor de tip E1, E2 si E5 în mediu apos ușor bazic (pH = 7,4) si in mediu apos ușor acid (pH = 6,4) a fost determinat folosind metoda gravimetrică. O cantitate specifică (50 mg) de nanoparticule a fost suspendată într-o solutie apoasă. Suspensia formată a fost introdusă într-un tub Eppendorf și a fost menținută sub agitare magnetică la 120 rpm la temperatura de 37°C. La anumite intervale de timp suspensia a fost centrifugată,

supernatantul a fost eliminat, și proba umflată a fost cântărită. Urmele de apă de pe pereții tubului au fost îndepărtate prin tamponare cu hârtie de filtru. Gradul de umflare a fost calculat cu relația:

$$Q(\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \cdot 100$$

W_1 – greutatea probei umflate;

W_0 – greutatea inițială a probei uscate.

Studiul comportării în dispersie apoasă a nanoparticulelor s-a impus dată fiind potențiala lor utilizare ca purtători de medicamente. Trebuie menționat de la bun început faptul că umflarea nanoparticulelor este datorată pătrunderii apei prin difuzie în matricea polimeră, până la umplerea acesteia. Evident, cantitatea de apă pătrunsă în interiorul nanoparticulelor depinde de densitatea de reticulare a rețelei polimerice care va determina viteza de difuzie a soluției apoase prin matricea polimeră. În **Figura 19 și 20** sunt prezentate rezultatele studiului cineticii de umflare a nanoparticulelor de PVP în mediu apos ușor bazic (pH = 7,4) și în mediu apos ușor acid (pH = 6,4). Se poate observa că toate probele analizate prezintă o umflare rapidă, care este cauzată de pătrunderea bruscă a apei prin membrana polimeră, urmată de o umflare mai lentă după care se instalează echilibrul. De asemenea, s-a constatat că, odată cu creșterea cantității de reticulant din sistem, gradul de umflare scade, acest comportament datorându-se creșterii densității de reticulare a matricii polimerice. Gradul de umflare al nanoparticulelor în mediul apos ușor bazic (pH = 7,4) s-a situat în intervalul de 491 - 660 %, iar în mediul apos ușor acid (pH = 6,4) a fost între 474-596%.

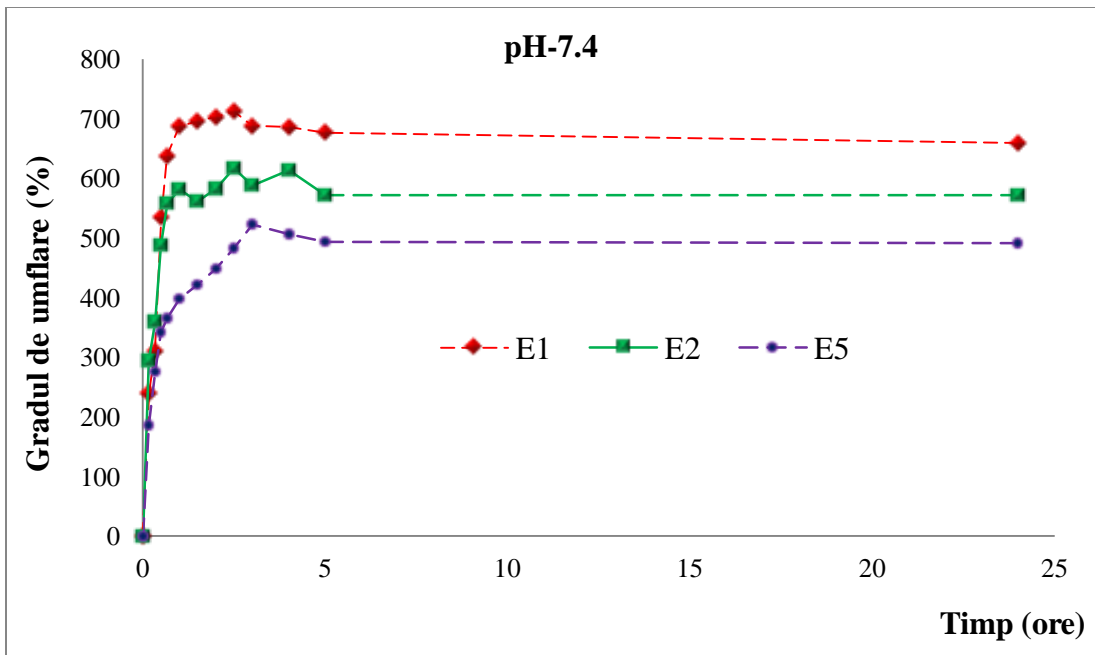


Figura 19. Cinetica de umflare a nanoparticulelor în mediu apos ușor bazic ($pH = 7,4$)

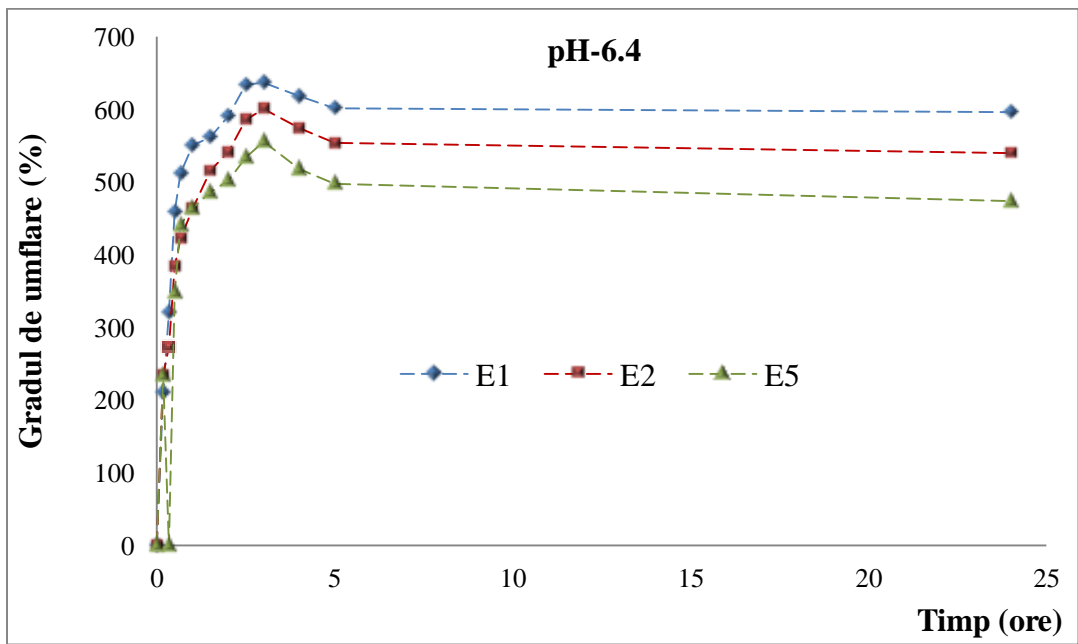


Figura 20. Cinetica de umflare a nanoparticulelor in mediu apos ușor acid ($pH = 6,4$)

4.1.2 Eliberarea *in vitro* a Cisplatinului din nanoparticulele de PVP si PCL

Nanoparticulele au câștigat o atenție considerabilă în dezvoltarea și cercetarea sistemelor de eliberare de medicamente datorită avantajelor majore pe care le prezintă. Aceste sisteme devin din ce în ce mai atractive în industria farmaceutică, datorită dimensiunilor lor mici care permit o administrare parenterală (fără a trece prin sistemul digestiv), o mai bună direcționare și o suprafață mai mare de absorbție la membranele celulare. Scopul cercetării noastre a constat în realizarea de noi nanoparticule apte să devină suporturi pentru încapsularea și eliberarea controlată a unui medicament antitumoral (cisplatin sau paclitaxel), care să ofere o soluție la problemele actuale din domeniul farmacologiei și medicinei. Terapia convențională de medicamente implică de obicei, administrarea periodică a unui agent terapeutic care a fost formulat într-o manieră ce poate să asigure stabilitatea, activitatea, și biodisponibilitatea acestuia. Aceste sisteme tradiționale sunt caracterizate prin cinetici de eliberare imediate și necontrolate. În consecință, absorbția medicamentului este, în principal, controlată de capacitatea organismului de a asimila agentul terapeutic. Concentrația medicamentului în diferite țesuturi ale corpului suferă, de obicei, o creștere bruscă urmată de o scădere similară. Ca o consecință, concentrația medicamentului poate să se apropie periculos de pragul de toxicitate iar apoi să scadă sub nivelul terapeutic eficient. Prin urmare, conceptul de eliberare controlată de medicamente a fost introdus pentru a depăși această limitare a terapiei convenționale și pentru a menține concentrația medicamentului în sânge sau în țesuturile țintă, la o valoare dorită, atâta timp cât este posibil.

Procesul de eliberare a Cisplatinului din nanoparticule în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4) a fost monitorizat prin masuratori spectroscopice UV-VIS utilizând un dispozitiv UV-VIS Nanodrop One. Masuratorile au fost realizate la o lungime de undă de 204 nm. Cinetica de eliberare a Cisplatinului a fost studiată pentru: medicamentul simplu, nanoparticulele de tip E6, E7 și nanoparticulele de tip E8, și a fost evaluată utilizând celule de difuzie Franz prevazute cu membrana artificială de celuloză.

În compartimentul donator a fost introdusă suspensia de nanoparticule (30 mg de nanoparticule dispersate în 0.5 ml PBS-7.4). Cantitatea de Cisplatin în încărcată în nanoparticule a fost de aproximativ 0.01 mg Cisplatin/1 mg nanoparticule. În compartimentul receptor a fost asigurată o bună agitare pe tot parcursul experimentului (120 rpm) iar temperatura de lucru a fost menținută constantă la $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Un anumit volum de soluție (totdeauna același) a fost prelevat la

intervale de timp prestabilite masurandu-se absorbanta acestuia cu un spectrofotometru UV-VIS.

Eficienta de eliberare a principiului activ ($E_{ef}\%$) a fost calculata dupa cum urmeaza:

m_r = cantitatea de Cisplatin eliberata (mg);

m_l = cantitatea de Cisplatin incarcata in nanoparticule (mg).

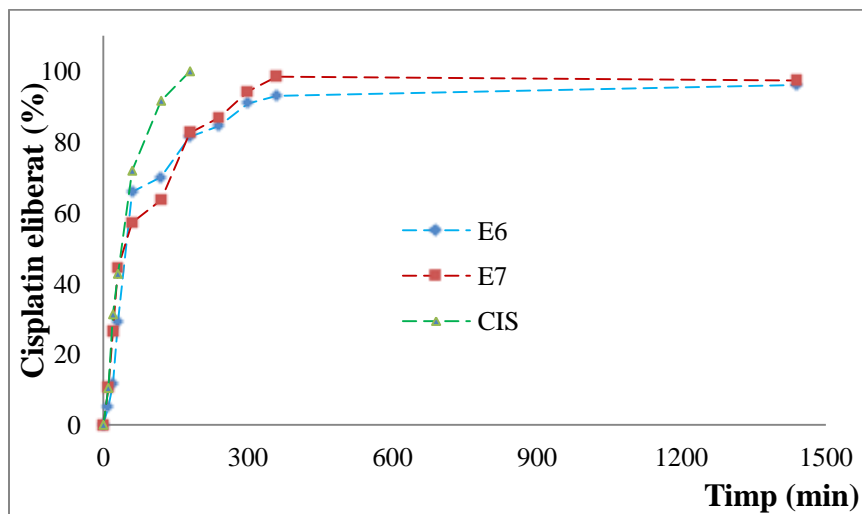


Figura 21. *Cinetica de eliberare in vitro a Cisplatinului simplu si a Cisplatinului din nanoparticulele pe baza de PVP (E6, E7) in solutie de tampon fosfat (pH = 7,4)*

Din **Figura 21** se observa ca concentratia de Cisplatin eliberat este mai ridicata pentru proba E7 in comparatie cu proba E6, ceea ce este normal avand in vedere gradul de reticulare mai redus.

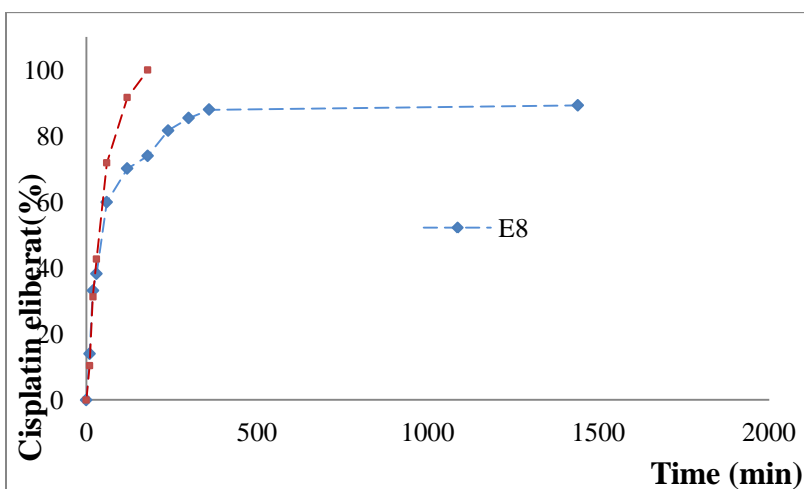


Figura 22. *Cinetica de eliberare in vitro a Cisplatinului simplu, a Cisplatinului din nanoparticulele pe baza de PCL (E8) in solutie de tampon fosfat (pH = 7,4)*

In comparatie cu Cisplatinul liber, se observa ca eliberarea din nanoparticulele de PVP sau de PCL se face intr-un mod mai lent si mai controlat.

Pe baza rezultatelor obtinute se pot trage urmatoarele concluzii:

- Cisplatinul simplu traverseaza membrana celulei Franz intr-un procent de 100% dupa aproximativ 180 minute de la debutul experimentului;
- Pentru nanoparticule s-a înregistrat o eliberare mai rapida in primele 4-5 ore urmata de o eliberare mai lenta pana la echilibru (Figura 21 si 22);
- Eficienta de eliberare a Cisplatinului in mediu slab alcalin din nanoparticulele E6 si E7 de tip PVP este situat intre 97% și 99% iar din nanoparticulele E8 de tip PCL este de aproximativ 92%.

4.1.3 Evaluarea eficientei de incarcare si eliberare a Paclitaxelului din nanoparticulele pe baza de PVP si PCL

Studii de încarcare a nanoparticulelor E1 si E4 cu Paclitaxel

Incarcarea particulelor de PVP si PCL cu Paclitaxel s-a realizat prin difuzie folosind urmatorul mod de operare: 50 mg de nanoparticule au fost dispersate în 1.5 ml solutie alcoolica de Paclitaxel (Etanol/Ser fiziologic (0.9%), intr-un raport volumic de 1/1) cu o concentratie de 15 mg/ml. Nanoparticulele au fost tinute in aceasta solutie la 37°C sub agitare timp de 3h, durata care corespunde cu durata in care s-a inregistrat gradul maxim de umflare. In etapa urmatoare, suspensia a fost centrifugata, supernatantul a fost indepartat iar sedimentul a fost liofilizat in prezenta unui crio-protector (trehaloza).

Cantitatea de Paclitaxel incarcata in nanoparticule a fost in cazul probei E1 de aproximativ 0.03 mg Paclitaxel/1 mg nanoparticule iar in cazul probei E4 a fost de aproximativ 0.05 mg Paclitaxel/1 mg nanoparticule. Masuratorile au fost realizate prin spectroscopie UV-Vis la o lungime de unda de 233 nm.

Studii de eliberare a Paclitaxelului din probele E1 si E4

Procesul de eliberare a Paclitaxelului din nanoparticule in solutie de Etanol/Ser fiziologic (0.9 %) a fost monitorizat prin masuratori spectroscopice UV-VIS utilizand un dispozitiv UV-VIS Nanodrop One. Masuratorile au fost realizate la o lungime de unda de 233 nm. Cinetica de eliberare a Paclitaxelului a fost studiata pentru: nanoparticulele de tip E1 si E4, si a fost evaluata utilizand celule de difuzie Franz prevazute cu membrana artificiala de celuloza. In compartimentul donor a fost introdusa suspensia de nanoparticule (50 mg de nanoparticule

dispersate în 1 ml Etanol/Ser fiziologic (0.9%). In compartimentul receptor a fost asigurata o buna agitare pe tot parcursul experimentului (120 rpm) iar temperatura de lucru a fost mentinuta constanta la $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Un anumit volum de solutie (intotdeauna acelasi) a fost prelevat la intervale de timp prestabilite masurandu-se absorbanta acestuia cu un spectrofotometru UV-VIS.

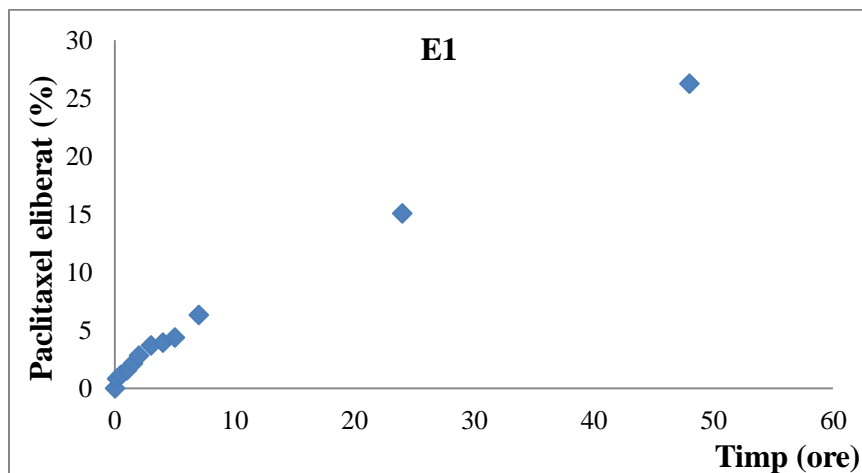


Figura 23. *Cinetica de eliberare in vitro a Paclitaxelului din nanoparticulele pe baza de PVP (E1)*

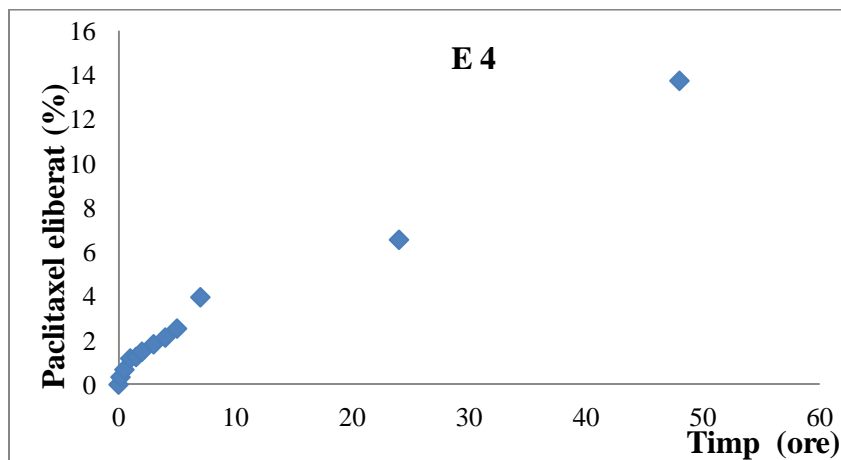


Figura 24. *Cinetica de eliberare in vitro a Paclitaxelului din nanoparticulele pe baza de PCL (E4)*

Eficienta de eliberare a Paclitaxelului din nanoparticulele E1 de tip PVP dupa primele 48 de ore de testare a fost de aproximativ 26%, iar din nanoparticulele E4 de tip PCL a fost de aproximativ 14%. Aceasta diferenta este datorata caracterului diferit al celor doua tipuri de particule, PCL avand un caracter hidrofob in timp ce PVP este hidrofil, se umfla in mediu apos si permite o crestere procentului de medicament eliberat.

Activitate 4.2 : Determinarea hemocompatibilitatii nanoparticulelor prin evaluarea gradului de hemoliza

Testul de hemoliza este o cerință obligatorie pentru materialele care intră în contact cu sângele. Interacțiunea materialelor cu componentele sangvine poate duce la schimbarea proprietăților sangvine. Din acest motiv a fost evaluată influența nanoparticulelor obținute asupra sângelui cu ajutorul unui test de hemoliza. Hemoliza reprezintă distrugerea celulelor roșii din sânge, soldată cu eliberarea hemoglobinei și a altor componente în lichidul din jur. Dacă această distrugere are loc pentru un număr semnificativ de celule roșii din sânge, poate duce la condiții patologice periculoase. Pentru evaluarea hemocompatibilitatii nanoparticulelor obținute s-a utilizat metoda spectrofotometrică. Proba de sânge uman utilizată a fost proaspăt obținută de la un voluntar sanatos nefumător. Pentru început, 5 ml de sânge au fost centrifugați la 2000 rpm timp de 5 minute, plasma a fost apoi îndepărtată și suspensia de hematii (RBC) sedimentate a fost separată și spălată de mai multe ori cu soluție salină. Suspensia de RBC a fost în final diluată cu 25 ml de soluție salină. Peste 2 ml de suspensie de RBC s-au adăugat 2 ml de suspensie de nanoparticule în soluție salină normală (concentrațiile finale au fost de 100 μg nanocapsule / ml, 250 μg nanocapsule / ml și 500 μg nanocapsule/ml). Probele control pozitiv (100% liză) și negativ (0% liză) au fost preparate prin adăugarea de volume egale de 2% Triton X-100 și respectiv de soluție salină la suspensia de RBC. Probele au fost incubate la 37°C timp de 1.5 și 3 ore. Probele au fost agitate o dată la fiecare 30 de minute pentru a resuspenda RBC-urile și nanoparticulele. După timpul de incubare, probele au fost centrifugate la 2000 rpm timp de 5 minute. Absorbția oxihemoglobinei în supernatant a fost măsurată spectrofotometric la 540 nm. Gradele de hemoliză ale RBC au fost calculate folosind relația (1):

$$Hemoliza \% = \frac{(Abs_{proba} - Abs_{Control negativ})}{(Abs_{Control pozitiv} - Abs_{Control negativ})} * 100 \quad (1)$$

Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 25-29:

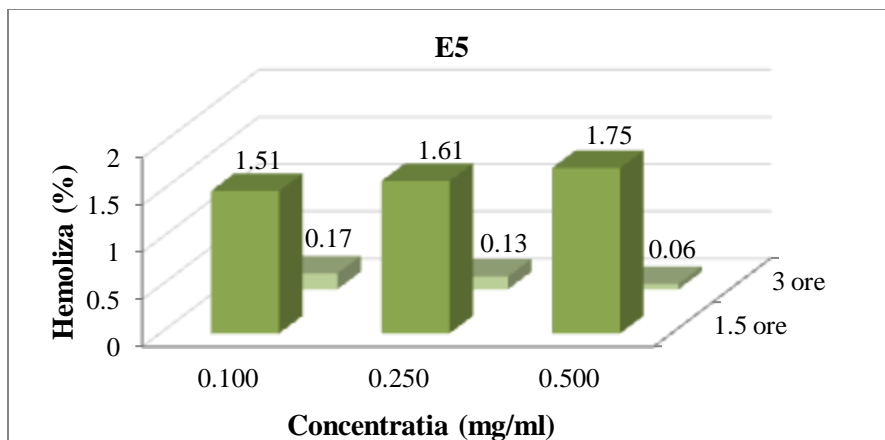


Figura 25: Gradul de hemoliza obtinut pentru proba E5

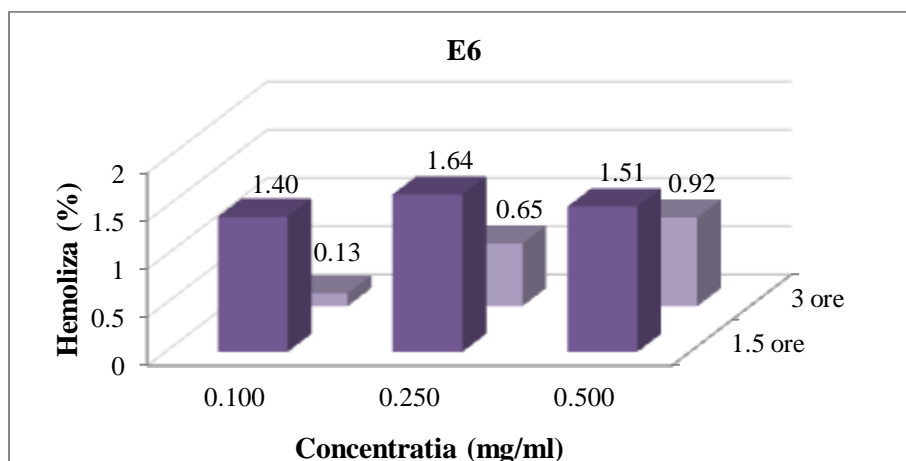


Figura 26: Gradul de hemoliza obtinut pentru proba E6

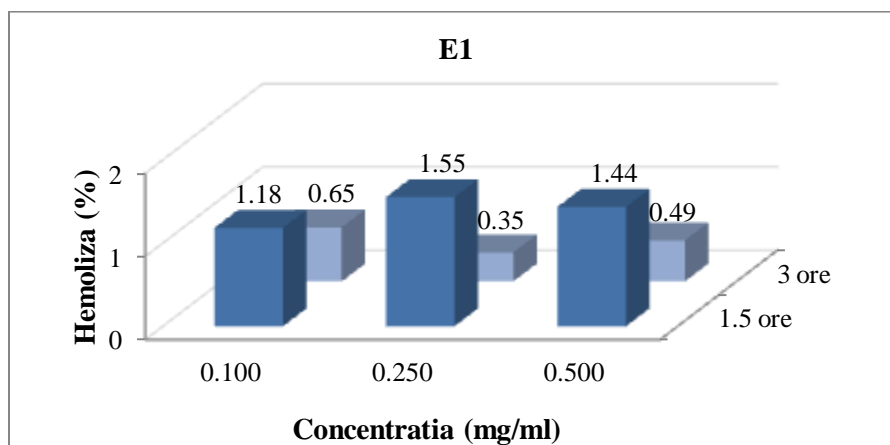


Figura 27: Gradul de hemoliza obtinut pentru proba E1

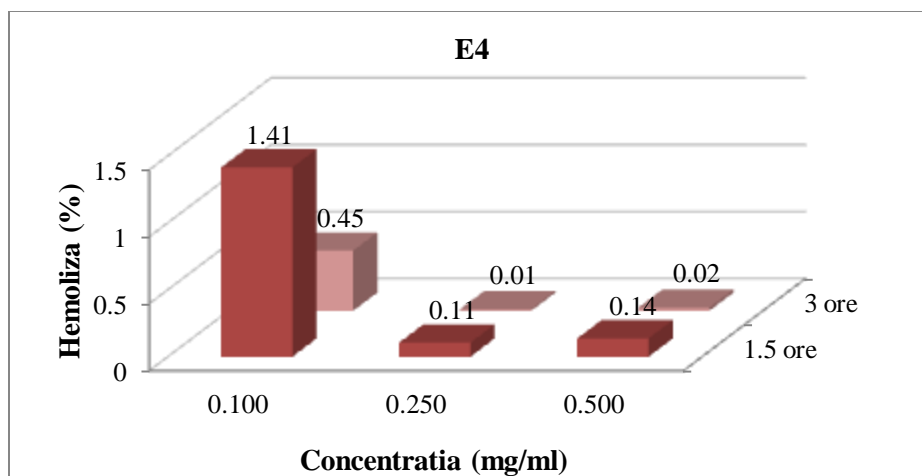


Figura 28: Gradul de hemoliza obtinut pentru proba E4

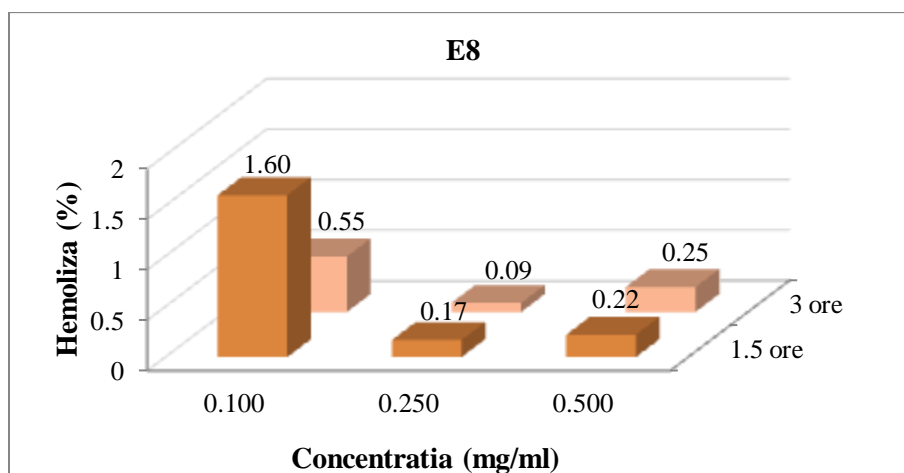


Figura 29: Gradul de hemoliza obtinut pentru proba E8

Informațiile obținute în urma acestui test sugerează că nanoparticulele obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin, care se încadrează în limitele normale (< 10% comparativ cu proba control pozitiv).

Activitatea 4.3: Studiul in vitro a citotoxicitatii nanoparticulelor

In cadrul acestei etape au fost realizate teste de citotoxicitate pe fibroblasti umani dar si pe cele 3 tipuri de celule canceroase, si anume: linia celulară **MCF-7 (ATCC® HTB-22™)**, celulele epiteliale umane izolate dintr-un adenocarcinom de glandă mamară, **A-375 [A375] (ATCC® CRL-1619™)**, celulele epiteliale umane izolate dintr-un melanom malign de piele, si celulele canceroase izolate dintr-un adenocarcinom de la nivelul plamanilor (**NCI-H596**).

In plus fata de studiul in vitro a citotoxicitatii nanoparticulelor de PVP si PCL (activitate descrisa in propunerea de proiect), in aceasta etapa s-a realizat si o alta activitate, studiul apoptozei, care

nu a fost prevazuta in propunerea de proiect dar care este foarte importanta in stabilirea comportamentului in vitro de biomaterial al nanoparticulelor sintetizate.

4.3.1 Studiul citotoxicității pe fibroblasti umani

Pentru evaluarea citotoxicității materialului luat în studiu s-au utilizat celule fibroblaste adulte, aderente, de proveniență dermică, Human Dermal Fibroblasts adult (HDFa). Anterior testării, materialul E1 fost sterilizat (timp de 5 min. la radiația UV-vis) și pus în contact direct cu celulele fibroblaste la două concentrații stabilite (250 și 500 μg/ml). Concentrația și volumul de material introdus în flacon a fost calculat și în funcție de caracteristicile flaconului de cultură utilizat (flacon de cultură steril, noncitotoxic, cu suprafața de 25 cm², volumul de lucru de 7 ml și capac de tip filtru).

Protocolul de lucru a vizat următoarele etape: prepararea mediului nutritiv complet necesar proliferării celulare (*celulele fibroblaste HDFa crioconservate au fost cultivate în mediul de creștere DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplimentat cu 10% FBS (Fetal Bovine Serum), un cocktail de antibiotice constând din 1% (v/v) penicilină-streptomicină și 1% (v/v) aminoacizi neesențiali*); dezghețarea și cultivarea celulelor fibroblaste de proveniență dermică (HDFa); pasajarea celulelor fibroblaste în vederea obținerii unui număr suficient de flacoane (flask-uri), conținând celule fibroblaste cu care materialul de testat a fost pus în contact direct; schimbarea mediului nutritiv; punerea în contact direct a materialului de testat (la cele două concentrații stabilite) cu celulele fibroblaste; analiza microscopică - microscopul inversat (CKX41, Olympus și determinarea procentului de viabilitate (la numărătorul automat de celule EVETM Automatic cell counter) utilizând testul de excludere cu albastru trypan 0,4%. Proba E1 a fost testat în duplicat, la concentrațiile enunțate mai sus, iar rezultatele au fost raportate la proba martor. Rezultatele experimentului se regăsesc în **Tabelul 19**.

Tabel 19: Rezultate viabilitate celulară - după 48 h de incubare a celulelor fibroblaste în prezența materialului supus testării (conc. 250 μg/ml, 500 μg/ml)

Nr. crt.	Cod Probe	P1%	P2%	media%	Deviația standard
	Martor	99	100	100	0,7
2	250 μg/ml	80	86	83	4,2
3	500 μg/ml	75	80	78	3,5

Rezultatele testului de citotoxicitate a indicat faptul că materialul E1 supus testării, s-a încadrat în categoria non-citotoxic la conc. de 250µg/ml, la conc. de 500 µg/ml manifestând un ușor efect citotoxic.

4.3.2 Studiul citotoxicității pe liniile de celule canceroase

Pregătirea materialului biologic

1. Linia celulară MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) este reprezentată de celule epiteliale umane izolate dintr-un adenocarcinom de glandă mamară și prezintă următoarele caracteristici de cultivare *in vitro*:

Mediul complet de creștere:

Mediul de bază pentru această linie celulară este Dulbecco modificat cu conținut crescut de glucoză (DMEM – 4,5 mg/L, Biochrom AG, Germania); ser bovin fetal la o concentrație finală de 10% bovin (Sigma, Germania), 100 µg/ml streptomycină (Biochrom AG, Germania), 100 UI/ml penicilină (Biochrom AG, Germania).

Subcultivare:

1. Se colectează mediul din placa de cultură într-un tub de centrifugă.
2. Se clătește scurt stratul de celule cu 0,25% (w/v) soluție Tripsină-EDTA (0,53 mM) pentru a elimina toate urmele de ser care conțin inhibitor de tripsină.
3. Se adăugă 2,0 până la 3,0 ml soluție Tripsină-EDTA în placa de cultură și se vizualizează celulele la un microscop inversat până când stratul celular este dispersat (de obicei în interval de 5 până la 15 minute).

Notă: Pentru a evita aglomerarea, nu se agită celulele lovind sau agitând placa în așteptarea detașării celulelor. Celulele dificile de detașat pot fi plasate la 37 ° C pentru a facilita dispersia.

4. Se adăugă 6,0 până la 8,0 ml de mediu de creștere complet și se aspiră celulele pipetând ușor.
5. Se transferă suspensia de celule în tubul de centrifugă cu mediul și celulele de la pasul 1 și se centrifughează la aproximativ 125 x g timp de 5 până la 10 minute. Se aruncă supernatantul.

6. Se resuspendă peletele celulare în mediu proaspăt de creștere și se plasează suspensiei celulare în vase noi de cultură.

7. Incubarea culturilor la 37°C.

Rata de subcultivare: 1:3 până la 1:6

Reînnoire mediu: de 2 - 3 ori pe săptămână.

Crioconservare:

Mediul de înghețare: Ser fetal bovin suplimentat cu 5% (v/v) DMSO

Temperatura de păstrare: vapori de azot lichid

Condiții de cultivare:

Atmosfera: aer, 95%; dioxid de carbon (CO₂), 5%

Temperatura: 37° C

2. **A-375 [A375] (ATCC® CRL-1619™)** – celule epiteliale umane izolate dintr-un melanom malign de piele. Pentru această linie celulară s-au avut în vedere următoarele condiții de cultivare:

Mediul complet de creștere:

Mediul de bază Dulbecco modificat cu conținut crescut de glucoză (DMEM – 4,5 mg/L, Biochrom AG, Germania), suplimentat cu 15% ser fetal bovin (Sigma, Germania), 100 μg/ml streptomycină (Biochrom AG, Germania), 100 UI/ml penicilină (Biochrom AG, Germania).

Subcultivare

1. Se colectează mediul din placa de cultură într-un tub de centrifugă.
2. Se clătește scurt stratul de celule cu 0,25% (w/v) soluție Tripsină-EDTA (0,53 mM) pentru a elimina toate urmele de ser care conțin inhibitor de tripsină.
3. Se adăugă 2,0 până la 3,0 ml soluție Tripsină-EDTA în placa de cultură și se vizualizează celulele la un microscop inversat până când stratul celular este dispersat (de obicei în interval de 5 până la 15 minute).

Notă: Pentru a evita aglomerarea, nu se agită celulele lovind sau agitând placa în așteptarea detașării celulelor. Celulele dificile de detașat pot fi plasate la 37° C pentru a facilita dispersia.

4. Se adăugă 6,0 până la 8,0 ml de mediu de creștere complet și se aspiră celulele pipetând ușor.

5. Se transferă suspensia de celule în tubul de centrifugă cu mediul și celulele de la pasul 1 și se centrifughează la aproximativ 125 x g timp de 5 până la 10 minute. Se aruncă supernatantul.

6. Se resuspendă peletele celulare în mediu proaspăt de creștere și se plasează suspensiei celulare în vase noi de cultură.

7. Incubarea culturilor la 37°C.

Rata de subcultivare: 1:3 până la 1:8

Reînnoire mediu: la fiecare 2-3 zile.

Crioconservare:

Mediul de înghețare: Ser fetal bovin suplimentat cu 5% (v/v) DMSO

Temperatura de păstrare: vapori de azot lichid

Condiții de cultivare

Atmosfera: aer, 95%; dioxid de carbon (CO₂), 5%

Temperatura: 37° C

3. Linia celulară de carcinom pulmonar adenocarcinom uman **NCI-H596-H596 (ATCC®HTB-178™)** a fost cultivată în mediu RPMI-1640 (ATCC®30-2001), suplimentat cu ser fetal 10% (FBS, Sigma, Germany), 100 μg/ml streptomycină (Biochrom AG, Germany), 100 UI/ml penicilină (Biochrom AG, Germany), în atmosferă umidificată și în prezența a 5% CO₂, la 37°C, într-un incubator Binder, până la obținerea unei confluente optime, în plăci de cultură de 75 cm².

4.3.3 Determinarea viabilității celulare prin metoda MTT

Principiul metodei

Metoda colorimetrică cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazoliu (MTT) are la bază capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii de a converti substratul hidrosolubil galben (MTT) în formazan, de culoare albastru închis, insolubil în apă, cantitatea de formazan produsă fiind direct proporțională cu numărul de celule vii.

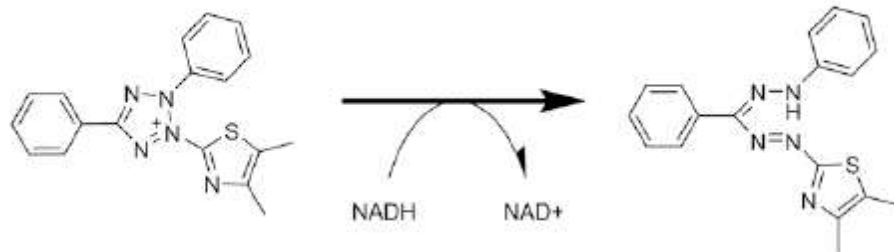


Figura 30: Reducerea enzimatică a MTT la formazan. Formazanul formează cristale solide care străpung membrana celulară după o anumită perioadă de creștere și duce la moartea celulelor, perturbând formarea suplimentară de formazan

Această metodă cantitativă, sensibilă și foarte precisă, evaluează atât efectul asupra viabilității celulare cât și asupra proliferării și stării celulare. Testul cu MTT este mult mai util în detectarea celulelor care nu se găsesc în diviziune, dar care sunt încă active, putând fi utilizat pentru a face o delimitare între proliferarea și activarea celulară. Acest test se pretează foarte bine pentru culturile celulare care cresc aderent pe substrat, permițând procesarea unui număr mare de probe, absorbțiile înregistrate convertindu-se în număr celular pe baza unor curbe standard construite cu diluții cunoscute de celule.

Tehnica de lucru

Monostratul celular a fost detașat cu tripsină / EDTA, celulele au fost numărate cu ajutorul unui numărător automat de celule (CelometerMini-Nexcelom), evaluându-se totodată și viabilitatea celulară folosind testul de excluziune cu albastru de tripan. Pentru realizarea tratamentului, celulele au fost cultivate în plăci cu 96 godeuri (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Elveția) cu densitatea de 8×10^3 celule/godeu.

Pentru ambele linii celulare tumorale, durata tratamentului a fost de 24 și 48 ore, compuşii testați și dozele folosite fiind redată în **Tabelul 20**, fiecare variantă experimentală fiind realizată în patru exemplare.

Tabel 20: Codificarea produşilor testați și dozele specifice folosite pentru tratarea celulelor, cifra din dreapta reprezentând doza ($\mu\text{g/ml}$).

Nr. crt.	Compus ($\mu\text{g/ml}$)
1	E1 100
2	E1 200
3	E1 300
4	E1 400
5	E1 500
6	E4 100
7	E4 200
8	E4 300
9	E4 400
10	E4 500
11	E6 100
12	E6 200
13	E6 300
14	E6 400
15	E6 500
16	E8 100
17	E8 200
18	E8 300
19	E8 400
20	E8 500
21	CIS 10
22	CIS 100
23	PTX 10
24	PTX 100

CIS – cisplatin; *PTX* - paclitaxel

După expirarea perioadei de incubare în prezența substanțelor de testat, mediul de incubare a fost înlocuit cu 100 μL de mediu proaspăt, peste care s-au adăugat 10 μL soluție de MTT (5 mg/ml) iar apoi celulele au fost menținute la 37°C timp de 3 ore, în condiții de umiditate și prezența CO_2 (5%). Următoarea etapă o constituie îndepărtarea a 90 μL din lichidul de cultură și dizolvarea precipitatului de formazan format cu 100 μL soluție de DMSO și plasarea culturilor în termostat 10 min, perioadă în care culoarea mediului de cultură virează spre nuanțe de violet brun.

După cele 10 minute de incubare probele au fost citite spectrofotometric la $\lambda = 562 \text{ nm}$, folosind cititorul automat pentru microplăci Biochrom EZ Read 400, conectat la calculator.

Rezultate privind evaluarea viabilității celulare

Cercetările *in vitro*, pe culturile de celule tumorale, au avut ca scop investigarea gradului de biocompatibilitate a unor noi nanoparticule de sinteză, ce au fost ulterior încărcate cu

citostaticelor de uz clinic cisplatină și paclitaxel, folosind o gamă de doze ce a variat de la 100 la 500 $\mu\text{g/ml}$, precum și evaluarea eficienței activității citostatice prin eliberarea controlată a citostaticelor, în vederea realizării unei terapii antitumorale țintite.

Compușii testați, timp de 24 și 48 de ore, au fost:

- nanoparticulele neîncărcate E1 și E4;
- nanoparticulele încărcate cu citostatice E6 și E8;
- citostaticele standard, cisplatină (CIS) și paclitaxelul (PTX).

1. În cazul tratamentului de 24 de ore cu nanoparticulele neîncărcate cu citostatice E1 și E4 a celulelor tumorale A 375, provenite dintr-un melanom malign (**Figura 31**), s-a evidențiat, comparativ cu celulele martor netratate, un efect nesemnificativ asupra viabilității celulare, valorile fiind cuprinse, în cazul E1 între 97,24% (100 $\mu\text{g/ml}$) și de 75,67% (500 $\mu\text{g/ml}$), iar în cazul E4 între 91,85% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ și 84,31% (500 $\mu\text{g/ml}$), ceea ce sugerează o bună biocompatibilitate. Tratamentul de 24 de ore cu E6 a determinat scăderi notabile ale viabilității celulare, într-o manieră dependentă de doză, înregistrându-se la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 66,30%. Nu aceeași situație se observă și în cazul tratamentului cu E8, când se constată o valoare de 85,85% a viabilității celulare la doza maximă folosită (500 $\mu\text{g/ml}$).

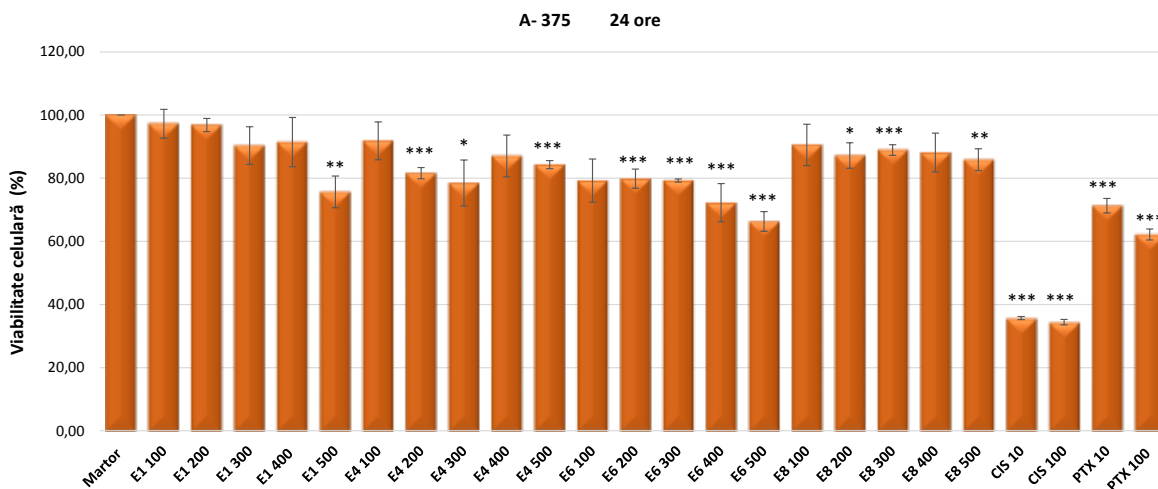


Figura 31: Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6 și E8 asupra viabilității culturilor de celule tumorale A 375

Tratamentul cu CIS timp de 24 de ore, a indus o diminuare semnificativă a viabilității celulare, fiind consemnate, surprinzător, valori similare ale viabilității celulare la cele două doze folosite, de 35,69% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 34,44% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, corespunzătoare unor efecte citotoxice foarte pronunțate, de 64,31% și respectiv 65,56%, fiind depășită limita de impusă de programele de referință de screening *in vitro* și anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50%. Tratamentul timp de 24 de ore cu PTX, a determinat o diminuare moderată a viabilității celulelor tumorale A 375, fiind înregistrate valori ale viabilității celulare de 71,32% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 62,18% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, care corespund unor efecte citotoxice de 28,68% și respectiv de 37,82%.

2. Tratamentul de 48 de ore cu compușii testați a fost urmat, în general, de diminuări ale viabilității celulelor neoplazice A 375, comparativ cu tratamentul de 24 de ore, după cum se observă din **Figura 32**. Astfel, în cazul nanoparticulelor neîncărcate cu citostatice, după 48 de ore de tratament, viabilitatea celulelor atinge, în raport cu martorul și la doza maximă folosită, de 500 $\mu\text{g/ml}$, valoarea de 80,74% pentru E1 și de 89,72% pentru E4, corelate cu valori de 19,26% și 10,28% ale citotoxicității, fiind practic non-citotoxice. În cazul tratamentul de 48 de ore cu E6 s-a înregistrat o diminuare semnificativă a viabilității celulare, într-o manieră dependentă de doză, înregistrându-se la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 46,83%, ceea ce corespunde unui efect citotoxic de 53,17%, depășind pragul minim de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Tratamentul cu nanoparticulele E8, timp de 48 de ore, a condus la diminuări progresive ale viabilității celulare, mai accentuate comparativ cu tratamentul de 24 ore, atingând la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 58,72%, ceea ce conduce la un efect citotoxic semnificativ, de 41,28%, dar care nu atinge pragul de minimum 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Și în cazul tratamentului de 48 de ore se constată o interferență puternică a cisplatinei cu viabilitatea celulară, fiind înregistrate valori de 21,84% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 20,76% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, corelate cu efecte citotoxice semnificative, de 78,16% și respectiv de 79,24%. Prelungirea tratamentul cu PTX timp de încă 24 de ore, s-a concretizat prin diminuări ale valorilor viabilității celulelor tumorale A 375 comparativ cu cele constatate în cazul tratamentului de 24 de ore, fiind înregistrate valori ale viabilității celulare de 61,56% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 48,78% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, care corespund unor efecte citotoxice de 38,44% și respectiv de 51,22%.

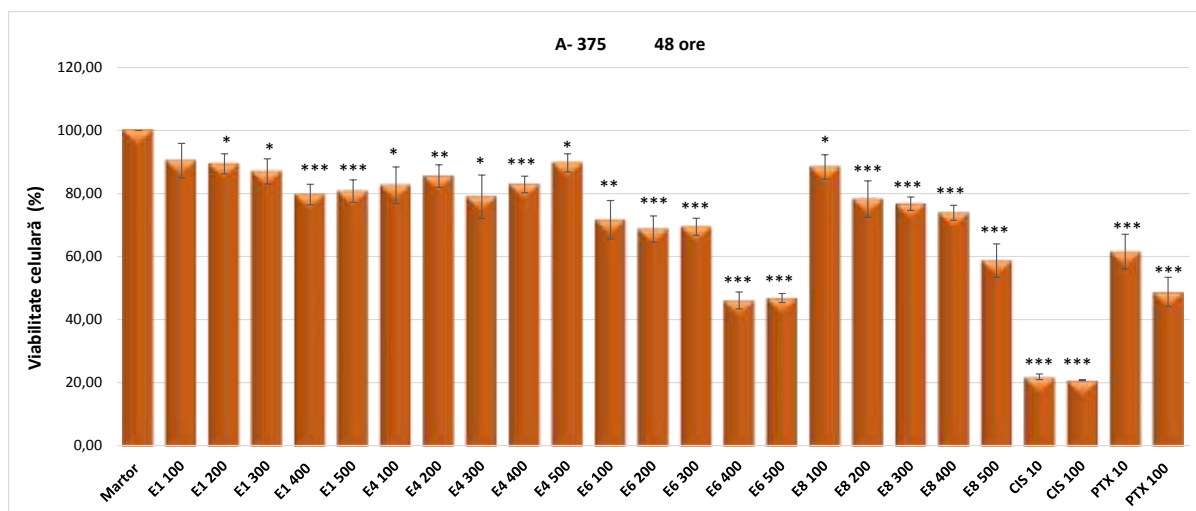


Figura 32: Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6 și E8 asupra viabilității culturilor de celule neoplazice A 375.

Se remarcă, pe de o parte, buna tolerabilitate celulară pentru nanoparticulele neîncărcate E1 și E4, iar pe de altă parte, impactul citotoxic semnificativ determinat de nanoparticulele încărcate cu citostatice, E6 și E8, însă inferior celui indus de citostaticele administrate singular.

3. Circuitul testărilor *in vitro* a inclus testarea compușilor E1, E4, E6, E8 și pe altă linie celulară tumorală, MCF 7, provenită dintr-un adenocarcinom de sân. După cum se poate observa din **Figura 33**, tratamentul timp de 24 de ore cu nanoparticulele neîncărcate E1 și E4 a celulelor neoplazice MCF 7, a evidențiat un impact neglijabil asupra viabilității celulare, valorile fiind cuprinse între 99,47% la concentrația minimă folosită (100 $\mu\text{g/ml}$), și de 82,65% (100 $\mu\text{g/ml}$) în cazul E1 și respectiv de 99,14% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ și de 91,35% (500 $\mu\text{g/ml}$) în cazul E4. Tratamentul de 24 de ore cu nanoparticulele E6 a determinat scăderi moderate ale viabilității celulare, într-o manieră dependență de doză, înregistrându-se la doza minimă (100 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 98,33% iar la doza maximă utilizată (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 81,74%. O situație similară se observă și în cazul încărcării nanoparticulelor E8, când se constată la doza minimă folosită (100 $\mu\text{g/ml}$) o valoare de 93,40% a viabilității celulare, iar la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$), valoarea de 85,71%. Tratamentul cu cisplatină timp de 24 de ore, a condus la o interferență mai scăzută cu viabilitatea celulară comparativ cu cea semnalată în cazul liniei celulare A 375, fiind consemnată la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 70,34%, pentru ca la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, să se înregistreze o valoare a viabilității celulare de 54,13%, corelate cu valori ale efectului citotoxic

de 29,66% și respectiv de 45,87%. În cazul tratamentului de 24 de ore cu PTX a celulelor de adenocarcinom de sân MCF 7, s-a constatat o interferență mai scăzută cu viabilitatea celulelor MCF 7, comparativ cu cisplatina, fiind înregistrate valori de 80,50% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 74,38% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, ceea ce reflectă un efect slab citotoxic pe această linie celulară, de 19,5% și respectiv 74,38%.

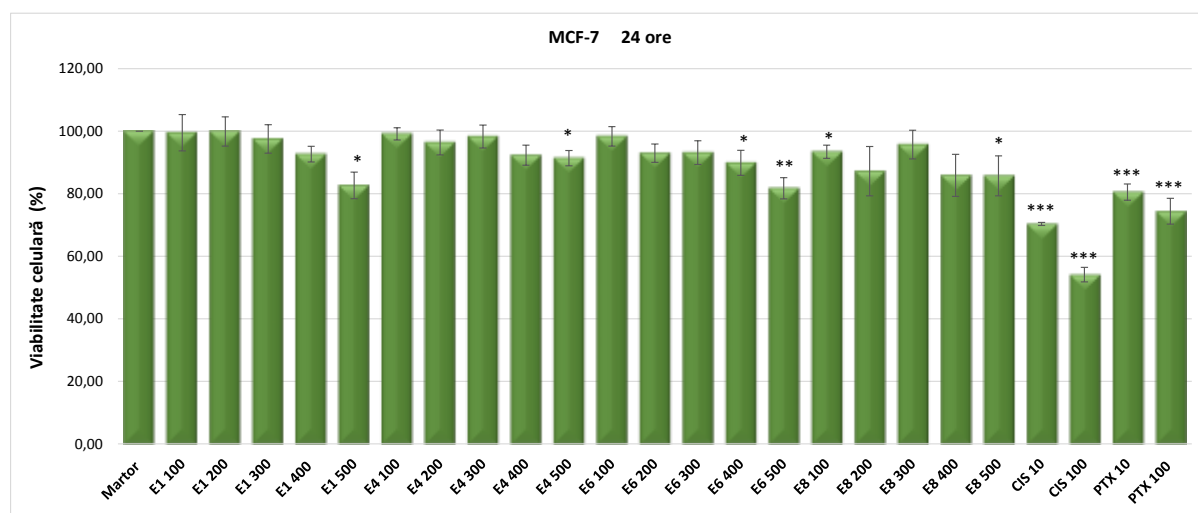


Figura 33: Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6 și E8 asupra viabilității culturilor de celule tumorale MCF 7.

4. Tratamentul de 48 de ore cu compușii E1, E4, E6 și E8 la aceleași doze, s-a concretizat prin diminuări ne semnificative ale viabilității celulare. Astfel, analizând **Figura 34**, se constată că în cazul nanoparticulelor neîncărcate cu citostatice, după 48 de ore de tratament, viabilitatea celulelor atinge, la doza maximă folosită, de 500 $\mu\text{g/ml}$, valoarea de 84,05% pentru E1 și de 83,03% pentru E4, corelate cu valori de 15,95% și 16,97% ale citotoxicității, fiind bine tolerate de celule. Spre deosebire de linia celulară tumorală A 375, tratamentul de 48 de ore a celulelor neoplazice MCF 7 cu E6 și E8 (încărcate cu citostatice) s-a caracterizat prin interferența ne semnificativă cu viabilitatea celulară, înregistrându-se la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$) valorile de 84,76%, și respectiv, de 72,97% ceea ce corespunde unor efecte citotoxice de 15,24% și respectiv 27,03%, nedepășind pragul minim de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Tratamentul singular cu cisplatină, timp de 48 de ore, a condus la diminuarea valorilor viabilității celulare, mai accentuate față de cele constatate la tratamentul de 24 ore, atingând la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 37,73%, ceea ce conduce la un efect citotoxic semnificativ, de

62,27%, care depășește pragul de minimum 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Tratamentul cu PTX timp de 48 de ore, a fost urmat de o interacțiune slabă cu viabilitatea celulelor tumorale MCF 7, fiind înregistrate valori de 71,51% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ și de 70,68% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, care corespund unor efecte citotoxice de 28,49% și respectiv de 29,32%.

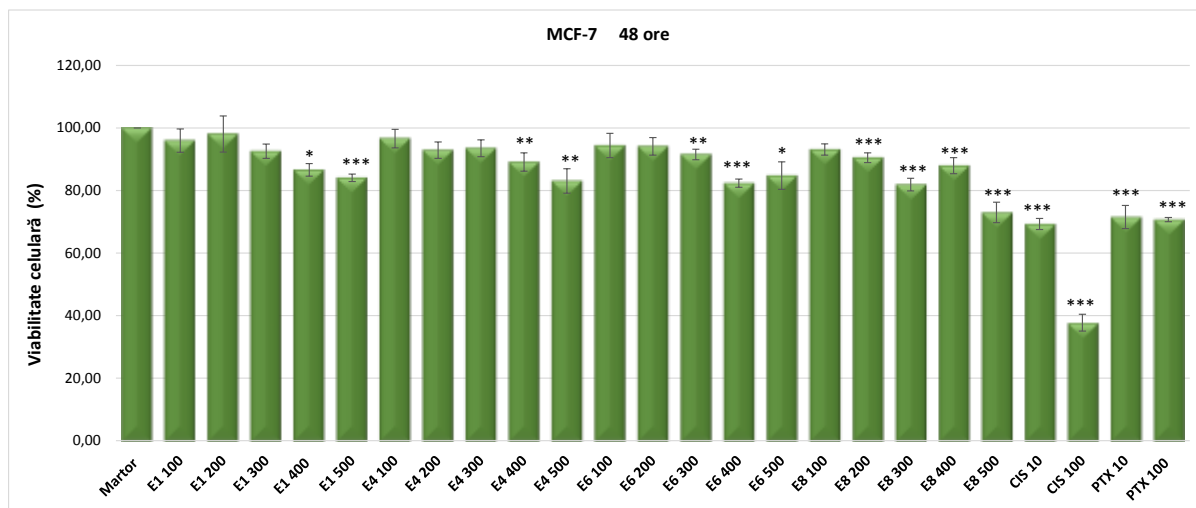


Figura 34. Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compuşilor E1, E4, E6 și E8 asupra viabilității culturilor de celule neoplazice MCF 7.

În cazul liniei celulare MCF 7 este de menționat buna biocompatibilitate a nanoparticulelor neîncărcate cu citostatice, E1 și E4. Se constată un impact citotoxic neglijabil înregistrat în cazul nanoparticulelor încărcate cu citostatice, E6 și E8, cauzat, probabil, pe de o parte, de întârzierea eliberării citostaticelor din nanoparticule, iar pe de altă parte, de reactivitatea celulară scăzută a acestei linii celulare tumorale.

5. În cazul tratamentului de 24 de ore cu nanoparticulele neîncărcate E1 și E4 a celulelor tumorale **NCI-H596**, (Figura 35), s-a consemnat, comparativ cu celulele martor netratate, un efect nesemnificativ asupra viabilității celulare, valorile fiind, în cazul E1 de 98,49% (100 $\mu\text{g/ml}$) și de 86,72% (500 $\mu\text{g/ml}$), iar în cazul E4 de 95,56% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ și de 91,52% la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$, ceea ce sugerează o bună tolerabilitate. Tratamentul de 24 de ore cu nanoparticulele încărcate cu cisplatină (E6) nu a condus la scăderi ale viabilității celulare, înregistrându-se la doza minimă o viabilitate de 97,64% iar la cea maximă, o valoare de 90,02%. O situație similară se observă și în cazul tratamentului cu particulele încărcate E8, când se constată o valoare de 93,70% a viabilității celulare la doza minimă și ușor mai scăzută, de

81,80% la doza maximă folosită (500 $\mu\text{g/ml}$). Tratamentul cu cisplatină timp de 24 de ore, a indus o diminuare semnificativă a viabilității celulare, fiind înregistrată o valoare de 45,20% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, corespunzătoare unui efect citotoxic de 54,80%, care atinge limita impusă de programele de referință de screening *in vitro* și anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50%.

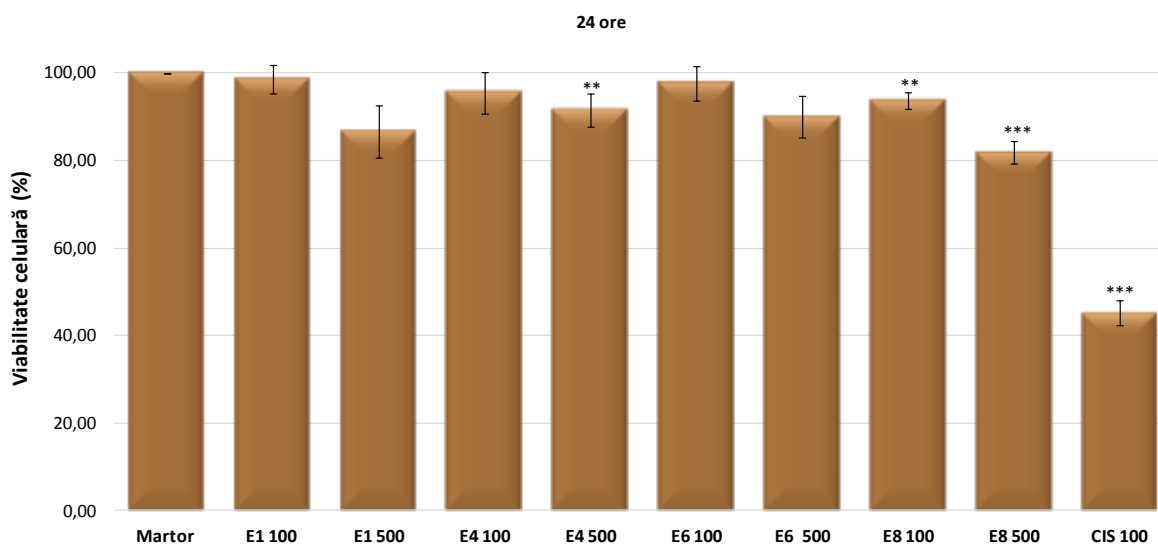


Figura 35: Impactul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6, E8 și CIS asupra viabilității culturilor de celule tumorale NCI-H596.

6. Tratamentul de 48 de ore cu compușii testați a fost urmat, în general, de diminuări ale viabilității celulelor neoplazice pulmonare NCI-H596, comparativ cu tratamentul de 24 de ore, după cum se observă în Figura 36. Astfel, tratamentul de 48 de ore cu nanoparticulele neîncărcate cu citostatic determină, comparativ cu martorul, înregistrarea unei viabilități, la doza minimă, de 88,64% iar la doza maximă, de 83,85% pentru E1 iar pentru E4 de 86,68% (la 100 $\mu\text{g/ml}$) și de 84,48% la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$, nefiind practic citotoxice. În cazul tratamentului de 48 de ore cu nanoparticulele E6 încărcate cu CIS s-a înregistrat o diminuare notabilă a viabilității celulare, într-o manieră dependentă de doză, înregistrându-se la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 47,80%, ceea ce corespunde unui efect citotoxic de 52,20%, depășind pragul minim de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Nu aceeași situație se constată la nanoparticulele încărcate E8, când la doza minimă s-a înregistrat o viabilitate de 95,10%, care a scăzut ușor la doza maximă, la 81,75%. Tratamentul cu cisplatină timp de 48 de ore, a condus la

o interferență remarcabilă cu viabilitatea celulară, fiind consemnată valoarea de 35,63%, corelată cu un efect citotoxic de 64,37%, care depășește limita minimă de 50% impusă de programele de screening *in vitro*.

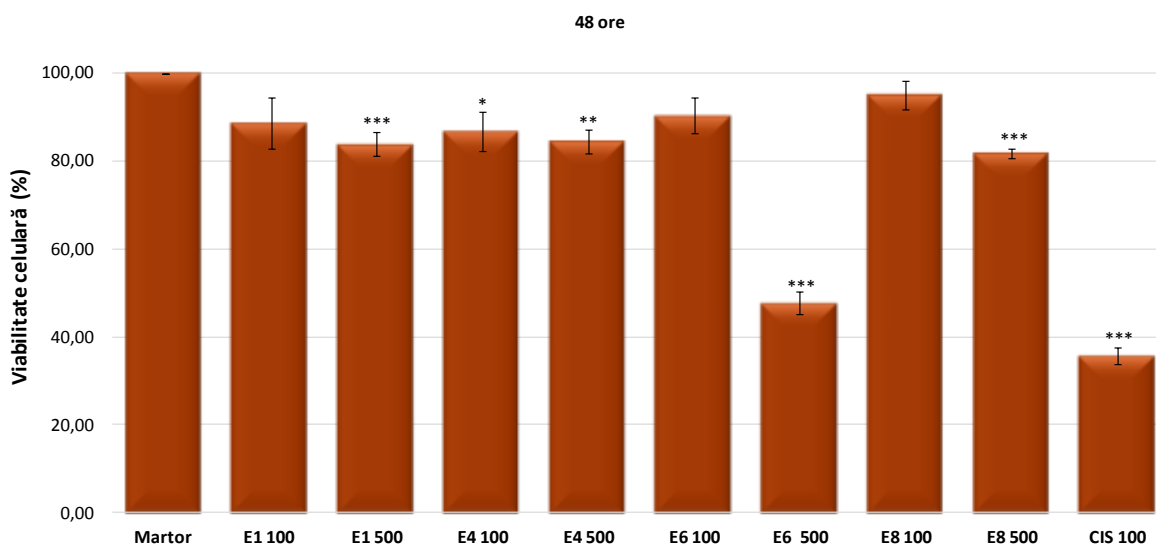


Figura 36: Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6, E8 și CIS asupra viabilității culturilor de celule neoplazice NCI-H596.

Comparativ cu liniile celulare A 375 și MCF 7 pe care au fost testați anterior compușii, în cazul liniei celulare NCI-H596 este de remarcat, de asemenea, buna biocompatibilitate a nanoparticulelor E1 și E4, neîncărcate cu cisplatină, fiind bine tolerate de celule. Se constată însă un impact citotoxic mai scăzut înregistrat în cazul nanoparticulelor încărcate cu cisplatină, E6 și E8, cauzat, posibil, pe de o parte, de întârzierea eliberării citostaticelor din nanoparticule, iar pe de altă parte, de reactivitatea celulară mai scăzută a acestei linii celulare tumorale, având o rată de diviziune mai lentă. Cel mai puternic efect citotoxic a fost înregistrat pe linia celulară A 375, urmată de linia MCF 7, apoi de NCI-H596.

În ansamblul lor, rezultatele obținute în urma testelor de viabilitate celulară confirmă buna compatibilitate celulară față de nanoparticulele nou sintetizate. Dintre cele două sisteme de vectorizare încărcate cu cisplatină, E6 a indus un efect citotoxic semnificativ, realizat printr-o eliberare mai rapidă a citostaticului din complex, care s-a manifestat pe parcursul unui contact prelungit de 48 de ore cu celulele, având însă eficiență antitumorală mai scăzută față de cea a chimioterapicului administrat singular. S-a remarcat impactul citotoxic semnificativ, în special

pe linia celulară A 375, ceea ce sugerează o posibilă aplicabilitate biomedicală, în terapia țintită a melanomului malign.

4.3.4 Evaluarea apoptozei celulare

Apoptoza sau moartea celulară programată este un proces fiziologic normal cu rol în îndepărtarea celulelor nedorite. Unul dintre evenimentele anterioare apoptozei este translocarea fosfatidilserinei (PS) membranei de la partea interioară a membranei plasmatică la suprafață. De asemenea, apoptoza este caracterizată printr-un număr de fenomene intracelulare, cum ar fi: formarea de vezicule pe suprafața membranei celulare, condensarea cromatinei și fragmentarea ADN-ului nuclear. Anexina V, o proteină de legare a fosfolipidelor dependentă de Ca^{2+} , are afinitate ridicată pentru PS, iar Anexina V marcată cu fluorocrom este utilizată pentru detectarea PS expusă la suprafața membranei celulare cu ajutorul citometriei în flux. Conjugarea dintre Anexina V și fluoresceină (FITC - Fluorescein isothiocyanat) facilitează cuantificarea rapidă a celulelor apoptotice marcate fluorescent. La începutul procesului de apoptoză, fosfatidilserina (PS) devine expusă pe suprafața celulară prin trecerea de pe partea internă spre cea externă a membranei citoplasmatică. Acest eveniment este considerat a fi important pentru recunoașterea celulelor supuse apoptozei de către macrofage - care au receptori specifici pentru fosfatidilserină, permițând astfel inițierea rapidă a procesului de fagocitoză.

Iodura de propidiu (PI) este utilizată pe scară largă împreună cu Anexina V pentru a determina dacă celulele sunt viabile, apoptotice sau necrotice datorită diferențelor în integritatea și permeabilitatea membranei plasmatică. PI este utilizată mai des comparativ cu alți coloranți nucleari, deoarece este stabilă și este un bun indicator al viabilității celulare, pe baza capacității sale de excludere a celulelor vii. Abilitatea PI de a intra într-o celulă depinde de permeabilitatea membranei; PI nu colorează celulele vii sau apoptotice timpurii datorită prezenței unei membrane plasmatică intacte. În celulele apoptotice și necrotice târzii, integritatea membranelor plasmatică și nucleare scade, permițând PI să treacă prin membrană, să se lege la acizii nucleici și să prezinte fluorescență roșie.

Etape de lucru:

1. Pentru realizarea monostratului celular, celulele au fost cultivate în plăci cu 12 godeuri la o densitate de 75×10^3 celule/godeu. După 24 de ore de la incubare s-a aplicat tratamentul cu

compușii testați folosindu-se două doze, 250 și 500 $\mu\text{g/ml}$, iar în cazul citostaticelor standard au fost testate dozele de 10 și 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. După expirarea perioadei de tratament de 48 ore, celulele au fost prelucrate pentru determinarea apoptozei după cum urmează:

- colectarea mediului de cultură în tuburi de centrifugă (tuburi sterile de 15 ml),
- spălarea filmului celular cu 300 μl TFS cald și colectarea mediului în tuburile de centrifugă corespunzătoare variantelor de tratament,
- desprinderea filmului celular cu 250 μl tripsină preîncălzită,
- incubare la 37°C timp de 5 minute,
- acțiunea tripsinei a fost stopată prin adăugare a 500 μl mediu de cultură complet (DMEM+10% FBS),
- suspensia celulară rezultată a fost transferată în tuburile de centrifugă corespunzătoare,
- centrifugare la 2500 rpm/4 minute/ 4°C ,
- resuspendare sediment în 1000 μl TFS rece,
- centrifugare la 2500 rpm/4 minute/ 4°C ,
- resuspendare sediment în 300 μl Binding Buffer 1x (BB) rece,
- centrifugare la 2500 rpm/4 minute/ 4°C ,
- resuspendare sediment în 100 μl Binding Buffer 1x (BB) rece,
- marcarea cu 5 μl Anexina V-FITC,
- repaus 20 minute la 37°C ,
- centrifugare la 2500 rpm/4 minute/ 4°C ,
- resuspendare sediment în 300 μl Binding Buffer 1x (BB) rece,
- marcarea cu 5 μl iodură de propidiu (PI). PI=1mg/ml,
- analiză la citometru în flux.

Protocolul constă, pe scurt, în detașarea celulelor prin tripsinizare, urmată de spălarea lor cu PBS (phosphate buffered saline) rece, resuspendarea lor în tamponul de legare și marcarea succesivă cu Anexina V-FITC și iodura de propidiu (furnizate cu kitul eBioscience). Analiza apoptozei a fost efectuată cu un citometru de flux QuantaSC Beckman Coulter Cell, echipat cu un laser de 488 nm și fluorescența a fost colectată pentru FITC pe FL1 (bandpass filter 525 nm) și pentru

iodură de propidiu pe FL3 (long pass filter 670 nm). Celulele care au fost negative la iodură de propidiu (PI) și negative la Anexina V sunt considerate a fi sănătoase, celulele negative la PI și pozitive cu Anexina V sunt considerate apoptotice, iar celulele pozitive pentru PI și Anexina V sunt considerate necrotice. Toate datele au fost exportate ca fișiere LMD și analizate prin software FCSalyzer v. 0.9.17-alpha.

Rezultate privind evaluarea apoptozei celulare

Apoptoza celulară a fost investigată după tratamentul de 48 de ore cu compușii testați prin testul cu Anexina V-FITC și iodură de propidiu. Determinarea apoptozei prin utilizarea anexinei V-FITC și a iodurii de propidiu are la bază afinitatea puternică a anexinei V pentru reziduurile de fosfatidilserină (în mod normal ascunse în membrana plasmatică) de la suprafața membranei celulare. De-a lungul instalării procesului apoptotic, fosfatidilserina este translocată de pe fața citoplasmatică a membranei plasmatică la suprafața celulei. Iodura de propidiu este utilizată pentru diferențierea celulelor moarte de cele vii, permițând de asemenea separarea dintre celulele preapoptotice și apoptotice în combinație cu Anexina V.

Profilul culturilor martor, în cazul celulelor neoplazice A 375 și MCF 7, relevă un număr crescut de celule viabile (91,99%, respectiv 95,67%), precum și fracții reduse de celule moarte (6,33% și respectiv 3,52%), celule preapoptotice (0,02% și respectiv 0,02%) și celule apoptotice (1,66% și respectiv 0,92%).

Aplicarea tratamentului cu proba E1, în cazul celor două culturi celulare tumorale, a condus, după 48 ore de tratament, la înregistrarea unui profil de distribuție a frecvenței diferitelor subpopulații celulare similar celui corespunzător martorului: în cazul dozei de 250 μg /ml - celule viabile (92,45 și respectiv 96,15%), celule moarte (5,25% și respectiv 2,92%), celule preapoptotice (0,06% și respectiv 0,06%) și celule apoptotice (2,25% și respectiv 1,25%), în timp ce în cazul dozei de 500 μg /ml - celule viabile (92,31 și respectiv 96,00%), celule moarte (6,16% și respectiv 3,42%), celule preapoptotice (0,09% și respectiv 0,09%) și celule apoptotice (1,45% și respectiv 0,80%)

Tratamentul cu proba E4, în cazul celor două culturi celulare tumorale, a condus la înregistrarea unui profil de distribuție a frecvenței diferitelor subpopulații celulare care indică un grad de toxicitate redus/mediu. Astfel:

- în cazul dozei de 250 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 80,11% și respectiv 91,83%, a celor moarte de 9,40% și respectiv de 7,55%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,02% în ambele cazuri, celule apoptotice 1,42% și respectiv 0,79%;

- în cazul dozei de 500 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 89,16% și respectiv 83,30%, a celor moarte de 19,28% și respectiv de 16,00%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,03% în ambele cazuri, celule apoptotice 0,60% și respectiv 0,66%;

Tratamentul cu proba E6 a determinat o reducere a viabilității celulare, pe fondul unui impact citotoxic și mai puțin prin inducerea apoptozei celulare, după 48 ore de la tratamentul inițial. Astfel:

- în cazul dozei de 250 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 67,39% și respectiv 70,08%, a celor moarte de 25,62% și respectiv de 26,23%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,08% în ambele cazuri, celule preapoptotice 7,42% și respectiv 3,98%;

- în cazul dozei de 500 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 59,86% și respectiv 62,25%, a celor moarte de 30,79% și respectiv de 28,06%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,12% și respectiv 0,13, celule apoptotice 9,24% și respectiv 9,56%.

Tratamentul cu proba E8, în cazul celor două culturi celulare (A 375 și respectiv MCF 7), a condus după 48 ore de tratament, la înregistrarea unui profil de distribuție a frecvenței diferitelor subpopulații celulare care indică un grad de toxicitate mediu/crescut. Astfel:

- în cazul dozei de 250 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 67,43% și respectiv 70,12%, a celor moarte de 29,81% și respectiv de 28,00%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,04% în ambele cazuri, celule apoptotice de 2,72% și respectiv 1,84%;

- în cazul dozei de 500 µg/ml, frecvența celulelor viabile a fost de 52,32% și respectiv 54,41%, a celor moarte de 47,19% și respectiv de 40,56%, celulele preapoptotice au avut o frecvență de 0,02% și respectiv 1,26%, celule apoptotice 0,96% și respectiv 3,77%.

Aplicarea tratamentului cu cisplatin asupra celor două linii tumorale a determinat, la doza de 250 µg/ml, înregistrarea unui profil de distribuție a frecvenței diferitelor subpopulații celulare după cum urmează: celule viabile (36,16% și respectiv 37,61%), celule moarte (45,31% și respectiv

40,27%), celule preapoptotice (1,68% și respectiv 1,76%) și celule apoptotice (16,85% și respectiv 20,35%). În cazul dozei de 500 $\mu\text{g/ml}$ s-au înregistrat: celule viabile (37,84% și respectiv 39,35%), celule moarte (35,09% și respectiv 38,98%), celule preapoptotice (2,07% și respectiv 2,17%) și celule apoptotice (25,01% și respectiv 19,49%).

Efectul tratamentului cu paclitaxel, pentru ambele culturi celulare tumorale constă în reducerea viabilității celulare, argumentată de scăderea frecvenței, în cazul dozei de 250 $\mu\text{g/ml}$, a celulelor viabile (62,10% și respectiv 64,69%) și creșterea frecvenței celulelor moarte (27,14% și respectiv 25,08%), celule preapoptotice (1,36% și respectiv 1,42%) și celule apoptotice (9,31% și respectiv 8,95%). Efectul citotoxic și preapoptotic a fost mai pronunțat la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$, semnalându-se: celule viabile (45,59% și respectiv 47,41%), celule moarte (44,30% și respectiv 46,35%), celule preapoptotice (4,85% și respectiv 4,00%) și celule apoptotice (5,23% și respectiv 2,25%).

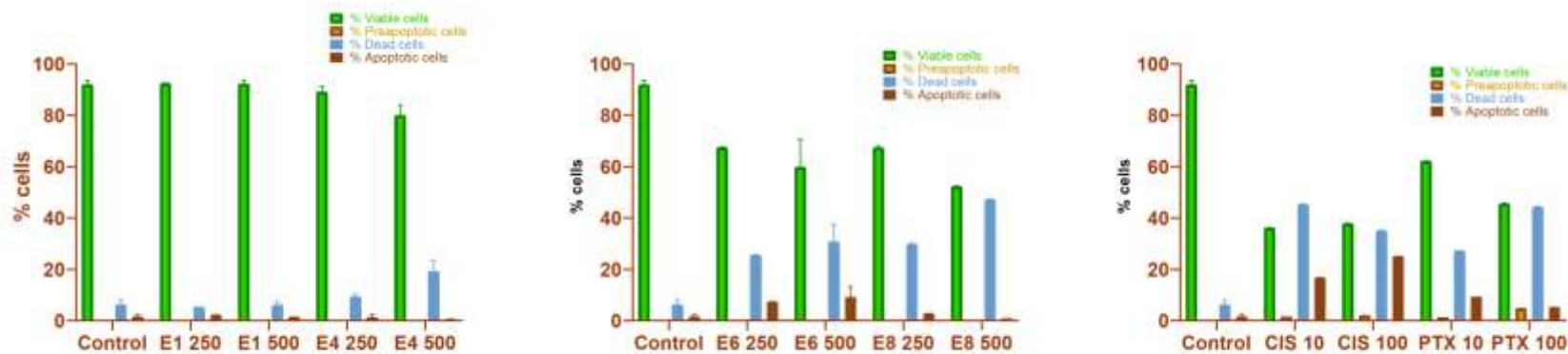
Impactul tratamentului cu compușii testați, în diferite doze, asupra frecvenței diferitelor populații celulare (vii, preapoptotice, moarte și apoptotice) este similar cu cel al martorului în cazul compușilor E1 și E4 (pentru doza de 250 $\mu\text{g/mL}$). Doza de 500 $\mu\text{g/ml}$ a compusului E4 a determinat o reducere a viabilității celulare evidențiată de creșterea numărului de celule moarte (19%). Compușii E6 și E8 conduc la creșteri însemnate ale frecvenței celulelor moarte și apoptotice comparativ cu martorul, indicând un impact semnificativ asupra viabilității celulare, acestea fiind dependente de doză. Comparativ cu citostaticele standard, efectul compușilor este variabil, fiind mai redus decât în cazul folosirii de cisplatin, dar mai intens decât în cazul tratamentului cu paclitaxel (**Tabelul 21** și **Figura 37**).

Rezultatele experimentale obținute în această etapă confirmă buna compatibilitate celulară a celor două tipuri de nanoparticule, PNVP și PCL ceea ce sugerează o posibilă aplicabilitate biomedicală.

Tabel 21: Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor E1, E4, E6, E8, precum și ale citostaticelelor cisplatin și paclitaxel asupra distribuției frecvenței celulelor viabile, moarte, preapoptotice și apoptotice corespunzătoare fiecărui lot, în cazul culturilor de celule neoplazice A 375 și MCF 7.

A 375	Control	E1 250	E1 500	E4 250	E4 500	E6 250	E6 500	E8 250	E8 500	CIS 10	CIS 100	PTX 10	PTX 100
% Celule vii	91.99±1.66	92.45±0.14	92.31±1.40	89.16±2.05	80.11±3.94	67.39±0.34	59.86±10.83	67.43±0.63	52.32±0.26	36.16±0.18	37.84±0.19	62.20±0.15	45.59±0.23
% Celule preapoptotice	0.02±0.01	0.06±0.00	0.09±0.03	0.03±0.03	0.02±0.00	0.08±0.02	0.12±0.00	0.04±0.01	0.02±0.00	1.68±0.01	2.07±0.01	1.36±0.01	4.85±0.02
% Celule moarte	6.33±1.75	5.25±0.05	6.16±1.33	9.40±0.99	19.28±4.10	25.62±0.13	30.79±6.74	29.81±0.50	47.19±0.23	45.31±0.27	35.09±0.33	27.14±0.14	44.30±0.28
% Celule apoptotice	1.66±0.86	2.25±0.09	1.45±0.03	1.42±1.05	0.60±0.16	7.42±0.04	9.24±4.10	2.72±0.13	0.96±0.00	16.85±0.08	25.01±0.12	9.31±0.01	5.26±0.03
MCF 7	Control	E1 250	E1 500	E4 250	E4 500	E6 250	E6 500	E8 250	E8 500	CIS 10	CIS 100	PTX 10	PTX 100
% Celule vii	95.67±1.72	96.15±0.15	96.00±1.45	91.83±2.13	83.31±4.10	70.08±0.35	62.25±11.26	70.12±0.66	54.41±0.27	37.61±0.19	39.35±0.20	64.69±0.16	47.41±0.24
% Celule preapoptotice	0.02±0.01	0.06±0.01	0.09±0.03	0.03±0.03	0.02±0.00	0.08±0.01	0.13±0.00	0.04±0.01	1.26±0.00	1.76±0.01	2.17±0.01	1.42±0.01	4.00±0.03
% Celule moarte	3.52±0.97	2.92±0.03	3.42±0.74	7.55±0.55	16.00±2.28	26.23±0.07	28.06±3.74	28.00±0.28	40.56±0.13	40.27±0.15	38.98±0.18	25.08±0.07	46.35±0.15
% Celule apoptotice	0.92±0.48	1.25±0.05	0.80±0.02	0.79±0.58	0.66±0.09	3.98±0.02	9.56±2.28	1.84±0.07	3.77±0.00	20.36±0.05	19.49±0.07	8.95±0.01	2.25±0.01

A 375



MCF 7

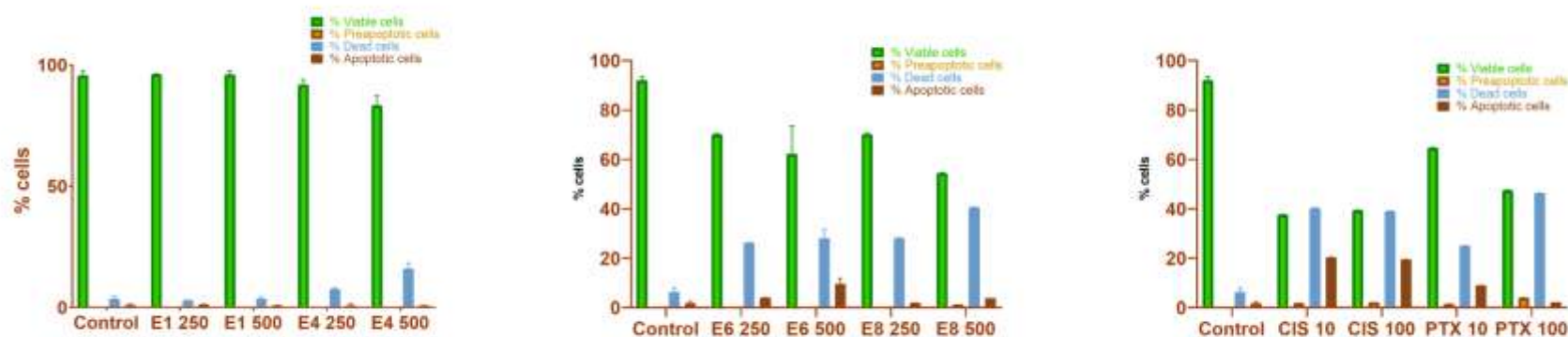


Figura 37. Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compuşilor E1, E4, E5, E8, cisplatin și paclitaxel asupra distribuției frecvenței celulelor viabile, moarte, preapoptice și apoptotice corespunzătoare a fiecărui lot în cazul culturilor de celule neoplazice A 375 și MCF 7.

Cercetarile realizate in etapa IV din cadrul acestui proiect au deschis noi perspective privind domeniul copolimerilor grefati pe baza de PCL. In cadrul acestei etape a fost realizata sinteza unor copolimeri grefati termo-sensibili si s-a studiat auto-asamblarea lor. Reprezentarea schematica a etapelor de sinteza este prezentata in Figura 38:

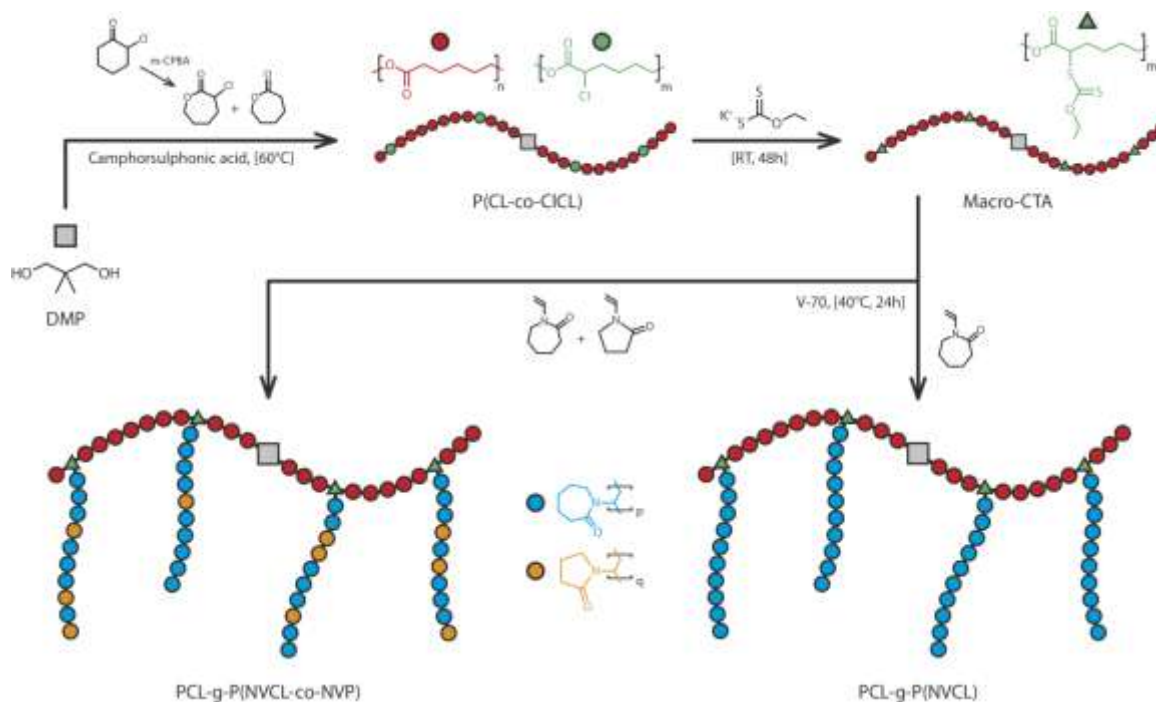


Figure 38: Etapele de sinteza a copolimerilor grefati pe baza de PCL si PVP

Copolimerii de tipul PCL-g-PNVCL cu o densitate constantă de grefare de 15, si cu un DP_n, al lantului principal=120 și DP_n,al lanturilor laterale=54 se auto-asambleaza în mediu apos in miclele stabile, având un diametru hidrodinamic mediu D_v de 38 nm. Prin microscopie TEM s-a observat morfologia sferică a acestor micelii, conform Figurii 39:

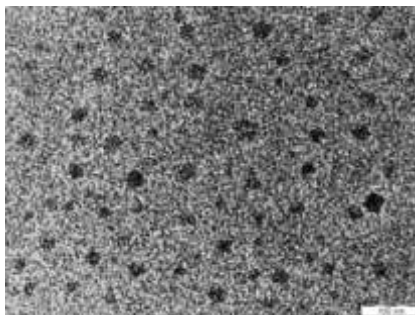


Figura 39: Fotografie TEM a micelilor de copolimer pe baza de PCL

Termo-sensibilitatea lor a fost confirmată în continuare prin determinarea dimensiunii micelilor în funcție de temperatura și a fost determinată o valoare a LCST de 32°C. Încorporarea a 10 sau 20 de moli de NVP în lanțurile laterale ale copolimerilor de tip PCL-g-P(NVCL-co-NVP) duc la trecerea LCST la temperaturi mai ridicate în intervalul 38 - 40°C. Acest comportament termo-sensibil fiind un avantaj considerabil pentru aplicații biomedicale.

Etapa V: Prepararea și caracterizarea biomaterialelor bifazice

Activitatea 5.1: Obținerea biomaterialelor prin fotopolimerizare

În această etapă uleiul de silicon (PDMS) utilizat ca fază continuă în etapa anterioară a fost înlocuit cu un ulei de silicon funcționalizat (PDMS-DGE) care poate fi reticulat printr-un proces de fotopolimerizare cationică. Structura PDMS-DGE este dată în Figura 40:

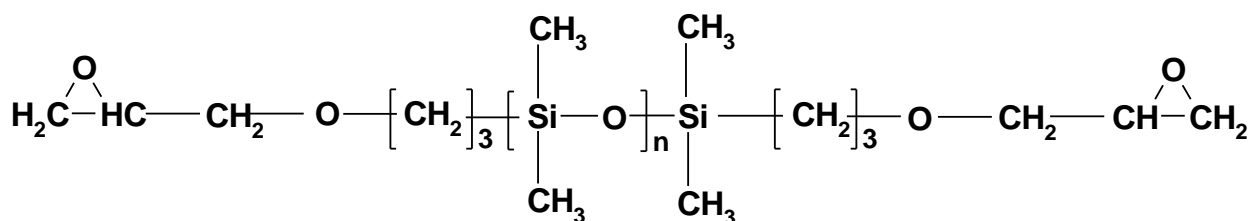


Figura 40: Structura chimică a uleiului de silicon funcționalizat PDMS-DGE

Acest ulei de silicon are aceeași vâscozitate, 50 cP la 25°C, ca cel folosit anterior pentru obținerea dispersiilor neapoase de PNVP și PCL.

Fotopolimerizarea fazei continue, reprezentată de către PDMS-DGE, a fost realizată pentru 5 probe, și anume: nanoparticule de PNVP și respectiv nanoparticule de PCL, ambele libere și încărcate cu cisplatin și dispersate în PDMS-DGE. De asemenea, a fost realizată fotopolimerizarea PDMS-DGE fără niciun tip de nanoparticule, în calitate de martor. Într-un procedeu model, PDMS-DGE, care conține 3% triarylsulfonium hexafluoroantimonat, a fost aplicat pe o placă de sticlă iar iradierea UV a fost realizată pe o linie Minicure (putere de 80 W cm⁻¹) pentru 4 s cu o lampă de mercur de înaltă presiune având debutul spectrelor UV la 250 nm. Compoziția de suprafață a filmelor rezultate a fost determinată prin spectroscopie ATR-IR. Picurile specifice PDMS-ului au fost detectate la 797, 1010 și 1257 cm⁻¹.

În activitatea următoare vor fi studiate următoarele 5 probe: PDMS, NPs-PNVP/PDMS, NPs-PCL/PDMS, NPs-PNVP-Cis/PDMS, NPs-PCL-Cis/PDMS.

Activitatea 5.2: Evaluarea caracteristicilor biologice ale biomaterialelor bifazice

5.2.1. Studiul eliberării medicamentelor din nanoparticulele immobilizate în biomaterialele bifazice

Gradul de eliberare a Cisplatinului (CIS), din materialele obținute, prin membrana artificială de celuloză în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4) a fost monitorizat prin măsurători spectroscopice UV-VIS utilizând un dispozitiv UV-VIS Nanodrop One. Cinetica de eliberare a medicamentului a fost studiată pentru următoarele tipuri de sisteme:

- **Sistemul I: film de PDMS având immobilizate în matrice nanoparticule pe baza de PNVP încărcate cu Cis (NPs-PNVP-Cis/PDMS);** acest sistem a fost comparat cu eliberarea Cisplatinului liber și cu proba E6 (nanoparticulele pe baza de PNVP încărcate cu Cis).
- **Sistemul II: film de PDMS având immobilizate în matrice nanoparticule pe baza de PCL încărcate cu Cis (NPs-PCL-Cis/PDMS);** acest sistem a fost comparat cu eliberarea Cisplatinului liber și cu proba E8 (nanoparticulele pe baza de PCL încărcate cu Cis).

Cinetica de eliberare a Cisplatinului prin membrana artificială a fost evaluată folosind celule de difuzie Franz. În compartimentul donator a fost introdusă fiecare probă exact cântărită peste care s-a adăugat 0,5 ml soluție tampon fosfat pH = 7,4. Compartimentul receptor a fost reprezentat de soluție tampon fosfat pH = 7,4, agitat continuu pe tot parcursul experimentelor la 120 rpm. Temperatura de lucru a fost menținută constantă la $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Un anumit volum de soluție (totdeauna același) a fost prelevat la intervale de timp prestabilite măsurându-se absorbanta acestuia cu un spectrofotometru UV-VIS. Figurile 41 și 42 pun în evidență faptul că esanțioanele analizate au o eliberare regulată a medicamentului în timpul experimentului.

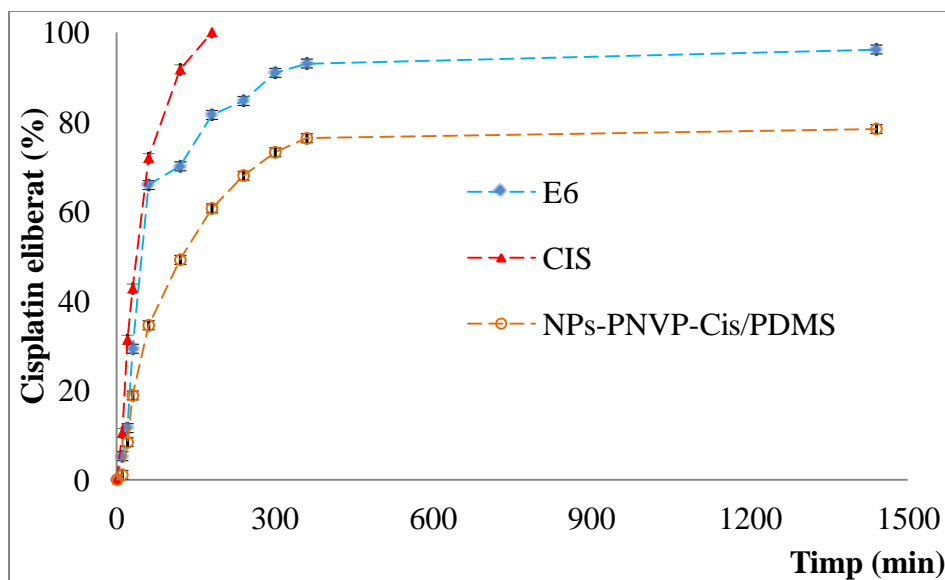


Figura 41. Cinetica de eliberare in vitro a Cisplatinului liber, a Cisplatinului din nanoparticulele pe baza de PNVP (E6) si a Cisplatinului din sistemul de tip I NPs-PNVP-Cis/PDMS in solutie de tampon fosfat (pH = 7,4)

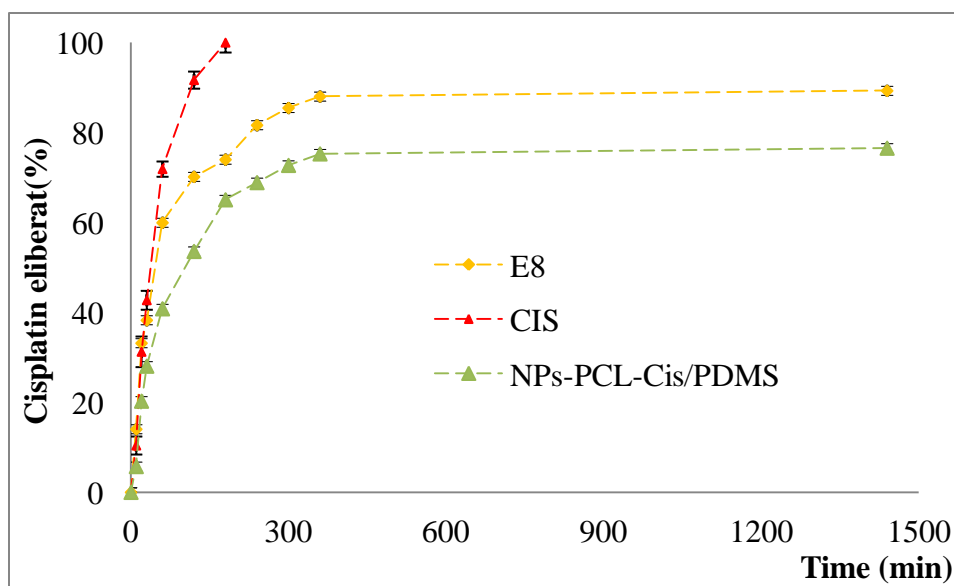


Figura 42. Cinetica de eliberare in vitro a Cisplatinului liber, a Cisplatinului din nanoparticulele pe baza de PCL (E8) si a Cisplatinului din sistemul de tip II NPs-PCL-Cis/PDMS in solutie de tampon fosfat (pH = 7,4)

Cisplatinul simplu traverseaza membrana celulei Franz intr-un procent de 100% dupa aproximativ 3 ore de la debutul experimentului. Incorporarea nanoparticulelor în filmele de PDMS a redus rata de eliberare a Cisplatinului prin membrana artificiala. O alta observatie este

aceea ca in primele ore s-a inregistrat o eliberare mai rapida („burst” effect) si apoi o eliberare lenta pana la echilibru. Eficienta de eliberare a Cisplatinului din sistemul I (pe baza de PNVP) a fost situata intre 78% și 99% iar din sistemul II (pe baza de PCL) a fost situata intre 76% și 92%. Din Figura 41 se observa proba de nanoparticule E6 prezinta un grad de eliberare mai pronuntat in comparatie cu proba in care nanoparticulele de PNVP sunt immobilizate in filmul de PDMS. Aceeasi concluzie se poate trage din Figura 42 pentru sistemul de tip II in care nanoparticulele de PCL sunt immobilizate in filmul de PDMS.

5.2.2 Determinarea hemocompatibilitatii biomaterialelor bifazice

Potentialul hemolitic al filmelor de PDMS cu cele doua tipuri de nanoparticule (PNVP și PCL) immobilizate a fost evaluat folosind o metodă spectrofotometrică. Pentru aceste analize, sangele a fost obținut de la un voluntar sanatos și tratat cu probele sub formă de film: PDMS, NPs-PNVP/PDMS, NPs-PCL/PDMS, NPs-PNVP-Cis/PDMS, NPs-PCL-Cis/PDMS. 5 ml sange cu anti-coagulat a fost centrifugat la 3000 rpm timp de 5 min și spalat cu solutie salina normala de mai multe ori pentru a indeparta complet plasma si a obtine suspensia de eritrocite (RBC). Suspensia de eritrocite purificate a fost apoi resuspendata în solutie salina normala pentru a obține 25 ml de suspensie de eritrocite. Filmele, de formă dreptunghiulară cu diferite mase, au fost suspendate în 2 ml solutie salina normala iar peste acestea s-au adăugat 2 ml suspensie de eritrocite pentru a se obține diferite concentrații (concentrațiile finale au fost 100 μg film / ml, 250 μg film / ml și 500 μg film / ml). Au fost preparate și probe control pozitiv (100% liza) și control negativ (0% liza) adaugand volume egale (2 ml) de Triton X-100 si solutie salina normala. Probele au fost apoi incubate la 37°C timp de 90 si 180 min. Probele au fost usor agitate o data la 30 de minute pentru a asigura un contact continuu intre eritrocite si filme. Dupa timpul de incubare, probele au fost centrifugate la 3000 rpm timp de 5 min si 100 μl de supernatant au fost incubati timp de 30 min la temperatura camerei pentru a permite oxidarea hemoglobinei. Absorbanta oximoglobinei din supernatant a fost masurata spectrofotometric (Spectrofotometru Nanodrop One UV-Vis) la 540 nm. Toate probele au fost analizate în trei exemplare. Procentul hemolitic a fost calculat folosind următoarea ecuație:

$$\text{Hemoliza (\%)} = \frac{(\text{Absorbanta}_{\text{proba}} - \text{Absorbanta}_{\text{control negativ}})}{(\text{Absorbanta}_{\text{control pozitiv}} - \text{Absorbanta}_{\text{control negativ}})} * 100$$

Rezultatele obtinute sunt prezentate in Figurile 43-47:

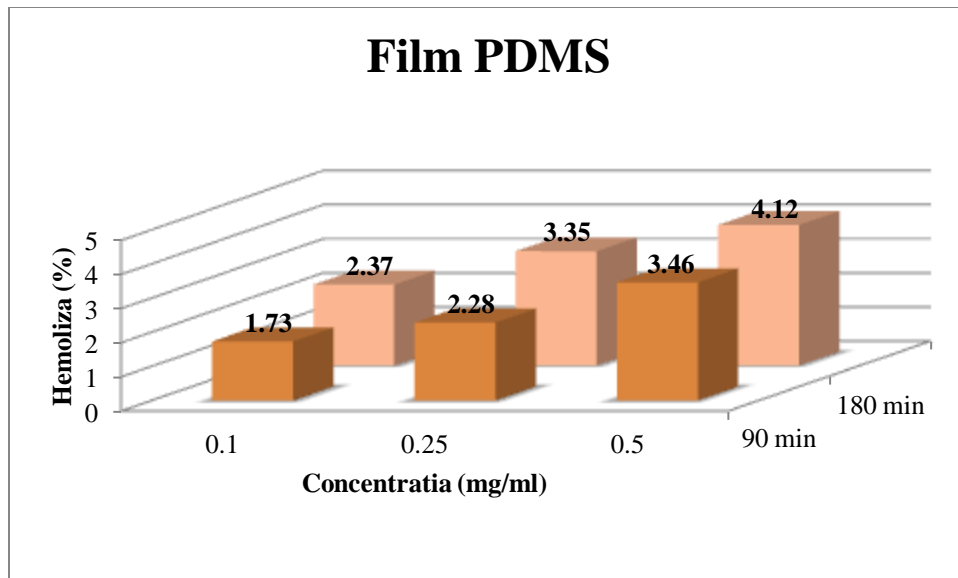


Figura 43: Gradul de hemoliza obtinut pentru filmul pe bază de PDMS

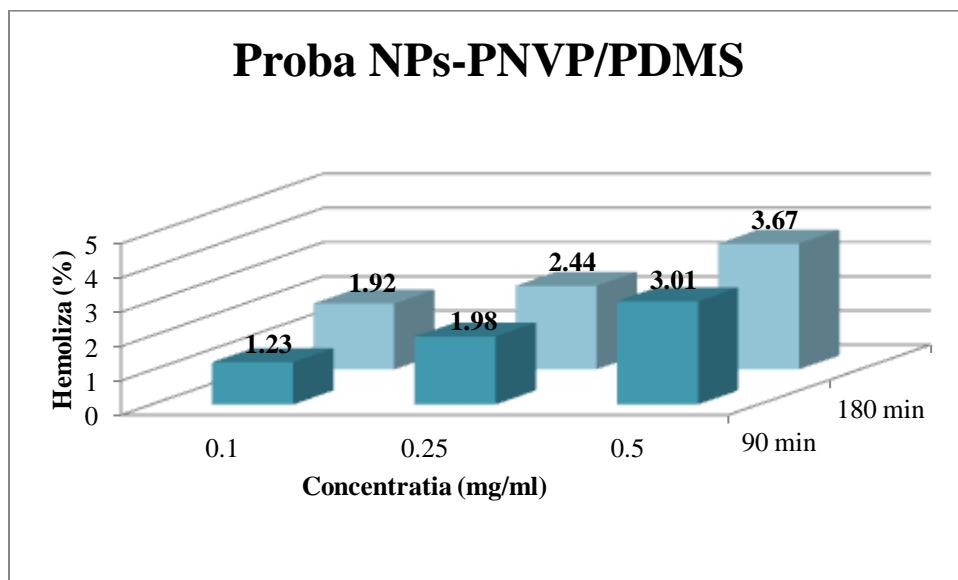


Figura 44: Gradul de hemoliza obtinut pentru filmul pe bază de PDMS cu nanoparticule de PNVP

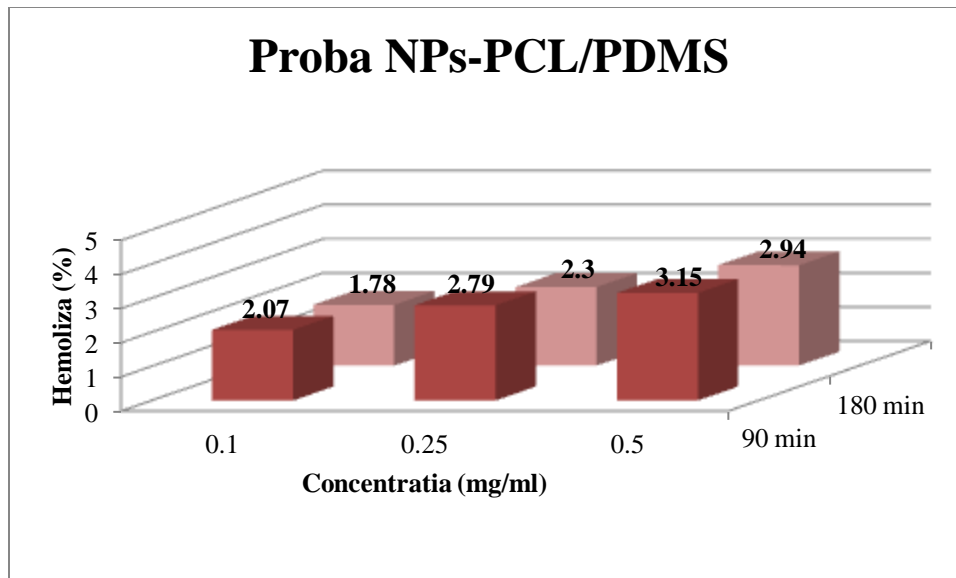


Figura 45: Gradul de hemoliza obtinut pentru filmul pe bază de PDMS cu nanoparticule de PCL

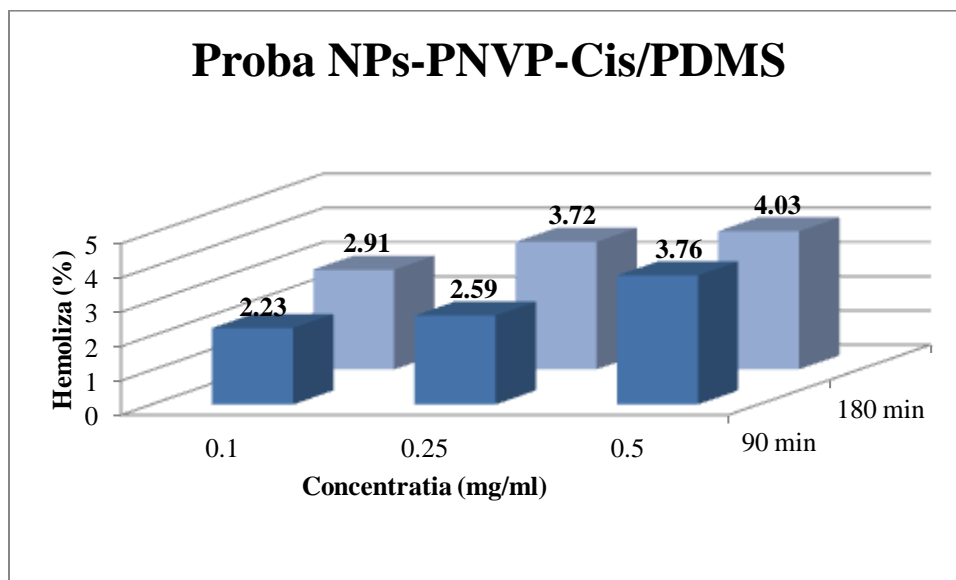


Figura 46: Gradul de hemoliza obtinut pentru filmul pe bază de PDMS cu nanoparticule de PNVP încărcate cu cisplatin

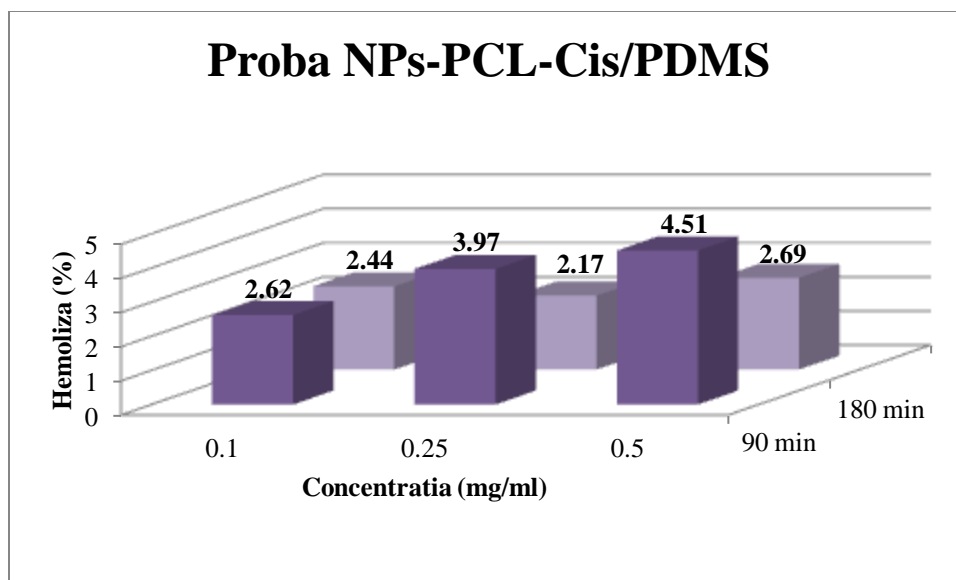


Figura 47: Gradul de hemoliza obtinut pentru filmul pe bază de PDMS cu nanoparticule de PCL încărcate cu cisplatin

Rezultatele au aratat ca toate probele testate au produs o hemoliza mai mica de 5% la toate concentratiile testate. Conform datelor din literatura, o proba este considerata hemocompatibila daca procentul hemolitic este sub 5%. Tinand cont de rezultatele obtinute, se poate afirma ca probele testate sunt hemocompatibile.

5.2.3 Studiul *in vitro* al citotoxicitatii biomaterialelor bifazice

Cercetarile *in vitro*, pe cele 3 tipuri de culturi de celule tumorale A 375, MCF 7 si NCI-H596, au avut ca scop investigarea gradului de biocompatibilitate a acestor noi sisteme complexe sub forma de filme pe baza de PDMS avand imobilizate in matrice nanoparticule de PNVP sau PCL incarcate cu Cisplatin, folosind o gama de doze ce a variat de la 100 la 500 $\mu\text{g/ml}$, precum și evaluarea eficientei activitatii citostatice prin eliberarea controlată a medicamentului antitumoral, in vederea imbunatatirii terapiei anticanceroase.

Compusii testati, timp de 24 și 48 de ore, au fost:

- filmul de PDMS;
- filmul cu nanoparticule de PNVP – NPs-PNVP/PDMS;
- filmul cu nanoparticule de PNVP incarcate cu Cisplatin– NPs-PNVP-Cis/PDMS;
- filmul cu nanoparticule de PCL – NPs-PCL/PDMS;
- filmul cu nanoparticule de PCL incarcate cu Cisplatin – NPs-PCL-Cis /PDMS;
- Cisplatin (CIS).

1. În cazul tratamentului de 24 de ore cu probele neincarcate cu medicament PDMS, NPs-PNVP/PDMS și NPs-PCL/PDMS a celulelor tumorale A 375, provenite dintr-un melanom malign (Figura 43), s-a evidentiat, comparativ cu celulele martor netratate, un efect ne semnificativ asupra viabilității celulare, valorile fiind cuprinse, în cazul PDMS între 94,36% (100 $\mu\text{g/ml}$) și de 79,97% (500 $\mu\text{g/ml}$), în cazul NPs-PNVP/PDMS între 92,42% (100 $\mu\text{g/ml}$) și de 69,10% (500 $\mu\text{g/ml}$), iar în cazul NPs-PCL/PDMS între 89,15% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ și 74,30% (500 $\mu\text{g/ml}$), ceea ce sugerează o bună biocompatibilitate.

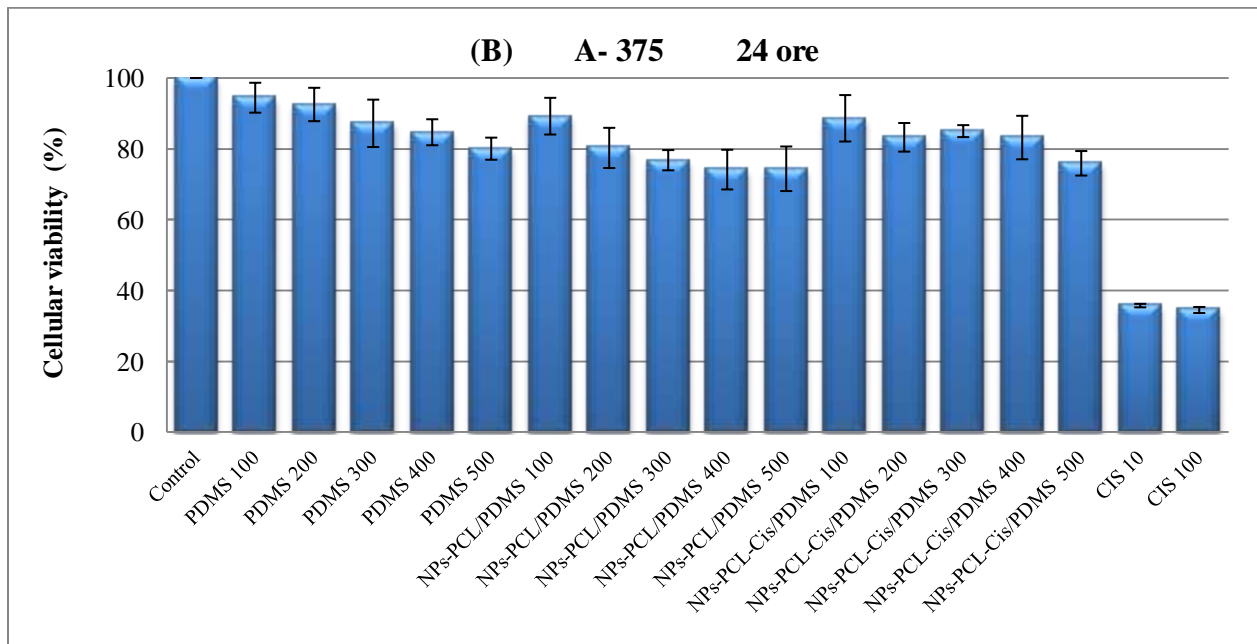
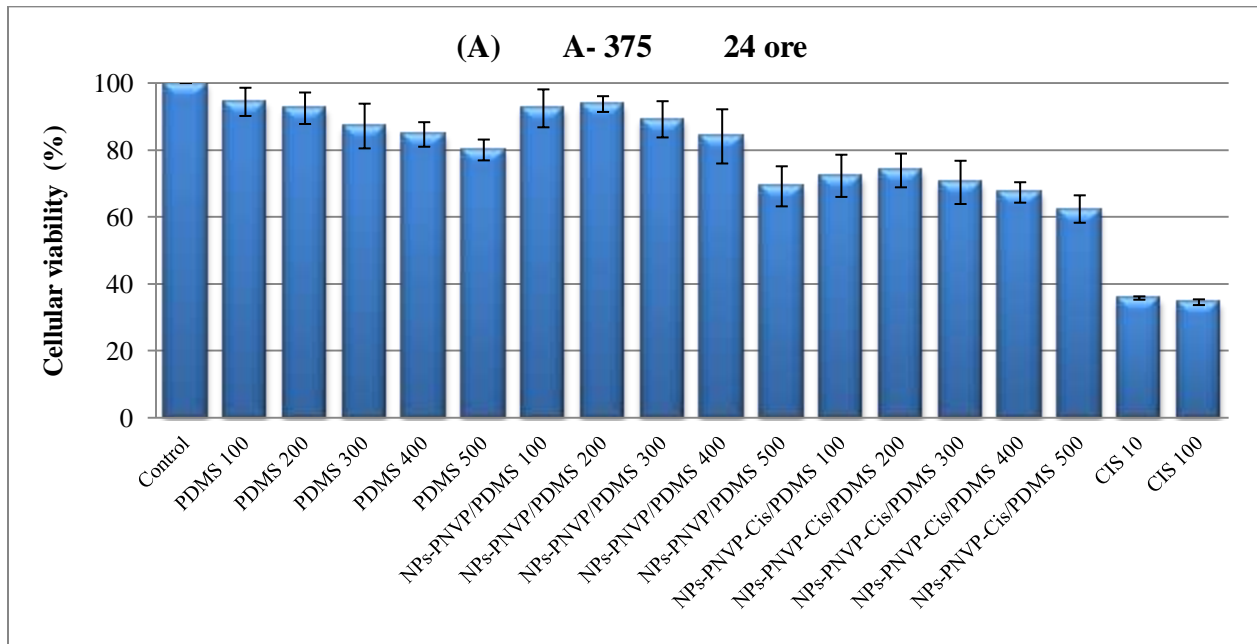


Figura 43: *Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentratii ($\mu\text{g/ml}$) ale compusilor PDMS, NPs-PNVP/PDMS, NPs-PNVP-Cis/PDMS (A), si NPs-PCL/PDMS, NPs-PCL-Cis/PDMS (B) asupra viabilitatii culturilor de celule tumorale A 375*

Tratamentul de 24 de ore cu NPs-PNVP-Cis/PDMS (Figura 43-A) a determinat scaderi notabile ale viabilitatii celulare, intr-o maniera dependenta de doza, înregistrându-se la doza maxima (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 63,29% iar în cazul tratamentului cu NPs-PCL-Cis /PDMS, se înregistrează o valoare de 75,83% a viabilitatii celulare la doza maxima folosita (500 $\mu\text{g/ml}$).

Tratamentul cu CIS timp de 24 de ore, a indus o diminuare semnificativa a viabilitatii celulare, fiind consemnate, surprinzator, valori similare ale viabilității celulare la cele doua doze folosite, de 35,69% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ si de 34,44% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, corespunzatoare unor efecte citotoxice foarte pronuntate, de 64,31% și respectiv 65,56%, fiind depasita limita de impusă de programele de referinta de screening *in vitro* si anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50%.

Tratamentul de 48 de ore cu compusii testati a fost urmat, in general, de diminuari ale viabilității celulelor neoplazice A 375, comparativ cu tratamentul de 24 de ore, după cum se observă din Figura 44. Astfel, in cazul probelor neincarcate cu citostatice, dupa 48 de ore de tratament, viabilitatea celulelor atinge, in raport cu martorul si la doza maxima folosita, de 500 $\mu\text{g/ml}$, valoarea de 69,37% pentru PDMS, 67,43% pentru NPs-PNVP/PDMS si de 67,37% pentru NPs-PCL/PDMS. In cazul tratamentului de 48 de ore cu NPs-PNVP-Cis/PDMS s-a înregistrat o diminuare semnificativa a viabilitatii celulare, intr-o maniera dependenta de doza, înregistrându-se la doza maxima (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 52,78%. Tratamentul cu nanoparticulele NPs-PCL-Cis/PDMS, timp de 48 de ore, a condus la diminuări progresive ale viabilitatii celulare, mai accentuate comparativ cu tratamentul de 24 ore, atingand la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 63,75%, ceea ce conduce la un efect citotoxic semnificativ, dar care nu atinge pragul de minimum 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Si in cazul tratamentului de 48 de ore se constata o interferenta puternica a medicamentului cu viabilitatea celulara, fiind înregistrate valori de 21,84% la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ si de 20,76% la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, corelate cu efecte citotoxice semnificative, de 78,16% si respectiv de 79,24%.

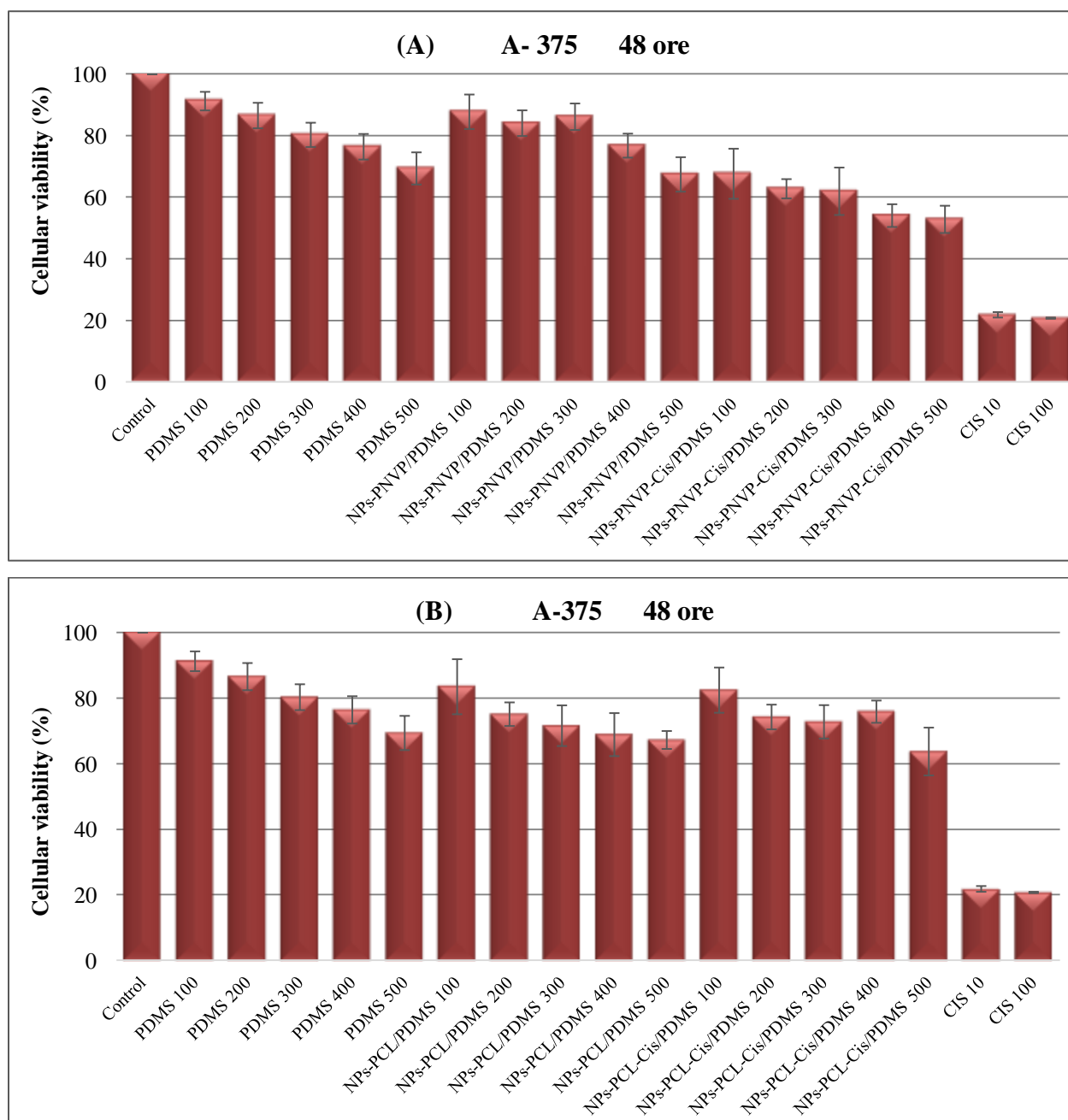
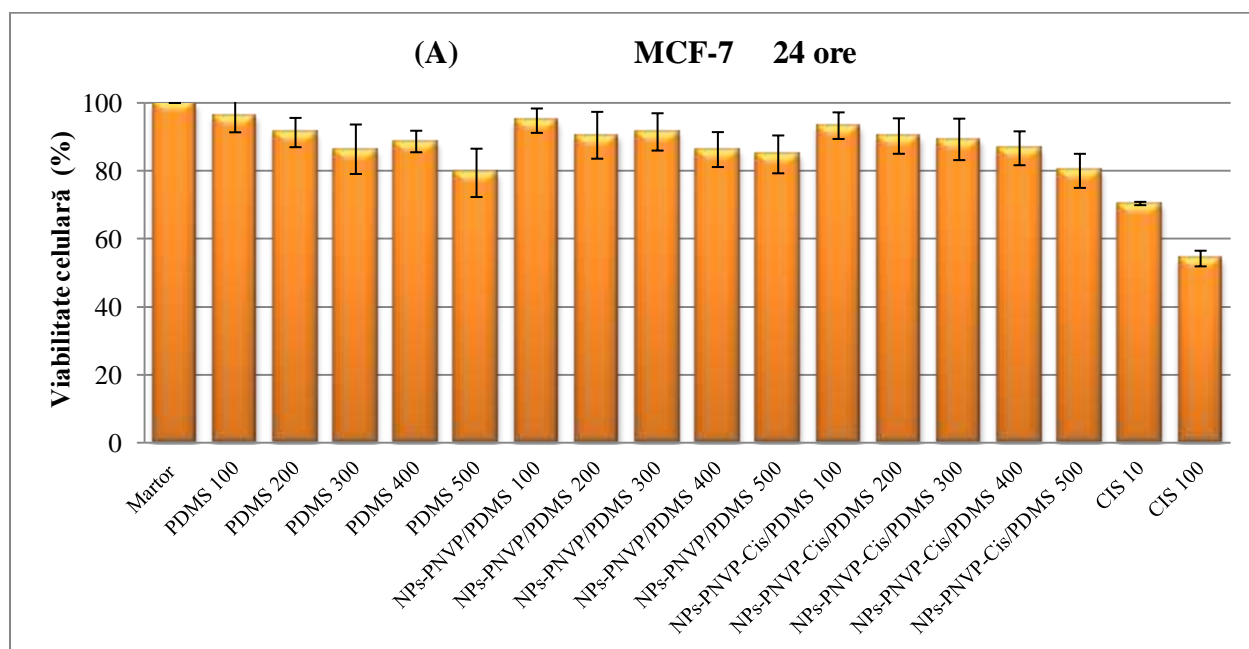


Figura 43: Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentratii ($\mu\text{g/ml}$) ale compusilor PDMS, NP_s-PNVP/PDMS, NP_s-PNVP-Cis/PDMS (A), si NP_s-PCL/PDMS, NP_s-PCL-Cis/PDMS (B) asupra viabilitatii culturilor de celule neoplazice A 375.

Se remarca, pe de o parte, buna tolerabilitate celulara pentru probele neincarcate, PDMS, NP_s-PNVP/PDMS și NP_s-PCL/PDMS, iar pe de alta parte, impactul citotoxic semnificativ determinat

de probele incarcate cu medicament, NPs-PNVP-Cis/PDMS și NPs-PCL-Cis/PDMS, inasa inferior celui indus de Cisplatinul administrat singular.

2. Circuitul testarilor *in vitro* a inclus testarea compusilor PDMS, NPs-PNVP/PDMS, NPs-PNVP-Cis/PDMS, NPs-PCL/PDMS si NPs-PCL-Cis/PDMS si pe alta linie celulara tumorală, MCF 7, provenita dintr-un adenocarcinom de san. După cum se poate observa din Figura 44, tratamentul timp de 24 de ore cu probele neincarcate PDMS, NPs-PNVP/PDMS si NPs-PCL/PDMS a celulelor neoplazice MCF 7, a evidentiat un impact neglijabil asupra viabilitatii celulare, valorile fiind cuprinse intre 96,34% la concentratia minima folosita (100 $\mu\text{g/ml}$) pentru PDMS, si de 94,74% in cazul NPs-PCL/PDMS si respectiv de 89,34% in cazul NPs-PCL/PDMS. Tratamentul de 24 de ore cu proba NPs-PNVP-Cis/PDMS a determinat scaderi moderate ale viabilitatii celulare, intr-o maniera dependenta de doza, inregistrandu-se la doza minima (100 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 93,27% iar la doza maxima utilizata (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 79,96%. O situatie similara se observa si in cazul probei NPs-PCL-Cis/PDMS, cand se constata la doza minima folosita (100 $\mu\text{g/ml}$) o valoare de 90,34% a viabilitatii celulare, iar la doza maxima (500 $\mu\text{g/ml}$), valoarea de 78,96%. Tratamentul cu Cisplatin timp de 24 de ore, a condus la o interferenta mai scazuta cu viabilitatea celulara comparativ cu cea semnalata in cazul liniei celulare A 375, fiind consemnata la doza de 10 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 70,34%, pentru ca la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$, sa se inregistreze o valoare a viabilitatii celulare de 54,13%, corelate cu valori ale efectului citotoxic de 29,66% si respectiv de 45,87%.



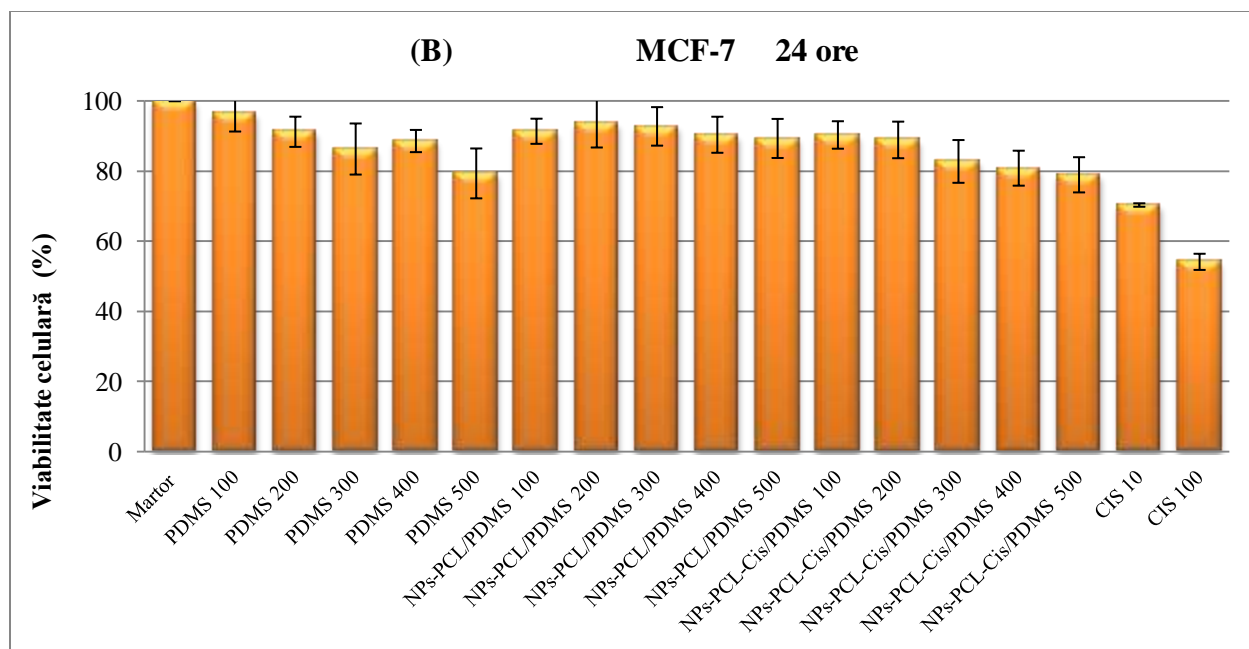


Figura 44: Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compușilor PDMS, NP_s-PNVP/PDMS, NP_s-PNVP-Cis/PDMS (A), și NP_s-PCL/PDMS, NP_s-PCL-Cis/PDMS (B) asupra viabilității culturilor de celule tumorale MCF 7.

Tratamentul de 48 de ore cu compușii PDMS, NP_s-PNVP/PDMS, NP_s-PNVP-Cis/PDMS, NP_s-PCL/PDMS și NP_s-PCL-Cis/PDMS la aceleași doze, s-a concretizat prin diminuări ne semnificative ale viabilității celulare. Astfel, analizând Figura 45, se constată că în cazul probelor neincarcate cu citostatice, după 48 de ore de tratament, viabilitatea celulelor atinge, la doza maximă folosită, de 500 $\mu\text{g/ml}$, valoarea de 73,86% pentru PDMS, 80,54% pentru NP_s-PNVP/PDMS și de 77,02% pentru NP_s-PCL/PDMS, corelate cu valori de 26,14%, 19,46% și 22,98% ale citotoxicității, fiind bine tolerate de celule. Spre deosebire de linia celulară tumorală A 375, tratamentul de 48 de ore a celulelor neoplazice MCF 7 cu NP_s-PNVP-Cis/PDMS și NP_s-PCL-Cis/PDMS (incarcate cu Cisplatin) s-a caracterizat prin interferență ne semnificativă cu viabilitatea celulară, înregistrându-se la doza maximă (500 $\mu\text{g/ml}$) valorile de 75,68%, și respectiv, de 70,83% ceea ce corespunde unor efecte citotoxice de 24,32% și respectiv 29,17%, nedepășind pragul minim de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. Tratamentul singular cu Cisplatin, timp de 48 de ore, a condus la diminuarea valorilor viabilității celulare, mai accentuate față de cele constatate la tratamentul de 24 ore, atingând la doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ valoarea de 37,73%, ceea ce conduce la un efect citotoxic semnificativ, de 62,27%, care depășește pragul de minimum 50% recomandat de programele de screening *in vitro*.

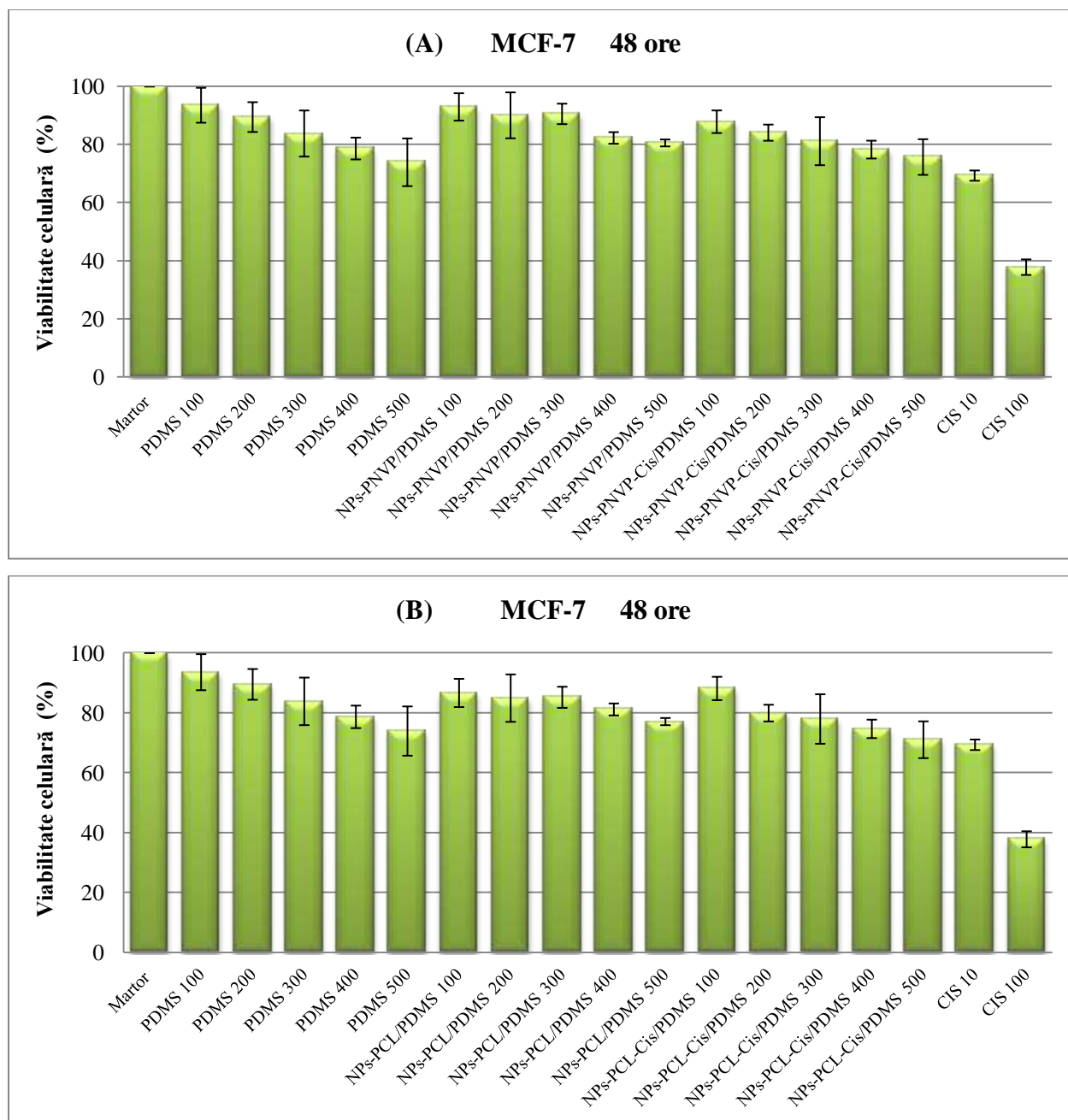


Figura 45. Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ($\mu\text{g/ml}$) ale compusilor PDMS, NP_s-PNVP/PDMS, NP_s-PNVP-Cis/PDMS (A), și NP_s-PCL/PDMS, NP_s-PCL-Cis/PDMS (B) asupra viabilității culturilor de celule neoplazice MCF 7.

În cazul liniei celulare MCF 7 este de menționat buna biocompatibilitate a probelor neîncărcate cu citostatice, PDMS, NP_s-PNVP/PDMS și NP_s-PCL/PDMS. Se constată un impact citotoxic neglijabil înregistrat în cazul probelor încărcate cu citostatice, NP_s-PNVP-Cis/PDMS și NP_s-

PCL-Cis/PDMS, cauzat, probabil, pe de o parte, de intarzierea eliberarii medicamentului din probe iar pe de alta parte, de reactivitatea celulara scazuta a acestei linii celulare tumorale.

3. In cazul tratamentului de 24 de ore cu probele neincarcate PDMS, NPs-PNV/PDMS si NPs-PCL/PDMS a celulelor tumorale NCI-H596, (Figura 46), s-a consemnat, comparativ cu celulele martor netratate, un efect nesemnificativ asupra viabilitatii celulare, valorile fiind, în cazul PDMS de 95,54% (100 µg/ml) si de 89,33% (500 µg/ml), in cazul NPs-PNV/PDMS 93,27% (100 µg/ml) si de 79,76% (500 µg/ml) iar în cazul NPs-PCL/PDMS de 87,03% la doza de 100 µg/ml si de 83,30% la doza de 500 µg/ml, ceea ce sugereaza o buna tolerabilitate. Tratamentul de 24 de ore cu proba incarcata cu Cisplatin (NPs-PNV-P-Cis/PDMS) nu a condus la scaderi ale viabilitatii celulare, inregistrandu-se la doza minima o viabilitate de 93,04% iar la cea maxima, o valoare de 82,23%. O situatie similara se observa si in cazul tratamentului cu proba incarcata NPs-PCL-Cis/PDMS, cand se constata o valoare de 87,77% a viabilitatii celulare la doza minima si usor mai scazuta, de 80,04% la doza maxima folosita (500 µg/ml). Tratamentul cu Cisplatin timp de 24 de ore, a indus o diminuare semnificativa a viabilitatii celulare, fiind inregistrata o valoare de 45,20% la doza de 100 µg/ml, corespunzatoare unui efect citotoxic de 54,80%, care atinge limita impusa de programele de referinta de screening in vitro și anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50%.

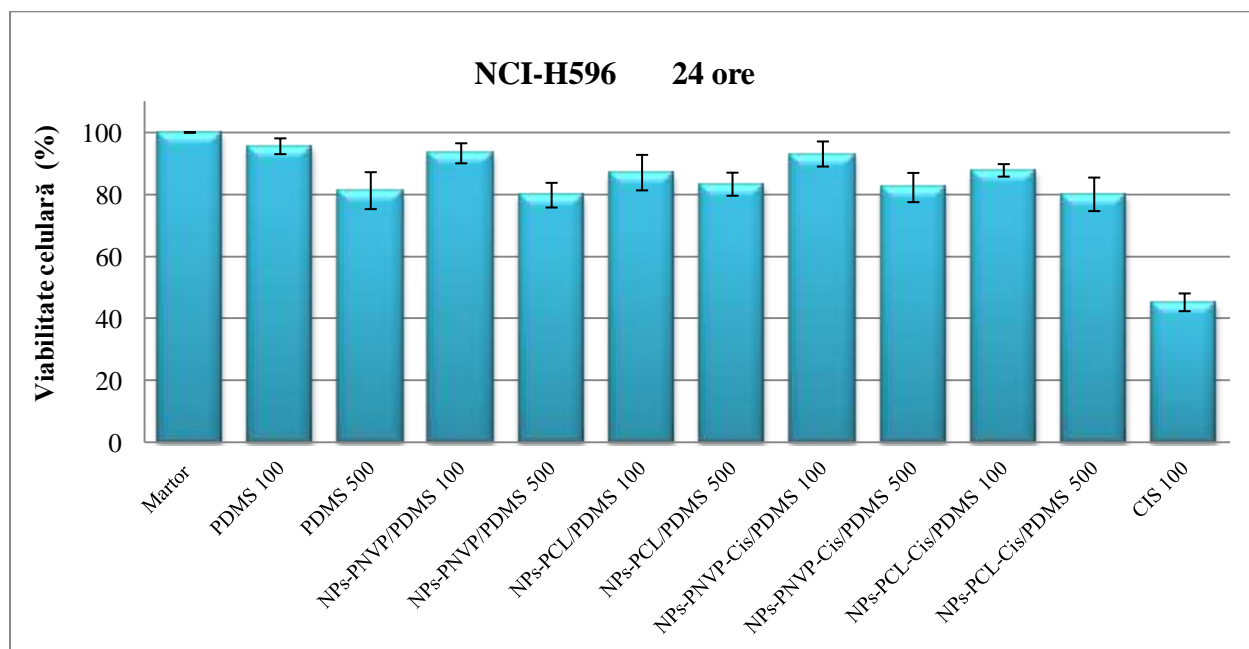


Figura 46: Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentratii ($\mu\text{g/ml}$) ale compusilor PDMS, $\text{NP}_s\text{-PNVP/PDMS}$, $\text{NP}_s\text{-PNVP-Cis/PDMS}$, $\text{NP}_s\text{-PCL/PDMS}$ si $\text{NP}_s\text{-PCL-Cis/PDMS}$ asupra viabilitatii culturilor de celule tumorale NCI-H596.

Tratamentul de 48 de ore cu compusii testati a fost urmat, in general, de diminuări ale viabilitatii celulelor neoplazice pulmonare NCI-H596, comparativ cu tratamentul de 24 de ore, după cum se observă în Figura 47.

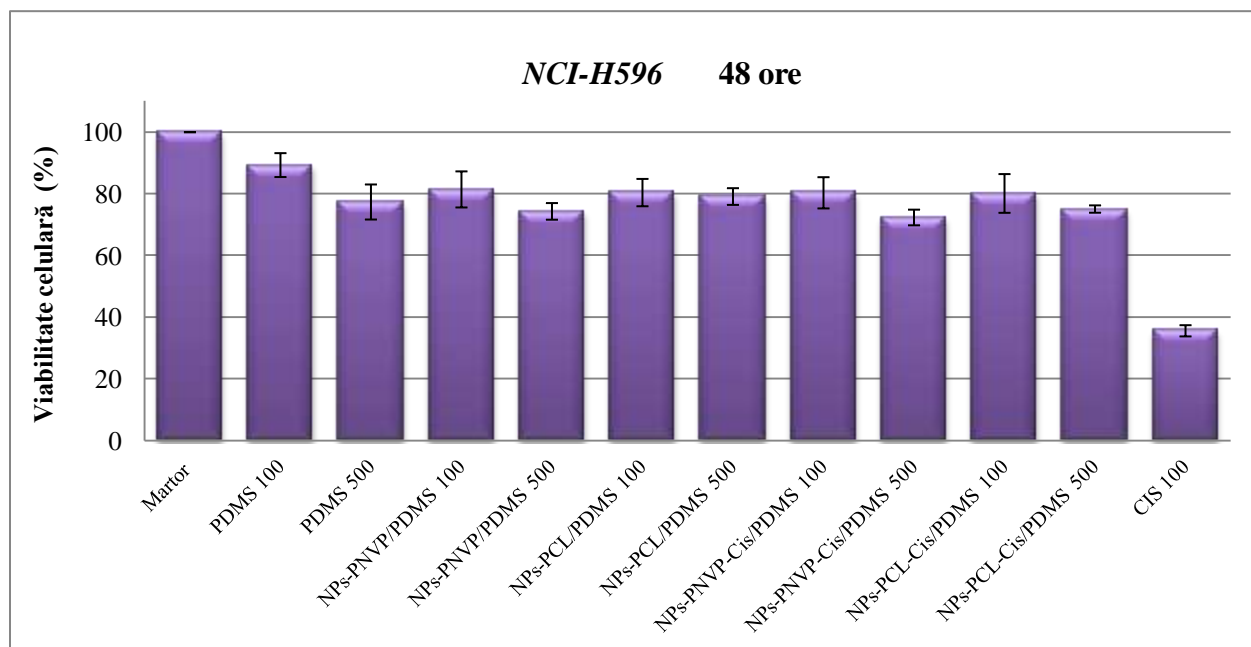


Figura 47: Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentratii ($\mu\text{g/ml}$) ale compusilor PDMS, $\text{NP}_s\text{-PNVP/PDMS}$, $\text{NP}_s\text{-PNVP-Cis/PDMS}$, $\text{NP}_s\text{-PCL/PDMS}$ si $\text{NP}_s\text{-PCL-Cis/PDMS}$ asupra viabilitatii culturilor de celule tumorale NCI-H596.

Astfel, tratamentul de 48 de ore cu nanoparticulele neincarcate cu citostatic determina, comparativ cu martorul, inregistrarea unei viabilitati, la doza minima de 89,33% iar la doza maxima de 77,37% pentru PDMS, 81,44% respectiv 74,33 pentru $\text{NP}_s\text{-PNVP/PDMS}$ iar pentru $\text{NP}_s\text{-PCL/PDMS}$ de 80,42% (la 100 $\mu\text{g/ml}$) si de 79,14% la doza de 500 $\mu\text{g/ml}$, nefiind practic citotoxice. In cazul tratamentului de 48 de ore cu proba $\text{NP}_s\text{-PNVP-Cis/PDMS}$ incarcata cu Cisplatin s-a inregistrat o diminuare a viabilitatii celulare, intr-o maniera dependenta de doza, inregistrandu-se la doza maxima (500 $\mu\text{g/ml}$) valoarea de 72,35%, ceea ce corespunde unui efect citotoxic de 27,65%. In cazul probei $\text{NP}_s\text{-PCL-Cis/PDMS}$ se constata la doza minima o viabilitate de 80,14%, care a scazut usor la doza maxima, la 75,09%. Tratamentul cu Cisplatin

timp de 48 de ore, a condus la o interferenta remarcabila cu viabilitatea celulara, fiind consemnată valoarea de 35,63%, corelata cu un efect citotoxic de 64,37%, care depaseste limita minima de 50% impusa de programele de screening *in vitro*.

Rezultatele experimentale ale testelor privind determinarea citotoxicitatii pe cele 3 linii de celule canceroase confirma buna compatibilitate celulara fata de biomaterialele bifazice preparate in acest proiect. De asemenea, se remarca impactul citotoxic semnificativ determinat de probele incarcate cu citostatice pe linia celulară A 375, ceea ce sugereaza o posibila aplicabilitate biomedicala, în terapia melanomului malign.

Concluzii

Rezultatele raportate periodic, pe masura rezolvarii etapelor proiectului, ca si acest raport final, demonstreaza viabilitatea obiectivului general pe baza careia s-a realizat proiectul. Succesiunea etapelor prevazute in derularea acestuia a fost logica iar activitatile derulate au condus la rezultate care demonstreaza potentialul aplicativ al polimerizarii neapoase pentru obtinerea de nanoparticule incarcate cu medicamente cu potentiale utilizarii ca sisteme de eliberare controlata a medicamentelor. Toate obiectivele propuse in proiect au fost rezolvate la timp iar valorificarea rezultatelor s-a realizat prin lucrari stiintifice deja aparute sau acceptate la reviste cu coeficient ridicat de impact dar si prin participarea la manifestari stiintifice nationale si internationale.

Diseminare

Articole ISI:

1. L.I. Atanase*, G. Riess. “Micellization of poly(2-vinylpyrrolidone)-b-poly(cyclohexyl methacrylate) (P2VP-b-PCHMA) block copolymers and their interpolymer complex formation in non-aqueous medium”, *J. Colloid Interface Sci.* (IF = 5.09), **2019**, 549, 171-178.
2. J. Winninger, D.M. Iurea, L.I. Atanase*, S. Salhi, C. Delaite, G. Riess. “Micellization of novel biocompatible thermo-sensitive graft copolymers based on poly(ϵ -caprolactone), poly(N-vinylcaprolactam) and poly(N-vinylpyrrolidone)”, *Eur. Polym. J.* (IF = 3.621), **2019**, 119, 74-82.
3. O.M. Daraba, A.N. Cadinoiu, D.M. Rata, L.I. Atanase*, G. Vochita. “Antitumoral drug-loaded biocompatible polymeric nanoparticles obtained by non-aqueous emulsion polymerization”, *Polymers* (IF = 3.164), **2020**, *accepted*.

Conferinte internationale:

1. « *Self-assembly of Biocompatible Copolymers in Organic Media*», Symposium of Drug Delivery Systems (SDDS), **2018**, Saint Petersburg, Rusia.

Autori: L.I. Atanase, A.N. Cadinoiu, D. Rata, G. Riess.

2. “*Preparation of biocompatible oil-in-oil emulsions stabilized with PDMS-based copolymers*”, Congresul International al Universitatii “Apollonia”, **2019**, Iasi, Romania.

Autori: L.I. Atanase, D.M. Rață, A.N. Cadinoiu, C.E. Iurciuc (Tincu), C. Popovici

3. “*Drug delivery systems based on PCL nanoparticles obtained by non-aqueous emulsion polymerization*”, 3rd International Conference and Exhibition of Polymer Chemistry, **2019**, Singapore.

Autori: L.I. Atanase, A. N. Cadinoiu, D.M. Rata, C. Popovici, C. E. Tincu, O. M. Daraba

4. “*Biodegradable polymeric based drug delivery systems obtained by non-aqueous emulsion polymerization*”, Congresul International al Universitatii “Apollonia”, **2020**, Iasi, Romania.

Autori: L.I. Atanase, A. N. Cadinoiu, D.M. Rata, C. Popovici, O. M. Daraba, G. Vochita

5. “*Electrospun bi-layer membrane of PCL nanofibers with IBU/HA deposited on GE/HA film for wound dressing application*”, Congresul International al Universitatii “Apollonia”, **2020**, Iasi, Romania.

Autori : Tabinda Riaz, Christelle Delaite, Dominique Adolphe, Nabyl Khenoussi, Delia Mihaela Rata, Leonard I. Atanase

Conferinte nationale :

1. „*Drug-loaded P2VP nanoparticles obtained by non-aqueous emulsion polymerization*”. Zilele Universitatii „Al. I. Cuza” din Iasi, Conferinta Facultatii de Chimie IasiChem **2019**, Iasi.

Autori : L.I. Atanase, A.N. Cadinoiu, D.M. Rata, C.E. Tincu, O.M. Daraba.

Stagii de cercetare la Universitatea de Haute Alsace, Mulhouse, Franta in perioada:

1. **13.10.2018-20.10.2018**

2. **24.06.2019-05.07.2019**