



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”
Domeniul CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Sisteme multicomponente pe bază de polimeri naturali și
sintetici.

Sinteză, caracterizare, aplicații.

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Dr. Mariana PINTEALĂ

DOCTORAND:
Denisse-Iulia BOȘTIOG

2025

**Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”**

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **31 octombrie 2025**, ora **12:00**, în **Sala de Conferințe Acad. Bogdan C. Simionescu a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”**, Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat *„Sisteme multicomponente pe bază de polimeri naturali și sintetici. Sinteză, caracterizare, aplicații.”*, autor **Denisse-Iulia Boștiog**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE:

CS I Dr. Marcela Mihai

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

CS I Dr. Mariana Pinteală

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

REFERENȚI:

Prof. Univ. Dr. Lenuța Profire

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

Prof. Dr. Valentin Năstase

Universitatea de Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad” din Iași

CS I Dr. Habil Luminița Marin

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,
Dr. Valeria Harabagiu

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
LISTĂ DE ABREVIERI.....	5
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRIILOR - STUDIU DE LITERATURĂ..	7
CAPITOL I – NANOPARTICULE DE AUR.....	7
I.1. METODE DE SINTEZĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR.....	8
<i>1.1.1. Metoda „top-down„.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2. Metoda ”bottom-up”.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2.1. Metoda Turkevich.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.2.2. Metoda „seeding growth”.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2.3. Metoda Brust-Schiffrin.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2.4. Sinteza bazată pe microunde și metode electrochimice.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.3. Metode de sinteză ecologice.....</i>	<i>14</i>
I.2. TEHNICI DE ANALIZĂ A STRUCTURII ȘI FUNCȚIONALIZĂRII NANOPARTICULELOR DE AUR.....	15
<i>1.2.1. Spectroscopia în Ultraviolet-Vizibil (UV-Vis).....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.2. Împrăștierea dinamică a luminii și potențialul zeta (DLS).....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.3. Microscopie electronică de transmisie (TEM) și microscopie electronică de transmisie prin scanare (STEM).....</i>	<i>17</i>
<i>1.2.4. Spectroscopie fotoelectronică cu raze X dispersivă în energie (EDAX).....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.5. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.6. Spectroscopie fotoelectronică cu raze X (XPS).....</i>	<i>20</i>
I.3. APLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE NANOPARTICULELOR DE AUR.....	20
<i>1.3.1. Nanoparticulele de aur ca vectori în terapia genică.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2. Sisteme de livrare a medicamentelor bazate pe nanoparticule de aur.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.3. Imagistică ghidată de nanoparticule de aur.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.4. Nanoparticule de aur în radioterapie.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.5. Nanoparticule de aur utilizate în biosenzori.....</i>	<i>32</i>
<i>1.4. Concluzii.....</i>	<i>34</i>
PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE.....	35

OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE.....	35
CAPITOLUL II - NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU POLIMER BIOCOMPATIBILI ȘI MOLECULĂ DE ȚINTIRE.....	35
CAPITOLUL II.1 - NANOPARTICULE DE AUR CU APLICAȚII ÎN TERAPIA GENICĂ.....	35
II.1.1. MOTIVAREA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI REALIZAT ÎN CAPITOLULUI II.....	35
II.1.1.1. OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE SPECIFICE.....	35
II.1.1.2. MOTIVAREA ALEGERII NANOPARTICULELOR DE AUR, A POLIMERILOR PENTRU FUNCȚIONALIZARE ȘI A GLUCOZAMINEI.....	36
II.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	39
II.1.2.1. SINTEZA VECTORILOR PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE AUR.....	39
II.1.2.2. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE.....	42
II.1.2.3. INTERACȚIUNEA VECTORILOR NON-VIRALI CU ADN: FORMAREA POLIPECȘILOR.....	47
II.1.3. EVALUAREA EFICIENȚEI VECTORILOR PRIN TRANSFECȚIA <i>IN VITRO</i>	51
II.1.3.1. CONDENSAREA ȘI PROTECȚIA ADN-ULUI PLASMIDIC.....	51
II.1.3.2 EFICIENȚA TRANSFECȚIEI <i>IN VITRO</i>	53
II.1.3.2. VIABILITATEA CELULARĂ.....	55
II.1.4. TESTĂRI PRECLINICE (TESTĂRI <i>IN VIVO</i>).....	56
II.1.4.1. EVALUAREA TOXICITĂȚII (DOZE ACUTE-DL50 ȘI DOZE REPETATE).....	56
II.1.4.2. ANALIZE HEMATOLOGICE.....	57
II.1.4.3. ANALIZELE PARAMETRILOR BIOCHIMICI.....	59
II.1.4.4. EVALUAREA CITOKINELOR ÎN URMA ADMINISTRĂRII VECTORILOR.....	60
II.1.4.5. EXAMEN HISTOPATOLOGIC.....	61
II.1.5. CONCLUZII.....	64
CAPITOLUL II - NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU POLIMER BIOCOMPATIBILI ȘI MOLECULĂ DE ȚINTIRE.....	66
CAPITOLUL II.2 - NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE, RADIOMARCAT, CA POTENȚIALI AGENȚI BIOCOMPATIBILI PENTRU TEHNICILE PET/SPECT.....	66
II.2.1. MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI.....	66
II.2.1.1 OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE SPECIFICE:.....	66

II.2.1.2. MOTIVAȚIA ALEGERII NANOPARTICULELOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE ȘI RADIOMARCATÉ CU IZOTOPI UTILIZAȚI ÎN TEHNICILE SPECT/PET.....	67
II.2.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	70
II.2.2.1. SINTEZA NANOPARTICULEOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU POLIMERI BIOCOMPATIBILI, GLUCOZAMINĂ ȘI RADIONUCLIZI.....	70
II.2.2.2. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE.....	71
II.2.2.3. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA AUPEG-PEI ȘI AuPEG-PEI-GA RADIOMARCATÉ CU ^{99m}Tc ȘI ^{68}Ga	82
II.2.2.3 TESTE <i>IN VITRO</i> - EFECTUL NANOCONJUGATELOR AuPEG-PEI ȘI AuPEG-PEI-GA ÎNAINTE ȘI DUPĂ RADIOMARCARE ASUPRA FIBROBLAȘTIILOR GINGIVALI UMANI NORMALI.....	91
II.2.2.4 BIODISTRIBUȚIA <i>IN VIVO</i> A NANOPARTICULELOR AUPEG-PEI ȘI AUPEG-PEI-GA RADIOMARCATÉ.....	93
II.2.2.5. CONCLUZII	95
CAPITOLUL III - NANOPARTICULE DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU METOTREXAT: O NOUĂ ABORDARE NANOTERAPEUTICĂ PENTRU O ACTIVITATE ANTITUMORALĂ, ANTIOXIDANTĂ ȘI BIOCOMPATIBILITATE ÎMBUNĂȚĂȚITĂ.....	97
III.1. MOTIVAREA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI REALIZAT ÎN CAPITOLUL III.....	97
III.1.1 OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE SPECIFICE:.....	97
III.1.2. MOTIVAREA ALEGERII NANOPARTICULELOR DE AUR CA AGENT DE LIVRARE A METOTREXATULUI.....	98
III.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	102
III.2.1. SINTEZA A DOUĂ SISTEME PE BAZĂ DE NANOPARTICULELOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE CU METOTREXAT (AUNPS-PEG-NH ₂ -MTX ȘI AUNPS-PEG-PEI-MTX).....	102
III.2.2. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR FUNCȚIONALIZATE (AUNPS-PEG-NH ₂ -MTX ȘI AUNPS-PEG-PEI-MTX).....	103
III.2.3. ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ.....	110
III.2.4. CITOCOMPATIBILITATEA NANOPARTICULELOR PE LINII CELULARE DERMALÉ, NORMALE ȘI TUMORALE.....	113
<i>TESTUL MTT</i>	113
<i>TESTUL LDH</i>	114

TESTUL LIVE/DEAD.....	116
III.2.5. CONCLUZII.....	117
CAPITOLUL IV- VECTORI NON-VIRALI DE LIVRARE ȚINTITĂ A MATERIALULUI GENETIC.....	119
IV.1. MOTIVAREA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI REALIZAT ÎN CAPITOLUL IV.....	119
IV.1.1 OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE SPECIFICE:.....	119
IV.1.2. MOTIVAREA ALEGERII ELEMENTELOR COMPONENTE ALE VECTORILOR NON-VIRALI.....	119
IV.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	122
IV.2.1. SINTEZA VECTORILOR NON-VIRALI DE LIVRARE ȚINTITĂ A MATERIALULUI GENETIC.....	122
IV.2.2. CARACTERIZAREA VECTORILOR NON-VIRALI DE LIVRARE ȚINTITĂ A MATERIALULUI GENETIC.....	123
IV.2.3. CARACTERIZAREA VECTORILOR AUPEINCD ÎN INERACȚIUNEA CU PCS2+MT-LUC.....	135
IV.2.4. EFICIENȚA IN VITRO A VECTORILOR NON-VIRALI.....	140
IV.3. CONCLUZII.....	141
CAPITOLUL V. – MATERIALE, METODE ȘI SINTEZĂ.....	143
CAPITOLUL V.1 MATERIALE	143
V.2 METODE DE CARACTERIZARE.....	144
V.2.1. SPECTROSCOPIA ÎN DOMENIUL ULTRAVIOLET-VIZIBIL (UV-VIS).....	144
V.2.2. SPECTROSCOPIA ÎN INFRAROȘU CU TRANSFORMATĂ FOURIER (FTIR).....	145
V.2.3. DIAMETRELE HIDRODINAMICE (DH) ȘI POTENȚIALELE ZETA (Z).....	145
V.2.4. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ.....	145
V.2.5 SPECTROMETRIA DE MASĂ (MS).....	146
V.2.6. SPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONI CU RAZE X (XPS).....	146
V.2.7. RADIOMARCAREA CU PERTECHNETAT DE SODIU ($\text{Na}^{+99\text{m}}\text{TcO}_4^-$).....	147
V.2.8. RADIOMARCAREA CU ^{68}Ga (DIN $^{68}\text{GaCl}_3$).....	148
V.2.9. METODA CROMATOGRAFIEI INSTANTANEE ÎN STRAT SUBȚIRE (ITLC).....	148
V.2.10. REZONANȚA MAGNETICĂ NUCLEARĂ (RMN).....	149
V.2.11. ANALIZA CANTITATIVĂ A PEI800 DA, PEI2K DA, PEI25K DA.....	149

V.2.12. ELECTROFOREZĂ PE GEL DE AGAROZĂ.....	150
V.2.13. TESTUL DE PROTECȚIE ÎMPOTRIVA DEGRADĂRII ENZIMEI DNAZA I.....	151
V.2.14. STUDIILE <i>IN VITRO</i>	152
<i>V.2.14.1. Testul MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu)</i>	154
<i>V.2.14.2. Testul de eliberare LDH (lactat dehidrogenaza)</i>	154
<i>V.2.14.3. Test Live/Dead</i>	154
<i>V.2.14.4. Analize statistice</i>	154
V.2.15. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE.....	156
<i>V.2.15.1. Testul de captare a radicalilor DPPH</i>	156
<i>V.2.15.2. Testul de reducere a puterii antioxidante a ionilor ferici (FRAP)</i>	156
<i>V.2.15.3. Testul de reducere a capacității antioxidante cuprice (CUPRAC)</i>	156
V.2.16. STUDII <i>IN VIVO</i>	157
<i>V.2.16.1. Toxicitate acută (LD₅₀)</i>	157
<i>V.2.16.2. Examinare hematologică</i>	157
<i>V.2.16.3. Profilul biochimic</i>	158
<i>V.2.16.4. Examenul imunologic</i>	158
<i>V.2.16.5. Necropsia și examenul histopatologic</i>	158
<i>V.2.16.6. Analiza statistică</i>	159
V.2.16. EVALUAREA BIOCOMPATIBILITĂȚII <i>IN VIVO</i> ȘI STUDIUL BIODISTRIBUȚIEI PET ȘI SPECT.....	159
V.2.17. SIMULĂRI DE DINAMICĂ MOLECULARĂ.....	160
V.3 METODE DE SINTEZĂ.....	161
V.3.1. OBȚINEREA VECTORILOR NON-VIRALI CAPITOL II.....	161
V.3.2. OBȚINEREA VECTORILOR DE LIVRARE A MEDICAMENTULUI DIN CAPITOL III.....	162
<i>V.3.2.1. Acoperirea cu fosfină a AuNPs (AuNPs-p)</i>	163
<i>V.3.2.2. PEG-gilarea AuNPs-p (AuNPs-PEG-NH₂ și AuNPs-PEG-COOH)</i>	163
<i>V.3.2.3. Cuplarea PEI800 cu AuNPs-PEG (AuNPs-PEG-PEI)</i>	164
<i>V.3.2.4. Sinteza nanoparticulelor de aur conjugate cu MTX (AuNPs-PEG-MTX și AuNPs-PEG-PEI-MTX)</i>	164

V.3.3. OBȚINEREA VECTORILOR NON-VIRALI DE LIVRARE ȚINTITĂ A MATERIALULUI GENETIC DIN CAPITOL IV.....	164
<i>V.3.3.1. Sinteza mono-6-O-(p-toluensulfonil)-β-ciclodextrinei (β-CD-6mOTs).....</i>	<i>164</i>
<i>V.3.3.2. Sinteza conjugatelor de polietilenimină ramificată modificată cu β-CD (CD-PEIn).....</i>	<i>165</i>
<i>V.3.3.3. Sinteza Ad-PEG-Pep</i>	<i>165</i>
<i>V.3.3.4. Sinteza AuPEI800CD, AuPEI2kCD și AuPEI25kCD.....</i>	<i>166</i>
<i>V.3.3.5. Sinteza AuPEI800CD-Pep, AuPEI2kCD-Pep și AuPEI25kCD-Pep.....</i>	<i>166</i>
CONCLUZII GENERALE.....	167
CAPITOLUL II.1.....	167
CAPITOLUL II.2.....	168
CAPITOLUL III.....	170
CAPITOL IV	172
DISEMINAREA REZULTATELOR.....	174
RESURSE BIBLIOGRAFICE.....	177

INTRODUCERE

Nanoparticulele de aur (AuNPs) s-au remarcat prin proprietățile lor fizico-chimice unice, dimensiune și formă controlabilă, suprafață ușor funcționalizabilă, stabilitate coloidală ridicată și comportament optic specific (efect plasmonic) (Medici *et al.*, 2021). Aceste caracteristici le transformă în candidați ideali pentru livrarea direcționată a medicamentelor și genelor, precum și pentru aplicații de imagistică (Chen *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2020).

Alegerea temei prezentei lucrări de doctorat este motivată de nevoia stringentă de a dezvolta sisteme multifuncționale, eficiente și sigure pentru terapii personalizate antitumorale, capabile să combine capacitatea de detecție și localizare tumorală cu livrarea țintită a încărcăturilor terapeutice. În mod special, interesul se concentrează asupra funcționalizării AuNPs cu molecule biologice active (peptide, polimeri cationici, liganzi specifici), care conferă selectivitate și direcționare către celulele tumorale, crescând astfel eficiența terapeutică și reducând toxicitatea sistemică.

În cadrul prezentei teze de doctorat intitulată „**Sisteme multicomponente pe bază de polimeri naturali și sintetici. Sinteză, caracterizare, aplicații**”, a fost urmărită obținerea și optimizarea unor sisteme de vectori non-virali pentru transportul și eliberarea de gene și medicamente, țintire celulară specifică și imagistică SPECT/PET.

În **prima parte** a tezei de doctorat, **Capitolul I**, este prezentat un studiu de literatură ce are la bază descrierea nanoparticulelor de aur (AuNPs), ce sunt considerate pe scară largă ca fiind sisteme de livrare superioare în medicină datorită ușurinței de sinteză, de funcționalizare a suprafeței, a stabilității ridicate, a proprietăților fizico-chimice unice și a biocompatibilității.

Partea a doua a tezei de doctorat este structurată pe patru capitole (**Capitolele II, III, IV și V**) ce prezintă contribuțiile personale cu privire la obținerea, optimizarea și caracterizarea fizico-chimică a sistemelor de vectori non-virali pe bază de nanoparticule de aur, cât și rezultatele biologice obținute în urma testărilor *in vitro*, *in vivo* corelate cu rezultatele obținute *in silico*.

În cadrul fiecărui capitol al secțiunii privind rezultatele proprii, se includ obiectivele investigației, argumentarea relevanței abordării temei propuse pentru dezvoltare, descrierea detaliată a experimentului, analizele fizico-chimice, precum și prezentarea rezultatelor obținute în urma evaluărilor biologice realizate atât *in vitro*, *in vivo* cât și *in silico*. În aditie, fiecare subcapitol se finalizează cu concluziile specifice fiecărui studiu.

Capitolul II.1 prezintă metoda de sinteză și evaluarea *in vitro*, *in vivo* și *in silico* a doi vectori non-virali bazati pe nanoparticule de aur (AuNPs) funcționalizate cu polietilenglicol (PEG) de două lungimi moleculare diferite care delimitează fragmentele de polietilenimina (PEI), cu scopul de a controla mai bine capacitatea de încărcare a ADN-ului și de a reduce drastic toxicitatea. Funcționalizarea periferică cu resturi de glucozamină permite direcționarea nanoparticulelor către medii biologice cu consum ridicat de glucoză. Vectorii au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic utilizând UV-Vis, DLS, STEM, FTIR. Pentru studiul cantitativ al celor doi vectori s-a testat transfecției pe celulele HeLa, toxicitatea celulară și biocompatibilitatea au fost determinate cantitativ prin testul CellTiter-Glo atât pe liniile HeLa, cât și pe liniile HGF. Toxicitatea acută (DL₅₀) a fost evaluată prin administrarea intravenoasă a vectorilor AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA și AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA. De asemenea s-au realizat examenul hematologic, profilul biochimic, necropsia și examen histopatologic. Testele *in silico* au fost realizate pentru a înțelege și prezice comportamentul structural al vectorilor non-virali la nivel molecular, oferind informații suplimentare privind stabilitatea, dimensiunea și organizarea acestora în funcție de compoziția polimerică.

Pe baza rezultatelor obținute în **Capitolul II.1**, s-a evidențiat un vector non-viral cu performanțe superioare (AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA) în ceea ce privește eficiența de complexare, stabilitatea coloidală și capacitatea de transfecție. Având în vedere aceste caracteristici favorabile, AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA și AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG au fost selectați pentru explorarea unor aplicații avansate în domeniul imagisticii moleculare dezvoltate în **Capitolul II.2**. Astfel, au fost supuși procesului de radiomarcare cu tehnici specifice utilizând radionuclizii technetiu-99m (^{99m}Tc) și galiu-68 (⁶⁸Ga), în vederea evaluării potențialului său în cadrul investigațiilor de tip SPECT și PET. Cromatografia instantă în strat subțire a fost utilizată pentru a evalua randamentul de radiomarcare. Rezultatele obținute în experimentele de radiomarcare au fost evidențiate *in vivo* pe un model animal. În acest sens, studiile de biodistribuție *in vivo* reprezintă o primă încercare, care demonstrează, pe de o parte, stabilitatea complexelor radiomarcate în mediul biologic și oferă, de asemenea, un mijloc de monitorizare a parcursului acestora, de la administrare până la eliminare.

În **Capitolul III** s-au dezvoltat AuNPs cu mai multe învelișuri funcționalizate cu metotrexat (MTX) pentru îmbunătățirea caracteristicilor antitumorale, antioxidante și de biocompatibilitate. AuNPs stabile acoperite cu fosfină au fost sintetizate și funcționalizate cu polietilenglicol (PEG)

și polietilenimină ramificată cu MW mică (PEI₈₀₀), urmate de legarea covalentă a MTX. Caracterizarea fizico-chimică a fost realizată prin spectroscopie UV-Vis, FTIR, DLS, STEM și XPS. Activitatea antioxidantă a AuNPs funcționalizate a fost determinată folosind testul de captare a radicalilor DPPH, testele FRAP și CUPRAC. Biocompatibilitatea și citotoxicitatea au fost evaluate folosind teste MTT și LDH pe keratinocite umane HaCaT și celule canceroase non-melanom CAL27.

Capitolului IV prezintă dezvoltarea unor vectori bazați pe AuNPs funcționalizate cu polietilenimină (PEI) și β -ciclodextrină mono-tosilată (CD), având ca scop livrarea țintită de material genetic. Strategia sintetică a inclus conjugarea β -ciclodextrinei cu PEI ramificat de diverse mase moleculare (800 Da, 2000 Da și 25000 Da), urmată de sinteza nanoparticulelor AuPEInCD prin reducerea ionilor de aur sub acțiunea radiației cu microunde. În paralel, a fost obținut conjugatul Ad-PEG-Pep, prin reacția 1-adamantilaminei cu linkerul PEG₁₂-SPDP și ulterior cuplarea cu o peptidă (Pep) specifică pentru celulele MCF-7. Acest compus a fost utilizat pentru formarea unui complex de incluziune cu unitățile de β -ciclodextrină de pe suprafața nanoparticulelor, rezultând vectorul final supramolecular AuPEInCD-Pep.

Pentru confirmarea structurii intermediarelor și produsului final, au fost utilizate mai multe tehnici de caracterizare. Spectroscopia RMN a fost aplicată pentru CD tosilată și pentru produsul CD-PEI, în timp ce spectrometria de masă (MS) a confirmat masele moleculare ale conjugatului Ad-PEG și Ad-PEG-Pep. Spectroscopia FTIR a evidențiat grupările funcționale caracteristice pentru PEInCD și AuPEInCD. De asemenea, spectroscopia UV-Vis și TEM au fost utilizate pentru caracterizarea optică și morfologică a nanoparticulelor AuPEI₈₀₀CD, AuPEI_{2k}CD și AuPEI_{25k}CD, precum și a variantelor lor funcționalizate cu peptidă. Ulterior, vectorii sintetizați au fost evaluați din punct de vedere biologic prin teste de transfecție și citotoxicitate *in vitro* pe celule MCF-7, HGF și HOS. Două abordări au fost comparate pentru funcționalizarea cu peptidă: înainte sau după formarea poliplexului cu plasmida pCS2+MT-Luc.

Capitolului V prezintă în detaliu materialele și metodele utilizate pe parcursul întregii lucrări, incluzând procedurile de sinteză, tehnicile de caracterizare fizico-chimică, precum și strategiile de testare *in vitro*, *in vivo* și *in silico*.

CAPITOL II.1. Nanoparticule de aur funcționalizate cu polimer biocompatibili și moleculă de țintire

Succesul terapiei genice depinde în mare măsură de eficiența și fiabilitatea instrumentelor moleculare implicate în manipularea și livrarea acizilor nucleici. În cercetarea de față sunt investigate metoda de sinteză și caracterizare, alături de evaluarea *in vitro*, *in vivo* și *in silico* a doi vectori non-virali cu scopul de a îmbunătăți eficiența livrării materialului genetic și de a reduce potențialele efecte adverse. Fiecare sistem se bazează pe nanoparticule de aur (AuNPs) funcționalizate cu fragmente de PEG cu lungimi diferite și PEI cu scopul de a controla mai eficient capacitatea de încărcare a ADN-ului, pentru a reduce toxicitatea sistemică a vectorilor, iar funcționalizarea periferică cu glucozamină permite direcționarea nanoparticulelor către medii biologice cu consum mare de glucoză (tumorile).

II.1.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de aur funcționalizate

Pentru ambele structuri investigate, AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA și AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA, spectrele suprapuse sunt prezentate în **figura II.1.3.a**. Regiunile spectrale corespunzătoare grupărilor hidroxil și amină sunt evidențiate în jurul valorii de 3500 cm^{-1} vO-H și vN-H, împreună cu vC-H prezent în jurul valorii de $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Legătura de întindere a carbonilului fiind observată la aproximativ 1700 cm^{-1} și C-O prezentă la $750\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$.

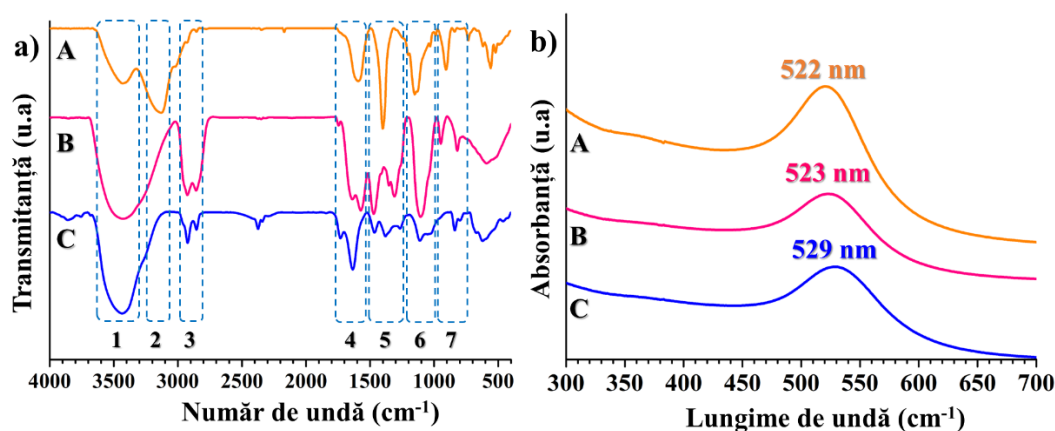


Figura II.1.3. (a) Spectrele IR suprapuse ale AuNPs (A), AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA (B) și AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA (C); unde: 1 –vO-H și vN-H; 2 –vO-H (carboxil); 3 –vC-H ; 4 –vC=O (carboxil) și vC=O (carbonil); 5 –vC-C și vN-H ; 6 –vC-O și vC-N; 7 –vC-H și vN-H. (b) Spectrele UV suprapuse ale AuNPs (A), AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA (B) și AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA (C)

Toate nanoparticulele investigate au prezentat o bandă distinctivă de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), la aproximativ 520 nm (**Figura II.1.3.b**), ceea ce indică prezența nanoparticulelor sferice.

Caracteristicile morfologice ale nanoparticulelor au fost evaluate cu ajutorul microscopiei electronice STEM (**Figura II.1.6**).

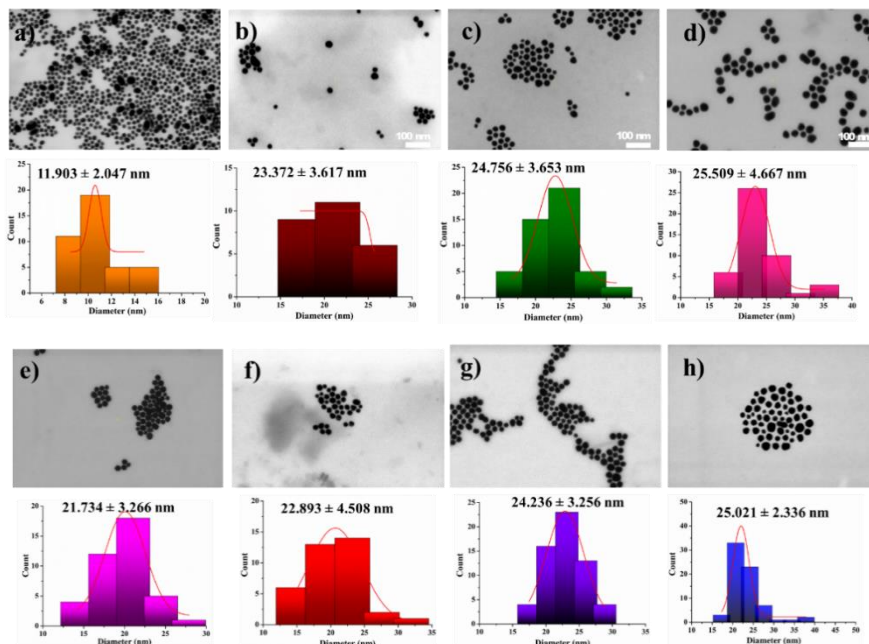


Figura II.1.6. Imagini de microscopie electronică cu transmisie prin scanare și distribuția diametrelor medii ale nanoparticulelor pe parcursul etapelor de funcționalizare: **(a)** AuNPs; **(b)** AuNPs-PEG-epoxi; **(c)** AuNPs-PEG-PEI; **(d)** AuNP-PEG-PEI-PEG-GA; **(e)** AuNPs-PEG-NH₂; **(f)** AuNPs-PEG-PEG-epoxi; **(g)** AuNPs-PEG-PEG-PEI; **(h)** proba AuNPs-PEG-PEG-PEI-PEG-GA

II.1.2.3. Interacțiune vectorilor cu ADN

Simulările de modelare moleculară (MD) (**Figura II.1.7.b** și **e**) demonstrează că, în absența ADN-ului, lanțurile de PEI rămân complet extinse, formând o "coroană" flexibilă în jurul nucleului de aur. Această extensie este determinată de repulsia electrostatică între grupările cationice încărcate pozitiv ($-NH_2^+/-NH_3^+$) de pe lanțurile polimerice. Odată cu introducerea ADN-ului (**Figura II.1.7.c** și **f**), se observă o restructurare dramatică: lanțurile de PEI se colapsează, înfășurând firul de ADN prin atracții electrostatice între grupurile pozitive ale PEI-ului și grupurile fosfat negative ale ADN-ului. Această tranziție structurală nu numai că evidențiază rolul cheie al interacțiunilor electrostatice în formarea complexelor ADN-vector, dar și sugerează un mecanism de optimizare a condensării ADN-ului, esențial pentru eficiența transfecției.

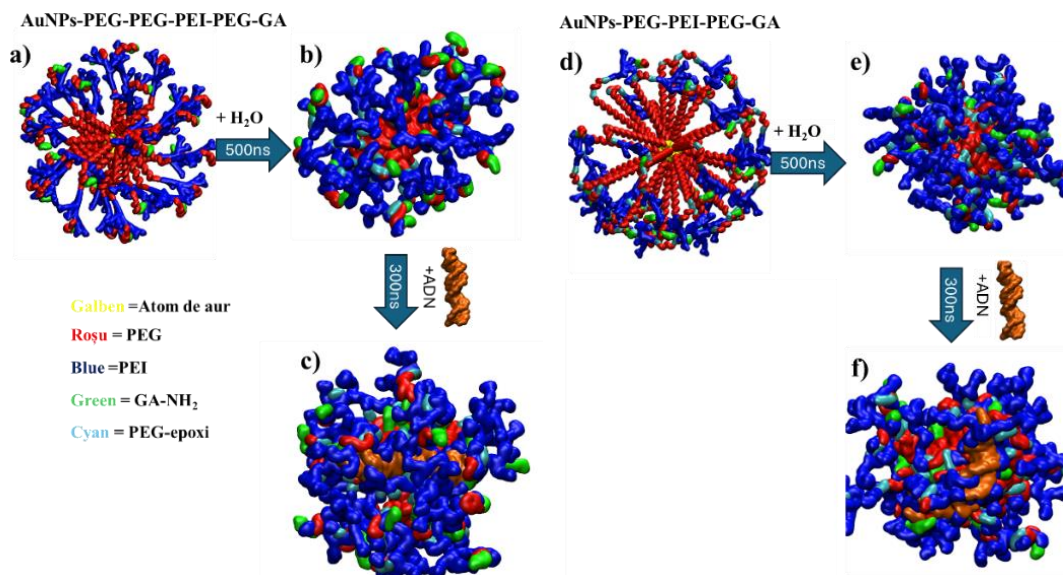


Figura II.1.7. Instantanee ale modelului AuNPs-*PEG-PEG*-PEI-PEG-GA (a) după construcție, (b) după echilibrare de 500 ns în apă și (c) după simulare de 300 ns în prezența unui fragment ADN; Instantanee ale modelului AuNPs-*PEG*-PEI-PEG-GA (d) după construcție, (e) după echilibrare de 500 ns în apă și (f) după simulare de 300 ns în prezența unui fragment ADN

II.1.3.1. Condensarea și protecția ADN-ului plasmidic

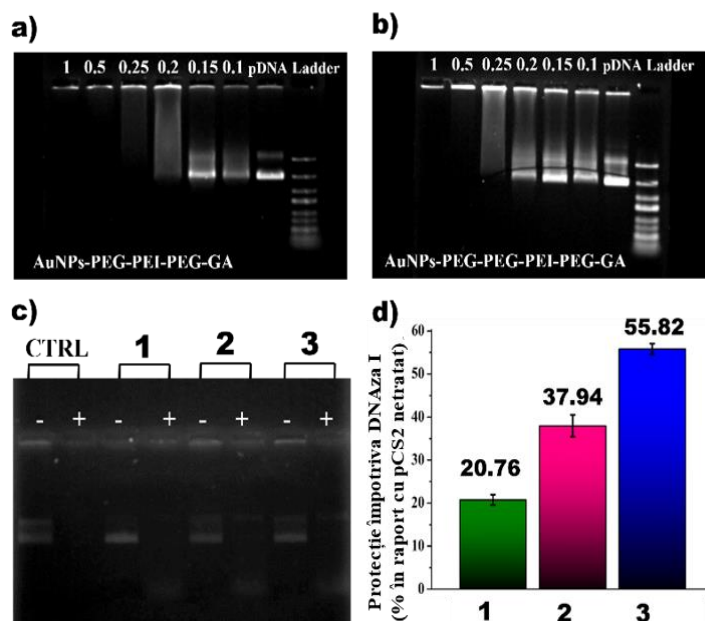
Testul de electroforeză pe gel de agaroză a fost realizat pentru a evalua capacitatea vectorilor AuNPs-*PEG-PEG*-PEI-PEG-GA și AuNPs-*PEG*-PEI-PEG-GA de a complexa ADN-ul plasmidic pCS2+MT-Luc, determinând eficiența de legare la diferite rapoarte N/P (azot/fosfor). Dispariția benzilor de ADN liber și reținerea completă a acestuia în complex indică o complexare eficientă, în timp ce prezența benzilor migratoare semnalează ADN necomplexat.

Testul de digestie enzimatică utilizând DNaza I (deoxiribonucleaza I) a fost realizat pentru a evalua stabilitatea complexelor ADN-vector și gradul de protecție oferit de nanoparticule împotriva degradării enzimatică.

Figura II.1.7 Mobilitatea electroforetică

a pCS2+MT-Luc în poliplecșii formați din (a) AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA, (b) AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA la diferite rapoarte N/P; (c) testul de protecție cu DNaza I, electroforeză reprezentativă în agaroză a poliplecșilor cu pCS2+MT-Luc incubati în absența (-) sau în prezența (+) DNazei I, pCS2+MT-Luc ca probă de control, (1) PEI, (2) AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA și (3) AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA; (d) Cuantificarea totalului benzilor cu (1) PEI, (2) AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA și (3) AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA, după tratarea cu DNA-aza I (valoarea pCS2+MT-Luc netratată este egală cu

100)



După incubarea poliplecșilor tratați cu DNA-aza I cu SDS (Figura II.1.6.d), PEI, AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA și AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA au eliberat 20,76%, 37,94% și, respectiv, 55,82% din ADN-ul plasmidic incubat. Cu toate acestea, vectorul AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA a păstrat cea mai mare cantitate de ADN, urmat de vectorul cu lungimea lanțului de PEG mai mică, iar în cele din urmă, cea mai mică capacitate de protecție a ADN-ului a fost obținută în cazul PEI.

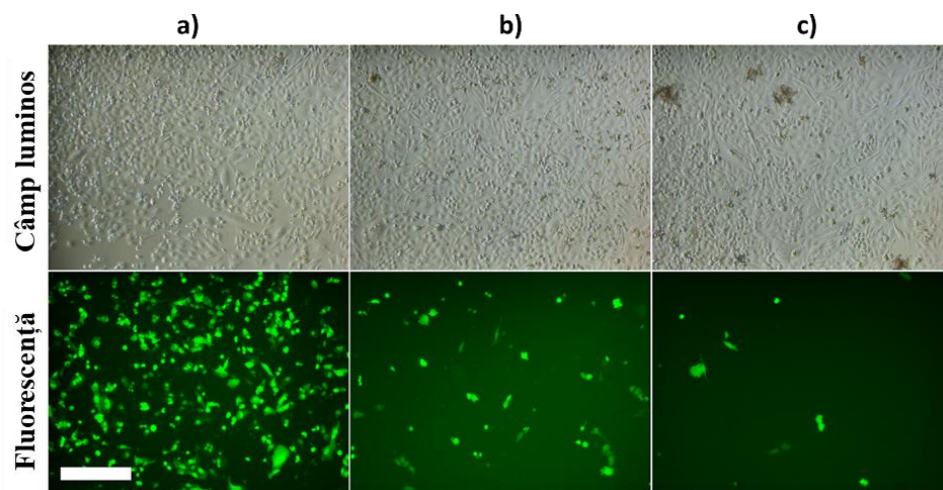
II.1.3.2 Eficiența transfecției *in vitro*

Pentru evaluarea calitativă, s-au obținut poliplecși prin interacțiunea moleculelor de PEI cu plasmidul pCS2+NLS-eGFP care conține gena pentru producerea unei proteine fluorescente verzi îmbunătățite (Figura II.1.8). Se poate aprecia faptul că, la 48 de ore după tratarea celulelor HeLa cu poliplecși vector/ADN, transfecția realizată cu sistemul AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA (Figura II.1.8.a) este mai puternică decât cea indusă de vectorul AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA (Figura II.1.8.b). De asemenea, ambii vectori reușesc să transfecteze mai eficient decât PEI liber (Figura II.1.8.c).

Figura II.1.8. Microscopie de fluorescență a celulelor HeLa transfectate.

Raportul PEI/ADN a fost (a) AuNPs-*PEG-PEG*-PEI-PEG-GA, (b) AuNPs-*PEG*-PEI-PEG-GA, (c) PEI. Celulele au fost vizualizate la microscop cu ajutorul filtrului GFP, la 48 de ore după transfecție.

Scara: 200 μ m.



Acest lucru indică faptul că lungimea lanțului de PEG joacă un rol esențial pentru obținerea unei performanțe superioare de transfecție.

II.1.4.5. Examen histopatologic

Examinările histopatologice au fost realizate pentru a investiga posibilele leziuni tisulare induse de administrarea vectorilor (AuNPs-*PEG-PEG*-PEI-PEG-GA și AuNPs-*PEG*-PEI-PEG-GA). Scopul principal al acestor analize a fost de a evalua impactul nanoparticulelor asupra structurii și morfologiei organelor vizate, în special asupra ficatului, splinei, rinichilor și plămânilor.

Prezența celulelor bi-nucleate indică existența unui proces de regenerare în curs de desfășurare (**Figura II.1.13**). Nu au fost observate alte modificări, cum ar fi atrofia, congestia, modificări de formă, volum și culoare. Alte organe, cum ar fi plămânii, rinichii și splina, nu au fost afectate și au prezentat un aspect normal pe secțiunile histologice.

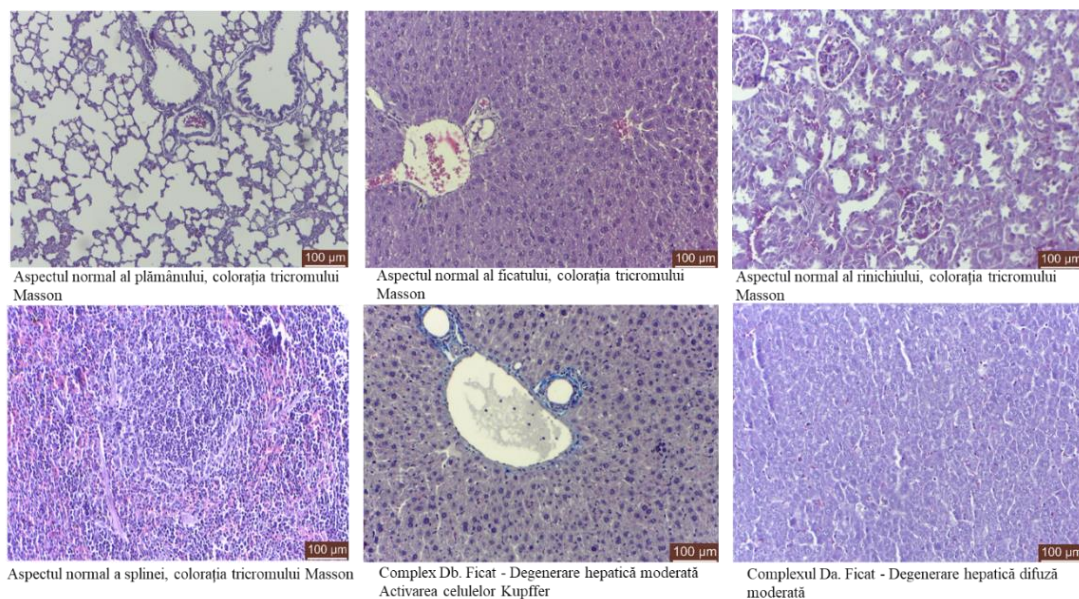


Figura II.1.13. Modificări histologice în ficatul șoarecilor BALB/c după administrarea de vectori AuNPs-*PEG-PEG*-PEI-PEG-GA și AuNPs-*PEG*-PEI-PEG-GA

Din punct de vedere histologic, nu au fost observate modificări de natură inflamatorie în splină, plămâni și rinichi. O ușoară degenerare hepatică, cu activarea celulelor Kupffer, a fost înregistrată pentru ambii vectori, dar prezența celulelor bi-nucleate indică un proces tranzitoriu, reversibil, care nu influențează starea de sănătate a animalelor de laborator. Activarea celulelor Kupffer este responsabilă pentru leziunile din stadiul inițial ale ficatului, care este principalul organ implicat în biotransformarea nanoparticulelor de aur (Balasubramanian *et al.*, 2010).

CAPITOLUL II.2 Nanoparticule de aur funcționalizate, radiomarcate, ca potențiali agenți biocompatibili pentru tehnicile PET/SPECT

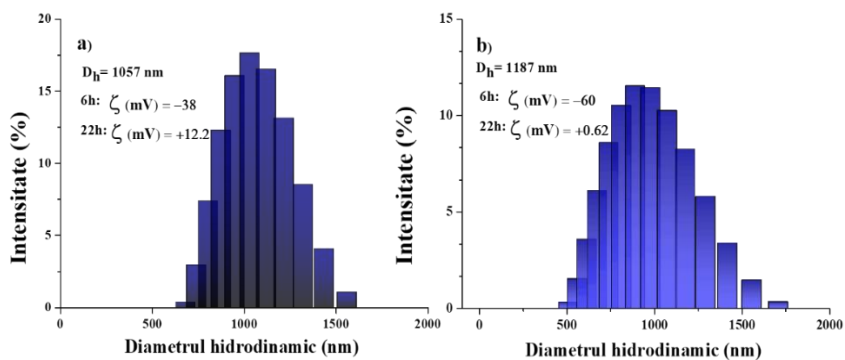
Având în vedere incidența tot mai ridicată a cancerului (Singh *et al.*, 2024), devine esențială dezvoltarea unor tratamente eficiente, precum și a unor metode accesibile și rentabile pentru depistarea precoce a acestei maladii, factor crucial în îmbunătățirea prognosticului și a ratelor de supraviețuire. În acest sens, medicina nucleară poate stabili un diagnostic rapid și precis. O condiție esențială în aplicarea tehnicii este oferta de substanțe radiomarcate adecvate pentru țesutul țintă.

Prezentul studiu explorează sinteza și caracterizarea unor vectori funcționaliizați, concepuți pentru imagistica SPECT și PET. Structura acestora include un nucleu de aur, un strat destinat captării radioizotopilor, un ligand pentru recunoaștere moleculară și o matrice polimerică menită să optimizeze interacțiunile biologice. De asemenea, o atenție deosebită este acordată decorării învelișului cu unități de GA situate în medii moleculare împiedicate steric, deoarece se asigură acumularea selectivă a nanoparticulelor în zonele cu un consum mare de glucoză.

II.2.2.3. Sinteza și caracterizarea AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA radiomarcate cu ^{99m}Tc și ^{68}Ga

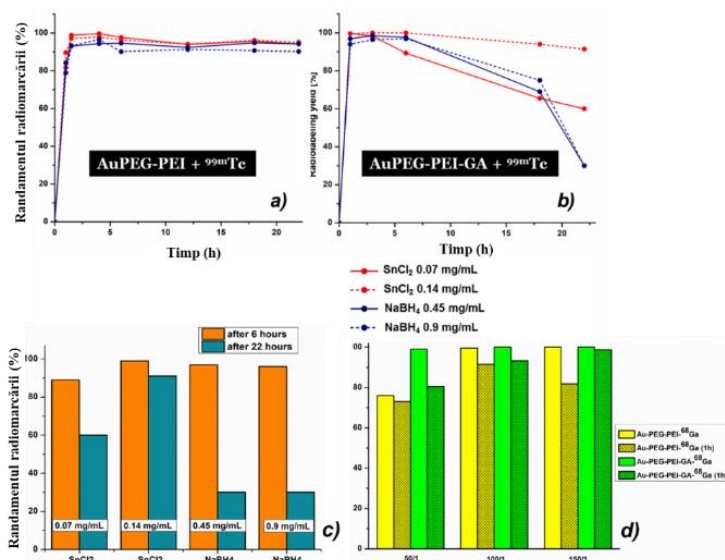
Pentru a obține cel mai mare randament de radiomarcare, procedura cu ^{99m}Tc a fost efectuată cu variația activității $\text{Na}^{+99m}\text{TcO}_4^-$ (185 MBq/5 mCi), împreună cu natura și concentrațiile de agenți reducători NaBH_4 sau SnCl_2 . Complexul rezultat dintre $[\text{TcO}_4^-]$ și PEI încărcat foarte pozitiv a fost confirmat prin scăderea valorilor potențialului zeta măsurate la 6 ore după procesul de radiomarcare. Valorile au scăzut de la +38 (valoarea inițială) la -38 mV pentru AuPEG-PEI/ ^{99m}Tc , de la +3 până la -60 mV pentru AuPEG-PEI-GA/ ^{99m}Tc , așa cum este prezentat în **figura II.2.10**. Totodată, s-a observat o creștere a potențialului zeta după 22 de ore indicând valoarea +12,2 mV pentru AuPEG-PEI și +0,6 mV pentru AuPEG-PEI-GA.

Figura II.2.10. Valorile diametrului și potențialului zeta pentru (a) AuPEG-PEI și (b) AuPEG-PEI-GA după radiomarcare cu nanoparticule cu ^{99m}Tc , folosind o soluție de 0,14 mg/mL SnCl_2 ca agent reducător. Valorile potențialului zeta (ζ) sunt prezentate în inserții (Uritu *et al.*, 2024)



Eficiența de radiomarcare a AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA atinge valori de până la 99%, în principal în perioada inițială de 6 ore, cu variații minore bazate pe tipul și concentrația agentului reducător utilizat. Datele prezentate în **figura II.2.12.c** indică faptul că stabilitatea sistemului este afectată semnificativ de prezența agentului reducător după o durată de 6 ore. Eficiența de radiomarcare a complexului AuPEG-PEI-GA- ^{99m}Tc s-a dovedit a fi de 91% după 22 de ore de incubare cu SnCl_2 (0,14 mg/mL).

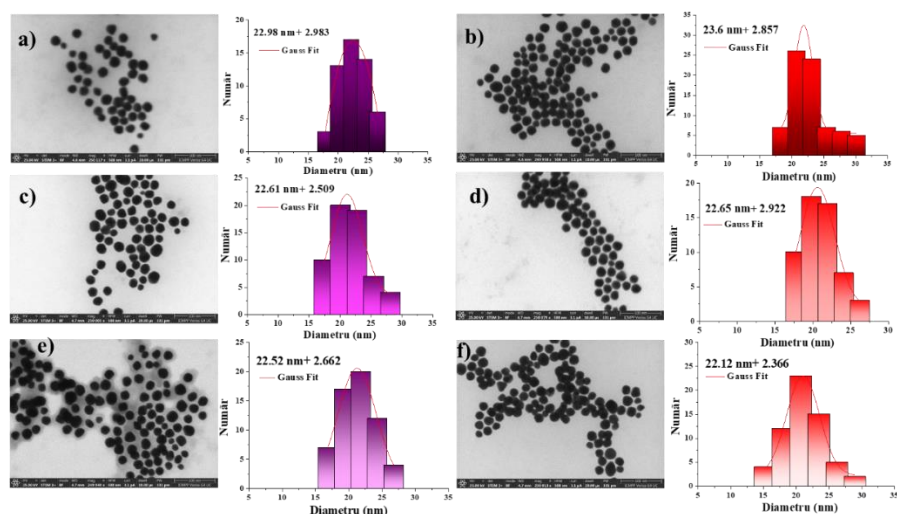
Figura II.2.12. Randamentul de radiomarcare al nanoparticulelor (a) AuPEG-PEI și (b) AuPEG-PEI-GA cu ^{99m}Tc , efectuată cu pertechetat de sodiu cu radioactivitate de 185 MBq (5 mCi), corespunzând unui raport N/ ^{99m}Tc de aproximativ 100/1; (c) Diagrama cu bare evidențiază condițiile optime pentru radiomarcarea AuPEG-PEI-GA; (d) Randamentele de radiomarcare ale AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA cu ^{68}Ga în funcție de raportul dintre azot și galiu (N / Ga) (Uritu *et al.*, 2024)



Protocolul aplicat pentru procesul de radiomarcare cu ^{68}Ga a presupus utilizarea unei cantități constante de $^{68}\text{GaCl}_3$ și a trei concentrații distincte de nanoparticule de aur, care au fost combinate pentru a obține rapoarte N/Ga de 50, 100 și 150. Coordonarea $^{68}\text{Ga}^{3+}$ cu azotul prezent în învelișul PEI a dus la încorporarea celor dintâi în lanțurile PEI. Spre deosebire de complexii formați cu $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$, $^{68}\text{Ga}^{3+}$ manifestă o preferință pentru formarea de entități mai mici. Histogramele generate din imaginile STEM au demonstrat că diametrele nanoparticulelor se

încadrează într-un interval îngust de 22,12 până la 23,6 nm, cu variații neglijabile observate la diferite concentrații.

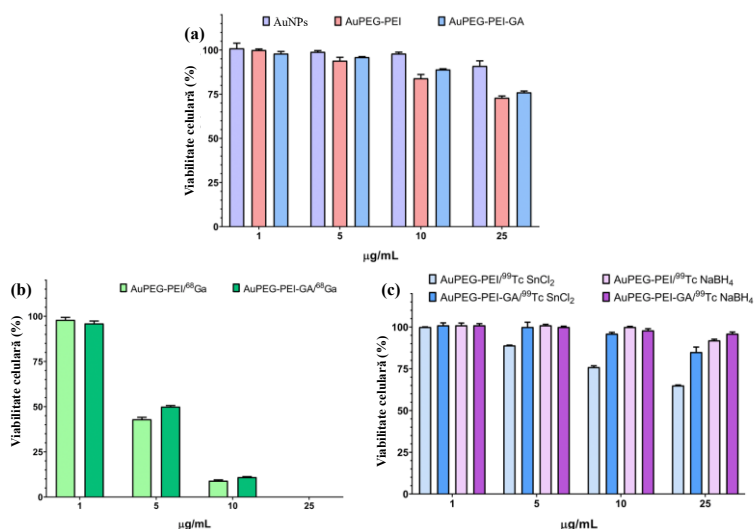
Figura II.2.13. Imaginile STEM ale (a,c și e) AuPEG-PEI/ ^{68}Ga și (b,d și f) AuPEG-PEI-GA/ ^{68}Ga la rapoartele N/Ga selectate: (a,b), 50/1, (c,d) 100/1 și (e,f) 150/1. Histogramele indică distribuția dimensională prin măsurarea a aproximativ 100 de particule din mai multe imagini STEM (Uritu *et al.*, 2024)



II.2.2.3 Teste *in vitro* - efectul nanoconjugatelor AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA înainte și după radiomarcare asupra fibroblaștilor gingivali umani normali

Testele *in vitro* pe fibroblaști (Figura II.2.20.a) au demonstrat biocompatibilitatea AuNPs, AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA la concentrațiile testate, menținând o viabilitate celulară de peste 70%. Cu toate acestea, s-a observat o sensibilitate la doză semnificativă pentru AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA, indicând necesitatea unei monitorizări atente a concentrațiilor utilizate.

Figura II.2.20. Evaluarea citotoxicității nanoparticulelor nemarcate și radiomarcate pe fibroblaști normali la incubare timp de 24 de ore: (a) nanoparticule AuNPs, AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-Ga; (b) AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-Ga marcate cu ^{68}Ga ; (c) AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA marcate cu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Uritu *et al.*, 2024)



Radiomarcarea cu ^{68}Ga a crescut citotoxicitatea chiar și la concentrații scăzute, sugerând că doza optimă este de $1\ \mu\text{g/mL}$ pentru a evita impactul negativ asupra viabilității fibroblaștilor. În contrast, etichetarea cu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a afectat viabilitatea doar la concentrații ridicate, subliniind variabilitatea efectelor în funcție de tipul de marcaj și concentrație.

II.2.2.4 Biodistribuția *in vivo* a nanoparticulelor AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA radiomarcate

Figura II.2.21. Ilustrează biodistribuția *in vivo* a sistemelor AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA, radiomarcate cu ^{68}Ga și $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A fost testată și demonstrată stabilitatea celor două sisteme radiomarcate până la 7 ore, ambele sisteme au prezentat caracteristici favorabile atunci când sunt utilizate ca sisteme radiomarcate. Captarea fiziologică a tiroidei prin symporter NIS (Franken et al.) a fost prezentă în cazul $^{99\text{m}}\text{Tc}$, dar absentă în cazul AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA.

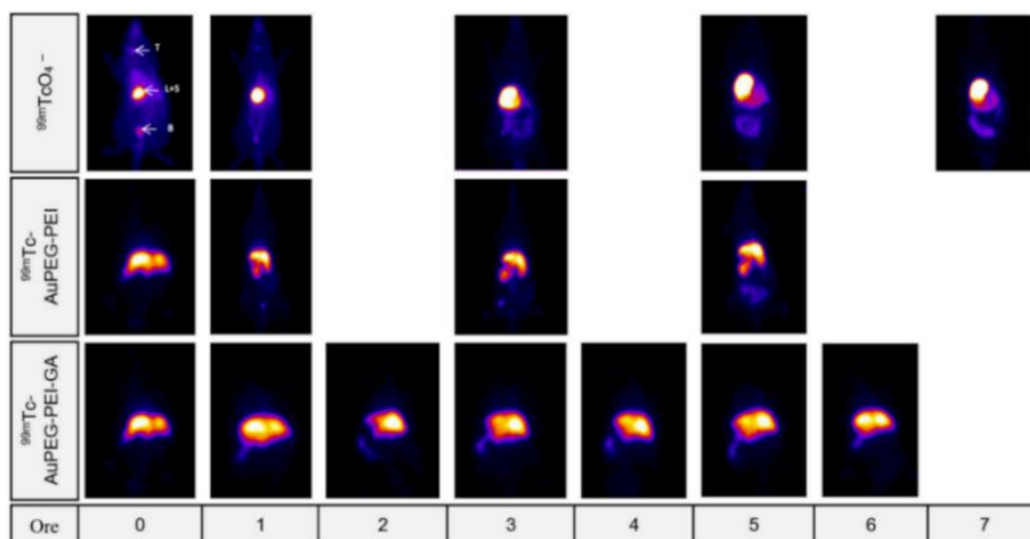


Figura II.2.21. Absorbția tisulară a nanoparticulelor radiomarcate cu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ investigată în comparație cu absorbția pertechnetatului de sodiu. T = tiroidă, St = stomac, B = vezică urinară, L = ficat, Sp = splină, LK = rinichi stâng (Uritu *et al.*, 2024)

Analizând **figura II.2.22.** se poate observa că radionuclidul liber (^{68}Ga) are o biodistribuție relativ nespecifică, cu o acumulare vizibilă în mai multe țesuturi precum inimă, creier, ficat, stomac și intestin. În cazul AuPEG-PEI/ ^{68}Ga , captarea este destul de slabă în majoritatea țesuturilor, fiind mai vizibilă în vezică și rinichi, deci cu predispoziție la eliminare rapidă pe cale renală.

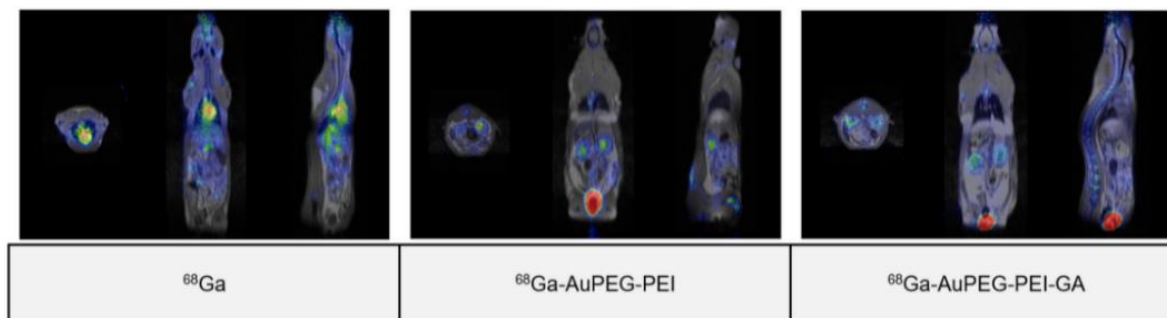


Figura II.2.22. Absorbția tisulară a nanoparticulelor radiomarcate cu ^{68}Ga în comparație cu $^{68}\text{GaCl}_3$ liber evidențiată de imaginile PET-RMN fuzionate (Uritu *et al.*, 2024)

Prezența GA în AuPEG-PEI-GA/ ^{68}Ga asigură o biodistribuție ce evidențiază compusul fără GA, care arată o captare mult mai bună în sistemul nervos (în creier și măduva spinării), fiind, de asemenea, prezent în rinichi și vezică urinară. Fixarea preferențială în țesutul nervos confirmă ipoteza conform căreia un astfel de compus ar putea fi util pentru vizualizarea imagistică a țesuturilor mari consumatoare de glucoză. Această constatare a fost confirmată doar pentru radiomarcarea cu ^{68}Ga (PET), dar nu și în cazul $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (SPECT), ceea ce reflectă faptul că radiomarcarea are loc prin mecanisme diferite pentru cei doi radionuclizi, fiind posibil la modificări conformaționale care au dat ca rezultat biodistribuții diferite.

CAPITOLUL III - Nanoparticule de aur funcționalizate cu metotrexat: o nouă abordare nanoterapeutică pentru o activitate antitumorală, antioxidantă și biocompatibilitate îmbunătățită

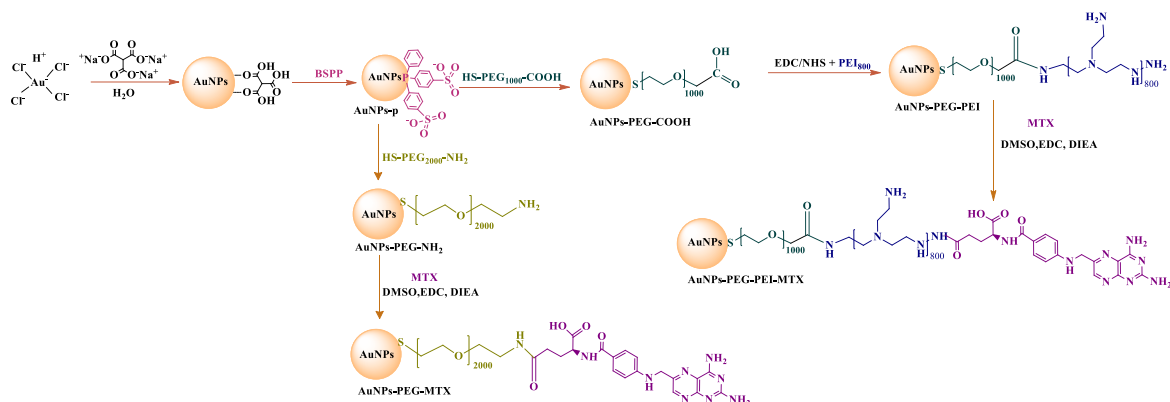
Sistemele de livrare țintită a medicamentelor permit să extindă posibilitățile terapeutice ale medicamentelor prin creșterea livrării către țesutul țintă, precum și raportul dintre țesutul țintă și țesutul non-țintă (Qiu and DelVecchio Good, 2021). Acest lucru va conduce, la rândul său, la reducerea dozei minime eficiente a medicamentului și a toxicității medicamentoase asociate, precum și la o îmbunătățire a eficacității terapeutice la concentrații plasmatice echivalente (Sudimack and Lee, 2000).

În acest studiu, s-a propus o nouă metodă pentru a îmbunătăți eficacitatea (proprietăți antitumorale și antioxidante) și siguranța metotrexatului prin utilizarea a două sisteme distincte ca nanopurtători pe bază de nanoparticule de aur (AuNPs) funcționalizate cu PEG, PEI.

Prin legarea MTX la AuNPs funcționalizate cu polimeri, acesta se pot acumula mai bine în celulele tumorale pentru o durată mai lungă, ceea ce duce la un comportament farmacocinetic îmbunătățit și la un efect terapeutic mai puternic.

III.2.1. Sinteza a două sisteme pe bază de nanoparticulelor de aur funcționalizate cu metotrexat (AuNPs-PEG-NH₂-MTX și AuNPs-PEG-PEI-MTX)

Procesul de sinteză (**Schema III.1**) a constat în grefarea SH-PEG-COOH pe suprafața nanoparticulelor de aur acoperite cu fosfină, iar al doilea înveliș a fost creat prin cuplarea unor fracțiuni de PEI cu ramificații scurte, urmată de legarea covalentă a MTX, rezultând sistemul AuNPs-PEG-PEI-MTX. Al doilea sistem (AuNPs-PEG-MTX) a rezultat în urma funcționalizării nanoparticulelor de aur cu SH-PEG-NH₂, urmată de legarea covalentă a metotrexatului.

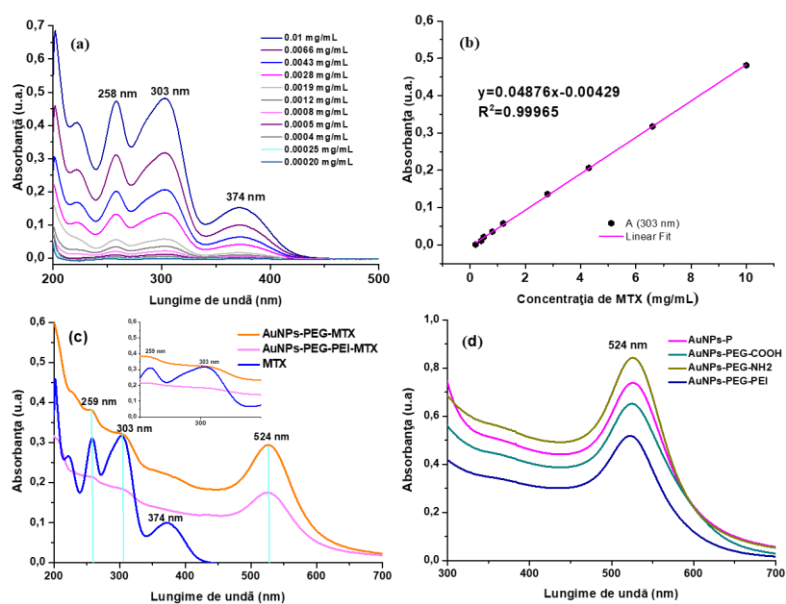


Schema III.1. Calea de sinteză pentru dezvoltarea nanoparticulelor de aur funcționalizate (Bostiog *et al.*, 2024)

III.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de aur funcționalizate (AuNPs-PEG-NH₂-MTX și AuNPs-PEG-PEI-MTX)

MTX liber a prezentat trei maxime caracteristice de absorbție UV-Vis la 258 nm, 303 nm și 374 nm (**Figura III.1.a**). Prezența maximelor caracteristice pentru MTX la 303 nm și 259 nm în spectrele AuNPs funcționalizate (**Figura III.1.c**) confirmă legarea MTX pe suprafața polimerilor, așa cum s-a raportat anterior (Tran *et al.*, 2013). Utilizând curba de calibrare a MTX în apă (**Figura III.1.b**), concentrațiile calculate de MTX în AuNPs au fost de 0,67 mg MTX / mL în AuNPs-PEG-MTX și de 0,385 mg MTX / mL în AuNPs-PEG-PEI-MTX.

Figura III.1. Spectrul UV-Vis ale (a) MTX în apă la diferite concentrații, (b) curba de calibrare a MTX, (c) spectrele UV-Vis ale MTX, AuNPs-PEG-MTX și AuNPs-PEG-PEI-MTX, (d) nanoparticulele de aur funcționalizate cu polimeri după fiecare etapă (Bostiog *et al.*, 2024)



Formarea morfologiei sferice a nanoparticulelor de aur funcționalizate cu MTX și nefuncționalizate este susținută în continuare de tehnica STEM (**Figura III.4**).

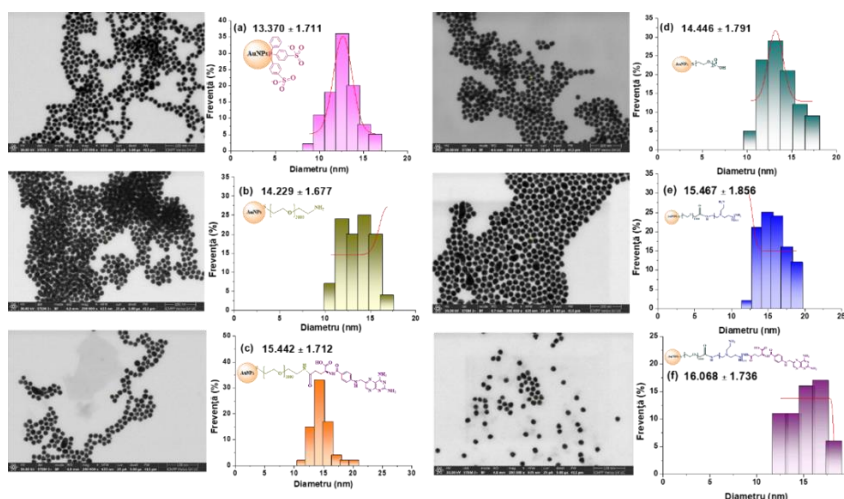


Figura III.4. Imagini de microscopie electronică cu transmisie prin scanare și histogramme ale distribuției dimensionale a nanoparticulelor investigate: **(a)** AuNPs-p, **(b)** AuNPs-PEG-NH₂, **(c)** AuNPs-PEG-MTX, **(d)** AuNPs-PEG-COOH, **(e)** AuNPs-PEG-PEI, **(f)** AuNPs-PEG-PEI-MTX (Bostiog *et al.*, 2024)

Nanoparticulele prezintă o polidispersitate scăzută și au diametre medii de $13 \pm 1,711$ nm (AuNPs-p), $14 \pm 1,677$ nm (AuNPs-PEG-NH₂), $15 \pm 1,712$ nm (AuNPs-PEG-MTX), $14 \pm 1,791$ nm (AuNPs-PEG-COOH), $15 \pm 1,856$ nm (AuNPs-PEG-PEI) și $16 \pm 1,736$ nm (AuNPs-PEG-PEI-MTX). După cum era anticipat, după funcționalizarea suprafeței, dimensiunile nanoparticulelor cresc progresiv la fiecare pas al funcționalizării.

III.2.3. Activitate antioxidantă

Activitatea antioxidantă a fost determinată atât pentru AuNPs funcționalizate cu MTX, cât și pentru produșii intermediari AuNPs-p, AuNPs-PEG-NH₂, AuNPs-PEG-PEI, utilizând metodele DPPH, FRAP și CUPRAC.

AuNPs-PEG-MTX prezintă activitate antioxidantă semnificativ mai mare în comparație cu AuNPs-PEG-PEI-NH₂, $p < 0,0001$, pentru testele DPPH, CUPRAC și MTX liber la aceeași concentrație ca cea găsită în nanoparticule, $p < 0,0001$, pentru toate cele trei teste. Aceste observații subliniază potențialul antioxidant îmbunătățit obținut prin încărcarea cu MTX ale conjugatelor AuNPs-PEG-NH₂, depășind atât nanoparticulele nefuncționalizate, cât și MTX liber. În schimb, AuNPs-PEG-PEI-MTX are o activitate antioxidantă semnificativ mai mică în comparație cu precursorul său, așa cum evidențiază testele DPPH ($p < 0,001$), FRAP ($p < 0,0001$) și CUPRAC ($p < 0,0001$).

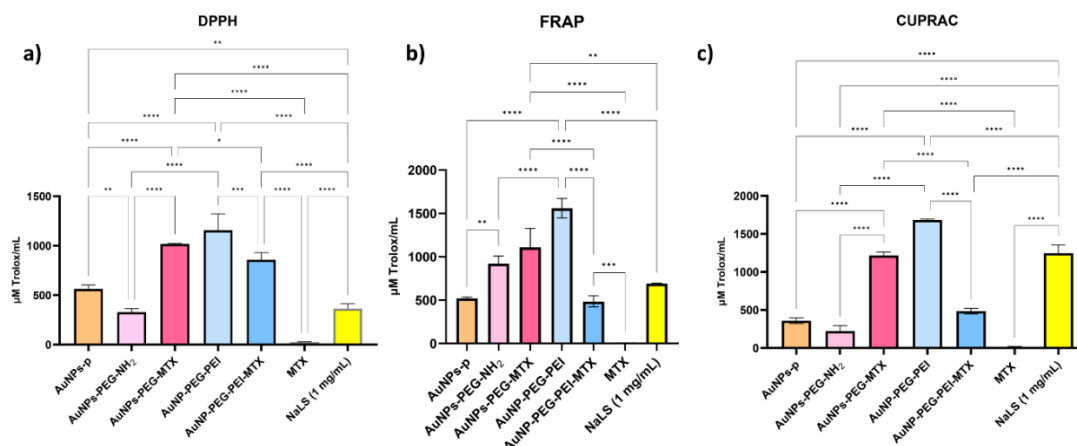


Figura III.7. Activitatea antioxidantă a produşilor intermediari şi a nanoparticulelor funcţionalizate: **(a)** Test DPPH, **(b)** Test FRAP, **(c)** Test CUPRAC (Bostiog *et al.*, 2024)

Metoda DPPH a arătat că AuNPs-p ($p<0,01$), AuNPs-PEG-MTX ($p<0,0001$), AuNPs-PEG-PEI ($p<0,0001$) şi AuNPs-PEG-PEI-MTX ($p<0,0001$) au avut o activitate antioxidantă semnificativ mai mare decât standardul NaLS (**Figura III.7.a**). În metoda FRAP, numai variantele AuNPs-PEG-MTX ($p<0,01$) şi AuNPs-PEG-PEI ($p<0,0001$) au prezentat o activitate antioxidantă semnificativ mai mare în comparaţie cu standardul NaLS (**Figura III.7.b**). În metoda CUPRAC, numai AuNPs-PEG-PEI ($p<0,0001$) a avut o activitate mai mare în comparaţie cu NaLS (**Figura III.7.c**).

III.2.4. Citocompatibilitatea nanoparticulelor pe linii celulare dermale, normale şi tumorale

Figura III.8 prezintă rezultatele testului MTT privind viabilitatea celulară a liniei celulare de keratinocite umane imortalizate (HaCaT) şi a liniei celulare de carcinom scuamos CAL27. Rezultatele indică faptul că viabilitatea celulară HaCaT a fost comparabilă cu cea a grupului de control sugerând o absenţă a citotoxicităţii. Diferenţele de viabilitate observate nu au fost semnificative statistic, atât pentru compuşi intermediari şi MTX, cât şi pentru nanoparticulele funcţionalizate cu MTX în comparaţie cu controlul.

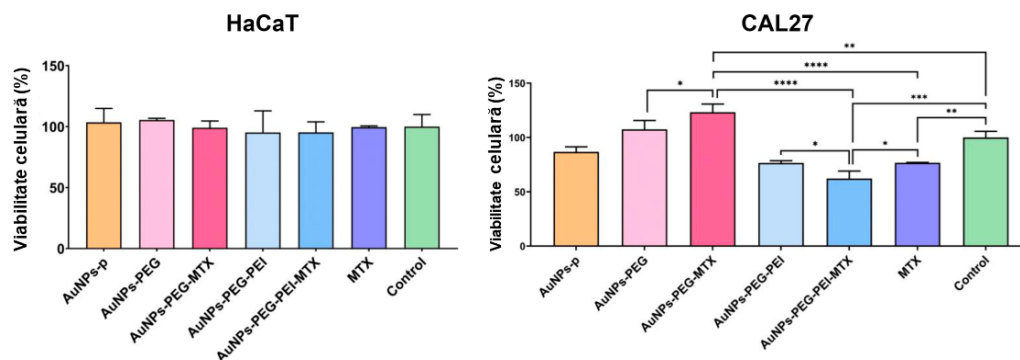


Figura III.8. Evaluarea biocompatibilității nanoparticulelor de aur funcționalizate cu MTX prin testul MTT în condiții standard de cultivare a liniei celulare de keratinocite umane HaCaT (stânga) și a liniei de celule canceroase non-melanom CAL27 (dreapta) (Bostiog *et al.*, 2024)

În cazul testelor efectuate pe linia celulară tumorală CAL27, s-au obținut rezultate diferite, evidențiindu-se o reducere a viabilității celulare care indică potențialul terapeutic al compușilor studiați. AuNPs-PEG-PEI-MTX a dovedit cea mai bună capacitate de a scădea viabilitatea celulelor tumorale, urmat de MTX liber și AuNPs-PEG-PEI.

Rezultatele testului Live/Dead realizat pe fiecare componentă a sistemelor (**Figura III.10**) coroborează rezultatele testelor biochimice. Mai exact, celulele HaCat au prezentat un raport semnificativ mai mare de celule vii (colorate în verde) și celule moarte (colorate în roșu) în **figura III.10.a**, ceea ce indică o viabilitate generală a celulelor HaCat în prezența condițiilor testate (Bhamidipati and Fabris, 2017).

Pe de altă parte, celulele tumorale au prezentat o viabilitate redusă în prezența nanoparticulelor de aur, conform **figurii III.10.b**, rezultând că tratamentul cu nanoparticule de aur are efect antitumoral (Uboldi *et al.*, 2009).

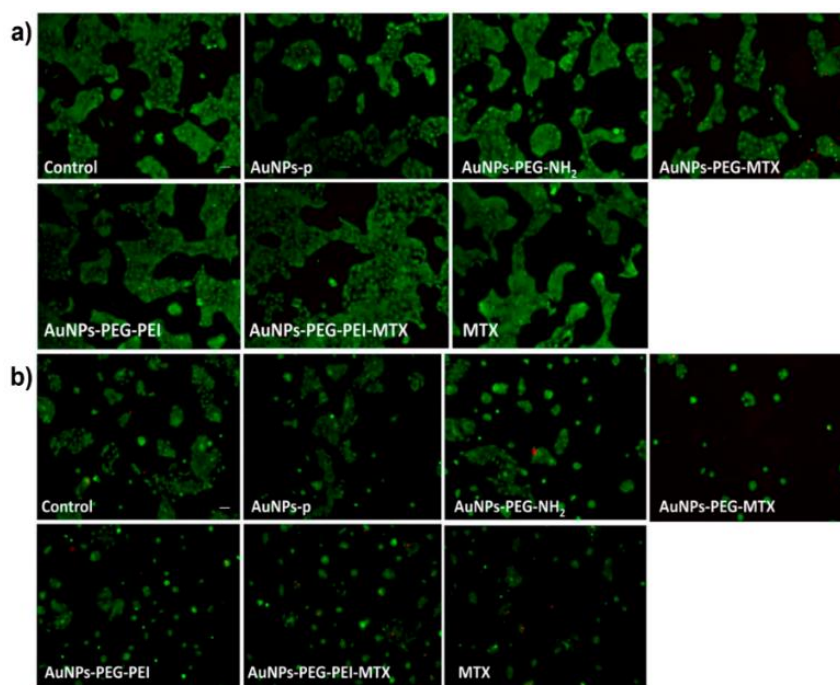


Figura III.10. Viabilitatea celulară măsurată prin test Live/Dead. **(a)** celule HaCat (normale) cultivate timp de 24 de ore în prezența AuNPs funcționalizate; **(b)** Celule tumorale (CAL27) cultivate timp de 24 de ore în prezența AuNPs funcționalizate; scară – 100 μm (Bostiog *et al.*, 2024)

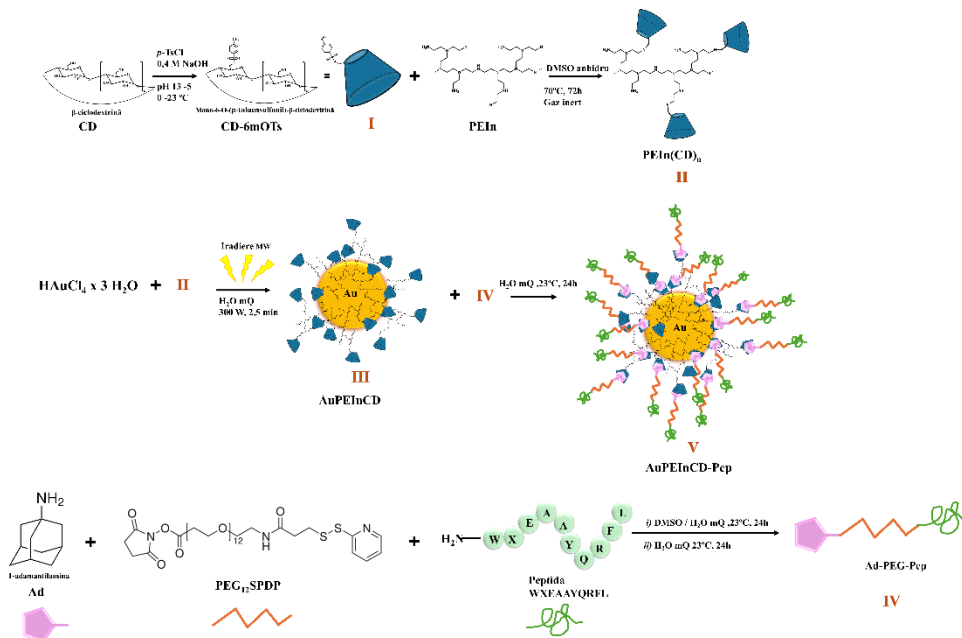
Testele de viabilitate celulară au arătat că nanoparticulele de aur funcționalizate cu MTX nu au afectat negativ celulele sănătoase, demonstrând potențialul acestora ca agenți terapeutici selectivi pentru celulele canceroase. Nanoparticulele s-au dovedit a fi biocompatibile și au prezentat citotoxicitate scăzută asupra keratinocitelor umane HaCaT și asupra celulelor canceroase non-melanom CAL27. Aceste descoperiri sugerează că AuNPs funcționalizate cu MTX sunt promițătoare pentru diverse aplicații biomedicale, cum ar fi terapia țintită a cancerului și tratamentele pe bază de antioxidanți.

CAPITOLUL IV- Vectori non-virali de livrare țintită a materialului genetic

Sistemul modular investigat în acest studiu abordează mai multe provocări în livrarea genelor, inclusiv specificitatea țintirii, eficiența transfecției și citotoxicitatea minimă. Designul vectorial utilizează chimia supramoleculară gazdă-oaspete între β -ciclodextrină și molecule funcționalizate cu adamantan pentru a crea o arhitectură de suprafață dinamică și interschimbabilă pe suprafața nanoparticulelor de aur (AuNPs). În construcția vectorilor, au fost testate trei tipuri de bPEI (800 Da, 2.000 Da și 25.000 Da) pentru a evalua modul în care lungimea masa moleculară a bPEI influențează dimensiunea particulelor, sarcina de suprafață, capacitatea de legare a ADN-ului și eficiența transfecției. Ulterior, pentru a investiga influența peptidei asupra performanței *in vitro*, au fost analizate două strategii: funcționalizarea AuPEInCD urmată de marcarea cu peptid fie înainte de formarea poliplecșilor cu pCS2+MT-Luc (ADN), fie după acest proces, în vederea determinării momentului optim de introducere a peptidei pentru maximizarea eficienței transfecției.

IV.2.1. Sinteza vectorilor non-virali de livrare țintită a materialului genetic

Procedura experimentală pentru obținerea vectorilor pe baza nanoparticulelor de aur a fost realizată conform **schemei IV.1**, urmând o cale de sinteză care implică două etape principale: formarea nanoparticulelor de aur (AuNPs) funcționalizate cu un conjugat de polietilenimină și β -ciclodextrină (PEInCD), și prepararea unui derivat de peptidă-PEG₁₂-SPDP-adamantan (Ad-PEG-Pep) care este capabil să formeze un complex de incluziune cu unitățile de β -CD de pe suprafața nanoparticulelor ducând astfel, în etapa finală, la obținerea de nanoparticule supramoleculare de AuPEInCD decorate cu peptida pentru țintire celulară specifică (Craciun *et al.*, 2023).



Schema IV.1. Cale experimentală pentru obținerea vectorilor non-virali AuPEInCD-Pep
(PEIn MW: 800 Da, 2.000 Da și 25.000 Da)

IV.2.2. Caracterizarea vectorilor non-virali de livrare țintită a materialului genetic

Pentru a confirma modificările chimice suferite de β -CD în urma reacțiilor de funcționalizare, a fost utilizată spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN).

Comparativ cu bine cunoscutul spectru protonic al β -CD (**Figura IV.1.a**), introducerea grupării p-toluensulfonil pe o subunitate de glucoză induce unele modificări în modelul RMN al beta-ciclodextrinei (**Figura IV.1.b**). Restul protonilor beta-ciclodextrinei prezintă semnale de rezonanță suprapuse în intervalul 3,0-4,0 ppm, în timp ce protonii de la gruparea hidroxil au fost atribuiți celor două semnale de la 4,50 (OH-6) și 5,73 ppm (OH-2 și OH-3). Prezența grupării p-toluensulfonil este ușor de recunoscut după singletul de la 2,44 ppm (CH₃) precum și cele două dublete localizate în regiunea câmpului magnetic scăzut, caracteristice protonilor din nucleul aromatic, confirmând astfel prezența grupării p-toluensulfonil.

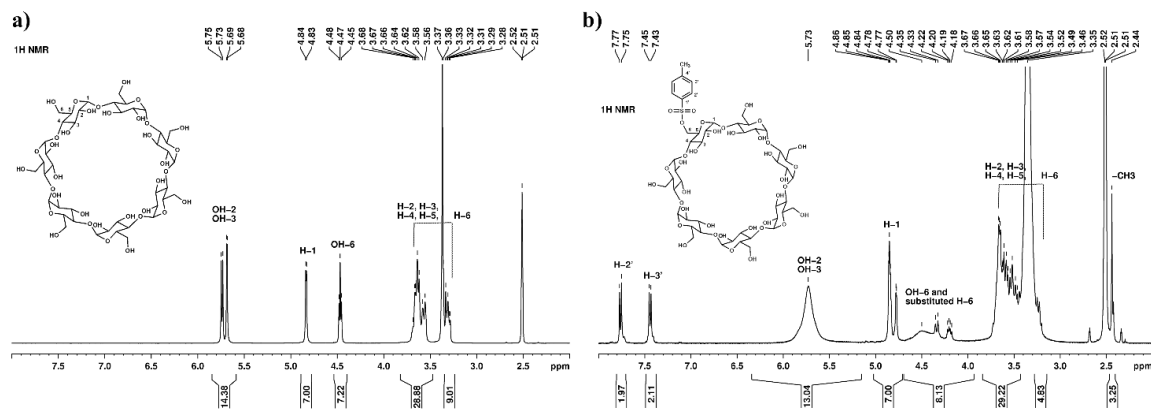


Figura IV.1. Spectre ^1H RMN corespunzătoare a) β -CD și b) β -CD-Ts. Ambele spectre au fost înregistrate în DMSO deuterat la 400 MHz.

Spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray (ESI-MS) a fost utilizată pentru a confirma structura compusului Ad-PEG-Pep sintetizat.

Picul ionului molecular pentru Ad-PEG₁₂ a fost detectat la m/z 948 [M+], corespunzând masei calculate de 947. În plus, spectrele au evidențiat prezența unei fracțiuni adamantil reziduale nereacționate.

În mod similar, Ad-PEG-Pep a fost identificat la m/z 1353, aliniindu-se exact cu masa moleculară așteptată ($m/2z$), împreună cu un vârf secundar la $m/3z$ 902 (**Figura IV.3**). În plus, Ad-PEG₁₂ rezidual a fost detectat la m/z 970, corespunzător aductului de sodiu (Ad-PEG+Na), indicând prezența unor intermediari minori nereacționați.

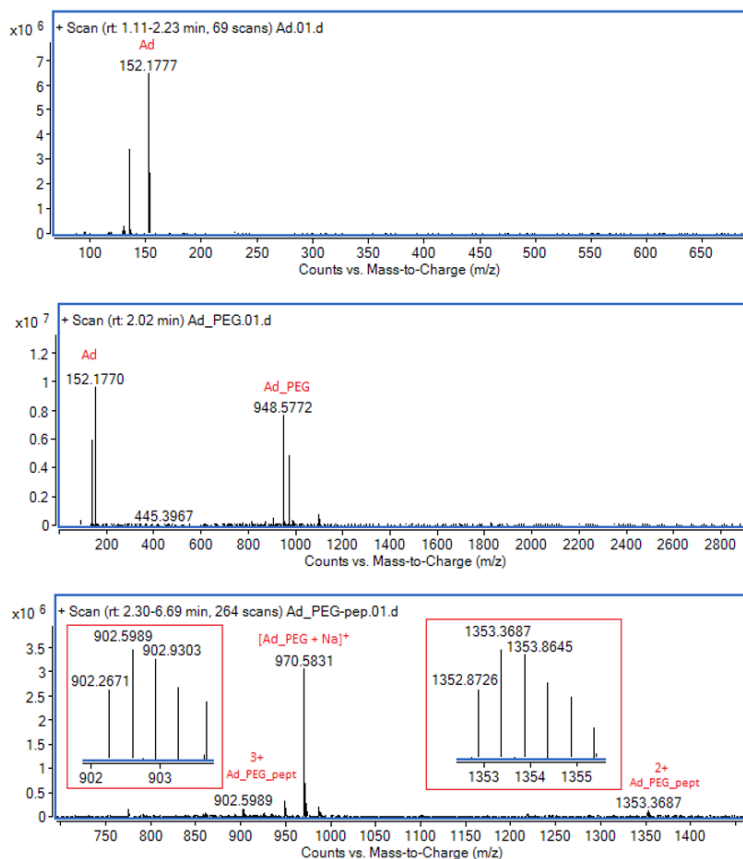
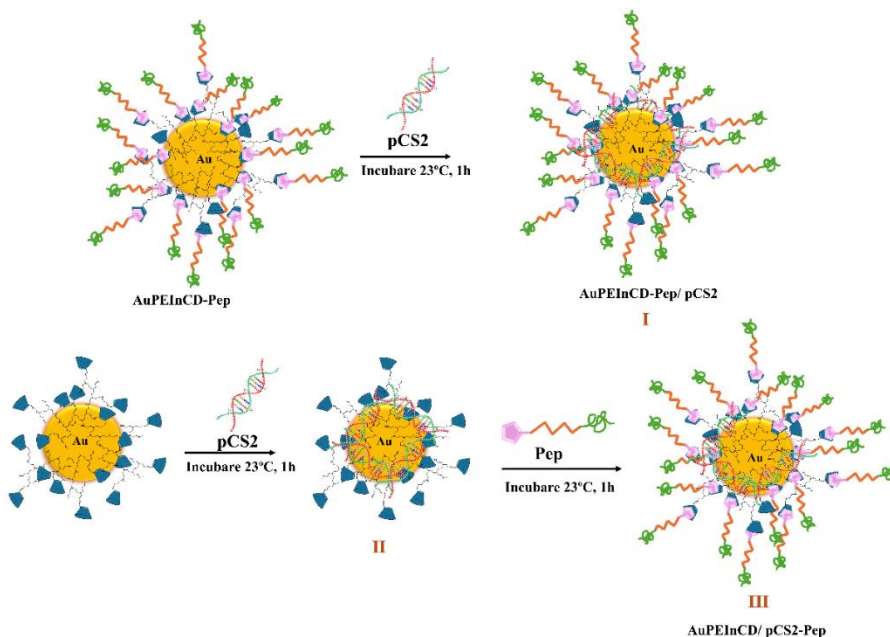


Figure IV.3. Spectrul MS al Ad-PEG-Pep și al intermediarilor

IV.2.3. Caracterizarea vectorilor AuPEInCD în interacțiunea cu pCS2+MT-Luc

În vederea evaluării influenței peptidei asupra performanței *in vitro*, au fost investigate două strategii: funcționalizarea AuPEInCD urmată de marcarea cu peptid fie înainte de formarea poliplecșilor cu pCS2+MT-Luc (ADN), fie ulterior acestui proces (**Schema IV.2**).



Schema IV.2. Reprezentarea schematică a procesului de obținere pentru vectorii non-virali AuPEIn-CD marcați cu peptidă înainte și după formarea poliplecșilor cu plasmid

Pentru a obține informații detaliate privind morfologia și dimensiune nanoparticulelor rezultate în urma formării poliplecșilor AuPEInCD/pCS2 a fost utilizată microscopia electronică de transmisie (TEM).

În cazul nanoparticulelor de aur, studiile au arătat că particulele cu un diametru mai mare pot transporta mai mult plasmid datorită suprafeței, dar densitatea ADN-ului pe suprafață scade pe măsură ce dimensiunea particulei crește (Vasiliu *et al.*, 2021). Atunci când PEI este utilizat pentru a forma complecși cu plasmid, masa moleculară a PEI (25000 Da) poate conduce la complecși mai substanțiali în comparație cu moleculele mai mici de PEI. Acest efect este în concordanță cu observațiile în care diametrul scade cu 1 sau 2 nanometri în urma împachetării plasmidului (**Figura IV.9**).

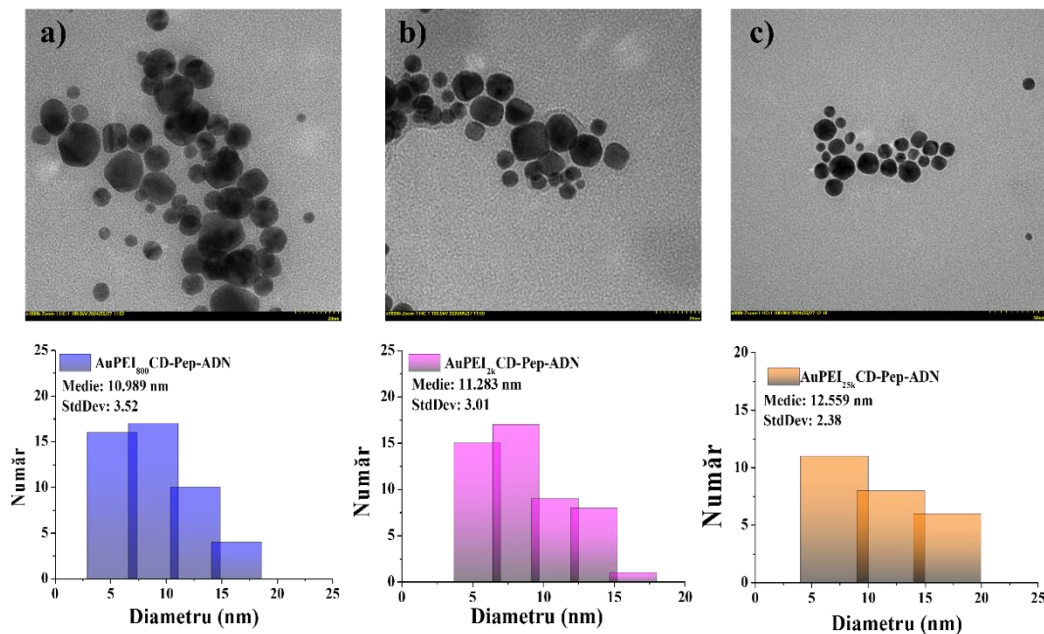


Figura IV.9. Microimaginele TEM și distribuțiile dimensiunilor aferente acestora pentru:
(a) AuPEI₈₀₀CD-Pep-ADN, **(b)** AuPEI_{2k}CD-Pep-ADN, **(c)** AuPEI_{25k}CD-Pep-ADN

Testul de digestie enzimatică utilizând DNaza I (deoxiribonucleaza I) a fost realizat pentru a evalua stabilitatea poliplecșilor vector non-viral/ADN și gradul de protecție oferit de vectori împotriva degradării enzimatice a ADN-ului. S-au utilizat două abordări diferite în formarea poliplecșilor: în prima abordare, nanoparticulele marcate cu Pep au fost complexate cu ADN plasmidic (AuPEIn-CD-Pep/pCS2), în a doua abordare, nanoparticulele nemarcate (AuPEIn-CD) au fost complexate cu ADN plasmidic, urmat de marcare cu peptid (AuPEIn-CD/pCS2+Pep). Compararea acestor două tipuri de complexe a permis evaluarea eficienței vectorilor în protejarea pCS2, un aspect esențial pentru menținerea integrității genetice în condiții biologice și pentru asigurarea succesului transfecției.

a.1=AuPEI_{25k}CD/pCS2/ Pep-DNaza
 a.2=AuPEI_{25k}CD/pCS2/ Pep
 a.3=AuPEI_{2k}CD/ pCS2/ Pep-DNaza
 a.4=AuPEI_{2k}CD/ pCS2/ Pep
 a.5=AuPEI₈₀₀CD/ pCS2/ Pep-DNaza
 a.6=AuPEI₈₀₀CD/ pCS2/ Pep
 a.7= pCS2 - Pep-DNaza
 a.8= pCS2
 L=Ladder

 b.1=AuPEI_{25k}CD-Pep/ pCS2 -DNaza
 b.2=AuPEI_{25k}CD-Pep/ pCS2
 b.3=AuPEI_{2k}CD-Pep/ pCS2 -DNaza
 b.4=AuPEI_{2k}CD-Pep/ pCS2
 b.5=AuPEI₈₀₀CD-Pep/ pCS2-DNaza
 b.6=AuPEI₈₀₀CD-Pep/ pCS2
 b.7= pCS2 -DNaza
 b.8= pCS2
 L=Ladder

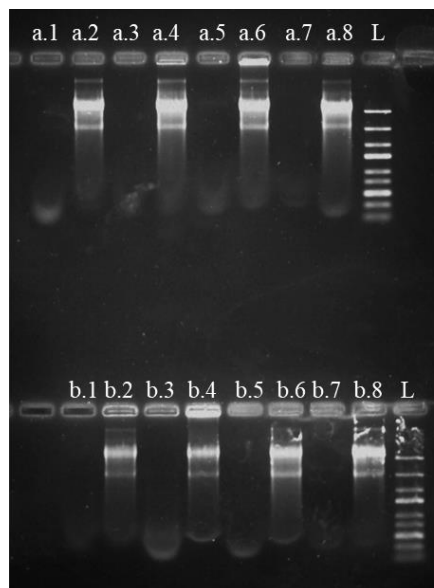
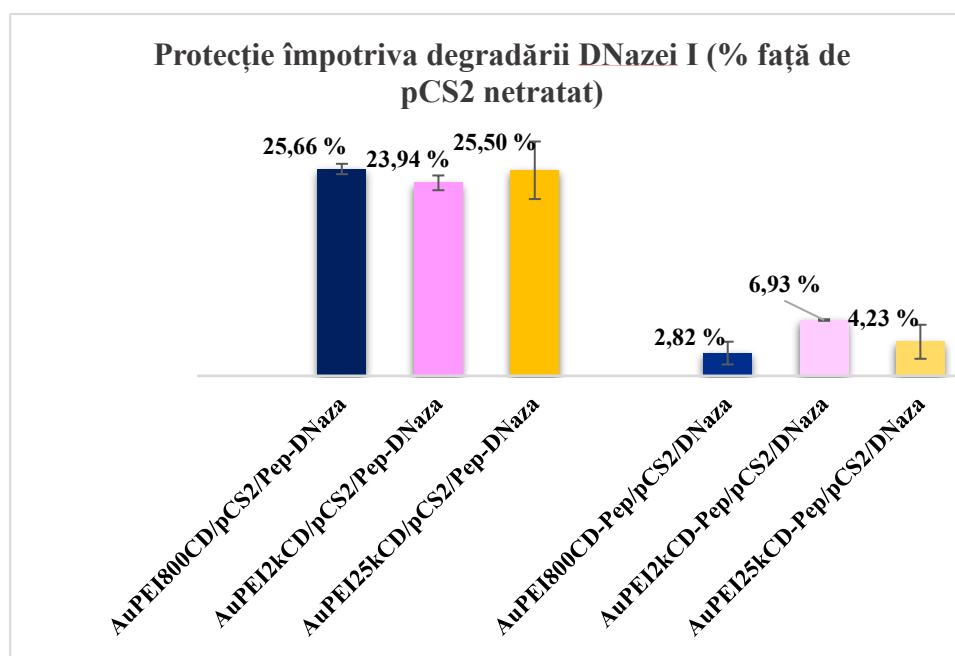


Figura IV.11. Testul de protecție la acțiunea DNaze I, electroforeză reprezentativă în agaroză a poliplecșilor cu pCS2+MT-Luc, (a) AuPEInCD/pCS2/Pep și (b) AuPEInCD-Pep/pCS2 incubăți în absența sau în prezența DNazei I, pCS2+MT-Luc ca probă de control

Configurația structurală a vectorilor non-virali joacă un rol critic în protejarea componentelor terapeutice (ADN, peptide) față de degradarea enzimatică. Studiul a evidențiat că sistemul AuPEInCD/pCS2/Pep protejează pCS2 în proporție de 25,66%, 23,94%, 25,5% în ordinea creșterii masei moleculare, oferind o protecție enzimatică superioară față de AuPEInCD-Pep/pCS2 (2,68%, 2,82%, 6,93% în ordinea creșterii masei moleculare), datorită diferențelor în mecanismele de asamblare și organizare moleculară (**Figura IV.12**).

Figura IV.12.
 Cuantificarea totalului benzilor electroforetice ale plasmidului neîmpachetat și împachetat pentru AuPEInCD/pCS2/Pep și AuPEInCD-Pep/pCS2 supuse acțiunii DNazei I



IV.2.4. Eficiența *in vitro* a vectorilor non-virali

Eficiența transfecției a fost determinată pe liniile celulare HOS și MCF-7, utilizând pCS2+MT-Luc ca genă reporter (**Figura IV.13**). S-au utilizat două abordări diferite în formarea poliplexului: nanoparticulele marcate cu Pep au fost complexate cu ADN plasmidic (AuPEIn-CD-Pep/pCS2), nanoparticulele nemarcate au fost complexate cu ADN plasmidic și apoi a fost efectuată marcarea cu Pep (AuPEIn-CD/pCS2+Pep) (**Figura IV.13.a**).

Comparând eficiența transfecției în celulele MCF-7 pentru cele 2 variante experimentale, am observat că marcarea cu peptid (Pep) după formarea poliplexului a determinat o transfecție mai bună comparativ cu abordarea clasică.

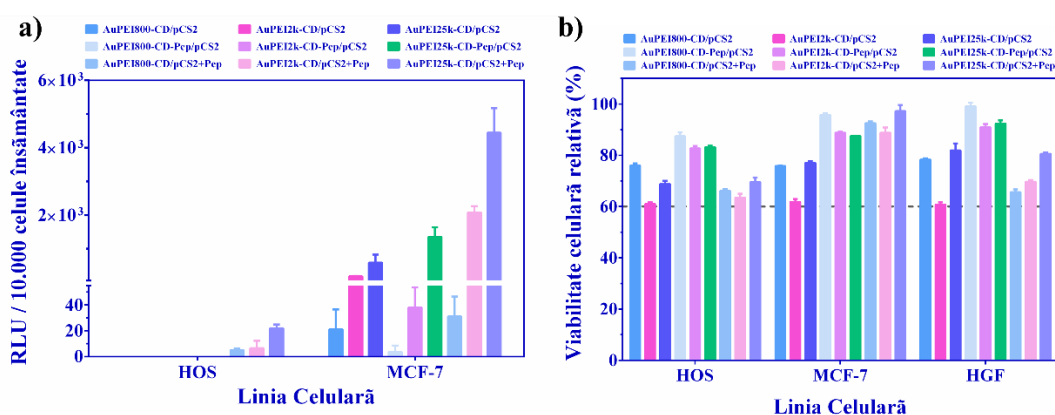


Figura IV.13. (a) Eficiența transfecției în celulele HOS și MCF-7 transfectate cu plasmidul pCS2+MT-Luc utilizând poliplecși la un raport N/P de 25. **(b)** Viabilitatea celulară a celulelor HOS, MCF-7 și HGF tratate cu poliplecși la un raport N/P de 25. Rezultatele sunt raportate ca % viabilitate pe baza celulelor de control netratate normalizate la 100% și sunt exprimate ca valoare medie $\pm$ deviația standard ($n=4$)

S-a observat o viabilitate celulară globală mai mare de 60% pentru toate complexele analizate, nanoparticulele marcate inducând o citotoxicitate mai scăzută în comparație cu cele nemarcate cu peptid (**Figura IV.11.b**).

Rezultatele sugerează că structura și compoziția vectorilor favorizează mecanisme celulare specifice de internalizare în aceste celule. În schimb, pentru liniile tumorale nespecifice, eficiența transfecției a fost considerabil redusă, ceea ce indică o capacitate de țintire selectivă a vectorilor, cu potențial de minimizare a efectelor adverse în celulele non-țintă.

CONCLUZII GENERALE

Contribuțiile persoanele prezentate în teza de doctorat „**Sisteme multicomponente pe bază de polimeri naturali și sintetici. Sinteză, caracterizare, aplicații**” au condus la următoarele concluzii generale pentru fiecare capitol:

Capitolul II.1

În acest capitol au fost proiectați, sintetizați și caracterizați vectori non-virali de tip AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA și AuNPs-**PEG**-PEI-PEG-GA, având la bază nanoparticule de aur funcționalizate cu polietilenglicol (PEG), polietilenimină (PEI) și glucozamină (GA).

Spectroscopia UV-Vis a confirmat prezența și stabilitatea nanoparticulelor prin benzile plasmonice caracteristice în intervalul 522–529 nm, iar concentrația lor a fost determinată cu ajutorul legii Lambert-Beer. Spectroscopia FTIR a susținut succesul funcționalizării chimice prin identificarea benzilor specifice fiecărui component al sistemului.

Caracterizarea fizico-chimică a vectorilor a evidențiat dimensiuni hidrodinamice corespunzătoare (369,6 nm și 386,8 nm), potențiale zeta negative ușor diferite și o morfologie sferică confirmată prin STEM și TEM, cu diametre medii ale nanoparticulelor și ale poliplecșilor compatibili cu utilizarea în livrarea genică.

Modelarea moleculară a confirmat influența arhitecturii polimerice asupra dimensiunilor finale ale vectorilor, în acord cu observațiile experimentale.

Capacitatea vectorilor de a proteja și elibera ADN-ul a fost evaluată prin tratamente cu DNA-aza I și SDS, relevând rate de eliberare diferențiate. Vectorul cu lanț polimeric extins (AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA) a oferit cea mai bună protecție împotriva degradării enzimatică, sugerând o structură mai compactă și stabilă a poliplecșilor. Această protecție s-a reflectat și în eficiența de transfecție evaluată prin testul Bright-Glo, unde același vector a înregistrat performanțe superioare în transfecția celulelor HeLa.

Testele toxicologice efectuate pe model animal au indicat o toxicitate scăzută, cu valori ale dozei letale medii (LD_{50}) de 6 mg/șoarece pentru vectorul extins și 1,90 mg/șoarece pentru cel simplificat, fără mortalitate sau semne clinice de toxicitate pe durata experimentului. Parametrii hematologici și biochimici au rămas în limite fiziologice, fără alterări semnificative ale funcției hepatice sau renale. De asemenea, răspunsul imun generat a fost moderat, cu o creștere ușoară și

tranzitorie a nivelurilor de citokine inflamatorii (IL-6, TNF- α , IFN- γ) în grupul tratat cu AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA, sugerând o inflamație localizată și controlată.

Analizele histopatologice au susținut siguranța vectorilor, evidențiind regenerare hepatică fiziologică (prezența celulelor binucleate), în absența semnelor de degenerare, inflamație sistemică sau afectare morfologică a organelor interne (ficat, rinichi, plămâni, splină). Toate aceste rezultate confirmă potențialul ridicat al sistemului AuNPs-**PEG-PEG**-PEI-PEG-GA ca vector non-viral eficient, stabil și biocompatibil pentru livrarea plasmidelor, justificând continuarea evaluărilor in vivo avansate și a testelor preclinice extinse.

Capitolul II.2.

În acest capitol au fost sintetizați și caracterizați vectori pe bază de nanoparticule de aur funcționalizate cu PEG, PEI și glucozamină (GA), respectiv AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA, ulterior radiomarcați cu ^{99m}Tc și ^{68}Ga , în vederea evaluării potențialului lor ca agenți de imagistică moleculară și vectori pentru livrare țintită. Confirmarea structurii chimice a precursorilor a fost realizată prin spectrometrie de masă ESI-MS, care a evidențiat masele specifice ale grupărilor GA și PEG, iar succesul funcționalizării nanoparticulelor a fost susținut prin spectroscopie FTIR și XPS, evidențiind prezența legăturilor Au-S, grupărilor amino, carbonil și epoxidice în etapele succesive de modificare.

Analiza morfologică prin STEM a arătat o creștere progresivă a dimensiunii nanoparticulelor odată cu adăugarea straturilor funcționale, de la 11,9 nm pentru AuNPs native, până la 26,5 nm pentru sistemul complet AuPEG-PEI-GA. Confirmarea compoziției chimice prin EDAX și identificarea elementelor-cheie (Au, C, N, O, S) au susținut succesul etapei de funcționalizare.

Radiomarcarea cu ^{99m}Tc a demonstrat randamente ridicate (>99% în primele 6 ore) și o stabilitate bună în timp, cu doar o ușoară scădere a eficienței după 22 de ore pentru AuPEG-PEI-GA/ ^{99m}Tc . Modificările semnificative ale potențialului zeta după radiomarcare au sugerat o interacțiune importantă între radionuclid și structura nanoparticulei, influențând încărcarea de suprafață și potențialul de stabilitate coloidală. Radiomarcarea cu ^{68}Ga a fost de asemenea eficientă, cu randamente de până la 100% și o stabilitate bună în funcție de raportul N/Ga, cu variații minime ale dimensiunilor nanoparticulelor, confirmând integritatea sistemului în condiții de marcaj radioactiv.

Spectroscopia FTIR a compușilor radiomarcați a indicat modificări structurale post-marcaj, în special pentru raportul optim N/Ga de 100/1. Evaluarea biocompatibilității prin teste *in vitro* pe culturi de fibroblaști a arătat o viabilitate celulară peste 70% pentru vectorii nemarcați, confirmându-le siguranța în condițiile testate. Radiomarcarea cu ^{68}Ga a crescut ușor citotoxicitatea la concentrații scăzute, sugerând că o doză optimă de 1 $\mu\text{g/mL}$ este recomandată pentru a minimiza efectele adverse, în timp ce marcajul cu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a fost mai bine tolerat, citotoxicitatea fiind observată doar la concentrații mai mari.

Studiile *in vivo* au demonstrat comportamente biologice diferite între radionuclizii liberi și vectorii conjugați. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ liber a prezentat captare specifică în tiroidă (prin transportorul NIS), în timp ce vectorii AuPEG-PEI și AuPEG-PEI-GA nu au evidențiat această acumulare, indicând o distribuție modificată și mai țintită. În cazul ^{68}Ga , forma liberă a arătat distribuție nespecifică extinsă în mai multe organe, în timp ce vectorii marcați au prezentat o distribuție redusă în majoritatea țesuturilor și o eliminare predominant renală, sugerând o cinetică favorabilă pentru aplicații imagistice non-invazive.

În ansamblu, datele obținute susțin validitatea platformei AuPEG-PEI-GA ca vector multifuncțional, cu potențial ridicat pentru aplicații de imagistică SPECT și PET, prezentând stabilitate chimică și coloidală, o eficiență ridicată a radiomarcării și a biocompatibilității.

Capitolul III.

În acest capitol au fost obținute și caracterizate două sisteme nanostructurate AuNPs-PEG-MTX și AuNPs-PEG-PEI-MTX printr-o strategie etapizată de funcționalizare a nanoparticulelor de aur cu PEG și PEI, urmată de conjugarea cu metotrexat (MTX).

Spectroscopia UV-Vis a confirmat prezența MTX prin apariția benzilor caracteristice la 259 nm și 303 nm, iar cuantificarea sa a evidențiat un grad de încărcare mai mare în cazul formulării AuNPs-PEG-MTX comparativ cu cea conținând și PEI.

Spectroscopia FTIR a validat structura chimică a conjugatelor, prin identificarea benzilor caracteristice suprapuse corespunzătoare fiecărei componente. Analiza dimensională a demonstrat dimensiuni medii mici, cu o polidispersitate scăzută, ceea ce sugerează o distribuție uniformă a nanoparticulelor. Spectroscopia XPS de înaltă rezoluție a confirmat prezența formelor Au(0) și Au(I) în toate sistemele, susținând stabilitatea și integritatea chimică a conjugatelor.

Evaluarea capacității antioxidante a indicat că AuNPs-PEG-MTX are activitate superioară față de toate celelalte formulări, inclusiv față de standardul de referință (NaLS), conform testelor

DPPH, FRAP și CUPRAC. Acest rezultat sugerează un rol sinergic al PEG și MTX în creșterea activității antioxidante a nanoparticulelor de aur.

Studiile *in vitro* pe celule umane sănătoase (HaCaT) au arătat o biocompatibilitate bună, fără efecte citotoxice notabile, atât pentru compușii intermediari, cât și pentru nanoparticulele finale. Testele efectuate pe linia celulară canceroasă CAL27 au evidențiat o reducere semnificativă a viabilității celulare, mai pronunțată în cazul formulării AuNPs-PEG-PEI-MTX, urmată de MTX liber și de sistemul AuNPs-PEG-PEI, sugerând o eficiență antitumorală crescută prin conjugarea metotrexatului pe un suport nanostructurat.

Testul Live/Dead a susținut aceste observații, indicând un raport net favorabil de celule viabile în cultura HaCaT, în contrast cu mortalitatea celulară crescută în cultura CAL27, consolidând astfel ipoteza selectivității și eficienței terapeutice potențiale a sistemului.

Aceste rezultate demonstrează că nanoparticulele de aur funcționalizate cu PEG, PEI și MTX prezintă stabilitate coloidală, activitate antioxidantă îmbunătățită, biocompatibilitate bună și potențial terapeutic antitumoral.

Capitolul IV.

În cadrul acestui studiu au fost sintetizați și caracterizați șase vectori non-virali bazați pe nanoparticule de aur și polietilenimină modificată cu ciclodextrină (CD) și peptid: AuPEI800CD, AuPEI2kCD, AuPEI25kCD și variantele lor funcționalizate cu peptide (AuPEI800CD-Pep, AuPEI2kCD-Pep, AuPEI25kCD-Pep). Acestea au fost dezvoltate în scopul livrării eficiente și selective a plasmidei pCS2.

Funcționalizarea chimică a fost confirmată prin spectroscopie RMN și FTIR, care au evidențiat atașarea cu succes a CD pe structura PEI, precum și modificările specifice ale grupărilor funcționale implicate. Datele RMN au indicat un grad diferit de substituție cu CD în funcție de masa moleculară a PEI, cu o densitate de substituție crescută (12 CD/moleculă) în cazul PEI25k, față de valorile scăzute (1 CD/moleculă) pentru PEI800 și PEI2k. Spectrometria de masă a confirmat structura așteptată pentru peptidul utilizat (Ad-PEG-Pep), validând succesul etapelor de sinteză intermediară.

Modificările fizico-chimice ale nanoparticulelor în urma funcționalizării au fost evidențiate de deplasarea benzii plasmonice în spectrele UV-Vis de la ~520 nm la ~530 nm, indicând o reorganizare a suprafeței în urma grefării peptidice.

Analizele de distribuție hidrodinamică și TEM au arătat că nanoparticulele au dimensiuni crescute odată cu creșterea masei moleculare a PEI și cu adăugarea peptidei, menținând însă o morfologie sferică regulată. Împachetarea cu plasmida pCS2 a determinat o compactare semnificativă a dimensiunilor, sugerând interacțiuni eficiente între componente.

Studiile de electroforeză pe gel de agaroză au fost esențiale în determinarea raporturilor N/P optime pentru legarea completă a pCS2, arătând variații în funcție de structura vectorului: valorile cele mai eficiente au fost obținute pentru PEI25k, în special în combinațiile post-funcționalizate cu peptidă.

În ceea ce privește protecția ADN-ului, sistemele în care peptidul a fost adăugat după formarea complexului AuPEInCD/pCS2 (și nu anterior) au oferit protecție superioară (23–26%), sugerând o organizare moleculară mai eficientă și o mai bună barieră împotriva agenților de degradare.

Evaluările de viabilitate celulară pe linia HaCaT au o viabilitate >60%. Citotoxicitatea testată pe linii celulare HGF și HOS a fost mai pronunțată în cazul vectorilor marcați cu peptid după complexare, comparativ cu cei funcționalizați anterior, sugerând o influență directă a organizării spațiale asupra comportamentului biologic.

În ceea ce privește eficiența transfectării, rezultatele au indicat o corelație directă între masa moleculară a PEI și capacitatea de livrare a pCS2, sistemul AuPEI25kCD/pCS2+Pep obținând performanțele cele mai bune, urmat de versiunile cu PEI2k și PEI800. Aceste observații susțin ideea că masa moleculară mai mare a PEI contribuie atât la un grad crescut de compactare, cât și la o interacțiune celulară mai eficientă.

În concluzie, vectorii dezvoltati demonstrează proprietăți structurale, biochimice și funcționale promițătoare, iar organizarea lor moleculară în special ordinea etapelor de funcționalizare influențează semnificativ eficiența de livrare și selectivitatea biologică.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate în jurnale științifice indexate ISI, ale căror rezultate au făcut conținutul tezei de doctorat:

1. Craciun BF, Clima L, **Bostiog DI**, Silion M, Calin M, Peptanariu D, Pinteala M. Multilayer gold nanoparticles as non-viral vectors for targeting MCF-7 cancer cells. *Biomaterials Advances*. **2023** Jan 1;144:213201. (IF = 5,5, Q1);
2. **Bostiog DI**, Simionescu N, Coroaba A, Marinas IC, Chifiriuc MC, Gradisteanu Pircalabioru G, Maier SS, Pinteala M. Multi-shell gold nanoparticles functionalized with methotrexate: a novel nanotherapeutic approach for improved antitumoral and antioxidant activity and enhanced biocompatibility. *Drug Delivery*. **2024**, 31(1):2388624. (IF = 6,5, Q1).
3. Uritu CM, Al-Matarneh CM, **Bostiog DI**, Coroaba A, Ghizdovat V, Filipiuc SI, Simionescu N, Stefanescu C, Jalloul W, Nastasa V, Tamba BI. Radiolabeled multi-layered coated gold nanoparticles as potential biocompatible PET/SPECT tracers. *Journal of Materials Chemistry B*. **2024**;12(15):3659-75. (IF = 6,1, Q1);

Articole publicate în jurnale științifice indexate ISI, ale căror rezultate au fost conexe cu subiectul tezei de doctorat (aceste rezultate nu au fost incluse în conținutul tezei):

1. Boucekhhou Z, Hadj Ziane-Zafour A, Lupascu FG, Profire BȘ, Nicolescu A, **Bostiog DI**, Doroftei F, Dascalu IA, Varganici CD, Pinteala M, Profire L. Binary and Ternary Inclusion Complexes of Niflumic Acid: Synthesis, Characterization, and Dissolution Profile. *Pharmaceutics*. **2024** Sep 9;16(9):1190. (IF= 4,9).

În perioada studiilor doctorale, studenta-doctorandă Boștiog Denisse-Iulia a fost membră din echipa de implementare a următoarelor proiecte:

1. „Versatile molecular vectors with tailored carrying and actuating abilities, dedicated to gene and drug delivery in fight against cancer (**TM-Vector**)”, PN-III-P4-ID-PCE-2020-1523;
2. „Intelligent systems for cancer diagnosis and treatment (**IntelDots**)”, PNRR-III-C9-2022 – I8;
3. „Multifunctional hybrid 3D architectures based on hollow GaN nano-micro-tetrapods for advanced application (**MultiPodGaN**)”, PNRR-III-C9-2023-I8.

Stagii de cercetare / mobilități realizate în perioada studiilor doctorale:

1. Stagiul de cercetare la Estonian University of Life Sciences, în perioada 01.10.2023 - 31.10.2023 (0 luni) în cadrul proiectului HORIZON-MSCA-2021-SE-01, *VOLATEVS* No 101086360;
2. A treia ediție a Școlii de Formare în Spectroscopie SENSORFINT, desfășurată în perioada 3-5 iulie 2024, la Universitatea de Economie și Afaceri din Poznań.

Participări la manifestări științifice internaționale/naționale:

Comunicări orale

1. Multi-shell gold nanoparticles functionalized with methotrexate for targeted therapy of breast cancer; **D. I. Bostiog**, N. Simionescu, M. Pinteala. *14th International Conference on Physics of Advanced Material (IPCAM-14)*, Dubrovnik, Croatia; 8-15 Septembrie **2022**;
2. Methotrexate-functionalized multi-shell gold nanoparticles for drug delivery applications; **D.I. Bostiog**, N. Simionescu, B. F. Craciun, M. Pinteala; *XXXIIIth edition of the International Congress of "Apollonia" University of Iasi. By promoting excellence, we prepare the future*, 2-5 Martie **2023**;
3. Innovations in Cancer Imaging and Therapy: The Role of Nanoparticles and Radiotracers; **D.I. Bostiog**, C. M. Uritu, C.M. Al-Matarneh, A. Coroaba, V. Ghizdovat, S. I. Filipiuc, B. I. Tamba, C. Stefanescu, V. Nastase, M. Pinteala. *12th International Symposium on Polyimides & High Performances Materials STEP12*, Montpellier 4-7 Iunie **2023**.

Postere

1. Investigations on the layer by layer multi-shell gold nanoparticles functionalization for the development of effective non-viral gene vectors; **D. I. Bostiog**, B. F. Craciun, E. L. Ursu, Peptanariu, M. Pinteala. *D. 7th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN)*, Mugla, Turkey; 22-28 April **2022**;
2. Obtaining and comprehensive analysis of polymeric-based carbon nanostructures. **D.I. Bostiog**, B.F. Craciun, N. Simionescu, N.L. Marangoci, M. Pinteala; *Conferința Internațională 30th edition of PolyChar World Forum on Advanced Materials PolyChar'30*, Iași România, 11-13 septembrie **2024**.

Resurse bibliografice selective

Balasubramanian, S.K. *et al.* (2010) 'Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats', *Biomaterials*, 31(8), pp. 2034–2042. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.079>.

Bhamidipati, M. and Fabris, L. (2017) 'Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry', *Bioconjugate Chemistry*, 28(2), pp. 449–460. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00605>.

Bostiog, D.I. *et al.* (2024) 'Multi-shell gold nanoparticles functionalized with methotrexate: a novel nanotherapeutic approach for improved antitumoral and antioxidant activity and enhanced biocompatibility', *Drug Delivery*, 31(1), p. Available at: <https://doi.org/10.1080/10717544.2024.2388624>.

Chen, G. *et al.* (2016) 'Peptide-Decorated Gold Nanoparticles as Functional Nano-Capping Agent of Mesoporous Silica Container for Targeting Drug Delivery', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(18), pp. 11204–11209. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02594>.

Craciun, B.F. *et al.* (2023) 'Multilayer gold nanoparticles as non-viral vectors for targeting MCF-7 cancer cells', *Biomaterials Advances*, 144(October 2022), p. 213201. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213201>.

Ferreira, D. *et al.* (2020) 'Gold nanoparticles for vectorization of nucleic acids for cancer therapeutics', *Molecules*, 25(15). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25153489>.

Medici, S. *et al.* (2021) 'Gold nanoparticles and cancer: Detection, diagnosis and therapy', *Seminars in Cancer Biology*, 76(May), pp. 27–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.017>.

Niu, J. *et al.* (2017) 'Transdermal Gene Delivery by Functional Peptide-Conjugated Cationic Gold Nanoparticle Reverses the Progression and Metastasis of Cutaneous Melanoma', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(11), pp. 9388–9401. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16378>.

Qiu, J.M. and DelVecchio Good, M.J. (2021) 'Making the best of multidisciplinary care for patients with malignant fungating wounds: A qualitative study of clinicians' narratives', *Palliative medicine*, 35(1), pp. 179–187. Available at: <https://doi.org/10.1177/0269216320966498>.

Singh, P. *et al.* (2024) ‘Advanced Nanomaterials for Cancer Therapy: Gold, Silver, and Iron Oxide Nanoparticles in Oncological Applications’, *Advanced Healthcare Materials*, 2403059. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.202403059>.

Sudimack, J. and Lee, R.J. (2000) ‘Targeted drug delivery via the folate receptor’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41(2), pp. 147–162. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00062-9).

Tran, N.T.T. *et al.* (2013) ‘Synthesis of methotrexate-conjugated gold nanoparticles with enhanced cancer therapeutic effect’, *Biochemical Engineering Journal*, 78, pp. 175–180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.017>.

Uboldi, C. *et al.* (2009) ‘Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441’, *Particle and Fibre Toxicology*, 6, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-18>.

Uritu, C.M. *et al.* (2024) ‘Radiolabeled multi-layered coated gold nanoparticles, as potential biocompatible PET/SPECT tracers’, *Journal of Materials Chemistry B* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1039/d3tb02654j>.

Vasiliu, T. *et al.* (2021) ‘In silico study of PEI-PEG-squalene-dsDNA polyplex formation: The delicate role of the PEG length in the binding of PEI to DNA’, *Biomaterials Science*, 9(19), pp. 6623–6640. Available at: <https://doi.org/10.1039/d1bm00973g>.