

# **Actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice în procesul de distrugere a celulelor canceroase**

**- Rezumatul tezei de doctorat -**

**Doctorand:**

**Anca Emanuela MINUTI**

**Conducător științific:**

**Prof. Dr. habil. Emilia Dorina CREANGĂ**

**IAȘI – 2023**

## **Mulțumiri**

Cu ocazia finalizării studiilor doctorale, doresc să adresez respectuoase mulțumiri domnului prof. dr. Horia Chiriac pentru direcția de cercetare propusă și atenta coordonare care a condus la obținerea de rezultate remarcabile

Adresez mulțumiri doamnei prof. dr. habil. Emilia Dorina Creangă pentru îndrumare, sprijin și încrederea acordată de-a lungul întregii perioade de pregătire a doctoratului și de elaborare a tezei.

Deosebite mulțumiri adresez doamnei CS I dr. Nicoleta Lupu pentru permanenta îndrumare și susținere acordată de-a lungul perioadei de elaborare a acestei lucrări.

Cu deosebită considerație, adresez sincere mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare, doamnei CS I dr. Nicoleta Lupu, domnului prof. dr. habil. Silviu-Octavian Gurlui și domnului prof. dr. habil. Dan-Gheorghe Dimitriu, pentru încurajare și pentru sfaturile constructive oferite pe parcursul stagiului doctoral.

De asemenea, doresc să-mi exprim gratitudinea față întreg colectivul din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică –IFT Iași, în special doamnei CS III dr. Mihaela Lostun, dr. CS III Luminița Lăbușcă și domnului CS III dr. Dumitru-Daniel Herea.

De asemenea, mulțumesc colegilor din cadrul INCDFIT-Iași care au fost în permanență aproape de mine, m-au susținut și mi-au oferit sprijin tehnic pentru obținerea rezultatelor.

În final, doresc să mulțumesc familiei și prietenilor pentru susținere și sprijin moral necondiționat acordat pe durata studiilor doctorale.

## Listă de abrevieri

MNP	Nanoparticule magnetice
Fe	Fier
Cr	Crom
Nb	Niobiu
B	Bor
OS	Osteosarcom
ADSC	Celule stem derivate din țesut adipos
FB	Fibroblaști umani normali
MMA	Actuare magneto-mecanică
HR-SEM	Microscopia electronică de baleiaj de înaltă rezoluție
HR-TEM	Microscopia electronică de transmisie de înaltă rezoluție
AO	Acid oleic
MTT	Test de viabilitate (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazoliu)
HM	Hipertermia magnetică
RMN	Rezonanță magnetică nucleară
mT	MiliTesla
O	Oxigen
OH	Hidroxil
SPION	Nanoparticule de oxid de fier superparamagnetice
SAF	Particule sintetice antiferomagnetice
Co	Cobalt
Ni	Nichel
Ru	Ruteniu
Pt	Platină
NF	Nanofirele magnetice
FF	Ferofluid
PS	Nanoparticule de polistiren
BPR	Ball to powder ratio (raportul bile/pulbere)
XRD	Difracția de raze X
FTIR	Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier
VSM	Magnetometria cu probă vibrantă
DLS	Dispersia dinamică a luminii
R <sub>H</sub>	Raza hidrodinamică a particulei
DMSO	Dimetilsulfoxid
ROS	Specii reactive de oxigen
HCl	Acid clorhidric
NaOH	Hidroxidul de sodiu
KMnO <sub>4</sub>	Permanganat de potasiu
FeCl <sub>3</sub>	Clorura de fier (Fe <sup>3+</sup> )
PBS	Tampon fosfat salin
EthD-1	Ethidium Homodimer-1

## Cuprins

Listă de abrevieri.....	3
Introducere.....	6
<b>CAPITOLUL 1. Date generale despre actuarea magneto-mecanică și particulele magnetice utilizate în realizarea acesteia .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Noțiuni introductive .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Tipuri de particule magnetice utilizate în actuarea magneto-mecanică.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Oxizi de fier .....	11
1.2.2. Particule sub formă de disc.....	11
1.2.3. Nanofire .....	11
1.2.4. Particule cu forme paralelipipedice .....	12
<b>1.3. Metode de obținere a nanoparticulelor magnetice .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Funcționalizarea nanoparticulelor magnetice .....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Stabilizatori monomerici.....	13
1.4.2. Stabilizatori anorganici.....	13
1.4.3. Stabilizatori polimerici.....	13
<b>1.5. Influența dimensiunii și formei nanoparticulelor magnetice asupra actuării magneto-mecanice</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Efectul frecvenței și amplitudinii câmpului magnetic asupra mișcării particulelor magnetice ....</b>	<b>14</b>
<b>CAPITOLUL 2. Metode utilizate în realizarea acestei teze pentru obținerea și caracterizarea dimensională, structurală și magnetică a nanoparticulelor magnetice .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Prepararea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Metode de caracterizare a particulelor magnetice .....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Dispersia dinamică a luminii (DLS).....	18
2.2.2. Microscopie electronică.....	19
2.2.3. Difracția de raze X (XRD) .....	20
2.2.3. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) .....	20
2.2.4. Magnetometria cu probă vibrantă (VSM) .....	21
<b>2.3. Prepararea și caracterizarea ferrofluidului cu particule de tipul Fe-Cr-Nb-B .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Instalația utilizată pentru realizarea actuării magneto-mecanice .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLUL 3. Evaluarea eficienței utilizării particulelor magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B în distrugerea celulelor canceroase .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Evaluarea citotoxicității pe culturi de celule normale și canceroase.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Efectul actuării magneto-mecanice produs de particulele magnetice de Fe-Cr-Nb-B asupra celulelor normale și tumorale .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Evaluarea cantitativă și calitativă a prezenței nanoparticulelor magnetice în interiorul celulelor .....</b>	<b>28</b>

# Actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice în procesul de distrugere a celulelor canceroase. Teză de doctorat

---

3.3.1. Testul pentru determinarea cantității de particule internalizate de celulele ADSC și OS	28
3.3.2. Microscopia electronică utilizată pentru vizualizarea celulelor și a particulelor magnetice de pe suprafața și din interiorul celulelor.	29
3.4. Transportul și eliberarea particulelor magnetice de Fe-Cr-Nb-B utilizând celule stem adipoase	31
3.4.1. Motilitatea ADSC <i>in vitro</i> .	31
3.5. Evaluarea <i>in vitro</i> a distrugerii celulelor canceroase induse de particule Fe-Cr-Nb-B actuate magneto-mecanic	32
Concluzii	34
Bibliografie	38
Diseminarea activității științifice	44
A. Articole publicate în reviste cotate ISI din domeniul tezei	44
B. Articole publicate în reviste cotate ISI din domenii conexe tezei	44
C. Lucrări prezentate de autoarea tezei la conferințe	45
D. Lucrări prezentate de alți autori la conferințe	46
E. Capitole de carte	48

## **Introducere**

Cancerul este a doua cauză principală de deces la nivel global și este responsabil pentru aproape 10 milioane de decese doar în 2020. La nivel global, aproximativ 1 din 6 decese este cauzat de cancer.

În prezent, este practică o terapie combinată, de chirurgie și chimioterapie, pentru a crește șansele de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu această maladie. O alternativă a acestor tratamente, este utilizarea particulelor magnetice în terapii precum hipertermia magnetică sau actuarea magneto-mecanică.

Actuarea magneto-mecanică se bazează pe oscilațiile sau rotațiile spațiale ale particulelor magnetice care urmăresc cu exactitate câmpurile magnetice oscilante sau rotative. Se formează un cuplu magnetic prin care particulele magnetice pot lovi celulele din exterior sau după ce intră în celule, ducând la moartea acestora. Mărimea acestui cuplu depinde de caracteristicile magnetice - în special de magnetizare și susceptibilitatea magnetică, dar și de dimensiunea și forma particulelor.

Această teză are ca scop sinteza, caracterizarea și testarea unor particule magnetice de tip Fe-Cr-Nb-B, cu aplicații în terapia cancerului, plecând de la experiența existentă în cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică - IFT Iași [1]. În acest sens, au fost sintetizate particule magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B prin măcinare mecanică folosind o moara cu bile. Ulterior sintetizării, particulele au fost spălate și resuspendate sub forma unui ferofluid în gluconat de calciu pentru a crește stabilitatea particulelor în suspensie și gradul de biocompatibilitate în contact cu celulele. Particulele obținute au fost caracterizate din punct de vedere al formei, dimensiunii, compoziției și magnetizării. În testarea acestora am optat pentru celulele de osteosarcom (OS) deoarece, asemenea multor tipuri de celule canceroase, ele prezintă o rezistență ridicată la chimioterapie și o adaptabilitate crescută la modificările din mediul biologic. Au fost realizate teste de verificare a citotoxicității acestora, de evaluare a gradului de internalizare în celule și de evaluat condițiile în care pot fi utilizate în terapia cancerului prin actuare magneto-mecanică. Au fost stabilite condițiile de actuare magnetică (durata de actuare, concentrație particule, interval de repetare) care conduc la eficiența maximă a acestor tratamente asupra distrugerii celulelor canceroase. Pentru a putea fi folosite la distrugerea celulelor canceroase de la nivelul tumoral am urmărit stabilirea unei forme de livrare a particulelor magnetice la locul de formare a țesutului canceros, utilizând celule stem derivate din țesut adipos (ADSC), urmat de metoda de aplicare a actuării magneto-mecanice asupra celulelor de osteosarcom ce au internalizat particulele magnetice eliberate de ADSC. În final, au fost realizate teste pentru a evalua eficiența transportului de particule magnetice către celulele de osteosarcom,

evaluarea internalizării de către celulele transportatoare și celulele țintă, precum și evaluarea efectelor cauzate de actuarea magneto-mecanică a acestor particule magnetice.

Prezenta lucrare este structurată în trei capitole, concluzii și bibliografie.

**Primul capitol** al acestei lucrări conține informații privind particulele magnetice utilizate în actuarea magneto-mecanică. Astfel, sunt prezentate date despre tipul de particule folosite în această aplicație, metodele de obținere ale acestora, precum și procedeele de funcționalizare ale acestora. Sunt prezentate date despre influența dimensiunii și formei particulelor magnetice asupra în actuarea magneto-mecanică. Ultima parte a acestui capitol prezintă efectul frecvenței și amplitudinii câmpului magnetic asupra mișcării particulelor magnetice.

**Al doilea capitol** constă din prezentarea metodelor utilizate de noi în cadrul acestei teze pentru obținerea și caracterizarea dimensională, structurală și magnetică a particulelor magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B. Astfel, în primul subcapitol este prezentat procedeul de obținere, de la prepararea aliajului cu compoziția  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$ , prepararea benzilor precursorare în stare amorfă, măcinarea acestora folosind mori cu bile și prepararea ferrofluidului pe bază de particule Fe-Cr-Nb-B. Particulele obținute au fost caracterizate din punct de vedere dimensional, folosind dispersia dinamică a luminii, care evidențiază că particulele au dimensiuni între 20 și 300 nm, având diametrul mediu de 106 nm. Pentru a corobora aceste rezultate, au fost realizate imagini cu particulele magnetice folosind microscopia electronică de baleiaj, imagini care prezintă particule cu dimensiuni sub 200 nm. A fost analizată și suprafața particulelor măcinate prin intermediul spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier, rezultate ce confirmă compoziția aliajului utilizat în obținerea acestor particule magnetice, dar și absența oxidării ce afectează adesea procesele de sinteză a multor tipuri de particule magnetice ce conțin fier. În final au fost realizate teste de evaluare a magnetizării particulelor, magnetizația de saturație fiind de 90 emu/g, caracteristică importantă în utilizarea particulelor magnetice în realizarea actuării magneto-mecanice.

**Capitolul 3** al acestei lucrări conține rezultatele testelor realizate privind interacțiunea dintre celule și particulele magnetice în absența sau prezența unui câmp magnetic rotitor. În acest sens am realizat teste de evaluare a biocompatibilității particulelor magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B în diferite concentrații și intervale de timp de incubare. Astfel, am cuantificat viabilitatea celulelor de osteosarcom (OS), ADSC și fibroblaști umani normali (FB) atât la 24 de ore de co-incubare cu particulele magnetice cu concentrații de 0,5, 1 și 2 mg/ml, cât și la 10 zile de co-incubare. În toate cazurile amintite anterior viabilitatea celulară depășește 100%, fapt ce indică biocompatibilitatea acestor nanomateriale.

În continuare a fost evaluat efectul actuării magneto-mecanice asupra celulelor de osteosarcom în prezența mai multor concentrații de particule magnetice. S-a arătat că o concentrație de 1 mg/ml induce scăderea cea mai semnificativă a viabilității celulare atunci când proba este actuată magneto-mecanic 30 minute într-un câmp magnetic rotativ de intensitate 8mT și frecvența de 2 Hz. Ulterior au fost prezentate testele realizate folosind concentrația de 1 mg/ml de MNP (nanoparticule magnetice), pentru a verifica care este cel mai eficient mod de a realiza actuarea magneto-mecanică, la cât timp după incubarea celulelor cu MNP și de câte ori este necesară aplicarea acestuia pentru a reduce viabilitatea la valori minime. Astfel, testele au evidențiat că este necesară realizarea de două acțiuni magneto-mecanice timp de 30 minute, la 24 de ore de la incubarea cu MNP, la intervale de 24 de ore între tratamente pentru ca viabilitatea celulelor de osteosarcom să fie redusă la 4,2%. Studiul a continuat în aceleași condiții de testare pentru celulele ADSC, celule ce urmează a fi folosite ca transportatori ai MNP și celulele FB, celule de control, cu dezvoltare normală. S-a evidențiat că pentru ADSC viabilitatea a fost redusă la 2,4%, iar pentru FB, viabilitatea a scăzut la 76,6%.

În continuare ne-am axat pe celulele ADSC care sunt celule ce au demonstrat în numeroase studii o afinitate pentru zonele în care apar inflamații sau prezintă modificări ce afectează procesele biologice normale. Din acest motiv, ele reprezintă opțiunea cea mai adecvată în realizarea transportului particulelor magnetice spre țesutul canceros. Pentru a verifica calitatea de transportator al ADSC, dar și modul în care OS internalizează MNP, am realizat testul cu ferozină ce evaluează cantitativ prezența MNP în celule, și am arătat că ADSC internalizează aproximativ 1,1 ng MNP per celulă, comparativ cu OS ce internalizează aproximativ 0,3 ng MNP per celulă. De asemenea, am evaluat calitativ prezența MNP pe suprafața membranei celulare folosind HR-SEM și în interiorul acestora prin intermediul HR-TEM.

Deoarece ADSC vor fi folosite cu scopul de a transporta MNP spre celulele de osteosarcom, a fost evaluată abilitatea acestora, atât încărcate cu MNP, cât și în absența MNP, de a se deplasa către celulele de osteosarcom. Rezultatele indică faptul că ADSC încărcate cu MNP prezintă cea mai ridicată motilitate atunci când se deplasează către celulele de osteosarcom.

În final am evaluat prin multiple metode viabilitatea celulelor de osteosarcom după actuarea magneto-mecanică dublă în prezența MNP transportate de ADSC. În acest sens am realizat testul MTT, testul Live/Dead și testul de evaluare a markerilor apoptotici - caspază 3/7. Pentru aceste ADSC, încărcate cu 1 mg/ml de MNP au fost adăugate peste cultura de OS sau FB și actuate magneto-mecanic pentru a elibera particulele magnetice. După 24 de ore, interval de timp suficient pentru ca OS/FB să internalizeze particulele eliberate de ADSC, probele cu OS/FB și MNP au fost actuate magneto-mecanic și evaluate. Testele de viabilitate și testul Live/Dead evidențiază eficiența acestei metode de



## **Actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice în procesul de distrugere a celulelor canceroase. Teză de doctorat**

---

a induce moartea celulelor OS, viabilitate care ajunge la 21,5% și de a nu afecta țesutul normal, care ar înconjura țesutul tumoral. S-a arătat că viabilitatea fibroblaștilor în acest caz este de 96,8%. Totodată a fost evaluată și prezența markerilor apoptotici, care apar cu prevalență în cazul probelor cu celule OS și MNP actuate magneto-mecanic și a celulelor OS cu MNP eliberate de ADSC, actuate magneto-mecanic, în restul cazurilor, valorile fiind apropiate de cele de control.

A rezultat că actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice de tip Fe-Cr-Nb-B reprezintă o metodă eficientă de distrugere a celulelor de osteosarcom fără a afecta celulele sănătoase care le înconjoară.

# CAPITOLUL 1. Date generale despre actuarea magneto-mecanică și particulele magnetice utilizate în realizarea acestora

## 1.1. Noțiuni introductive

Metodele convenționale de tratament al cancerului (chirurgie, chimioterapie, radioterapie împreună cu imunoterapia) au fost îmbunătățite constant în ultimele decenii, crescând ratele de supraviețuire, precum și calitatea vieții pacienților oncologici [2]. Cu toate acestea, limitări majore, cum ar fi recidivele tumorale și o mare varietate de efecte secundare specifice acestor tratamente încă reprezintă o problemă pentru metodele terapeutice convenționale. Nanotehnologia și în special utilizarea micro și nanoparticulelor magnetice (MNP) au un potențial crescut de a fi utilizate ca platforme multifuncționale în diagnosticul și terapia cancerului [3].

Utilizarea nanomaterialelor este avantajoasă datorită posibilităților de modificare a dimensiunilor, formei și suprafeței. Ca rezultat, au o stabilitate ridicată, o capacitate mare de transport, posibilitatea de a încorpora atât substanțe hidrofile cât și hidrofobe, precum și compatibilitate cu diferite căi de administrare - factori care le transformă în agenți foarte atractivi în multe aspecte ale medicinei [4]. O atenție deosebită se acordă nanoparticulelor magnetice (MNP) pentru proprietățile lor magnetice, ce pot fi utilizate în imagistică medicală ca agent de contrast pentru localizarea și diagnosticarea cancerului, precum și sisteme adecvate de administrare a medicamentelor sau terapeutice pentru tratamentul tumorilor. În mod particular, nanoparticulele de oxid de fier (magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sau maghemită  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) au fost promovate ca fiind printre cei mai buni candidați pentru diagnosticarea cancerului (RMN) și terapie (hipertermie, transport activ de medicamente și terapie genică) datorită biocompatibilității și biodegradabilității [5]. Alte tipuri de particule testate pentru terapia cancerului includ particule în formă de disc obținute prin tehnici de subțiere în vid, urmate de litografie [6] și nanofire de nichel sau alte aliaje obținute prin depunerea electrolică în membrane cum ar fi cele de alumina [7], și nu în ultimul rând, particule magnetice obținute prin măcinare mecanică din precursori cum sunt benzile amorfe din diferite aliaje feroase.

Distrugerea celulelor canceroase prin actuare mecanică, implică rotirea particulelor magnetice în interiorul tumorilor sau în experimentele *in vitro*, în spațiul în care celulele canceroase sunt plasate în mediul de cultură, sub acțiunea unui câmp magnetic rotitor de frecvență joasă (2 Hz) și de valoare relativ mică (8mT). Eficiența acestui proces depinde de mărimea cuplului mecanic ce se comunică

particulelor, de câmpul magnetic în rotație și respectiv de mărimea forțelor mecanice cu care aceste particule lovesc celule din exterior sau după interiorizarea lor în celule, asupra componentelor celulare. Mărimea cuplului mecanic este cu atât mai mare cu cât valoarea magnetizării de saturație a particulelor este mai mare și cu cât mai mare este anizotropia magnetică a acestor particule. Anizotropia magnetică provine în mare măsură din anizotropia de formă a particulelor. Din acest motiv este de dorit ca particulele magnetice să nu fie sferice ci să aibă o formă paralelipipedică. Particulele magnetice trebuie să aibă o temperatură Curie peste 60 °C pentru a se putea folosi în condiții normale, de temperatură ambientală. Aceste condiții depind de compoziția aliajului pe de o parte și pe de altă parte de procesul de obținere a pulberilor prin măcinare mecanică, păstrarea naturii amorfe a materialului fiind o condiție esențială [9].

## **1.2. Tipuri de particule magnetice utilizate în actuarea magneto-mecanică**

### **1.2.1 Oxizi de fier**

Oxizii de fier sunt compuși bine cunoscuți și utilizați pe scară largă, fiind ușor de preparat în laboratoare industriale și de cercetare. În general, ei au în componență Fe, O și / sau OH, dar impuritățile sau adaosurile pot modifica compoziția lor, în timp ce procesele de oxidare pot induce diferite modificări la nivelul structurii. Din punct de vedere al magnetizării, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita) și γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemita) sunt cei mai importanți oxizi ai fierului. În plus față de magnetismul lor puternic, magnetita și maghemita s-au dovedit a fi biocompatibile, ceea ce a condus la utilizarea în diferite aplicații biomedicale. Acestea sunt utilizate fie în aplicații biomedicale *in vivo*, cum ar fi cele terapeutice (hipertermie și țintirea magnetică pentru administrarea de medicamente) fie în diagnosticare (imagistică prin rezonanță magnetică nucleară, actuare magneto-mecanică și sortare magnetică a celulelor) [11].

### **1.2.2. Particule sub formă de disc**

Pe lângă particulele magnetice de tip SPION sferice studiate pe scară largă în domeniul biomedical de zeci de ani, particulele în formă de disc, compuse din straturi feromagnetice, au devenit o direcție atent studiată. Acestea sunt obținute prin tehnicile microelectronicii, inclusiv fotolitografia și diverse tehnici de depunere precum pulverizarea, evaporarea, sau electrodepunerea.

### **1.2.3. Nanofire**

Nanofirele magnetice sau nanotuburile (NF) reprezintă o altă categorie de materiale magnetice cu posibilități de utilizare în terapia cancerului prin actuare magneto-mecanică. NF au o anizotropie de formă îmbunătățită, care tinde puternic să-și mențină momentul magnetic în paralel cu axa cilindricului și, astfel, poate produce un efect magneto-mecanic mai eficient. Magnetizarea remanentă

pe această axă ușoară poate fi aproape de 100% din magnetizarea lor de saturație  $M_s$ , în funcție de raportul diametru/lungime.

#### **1.2.4. Particule cu forme paralelipipedice**

Deși discurile, sferile și nanofirele sunt cele trei forme de particule cel mai frecvent utilizate pentru MMA, au fost testate și particule cubice de fier dopat cu zinc [22]. Autorii au observat o agregare a particulelor în formă de lanț în timpul aplicării câmpului magnetic, efectele lor asupra celulelor devenind similare cu al celor în formă de nanofire.

Ca o nouă abordare, particulele Fe-Cr-Nb-B produse prin măcinarea cu bile au fost utilizate la INCDFT pentru MMA [1]. Această tehnică de fabricație constă în măcinarea unor precursori, cum ar fi benzile amorfe, pentru a obține particule anizotrope de dimensiune nanometrică. Dimensiunea obținută poate fi cuprinsă între 10 și 200 nm. În plus, prezintă o remanență scăzută și o susceptibilitate ridicată.

Formele paralelipipedice ale MNP și superferomagnetismul aliajelor amorfe din care sunt alcătuite induc anizotropii importante de formă magnetică care, în asociere cu o magnetizare de saturație mare, generează un cuplu îmbunătățit într-un câmp magnetic rotativ, producând daune importante asupra viabilității celulare a celulelor canceroase. Parametrii specifici precum concentrația MNP, frecvența și intensitatea câmpului magnetic aplicat sau timpul de expunere au o influență puternică asupra viabilității celulelor canceroase. Comportamentul specific al particulelor magnetice Fe-Cr-Nb-B le oferă efect distructiv chiar și în câmpuri magnetice scăzute precum 10 Oe, iar această caracteristică permite utilizarea sistemelor de bobine care asigură spații experimentale mari [1].

Particulele magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B au coercivitate diferită de zero la temperatura camerei spre deosebire de coercivitate zero la temperatura camerei raportată în literatură pentru MNP superparamagnetice precum oxizii de fier de dimensiuni similare. Aceste particule prezintă magnetizare mare, susceptibilitate magnetică mare și temperatură Curie scăzută de aproximativ 47 °C ce poate fi controlată în funcție de conținutul de Cr din aliaj [24]. Acestea sunt potrivite și pentru aplicații de hipertermie magnetică, așa cum este descris în [1]. Procesul de preparare este controlabil și permite obținerea unor cantități mari de particule cu costuri reduse. Dimensiunea particulelor variază între 10 și 200 nm, în funcție de condițiile de măcinare, și prezintă forme nesferice și neregulate. Ele au formă paralelipipedică, așa cum se poate vedea în Figura 1. Particulele magnetice pot fi adăugate direct în culturile celulare sub formă de pulbere sau într-o suspensie sub formă de ferrofluid (FF). Avantajul utilizării FF pentru aplicații *in vitro* este dispersabilitatea bună a MNP în culturile celulare și prevenirea aglomerării lor [24].

### **1.3. Metode de obținere a nanoparticulelor magnetice**

Până în prezent, s-au dezvoltat diferite metode generale pentru sinteza particulelor magnetice:

1. **metode fizice** cum ar fi măcinarea mecanică a unui material precursor;
2. **metode chimice** cum ar fi coprecipitarea, electrodepunerea, microemulsii, descompunerea la temperaturi înalte a precursorilor organo-metalici;
3. **metode biologice** care utilizează microorganisme precum *Actinobacter* spp. și *Fusarium oxysporum* sunt utilizate cu succes pentru a produce magnetită [25].

### **1.4. Funcționalizarea nanoparticulelor magnetice**

Pentru a explora întregul potențial biomedical al nanoparticulelor în aplicații precum actuarea magneto-mecanică, hipertermia magnetică, imagistică nucleară este necesar controlul dispersiei MNP și interacțiunilor dintre MNP și alte molecule. Acest lucru se poate întâmpla numai prin modificarea adecvată a suprafeței MNP prin funcționalizarea suprafeței lor, care, la rândul său, îmbunătățește interacțiunea lor cu mediile înconjurătoare. Funcționalizarea MNP influențează în totalitate dispersia, stabilitatea coloidală și biocompatibilitatea. De exemplu, pentru aplicațiile biomedicale, funcționalizarea de suprafață cu diverse biomolecule poate oferi proprietăți suplimentare, precum internalizare celulară mai eficientă și biocompatibilitate mai ridicată dar și lipsa de toxicitate pe perioade îndelungate.

#### **1.4.1. Stabilizatori monomerici**

Printre cei mai întâlniți compuși legați pe suprafața MNP sunt cei care conțin grupe funcționale printre care sunt cele carboxilice (acidul citric, acidul gluconic, acidul dimercaptosuccinic), acizi sulfonici, acizii fosfonici sau gluconatul de calciu [38].

#### **1.4.2. Stabilizatori anorganici**

MNP pot fi acoperite cu diferite materiale anorganice precum silice, aur sau gadoliniu. Utilizarea unor astfel de stabilizatori oferă o bună stabilitate a nanoparticulelor magnetice în soluție și joacă un rol important în legarea liganzilor biologici de suprafața acestora.

#### **1.4.3. Stabilizatori polimerici**

În cazul stabilizatorilor polimerici, cei mai utilizați agenți de funcționalizare a MNP sunt alcoolul polivinilic, dextranul, și polietilenglicolul. În general, acești compuși sunt hidrofilici și biocompatibili, caracteristici ce îi face atractivi în funcționalizarea nanoparticulelor pentru aplicații biomedicale.

### **1.5. Influența dimensiunii și formei nanoparticulelor magnetice asupra actuării magneto-mecanice**

Particulele magnetice cu potențial în actuarea magneto mecanică, sunt cele care prezintă anizotropie de formă. În ultimii ani, au fost publicate numeroase studii privind efectul utilizării acestor particule în dezvoltarea terapiilor antitumorale. Dintre particulele ce prezintă anizotropie de formă amintim: nanocuburi, nanodiscuri, nanofire, nanoparticule alungite și particule cu forme neregulate. Pentru a fi utilizate în terapii mediate de MMA, parametri precum forma, dimensiunea și proprietățile magnetice ale MNP trebuie alese cu atenție, în vederea realizării unei sinergii cu frecvența și amplitudinea câmpului magnetic aplicat pentru a maximiza răspunsul mecanic al particulelor din țesutul biologic.

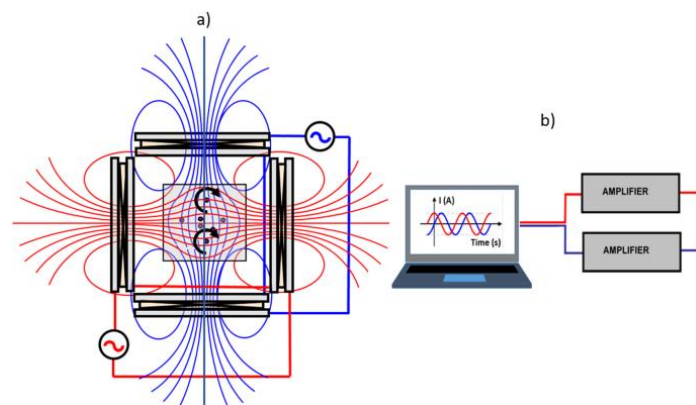
Pentru o gamă largă de tipuri de particule magnetice, dimensiunea și forma particulelor - în funcție de compoziția lor - sunt în mare măsură variabile. Acești parametri fizici au un impact semnificativ asupra interacțiunii cu mediul biologic și asupra MMA în sine. Mărimea și forma particulelor trebuie mai întâi alese pentru a satisface cerințele de bază ale biologiei, cum ar fi o dimensiune suficient de mică, și cele ale actuării magneto-mecanice, o rotație eficientă și o bună dispersie a particulelor în soluție.

### **1.6. Efectul frecvenței și amplitudinii câmpului magnetic asupra mișcării particulelor magnetice**

Pentru a induce o vibrație sau oscilație a particulelor, câmpul magnetic aplicat trebuie să fie în rotație, cu o amplitudine suficientă, de preferință apropiată de câmpul de saturație al particulelor. Alternativ, poate fi explorat și efectul forțelor magneto-mecanice statice în loc de oscilante aplicate pe membranele celulare, pentru a induce moartea celulelor, prin aplicarea unui gradient constant de câmp magnetic asupra particulelor legate de celule. Spre deosebire de hipertermie, care necesită frecvențe mari pentru a induce încălzirea (peste 100 kHz până la câțiva MHz), MMA poate fi realizat la frecvențe sub 100 Hz. În ceea ce privește caracteristicile particulelor, există o mare varietate de dispozitive și parametri aplicați a câmpului magnetic pentru a realiza actuare magneto-mecanică.

O metodă utilizată pe scară largă pentru aplicarea unui câmp magnetic alternativ celulelor constă în utilizarea bobinelor sau electromagneților. Câmpul poate fi aplicat cu un baston de fier plasat între godeurile unei plăci de cultură, înfășurată ea însăși cu sârmă de cupru, pentru a aplica un câmp de 90 Oe (=9 mT) [12]. Alternativ, placa de cultură poate fi plasată direct deasupra unei bobine. Kilinc și colab. au folosit un vârf de Fe-Co-V înfășurat cu o bobină de cupru pentru a aplica câmpul magnetic (amplitudinea nu este indicată) [61]. În acest din urmă caz, câmpul magnetic a fost aplicat foarte local

(500  $\mu\text{m}$  de la vârf). Câmpurile magnetice produse prin aceste trei metode sunt foarte neomogene și scad brusc în funcție de distanța de la sursa câmpului. O altă metodă propusă constă din introducerea probei în spațiul interior unei instalații cu miez de ferită în formă de U sau C supus curentului alternativ. Această tehnică a fost aleasă de D. Cheng și colab. [13] și folosită la frecvență foarte mare (35 kHz) pe celule în suspensie și plasate într-un tub căruia i se aplică un câmp de 1 mT și frecvența de 10 Hz. Cu această metodă, câmpul magnetic este omogen în centrul instalației, dar limitările vin din dimensiunea dispozitivului în comparație cu amplitudinea câmpului [14]. Într-o abordare diferită, celulele sau șoarecii sunt plasați direct în centrul solenoidului pentru a aplica un câmp de 100 Oe (=10 mT). Din nou, amplitudinea câmpului este foarte limitată [62]. Au mai fost folosite alte dispozitive comerciale compuse dintr-un sistem de inducție cu miez feromagnetic sau mai multe bobine. Câmpul produs de aceste sisteme creează un gradient care este fie folosit de unii autori, fie evitat prin poziționarea celulelor în raport cu geometria sursei câmpului.



**Figura 1.** (a) Câmpul magnetic rotativ produs de un curent alternativ aplicat în sistemul cu 4 bobine.

(b) Configurația pentru generarea de curent alternativ pentru alimentarea sistemului de bobine. [1]

Utilizarea bobinelor de dimensiune identică și număr par, plasate în jurul zonei de interes, creează un câmp destul de omogen în jurul planului de simetrie care le separă. Acest proces este realizat folosind bobine Helmholtz (Figura 1). Sistemul este format din patru bobine plasate în cruce, care poate produce fie un câmp magnetic variabil în timp care generează un gradient mare de câmp magnetic, fie un câmp magnetic rotativ (Figura 1-a). Mecanismul permite setarea intensității câmpului magnetic, frecvența acestuia și timpul de expunere. În centrul sistemului de bobine există un spațiu de aproximativ  $20\text{ cm}^3$  unde câmpul magnetic este uniform, iar plăcile de cultură celulară pot fi amplasate. Un dispozitiv care permite variația temperaturii este introdus pentru a modifica și menține temperatura dorită a plăcilor celulei. Sistemul de bobine este alimentat de două forme de undă care sunt generate folosind un cod realizat în LabView și o placă de achiziție (Figura 1-b). Formele de undă sunt defazate cu 90 de grade pentru a se potrivi cu aranjamentul ortogonal al sistemului de bobine, prin urmare

## **Actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice în procesul de distrugere a celulelor canceroase. Teză de doctorat**

---

câmpul magnetic rezultat se va roti cu frecvența formelor de undă. În funcție de scop, frecvența și amplitudinea formelor de undă pot fi ajustate într-o gamă largă de la mHz până la câțiva kHz. Semnalele generate la ieșirile analogice ale plăcii de achiziție sunt amplificate folosind două amplificatoare de putere identice. Sistemul generează câmpuri magnetice între 1 Oe și 20 Oe. [1] Dezavantajul acestei metode este încălzirea rapidă a bobinelor atunci când se aplică un curent mare, ceea ce necesită un sistem de răcire.



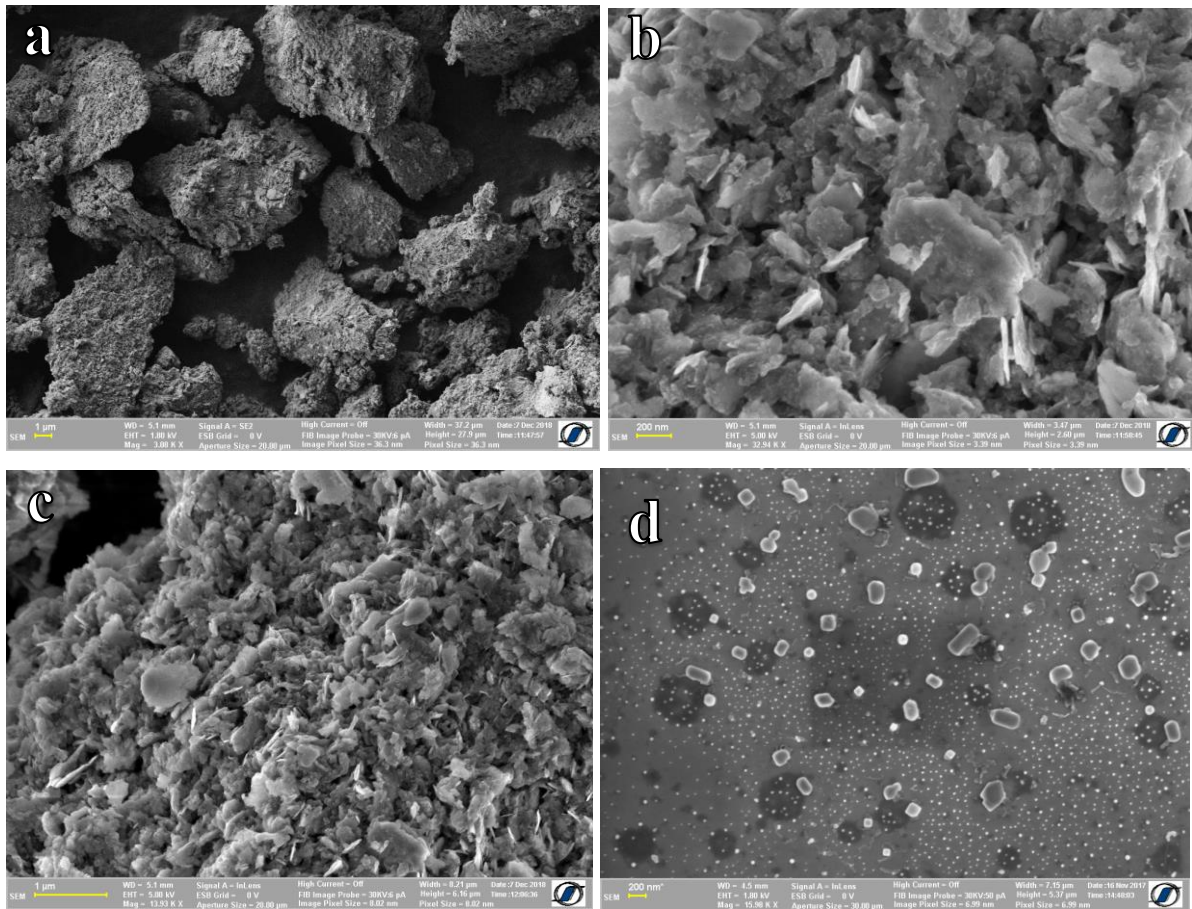
## CAPITOLUL 2. Metode utilizate în realizarea acestei teze pentru obținerea și caracterizarea dimensională, structurală și magnetică a nanoparticulelor magnetice

În ultimele decenii, principalele tipuri de terapii de cancer au fost chimioterapia, radioterapia și chirurgia. Modalități suplimentare, cum ar fi hipertermia magnetică sau actuarea magneto-mecanică, nu au reușit să devină un standard în terapia cancerului, deși au fost dovedite rezultatele pozitive în urma aplicării acestora *in vivo* și/sau *in vitro*. Particulele magnetice dezvoltate pentru aceste aplicații trebuie să prezinte anumite caracteristici fizico-chimice pentru a fi utilizate. În cadrul acestei teze ne-am ocupat de prepararea particulelor de tip Fe-Cr-Nb-B și de studiul procesului de distrugere a celulelor canceroase prin actuare magneto-mecanică. Am ales aliajul  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$  considerat potrivit pentru această aplicație.

### 2.1. Prepararea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B

Pentru a obține particulele magnetice ce pot fi utilizate în aplicații biomedicale, prin actuare magneto-mecanice asupra celulelor canceroase, sunt necesari următorii pași:

- prepararea aliajului cu compoziția  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$ ;
- prepararea benzilor amorfe prin răcirea rapidă din topitură;
- fragmentarea benzilor;
- realizarea unor tratamente termice de fragilizare a benzilor pentru ușurarea procesului de măcinare mecanică;
- măcinarea mecanică în mori cu bile;
- curățarea particulelor obținute în vederea procesului de evaluare dimensională, a caracteristicilor magnetice și pentru utilizarea lor în interacția cu celulele.



**Figura 2.** Imagini SEM cu particule magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B a) după 50 de ore de măcinare; b) după 100 de ore de măcinare; c) după 150 de ore de măcinare; d) după 300 de ore de măcinare înainte de spălare (rezultate proprii, nepublicate)

## 2.2. Metode de caracterizare a particulelor magnetice

Au fost folosite mai multe tehnici analitice cum ar fi dispersia dinamică a luminii, microscopia electronică de transmisie de înaltă rezoluție (HR-TEM), microscopia electronică de baleiaj de înaltă rezoluție (HR-SEM), difracția de raze X (XRD), spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și magnetometria cu probă vibrantă (VSM), pentru evaluarea formei, a distribuției dimensionale, a compoziției și caracteristicilor magnetice ale particulelor.

### 2.2.1. Dispersia dinamică a luminii (DLS)

După cum se observă în figura 5 diametrul particulelor este relativ mic, începând de la 20 nm până la 300 nm. Diametrul mediu al MNP este de 106 nm, iar majoritatea au între 60 și 100 nm în diametru. Sintetizarea particulelor magnetice prin măcinare mecanică conduce la obținerea unor probe cu o plajă mai largă de dimensiuni comparativ cu alte metode de sinteză, cum ar fi coprecipitarea

chimică. Pentru a putea obține particule magnetice cu dimensiuni nanometrice, de până la 200 nm, timpii de măcinare a benzilor amorfe precursorare sunt îndelungați, de până la 300 de ore.

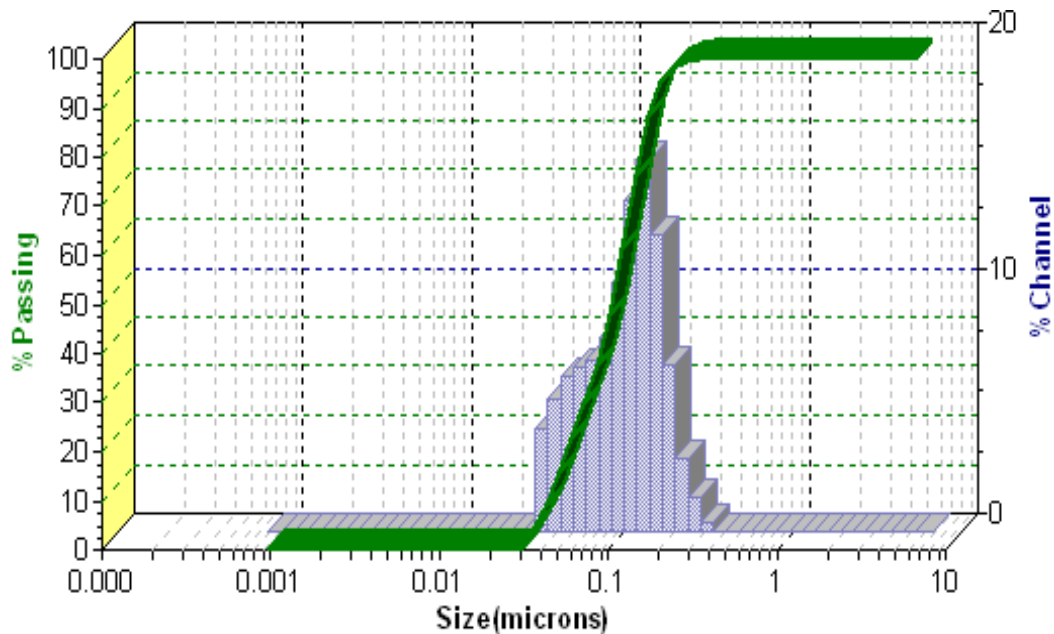


Figura 3. Distribuția dimensională a particulelor Fe-Cr-Nb-B (rezultate proprii, nepublicate)

### 2.2.2. Microscopie electronică

Microscopia electronică de baleiaj (HR-SEM)

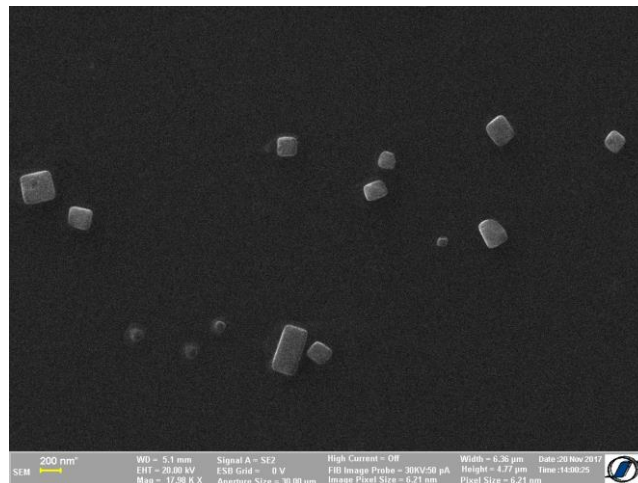
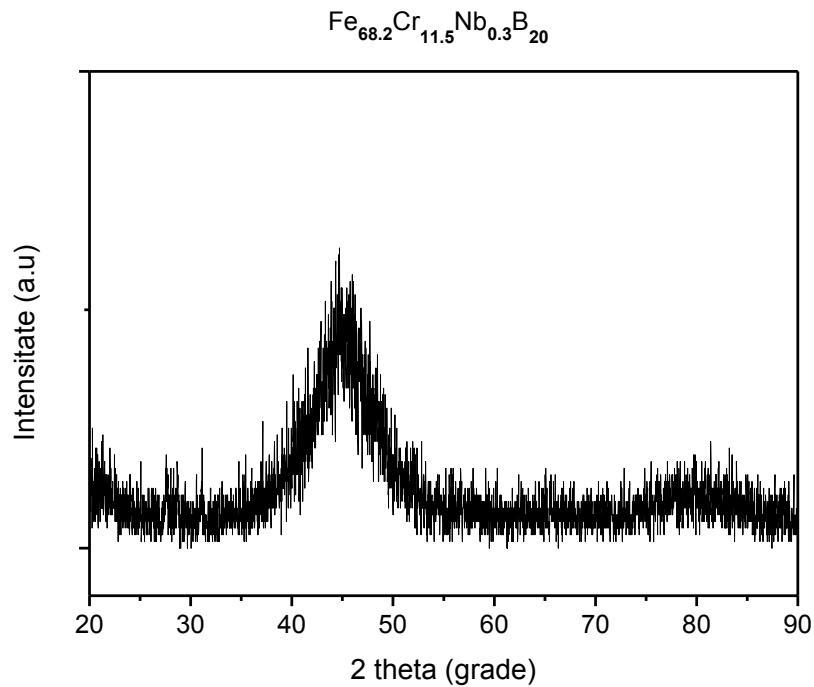


Figura 4. Imagine HR-SEM pentru particule  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$ . (rezultate proprii, nepublicate)

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) înregistrate pentru particulele magnetice obținute prezintă o formă definită, paralelipedică. Particulele magnetice din eșantion evidențiază un model cu o morfologie foarte uniformă, cu dimensiuni cuprinse între 30 și 100 nm.

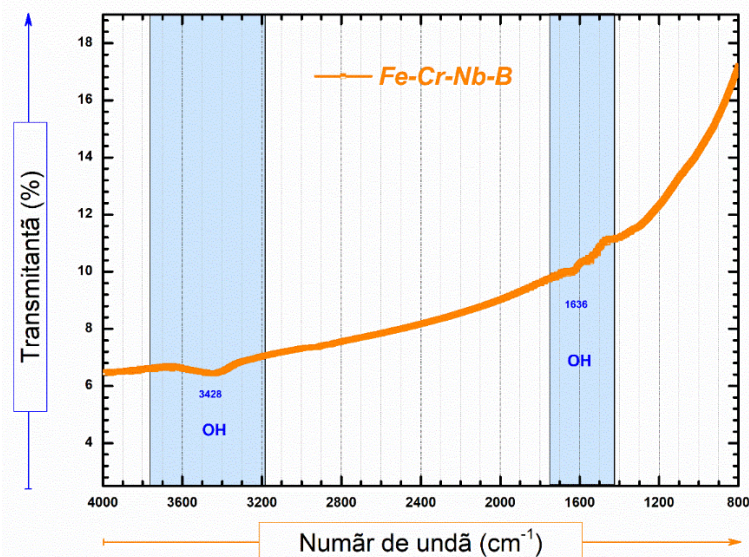
### 2.2.3. Difracția de raze X (XRD)



**Figura 5.** Curba de difracție pentru particulele magnetice obținute din aliaj cu conținut de Cr (rezultate proprii, nepublicate)

Figura 5 prezintă structura pulberilor de Fe-Cr-Nb-B măcinate în acid oleic. Se poate observa că structura amorfă a pulberilor se păstrează chiar și pentru un timp îndelungat de măcinare mecanică (300 de ore).

### 2.2.3. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

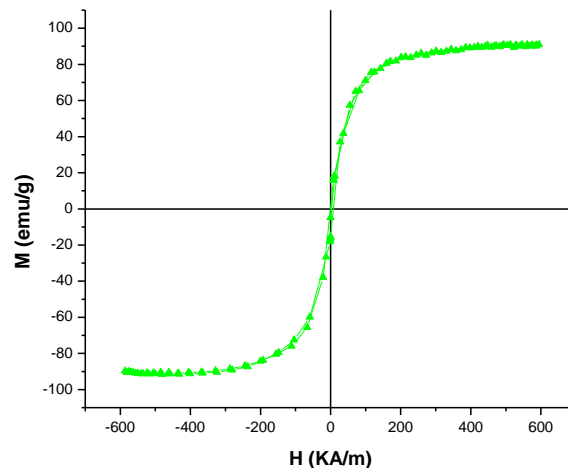


**Figura 6:** Spectrul FTIR caracteristic aliajelor Fe-Cr-Nb-B în domeniul numerelor de undă cuprins între 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  evidențiind vibrațiile distinctive (rezultate proprii, nepublicate)

Prin analiza spectrului FT-IR al aliajelor Fe-Cr-Nb-B prezentat în Figura 10, se pot identifica două vibrații specifice la 3428  $\text{cm}^{-1}$  și 1636  $\text{cm}^{-1}$ , care sunt atribuite moleculelor de apă. Este demn de menționat că în domeniul numerelor de undă mai mici de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , nu se observă vibrații de legătură, fapt ce confirmă absența oricărei forme oxidice care ar putea fi prezentă în urma proceselor anterioare.

#### **2.2.4. Magnetometria cu probă vibrantă (VSM)**

În Figura 7 este reprezentat ciclul de histerezis obținut în cazul particulelor cu  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$ . Se observă valoarea relativ mare a magnetizării de saturație (90 emu/g), valoarea redusă a câmpului coercitiv și a remanenței.

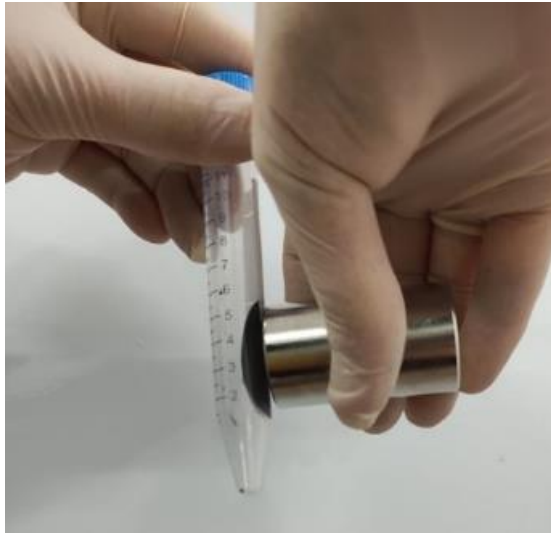


**Figura 7.** Ciclul de histerezis pentru particule cu compoziția  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$  (rezultate proprii, nepublicate)

### **2.3. Prepararea și caracterizarea ferrofluidului cu particule de tipul Fe-Cr-Nb-B**

Pentru obținerea ferrofluidului, 80 mg de Fe-Cr-Nb-B au fost spălate de 3 ori cu NaOH 5% pentru a îndepărta excesul de oleat de sodiu din procesul de măcinare, urmat de spălarea cu apă deionizată până la pH=7. Particulele magnetice sunt separate cu un magnet, iar apa este îndepărtată și înlocuită cu 1 ml soluție de gluconat de calciu, 94 mg/ml. Proba este ultrasonicată timp de 30 de minute la 80°C folosind o sondă de ultrasonicare. Ferrofluidul rezultat este sterilizat la 121°C timp de 30 de minute folosind un autoclav. Ulterior sterilizării, ferrofluidul poate fi folosit în contact cu mediul steril din mediul de cultură al celulelor.





**Figura 8.** Comportamentul ferofluidului în prezența unui magnet [24]

#### 2.4. Instalația utilizată pentru realizarea actuării magneto-mecanice

Pentru a realiza actuarea magneto-mecanică a particulelor de tip Fe-Cr-Nb-B a fost folosit un set-up pentru producerea unui câmp magnetic rotitor care sa permită controlul atât al intensității câmpului cât și al frecvenței de rotație pentru anumite perioade de timp prestabilite. Această instalație a fost proiectată, realizată și utilizată la INCDFT.



**Figura 9.** a) Set-up – experimental, vedere de ansamblu; b) Interfața utilizator (panou de control) [1]

Frecvența de rotație a câmpului magnetic generat de acest sistem este de 0,001 Hz, până la 20 kHz, iar amplitudinea câmpului rotitor rezultat este cuprinsă între 0 și 13,5 mT.

### **CAPITOLUL 3. Evaluarea eficienței utilizării particulelor magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B în distrugerea celulelor canceroase**

Utilizarea micro și nanoparticulelor magnetice prezintă un potențial crescut de a fi utilizate ca platforme multifuncționale în diagnosticul și terapia cancerului. Hipertermia magnetică și actuarea magneto-mecanică au fost recent recunoscute ca metode cu potențial ridicat pentru a crește eficiența și specificitatea terapiei tumorale. Procesul de actuare magneto-mecanică a particulelor magnetice cu scopul de a distruge celule canceroase, în cazul nostru osteosarcomul, necesită studiul tuturor parametrilor care intervin în acest proces. Astfel, au fost analizate cantitatea optimă de particule necesară distrugerii osteosarcomului, caracteristicile câmpului rotitor utilizat, precum intensitatea și frecvența acestui, numărul și durata expunerilor în câmp, necesare unui efect cât mai puternic asupra celulelor precum și analiza influenței timpilor de evaluare.

Celulele stromale mezenchimale și, în special, celulele stem derivate din țesut adipos (ADSC) sunt cunoscute că ținesc în mod preferențial tumorile, inflamațiile sau locurile de vindecare a rănilor, devenind astfel o modalitate convenabilă de a transporta substanțe terapeutice. Utilizarea acestor celule pentru transportul unor particule magnetice, în acest caz particulele de tipul Fe-Cr-Nb-B, reprezintă una dintre aplicațiile realizate în prezenta lucrare. ADSC au internalizat o cantitate ridicată de MNP într-un interval de 24 de ore, după care au fost adăugate peste o cultură de celule canceroase, osteosarcom uman. Probele au fost ulterior tratate timp de 30 minute într-un câmp magnetic rotitor, tratament care induce moartea celulelor încărcate cu aceste particule. În urma distrugerii ADSC, particulele magnetice sunt eliberate în mediul de cultură în care se află OS, celule care vor internaliza la rândul lor aceste MNP. După 24 de ore de la aplicarea ultimului tratament magneto-mecanic, aceste celule sunt actuate magneto-mecanic din nou, de două ori, câte 30 min la fiecare 24 de ore. Pentru a evalua eficiența metodei, la 24 de ore de la ultima actuare magneto-mecanică este realizat testul MTT ce cuantifică viabilitatea celulară.

#### **3.1. Evaluarea citotoxicității pe culturi de celule normale și canceroase**

Pentru a evalua biocompatibilitatea particulelor magnetice au fost utilizate 3 linii celulare: celule de osteosarcom, fibroblaști și ADSC. Decongelarea celulelor criogenate a fost făcută la 37 °C pe o baie de apă termostatăă, apoi spălate cu mediu de cultură complet pentru a elimina DMSO toxic (Dimetilsulfoxid, Sigma Aldrich). Celulele au fost centrifugate la 300g timp de 5 min și se resuspendate în 5 ml mediu complet, și subcultivate în flask-uri de 25 cm<sup>2</sup>.

După 72 de ore, celulele au fost detașate din flask-uri prin tripsinizare (tratate cu tripsină-EDTA). După adăugarea mediului de cultură complet, suspensia a fost centrifugată timp de 5 minute la 300G, iar peleta rezultată a fost resuspendată în mediu complet. Densitatea celulară a fost determinată prin utilizarea unui numărător automat de celule (Bio-Rad, TC20TM).

În final, celulele au fost însămânțate la o densitate de  $10^4$  celule/ml în plăci cu fund plat cu 96 de godeuri și incubate 48 de ore la 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> și 95% umiditate pentru testele ulterioare. Mediul de cultură a fost apoi înlocuit în unele dintre godeuri cu mediu proaspăt care conține ferrofluid dispersat în concentrația prestabilită. La 24 de ore după ce particulele au fost adăugate, a fost efectuat testul MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazoliu) pentru a evalua viabilitatea celulară. Testul MTT se bazează pe reducerea sărurilor de tetrazoliu de către celulele active metabolic prin intermediul enzimelor dehidrogenază, iar formazanul violet intracelular rezultat poate fi solubilizat și cuantificat prin metode spectrofotometrice.

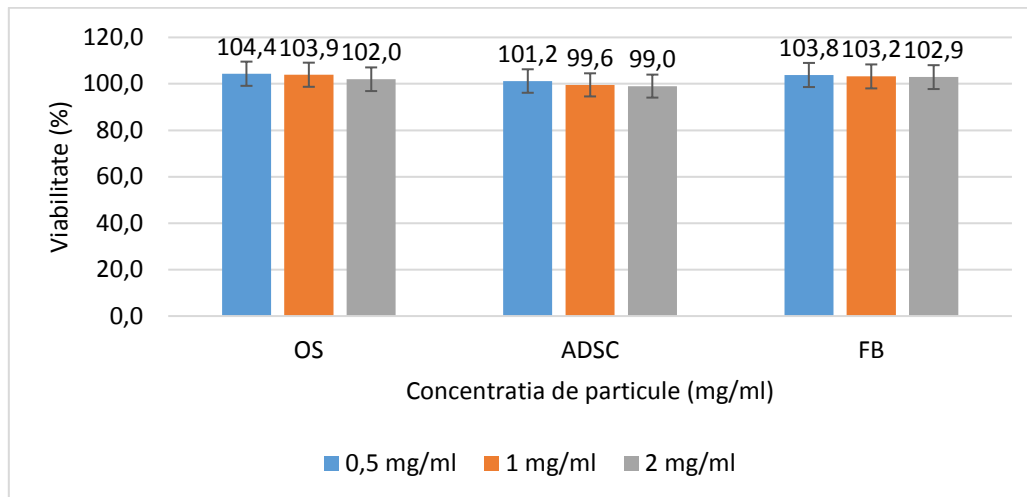
Viabilitatea celulară (%) a fost calculată folosind următoarea relație:

$$VC (\%) = 100 \times \frac{OD_{\text{Ferrofluid}} - OD_{\text{Blank}}}{OD_{\text{Control}} - OD_{\text{Blank}}}$$

unde VC(%) reprezintă viabilitatea celulară și OD reprezintă densitatea optică a godeurilor care conțin (a) celule cu ferrofluid ( $OD_{\text{Ferrofluid}}$ ), (b) numai celule ( $OD_{\text{Control}}$ ) și (c) mediu de cultură fără celule ( $OD_{\text{Blank}}$ ). Absorbanta probelor a fost măsurată la lungimea de undă de 570 nm utilizând spectrofotometrul Multi-Mode Microplate Reader Synergy HTX.

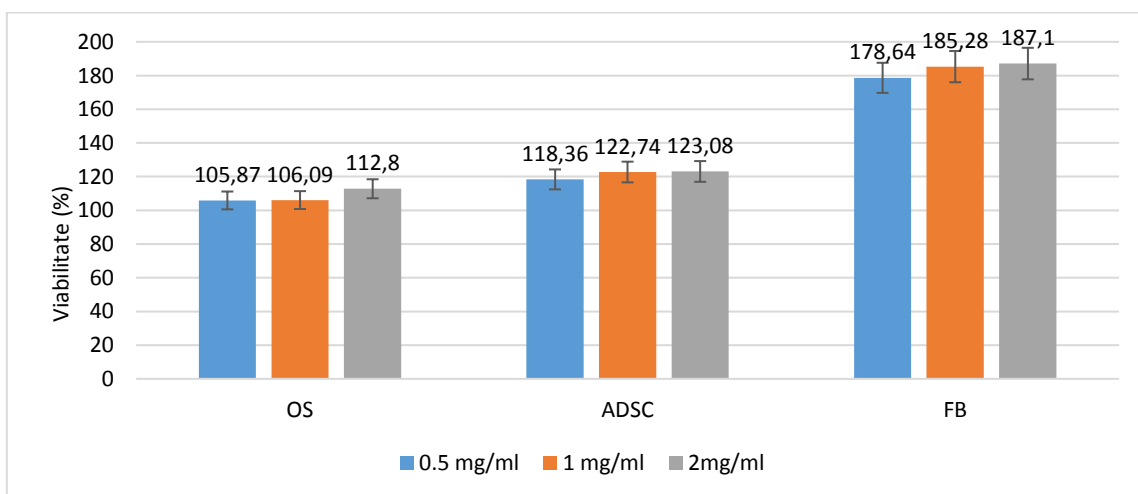
Utilizarea particulelor magnetice pentru distrugerea celulelor canceroase prin efect magneto-mecanic implică că aceste MNP sunt biocompatibile și nu prezintă efecte citotoxice. Înainte de expunerea lor la câmpuri magnetice variabile, ferrofluidul obținut din particulele magnetice Fe-Cr-Nb-B, a fost evaluat indirect prin măsurarea ratei de proliferare a celulelor expuse la concentrații crescătoare (între 0,5 și 2 mg/ml) de MNP adăugate în cultura celulară. Testele au fost efectuate pe mai multe tipuri de linii celulare: osteosarcom, ADSC și fibroblaști. Viabilitatea celulară a fost evaluată utilizând testul MTT. Nu s-a observat niciun efect citotoxic pentru nici una dintre cele trei linii celulare, chiar și la concentrații de MNP de până la 2 mg/ml (Figura 10). Controlul a constat din culturi de celule fără MNP.





**Figura 10.** Viabilitatea celulară după 24 de ore de incubare cu concentrații crescătoare de particule magnetice de Fe-Cr-Nb-B, evaluată prin testul MTT [74]

Ferofluidul a arătat o biocompatibilitate excelentă atât pe termen scurt, cât și pe termen lung (zece zile) atunci când a fost testat pe aceleași linii celulare și în concentrații mai ridicate. Rezultatele de citotoxicitate au evidențiat că viabilitatea celulară este similară cu cea a controlului (considerată ca fiind 100%) pentru probele evaluate la 24 de ore de la incubare, menținându-se la niveluri ridicate (deviația standard a fost de 1,26%). În cazul probelor evaluate după 10 zile (Figura 11), viabilitatea este mai mare decât a probele de control, ceea ce demonstrează că particulele evaluate nu au efecte citotoxice asupra celulelor chiar dacă sunt incubate pentru o perioadă atât de lungă de timp. În plus, rezultatele au evidențiat faptul că prezența acestor particule duce la creșterea activității metabolice și proliferarea ridicată, în special pentru fibroblaști (deviația standard a fost de 0,46%).



**Figura 11.** Viabilitatea celulară după 10 zile de incubare cu concentrații crescătoare de particule magnetice de Fe-Cr-Nb-B, evaluată prin testul MTT (rezultate proprii, nepublicate)

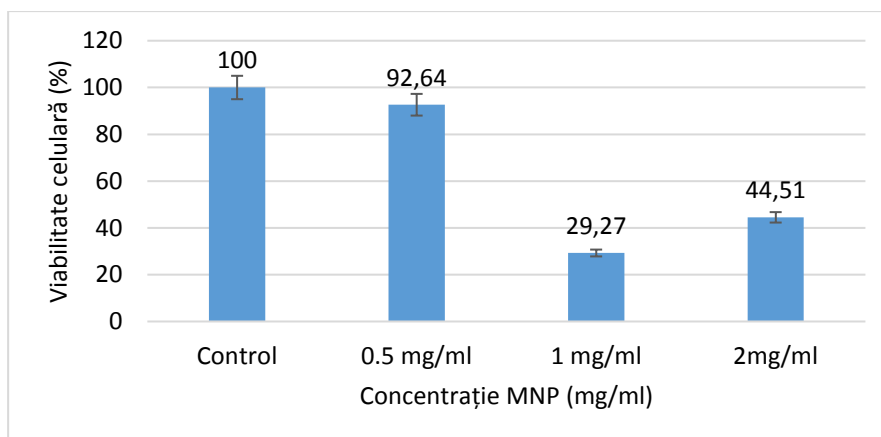
Măsurarea cantitativă a proceselor metabolice celulare reprezintă una dintre cele mai utilizate și mai fiabile metode de evaluare a viabilității celulare. În general, astfel de măsurători sunt efectuate după 2-3 zile de incubare a celulelor. Cu toate acestea, pentru a avea o indicație puternică a viabilității celulare după expunerea continuă pe termen lung la particule magnetice, am extins fereastra de timp a experimentelor până la 10 zile de incubație.

Această abordare ne-a oferit date fiabile cu privire la absența efectelor citotoxice a acestor particule magnetice. Putem aprecia că fenomene precum apoptoza celulară nu sunt induse de prezența exclusivă a MNP în mediul de cultură celular.

### **3.2. Efectul actuării magneto-mecanice produs de particulele magnetice de Fe-Cr-Nb-B asupra celulelor normale și tumorale**

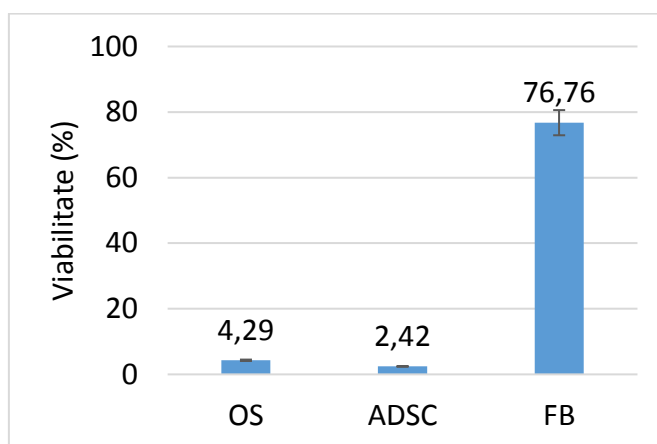
Celulele de OS, ADSC și FB au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri și incubate până la o confluență de 90%. Am adăugat MNP în concentrații de 0,5, 1 și 2 mg/ml și am lăsat probele pentru incubare timp de 2 sau 24 de ore. Ulterior, probele au fost actuate magneto-mecanic pentru diferite perioade de timp și s-a efectuat testul MTT.

Instalația experimentală pentru actuarea magnetomecanică a fost realizată la IFT-Iași și constă dintr-un sistem personalizat de patru bobine plasate în cruce, care pot produce un câmp magnetic rotativ. Sistemul permite reglarea intensității câmpului magnetic, frecvența acestuia și timpul de expunere. În centrul sistemului de bobine există un spațiu de aproximativ 20 cm<sup>3</sup> în care câmpul magnetic este uniform și în care se pot amplasa plăcile de cultură celulară. Câmpul magnetic utilizat în această aplicație are 8 mT și o frecvență de 2 Hz. Figura 12 arată variația viabilității OS după actuarea magnetică timp de 30 de minute la concentrații crescătoare. Celulele au fost incubate anterior cu MNP timp de 24 de ore. Au fost utilizate concentrații de MNP variind de la 0,5 și 2 mg/ml.



**Figura 12.** Viabilitatea OS după MMA cu creșterea concentrației de MNP, așa cum a fost evaluată prin testul MTT. Se observă o scădere semnificativă a viabilității celulare sub 30% la concentrația de 1 mg/ml de MNP în comparație cu celelalte probe [74]

Există o scădere semnificativă a viabilității celulare care atinge un minim pentru suspensia de MNP cu o concentrație de 1 mg/ml. Este de remarcat faptul că o creștere a concentrației de MNP la 2 mg/ml conduce la o reducere mai mică a viabilității OS atunci când este expus la MMA (deviația standard a fost de 42,56%). Acest efect s-ar putea explica prin faptul că o densitate crescută a particulelor pe unitate de volum nu permite o mișcare de rotație liberă care ar induce distrugerea celulelor. Având în vedere aceste rezultate, toate experimentele ulterioare au fost efectuate folosind o concentrație de 1 mg/ml MNP în mediul de cultură celulară. Fiecare actuare magneto-mecanică aplicată a avut o durată de 30 de minute.



**Figura 13.** Viabilitatea celulară după MMA realizat de două ori, a OS, ADSC și FB, incubate cu 1 mg/ml de MNP. [74]

După ce am testat ce concentrație de MNP oferă cel mai înalt nivel de distrugere al OS după realizarea MMA, am evaluat efectele tratamentului asupra OS, ADSC și FB folosind concentrația de 1 mg/ml de MNP, dar cu două actuări magneto-mecanice efectuate la 24 de ore după incubare, cu 24 de ore între fiecare tratament.

Pentru OS și ADSC, dublarea numărului de tratamente MMA duce la viabilități sub 5%, în timp ce pentru FB, viabilitatea este peste 70%, arătând că celulele normale nu sunt la fel de afectate de aceste tratamente (deviația standard a fost de 1,05%).

### **3.3. Evaluarea cantitativă și calitativă a prezenței nanoparticulelor magnetice în interiorul celulelor**

Am testat fezabilitatea incorporării particulelor de Fe-Cr-Nb-B în ADSC pentru transportul acestora în zona celulelor canceroase utilizând teste calitative (imagini SEM și TEM) și cantitative (testul ferozină).

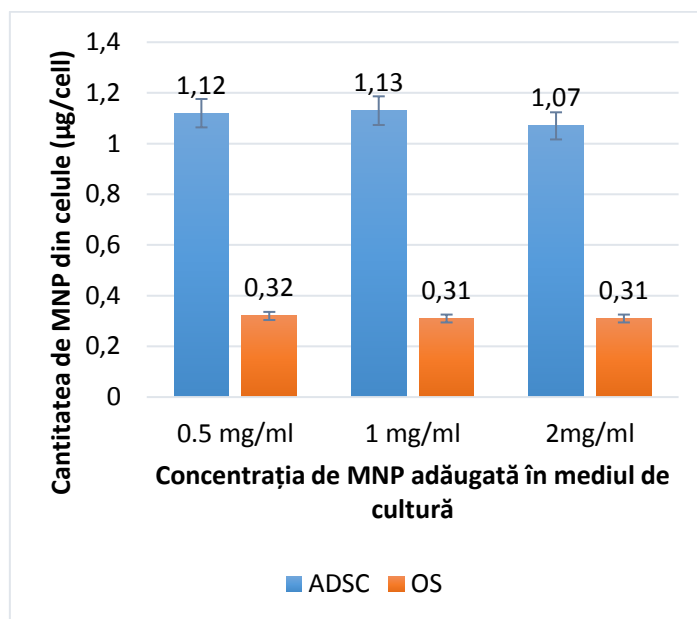
#### **3.3.1. Testul pentru determinarea cantității de particule internalizate de celulele ADSC și OS**

Testul de evaluare cantitativă a prezenței MNP internalizate de celule se numește testul ferozină și se bazează pe determinarea ionilor de fier din interiorul acestora.

OS și ADSC au fost cultivate în plăci cu 24 de godeuri. MNP au fost adăugate după 48 de ore (după ce au ajuns la confluență), iar cuantificarea cantității de fier a fost efectuată după interacțiunea celulă-particulă timp de 24 de ore.

La 24 de ore după adăugarea MNP în mediul de cultură, celulele au fost spălate de două ori cu PBS rece pentru a îndepărta orice MNP extracelular. Plăcile cu celule au fost congelate timp de 24 de ore, după care s-au adăugat 200  $\mu$ l de NaOH 50 nM în godeuri, iar placa a fost agitată timp de 2 ore. Supernatantul celular (100 $\mu$ l) a fost apoi transferat în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și amestecat cu 100  $\mu$ l de 10 mM HCl și 100  $\mu$ l de reactiv de eliberare a fierului (o soluție proaspăt preparată din volume egale de 1,4 M HCl și 4,5% (g / v)  $\text{KMnO}_4$  în apă distilată. Aceste amestecuri au fost incubate timp de 2 ore la 60°C într-o etuvă, iar după răcire s-a adăugat 30  $\mu$ l de reactiv de detecție a fierului (6,5 mM ferozină, neocuproină, 2,5 M acetat de amoniu și 1 M acid ascorbic dizolvate în apă). După 30 de minute, 280  $\mu$ l din soluția obținută în fiecare tub au fost transferate într-o placă cu 24 de godeuri pentru măsurătorile spectrofotometrice la o lungime de undă de 550 nm.

În prealabil a fost realizată o curbă de etalonare în intervalul de concentrație 0-300  $\mu$ M  $\text{FeCl}_3$  în HCl 10 mM pentru determinarea exactă a conținutului de fier din fiecare probă.



**Figura 14.** Conținutul de MNP intracelular pentru OS și ADSC după 24 de ore de incubare cu particulele magnetice Fe-Cr-Nb-B [74]

Cantitatea de fier per celulă a fost evaluată la 24 de ore după adăugarea MNP în mediul de cultură. Am calculat conținutul de fier în celulele încărcate cu MP după scăderea cantității de fier care se găsește în mod natural în celulele neîncărcate cu MNP în condiții de cultură similare. ADSC, având dimensiuni mai mari, încorporează cantități mai mari de MNP (1,12 ng MNP per celulă) decât OS (0,31 ng MNP per celulă) - Figura 14 (deviația standard a fost de 0,05%). Trebuie menționat că indiferent de cantitatea de MNP adăugată în mediul celular, aceasta nu influențează aproape deloc cantitatea de MNP găsite într-o celulă. Internalizarea MNP, un proces membranar activ, se realizează mai degrabă în dependență de durata interacțiunii particulelor cu celulele, decât în dependență de concentrația lor în mediul de cultură.

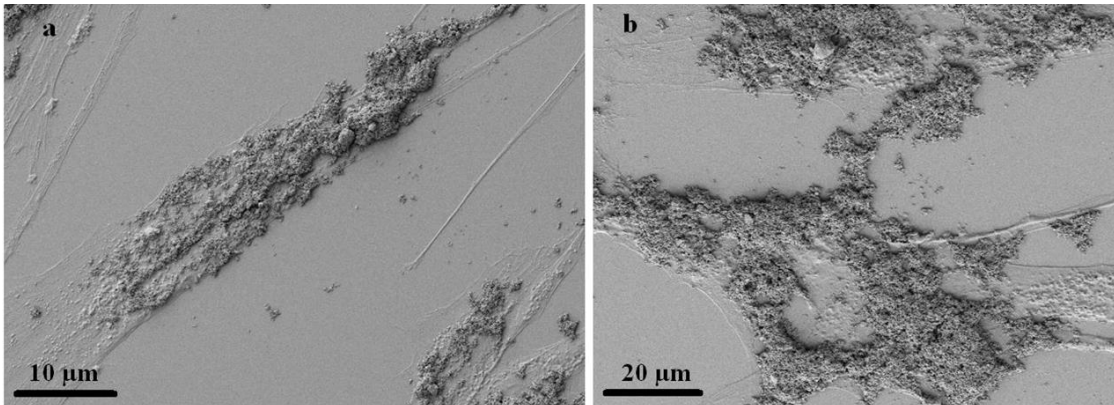
### 3.3.2. Microscopia electronică utilizată pentru vizualizarea celulelor și a particulelor magnetice de pe suprafața și din interiorul celulelor.

Pentru a evalua în continuare interacțiunea celulă-MNP și pentru a demonstra internalizarea MNP, am folosit microscopia electronică de scanare (HR-SEM) și de transmisie (HR-TEM) de înaltă rezoluție.

Pentru imagistica HR-SEM am pregătit mostre OS și ADSC crescute pe bucăți de siliciu plasate în godeurile unei plăci cu 24 de godeuri până la confluență de 80% și incubate cu MNP timp de 24 de ore. Suprafața culturii a fost spălată cu PBS pentru a îndepărta MNP neatașate, iar celulele au fost fixate cu un amestec de soluție de glutaraldehidă și soluție de tetraoxid de osmiu. Ulterior acestor pași, celulele au fost deshidratate folosind soluții de etanol în concentrații crescătoare, și uscate în hota

biologică și în vid. Plăcuțele de siliciu au fost apoi acoperite prin pulverizare cu un strat de aur de 5 nm. Imaginile acestor probe au fost obținute cu un microscop electronic cu scanare (SEM) UHR-SEM Carl Zeiss NEON 40 EsB CrossBeam [73].

În figura 21, ce conține imagini HR-SEM cu celulele OS și ADSC incubate 24 de ore cu MNP se evidențiază cantitatea ridicată de particule ce par să adere pe suprafața membranei celulare, în ciuda numeroaselor spălări necesare de procesarea celulară pentru SEM (Figura 15-a, b).

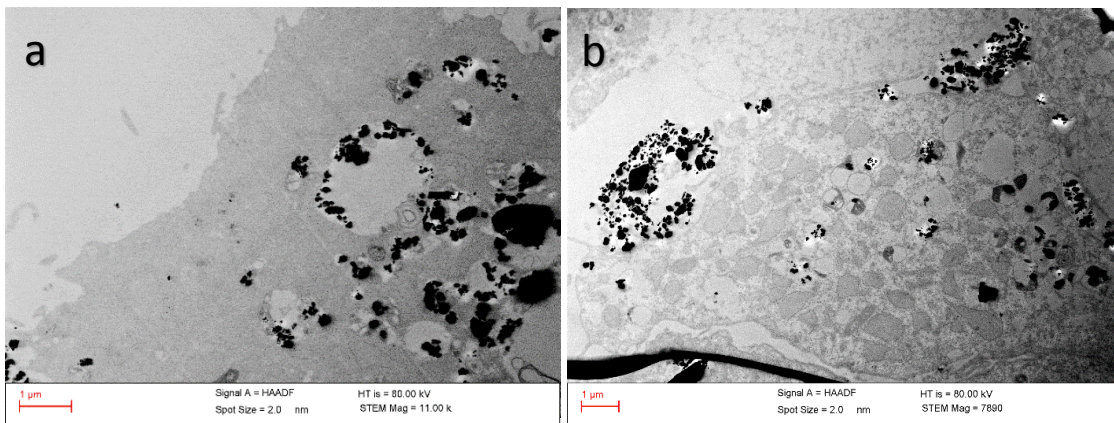


**Figura 15.** Imagini SEM ale ADSC (a) și OS (b) acoperite cu MNP [74]

În vederea realizării probelor pentru TEM, OS și ADSC au fost crescute într-un flacon de tip T25 până la confluență și incubate cu 200  $\mu\text{g/ml}$  MNP timp de 24 de ore. După incubare, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost spălate de trei ori cu PBS pentru a îndepărta particulele în exces, apoi au fost tripsinizate și centrifugate timp de 5 minute la 300g pentru a forma o peletă pe fundul unui tub de centrifuga de 15 ml. Peleta a fost tratată cu un amestec proaspăt de 2,5% glutaraldehidă în PBS timp de 2 ore, la temperatura camerei. După ce fixarea a fost completă, proba a fost clătită cu PBS și tratată cu tetraoxid de osmiu 1% în PBS timp de 1 oră, apoi spălată repetat cu PBS și apă. Deshidratarea probei a fost efectuată prin utilizarea unei serii gradate de concentrații de etanol (50, 70, 90 și 100%), urmată de incorporarea probei în rășină epoxidică, uscată, tăiată cu un ultramicrotom și vizualizată cu TEM UHR-TEM LIBRA®200MC/Carl Zeiss GmbH.

MNP par să fie încorporate în ADSC, precum și în OS, (Figura 16 a, b). ADSC, fiind celule mai mari, sunt capabile să încorporeze o cantitate mai mare de MNP în comparație cu OS, dar ambele tipuri de celule internalizează MNP. În interiorul celulelor, MNP pot fi observate în lizozomi, organite celulare responsabile cu digestia în interiorul celulelor, reprezentând cea mai probabilă metodă de internalizare.





**Figura 16.** Imagini TEM ale ADSC (c) și OS (d) cu MNP internalizate [74]

Luând în considerare aceste rezultate, putem concluziona că MNP nu numai că aderă la suprafața celulei, ci sunt și internalizate de celule fără a deteriora membrana celulară. Aceste rezultate oferă o bază solidă pentru ipoteza că actuarea magnetomecanică a MNP care se află în contact strâns cu membrana celulară și organele celulare, poate afecta viabilitatea celulei prin intermediul diferitelor mecanisme de deteriorare a membranei și lizozomilor.

### 3.4. Transportul și eliberarea particulelor magnetice de Fe-Cr-Nb-B utilizând celule stem adipoase

#### 3.4.1. Motilitatea ADSC *in vitro*.

Motilitatea celulară a fost evaluată *in vitro* utilizând un „test de vindecare a rănilor” și evaluarea imagistică folosind un microscop inversat (Live Imaging). Migrația ADSC încărcate cu MNP către zona celulelor tumorale a fost înregistrată utilizând metoda time-lapse și interpretarea computațională a rezultatelor (Image J). Înainte de evaluare, cele două populații de celule (ADSC-MNP și OS) au fost separate printr-un spațiu liber de aproximativ 0,5 mm realizat mecanic folosind un vârf de pipetă. Analiza imaginilor a arătat că ADSC încărcat cu MNP a fost capabil să țintească celulele de osteosarcom. Mai mult, viteza celulară calculată a ADSC-MNP a fost aproape dublă în comparație cu ADSC lipsite de MNP (probă de control) în condiții de cultură similare (Figura 25).

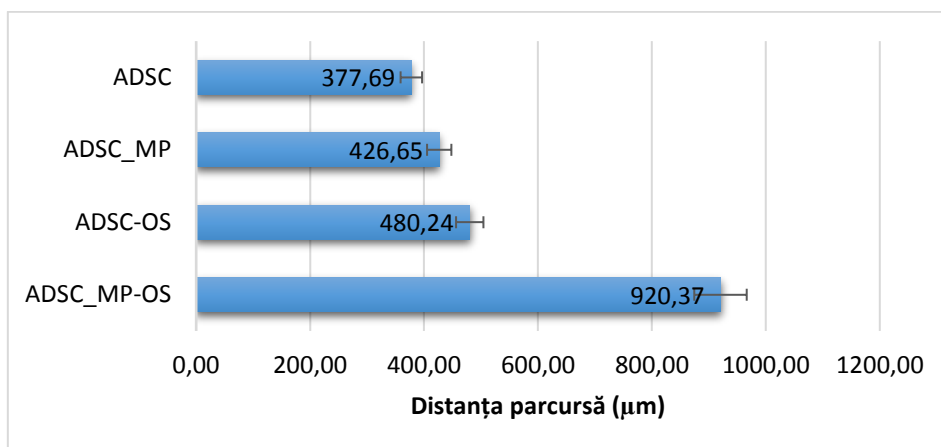


Figura 17. Motilitatea celulară a celulelor cu și fără MNP [74]

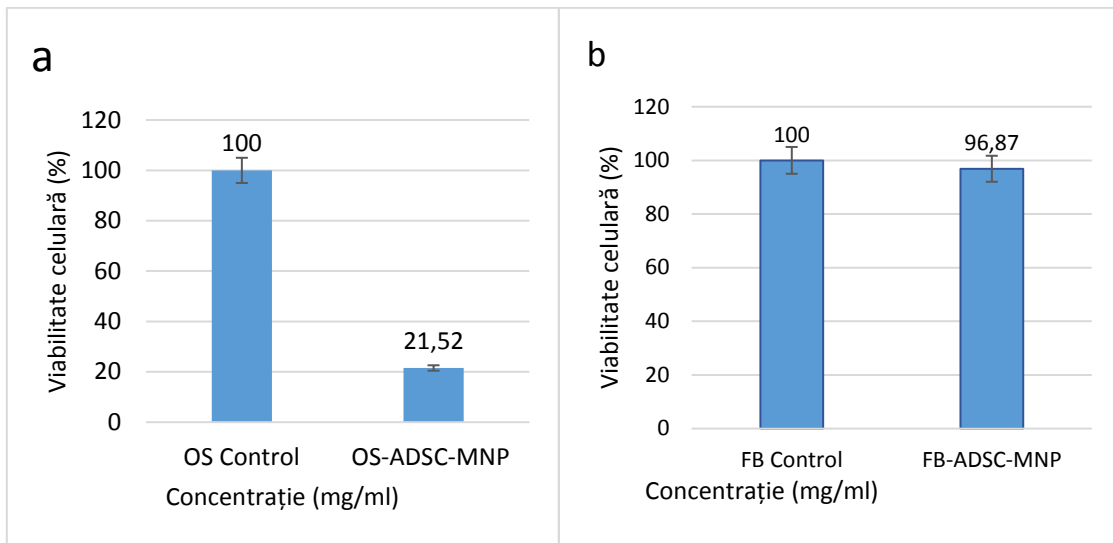
Cea mai mare distanță înregistrată a fost în cazul ADSC încărcate cu MNP și cultivate împreună cu celule OS. Distanța parcursă a fost de aproximativ 920 μm în 24 de ore, aproape dublu față de ADSC-urile lipsite de MNP cultivate împreună cu OS.

### 3.5. Evaluarea *in vitro* a distrugerii celulelor canceroase induse de particule Fe-Cr-Nb-B actuate magneto-mecanic

După incubarea de 24 de ore, godeurile cu ADSC și MNP au fost tripsinizate, celulele resuspendate în mediu de cultură proaspăt, iar amestecul de celule și mediu a fost adăugat în cultura de OS din plăcile cu 24 de godeuri. La două ore după adăugarea ADSC încărcat cu MNP în godeurile cu OS, acestea au fost actuate magneto-mecanic timp de 30 de minute pentru a distruge ADSC și a elibera MNP în mediu. Probele au fost lăsate în incubator timp de 24 de ore (timp în care MNP eliberate anterior au fost internalizate de OS) și apoi actuate magneto-mecanic din nou pentru a distruge celulele de osteosarcom. Pentru a realiza actuarea magneto-mecanică a particulelor din aceste probe am folosit același sistem menționat anterior, intensitatea fiind de 8 mT și frecvența de 2 Hz.

Scopul final al acestui studiu a fost de dezvoltat o metodă prin care să scădem viabilitatea celulelor canceroase prin actuarea magneto-mecanică a particulelor magnetice transportate prin intermediul celulelor ADSC. În acest sens am testat efectul actuării magneto-mecanice a particulelor magnetice transportate de ADSC către celulele de osteosarcom într-un model *in vitro* de interacțiune celulară prin încărcarea ADSC cu particule și livrarea la celulele OS urmată de actuarea magnetică a amestecului celular. Am folosit protocolul de actuare magneto-mecanică dublă, constând într-o primă actuare la câteva ore după incubarea celulelor-particule și a doua actuare la 24 de ore după prima expunere în câmp. Folosind acest protocol, MMA a fost efectuat inițial pentru a distruge ADSC-MNP cu scopul de a elibera particulele magnetice.





**Figura 18.** (a) Viabilitatea OS după MMA a amestecului de celule - OS simple și ADSC încărcate; (b) Viabilitatea FB după MMA a amestecului de celule FB și ADSC-MNP [74]

Figura 14 arată că MMA induce o scădere a viabilității ADSC-MNP până la o valoare de până la 2%, ceea ce asigură că particulele vor fi eliberate aproape complet după actuare. La 24 de ore după acest tratament, probele sunt din nou actuate magneto-mecanic pentru a distruge OS. Rezultatul prezentat în Figura 18-a evidențiază faptul că viabilitatea celulară scade la 21% după MMA (deviația standard a fost de 0,08%). Pentru a verifica dacă MMA, în eventualitatea utilizării în terapie, nu va afecta țesutul normal din jurul zonei canceroase, a fost efectuat un test similar înlocuind OS cu FB (Fig. 27-b). În acest caz, viabilitatea celulară după expunerea dublă la MMA a scăzut cu doar 3%, o mică proporție a celulelor fiind afectată în comparație cu OS.

## **Concluzii**

Scopul principal al acestei lucrări a fost de a sintetiza, caracteriza și testa particule magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B cu aplicații în terapia cancerului, în special în tratamentul cancerului osos. În acest sens au fost stabilite condițiile de actuare magnetică (durata de actuare, concentrație particule, interval de repetare) care conduc la eficiența maximă a acestor tratamente asupra distrugerii celulelor canceroase și a fost dezvoltată o metodă de a transporta și elibera particulele magnetice în zona cu celule de osteosarcom și actuarea magneto-mecanică a acestora după internalizarea în celulele canceroase.

**1.** Au fost sintetizate particule cu compoziția  $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$  prin măcinarea benzilor precursoare folosind măcinarea mecanică în moara cu bile în prezența acidului oleic. Particulele obținute au fost spălate și resuspendate sub forma unui ferofluid în soluție de gluconat de calciu.

Particulele obținute au fost caracterizate din punct de vedere dimensional, folosind DLS, care evidențiază că particulele au dimensiuni între 20 și 300 nm, având diametrul mediu de 106 nm. Pentru a corobora aceste rezultate, au fost realizate imagini cu particulele magnetice folosind HR-SEM, imagini care arată particule cu dimensiuni sub 200 nm, cu forme paralelipipedice. Suprafața particulelor obținute prin măcinare a fost analizată și prin intermediul spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier, rezultate ce nu doar confirmă compoziția aliajului utilizat în obținerea acestor probe, dar și absența oxidării ce afectează adesea procesele de sinteză a multor tipuri de particule magnetice ce conțin fier. Un ultim pas în testarea acestor particule magnetice a fost reprezentat de realizarea evaluării magnetizației de saturație, de 90 emu/g, caracteristică importantă în utilizarea particulelor magnetice în condițiile aplicării actuării magneto-mecanice.

**2.** Au fost realizate teste de evaluare a biocompatibilității particulelor magnetice de tipul Fe-Cr-Nb-B în diferite concentrații și intervale de timp de incubare. Viabilitatea celulelor de osteosarcom, ADSC și fibroblaști umani normali a fost evaluată atât la 24 de ore cât și la 10 zile de incubare cu particulele magnetice în diferite concentrații. Pentru toate concentrațiile de particule testate, viabilitatea nu scade sub cea a culturilor de celule control ci chiar o depășește pe aceasta, fapt ce confirmă biocompatibilitatea acestor nanomateriale.

**3.** A fost evaluat efectul actuării magneto-mecanice asupra celulelor de osteosarcom în prezența mai multor concentrații de particule magnetice. Concentrația de 1 mg/ml induce scăderea cea mai semnificativă asupra viabilității celulare atunci când proba este actuată magneto-mecanic 30 minute într-un câmp magnetic rotativ de intensitate 8 mT și frecvența de 2 Hz.

4. A fost stabilit cel mai eficient mod de a efectua actuarea magneto-mecanică, la 24 de ore după incubarea MNP cu celule, prin aplicarea a două actuări magneto-mecanice, timp de 30 minute, cu intervale de 24 de ore între tratamente pentru ca viabilitatea celulelor de osteosarcom să fie redusă la 4,2%. În aceleași condiții de testare, viabilitatea celulelor ADSC, cu rol transportatori ai MNP scade până la 2%, iar viabilitatea celulelor FB, celule de control, cu dezvoltare normală, viabilitatea scade până la 76%.

5. A fost verificată posibilitatea de a utiliza celule de ADSC ca transportatori pentru MNP, dar și modul în care OS internalizează MNP, prin intermediul testului cu ferozină ce evaluează cantitativ prezența MNP în celule, ADSC internalizând aproximativ 1,1 ng MNP per celulă, comparativ cu OS ce internalizează aproximativ 0,3 ng MNP per celulă. De asemenea, a fost confirmată calitativ prezența MNP pe suprafața membranei celulare folosind HR-SEM și în interiorul acestora prin intermediul HR-TEM.

Deoarece ADSC vor fi folosite cu scopul de a transporta MNP spre celulele de osteosarcom, a fost evaluată abilitatea acestora, atât încărcate cu MNP, cât și în absența MNP, de a se deplasa către celulele de osteosarcom. Rezultatele indică faptul că ADSC încărcate cu MNP prezintă cea mai ridicată motilitate atunci când se deplasează către celulele de osteosarcom.

6. În final a fost evaluată viabilitatea celulelor de osteosarcom și a fibroblaștilor după actuarea magneto-mecanică dublă în prezența MNP transportate de ADSC. În acest sens a fost realizat testul MTT, testul Live/Dead și testul de evaluare a markerilor apoptotici - caspază 3/7. Rezultatele obținute după efectuarea acestor teste confirmă reducerea viabilității celulelor de osteosarcom cu până la 80%, demonstrând eficiența metodei în distrugerea celulelor canceroase. Totodată, aceste teste evidențiază absența unor efecte nocive asupra celulelor normale, cum sunt fibroblaștii, prin realizarea acestor tratamente.

Rezultatele obținute și prezentate în această lucrare confirmă că ADSC sunt transportatori adecvați ai particulelor magnetice de tip Fe-Cr-Nb-B în zona celulelor canceroase și pot fi acționate magneto-mecanic pentru a elibera MNP. Internalizarea și ulterior actuarea magneto-mecanică acestora conduce la moartea celulelor de osteosarcom, fără a afecta țesutul normal.

7. Rezultatele prezentate în această teză de doctorat au fost prezentate la conferințe internaționale de specialitate și au fost publicate în reviste științifice cotate ISI.

a) Lucrări prezentate la conferințe internaționale:

1. „Simple method of preparing biological cell samples for SEM imaging of nanomaterials adherent to the cell membrane” la 13th International Conference on

Physics of Advanced Materials (ICPAM-13), autori A.E. Minuti, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Spania, 2021.

2. „A ferrofluid based on Fe-Cr-Nb-B magnetic particles for biomedical application” la JEMS2022 Hybrid Conference, autori Anca Emanuela Minuti, George Stoian, Dumitru-Daniel Herea, Ecaterina Radu, Nicoleta Lupu, Horia Chiriac, Varşovia, Polonia, 2022
3. „A simplified protocol for preparation of cell based biological samples for observing nanomaterial surface adherence using scanning electron microscopy imaging” la Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference, autori A.E. Minuti, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Cracovia, Polonia 2022.
4. „A straightforward method for cell sample preparation to allow a reliable image of the nanomaterials adhering to the surface, using scanning electron microscopy” la International Conference Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, “IC-ANMBES 2022, autori A.E. Minuti, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Brasov, Romania, 2022.

b) Articole publicate sau trimise spre publicare în reviste cotate ISI

1. Minuti AE, Stoian G, Herea DD, Radu E, Lupu N, Chiriac H. 2022, Fe-Cr-Nb-B Ferrofluid for Biomedical Applications. *Nanomaterials* (Basel), doi: 10.3390/nano12091488, 2022 Apr 27;12(9):1488. doi: 10.3390/nano12091488. IF 4,921. **AIS=0,707**
2. Minuti AE, Labusca L, Herea D-D, Stoian G, Chiriac H, Lupu N. A Simple Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopic Imaging Allows Quick Screening of Nanomaterials Adhering to Cell Surface. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):430. <https://doi.org/10.3390/ijms24010430>, IF 6,208 **AIS=1,028**
3. Chiriac H, Minuti AE, Stavila C, Labusca L, Herea D-D, Stoian G, Ababei G, Lupu N. Fe-Cr-Nb-B magnetic particles and adipose derived mesenchymal cells, triggers for cancer cells apoptosis by magneto-mechanical actuation, *Nanomaterials*, 2023, articol trimis spre publicare cu Id: nanomaterials-2520891. IF 4,921. **AIS=0,707**

c) Capitole de carte

1. „Magneto-mechanical actuation of magnetic particles for cancer therapy” în cartea „Magnetic sensors and actuators”, autori Horia Chiriac, Anca-Emanuela Minuti, Dumitru-Daniel Herea, Luminița Lăbușcă, Nicoleta Lupu, editura Elsevier, Woodhead Publishing, 2023

## Bibliografie

1. Chiriac H, Radu E, Țibu M et al. Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles with shape anisotropy for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation. *Sci. Rep.* 8, 11538 (2018).
2. Richards MA, Stockton D, Babb P, Coleman MP. How many deaths have been avoided through improvements in cancer survival? *BMJ (British Medical Journal)*. 320(7239):895-8. 10.1136/bmj.320.7239.895. (2000).
3. Ferreira M, Sousa J, Pais A, Vitorino C. The Role of Magnetic Nanoparticles in Cancer Nanotheranostics. *Materials (Basel)*.13(2):266. 10.3390/ma13020266. (2020).
4. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* 12 (11), 991–1003. (2013).
5. Cole AJ, David AE, Wang J, Galban CJ, Hill HL, Yang VC. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials* 32, 2183–2193. (2011).
6. Weis LD. Common malignant bone tumors: osteosarcoma. Simon MA, Springfield D, eds. *Surgery for Bone and Soft-Tissue Tumors. Philadelphia: Lippincott-Raven; 265-74.* (1998).
7. Vander Griend RA. Osteosarcoma and its variants. *Orthop. Clin. North Am. Jul.* 27(3):575-81. (1996).
8. Chang D, Lim M, Goos JACM, Qiao R, Ng YY, Mansfeld FM, Jackson M, Davis TP, Kavallaris M. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Front Pharmacol.* 9:831. 10.3389/fphar.2018.00831. (2018).
9. Naud C, Thebault C, Carriere M, Hou Y, Morel R, Berger F, Diény B, Joisten H. Cancer Treatment by Magneto-Mechanical Effect of Particles, a Review. *Nanoscale Advances.* 2. 10.1039/D0NA00187B. (2020).
10. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J. et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 15, 730–738. /10.1038/gt.2008.39. (2008).
11. Teja AS, Koh PY. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog Cryst Growth.* 22–45. (2009).
12. Kim D-H, Rozhkova E A, V Ulasov I, Bader SD, Rajh T, Lesniak MS, Novosad V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat. Mater.* 9:165–171. (2010).

13. Cheng D, Li X, Zhang G. et al. Morphological effect of oscillating magnetic nanoparticles in killing tumor cells. *Nanoscale Res Lett* 9, 195. (2014).
14. Hu W, Wilson RJ, Koh A, Fu A, Faranesh AZ, Earhart CM, Osterfeld SJ, Han SJ, Xu L, Guccione S, Sinclair R, Wang SX. High-moment antiferromagnetic nanoparticles with tunable magnetic properties. *Adv. Mater.* 20:1479–1483. (2008).
15. Joisten H, Courcier T, Balint P, Sabon P, Faure-Vincent J, Auffret S, Dieny B. Self-polarization phenomenon and control of dispersion of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications. *Appl. Phys. Lett.* 97:2–4. (2010)
16. Vemulkar T, Mansell R, Petit DCMC, Cowburn RP, Lesniak MS. Highly tunable perpendicularly magnetized synthetic antiferromagnets for biotechnology applications. *Appl. Phys. Lett.* 107:012403. (2015).
17. Liu D, Wang L, Wang Z, Cuschieri A. Magnetoporation and magnetolysis of cancer cells via carbon nanotubes induced by rotating magnetic fields. *Nano Lett.* 12:5117–5121. (2012).
18. Contreras MF, Sougrat R, Zaher A, Ravasi T, Kosel J. Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *Int. J. Nanomed.* 10:2141–2153. (2015).
19. Wong DW, Gan WL, Liu N, Lew WS. Magneto-actuated cell apoptosis by biaxial pulsed magnetic field. *Sci. Rep.* 7:1–8. (2017).
20. Cheng D, Li X, Zhang G, Shi H. Morphological effect of oscillating magnetic nanoparticles in killing tumor cells. *Nanoscale Res. Lett.* 9:1–8. (2014).
21. Chiriac H, Minuti AE, Lupu N. Cancer Cell Destruction by Magneto-Mechanical Actuation of Nanowires Compared with Nano/Micromagnetic Particles. *J. Biomed. Res. Environ. Sci.* 3(8): 905-907. (2022).
22. Shen Y, Wu C, Uyeda TQP, Plaza GR, Liu B, Han Y, Lesniak MS, Cheng Y. Elongated nanoparticle aggregates in cancer cells for mechanical destruction with low frequency rotating magnetic field. *Theranostics.* 7:1735–1748. (2017).
23. Chiriac H, Radu E, Țibu M. et al. Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles with shape anisotropy for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation. *Sci. Rep.* 8, 11538 (2018).
24. Minuti AE, Stoian G, Herea D-D, Radu E, Lupu N, Chiriac H. Fe-Cr-Nb-B Ferrofluid for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 12, 1488. (2022).
25. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 6:257–26 (2010).

26. Chiriac H, Lupu N, Lostun M, Ababei G, Grigoraş M, Dănceanu C. Low TC Fe-Cr-Nb-B glassy submicron powders for hyperthermia applications. *J. Appl. Phys.* 115(17), 17B520. (2014).
27. Saito, T. Magnetic properties of Ti-Fe alloy powders prepared by mechanical grinding. *J. Alloy. Compd.* 364(1-2), 113–116. (2004).
28. Budeanu L, Neagu M, Lupu N, Chiriac H, Velicu I-L. Fe<sub>73.5</sub>Cu<sub>1</sub>Nb<sub>3</sub>Si<sub>15.5</sub>B<sub>7</sub> powders prepared by mechanical grinding: Structural and magnetic properties. *Optoelect. Adv. Mater. RC.* 9. 1164-1166. (2015).
29. Liu H, Wei Y, Sun Y. The formation of hematite from ferrihydrite using Fe(II) as a catalyst. *J. Mol Catal.* 226:135–140. (2005).
30. Lu J, Yang S, Ng K, Su CH, Yeh CS, Wu YN, Shieh DB. Solid-state synthesis of monocrystalline iron oxide nanoparticle based ferrofluid suitable for magnetic resonance imaging contrast application. *Nanotechnology.* 17:5812–5820. (2006).
31. Zhao Y, Qiu Z, Huang J. Preparation and analysis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers. *Chin. J. Chem. Eng.* 16, 451–455. (2008).
32. Indira TK, Lakshmi PK. Magnetic nanoparticles – a review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 3, 1035–1042. (2010).
33. Goirienea-Goikoetxea M, García-Arribas A, Rouco M, Svalov AV, Barandiaran JM. High-yield fabrication of 60 nm Permalloy nanodiscs in well-defined magnetic vortex state for biomedical applications. *Nanotechnology.* 29;27(17):175302. (2016),
34. Piraux L. Magnetic Nanowires. *Appl. Sci.* 10, 1832. (2020).
35. Nadeem M, Khan R, Shah N, Bangash IR, Abbasi BH, Hano C, Liu C, Ullah S, Hashmi SS, Nadhman A, Celli J. A Review of Microbial Mediated Iron Nanoparticles (IONPs) and Its Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel).* 12(1):130. (2021).
36. Chakka VM, Altuncevahir B, Jin ZQ, Li Y, Liu JP. Magnetic nanoparticles produced by surfactant-assisted ball milling. *J. Appl. Phys.* 99(8), 08E912. (2006).
37. Chiriac H, Lupu N, Lostun M, Ababei G, Grigoraş M, Dănceanu C. Low TC Fe-Cr-Nb-B glassy submicron powders for hyperthermia applications. *J. Appl. Phys.* 115 (17): 17B520. (2014).
38. Chertok, B. et al. Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration. *Biomaterials.* 31, 6317–6324. (2010).



39. Răuciu M, Creangă DE, Airinei A. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. *The European Physical Journal. E*, 21(2). (2016).
40. Lee, H. et al. Thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and application as a dual Imaging probe for cancer in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12739–12745. (2007).
41. Yallapu MM. et al. PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications. *Pharm. Res.* 27, 2283–2295. (2010).
42. Chertok, B. et al. Comparison of electron spin resonance spectroscopy and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy for biodistribution analysis of iron-oxide nanoparticles. *Mol. Pharm.* 7, 375–385. (2010).
43. Kunzmann, A. et al. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810, 361–373. (2011).
44. Occhipinti E, Verderio P, Natalello A, Galbiati E, Colombo M, Mazzucchelli S, Salvadè A, Tortora P, Doglia SM, Prospero D. Investigating the structural biofunctionality of antibodies conjugated to magnetic nanoparticles. *Nanoscale.* 3(2):387-90. (2011).
45. Jain TK. et al. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.* 5, 316–327. (2008).
46. Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee SY, Chiappini C, Liu X, Ferrari M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Controlled Release.* 141:320–327. (2010).
47. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14:1–16. (2012).
48. Ye H, Shen Z, Li Y. Computational modeling of magnetic particle margination within blood flow through LAMMPS. *Comput. Mech.* 62:457–476. (2018).
49. Vegerhof A, Barnoy EA, Motiei M, Malka D, Danan Y, Zalevsky Z, Popovtzer R. Targeted magnetic nanoparticles for mechanical lysis of tumor cells by low-amplitude alternating magnetic field. *Materials.* 9:1–12. (2016).
50. Ye H, Shen Z, Yu L, Wei M, Li Y. Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces: An exemplar of mechanics in nanomedicine. *Proc. R. Soc. A.* 474:1–24. (2018).
51. Goiriena-Goikoetxea M, Muñoz D, Orue I, Fernández-Gubieda ML, Bokor J, Muela A, García-Arribas A. Disk-shaped magnetic particles for cancer therapy. *Appl. Phys. Rev.* 7:011306. (2020).

52. Leulmi S, Joisten H, Dietsch T, Iss C, Morcrette M, Auffret S, Sabon P, Dieny B. Comparison of dispersion and actuation properties of vortex and synthetic antiferromagnetic particles for biotechnological applications. *Appl. Phys. Lett.* 103:8–13. (2013).
53. Mansell R, Vemulkar T, Petit DC, Cheng Y, Murphy J, Lesniak MS, Cowburn RP. Magnetic particles with perpendicular anisotropy for mechanical cancer cell destruction. *Sci. Rep.* 7:1–7. (2017).
54. Vegerhof A, Barnoy EA, Motiei M, Malka D, Danan Y, Zalevsky Z, Popovtzer R. Targeted magnetic nanoparticles for mechanical lysis of tumor cells by low-amplitude alternating magnetic field. *Materials.* 9:1–12. (2016).
55. Hu S-H, Gao X. Nanocomposites with Spatially Separated Functionalities for Combined Imaging and Magnetolytic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 132:7234–7237. (2010).
56. Kralj S, Makovec D. Magnetic Assembly of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Clusters into Nanochains and Nanobundles. *ACS Nano.* 9:9700–9707. (2015).
57. Fung AO, Kapadia V, Pierstorff E, Ho D, Chen Y. Induction of cell death by magnetic actuation of nickel nanowires internalized by fibroblasts. *J. Phys. Chem. C.* 112:15085–15088. (2008).
58. Li W, Liu Y, Qian Z, Yang Y. Evaluation of Tumor Treatment of Magnetic Nanoparticles Driven by Extremely Low Frequency Magnetic Field. *Sci. Rep.* 7:1–9. (2017).
59. Wo F, Xu R, Shao Y, Zhang Z, Chu M, Shi D, Liu S. A multimodal system with synergistic effects of magneto-mechanical, photothermal, photodynamic and chemo therapies of cancer in graphene-quantum dot-coated hollow magnetic nanospheres. *Theranostics.* 6:485–500. (2016).
60. Maniotis N, Makridis A, Myrovali E, Theopoulos A, Samaras T, Angelakeris M. Magneto-mechanical action of multimodal field configurations on magnetic nanoparticle environments. *J. Magn. Magn. Mater.* 470:6–11. (2019).
61. Kilinc D, Lesniak A, Rashdan SA, Gandhi D, Blasiak A, Fannin PC, von Kriegsheim A, Kolch W, Lee GU. Mechanochemical Stimulation of MCF7 Cells with Rod-Shaped Fe–Au Janus Particles Induces Cell Death Through Paradoxical Hyperactivation of ERK. *Adv. Healthcare Mater.* 4:395–404. (2015).
62. Muroski ME, Morshed RA, Cheng Y, Vemulkar T, Mansell R, Han Y, Zhang L, Aboody KS, Cowburn RP, Lesniak MS. Controlled payload release by magnetic field triggered neural stem cell destruction for malignant glioma treatment. *PLoS One.* 1–12. (2016),
63. Chen M, Wu J, Ning P, Wang J, Ma Z, Huang L, Plaza GR, Shen Y, Xu C, Han Y, Lesniak MS, Liu Z, Cheng Y. Remote Control of Mechanical Forces via Mitochondrial-Targeted Magnetic NanospINNers for Efficient Cancer Treatment. *Small.* 16:1905424. (020).

64. Hapuarachchige S, Kato Y, Ngen EJ, Smith B, Delannoy M, Artemov D. Non-temperature induced effects of magnetized iron oxide nanoparticles in alternating magnetic field in cancer cells. *PLoS One*. 11:1–12. (2016).
65. Cho MH, Lee EJ, Son M, Lee JH, Yoo D, Kim J, W. Park SW, Shin JS, Cheon J. A magnetic switch for the control of cell death signalling in in vitro and in vivo systems. *Nat. Mater.* 11:1038–1043. (2012).
66. Wang B, Bienvenu C, Mendez-Garza J, Lançon P, Madeira A, Vierling P, Di Giorgio C, Bossis G. Necrosis of HepG2 cancer cells induced by the vibration of magnetic particles. *J. Magn. Mater.* 344:193–201. (2013).
67. Lim J, Yeap SP, Che HX. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 381 (2013).
68. <https://www.phys-iasi.ro/en/scanning-electron-microscope-sem> Accesat la data de 04.03.2023
69. Ali A, Chiang YW, Santos RM. X-ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. *Minerals*. 12, 205. (2022).
70. <https://www.phys-iasi.ro/en/lake-shore-vsm-7410-vibrating-sample-magnetometer> Accesat la data de 22.03.2023
71. Kwon S, Yang W, Moon D, Kim KS. Comparison of Cancer Cell Elasticity by Cell Type. *J. Cancer*. 11(18):5403-5412. (2020).
72. Guarnieri D, Sabella S, Muscetti O, Belli V, Malvindi MA, Fusco S, Luca E, Pompa P, Netti P. Transport across the cell-membrane dictates nanoparticle fate and toxicity: A new paradigm in nanotoxicology. *Nanoscale*. 6. 10.1039/c4nr02008a. (2014).
73. Minuti AE, Labusca L, Herea D-D, Stoian G, Chiriac H, Lupu N. A Simple Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopic Imaging Allows Quick Screening of Nanomaterials Adhering to Cell Surface. *Int. J. Mol. Sci.* 24(1):430. (2023).
74. Chiriac H, Minuti AE, Stavila C, Labusca L, Herea D-D, Stoian G, Ababei G, Lupu N. Fe-Cr-Nb-B magnetic particles and adipose derived mesenchymal cells, triggers for cancer cells apoptosis by magneto-mechanical actuation, *Nanomaterials*, 2023, articol trimis spre publicare cu Id: nanomaterials-2520891

## Diseminarea activității științifice

### A. Articole publicate în reviste cotate ISI din domeniul tezei

1. **Minuti AE**, Stoian G, Herea DD, Radu E, Lupu N, Chiriac H. 2022, Fe-Cr-Nb-B Ferrofluid for Biomedical Applications. *Nanomaterials* (Basel), doi: 10.3390/nano12091488, 2022 Apr 27;12(9):1488. doi: 10.3390/nano12091488. **IF 4,921. AIS=0,737**
2. **Minuti AE**, Herea DD, Labusca L, Stoian G, Lupu N, Chiriac H, A simple protocol for sample preparation for scanning electron microscopic imaging allows quick screening of nanomaterials adhering to cell surface, *International Journal of Molecular Sciences*, <https://doi.org/10.3390/ijms24010430>, 2022, **IF 6,208 AIS=1,064**

\*\*\*

### B. Articole publicate în reviste cotate ISI din domenii conexe tezei

1. Labusca L, Herea D-D, Danceanu C-M, **Minuti A-E**, Stavila C, Grigoras M, Gherca D, Stoian G, Ababei G, Chiriac H, Lupu N, 2020, The effect of magnetic field exposure on differentiation of magnetite nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells, *Materials Science and Engineering: C*, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110652>, Volume 109, 110652, **IF = 5,880; AIS = 0,794**.
2. Labusca L, Herea DD, **Minuti AE**, Stavila C, Danceanu C, Grigoras M, Ababei G, Chiriac H, Lupu N, 2021, Magnetic nanoparticle loaded human adipose derived mesenchymal cells spheroids in levitated culture, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. doi: 10.1002/jbm.b.34727, 109(5):630-642, **IF 3,405; AIS = 0,487**.
3. Borhan A, Herea DD, Gherca D, Stavila C, **Minuti AE**, Grigoras M, Danceanu CM, Labusca L, Stoian G, Ababei G, Stan C, Lupu N, Chiriac H, 2020, Flash-cooling assisted sol-gel self-ignited synthesis of magnetic carbon dots-based heterostructure with antitumor properties, doi: 10.1016/j.msec.2020.111288, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Dec;117:111288. **IF = 5,880; AIS = 0,794**.
4. Labusca L, Herea DD, **Minuti AE**, Stavila C, Danceanu C, Plamadeala P, Chiriac H, Lupu N, 2021, Magnetic Nanoparticles and Magnetic Field Exposure Enhances Chondrogenesis of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells But Not of Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells. doi: 10.3389/fbioe.2021.737132, *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Oct 18;9:737132, **IF 5,89; AIS = 1,005**.

5. Labusca L, Danceanu C, **Minuti AE** et al. 2022, Magnetic nanowires substrate increases adipose-derived mesenchymal cells osteogenesis. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21145-z>, Sci Rep 12, 16698, **IF 4,996**
6. Herea DD, Zară-Dănceanu C-M, Lăbușcă L, **Minuti A-E**, Stăvilă C, Ababei G, Tibu M, Grigoraș M, Lostun M, Stoian G, et al. Enhanced Multimodal Effect of Chemotherapy, Hyperthermia and Magneto-Mechanic Actuation of Silver-Coated Magnetite on Cancer Cells. Coatings. 2023; 13(2):406. <https://doi.org/10.3390/coatings13020406>, **IF 3,4; AIS = 0,438**
7. Zară-Dănceanu CM, **Minuti AE**, Stăvilă C, Lăbușcă L, Herea DD, Tiron CE, Chiriac H, Lupu N. Magnetic Nanoparticle Coating Decreases the Senescence and Increases the Targeting Potential of Fibroblasts and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. ACS Omega. 2023 Jun 22;8(26):23953-23963. doi: 10.1021/acsomega.3c02449, **IF 4,132; AIS = 0,622.**
8. Zară-Dănceanu CM, Stăvilă C, **Minuti AE**, Lăbușcă L, Nastasa V, Herea D-D, Malancus R-N, Ghercă D, Pasca S-A, Chiriac H, et al. Magnetic Nanoemulsions for the Intra-Articular Delivery of Ascorbic Acid and Dexamethasone. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(15):11916. <https://doi.org/10.3390/ijms241511916>, **IF 6,208; AIS=1,028.**

\*\*\*

### **C. Lucrări prezentate de autoarea tezei la conferințe**

1. „Simple method of preparing biological cell samples for SEM imaging of nanomaterials adherent to the cell membrane” la 13th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-13), autori **A.E. Minuti**, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Spania, 2021.
2. „A ferrofluid based on Fe-Cr-Nb-B magnetic particles for biomedical application” la JEMS2022 Hybrid Conference, autori **Anca Emanuela Minuti**, George Stoian, Dumitru-Daniel Herea, Ecaterina Radu, Nicoleta Lupu, Horia Chiriac, Varșovia, Polonia, 2022
3. „A simplified protocol for preparation of cell based biological samples for observing nanomaterial surface adherence using scanning electron microscopy imaging” la Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference, autori **A.E. Minuti**, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Cracovia, Polonia 2022.
4. „A straightforward method for cell sample preparation to allow a reliable image of the nanomaterials adhering to the surface, using scanning electron microscopy” la International

Conference Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "IC-ANMBES 2022, autori **A.E. Minuti**, D.D. Herea, L. Labusca, G. Stoian, N. Lupu, H. Chiriac, Brasov, Romania, 2022.

\*\*\*

**D. Lucrări prezentate de alți autori la conferințe**

1. „Influence of alternating magnetic fields on the differentiation of stem cells loaded with magnetic nanoparticle” la conferința NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS PROGRESS UNDER HORIZON2020 AND BEYOND - 9th Edition of EuroNanoForum - ENF2019, autori Herea D.D.; Labusca L.; Danceanu C.; **Minuti A.E.**; Stavila C.; Stoian G.; Ababei G.; Chiriac H.; Lupu N; București, România, 2019.
2. „Magnetic Nanoparticles Uploaded by Human Adipose derived stem cells as versatile antitumoral and regenerative tools” la A 18-a Ediție a Seminarului Național de Nanoștiință și Nanotehnologie - SNN 2019, autori Labusca L.; Herea D.D.; Dănceanu C.; **Minuti A.E.**; Stavila C.; Chiriac H.; Lupu N, , Iasi, Romania.
3. „3D Cultures Enhanced Through Magnetic Levitation of MNP Loaded ADSCs” la National Online Conference of Biophysics-CNB 2020, autori Stavilă C.; **Minuti A.E.**; Labusca L., Brasov, Romania.
4. „Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles and STEM Cells, Triggers for Cancer Cells Apoptosis by Magneto-Mechanical Actuation” la The 65th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials (MMM 2020), autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N, Palm Beach, FL, USA
5. „Fe-Cr-Nb-B magnetic particles and STEM cells, triggers for cancer cells apoptosis by magnetomechanical Actuation” la European Magnetic Symposia - JEMS 2020, autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N, Lisabona, Portugalia.
6. „Cancer Cells Death Induced by Magneto-Mechanical Actuation of Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles Carried by Stem Cells to the Cancer Cells Area”, la International Magnetics Virtual Conference INTERMAG 2021, autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N, Lyon, Franta.
7. „High-drug-loading magnetic nanoplatforms” la International Conference "Progress in Organic and Macromolecular Compounds" 28th Edition, 2021, autori **Minuti A. E.**; Danceanu C. M.; Stavila C.; Chiriac H.; Lupu N.; Gherca D.; Borhan A.I.; Herea D.D.; Labusca L, Iasi, Romania.

8. „Fe-Co magnetic nanowires for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation” la 2022 Joint MMM-INTERMAG, autori Chiriac H.; **Minuti A. E.**; Ghemes A.; Herea D. D.; Labusca L.; Stoian G.; Lupu N., New Orleans, LA, SUA.
9. „Magnetic Nano Platforms for Enhancing Mesenchymal Stem Cells Chondrogenesis”, la International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society – ICRS 2022, autori Lăbușcă L.; Herea D. D.; **Minuti A.E.**; Dănceanu C.M.; Staviță C.; Chiriac H.; Lupu N, Berlin, Germania.
10. „Fe-Co Soft Magnetic Nanowires for Cancer Cell Destruction by Magneto-mechanical Actuation”, la 25th Soft Magnetic Materials Conference 2022, autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Ghemes A.; Herea D.; Lăbușcă L.; Stoian G.; Lupu N, Grenoble, Franta
11. „Fe-Cr-Nb-B soft magnetic particles transported by ADSC for cancer treatment”, la 25th Soft Magnetic Materials Conference 2022, autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Ghemes A.; Herea D.; Lăbușcă L.; Stoian G.; Lupu N, Grenoble, Franta
12. „STEM cells carriers of Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation”, la 13th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers 2022, autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Stavița C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu, University College London (UCL) Campus, UK.
13. „Human mesenchymal stem cells and nanomagnetic materials for regenerative medicine” la Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference 2022, autori Lăbușcă L.; Herea D.D.; Dănceanu C.; **Minuti A.E.**; Stavița C.; Chiriac H.; Lupu N, Cracovia, Polonia.
14. „Magnetic Nanowires for Cancer Cell Destruction by Magneto-mechanical Actuation”, la The XIII European Magnetic Sensors and Actuators Conference (EMSA 2022), autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Ghemes A.; Herea D.D.; Labusca L.; Stoian G.; Lupu N, Madrid, Spania.
15. „Establishing an attractive regenerative alliance: Human mesenchymal stem cells and nanomagnetic materials” la Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Chapter Conference 2022 - TERMIS AP, autori Labusca L.; Dănceanu C.; **Minuti A.E.**; Herea D.; Chiriac H.; Lupu N, Jeju, South Korea.
16. „Cancer cell destruction by magneto – mechanical actuation of nanowires compared with nano/micromagnetic particles” la 67th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials (MMM 2022), autori Chiriac H.; **Minuti A.E.**; Lupu N.

\*\*\*



**E. Capitole de carte**

1. „Magneto-mechanical actuation of magnetic particles for cancer therapy” în cartea „Magnetic sensors and actuators”, autori Horia Chiriac, **Anca-Emanuela Minuti**, Dumitru-Daniel Herea, Luminița Lăbușcă, Nicoleta Lupu, editura *Elsevier, Woodhead Publishing*, 2023