

Studiul efectelor induse de nanoparticule magnetice în celule normale și tumorale

—Rezumat teză de doctorat—

Doctorand:

Cristina SURDU (căs. STAVILĂ)

Conducător științific:

Prof. Dr. habil. Emilia Dorina CREANGĂ

IAȘI — 2024

Mulțumiri

Cu ocazia încheierii studiilor doctorale, aş dori să exprim cele mai sincere mulțumiri domnului prof. dr. Horia Chiriac pentru tema de cercetare propusă şi pentru coordonarea deosebită care a condus la rezultatele acestei cercetări.

De asemenea, adresez mulțumiri doamnei prof. dr. habil. Emilia Dorina Creangă pentru sprijinul constant, îndrumările prețioase şi încrederea pe care mi-a acordat-o pe tot parcursul doctoratului şi a elaborării tezei.

Recunoştinţa mea se îndreaptă şi către doamna CS I dr. Nicoleta Lupu pentru îndrumarea continuă şi susţinerea oferită pe durata realizării acestei lucrări.

Cu respect şi apreciere, mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, doamnei CS I dr. Nicoleta Lupu, domnului prof. dr. habil. Dan-Gheorghe Dimitriu şi domnului prof. dr. habil. Silviu-Octavian Gurlui, pentru încurajările şi recomandările constructive primite în timpul stagiului doctoral.

Aş dori să îmi exprim recunoştinţa faţă de colectivul Institutului Naţional de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică – INCDFT Iaşi, în special doamnei domnului CS II dr. Dumitru-Daniel Herea şi doamnei dr. CS III Luminiţa Lăbuşcă pentru sprijinul acordat.

Mulțumirile mele se îndreaptă şi către colegii din cadrul INCDFT Iaşi care au fost alături de mine, oferindu-mi suport tehnic şi moral pe tot parcursul cercetării.

În cele din urmă, doresc să mulțumesc familiei pentru suportul moral necondiţionat şi ajutorul constant de-a lungul anilor de studii doctorale.

Listă de abrevieri

- 2D – bidimensional
- 3D – tridimensional
- ACM – actuale în câmp magnetic
- ADM – mediului de cultură pentru diferențierea adipogenă
- ADN – acid dezoxiribonucleic
- ADSC – celulele stem mezenchimale derivate din țesut adipos
- ARN – acid ribonucleic
- As.Ac. – acid ascorbic
- CCM – mediu condrogenic complet
- Dex – dexametazonă
- DLS – Dispersia dinamică a luminii
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, mediu de cultură pentru celule
- DMMB – Dimetil-Metilen Blue
- ECM – matrice extracelulară
- FBS – ser fetal bovin
- FTIR – analiza spectrofotometrică în infraroșu cu transformată Fourier
- GAG – glucozaminoglicani
- GFP – filtru fluorescent la microscopul optic
- Hc – câmpul coercitiv
- HOS – celule de osteosarcom uman
- HR-SEM – microscopie electronică de scanare de înaltă rezoluție
- HR-TEM – microscopie electronică de transmisie de înaltă rezoluție
- IC₅₀ – cantitatea de medicament necesară pentru inhibarea creșterii a 50 % din populația de celule
- ICM – mediu condrogenic incomplet
- LDH – test de citotoxicitate
- MCC – mediu de cultură complet
- MMA – actuale magneto-mecanică
- MNE – nano-emulsii magnetice
- MNP – nanoparticule de magnetită
- MP – nanoparticule Fe-Cr-Nb-B
- Mr – magnetizație remanentă
- MTT – test de viabilitate celulară
- ODM – mediului de cultură pentru diferențierea osteogenă
- PBS – soluție tampon fosfat
- RFP – filtru fluorescent la microscopul optic
- ROS – specii reactive de oxigen
- SMF – câmp magnetic static

- SVF – fracția vasculară stromală
- TGF β -3 – factor de creștere în diferențierea condrogenică
- VSM – magnetometru cu probă vibrantă

Cuprins

Mulțumiri	1
Listă de abrevieri	2
Introducere	7
Capitolul 1. Interacțiunea nanoparticulelor magnetice expuse în câmpuri magnetice cu celulele umane	10
1.1. Nanoparticulele magnetice	10
1.1.1. Tipuri de nanoparticule magnetice	10
1.1.2. Dimensiuni, Forme și Proprietăți Magnetice	11
1.2. Culturi celulare	12
1.2.1. Celula: structură, componente și funcțiile acestora.....	12
1.2.2. Culturile celulare	12
1.2.3. Sferoizii celulari în cultură tridimensională 3D	14
1.3. Interacțiunea dintre nanoparticule magnetice, câmp magnetic și celule umane.....	15
1.3.1. Acțiunea nanoparticulelor magnetice asupra celulelor umane.....	15
1.3.2. Acțiunea câmpurilor magnetice asupra celulelor umane	16
1.3.3. Interacțiunea dintre nanoparticule magnetice, câmp magnetic și celule umane	16
Capitolul 2. Materiale și metode utilizate în cadrul acestei teze	18
2.1. Materiale și metode utilizate pentru identificarea acțiunii câmpului magnetic asupra celulelor încărcate cu nanoparticule cu potențial în medicina regenerativă.....	18
2.1.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de magnetită	18
2.1.2. Metode de recoltare folosite în cultura de celule stem adulte	19
2.1.3. Încărcarea celulelor stem cu nanoparticule de magnetită.....	19
2.1.4. Metodele folosite pentru diferențierea celulară.....	19
2.1.5. Evaluarea fibrelor citoscheletelor ADSC și WJMSC în câmp magnetic	20
2.2. Materiale și metode utilizate pentru identificarea acțiunii câmpului magnetic asupra celulelor încărcate cu nanoparticule Fe-Cr-Nb-B pentru tratament anti-tumoral.....	20
2.2.1. Prepararea nanoparticulelor magnetice $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$	20
2.2.2. Metode utilizate în caracterizarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B.....	21
2.2.3. Metoda de încărcare a medicamentelor pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B.....	21
2.2.4. Metode utilizate în evaluarea eliberării <i>in vitro</i> a Mitoxantronei sau Doxorubicinei de pe particulele Fe-Cr-Nb-B.....	22
2.2.5. Metode de evaluare a viabilității și citotoxicității culturilor celulare co-incubate cu nanoparticule magnetice Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX și DOX.....	23
2.2.6. Internalizarea particulelor magnetice Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX sau DOX în celulele ADSC și HOS	24

2.2.7. Metode de actuare magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX și DOX	24
2.2.8. Metoda de identificare a celulelor vii/moarte în urma actuării magneto-mecanice. Colorarea celulelor cu LIVE/DEAD	24
Capitolul 3. Proliferarea și diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în prezența câmpului magnetic	25
3.1. Proliferarea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în formă de sferoizi 3D sub acțiunea câmpului magnetic static	25
3.1.1. Caracterizarea nanoparticulelor magnetice	25
3.1.2. Evaluarea cantității de nanoparticule internalizate în celule	26
3.1.3. Obținerea sferoizilor celulari 3D sub acțiunea câmpului magnetic static	27
3.1.4. Câmpul magnetic static în diferențierea celulelor încărcate cu particule magnetice - diferențierea sferoizilor	28
3.2. Diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice actuate în câmp magnetic	31
3.2.1. Evaluarea diferențierii celulelor ADSC încărcate cu nanoparticule magnetice actuate în câmp magnetic	32
3.2.2. Diferențierea condrogenică a celulelor ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule magnetice sub influența actuării în câmp magnetic	33
Capitolul 4. Distrugerea celulelor canceroase prin actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale	36
4.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice $Fe_{68.2}Cr_{11.5}Nb_{0.3}B_{20}$	37
4.2. Adsorbția medicamentelor tumorale pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B	38
4.2.1. Cuantificarea medicamentelor tumorale adsorbite pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B prin metodă spectrofotometrică	38
4.3. Eliberarea medicamentelor antitumorale de pe particulele Fe-Cr-Nb-B	38
4.4. Internalizarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente în celulele de ADSC și HOS	41
4.5. Efectul nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale asupra viabilității celulare	42
4.6. Actuarea magneto-mecanică a particulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente în interiorul celulelor ADSCs și HOS	43
4.6.1. Viabilitatea celulelor ADSCs și HOS după actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu medicamente antitumorale	43
4.6.2. Determinarea celulelor vii și moarte după actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu medicamente antitumorale în celulele ADSCs și HOS prin testul Live/Dead	44
4.6.3. Actuarea magneto-mecanică a celulelor ADSCs care transportă nanoparticule încărcate cu medicament în cultura celulară de osteosarcom	45

5. Concluzii	48
• Bibliografie selectivă.....	50
• Diseminarea activității științifice	54
A. Articole publicate în reviste cotate ISI din domeniul tezei	54
B. Articole publicate în reviste cotate ISI din domenii conexe tezei	54
C. Lucrări prezentate de autoarea tezei la conferințe	55
D. Lucrări prezentate de alți autori la conferințe	55

Introducere

În ultimele decenii, cercetarea în domeniul nanoparticulelor magnetice a cunoscut o dezvoltare exponențială, având aplicații semnificative în biomedicină, inginerie și științele materialelor. Nanoparticulele magnetice sunt structuri de dimensiuni nanometrice, cu proprietăți magnetice deosebite, care le fac ideale pentru o gamă largă de aplicații biomedicale, inclusiv imagistica prin rezonanță magnetică, livrarea țintită a medicamentelor și terapii antitumorale.

Nanoparticulele magnetice pot juca un rol semnificativ în acest proces prin influențarea mediului celular și a mecanismelor de semnalizare. Atunci când celulele încărcate cu nanoparticule magnetice sunt expuse la câmpuri magnetice, se pot genera forțe mecanice care influențează structura citoscheletului și căile de semnalizare intracelulară.

Una dintre aplicațiile nanoparticulelor magnetice este eliberarea controlată a medicamentelor. Nanoparticulele pot fi încărcate cu medicamente terapeutice, cum ar fi medicamentele antiinflamatoare sau cele antitumorale, și dirijate către locul țintă utilizând un câmp magnetic extern. Această metodă permite o eliberare localizată a medicamentului, reducând astfel efectele secundare sistemice și crescând eficacitatea tratamentului.

Actuarea magneto-mecanică reprezintă o metodă inovatoare de tratament al cancerului, utilizând nanoparticule magnetice pentru a induce stres mecanic asupra celulelor tumorale. Prin aplicarea unui câmp magnetic alternativ, nanoparticulele aflate în interiorul celulelor canceroase suferă mișcări mecanice care pot provoca distrugerea celulelor tumorale prin diverse mecanisme, inclusiv perturbarea membranei celulare, ruperea membranei lizozomale și inducerea apoptozei ce duce la moarte celulară.

Scopul aceste teze/lucrări de doctorat, este de a investiga modul în care nanoparticulele magnetice, în prezența câmpurilor magnetice, influențează comportamentul celulelor umane. În particular, se dorește evidențierea prin care aceste nanoparticule pot modula procesele celulare precum proliferarea, diferențierea și apoptoza. De asemenea, lucrarea urmărește să contribuie la dezvoltarea unor noi abordări terapeutice bazate pe utilizarea nanoparticulelor magnetice, atât în medicina regenerativă, unde ar putea stimula diferențierea celulară ce duce la regenerarea țesuturilor, cât și în tratamentele antitumorale, unde ar putea crește eficacitatea terapiilor existente și reduce efectele secundare.

În experimentele realizate au fost utilizate trei surse de celule. Celulele stem mezenchimale reprezentate de celulele stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSC) și celulele stem mezenchimale din gelatina Wharton (WJMSC). Aceste celule provin din surse abundente (țesut adipos obținut prin liposucție sau gelatina Wharton provenită din cordonul ombilical), cu capacitate multipotentă a celulelor (diferențierea în numeroase tipuri de celule) și posibilitatea de a fi recoltate în acord cu condițiile etice și consimțământul informat. Celulele stem contribuie la vindecarea țesuturilor afectate și au capacitatea de țintire a zonelor inflamate. Din acest motive, aceste celule au fost selectate pentru experimentele din cadrul acestei teze.

Al treilea tip de celule sunt celulele de osteosarcom uman, prescurtate HOS. Acesta este un tip de carcinom uman, ce se dezvoltă în cancerul de os. Este un tip agresiv prezent în special la copii, adolescenți și adulți tineri și din păcate are o rată de supraviețuire mică. Unele tulpini din acest cancer prezintă rezistență la tratamentele antitumorale. Din acest motiv această tulpină de cancer osos a fost selectată pentru teste în cadrul acestei teze.

În cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică s-au realizat anterior experimente ce au implicat actuaarea magneto-mecanică a particulelor Fe-Cr-Nb-B pentru distrugerea celulelor canceroase. Pe baza acestor studii, în continuare, în această teză de doctorat am dezvoltat o metodă cu eficiență crescută ce a implicat încărcarea acestor nanoparticule cu medicamente antitumorale și actuaarea magneto-mecanică. Sinergia dintre aceste două mecanisme a dus la o eficiență sporită și la un timp mai scurt de tratament, cu efecte adverse reduse.

Această lucrare este compusă din 4 capitole, concluzii și bibliografie.

Capitolul 1. Interacțiunea nanoparticulelor magnetice expuse în câmpuri magnetice cu celulele umane

Acest capitol conține o prezentare a literaturii de specialitate privind nanoparticulele magnetice și câmpurile magnetice, detaliind tipurile și proprietățile acestora. Se descriu câmpurile magnetice statice și variabile, diferențele și aplicabilitatea fiecăruia în diverse contexte. Sunt prezentate diferitele tipuri de nanoparticule magnetice, inclusiv oxizi de fier, ferite și nanoparticule compozite, subliniind caracteristicile specifice fiecărui tip. De asemenea, se menționează modurile prin care nanoparticulele și câmpurile magnetice interacționează cu celulele umane, inclusiv procesele de internalizare, influența asupra viabilității și proliferării celulare, precum și mecanotransducția și efectele actuaării magneto-mecanice asupra structurilor celulare.

Capitolul 2. Materiale și metode utilizate în cadrul acestei teze

Acest capitol descrie detaliat materialele și metodele utilizate pentru realizarea experimentelor. Prima secțiune se concentrează pe sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de magnetită, prin proceduri hidrotermale și mecano-chimice utilizate. Sunt prezentate sursele de celule stem adulte, metodele de recoltare și tehnicile de încărcare a celulelor cu nanoparticule de magnetită. Metodele de cuantificare a potențialului de proliferare și diferențiere a celulelor în prezența câmpurilor magnetice sunt descrise în detaliu. A doua secțiune se concentrează pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B, incluzând metodele de obținere și caracterizare, procedurile de încărcare a medicamentelor antitumorale și evaluarea eliberării acestora. Sunt descrise metodele de actuaare magneto-mecanică și evaluarea viabilității și citotoxicității celulelor în prezența nanoparticulelor magnetice.

Capitolul 3. Proliferarea și diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în prezența câmpului magnetic

Acest capitol prezintă în detaliu efectele câmpurilor magnetice statice asupra proliferării și diferențierii celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice. Se prezintă metodele de formare a sferoizilor sub influența câmpului magnetic static, de evaluare a viabilității proliferării și diferențierii sferoizilor celulari și motilității celulare.

În continuare a fost evaluată viabilitatea și diferențierea celulară (adipogeneză, osteogeneză) în funcție de timpii de actuare în câmp magnetic (ACM) a celulelor ADSC încărcate cu nanoparticule de magnetită. După stabilirea timpilor de expunere în câmp magnetic s-a testat diferențierea condrogenică comparativă a celulelor ADSC și WJMSC. Rezultatele obținute arată modul în care câmpurile magnetice pot modula comportamentul celulelor, stimulând procesele de regenerare și diferențiere în celule stem mezenchimale.

Capitolul 4. Distrugerea celulelor canceroase prin actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale

Capitolul patru prezintă rezultatele privind utilizarea nanoparticulelor magnetice Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamentele mitoxantronă (MTX) și doxorubicină (DOX) pentru tratamentul cancerului. Sunt detaliate eficiența încărcării medicamentelor pe particulele de Fe-Cr-Nb-B și curbele de eliberare ale acestora pe parcursul a 72 de ore la pH de 4,5, 6 și 7,4, precum și modelele matematice ce caracterizează eliberarea. De asemenea, sunt descrise în detaliu metodele de actuare magneto-mecanică și rezultatele obținute în ceea ce privește viabilitatea și citotoxicitatea celulelor canceroase în urma tratamentului cu nanoparticule Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente. Se discută modul prin care actuarea magneto-mecanică poate induce apoptoza în celulele tumorale și sunt prezentate imagini de microscopie ce prezintă celulele vii și moarte după actuare, demonstrând eficacitatea sinergiei dintre câmp magnetic și medicamente antitumorale, pentru dezvoltarea unor terapii mai eficiente și mai puțin invazive.

Menționăm că cercetările acestei teze au fost efectuate în baza unor contracte de cercetare ale INCDTF. De asemenea, în cadrul tezei au fost utilizate și resurse din fondurile destinate doctoranzilor universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

Capitolul 1. Interacțiunea nanoparticulelor magnetice expuse în câmpuri magnetice cu celulele umane

În cadrul acestei lucrări de doctorat am studiat influența câmpului magnetic și a nanoparticulelor magnetice asupra proceselor și mecanismelor celulare, cu accent pe proliferarea și diferențierea celulelor stem. Celulele stem sunt singurele celule capabile de diferențiere în celule cu funcție definită. Aceste celule provin din surse abundente și corespund tuturor cerințelor pentru utilizarea în posibile terapii regenerative. Celulele stem prezintă o capacitate superioară de internalizare a particulelor magnetice.

De asemenea, în cadrul acestei teze, am studiat, procesul de distrugere a celulelor canceroase de osteosarcom uman prin efect magneto-mecanic, utilizând particule de Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente anti-tumorale.

Pentru a evalua impactul asupra celulelor umane, s-au utilizat atât câmpuri magnetice staționare, generate de magneți permanenți precum NdFeB, cât și câmpuri magnetice variabile, produse în sisteme de bobine, la frecvențe joase și intensități moderate. Aceste experimente au avut ca scop să ofere o înțelegere mai profundă a modului în care interacțiunile între câmpurile magnetice și particulele magnetice pot afecta comportamentul celular, inclusiv în ceea ce privește diferențierea celulară și terapia cancerului.

1.1. Nanoparticulele magnetice

Nanoparticulele magnetice (MNP) sunt structuri extrem de mici, de ordinul nanometrilor, care posedă proprietăți magnetice remarcabile. Acestea au câștigat o atenție considerabilă în diverse domenii științifice și tehnologice, datorită aplicațiilor potențiale în biomedicină, mediu și electronică. Proprietățile unice ale MNP sunt determinate de dimensiunile lor mici, compoziția chimică specifică și forma lor, care le conferă caracteristici magnetice distincte.

1.1.1. Tipuri de nanoparticule magnetice

Nanoparticulele magnetice sunt clasificate în funcție de materialul din care sunt compuse și de comportamentul lor magnetic. Cele mai comune tipuri de MNP includ: oxizi de fier, ferite, nanoparticule metalice și nanoparticule compozite.

1.1.1.1. Oxizii de Fier

Magnetita (Fe_3O_4) este unul dintre cei mai utilizați oxizi de fier în aplicațiile biomedicale. Nanoparticulele de magnetită pot fi superparamagnetice la dimensiuni mici și pot fi ușor funcționalizate pentru diverse aplicații. Nanoparticulele SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) sunt utilizate în domeniul medical pentru imagistica prin rezonanță magnetică, datorită proprietăților lor superparamagnetice care permit îmbunătățirea contrastului și vizualizarea mai clară a structurilor biologice. Magnetita este intens studiată pentru aplicații medicale: agent de contrast în imagistica prin rezonanță magnetică, tehnici de livrare țintită a medicamentelor și genelor, inginerie tisulară și medicină regenerativă, tratamente anticancer [1].

Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) este un alt oxid de fier important, cunoscut pentru stabilitatea sa chimică și proprietățile superparamagnetice la dimensiuni nanometrice. Nanoparticulele de maghemită sunt utilizate în aplicații similare cu cele ale magnetitei, inclusiv în terapii hipertermice și în separarea magnetică [2].

1.1.1.2. Nanoparticule Compozite

Nanomaterialele magnetice compozite reprezintă o categorie de materiale care combină proprietățile magnetice unice ale nanoparticulelor cu avantajele mecanice și fizice ale unei matrice convenționale. Aceste materiale sunt formate prin integrarea nanoparticulelor magnetice, cum ar fi ferite sau nanoparticulele de fier, acoperindu-le cu un înveliș polimeric, ceramic sau metalic, rezultând compozite cu performanțe îmbunătățite și noi funcționalități.

De asemenea, din categoria materialelor magnetice compozite fac parte și particulele formate din aliaje, de exemplu: Fe-Pt, Fe-Pd, Co-Pt, Fe-Cr-Nb-B. Nanoparticulele magnetice compozite formate din aliaje sunt constituite din două sau mai multe metale, care pot fi dispuse într-o structură core-shell (nucleu-înveliș) sau într-o structură omogenă. Această combinație permite ajustarea proprietăților magnetice, termice și chimice ale nanoparticulelor prin variația compoziției și a metodei de sinteză [3].

1.1.2. Dimensiuni, Forme și Proprietăți Magnetice

Dimensiunile nanoparticulelor magnetice variază de obicei între 1 și 100 nanometri. Forma lor poate influența semnificativ proprietățile magnetice și aplicabilitatea. Dimensiunea nanoparticulelor magnetice afectează semnificativ comportamentul lor magnetic. În general, nanoparticulele magnetice prezintă două regimuri magnetice principale: superparamagnetism și feromagnetism.

Superparamagnetismul se manifestă atunci când dimensiunile nanoparticulelor sunt sub o anumită limită critică (de obicei sub 10 nm pentru magnetită). În acest regim, fiecare nanoparticulă poate fi considerată un singur domeniu magnetic, și momentele magnetice ale particulelor pot fluctua liber. Acest fenomen conduce la o magnetizație netă zero în absența unui câmp magnetic extern și o magnetizare rapidă și complet reversibilă în prezența unui câmp magnetic [4].

Nanoparticulele prezintă comportament feromagnetic, similar cu materialele magnetice convenționale atunci când au dimensiuni mai mari decât o limită critică. Acestea conțin mai multe domenii magnetice și pot avea anizotropie magnetică [5].

Forma nanoparticulelor magnetice este determinantă pentru proprietățile lor magnetice și funcționale. Acestea pot fi sintetizate în diferite forme, cum ar fi: sferice, cubice, elipsoidale, discuri, nanofire, dendritice sau forme mai complexe precum tije sau forme neregulate [6]. Alegerea formei potrivite este esențială pentru optimizarea performanței lor în aplicații specifice.

Încărcarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B cu cele două medicamente antitumorale s-a realizat prin combinația a două metode descrise mai sus. Metoda de funcționalizare fizică prin

interacțiuni van der Waals și forțe electrostatice, dar și metoda covalentă prin legătura metal-oxigen confirmată prin FT-IR.

1.2. Culturi celulare

1.2.1. Celula: structură, componente și funcțiile acestora

Celulele umane reprezintă unitatea fundamentală a vieții, fiind elementele constitutive ale tuturor țesuturilor și organelor din corpul uman. Fiecare tip de celulă din corp are o funcție specifică și este adaptată pentru a îndeplini anumite sarcini, de la celulele musculare care permit mișcarea, la neuronii care transmit impulsuri nervoase. Studiul celulelor umane și utilizarea culturilor celulare au revoluționat biologia și medicina, permițând descoperiri semnificative în ceea ce privește înțelegerea mecanismelor bolilor, dezvoltarea de noi terapii și testarea medicamentelor.

Celulele umane sunt eucariote, adică au un nucleu bine definit care conține materialul genetic (ADN). În interiorul acestora sunt prezente organite specializate, cum ar fi mitocondriile, care sunt responsabile de producerea energiei, reticulul endoplasmatic, care participă la sinteza proteinelor și lipidelor, și aparatul Golgi, care este implicat în modificarea, sortarea și transportul proteinelor [7].

Unul dintre organitele importante din celulă este lizozomul. Lizozomii sunt organite sferice, care conțin enzime hidrolitice ce sunt capabile să degradeze diverse tipuri de macromolecule, cum ar fi proteine, lipide, carbohidrați și acizi nucleici.

Toate structurile enumerate mai sus sunt încapsulate de o membrană celulară. Membrana este stratul bilipidic exterior ce permite transportul substanțelor prin diverse mecanisme. Transportul pasiv se realizează atunci când moleculele se deplasează de-a lungul gradientului lor de concentrație fără consum de energie. Transportul activ are loc când moleculele sunt transportate împotriva gradientului lor de concentrație, utilizând energie. Iar endocitoza și exocitoza reprezintă procese prin care celula internalizează materiale (endocitoză) sau elimină produse de excreție și secreție (exocitoză) prin vezicule membranare [8].

Componenta ce se află între nucleu și membrană se numește citoplasmă. În interiorul citoplasmei se află toate organitele celulare, dar și partea ce îi oferă rezistență, și anume citoscheletul celular. Citoscheletul este o rețea de fibre proteice care se extinde prin citoplasmă, oferind suport structural și facilitând mișcarea și transportul intracelular. Citoscheletul este compus din trei tipuri principale de filamente acestea fiind microtubulii, microfilamentele și filamentele intermediare. Citoscheletul determină forma și deplasarea unei celule, în timp ce generează și transmite semnale mecanice ce apoi influențează soarta acelei celule [9].

1.2.2. Culturile celulare

Culturile celulare reprezintă tehnica de creștere a celulelor într-un mediu controlat, în afara organismului viu. Culturile celulare au devenit un instrument esențial în cercetarea biomedicală, oferind un model simplificat și controlabil pentru studierea proceselor biologice complexe.

1.2.2.1. Celule normale și celule canceroase în cultură monostrat 2D

Celulele normale și celulele canceroase reprezintă două tipuri fundamentale de celule în organism, având caracteristici distincte care le separă în mod semnificativ. Înțelegerea acestor diferențe este esențială pentru cercetările în domeniul biologiei celulare și oncologiei, deoarece oferă perspective asupra mecanismelor care stau la baza dezvoltării cancerului și a potențialelor strategii terapeutice.

Celulele normale sunt unitățile de bază ale organismelor vii, descrise printr-o serie de caracteristici esențiale:[10]

- ✓ Ciclu celular regulat - celulele normale au un ciclu celular strict controlat de diverse puncte de control și semnale moleculare care asigură diviziunea celulară ordonată și corectă.
- ✓ Apoptoza - un mecanism vital pentru menținerea homeostaziei tisulare este apoptoza, un proces programat de moarte celulară care elimină celulele deteriorate sau inutile.
- ✓ Comunicare intercelulară - celulele normale comunică eficient prin semnale chimice și conexiuni fizice, menținând funcționarea coordonată a țesuturilor și organelor.
- ✓ Diferențiere și specializare - în funcție de tipul de țesut, celulele normale se diferențiază pentru a îndeplini funcții specifice, contribuind la complexitatea și funcționalitatea organismului.

Celulele canceroase, pe de altă parte, se abat de la aceste caracteristici normale și prezintă modificări patologice care conduc la dezvoltarea tumorilor și la metastază:[10]

- ✓ Proliferare necontrolată - celulele canceroase se divid necontrolat și formează mase tumorale.
- ✓ Evitarea apoptozei - aceste celule dezvoltă mecanisme pentru a evita apoptoza, permițându-le să supraviețuiască și să se acumuleze.
- ✓ Angiogeneza - pentru a susține creșterea rapidă, celulele canceroase induc formarea de noi vase de sânge pentru a asigura aportul necesar de nutrienți și oxigen.
- ✓ Metastazele - un aspect critic al cancerului este capacitatea celulelor canceroase de a invada țesuturile adiacente și de a se răspândi în alte părți ale corpului prin intermediul sistemului sanguin sau limfatic.

Celulele de osteosarcom uman

Osteosarcomul este un tip agresiv de cancer osos care afectează în principal copii și tineri adulți. Acesta reprezintă cel mai comun tip de sarcom osos malign și se caracterizează prin formarea de țesut osos neorganizat de către celulele tumorale de osteosarcom (HOS). Incidența maximă a osteosarcomului este observată în perioada adolescenței, care coincide cu perioadele de creștere rapidă a oaselor. Celulele de osteosarcom uman (HOS) sunt utilizate extensiv în cercetările oncologice pentru a înțelege mecanismele moleculare și genetice ale bolii. Aceste celule sunt derivate din tumori osoase maligne și sunt cultivate *in vitro* pentru a studia caracteristicile comportamentale ale cancerului, cum ar fi rata de proliferare, capacitatea de invazie și potențialul metastatic [11].

1.2.2.1.1. Celule stem umane

Celulele stem sunt celule primare care au capacitatea unică de a se diferenția, transformându-se în diverse tipuri de celule specializate și de a se auto-reînnoi pentru perioade lungi prin diviziune celulară. Celulele stem prezintă capacități superioare de proliferare celulară definită prin creșterea accelerată a numărului de celule. Acestea joacă un rol remarcabil în dezvoltarea și regenerarea organismului uman. Există două tipuri principale de celule stem: celule stem embrionare și celule stem adulte.

Celule stem adulte

Celulele stem adulte sunt găsite în țesuturile mature și au o capacitate limitată de a se diferenția în diferite tipuri de celule. Două tipuri importante de celule stem adulte sunt celulele stem derivate din țesut adipos (ADSC) și celulele stem din gelatina Wharton a cordonului ombilical (WJMSC).

ADSC sunt celule stem multipotente obținute din țesutul adipos și oferă o alternativă promițătoare la alte tipuri de celule stem, cum ar fi celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă, datorită abundenței și ușurinței de extracție. ADSC sunt celule stem mezenchimale care prezintă abilitatea de a se diferenția, adică transforma, în diverse tipuri de celule, inclusiv osteocite (os), condrocite (cartilaj), adipocite (țesut adipos), miocite (mușchi) și neurocite (neuroni) [12]. ADSC reprezintă o sursă valoroasă de celule stem pentru medicina regenerativă datorită capacității lor de diferențiere multipotente și a accesibilității lor.

Celule Stem din Gelatina Wharton sunt celule stem mezenchimale, celule primare izolate din gelatina Wharton a cordonului ombilical. Gelatina Wharton este o substanță gelatinoasă în care sunt încorporate vasele de sânge ale cordonului ombilical și reprezintă sursa principală de WJ-MSC. Aceste celule au o mare capacitate de proliferare și potențial multipotent, fiind capabile să se diferențieze în osteoblaste, condrocite și adipocite, miocite și neurocite, similar cu celulele ADSC. Avantajele utilizării WJMSC sunt accesibilitatea, deoarece sunt colectate din cordon la momentul nașterii, nu implică probleme etice, riscuri minime pentru donatori (mamă și copil). Datorită caracteristicilor lor unice, WJMSC sunt studiate intens pentru aplicații în medicina regenerativă și tratamente pentru boli degenerative [13].

1.2.3. Sferoizii celulari în cultură tridimensională 3D

Sferoizii celulari sunt formați din celule printr-o metodă de cultură celulară tridimensională (3D) care a câștigat popularitate în ultimele decenii datorită capacității lor de a reproduce mai exact mediul *in vivo* comparativ cu culturile celulare monostrat bidimensionale (2D). Aceste structuri 3D sunt formate prin agregarea celulelor în culturi suspendate, permițând celulelor să interacționeze în moduri mai complexe și mai naturale.

Sferoizii permit formarea unor micro-ambiente variate, cu celule de același tip sau tipuri diferite care interacționează între ele. Celulele sunt aranjate într-un mod care imită arhitectura țesuturilor *in vivo*, ceea ce permite studii mai realiste ale comportamentului celular. Această structură prezintă gradient de oxigen, nutrienți și factori de creștere, similare cu cele observate

în țesuturile naturale ale omului. De asemenea, celulele din interiorul sferoizilor formează legături între ele, formând astfel o matrice extracelulară (ECM) [14].

Sferoizii magnetici, formați din celule încărcate cu nanoparticule magnetice, reprezintă o abordare inovatoare în cultura celulară, permițând formarea de agregate celulare tridimensionale sub influența câmpurilor magnetice. Această metodă facilitează interacțiunile celulare naturale și recreează mai fidel micro-ambientul tisular, oferind un model superior pentru studiile de viabilitate și diferențiere celulară.

1.3. Interacțiunea dintre nanoparticule magnetice, câmp magnetic și celule umane

1.3.1. Acțiunea nanoparticulelor magnetice asupra celulelor umane

Nanoparticulele magnetice pot interacționa cu celulele umane într-o varietate de moduri, influențate de proprietățile particulelor și de condițiile experimentale. Acestea ar trebui să aibă anumite caracteristici bine definite. Forma și dimensiunea nanoparticulei este importantă pentru modul de internalizare a acestora în celulă, dar și pentru structurile în care acestea ajung, lizozomi, nucleu, citoplasmă sau pe fibrele citoscheletului celular.

Interacțiunea dintre nanoparticulele magnetice și celulele umane poate fi descrisă prin prisma mai multor mecanisme. Endocitoza se realizează prin vezicule formate în membrana celulară de dimensiuni mai mici sau în macropinocitoza - procesul de ingerare a cantităților mai mari de lichid extracelular în care se află și nanoparticule magnetice. De asemenea, MNP se pot adsorbi la suprafața celulară prin interacțiuni cu proteinele și lipidele membranare. În unele cazuri, nanoparticulele magnetice pot fi absorbite prin fagocitoză, prin formarea veziculelor mari din membrana celulară, facilitând livrarea de medicamente sau alte molecule terapeutice în interiorul celulelor [15].

Nanoparticulele magnetice trebuie să fie biocompatibile și să permită funcționalizarea cu diferiți polimeri, medicamente, anticorpi sau fluorocromi pentru a putea fi urmărite în interiorul celulelor. Faptul că prezintă proprietăți magnetice le permite a fi manipulate și controlate prin aplicarea câmpurilor magnetice externe.

Un criteriu important pentru MNP este compoziția acestora. Compoziția trebuie să conțină elemente biocompatibile sau aliajul din care sunt formate MNP trebuie să nu fie citotoxic. Aceste criterii se confirmă pe baza testului de viabilitate celulară numit MTT, care identifică rata de supraviețuire a celulelor în dependență de activitatea mitocondrială, prin raportul dintre celulele expuse la anumiți factori (în cazul de față nanoparticule sau câmpuri) comparativ cu un control (celule ce nu sunt expuse la stresori) [16]. Testele de citotoxicitate, de exemplu testul LDH, identifică celulele ce prezintă rupturi ale membranei și eliberarea enzimelor intracelulare în mediu de cultură. Aceste enzime sunt identificate și se calculează procentul acestor celulele afectate [17].

Un alt parametru identificat în cazul celulelor ce conțin nanoparticule magnetice este proliferarea crescută, adică numărul celulelor este mai mare în cazul celulelor ce au internalizat particule comparativ cu controlul. Proliferarea se evaluează de asemenea prin teste de viabilitate, de obicei testul MTT [18].

1.3.2. Acțiunea câmpurilor magnetice asupra celulelor umane

Câmpurile magnetice au fost utilizate pe scară largă în cercetarea biomedicală pentru a influența diverse procese biologice. Deși majoritatea studiilor s-au concentrat pe celulele încărcate cu nanoparticule magnetice, câmpurile magnetice influențează și celulele care nu conțin astfel de particule.

Câmpurile magnetice pot interacționa cu celulele prin intermediul a diferite mecanisme fizico-chimice. Deși celulele fără nanoparticule magnetice nu prezintă susceptibilitate magnetică semnificativă, moleculele paramagnetice sau diamagnetice din interiorul celulelor pot răspunde la câmpuri magnetice puternice, de exemplu cele ce conțin ioni de Fe prezenți în metabolismul tuturor celulelor vii. De asemenea, câmpurile magnetice pot influența canalele ionice, afectând astfel echilibrul ionic și potențialele membranare ale celulelor. Această influență asupra canalelor ionice poate rezulta în modificarea ratei de proliferare sau diferențiere a celulelor [19]. Câmpurile magnetice pot modula nivelurile de specii reactive de oxigen (ROS), care joacă un rol decisiv în semnalizarea celulară ce declanșează cascade de semnalizare și ulterior schimbări în expresia genică, proliferare, apoptoză și alte procese intracelulare [20].

În general, există multe studii despre influența câmpurilor magnetice statice sau variabile asupra creșterii celulare, dar concluziile lor sunt adesea contradictorii. Anterior, unii oameni de știință au constatat că câmpurile magnetice statice pot avea un efect benefic asupra ritmului de proliferare celulară, migrării și diferențierii celulelor stem din pulpa dentară [21], promovarea osteogenezei la celulele stem mezenchimale, [22] Studiile din literatură au evidențiat diverse efecte biologice induse de câmpurile magnetice variabile. Câmpurile magnetice variabile au fost asociate cu modificări morfologice și intracelulare care favorizează diferențierea celulară osteogenă [23].

1.3.3. Interacțiunea dintre nanoparticule magnetice, câmp magnetic și celule umane

Pe lângă procesele individuale ce se desfășoară în interiorul celulei cauzate separat fie de nanoparticulele magnetice, fie de câmpurile magnetice, există procese ce pot avea loc atunci când toate aceste trei elemente - nanoparticulele, câmpul magnetic și celulele sunt combinate sinergic. Un aspect deosebit de important legat de nanoparticule este capacitatea lor de a influența mecanotransducția celulară prin interacțiunea cu câmpurile magnetice.

Mecanotransducția se referă la procesele prin care celulele convertesc stimulii mecanici în semnale biochimice, esențiale pentru funcționarea celulară și homeostazia tisulară. Mecanotransducția poate fi realizată prin expunerea nanoparticulelor magnetice în câmp magnetic atunci când se află în interiorul celulelor. Atunci când nanoparticulele magnetice sunt expuse unui câmp magnetic, ele pot genera forțe mecanice asupra celulelor. Aceste forțe pot influența structura celulară și semnalizarea mecanică prin mai multe mecanisme [24].

Câmpurile magnetice pot manipula direct MNP internalizate sau ancorate pe suprafața celulelor, generând forțe mecanice care pot afecta citoscheletul și membrana celulară. De asemenea, forțele mecanice generate de MNP pot activa canalele ionice sensibile la stimuli mecanici, modificând homeostazia ionică și declanșând cascade de semnalizare intracelulară.

Un alt mecanism al mecanotransducției este atunci când MNP ancorate la membrana celulară pot modifica tensiunea membranei, influențând și activând căile de semnalizare dependente de tensiune [25].

Actuarea magneto-mecanică (MMA) este o tehnică avansată care folosește nanoparticule magnetice prin actuarea mecanică a acestor particule în câmpuri magnetice de joasă frecvență. Nanoparticulele magnetice, expuse acestor câmpuri, suferă mișcări mecanice încercând să își alinieze momentele magnetice cu direcțiile câmpurilor aplicate. Aceste mișcări generează forțe mecanice prin care nanoparticulele sunt capabile să manipuleze sau să acționeze asupra bio-moleculilor sau structurilor celulare din vecinătate [26].

Actuarea magneto-mecanică implică utilizarea câmpurilor magnetice pentru a genera forțe mecanice asupra celulelor. În dependență de tipul nanoparticulelor și localizarea acestora în interiorul celulelor, MMA distruge celulele canceroase prin inducerea stresului mecanic, care afectează integritatea structurală a celulelor, cum ar fi ruperea membranei lizozomale și vărsarea conținutului acid și ulterior inducerea apoptozei celulare. Utilizarea nanoparticulelor magnetice încărcate cu medicamente poate amplifica acest efect, oferind o abordare combinată pentru tratamentele anti-tumorale.

În cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică, au fost dezvoltate nanoparticule din aliaj metalic cu compoziția Fe-Cr-Nb-B, de dimensiune 30-200 nm și o anizotropie de formă mare. Proprietățile magnetice superioare ale acestor particule au permis dezvoltarea experimentelor pe culturile celulare canceroase, folosind efectul magneto-mecanic în distrugerea celulară. Pe baza acestor studii, am continuat cu experimentele prezentate în această teză.

Capitolul 2. Materiale și metode utilizate în cadrul acestei teze

Acest capitol ce descrie materialele și metodele folosite în această teză este compus din două secțiuni. Prima secțiune va descrie materialele și metodele folosite pentru ”**Capitolul 3. Proliferarea și diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în prezența câmpului magnetic**”. Această secțiune conține detalii importante despre nanoparticulele de magnetită, în special sinteza și caracterizarea acestora, dar și informații despre sursele de celule utilizate și metodele de recoltare. De asemenea, această secțiune dezvăluie metodele de încărcare a celulelor cu nanoparticule de magnetită și interacțiunea acestora cu câmpurile magnetice. Vor fi descrise și metodele de cuantificare a potențialului de proliferare și diferențiere a celulelor în urma interacțiunii cu nanoparticulele și câmpurile statice și variabile. Prima secțiune este dedicată acțiunii câmpului magnetic asupra celulelor încărcate cu nanoparticule cu potențial în medicina regenerativă.

A doua parte a capitolului 2 este axată pe materialele și metodele utilizate în ”**Capitolul 4. Distrugerea celulelor canceroase prin actiunea magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale**”. Această secțiune conține detalii despre nanoparticulele de Fe-Cr-Nb-B, metoda de obținere și caracterizarea acestora. În continuare a fost detaliat procesul de încărcare a medicamentelor mitoxantronă sau doxorubicină pe suprafața nanoparticulelor și eliberarea de pe acestea. Procesul de încărcare și eliberare a fost realizat printr-o metodă spectrofotometrică, cu metoda sacilor de dializă îmbunătățită, descrisă în continuare. Eliberarea medicamentelor de pe suprafața nanoparticulelor a fost interpretată prin 5 modele matematice. Apoi a fost descrisă și caracterizată interacțiunea dintre aceste particule cu proprietăți magnetice speciale și celulele ADSC/HOS. S-au pus în evidență diferite procese celulare în urma acțiunii magneto-mecanice a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente anti-tumorale, prin teste specifice fiecărui proces cum ar fi: testul de viabilitate, testul de citotoxicitate, evidențierea celulelor vii/moarte și structura și morfologia nucleelor în urma acestor influențe.

2.1. Materiale și metode utilizate pentru identificarea acțiunii câmpului magnetic asupra celulelor încărcate cu nanoparticule cu potențial în medicina regenerativă

2.1.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de magnetită

Sinteza nanoparticulelor de magnetită - Fe_3O_4 a fost realizată conform unei metode hidrotermală mecano-chimice modificate. 2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ au fost dizolvate în 4 mL de apă deionizată și 0,5 mL de HCl a fost adăugat într-o soluție de 50 mL de apă fierbinte care conținea 0,8 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Apoi a fost adăugat 15 g de NaOH în stare solidă și s-a amestecat rapid până când soluția a devenit neagră. După adăugarea a 100 mL de apă, sub agitare mecanică, încălzirea a fost oprită. Soluția rezultată a fost amestecată încă 30 de minute. MNP au fost separate magnetic și spălate până când pH-ul soluției a ajuns la 6,5.

2.1.2. Metode de recoltare folosite în cultura de celule stem adulte

2.1.2.1. Recoltarea celulelor stem mezenchimale derivate din țesutul adipos (ADSC)

Celulele stem mezenchimale din țesutul adipos (ADSC) au fost obținute de la donatori sănătoși care au suferit proceduri de liposucție în scopuri cosmetice, după obținerea aprobării etice de la comitetul instituțional și consimțământul informat scris al pacienților. Lipoaspiratul a fost procesat în termen de 24 de ore de la intervenția chirurgicală. Lipoaspiratul a fost spălat cu PBS, digerat enzimatic cu collagenază de tip I (0,01 mg/mL), după centrifugare, celulele sedimentate au fost resuspendate în mediu complet de cultură (MCC) compus din DMEM, 10% ser fetal bovin (FBS), și 2% antibiotic/antimicotic, apoi numărate cu ajutorul unui numărător automat de celule TC20™.

2.1.2.2. Recoltarea celulelor stem mezenchimale din gelatina Wharton din cordonul ombilical (WJMSC)

Cordul ombilical de la o pacientă sănătoasă, colectat la nașterea la termen, a fost preluat cu consimțământul informat semnat și transportat la laborator în primele 4 ore de la naștere. Gelatina Wharton a fost separată cu grijă de vasele de sânge, spălată cu o soluție de PBS cu antibiotic, tăiată, plasată în plăci cu șase godeuri în mediu de cultură complet și păstrată în incubator.

2.1.3. Încărcarea celulelor stem cu nanoparticule de magnetită

Celulele ADSC și WJMSC în pasajele 2–4 au fost plasate în flacoane de cultură celulară și crescute până la o confluență de 85%–90%. MNP de magnetită în concentrațiile corespunzătoare experimentului descris, au fost adăugate în mediul de cultură și co-incubate. După 24 de ore, celulele au fost spălate de două ori cu PBS și eventual detașate pentru a fi plasate în plăci de 96 de godeuri pentru experimente ulterioare.

2.1.4. Metodele folosite pentru diferențierea celulară

Protocoloalele pentru diferențierea celulară sunt comune pentru toate tipurile de celule: ADSC, ADSC-MNP, ADSC provenite din sferoizi cu și fără MNP dar și WJMSC, WJMSC-MNP. De asemenea, metodele de cuantificare în toate cazurile de diferențiere celulară sunt general valabile.

2.1.4.1. Adipogeneza și cuantificarea adipogenezei

Celulele au fost plasate în plăci cu 96 de godeuri la 1×10^4 celule/godeu și au fost incubate până la confluența de 95%. După 24 de ore, celulele au fost spălate cu PBS, iar peste ele a fost adăugat mediu de cultură adipogenic. După ce au fost realizate 3 cicluri pentru fiecare tip de mediu se realizează cuantificarea adipogenezei.

2.1.4.2. Osteogeneza și cuantificarea osteogenezei

Celulele au fost plasate în plăci cu 96 de godeuri la 1×10^4 celule/godeu și au fost incubate până la confluența de 95%. După 24 de ore, celulele au fost spălate cu PBS, iar peste ele a fost adăugat mediu de cultură osteogenic. După 21 de zile de cultură în mediu osteogenic se realizează cuantificarea osteogenezei.

Pe durata procesului de osteogeneză celulele depun matrice calcifiată încercând să realizeze o matrice extracelulară osoasă.

2.1.4.3. Condrogeneza și cuantificarea condrogenezei

Diferențierea condrogenică se realizează doar în format 3D, din această cauză celulele fiind centrifugate și peletizate. ADSC, WJMSC și sferoizii cu sau fără MNP au fost centrifugate la 300g timp de 5 minute pentru a forma peleta pe fundul tubului de centrifugă de 15 mL. Pentru o condrogeneză este necesar un număr minim de celule de 1 milion.

După realizarea peletelor, acestea au fost hrănite cu mediu condrogenic. Mediul condrogenic este format din două tipuri de mediu: Mediu Condrogenic Incomplet (ICM) și Mediu Condrogenic Complet (CCM).

Pe durata procesului de condrogeneză celulele depun în structura de matrice 3D formată din glucozaminoglicani (GAG), mucopolizaharide găsite în compoziția cartilajului, încercând să realizeze o matrice extracelulară similară cu cea cartilaginoasă.

2.1.5. Evaluarea fibrelor citoscheletelor ADSC și WJMSC în câmp magnetic

Citoscheletul celular poate fi modificat de mai mulți factori cum ar fi câmpul magnetic sau nanoparticulele magnetice atât separat, cât și împreună. Celulele ADSC și WJMSC cu și fără MNP au fost cultivate în mediu de cultură complet până la 90 % confluență. După expunerea în câmp magnetic celulele au fost fixate cu 2% paraformaldehidă timp de 15 minute, apoi au fost colorate cu faloidină, un colorant fluorescent care se atașează de fibrele citoscheletului celular - Texas Red™-X Phalloidin de la Thermo Fischer Scientific. Pentru a identifica poziția fiecărei celule, acestea au fost contra-colorate cu DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) un colorant fluorescent ce se atașează de ADN din interiorul nucleului celular. Imagini ale citoscheletului au fost vizualizate cu filtrul de fluorescență RFP, iar nucleeele cu filtrul de fluorescență DAPI cu microscopul inversat EVOS, apoi aceste imagini au fost suprapuse.

2.2. Materiale și metode utilizate pentru identificarea acțiunii câmpului magnetic asupra celulelor încărcate cu nanoparticule Fe-Cr-Nb-B pentru tratament anti-tumoral

2.2.1. Prepararea nanoparticulelor magnetice $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$

Nanoparticulele magnetice $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$ au fost preparate din benzi amorfe răcite rapid, cu aceeași compoziție, prin procesul de măcinare cu bile.

Benzile amorfe au fost topite prin răcirea rapidă a aliajului Fe-Cr-Nb-B într-un creuzet tubular de cuarț. Benzile au fost măcinate mecanic folosind o moară cu bile Vibratory Fritsch cu două camere de măcinare, în prezența acidului oleic ca surfactant. Pulberile au fost obținute după 360 de ore de măcinare. În cele din urmă, particulele obținute au fost spălate în heptan într-o baie cu ultrasunete, uscate într-un cuptor cu vid la 700 °C și păstrate într-o cameră de vid [27].

2.2.2. Metode utilizate în caracterizarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B

Magnetometria cu probă vibrantă (VSM). Proprietățile magnetice ale particulelor Fe-Cr-Nb-B au fost evaluate cu ajutorul unui Magnetometru cu Eșantion Vibrant din seria 7410, furnizat de Lake Shore Cryotronics, Inc., Westerville, OH, SUA.

Analiza de determinare a dimensiunii nanoparticulelor prin **metoda de dispersie dinamică a luminii (DLS)**. Pentru realizarea analizei DLS, 5 mg de nanoparticule au fost dispersate în 10 mL de apă pură și supuse unui proces de ultrasonare timp de 5 minute. Concentrația particulelor a fost aproximativ 0,5 mg/mL, iar pentru analiză s-a utilizat un eșantion de 2 mL. Eșantionul a fost analizat utilizând echipamentul Microtrac/Nanotrac 252 (Montgomeryville, PA, SUA).

Analiza formei și dimensiunile nanoparticulelor a fost evaluată prin **microscopie electronică de scanare de înaltă rezoluție (HR-SEM)**. Pentru analiza HR-SEM, nanoparticulele magnetice au fost diluate în apă pură, plasate pe suport din oxid de siliciu și lăsate să se usuce la aer. Imaginile au fost obținute cu ajutorul unui microscop Carl Zeiss NEON 40 EsB CrossBeam, Oberkochen, Germania, și a software-ului său, JEOL, pentru numărarea nanoparticulelor și determinarea distribuției dimensiunilor acestora.

2.2.3. Metoda de încărcare a medicamentelor pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B

Nanoparticulele magnetice au fost încărcate fie cu Mitoxantronă, fie cu Doxorubicină în soluție apoasă a acestor medicamente chimioterapeutice. Soluțiile cu concentrații stabilite de 100 μg/mL au fost preparate prin dizolvarea clorhidratului de Mitoxantronă (Merck) și a clorhidratului de Doxorubicină (Merck) în apă ultra-pură.

Încărcarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B a fost realizată prin adăugarea nanoparticulelor în soluțiile de MTX / DOX în tuburi de centrifugare de 15 mL, care au fost plasate pe un agitator rotativ timp de 24 de ore.

Cantitățile încărcate de MTX și DOX au fost calculate prin scăderea cantităților nelegate (libere) din cantitatea totală.

Astfel au fost calculați doi parametri: gradul de încărcare al medicamentului- drug loading efficiency- DL (%) și eficiența încapsulării medicamentului-EE (%) după următoarele ecuații:[28]

$$DL(\%) = \frac{(M_{tm} - M_{lm})}{M_{tn}} \times 100$$

$$EE(\%) = \frac{(M_{tm} - M_{lm})}{M_{tm}} \times 100$$

unde: M_{tm} = Masa totală a medicamentului, M_{lm} = Masa liberă a medicamentului în supernatant, M_{tn} = Masa totală a nanoparticulelor.

2.2.4. Metode utilizate în evaluarea eliberării *in vitro* a Mitoxantronei sau Doxorubicinei de pe particulele Fe-Cr-Nb-B

Profilele de eliberare a medicamentelor Mitoxantronă și Doxorubicină au fost evaluate pentru a cuantifica medicamentul eliberat într-o anumită perioadă de timp. Profilele de eliberare a MTX și DOX de pe nanoparticulele magnetice au fost realizate conform metodei adaptate a sacilor de dializă. O cantitate de 5 mg de nanoparticule Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX / DOX au fost distribuite în 1 mL de mediu de cultură fără roșu-fenol (pentru a nu interfera cu citirea spectrofotometrică și plasate în sacii de dializă fabricați din membrane de dializă (MWCO: 14.000) legate la ambele capete. Sacii cu particule și mediu au fost dializați în 4 mL de mediu de cultură la un pH de 7,4 (imitând pH-ul fiziologic) și pH acid 6, 4,5 sub agitare la 37 °C.

La intervale de timp specifice, au fost retrase alicote de 0,2 mL pentru citirea spectrofotometrică și înlocuite cu un volum egal de mediu de cultură proaspăt. Probele au fost măsurate într-o placă de 96 de godeuri, în duplicat pentru fiecare valoare, și citite cu un spectrofotometru de plăci Multi-Mode Synergy HTX prin spectrometrie UV-Vis la 610 nm pentru MTX și 480 nm pentru DOX. Eliberarea cumulativă a medicamentului a fost calculată pe baza curbelor standard pentru MTX și DOX obținute în apă și în mediu de cultură.

Experimentele de eliberare *in vitro* au fost efectuate în triplicat pentru a confirma reproductibilitatea acestora. Cantitatea de medicamente eliberată în mediul de cultură a fost determinată folosind următoarea relație:[29]

$$\text{Eliberarea cumulată (\%)} = \frac{An + \frac{v}{vt} \sum_{k=0}^{n-1} Ak}{Ac} \times 100$$

unde v = volumul mediului de eliberare extras la fiecare moment (adică, 0,2 mL); vt = volumul total al mediului de eliberare (adică, 5 mL); An = absorbția probelor la momentele de timp n ; Ak = absorbția probelor la momentele de timp k , unde $k \in [0, n - 1]$; Ac = absorbția controalelor* și n ($\neq 0$) este momentul de timp pentru colectarea probei.

*MTX și DOX în mediu de cultură care se potrivește cu concentrația medicamentului adsorbit de nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B determinată pe baza curbelor standard.

Metoda pentru determinarea cantității unei substanțe bioactive în diverse sisteme a fost adaptată și optimizată pentru a depăși anumite limitări existente. În cadrul acestei teze, metoda sacului de dializă a fost semnificativ îmbunătățită. Un aspect al protocolului revizuit este modificarea soluției de eliberare. Deși eliberarea medicamentelor se efectuează de obicei în soluție tampon fosfat (PBS), pentru aceste experimente s-a utilizat mediul de cultură celulară (DMEM), care imită mai fidel condițiile fiziologice comparativ cu PBS. Curbele de calibrare au fost astfel realizate pentru calculul încărcării medicamentelor în apă, iar eliberarea medicamentului a fost evaluată în DMEM.

Noua metodă de eliberare, cu parametrii ajustați, permite acum evaluarea cantității de medicament eliberate de pe suprafața sistemelor cu formulări variate, inclusiv particule polimerice sau magnetice, nanoparticule și nano-emulsii magnetice. Aceasta metodă facilitează

utilizarea unor cantități minime de nanoparticule/nano-emulsii, de ordinul miligramelor, în volume de eliberare de doar câțiva mililitri.

Metoda de calcul a cantității eliberate de medicament/substanță activă a fost de asemenea adaptată pentru a ține cont de cantitățile reduse. În mod obișnuit, eliberarea medicamentelor implică alicote de 1-4 mL soluție, însă în cadrul acestor studii au fost extrase alicote de 0,1 mL și plasate în plăci de cultură pentru evaluare spectrofotometrică. Această reducere a volumului a permis optimizarea procesului, reducerea costurilor și a consumabilelor, menținând totodată reproductibilitatea și acuratețea rezultatelor. Un alt factor determinant în realizarea experimentelor în medii biologice este menținerea sterilității. Metoda propusă permite lucrul în condiții aseptice, iar prelevarea alicotelor se efectuează în hota cu flux laminar.

2.2.5. Metode de evaluare a viabilității și citotoxicității culturilor celulare co-incubate cu nanoparticule magnetice Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX și DOX

Celulele stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSC) și celulele de osteosarcom uman (HOS) au fost cultivate folosind medii complete de cultură (DMEM, 10% FBS, 1% antibiotic/antimicotic), fiind crescute în plăci de 96 de godeuri, începând de la 10^4 celule/godeu, la 37 °C și 5% CO₂, și incubate până la o confluență de 90%.

2.2.5.1. Testul de viabilitate MTT

Testul MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu bromidă) este utilizat pentru determinarea viabilității celulelor după un tratament specific sau interacțiuni comparativ cu celulele martor. Viabilitatea celulară a fost determinată folosind testul MTT (ThermoFisher Scientific) conform instrucțiunilor furnizorului.

Viabilitatea celulară (%) este calculată folosind următoarea relație [30]:

$$VC (\%) = 100 \times \frac{Ab_{MP} - Ab_{Blank}}{Ab_{Control} - Ab_{Blank}},$$

unde CV (%) reprezintă viabilitatea celulară, iar Ab reprezintă absorbanta măsurată a: (a) Ab_{MP} pentru celulele cu nanoparticule de Fe-Cr-Nb-B (cu sau fără medicamente), (b) $Ab_{Control}$ pentru celulele de control și (c) Ab_{Blank} pentru mediul de cultură celulară în godeu. Absorbanta a fost măsurată la 570 nm, cu un spectrofotometru pentru plăci de cultură Multi-Mode Microplate Reader Synergy HTX.

2.2.5.2. Testul de citotoxicitate LDH

Evaluarea citotoxicității celulare în urma co-incubării cu nanoparticule încărcate cu MTX și DOX, a fost realizată cu testul CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen) conform instrucțiunilor producătorului. Testul LDH este o metodă colorimetrică, bazată pe colorația formazanului, pentru identificarea citotoxicității celulare prin măsurarea enzimei citosolice LDH eliberate după ruperea membranei celulare. Citotoxicitatea este calculată conform relației de mai jos:

$$\% \text{ Citotoxicitate LDH} = \frac{\text{Activitatea LDH probă} - \text{Activitatea LDH spontană}}{\text{Activitatea LDH Maximă} - \text{Activitatea LDH spontană}} \times 100$$

2.2.6. Internalizarea particulelor magnetice Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX sau DOX în celulele ADSC și HOS

2.2.6.1. Testul Ferozină

Pentru a studia internalizarea celulară a Fe-Cr-Nb-B cu sau fără MTX / DOX, celulele ADSC și HOS au fost cultivate în plăci de cultură de 24 de godeuri până la formarea unui monostrat confluent. Apoi, mediu de cultură celulară conținând MP / MP-MTX / MP-DOX a fost adăugat în godeurile de cultură celulară și co-incubate timp de 24 de ore. Pentru a identifica dacă există diferențe în internalizarea celulară la diferite cantități de medicament pe particule, au fost efectuate teste cu 1 mg/mL de MP și MP cu 1 și 10 μ g de MTX / DOX per 1 mg de nanoparticule. Cantitatea de MP a fost cuantificată pe baza unei soluții standard de fier. S-a realizat o curbă de calibrare folosind standarde FeCl_3 (0÷300 μ M) în HCl 10mM, pentru a permite calculul conținutului de fier per probă [31].

2.2.7. Metode de actuare magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu MTX și DOX

Actuarea magneto-mecanică a particulelor de Fe-Cr-Nb-B implică expunerea acestora într-un câmp magnetic rotativ la o frecvență joasă. Sistemul experimental dezvoltat în laboratorul Institutului de Fizică Tehnică cuprinde un ansamblu de patru bobine aranjate într-o configurație în cruce. Aceste bobine pot genera un câmp magnetic rotativ uniform cu valori de până la 200 Oe într-un spațiu de aproximativ 20 cm³ [26]. Două forme de undă trec prin sistemul de bobine, fiecare având un decalaj de fază de 90 de grade. Această configurație se aliniază cu dispunerea ortogonală a sistemului de bobine, permițând câmpului magnetic să se rotească la frecvența formelor de undă, acoperind intervale de la câțiva mHz până la kHz. Plăcile de cultură celulară sunt situate în zona uniformă a câmpului magnetic a sistemului de bobine, fiind supuse actuării magneto-mecanice, ceea ce duce la mișcarea particulelor magnetice, urmată de distrugerea celulelor și moartea celulară ulterioară.

2.2.8. Metoda de identificare a celulelor vii/moarte în urma actuării magneto-mecanice. Colorarea celulelor cu LIVE/DEAD

Colorarea fluorescentă Live/Dead (Invitrogen) este utilizată pentru identificarea celulelor vii (colorate în verde) și a celulelor moarte (colorate în roșu). Celulele HOS și ADSC au fost cultivate în plăci de 6 godeuri până la o confluență de 90%. La 24 de ore după adăugarea MP sau a MP încărcate cu medicament, celulele au fost supuse actuării magneto-mecanice, conform descrierii anterioare. După alte 12 ore, celulele au fost spălate de două ori cu PBS.

O soluție de 2 μ M calcein AM și 4 μ M EthD-1 a fost preparată și 0,5 mL din această soluție a fost adăugată în fiecare godeu. Celulele au fost incubate timp de 45 de minute în absența luminii, la temperatura camerei. Ulterior, celulele au fost spălate cu PBS și vizualizate cu ajutorul microscopului cu lumină inversată EVOS, utilizând filtre de fluorescență (RFP pentru celulele moarte / GFP pentru celulele vii), dar și în câmp luminos apoi efectuând o suprapunere (imagini combinate ale câmpului luminos, RFP și GFP).

Capitolul 3. Proliferarea și diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în prezența câmpului magnetic

3.1. Proliferarea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice în formă de sferoizi 3D sub acțiunea câmpului magnetic static

Celulele ADSC sunt intens studiate pentru utilizarea lor ca agenți terapeutici în diverse domenii ale medicinei regenerative. ADSC pot fi obținute prin digestia enzimatică din fracția vasculară stromală (SVF) ce este colectată în urma procedurii chirurgicale cosmetice de liposucție. Ulterior celulele ADSC sunt cultivate în vase destinate culturii celulare în monostrat. Creșterea celulară în cultură monostrat este cauza senescentei celulare, alterării potențialului regenerativ și calității de celulă stem a ADSC [32].

Dar cultivarea celulelor ADSC în formă tridimensională (3D) oferă un mediu care se aseamănă cu țesutul natural, conservând sau chiar îmbunătățind fenotipul și potențialul terapeutic al ADSC [33]. Avantajele oferite de culturile 3D sunt reproducerea comunicării intercelulare și generarea de structuri tisulare complexe. Metodele de cultivare în formă 3D se bazează pe cultivarea celulelor în condiții de non-aderență. ADSC, fiind celule dependente de ancorare, sunt capabile să dezvolte agregate celulare de formă sferică, numite „sferoizi”, atunci când sunt cultivate în vase de cultură cu aderență redusă. Cultivate sub formă de sferoizi, celulele ADSC posedă o activitate antiinflamatoare, angiogenică și regenerativă superioară, precum și o supraviețuire îmbunătățită a celulelor în cazul transplantului *in vivo* [34].

În continuare se vor prezenta o serie de rezultate privind proliferarea și diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice sub acțiunea câmpului magnetic obținute în cadrul acestei teze de doctorat.

Prima parte a acestui capitol cuprinde rezultatele obținute privind asamblarea sferoizilor magnetici (în cultură tridimensională) formați din celule ADSC încărcate cu nanoparticule de magnetită prin levitație în câmp magnetic static. De asemenea, se urmărește efectul internalizării MNP și expunerii la câmp magnetic static (SMF) asupra formării sferoizilor în ceea ce privește dimensiunea și numărul acestora, prin imagistică digitală. Pentru evaluarea influenței nanoparticulelor magnetice și efectul câmpului magnetic asupra caracteristicilor ADSC în formă de sferoizi, a fost determinată viabilitatea celulară, proliferarea, migrația și diferențierea în trei linii mezenchimale (osteogeneză, adipogeneză și condrogeneză).

3.1.1. Caracterizarea nanoparticulelor magnetice

Măsurătorile prin metoda de dispersie dinamică a luminii (DLS) au arătat o distribuție îngustă a dimensiunilor nanoparticulelor, cu o dimensiune medie de 83,5 nm (Figura 1a).

Dimensiunile obținute prin DLS se referă însă la diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor, iar valorile rezultate sunt mai mari din cauza straturilor de fluid adiacente și aglomerării nanoparticulelor magnetice. Imaginile realizate cu microscopul electronic cu transmisie de înaltă rezoluție (HRTEM) ale nanoparticulelor de magnetită arată că distribuția reală a dimensiunilor este între 5 și 20 nm (Figura 1c). Aceste nanoparticule de magnetită prezintă forme polimorfe, adică conțin particule cubice, octaedrice, prismatice și alte forme neregulate.

Dependența de câmp a magnetizării MNP este prezentată în Figura 4b. Magnetizația de saturație ajunge la valoarea de 42 emu/g la un câmp magnetic aplicat de 20 kOe, în timp ce câmpul coercitiv, H_c , este de 57 Oe, iar magnetizația remanentă la temperatura camerei, M_r , este de 3,3 emu/g.

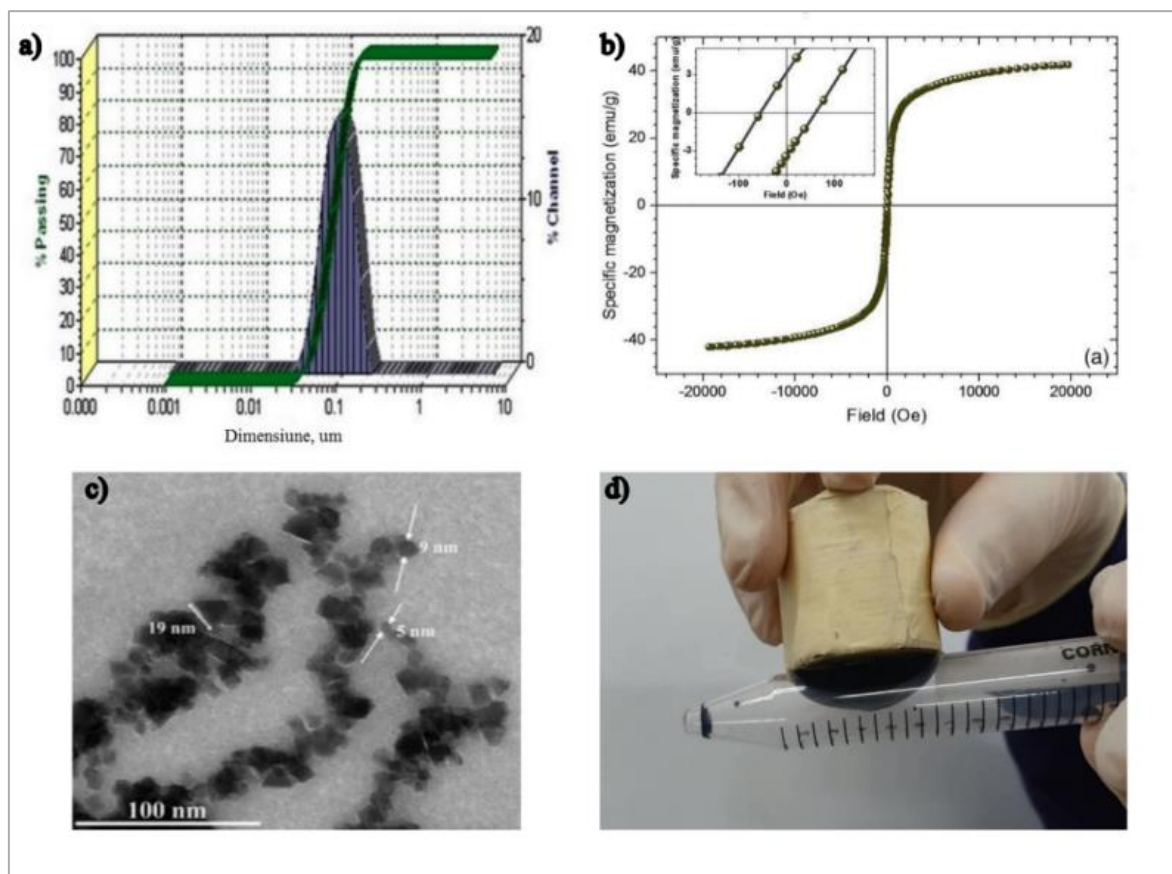


Figura 1. Caracteristici ale nanoparticulelor de magnetită. a) Distribuția dimensională a nanoparticulelor determinată prin metoda DLS; b) Ciclul de histerezis magnetic al nanoparticulelor; c) Imagine HR-TEM a nanoparticulelor; d) Ferofluidul magnetic pe bază de nanoparticule de magnetită [35].

În testele ce conțin culturi celulare au fost folosite nanoparticule dintr-un ferrofluid cu concentrație determinată. Pentru obținerea ferrofluidului magnetic (Figura 1d), masa totală de MNP obținute în procesul de sinteză a fost transferată într-o cantitate redusă de apă. Particulele au fost ultrasonate câte 10 minute, de 3 ori, cu pauze de jumătate de oră pentru răcire.

3.1.2. Evaluarea cantității de nanoparticule internalizate în celule

Evaluarea cantității de nanoparticule internalizate în celule se realizează prin testul Ferozină. Acesta identifică cantitatea de fier regăsită în celula ADSC. Celulelor ADSC au fost co-incubate cu o cantitate de magnetită de 40 $\mu\text{g/mL}$ pe parcursul a 24, 48 și 72 ore. Ulterior, celulele au fost numărate, iar cantitatea totală de fier rezultată din fiecare godeu, a fost raportată la numărul de celule, iar rezultatele sunt prezentate în Figura 2.

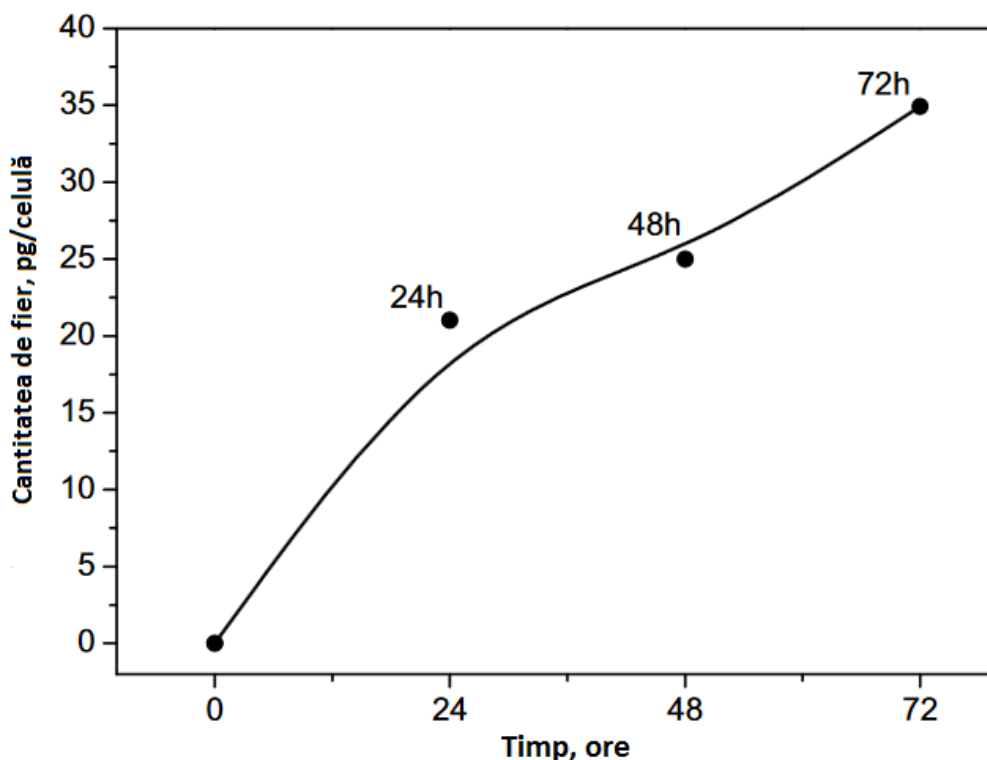


Figura 2. Cantitatea de fier din nanoparticule internalizate de celulele ADSC pe parcursul a 24, 48 și 72 de ore, exprimată în picograme/celulă [36].

Este important de menționat că orice celulă conține o cantitate mică de fier intrinsec, necesar pentru activitățile metabolice ale celulei. Astfel, încărcarea cu nanoparticule magnetice (MNP) a fost calculată utilizând cantitatea totală de fier cuantificată în ADSC-MNP, din care apoi a fost scăzut conținutul de fier intrinsec al ADSC fără nanoparticule de magnetită. Cantitatea de fier rezultată crește gradual de la 21,02 picograme/celulă la 24 de ore până la 34,9 picograme/celulă la 72 de ore.

3.1.3. Obținerea sferoizilor celulari 3D sub acțiunea câmpului magnetic static

Celulele ADSC încărcate cu nanoparticule magnetice de magnetită sunt dispuse în monostrat 2D pe suprafața vasului de cultură celulară. ADSC-MNP au fost spălate de două ori cu PBS și tripsinizate pentru formarea sferoizilor. Celulele au fost numărate și plasate în plăci cu 96 godeuri cu atașament ultra-redus (ultra-low attachment) (1×10^4 celule/godeu) în mediu de cultură complet.

Peste capacul plăcii de cultură celulară au fost lipiți magneți permanenți ce produc un câmp magnetic static (SMF). Magneții permanenți au compoziția NdFeB cu diametrul de 8 mm fiecare. Acest câmp magnetic acționează asupra celulelor încărcate cu MNP și ridică în mediul de cultură sferoizii până la înălțimea maximă a lichidului, realizându-se o levitație în câmp magnetic a sferoizilor. Sferoizii de control au fost realizați prin aceeași tehnică, însă nu au fost supuși câmpului magnetic static. Procesul de formare a sferoizilor este prezentat schematic în Figura 3.

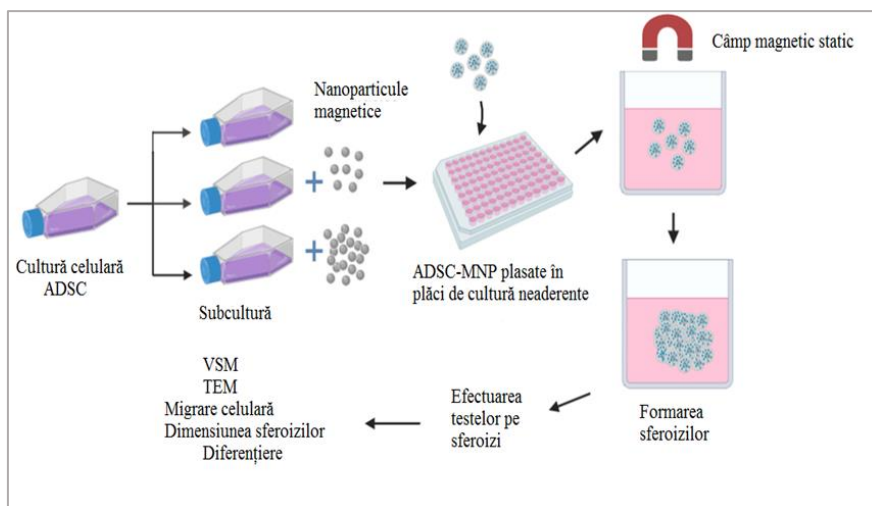


Figura 3. Procesul de obținere a sferoizilor magnetici levitați. (Reprezentare schematică)

După 7 zile de cultură în suspensie, sferoizii au fost colectați prin centrifugare și utilizați pentru TEM, VSM sau disociați cu tripsină, triturare mecanică și replantați pentru migrarea, numărarea, viabilitatea și diferențierea celulelor (adipogeneză, osteogeneză și condrogeneză).

3.1.4. Câmpul magnetic static în diferențierea celulelor încărcate cu particule magnetice - diferențierea sferoizilor

Celulele stem derivate din țesutul adipos ar trebui să își păstreze capacitatea de proliferare și diferențiere celulară după extracția și izolarea acestora. Testarea și identificarea condițiilor necesare pentru menținerea capacității de diferențiere este un subiect de interes în cercetare la acest moment. Celulele ADSC fac parte din celulele stem mezenchimale (MSC) și se pot diferenția în diferite tipuri de celule cum ar fi: adipocite, osteoblaste, condrocite, miocite, celule endoteliale, celule neuronale, hepatocite sau keratinocite [37].

Celulele ADSC cultivate sub formă de sferoizi în prezența nanoparticulelor magnetice și câmpului magnetic static au fost supuse diferențierii adipogenice, osteogenice și condrogenice. Diferențierea adipogenică și osteogenică a fost realizată pe celule disociate din sferoizi crescuți în suspensie timp de 7 zile, iar diferențierea condrogenică a fost realizată pe sferoizi sub formă de peletă celulară pentru imitarea matricei structurale a cartilajului.

3.1.4.1. Diferențierea osteogenică

Evaluarea cantitativă a osteogenezei a fost realizată cu ajutorul a două teste. Primul test folosește un colorant fluorescent care se leagă de calciul depozitat în celule (OsteoImage Lonza), oferind o fluorescență ce poate fi cuantificată spectrofotometric, cu rezultate afișate în Figura 4a. Al doilea test constă în evaluarea ionului de calciu depus în matricea extracelulară, cuantificat spectrofotometric prin absorbanță, datele fiind prezentate în Figura 4b.

Ambele teste au arătat diferențe nesemnificative între diferențierea osteogenică a celulelor ADSC disociate din sferoizi expuși și neexpuși în comparație cu celulele de control cultivate în monostrat 2D.

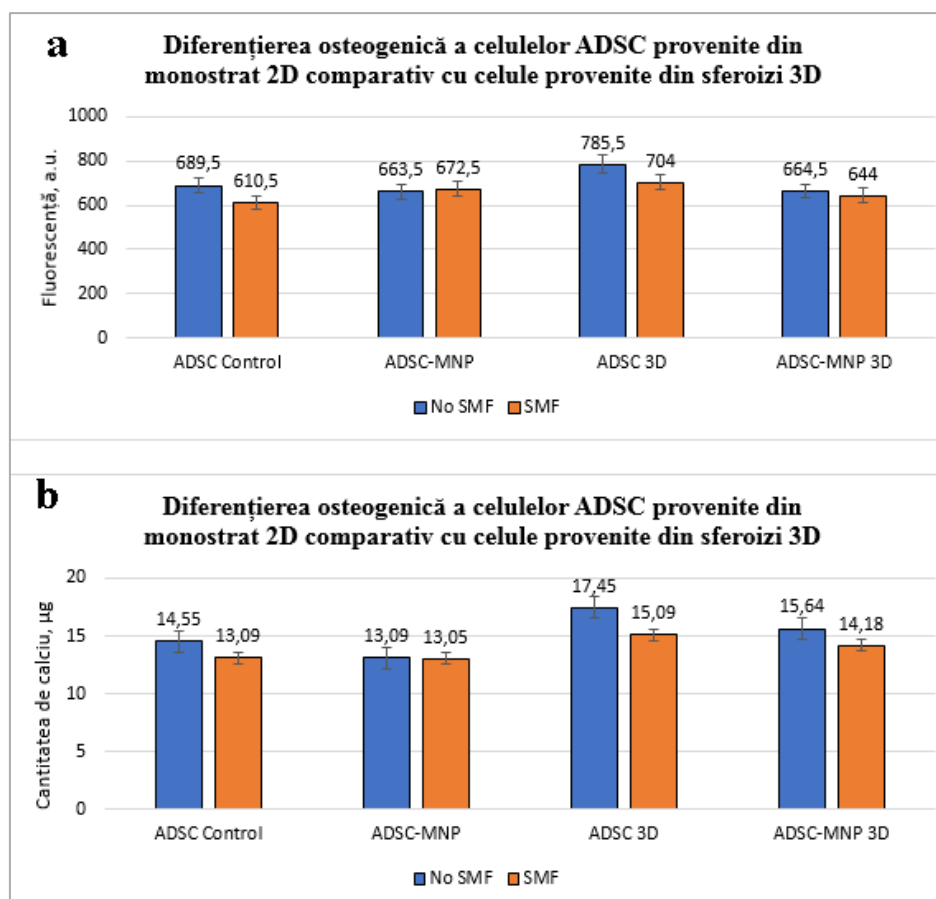


Figura 4. Cuantificarea diferențierii osteogenice. a) prin cuantificarea fluorescenței calciului depus în matricea extracelulară prin testul OsteoImage Lonza; b) prin cuantificarea absorbției calciului depus în matricea extracelulară prin testul StanBio Calcium [35].

Testele de cuantificare a diferențierii osteogenice au demonstrat că factorii externi cum ar fi nanoparticulele magnetice sau expunerea la câmp magnetic static nu influențează semnificativ depunerea matricei osoase. S-a observat o ușoară creștere a conținutului de calciu în cazul celulelor ce au fost dissociate din sferoizi, însă această creștere nu are valoare semnificativă din punct de vedere statistic. Acest lucru ar putea fi cel mai probabil explicat prin faptul că a fost efectuat testul de diferențiere în cultură monostrat (2D). O altă explicație posibilă este că au fost folosite două metode de evaluare a osteogenezei, ambele teste cuantificând mineralizarea matricei osoase, matrice ce se formează în timpul osteogenezei în stadiul final.

3.1.4.2. Diferențierea adipogenică

Sferoizii neîncărcați cu MNP și neexpuși la SMF au prezentat cea mai mare creștere a adipogenezei versus celulele cultivate în 2D. Dimpotrivă, ADSC încărcate cu MNP au prezentat o creștere mai mică a adipogenezei comparativ cu sferoizii neîncărcați. Expunerea la SMF a sferoizilor încărcate cu MNP determină o adipogeneză semnificativ mai mare în comparație cu cei neexpuși, atingând aproape nivelurile celor neîncărcați, neexpuși la SMF. Cuantificarea diferențierii adipogenice a fost realizată prin fluorescența unui colorant fluorescent ADIPO RED cu fixare specifică pe veziculele de lipide depuse în interiorul corpului celular în procesul adipogenezei, rezultate prezentate în Figura 5.

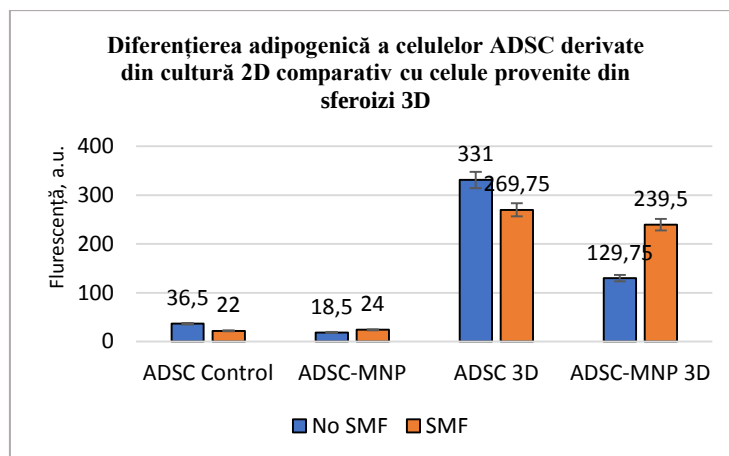


Figura 5. Cuantificarea diferențierii adipogenice prin cuantificarea fluorescenței veziculelor de lipide depuse în interiorul corpului celular, prin testul Adipo Red [35].

Celulele provenite din sferoizi au prezentat o adipogeneză crescută în raport cu cele în cultură 2D. Cu toate acestea, prezența MNP a influențat negativ conversia adipogenică. În acest caz, s-a observat o scădere ușoară a depunerii de lipide intracelular, la ADSC-MNP 3D comparativ cu celulele neîncărcate. O cantitate mai mare de lipide a fost depusă de către sferoizii ADSC-MNP expuși la SMF comparativ cu cei neexpuși.

Expunerea la SMF pare să contracareze scăderea adipogenezei generată de prezența MNP. O creștere a adipogenezei a fost observată pentru toate celulele provenite din sferoizi ADSC versus celulele cultivate în 2D.

3.1.4.3. Diferențierea condrogenică

Diferențierea condrogenică a fost evaluată folosind cantitatea totală de glucozaminoglicani (GAG)/peletă în raport cu ADN total/peletă, rezultate prezentate în Figura 6. Glucozaminoglicanii (GAG) sunt formați din polizaharide și sunt specifici matricei cartilajinoase. Aceștia au fost identificați prin test de spectrofotometrie cu citirea absorbantei, după conjugarea GAG cu Dimetil-Metilen Blue (DMMB). Cuantificarea de ADN s-a realizat pentru a raporta GAG la cantitatea de ADN găsită în celulele din peletă.

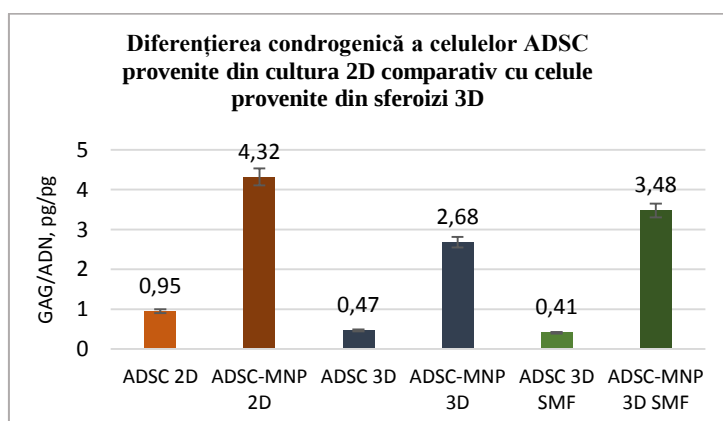


Figura 6. Cuantificarea diferențierii condrogenice prin cuantificarea absorbantei glucozaminoglicanilor raportat la cantitatea de ADN din peletă [35].

Un raport GAG/ADN mare a fost obținut în sferoizii expuși la SMF cu ADSC-MNP comparativ cu cei neexpuși. Raportul GAG/ADN pentru ADSC-MNP 2D este mai mare comparativ cu ADSC-MNP 3D. Toate celulele ce au conținut nanoparticule de magnetită au avut o diferențiere condrogenică considerabilă. De asemenea, a fost calculată o creștere de până la 8,5 ori mai mare a raportului GAG/ADN în sferoizii ADSC-MNP SMF comparativ cu sferoizii ADSC neexpuși.

3.2. Diferențierea celulelor încărcate cu nanoparticule magnetice actuate în câmp magnetic

În urma rezultatelor obținute pentru celule ADSC expuse în câmp magnetic static, în continuare, celulele ADSC încărcate cu nanoparticule de magnetită au fost actuate în câmp magnetic pentru influențarea diferențierii adipogenice și osteogenice.

Scopul acestui studiu este de a identifica influența câmpului magnetic variabil asupra viabilității și diferențierii celulelor ADSC încărcate cu MNP în timp de expunere diferiți ai câmpului magnetic. Actuarea în câmp magnetic (ACM) este continuă pe parcursul a 48 de ore sau intermitentă pe parcursul a 48 de ore sau 7 zile. S-au realizat teste de viabilitate celulară în câmp magnetic, teste de identificare a diferențierii adipogenice și osteogenice.

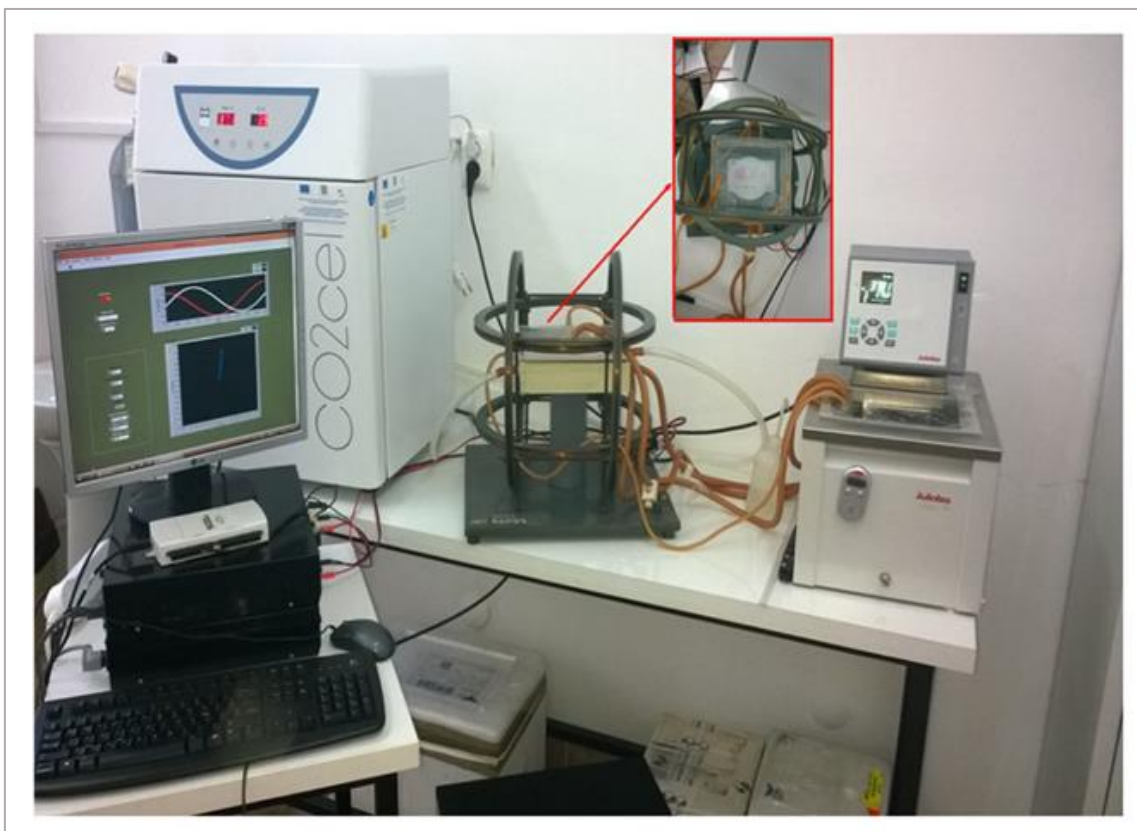


Figura 7. Instalația de actulare în câmp magnetic cu bobine Helmholtz și mini-incubator ce menține parametrii de cultură celulară în interiorul circuitului [36].

Parametrii și durata câmpului sunt prezentați în Tabelul 1.

Tabel 1. Protocol de expunere a celulelor ADSC și ADSC-MNP la actuale în câmp magnetic.

	Absența câmpului magnetic	Actuale în câmp magnetic continuă	Actuale în câmp magnetic intermitentă
Parametri câmp	Nu se aplică	7 Hz, 0,5 mT	7 Hz, 0,5 mT
Frecvență expunere	ADSC în plăci de control în incubator	2 zile expunere continuă, în mini-incubator plasat în bobinele Helmholtz	2 sau 7 zile expunere intermitentă, 10 min/sesiune, 7h/zi, la interval de 1 oră

Celulele ADSC cultivate în monostrat 2D, aflate la confluență, au fost încărcate cu nanoparticule magnetice de magnetită (MNP) prin adăugarea acestora în mediul de cultură. MNP-urile au fost mai întâi suspendate în mediul de cultură complet, ce conține ser fetal bovin (FBS), pentru a permite formarea coroanei proteice, deoarece interacțiunea și încărcarea MNP-urilor de către celule depind foarte mult de structura și compoziția coroanei proteice. În urma încărcării celulelor cu nanoparticule de magnetită, celulele ADSC sunt spălate cu PBS de excesul de nanoparticule.

3.2.1. Evaluarea diferențierii celulelor ADSC încărcate cu nanoparticule magnetice actuate în câmp magnetic

Celule ADSC sunt celule ce ar putea fi folosite în terapii individualizate sau în medicină regenerativă datorită capacității lor de diferențiere. Acest studiu are ca scop îmbunătățirea capacității de diferențiere pe cale adipogenă sau osteogenă prin influența unor factori externi asupra căilor de diferențiere. După ce a fost confirmat că diferiți timpi de expunere în câmp magnetic nu afectează viabilitatea ADSC și ADSC-MNP, s-a testat în continuare efectul câmpului magnetic asupra procesului de diferențiere adipogenică și osteogenică.

Celule ADSC și ADSC-MNP au fost actuate în câmp magnetic în condițiile descrise în Tabelul 1, în prezența mediului de cultură pentru diferențierea adipogenă (ADM) sau osteogenă (ODM). După 2/7 zile expunere la ACM, celulele au fost cultivate în continuare în mediul corespunzător pentru 21 de zile, apoi fiind evaluate cu testele Adipo Red sau OsteoImage pentru identificarea compușilor specifici diferențierii celulare rezultate. Datele obținute sunt prezentate în Figura 8 și Figura 9.

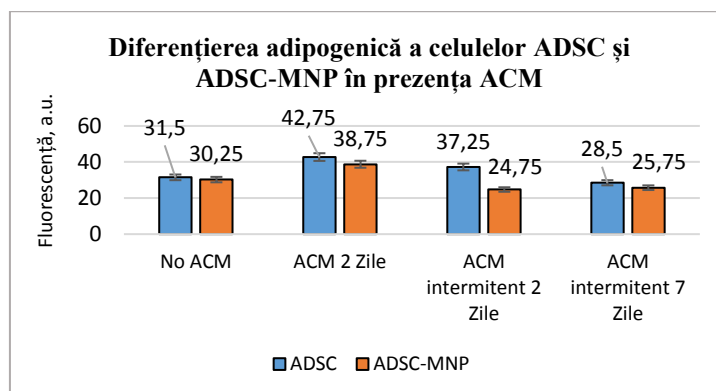


Figura 8. Diferențierea adipogenică a celulelor ADSC și ADSC-MNP în prezența ACM. Adipogeneza cuantificată prin testul Adipo Red, utilizând spectrofotometria de fluorescență [36].

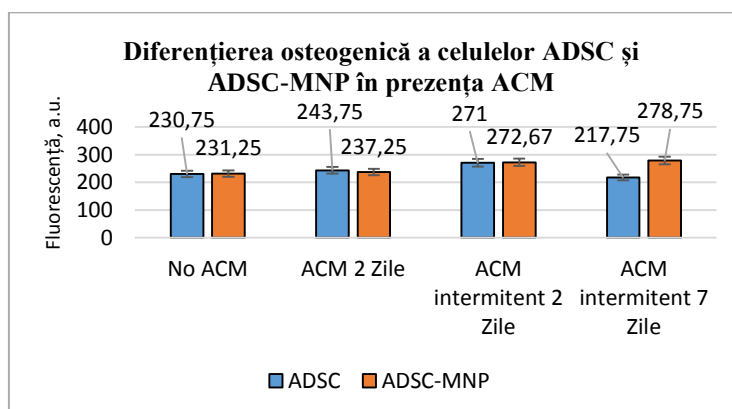


Figura 9. Diferențierea osteogenică a celulelor ADSC și a ADSC-MNP în prezența ACM. Osteogeneza cuantificată prin testul OsteoImage, utilizând spectrofotometria de fluorescență [36].

Actuarea în câmp magnetic a MNP internalizate în corpul celular a influențat osteogeneza în funcție de tipul de stimulare (intermitentă versus continuă), precum și de durata de expunere a probelor. Un câmp aplicat continuu în primele două zile după inițierea procesului osteogenic a condus la o osteogeneză crescută a ADSC-MNP în comparație cu ADSC fără MNP, expuse și neexpuse la ACM. Efectul nu a fost observat pentru expunerea intermitentă la ACM în primele două zile, însă s-a confirmat pentru probele expuse intermitent timp de 7 zile.

3.2.2. Diferențierea condrogenică a celulelor ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule magnetice sub influența actuării în câmp magnetic

În cadrul experimentelor anterioare a fost determinată influența nanoparticulelor de magnetită și a actuării în câmp magnetic asupra viabilității, proliferării și capacității de diferențiere în adipocite și osteocite a celulelor ADSC. În continuare, scopul acestui studiu a fost de a determina dacă poate fi indusă condrogeniza în două linii diferite de celule stem încărcate cu nanoparticule magnetice în cadrul expunerii intermitente de durată lungă la ACM. Pentru aceste teste s-au utilizat celulele stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSC) și celule stem extrase din gelatina Wharton din cordonul ombilical (WJMSC). Țesutul din cordonul ombilical în jurul vaselor de sânge este format preponderent din gelatina Wharton (Wharton's Jelly) și conține numeroase celule stem mezenchimale multipotente.

3.2.2.1. Evaluarea citoscheletului ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule de magnetită în urma actuării în câmp magnetic

În continuare s-a urmărit influența actuării în câmp magnetic asupra fibrelor ce formează citoscheletul celular.

În urma unei scurte expuneri de 20 min la ACM, fibrele de actină, au prezentat tendința de a se dezorganiza și de a distorsiona conturul celulei. ADSC-MNP și într-o măsură mai mică

WJMSC-MNP au prezentat o rearanjare a fibrelor citoscheletale sub influența ACM confirmată de Figura 10.

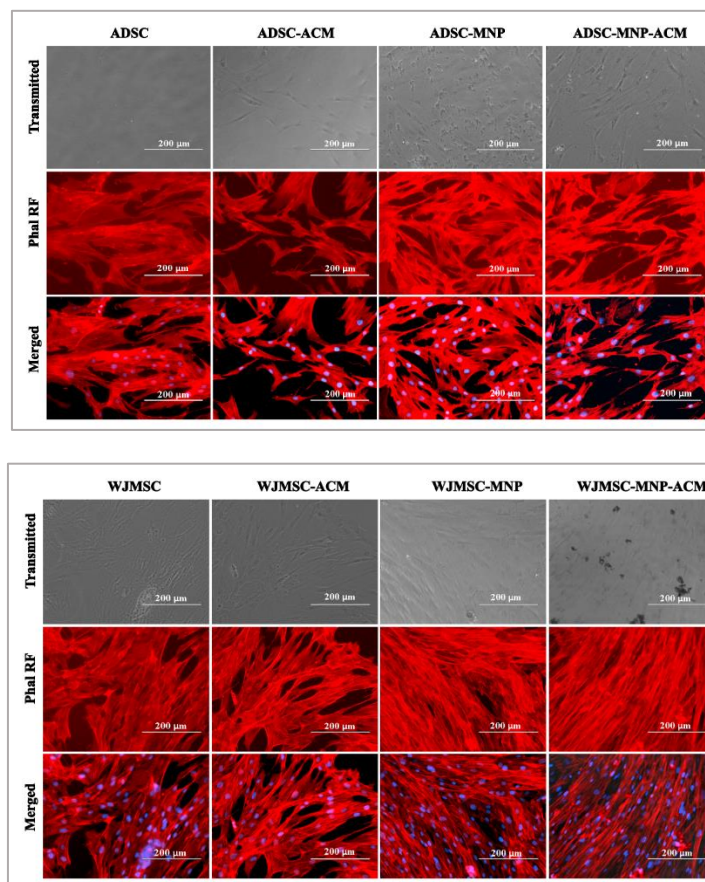


Figura 10. Citoscheletul celular și aranjarea fibrelor de actină la celulele ADSC și WJMSC cu și fără particule, în prezența sau absența ACM. Imagini obținute prin microscopie optică, microscopie cu fluorescență și imagini combinate. Scala=200 μm, Microscop cu lumină inversată EVOS, magnificare=20× [38].

Se cunoaște că MNP sunt internalizate în interiorul citoplasmei celulare de-a lungul fibrelor citoscheletale [39]. Astfel este posibil ca proximitatea lor față de fibrele de actină în timpul expunerii la ACM să genereze micro-mișcări care să acționeze ca stimulare mecanică internă ce acționează ca stimuli similari cu biomecanica intracelulară naturală.

3.2.2.2. Evaluarea diferențierii condrogenice a celulelor ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule magnetice actuate în câmp magnetic

În urma stabilirii mecanismului de acțiune a nanoparticulelor de magnetită actuate în câmp magnetic asupra citoscheletului celular, următorul studiu implică diferențierea condrogenică în aceste condiții. Astfel s-a evaluat influența actuării în câmp magnetic asupra procesului de diferențiere condrogenică a celulelor ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule magnetice.

ADSC, ADSC-MNP, WJMSC și WJMSC-MNP sub formă de pelete au fost tratate cu medii de diferențiere condrogenică timp de 21 de zile. Aceste probe au fost expuse la ACM

timp de 10 min la fiecare 2 ore în primele 7 zile după inducerea condrogenică. După 21 de zile, diferențierea condrogenică a fost evaluată cu ajutorul testului cantitativ spectrofotometric pe bază de absorbantă a GAG (glucozaminoglicanilor), iar rezultatele au fost normalizate în funcție de numărul de celule/peletă, rezultate prezentate în Figura 11.

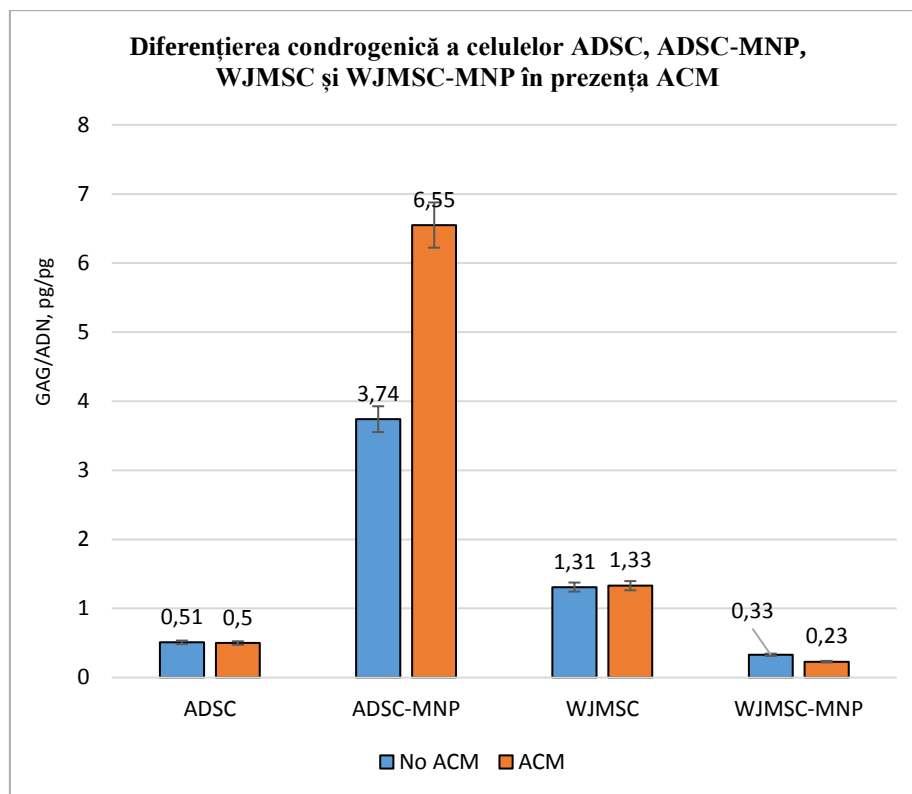


Figura 11. Cuantificarea diferențierii condrogenice a celulelor ADSC, ADSC-MNP, WJMSC și WJMSC-MNP în prezența ACM. Cuantificarea spectrofotometrică a absorbantei glucozaminoglicanilor raportat la cantitatea de ADN din peletă [38].

ADSC-MNP prezintă o creștere semnificativă a conținutului de GAG pe celulă comparativ cu ADSC. Mai mult, ADSC-MNP expuse la ACM au prezentat o creștere și mai mare comparativ cu celulele neîncărcate cu MNP.

WJMSC expuse la ACM și WJMSC neexpuse la ACM au generat o cantitate semnificativ mai mare de GAG/celulă comparativ cu WJMSC-MNP și față de WJMSC-MNP în prezența ACM. Cantitatea maximă de GAG/celulă generată de ADSC-MNP-ACM (6,55 pg) a fost de aproape cinci ori mai mare în comparație cu cantitatea maximă generată de WJMSC-ACM (1,33 pg).

Prezența MNP a crescut semnificativ depunerea de GAG în ADSC, în special după expunerea la ACM. De asemenea, expunerea la ACM influențează organizarea fibrei citoscheletice. Depunerea de GAG în ADSC-MNP supuse la ACM a fost de aproape 5 ori mai mare în comparație cu WJMSC neîncărcate, ceea ce indică o posibilă modalitate de manipulare a ADSC pentru îmbunătățirea conversiei condrogenice *in vitro* și, posibil, pentru o viitoare metodă de îmbunătățire a regenerării cartilajului.

Capitolul 4. Distrugerea celulelor canceroase prin actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale

Nanoparticulele magnetice (MPs) au atras o atenție considerabilă în cercetarea biomedicală datorită aplicațiilor lor. Proprietățile ajustabile, inclusiv dimensiunea, forma, compoziția, chimia suprafeței și caracteristicile magnetice, le fac instrumente versatile pentru diverse scopuri. Un avantaj remarcabil al nanomaterialelor constă în răspunsul la câmpuri magnetice statice și variabile. Momentul magnetic câștigat al particulelor magnetice într-un câmp magnetic, în special în câmpurile magnetice variabile, a fost explorat pentru diagnosticul și tratamentul cancerului.

Actuarea magneto-mecanică (MMA) implică un câmp magnetic rotativ extern menit să inducă mișcarea mecanică a nanoparticulelor magnetice către direcția câmpului aplicat. Ca urmare, mișcările rezultate generează forțe mecanice în MPs capabile să afecteze biomoleculele sau structurile celulare situate în apropiere [26,40]. Pentru a mări valoarea cuplului magnetic, este considerat necesar ca nanoparticulele să posede o anizotropie magnetică și o magnetizație de saturație crescută. Această capacitate de rotație are implicații semnificative în procesul inducerii apoptozei celulare. În momentul interacțiunii cu membranele celulare, nanoparticulele încep procesul de internalizare, reușind să traverseze membrana celulară. Internalizarea ulterioară a MPs duce la penetrarea membranei lizozomale. Supunerea probelor la MMA induce mișcarea de rotație a MPs, generând astfel forțe mecanice care distrug integritatea membranei lizozomale. Ca urmare, conținutul lizozomal este eliberat în citoplasmă, precipitând astfel o scădere a pH-ului și declanșarea eventuală a apoptozei.

În contextul tratamentului cancerului, grupul nostru a introdus nanoparticulele $\text{Fe}_{68,2}\text{Cr}_{11,5}\text{Nb}_{0,3}\text{B}_{20}$ produse prin măcinare mecanică a benzilor amorfe cu aceeași compoziție, obținute anterior prin răcire rapidă a topiturii. Aceste MPs prezintă o anizotropie ridicată, formă paralelipipedică (cu dimensiuni cuprinse între 10 și 200 nm), structură amorfă, comportament feromagnetic și au arătat rezultate în reducerea viabilității celulare canceroase sub actuarea magneto-mecanică [26,40].

Plecând de la aceste rezultate, am dezvoltat o metodă pentru a mări gradul de distrugere a celulelor canceroase printr-o abordare sinergică, combinând actuarea magneto-mecanică cu medicamente antitumorale utilizate în practica clinică. Pentru acest studiu, au fost folosite celule de osteosarcom uman (HOS) ca reprezentant al celulelor canceroase și celulele stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSCs) ca reprezentanți non-tumoral și posibili transportatori pentru MPs.

Nanoparticulele magnetice $\text{Fe}_{68,2}\text{Cr}_{11,5}\text{Nb}_{0,3}\text{B}_{20}$ obținute sunt folosite pentru încărcarea cu medicamente antitumorale - Mitoxantronă (MTX) sau Doxorubicină (DOX). Aceste medicamente sunt utilizate în practica clinică pentru mai multe tipuri de cancer. Particulele Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente pătrund în corpul celular și funcționează ca nanovehicule pentru administrarea medicamentelor.

Actuarea magneto-mecanică a acestor particule duce la ruperea membranei celulare, urmată de moartea celulară. Biocompatibilitatea nanoparticulelor a fost evaluată folosind testul

MTT, iar încărcarea cu medicamente cu Mitoxantronă sau Doxorubicină a fost confirmată prin analiza FT-IR și măsurători spectrofotometrice. Eficiența încărcării cu medicamente (DL, %), eficiența încapsulării medicamentelor (EE, %) și eliberarea medicamentului *in vitro* au fost determinate prin măsurători spectrofotometrice. Testul Ferozină a fost utilizat pentru a evalua internalizarea nanoparticulelor în ADSCs și celulele HOS. Citotoxicitatea MPs încărcate cu medicamente a fost evaluată prin testul MTT, iar colorarea nucleelor celulare a fost realizată cu DAPI.

După introducerea nanoparticulelor cu medicamente în celule, acestea au fost expuse la MMA. Ulterior, evaluarea morții celulare prin teste MTT, LDH și colorarea celulelor vii/moarte în ambele linii celulare. În plus, ADSCs au fost testate pentru utilizarea lor potențială ca purtători/transportatori de MPs. MPs încărcate cu medicamente în interiorul celulelor ADSCs au fost transferate peste culturile de celule HOS și expuse la MMA. În continuare, HOS a internalizat MPs eliberate și au fost supuse din nou acțiunii magneto-mecanice în câmp magnetic pentru distrugerea celulelor canceroase, cu rezultate evaluate prin teste MTT și LDH.

4.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$

Nanoparticulele magnetice sunt obținute din benzi amorfe cu compoziția $\text{Fe}_{68.2}\text{Cr}_{11.5}\text{Nb}_{0.3}\text{B}_{20}$. Aceste benzi sunt preparate prin răcirea rapidă a topiturii într-un strat rotativ de apă. Datorită stării amorfe, benzile magnetice prezintă proprietăți magnetice specifice, cum ar fi: permeabilitate magnetică ridicată, magnetizație de saturație mare obținută la câmpuri magnetice mici și temperatură Curie controlată. Ulterior, benzile amorfe sunt supuse unui proces de măcinare mecanică în moară cu bile, până când se obțin particule de dimensiuni nanometrice. Prin această tehnică, se obțin particule magnetice cu dimensiuni cuprinse între 10 și 200 nm, prezentând o formă paralelipipedică, așa cum se arată în Figura 12a obținută folosind un HR-SEM. Măsurătorile DLS (Dispersia Dinamică a Luminii) prezentate în Figura 12c au relevat intervalul de dimensiuni între 50-500 nm pentru particulele magnetice Fe-Cr-Nb-B.

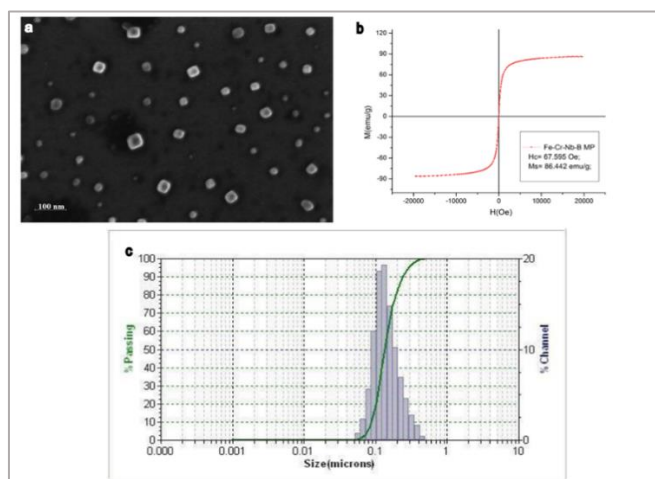


Figura 12. Nanoparticulele magnetice Fe-Cr-Nb-B. a) Formă și dimensiunea nanoparticulelor, obținută cu HR-SEM ; b) Curbă de histerezis a nanoparticulelor, obținută prin metoda VSM ; c) Distribuția dimensională a nanoparticulelor de Fe-Cr-Nb-B determinată prin metoda DLS [41].

Aceste particule au o magnetizație de saturație de 86 emu/g, rezultate obținute folosind un magnetometru cu probă vibrantă (VSM), prezentate în Figura 12b. Forma paralelipipedică conferă particulelor o anizotropie magnetică de formă, ce duce la creșterea cuplului de rotație în câmpul magnetic rotativ.

4.2. Adsorbția medicamentelor tumorale pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B

4.2.1. Cuantificarea medicamentelor tumorale adsorbite pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B prin metodă spectrofotometrică

Având în vedere că scopul acestui studiu este de a utiliza o terapie sinergică care include utilizarea actuării magneto-mecanice combinată cu compuși bioactivi anti-tumorali, a fost testată abilitatea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B de a reține pe suprafața lor Mitoxantronă (MTX) și Doxorubicină (DOX).

Încărcarea medicamentului (Gradul de încărcare al medicamentului- Drug loading efficiency- DL, %) pe suprafața nanomaterialului (Figura 34) a fost de 7,45% masă/masă (m/m) pentru MTX și 7,02% m/m pentru DOX în fiecare miligram de nanoparticule magnetice. Eficiența încapsulării medicamentului (EE, %) în acest caz a fost de 74,56% pentru MTX și 70,20% pentru DOX. Mitoxantrona și Doxorubicina utilizate în aceste experimente au fost de calitate farmaceutică, iar soluțiile au fost filtrate pentru a fi sterilizate, încărcarea ulterioară fiind realizată în condiții aseptice în fiecare experiment.

În urma acestor teste, s-a confirmat că nanoparticulele de tip Fe-Cr-Nb-B au capacitatea de a adsorbi pe suprafață ambele tipuri de medicamente antitumorale. În cazul mitoxantronei această încărcare este de 74,5μg pentru 1 mg de particule, iar în cazul doxorubicinei este de 70,20μg pentru 1 mg de particule.

4.3. Eliberarea medicamentelor antitumorale de pe particulele Fe-Cr-Nb-B

Curbele de eliberare a Mitoxantronei și Doxorubicinei de pe suprafața nanoparticulelor magnetice au fost analizate pentru a identifica cantitatea de medicament ce poate fi eliberată. Cinetica de eliberare simulează timpii și cantitățile în care medicamentele ajung în zonele afectate de cancer și în țesutul sănătos din apropierea tumorii. Atât particulele MP-MTX, cât și cele MP-DOX au fost introduse într-o membrană de dializă și plasate în mediu de cultură fără fenol roșu (pentru a minimiza interferențele în citirea absorbției) la trei valori diferite de pH: 4,5, 6 și 7,4.

Figurile 13a și 14a prezintă curbele de eliberare cumulativă atât pentru MTX, cât și pentru DOX pe parcursul a 72 de ore.

O problemă majoră în administrarea medicamentelor antitumorale constă în distribuția substanțelor în întregul sistem circulator, afectând atât zonele sănătoase, cât și pe cele tumorale [42]. În cazul acestui studiu curbele de eliberare cumulată indică că, la pH-ul 7,4, după 24 de ore, doar 12,5% din MTX și 12% din DOX au fost eliberate de pe nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B, cu peste 85% din medicamente rămase încapsulate, sugerând că în cazul transportului prin

circulația sângelui sau injectării în zona apropiată a tumorii, nanoparticulele încărcate cu medicament vor elibera doar o cantitate limitată de medicament în zonele sănătoase. De asemenea, atunci când se utilizează ADSC încărcate cu MP-(MTX/DOX) ca transportatori de nanoparticule, medicamentele eliberate nu ar afecta în mod major celulele purtătoare. După 72 de ore, cantitatea de MTX eliberată a fost de 24%, respectiv 21,5% pentru DOX.

La un pH de 6, a fost înregistrată o creștere a eliberării de medicament, atât pentru MTX, cât și pentru DOX. Eliberarea de MTX după 72 de ore a fost de aproape 34%, cu 12% din medicament eliberat în primele 5 ore. Valoarea pentru DOX a fost de aproape 47% după 72 de ore și 23% în primele 5 ore.

La un pH de 4,5, în mediul cel mai acid, eliberarea medicamentelor a atins pragul cel mai înalt, ajungând la 74% pentru MTX și 77% pentru DOX. PH-ul acid facilitează eliberarea medicamentelor de pe suprafața particulei, în moment ce particula se află în proximitatea mediului acid al tumorii sau în compartimentul endozomal/lizozomal. Cantitatea de medicament antitumoral eliberat în mediul acid este mai mare în comparație cu cantitatea eliberată în pH-ul neutru din celulele normale.

Analiza eliberării medicamentelor prin intermediul modelelor cinetice, este imperativă în înțelegerea procesului de livrare a substanțelor farmaceutice active într-un mod controlat. În consecință, s-a folosit o serie de cinci modele cinetice, incluzând modelul de ordin zero, de ordinul întâi, Korsmeyer-Peppas, Higuchi și Hixson-Crowell, pentru a demonstra mecanismele de eliberare a Mitoxantronei (Figura 13) și a Doxorubicinei (Figura 14) sub condițiile de pH 4,5, 6 și 7,4, respectiv.

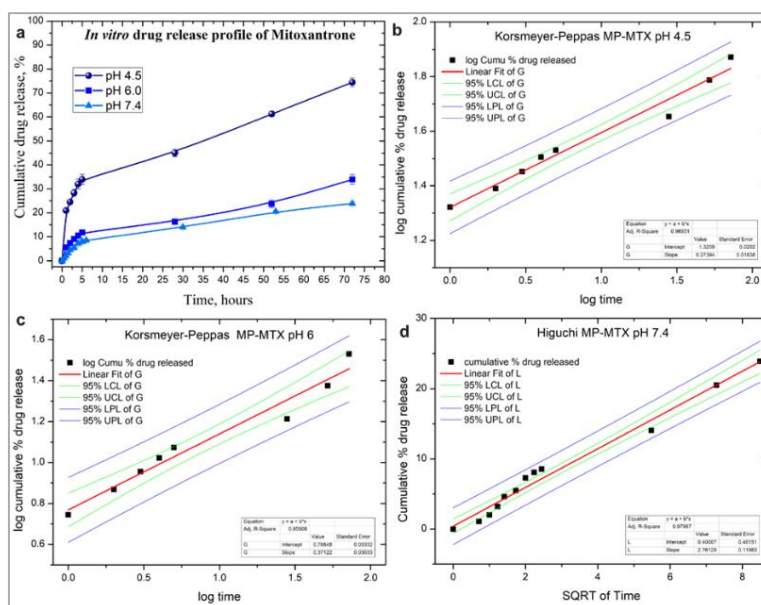


Figura 13. a) Profilul de eliberare in vitro a Mitoxantronei la diferite valori de pH- 4,5, 6 și 7,4;b-d) Cinetica eliberării Mitoxantronei de pe nanoparticulele magnetice Fe-Cr-Nb-B la: b) pH 4,5 corespunzător modelului Korsmeyer-Peppas, $R^2=0,969$; c) pH 6 corespunzător modelului Korsmeyer-Peppas, $R^2=0,955$ și la d) pH 7,4 corespunzător modelului Higuchi, $R^2=0,979$ [41].

Figura 13 prezintă profilul de eliberare a Mitoxantronei *in vitro* și modelele matematice de eliberare ce se potrivesc cel mai bine pentru nanoparticulele magnetice Fe-Cr-Nb-B la diferite valori de pH (4,5, 6 și 7,4). Profilele de eliberare prezintă modele distincte influențate de valorile pH-ului, la pH-ul acid 4,5 și 6 eliberarea MTX urmează un mecanism controlat, după cum indică buna potrivire ($R^2 = 0,969$ și $0,955$) cu modelul Korsmeyer-Peppas, comportamentul de eliberare fiind predominant guvernat de procesele de difuziune. La o valoare mai mare a pH-ului, cea de 7,4, cinetica eliberării MTX din nanoparticule se potrivește bine ($R^2 = 0,979$) cu modelul Higuchi, sugerând un mecanism controlat de difuziune pentru eliberarea medicamentului. Rezultatele prezentate sunt în conformitate cu așteptările pentru sistemele în care difuziunea medicamentului este modul principal de eliberare, și evidențiază comportamentul dependent de pH al nanoparticulelor magnetice Fe-Cr-Nb-B în eliberarea MTX.

În Figura 14 se poate observa un comportament similar pentru Doxorubicină, unde este reprezentat profilul de eliberare a medicamentului *in vitro* la diferite valori de pH (4,5, 6 și 7,4), alături de cele mai potrivite modele matematice. La pH-urile 4,5 și 6, cinetica eliberării DOX de pe nanoparticulele prezintă un comportament asemănător cu cel al Mitoxantronei la același pH (Figura 36), ajustându-se bine la modelul Korsmeyer-Peppas, cu un R^2 de 0,991 și 0,979. Consistența observată sugerează că nanoparticulele magnetice Fe-Cr-Nb-B prezintă un mecanism de eliberare fiabil și predictibil pentru diferite încărcături de medicamente în condiții acide, astfel confirmând potențialul utilizării ca vehicul versatil pentru livrarea medicamentelor. La pH 7,4, similar observațiilor pentru MTX, cinetica eliberării Doxorubicinei demonstrează o potrivire bună la modelul Higuchi, cu o valoare R^2 de 0,991. Acest lucru reafirmă importanța mecanismelor controlate de difuziune în eliberarea medicamentelor de pe nanoparticulele magnetice.

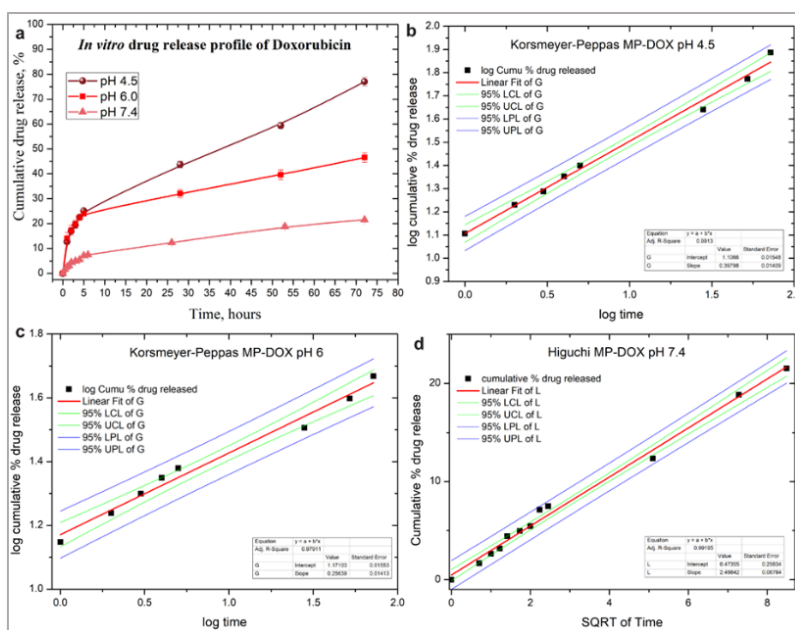


Figura 14. a) Profilul de eliberare *in vitro* a Doxorubicinei la diferite valori de pH: 4,5, 6 și 7,4; b-d) Cinetica eliberării Doxorubicinei de pe nanoparticulele magnetice Fe-Cr-Nb-B la:

b) pH 4,5 corespunzător modelului Korsmeyer-Peppas, cu $R^2=0,991$; c) pH 6 corespunzător modelului Korsmeyer-Peppas, cu $R^2=0,979$ și la d) pH 7,4 corespunzător modelului Higuchi, cu $R^2=0,991$ [41].

4.4. Internalizarea nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente în celulele de ADSC și HOS

Internalizarea celulară a nanomaterialelor se realizează prin mecanisme cum ar fi: endocitoza, fagocitoza, micropinocitoza, difuzia directă și interacțiunile aderente [43]. Studiile recente realizate în cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică Tehnică [26] au arătat că o concentrație de 1 mg/mL de nanoparticule magnetice Fe-Cr-Nb-B a fost cea mai eficientă pentru actuarea magneto-mecanică și distrugere celulară.

Determinarea cantității de Fe a fost efectuată în plăci de 24 de godeuri, testând următoarele loturi de particule: MP (particule neîncărcate), MP-MTX1, MP-MTX10, MP-DOX1 și MP-DOX10. Ambele linii celulare, ADSC și HOS, au fost utilizate pentru determinarea capacității de internalizare a nanoparticulelor. Cantitatea totală de Fe a fost împărțită la numărul total de celule din godeul respectiv, astfel încât rezultatele obținute, prezentate în Figura 15, indică cantitatea de nanoparticule magnetice per celulă.

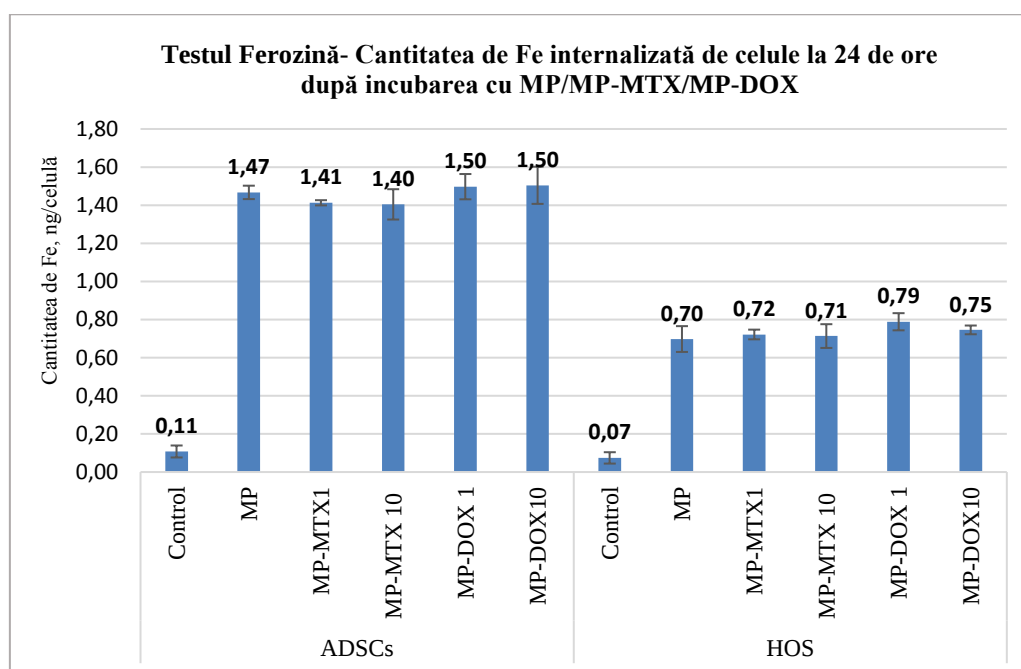


Figura 15. Cantitatea de Fe conținută în fiecare celulă după incubarea cu particule neîncărcate și încărcate cu mitoxantronă sau doxorubicină. Valori obținute prin citire spectrofotometrică și divizarea cantității de fier la numărul de celule [41].

Testul Ferozină relevă că atât nanoparticulele încărcate cu medicament, cât și cele neîncărcate au aceeași rată de internalizare în celule, cu o cantitate ușor crescută la nanoparticulele acoperite cu DOX.

4.5. Efectul nanoparticulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale asupra viabilității celulare

Ca prim pas pentru optimizarea livrării nanoparticulelor magnetice, nanoparticulele încărcate cu medicament au fost testate pentru efectul lor citotoxic. 1 mg/mL din fiecare tip de nanoparticule încărcate și neîncărcate au fost adăugate peste celule ADSCs și HOS aflate la confluență în plăci cu 96 de godeuri, utilizând mediu de cultură celulară. După 24 de ore de co-incubare, viabilitatea celulară a fost evaluată prin testul MTT.

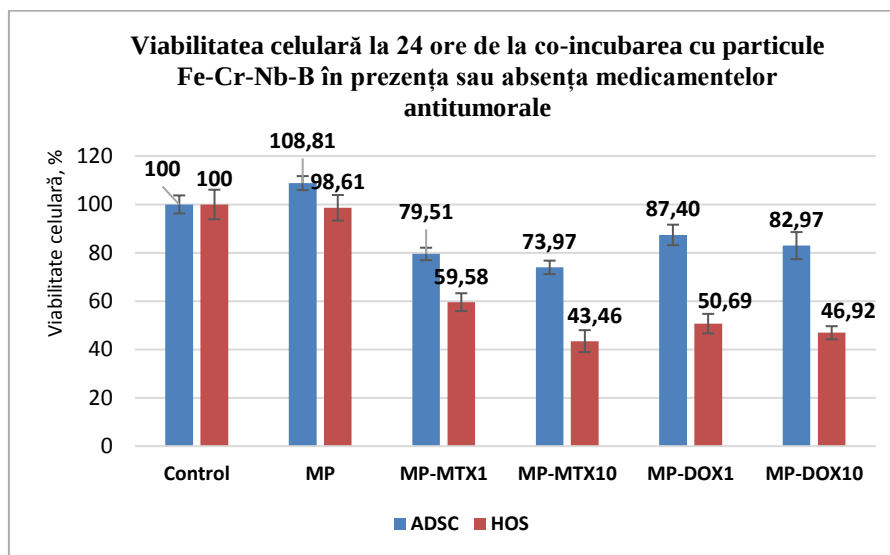


Figura 16. Viabilitate celulară a ADSC și HOS determinată prin test MTT la 24 ore după co-incubare cu particule Fe-Cr-Nb-B [41].

După cum se poate observa în Figura 16, nanoparticulele magnetice neîncărcate nu afectează ADSCs sau HOS. Particulele Fe-Cr-Nb-B sunt internalizate de către celule prin endocitoză, metodă de captare a nanoparticulelor sub 200 nm [44], iar veziculele formate (endozomi) sunt transportate în compartimentul lizozomal, unde mediul acid facilitează dizolvarea și eliberarea ionilor de fier din nanoparticule, ce sunt ulterior utilizați în activitatea celulară și stocați ca rezerve de fier [18].

Celulele au fost expuse și la particule încărcate cu medicamente: MP-MTX cu 1 și 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanoparticule și similar pentru nanoparticulele încărcate cu DOX. Rezultatele prezentate în Figura 16 arată că MP-MTX10 și MP-DOX10 au redus viabilitatea celulară pentru cultura HOS la nivel de 43% pentru MP-MTX și 46% pentru MP-DOX. În același timp, cultura celulară ADSCs prezintă o viabilitate crescută în comparație cu HOS, după expunerea la nanoparticule încărcate cu medicament, fiind afectate puțin în mostrele de DOX cu 12-18% și pentru MTX cu 21-26%.

4.6. Actuarea magneto-mecanică a particulelor Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente în interiorul celulelor ADSCs și HOS

4.6.1. Viabilitatea celulelor ADSCs și HOS după actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu medicamente antitumorale

Terapia sinergică propusă aici implică mecanismul medicamentos, prezentat mai sus, dar și un mecanism magneto-mecanic complementar celulelor deja afectate de medicament. Actuarea magneto-mecanică are loc într-un sistem cu patru bobine Helmholtz ce generează un câmp magnetic uniform în interiorul zonei sistemului.

Plăcile cu 96 de godeuri cu HOS și ADSCs au fost plasate în interiorul sistemului și au fost actuate într-un câmp magnetic rotativ. Anterior testelor, celulele la o confluență de 90% au fost co-incubate timp de 24 de ore cu 1 mg/mL de nanoparticule neîncărcate și încărcate cu medicamente pentru a permite internalizarea nanoparticulelor. Sesiunea de MMA a durat 30 de minute. Nanoparticulele de Fe-Cr-Nb-B aflate în interiorul dispozitivului MMA dobândesc o mișcare de rotație și distrug celulele vizate. Pentru a evalua efectul nanoparticulelor sub influența MMA asupra culturilor celulare, a fost utilizat un test de viabilitate MTT.

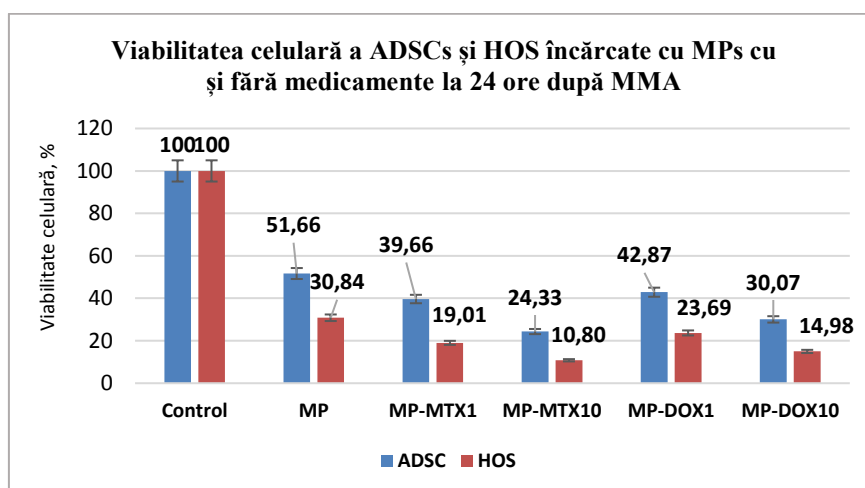


Figura 17. Viabilitate celulară determinată prin test MTT la 24 ore după actuarea magneto-mecanică a celulelor ADSCs și HOS încărcate cu particule Fe-Cr-Nb-B cu și fără medicamente [41].

Testele de viabilitate au fost efectuate la 24 de ore după actuarea magneto-mecanică. După expunerea celulelor ADSCs și HOS la MMA, viabilitatea celulară a fost identificată cu ajutorul testului MTT. Probele care conțin doar particule magnetice au arătat o viabilitate de 51% pentru ADSCs și 30% pentru HOS, astfel că celulele încărcate cu nanoparticule sunt distruse prin aplicarea unui câmp magnetic care induce mișcarea particulelor în interiorul sau în afara celulelor.

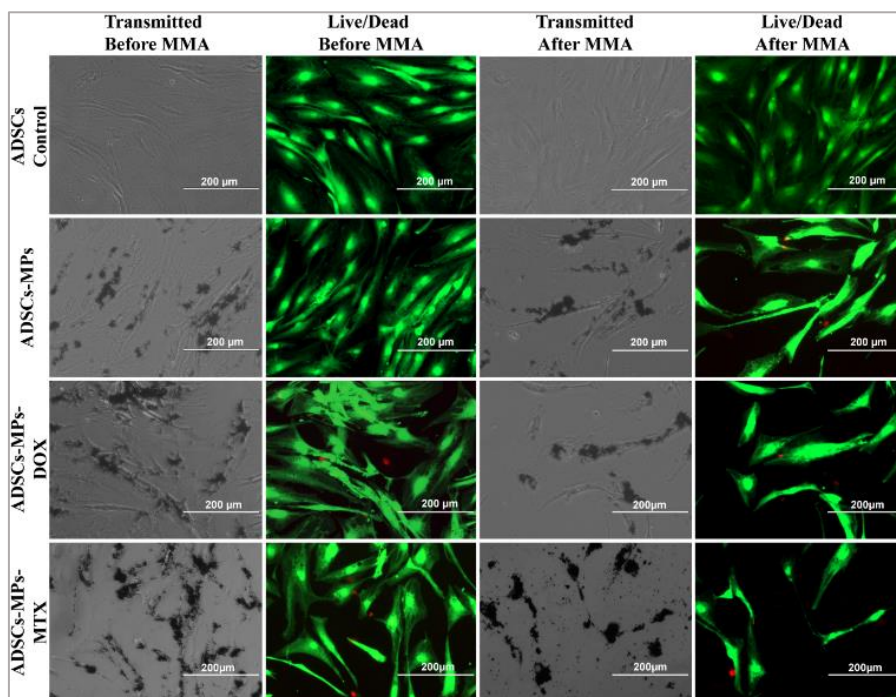
Nanoparticulele încărcate cu medicament combinate cu MMA au dus la o viabilitate extrem de scăzută în cazul ambelor linii celulare. Probele ce au conținut MP-MTX prezintă o viabilitate în intervalul 24-39% pentru ADSCs și 10-19% pentru HOS, valorile viabilității fiind invers proporționale cu concentrația de medicament. MP-DOX arată o viabilitate de 30-42%

pentru ADSCs și 14-23% pentru HOS. Un aspect important de menționat, este că în toate probele menționate anterior, ADSCs au o viabilitate mai bună în comparație cu probele similare pentru HOS, indicând faptul că ADSCs nu sunt influențate atât de negativ comparativ cu celulele HOS.

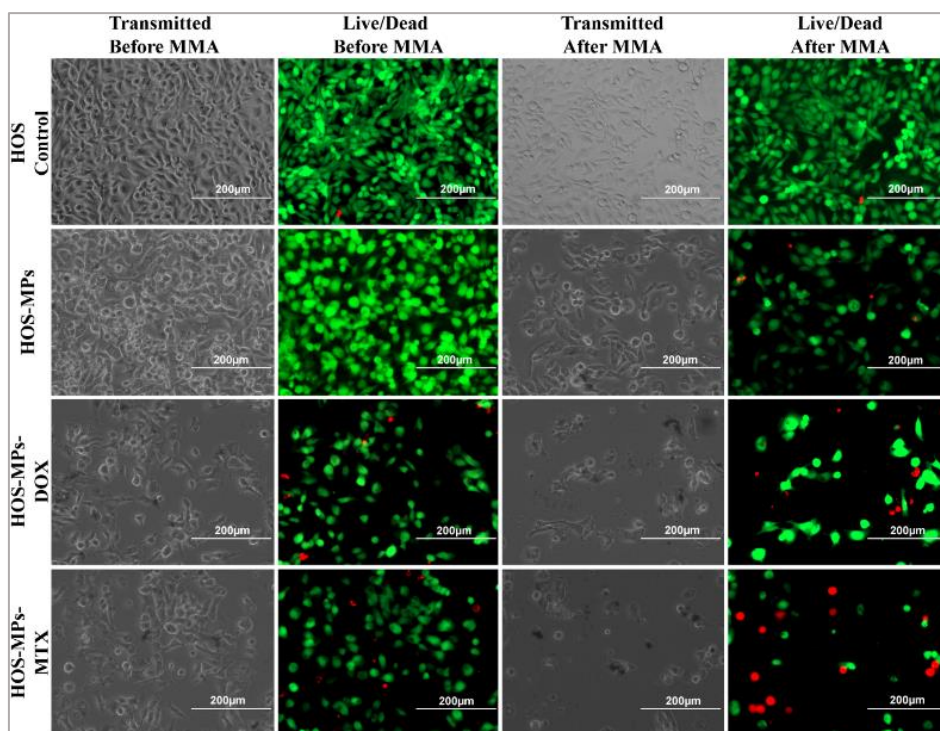
4.6.2. Determinarea celulelor vii și moarte după actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor magnetice încărcate cu medicamente antitumorale în celulele ADSCs și HOS prin testul Live/Dead

Testul Live/Dead oferă o metodă de colorare în două culori cu coloranți fluorescenți pentru celulele vii și cele moarte. Celulele vii au activitate a esterazelor intracelulare și pot fi colorate cu calcein-AM fluorescent verde care se fixează pe întregul corp celular, în timp ce celulele moarte, care au pierdut integritatea membranei celulare, sunt colorate cu etidium homodimer-1 fluorescent roșu care se leagă de nucleul celular.

Figura 18 indică efectul MMA în cazul celulelor ADSCs neîncărcate și încărcate cu nanoparticule. ADSCs, atât cele de control, cât și cele control MMA, sunt fusiforme, cu o formă celulară alungită și o bună fixare pe vasul de cultură celulară, fiind astfel celule viabile în proporție de 100%. ADSCs-MP, ce conțin nanoparticule neîncărcate, nu prezintă efect citotoxic și au o viabilitate bună, dar același lucru nu se poate afirma pentru ADSCs-MP în urma expunerii MMA. Forma corpului celular evidențiază procesele din interiorul celulei.



Figură 18. Testul Live/Dead reprezentând ADSCs înainte și după actuarea magneto-mecanică. Imaginile prezentate conțin ADSCs Control, ADSCs-MP, ADSCs-MP-DOX și ADSC-MP-MTX. Imaginile au fost capturate în: lumină transmisă și filtre de fluorescență GFP și RFP. Imaginile pentru celulele vii (filtrul GFP) și cele moarte (filtrul RFP) au fost combinate pentru a obține imaginile Live/Dead cu microscopul EVOS cu lumină inversată, scala=200 μm, magnificare=20× [41].



Figură 19. Testul Live/Dead reprezentând HOS înainte și după actuaarea magneto-mecanică. Imaginile prezentate conțin HOS Control, HOS-MP, HOS-MP-DOX și HOS-MP-MTX. Imaginile au fost capturate în: lumină transmisă și filtre de fluorescență GFP și RFP. Imaginile pentru celulele vii (filtrul GFP) și cele moarte (filtrul RFP) au fost combinate pentru a obține imaginile Live/Dead cu microscopul EVOS cu lumină inversată, scala=200 μm , magnificare=20 $\times$ [41].

Celulele HOS au fost supuse aceluiași tratament ca și ADSCs, colorând cu testul Live/Dead celulele înainte și după MMA. Figura 19 arată morfologia celulelor HOS înainte și după MMA. Dimensiunea celulei HOS este semnificativ mai mică în comparație cu ADSC și, implicit, conține o cantitate mai mică de nanoparticule, fapt confirmat și de testul cu ferozină, totuși suficient pentru a leza celulele prin MMA.

Celulele de control HOS își mențin homeostazia celulară sub influența câmpului magnetic. În schimb, celulele HOS care conțin nanoparticule au fost grav afectate de actuaarea magneto-mecanică, ori de încărcarea cu medicament, sau ambele. Atașarea celulelor este puternic perturbată, cu celule care tind să ia o formă sferică și să piardă aderența la recipient, ceea ce înseamnă că celula se află în fază de apoptoză sau este decedată. Imaginile Live/Dead confirmă că nanoparticulele sub influența MMA duc la deteriorarea celulelor, dar împreună cu mecanismul antitumoral al medicamentelor scad semnificativ viabilitatea celulară.

4.6.3. Actuaarea magneto-mecanică a celulelor ADSCs care transportă nanoparticule încărcate cu medicament în cultura celulară de osteosarcom

Având în vedere tratamentul propus anterior, ce implică nanoparticule încărcate cu medicament în combinație cu actuaarea magneto-mecanică (MMA), a fost testată în continuare o strategie de

tip „Cal Troian”, constând în livrarea nanoparticulelor încărcate cu medicament folosind celule ADSCs.

Inițial pentru înglobarea nanoparticulelor, ADSCs în plăci de 96 de godeuri au fost co-incubate timp de 24 de ore cu nanoparticule încărcate cu medicament la o concentrație de 1 mg/mL. ADSCs au fost spălate corespunzător de două ori cu PBS pentru a elimina excesul de nanoparticule și au fost tripsinizate pentru desprinderea de pe vasul de cultură. Celulele desprinse au fost transferate peste cultura celulară HOS aflată la confluență. După 2 ore, cât timp ADSCs erau încă în suspensie, celulele au fost expuse la MMA timp de 30 de minute. În prima rundă de MMA, ADSCs au suferit ruptura membranei celulare și au eliberat nanoparticulele transportate asupra celulelor HOS. După încă 24 de ore, când nanoparticulele eliberate au fost încorporate de HOS, a fost aplicată încă o rundă de MMA, de această dată nanoparticulele distrugând celulele canceroase. După 24 de ore, s-au efectuat testul de viabilitate MTT și testul de citotoxicitate LDH pentru co-cultura de ADSC+HOS.

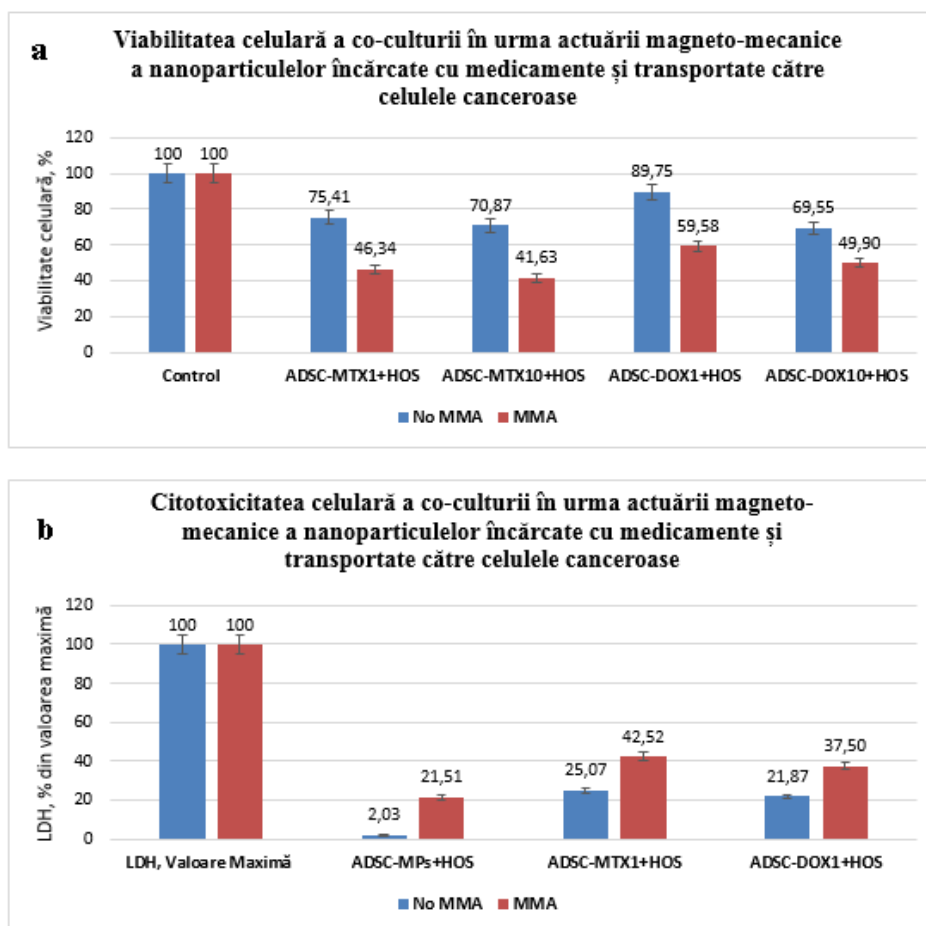


Figura 20. a) Testul de viabilitate MTT și b) Testul de citotoxicitate LDH. Actuarea magneto-mecanică a fost aplicată asupra celulelor ADSCs ce conțineau nanoparticule încărcate cu medicament, aflate la siturile tumorale (HOS), iar după 24 de ore a fost aplicată încă o sesiune de MMA odată ce nanoparticulele au pătruns în celulele HOS [41].

Figura 20 arată că atât testul MTT, cât și cel LDH demonstrează că o concentrație mică precum 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de medicament încărcat pe MPs poate reduce viabilitatea celulară la 75% utilizând doar componenta de medicament în această co-cultură ADSCs-HOS și la o viabilitate și mai redusă—70% pentru concentrația de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de medicament-MPs în cazul mitoxantronei. În cazul doxorubicinei înainte de MMA viabilitatea celulară scade la doar 89% pentru concentrația 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ și 69% pentru 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Când se aplică MMA și se utilizează terapie sinergică, viabilitatea celulară este redusă la doar 41% pentru probele cu MTX și la 50% pentru probele DOX. Testul de citotoxicitate LDH confirmă că probele prezintă leziuni ale membranei celulare urmând același tipar observat la testul MTT.

5. Concluzii

Această teză de doctorat se ocupă de influența nanoparticulelor magnetice în proliferarea, diferențierea și distrugerea celulară. Au fost studiate interacțiunile dintre nanoparticulele de magnetită și respectiv de Fe-Cr-Nb-B și celulele umane, atât în contextul diferențierii celulare, cât și în tratamentul cancerului.

1. În cadrul acestei teze au fost folosite două tipuri de particule.
 - a. Nanoparticulele de magnetită au fost sintetizate prin metoda hidrotermală mecano-chimică modificată ce prezintă caracteristici fizico-chimice adecvate pentru proliferarea și diferențierea celulară.
 - b. Nanoparticulele de Fe-Cr-Nb-B au fost obținute prin măcinarea benzilor amorfe, rezultând nanoparticule cu dimensiuni sub 200 nm și o anizotropie de formă ridicată.
 2. Am dezvoltat o metodă de asamblare a sferoizilor magnetici sub influența câmpului magnetic static.
 - a. Am testat viabilitatea, proliferarea și mobilitatea sferoizilor încărcăți cu nanoparticule de magnetită. Expunerea sferoizilor formați din celule stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSC) la câmpuri magnetice statice a dus la o creștere a volumului și a capacității de proliferare comparativ cu sferoizii neexpuși.
 - b. Am studiat diferențierea condrogenică a sferoizilor și am observat o îmbunătățire în prezența nanoparticulelor, indiferent de expunerea la câmp magnetic static. Sferoizii ADSC-MNP au prezentat o creștere semnificativă a conținutului de glucozaminoglicani (GAG), indicând un rol important al MNP în promovarea condrogenezei.
 3. Au fost actuate în câmp magnetic la timpi variabili celulele ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule magnetice.
 - a. Am găsit că celulele ADSC prezintă valori crescute ale diferențierii adipogenice atunci când sunt actuate în câmp magnetic 2 zile în regim continuu.
 - b. A rezultat că diferențierea osteogenică a ADSC are valori crescute atunci când celulele sunt expuse 2 sau 7 zile în câmp magnetic și sunt încărcate cu nanoparticule de magnetită.
 - c. Am identificat că celulele ADSC și WJMSC încărcate cu nanoparticule de magnetită au arătat o viabilitate bună și o capacitate de proliferare semnificativă, ADSC demonstrând o internalizare mai mare a nanoparticulelor comparativ cu WJMSC.
 - d. Cea mai mare valoare a diferențierii condrogenice a fost înregistrată la celulele ADSC încărcate cu MNP actuate în câmp magnetic.
- Pe baza acestor rezultate se poate aprecia că proliferarea, viabilitatea și diferențierea este majoritar crescută în prezența nanoparticulelor magnetice.
4. Am studiat actuarea magneto-mecanică combinată cu medicamentele antitumorale pentru tratamentul cancerului.
 - a. Nanoparticulele Fe-Cr-Nb-B au fost încărcate cu Mitoxantronă și Doxorubicină prin adsorbție, proces confirmat prin metode spectrofotometrice și FT-IR. Gradul de încărcare a fost ridicat, indicând o capacitate excelentă de captare a celor două medicamente.

- b. Studiind eliberarea medicamentelor am găsit că aceasta este dependentă de pH, cu o eliberare mai rapidă la pH acid (4,5), specific compartimentului lizozomal. Modelele matematice Higuchi și Korsmeyer-Peppas au descris cel mai bine cinetica eliberării medicamentelor.
- c. Nanoparticulele de Fe-Cr-Nb-B încărcate cu medicamente antitumorale au demonstrat eficiență în eliberarea controlată a medicamentelor, confirmând potențialul acestor sisteme pentru tratamentul cancerului.
- d. Nanoparticulele încărcate cu medicamente au fost internalizate eficient de celulele HOS și ADSC demonstrat prin testul de Ferozină și imagini de microscopie optică. Cantitatea de nanoparticule este dublă în cazul ADSC comparativ cu celulele HOS, valori rezultate din cauza diferenței de dimensiune a celulelor.
- e. Actuarea magneto-mecanică a nanoparticulelor încărcate cu medicamente a fost testată pe celule de osteosarcom uman (HOS) și celule stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSCs). Mișcările mecanice generate de nanoparticule au provocat leziuni ale membranei celulare și au indus apoptoza. Eficiența acestui proces a fost confirmată prin teste de viabilitate celulară (MTT), teste de citotoxicitate (LDH) și colorarea celulelor vii/moarte.
- f. Actuarea magneto-mecanică a amplificat efectul antitumoral al medicamentelor. ADSC au fost afectate în măsură mai mică, indicând selectivitatea și eficiența terapiei propuse.
- g. ADSC au demonstrat potențialul de a transporta nanoparticulele încărcate cu medicament direct la siturile tumorale, minimizând astfel efectele secundare asupra țesuturilor sănătoase.
- h. Terapia sinergică ce combină actuarea magneto-mecanică cu eliberarea controlată a medicamentelor, reprezintă o metodă promițătoare pentru tratamentul cancerului. Aceasta poate îmbunătăți semnificativ eficiența tratamentului și reduce toxicitatea sistemică asociată cu terapiile convenționale.

Rezultatele obținute în această teză subliniază contribuțiile nanoparticulelor magnetice în medicină. Sunt necesare studii suplimentare pentru optimizarea și aplicabilitatea clinică acestor rezultate. Direcțiile viitoare de cercetare ar putea să se concentreze pe:

- Evaluarea *in vivo* a efectelor nanoparticulelor și câmpurilor magnetice în modele animale.
- Optimizarea parametrilor de actuare magneto-mecanică pentru alte tipuri de celule canceroase și aplicații terapeutice.
- Dezvoltarea unor protocoale standardizate pentru utilizarea nanoparticulelor în medicina regenerativă și tratamentul cancerului.

Această teză contribuie la înțelegerea și dezvoltarea nanotehnologiei în medicină, oferind o bază pentru cercetări viitoare.

• Bibliografie selectivă

- [1] Petrov K D and Chubarov A S 2022 Magnetite Nanoparticles for Biomedical Applications *Encyclopedia* **2** 1811–28
- [2] Jiang K, Zhang L and Bao G 2021 Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications *Current Opinion in Biomedical Engineering* **20** 100330
- [3] Dik G, Ulu A and Ates B 2022 Medicinal and Biological Application of Magnetic Alloy Nanoparticles and Their Polymer Nanocomposites *Handbook of Magnetic Hybrid Nanoalloys and their Nanocomposites* ed S Thomas and A Rezazadeh Nochehdehi (Cham: Springer International Publishing) pp 1127–53
- [4] Enriquez-Navas P M and Garcia-Martin M L 2012 Chapter 9 - Application of Inorganic Nanoparticles for Diagnosis Based on MRI *Frontiers of Nanoscience Nanobiotechnology* vol 4, ed J M de la Fuente and V Grazu (Elsevier) pp 233–45
- [5] Stachurski Z H, Wang G and Tan X 2021 Chapter 6 - Magnetic properties of amorphous metallic alloys *An Introduction to Metallic Glasses and Amorphous Metals* ed Z H Stachurski, G Wang and X Tan (Elsevier) pp 157–92
- [6] Hamida R S, Ali M A, Redhwan A and Bin-Meferij M M 2020 <p>Cyanobacteria – A Promising Platform in Green Nanotechnology: A Review on Nanoparticles Fabrication and Their Prospective Applications</p> *IJN* **15** 6033–66
- [7] Corbett S A and Foty R A 2008 Cell Structure, Function, and Genetics *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence* ed J A Norton, P S Barie, R R Bollinger, A E Chang, S F Lowry, S J Mulvihill, H I Pass and R W Thompson (New York, NY: Springer) pp 37–73
- [8] Cooper G M 2000 Structure of the Plasma Membrane *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (Sinauer Associates)
- [9] Fletcher D A and Mullins R D 2010 Cell mechanics and the cytoskeleton *Nature* **463** 485–92
- [10] Reya T, Morrison S J, Clarke M F and Weissman I L 2001 Stem cells, cancer, and cancer stem cells *Nature* **414** 105–11
- [11] Urlić I, Jovičić M Š, Ostojić K and Ivković A 2023 Cellular and Genetic Background of Osteosarcoma *Curr Issues Mol Biol* **45** 4344–58
- [12] Mazini L, Ezzoubi M and Malka G 2021 Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart and regulation updates before and after COVID-19 *Stem Cell Research & Therapy* **12** 1
- [13] Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z and Gharravi A M 2019 Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cell: Various Protocols for Isolation and Differentiation of Hepatocyte-Like Cells; Narrative Review *Iran J Med Sci* **44** 437–48
- [14] Friedrich J, Seidel C, Ebner R and Kunz-Schughart L A 2009 Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach *Nat Protoc* **4** 309–24

- [15] Foroozandeh P and Aziz A A 2018 Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles *Nanoscale Res Lett* **13** 339
- [16] Calero M, Gutiérrez L, Salas G, Luengo Y, Lázaro A, Acedo P, Morales M P, Miranda R and Villanueva A 2014 Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **10** 733–43
- [17] de la Fuente-Jiménez J L, Rodríguez-Rivas C I, Mitre-Aguilar I B, Torres-Copado A, García-López E A, Herrera-Celis J, Arvizu-Espinosa M G, Garza-Navarro M A, Arriaga L G, García J L, García-Gutiérrez D I, Dehesa A Z, Sharma A and Oza G 2023 A Comparative and Critical Analysis for In Vitro Cytotoxic Evaluation of Magneto-Crystalline Zinc Ferrite Nanoparticles Using MTT, Crystal Violet, LDH, and Apoptosis Assay *International Journal of Molecular Sciences* **24** 12860
- [18] Yaremenko A V, Zelepukin I V, Ivanov I N, Melikov R O, Pechnikova N A, Dzhililova D Sh, Mirkasymov A B, Bragina V A, Nikitin M P, Deyev S M and Nikitin P I 2022 Influence of magnetic nanoparticle biotransformation on contrasting efficiency and iron metabolism *J Nanobiotechnol* **20** 535
- [19] Maziarz A, Kocan B, Bester M, Budzik S, Cholewa M, Ochiya T and Banas A 2016 How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts *Stem Cell Research & Therapy* **7** 54
- [20] Wang H and Zhang X 2017 Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species *Int J Mol Sci* **18** 2175
- [21] Zheng L, Zhang L, Chen L, Jiang J, Zhou X, Wang M and Fan Y 2018 Static magnetic field regulates proliferation, migration, differentiation, and YAP/TAZ activation of human dental pulp stem cells *J Tissue Eng Regen Med* **12** 2029–40
- [22] Wang J and Shang P 2023 Static magnetic field: A potential tool of controlling stem cells fates for stem cell therapy in osteoporosis *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **178** 91–102
- [23] Di S, Tian Z, Qian A, Li J, Wu J, Wang Z, Zhang D, Yin D, Brandi M L and Shang P 2012 Large gradient high magnetic field affects FLG29.1 cells differentiation to form osteoclast-like cells *Int J Radiat Biol* **88** 806–13
- [24] Rotherham M, Nahar T, Broomhall T J, Telling N D and El Haj A J 2022 Remote magnetic actuation of cell signalling for tissue engineering *Current Opinion in Biomedical Engineering* **24** 100410
- [25] Goldmann W H 2014 Chapter Four - Mechanosensation: A Basic Cellular Process *Progress in Molecular Biology and Translational Science* Mechanotransduction vol 126, ed A J Engler and S Kumar (Academic Press) pp 75–102
- [26] Chiriac H, Minuti A E, Stavila C, Herea D-D, Labusca L, Ababei G, Stoian G and Lupu N 2023 Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles and Adipose-Derived Mesenchymal Cells Trigger Cancer Cell Apoptosis by Magneto-Mechanical Actuation *Nanomaterials* **13** 2941

- [27] Chiriac H, Lupu N, Lostun M, Ababei G, Grigoraş M and Dănceanu C 2014 Low TC Fe-Cr-Nb-B glassy submicron powders for hyperthermia applications *Journal of Applied Physics* **115** 17B520
- [28] Darwish W, Lafta R, Shafaa M and El-Nagdy M 2021 Mitoxantrone in synergism with gold hexagonal nanoparticles and gamma radiation for effective treatment of MCF7 cells *Egypt. J. Chem.* **0** 0–0
- [29] Herea D-D, Labusca L, Radu E, Chiriac H, Grigoras M, Panzaru O D and Lupu N 2019 Human adipose-derived stem cells loaded with drug-coated magnetic nanoparticles for in-vitro tumor cells targeting *Materials Science and Engineering: C* **94** 666–76
- [30] Morgan D M 1998 Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity *Methods Mol Biol* **79** 179–83
- [31] Riemer J, Hoepken H H, Czerwinska H, Robinson S R and Dringen R 2004 Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells *Anal Biochem* **331** 370–5
- [32] Burrow K L, Hoyland J A and Richardson S M 2017 Human Adipose-Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Proliferative Capacity and Retain Multipotency Longer than Donor-Matched Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Expansion In Vitro *Stem Cells International* **2017** 1–15
- [33] Yoon J-K, Kang M-L, Park J H, Lee K-M, Shin Y M, Lee J W, Kim H O and Sung H-J 2018 Direct Control of Stem Cell Behavior Using Biomaterials and Genetic Factors *Stem Cells International* **2018** 1–17
- [34] Cesarz Z and Tamama K 2016 Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells *Stem Cells International* **2016** 1–11
- [35] Labusca L, Herea D D, Minuti A E, Stavila C, Danceanu C, Grigoras M, Ababei G, Chiriac H and Lupu N 2021 Magnetic nanoparticle loaded human adipose derived mesenchymal cells spheroids in levitated culture *J Biomed Mater Res* **109** 630–42
- [36] Labusca L, Herea D-D, Danceanu C-M, Minuti A E, Stavila C, Grigoras M, Gherca D, Stoian G, Ababei G, Chiriac H and Lupu N 2020 The effect of magnetic field exposure on differentiation of magnetite nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells *Materials Science and Engineering: C* **109** 110652
- [37] Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X and Hui Y 2019 Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies *Biomedicine & Pharmacotherapy* **114** 108765
- [38] Labusca L, Herea D-D, Emanuela Minuti A, Stavila C, Danceanu C, Plamadeala P, Chiriac H and 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 *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9** 737132
- [39] Orynbayeva Z, Sensenig R and Polyak B 2015 Metabolic and Structural Integrity of Magnetic Nanoparticle-Loaded Primary Endothelial Cells for Targeted Cell Therapy *Nanomedicine*

- [40] Chiriac H, Radu E, Țibu M, Stoian G, Ababei G, Lăbușcă L, Herea D-D and Lupu N 2018 Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles with shape anisotropy for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation *Sci Rep* **8** 11538
- [41] Stavila C, Minuti A E, Herea D D, Labusca L, Gherca D, Lupu N and Chiriac H Synergistic effect of chemotherapy and magneto-mechanical actuation of Fe-Cr-Nb-B magnetic particles on cancer cells *ACS Omega* **Articol acceptat pentru publicare**
- [42] Anand U, Dey A, Chandel A K S, Sanyal R, Mishra A, Pandey D K, De Falco V, Upadhyay A, Kandimalla R, Chaudhary A, Dhanjal J K, Dewanjee S, Vallamkondu J and Pérez de la Lastra J M 2023 Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics *Genes & Diseases* **10** 1367–401
- [43] Wu M, Guo H, Liu L, Liu Y and Xie L 2019 Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles *IJN* **Volume 14** 4247–59
- [44] Wang T, Wang L, Li X, Hu X, Han Y, Luo Y, Wang Z, Li Q, Aldalbahi A, Wang L, Song S, Fan C, Zhao Y, Wang M and Chen N 2017 Size-Dependent Regulation of Intracellular Trafficking of Polystyrene Nanoparticle-Based Drug-Delivery Systems *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9** 18619–25

• **Diseminarea activității științifice**

A. Articole publicate în reviste cotate ISI din domeniul tezei

1. Stavila C., Minuti A., Herea D.D., Labusca L., Gherca D., Lupu N., Chiriac H., Synergistic effect of chemotherapy and magneto-mechanical actuation of Fe-Cr-Nb-B magnetic particles on cancer cells. ACS Omega 2024, Acceptat pentru publicare, Manuscris ID: ao-2024-021892. **IF 4,1; AIS 0,622.**
2. Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Herea D.-D.; Labusca L.; Ababei G.; Stoian G.; Lupu N. Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles and Adipose-Derived Mesenchymal Cells Trigger Cancer Cell Apoptosis by Magneto-Mechanical Actuation. Doi: 10.3390/nano13222941, Nanomaterials 2023, 13, 2941. **IF 5,3; AIS 0,707.**
3. Zară-Dănceanu C.M.; Stavilă C.; Minuti A.E.; Lăbușcă L.; Nastasa V.; Herea D.-D.; Malancus R.-N.; Ghercă D.; Pasca S.-A.; Chiriac H.; et al., 2023, Magnetic Nanoemulsions for the Intra-Articular Delivery of Ascorbic Acid and Dexamethasone, doi: 10.3390/ijms241511916. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 11916. Stavila Cristina - Autor cu drepturi egale cu prim-autor. **IF 5,6; AIS 1,028.**
4. Labusca L., Herea D. D., Minuti A. E., Stavila C., Danceanu C., Grigoras M., Ababei G., Chiriac H., Lupu N., 2020, 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 3,4; AIS 0,54.**
5. Labusca L., Herea D. D., Minuti A. E., 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 5,7; AIS 0,999.**
6. 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 7,328; AIS 0,902.**

Suma AIS a articolelor științifice publicate în domeniul tezei:

$$0,622 + 0,707 + 1,028 + 0,54 + 0,999 + 0,902 = 4,798$$

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

1. Stavila C., Zara C. M., Stoian G., Minuti A. M., Labusca L., Grigoras M., Chiriac H., Lupu N., 2024, Enhancement of chemotherapy effects by non-lethal magneto-mechanical actuation of gold-coated magnetic nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. Manuscris ID: JN2024132. Articol acceptat pentru publicare. **IF 5,4; AIS 0,845.**
2. Borhan A., Herea D. D., Gherca D., Stavila C., Minuti A. E., Grigoras M., Danceanu C. M., 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.**

3. Herea D. D., Zară-Dănceanu C-M., Lăbușcă L., Minuti A-E., Stavilă 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.**
4. Zară-Dănceanu C. M., Minuti A. E., Stavilă C., Lăbușcă L., Herea D. D., Tiron C. E., 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.**
5. Labusca L., Herea D-D., Dănceanu C-M., Stavila C., Minuti A-E., Chiriac H., Lupu N., Chondrogenic conversion of adipose derived mesenchymal stem cells loaded with magnetic nanoparticles. Osteoarthritis and Cartilage, Volume 29, Supplement 1, 2021, ISSN 1063-4584, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.02.528>. **IF 7,0; AIS 1,784.**

C. Lucrări prezentate de autoarea tezei la conferințe

1. Conferința științifică studentă FARPHYS 26 Octombrie 2019, Iași: „Cercetări experimentale asupra răspunsului unor culturi de celule maligne la acțiunea nanoparticulelor magnetice”, Autori: Cristina Surdu (Stavilă), Emilia Dorina CREANGĂ – poster
2. Conferința Internațională Confestetis 24 -26 Octombrie 2019, Iași : „Magnetic levitated culture for controlled spheroid formation of ADSC-MNPs”, Autori: Cristina Stavilă, Anca Minuti, Luminița Lăbușcă, Camelia Dănceanu - prezentare orală
3. National Online Conference of Biophysics - CNB 2020 Brașov, România „3D Cultures Enhanced Through Magnetic Levitation of MNP Loaded ADSCs” , Autori Stavilă C.; Minuti A.E.; Labusca L. – prezentare orală
4. 14th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, June 17-21 2024, Barcelona, Spain: „Fe-Cr-Nb-B magnetic particles for targeted chemotherapy”, autori: Cristina Stavila, Anca Emanuela Minuti, Horia Chiriac, Nicoleta Lupu – poster
5. 10th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED MATERIALS ROCAM, July 15-18 2024, București, România: „Silver-coated magnetite for tumor cells treatment”, autori: Cristina Stavila , Dumitru Daniel Herea, Anca Emanuela Minuti, Camelia-Mihaela Zara-Dănceanu, Luminita Labusca, Horia Chiriac, Nicoleta Lupu – poster

D. Lucrări prezentate de alți autori la conferințe

1. Conferința Internațională NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS PROGRESS UNDER HORIZON2020 AND BEYOND - 9th Edition of EuroNanoForum

- ENF 2019 București, România: „Influence of alternating magnetic fields on the differentiation of stem cells loaded with magnetic nanoparticle” ,Autori Herea D. D.; Labusca L.; Danceanu C.; Minuti A.E.; Stavila C.; Stoian G.; Ababei G.; Chiriac H.; Lupu N – prezentare orală
- 2. Conferința Internațională A 18-a Ediție a Seminarului Național de Nanoștiință și Nanotehnologie - SNN 2019, Iasi, Romania: „Magnetic Nanoparticles Uploaded by Human Adipose derived stem cells as versatile antitumoral and regenerative tools”, Autori Labusca L.; Herea D.D.; Dănceanu C.; Minuti A.E.; Stavila C.; Chiriac H.; Lupu N – prezentare orală
- 3. The 65th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials (MMM 2020) Palm Beach, FL, USA: „Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles and STEM Cells, Triggers for Cancer Cells Apoptosis by Magneto-Mechanical Actuation” , Autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N –poster.
- 4. European Magnetic Symposia - JEMS 2020, Lisabona, Portugalia: „Fe-Cr-Nb-B magnetic particles and STEM cells, triggers for cancer cells apoptosis by magnetomechanical Actuation” , Autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N–poster
- 5. International Magnetism Virtual Conference INTERMAG 2021, Lyon, Franta: „Cancer Cells Death Induced by Magneto-Mechanical Actuation of Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles Carried by Stem Cells to the Cancer Cells Area”, Autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu N, –poster
- 6. International Conference "Progress in Organic and Macromolecular Compounds" 28th Edition, 2021, Iasi, Romania: „High-drug-loading magnetic nanoplatforms” , Autori Minuti A. E.; Danceanu C. M.; Stavila C.; Chiriac H.; Lupu N.; Gherca D.; Borhan A.I.; Herea D.D.; Labusca L, – poster
- 7. International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society – ICRS 2022, Berlin, Germania:„Magnetic Nano Platforms for Enhancing Mesenchymal Stem Celss Chondrogenesis” autori Lăbușcă L.; Herea D. D.; Minuti A.E.; Dănceanu C.M.; Stavilă C.; Chiriac H.; Lupu N – prezentare orală
- 8. 13th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers 2022, University College London (UCL) Campus, UK:„STEM cells carriers of Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation”, Autori Chiriac H.; Minuti A.E.; Stavila C.; Labusca L.; Herea D.D.; Lupu – prezentare orală
- 9. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference 2022, Cracovia, Polonia:„Human mesenchymal stem cells and nanomagnetic materials for regenerative medicine” Autori Lăbușcă L.; Herea D.D.; Danceanu C.; Minuti A.E.; Stavila C.; Chiriac H.; Lupu N, – prezentare orală
- 10. INTERMAG 2023, May , 2023, Sendai, Japan: “Magnetic Nanowires versus nano/micro-particles for Cancer Cell Destruction by Magneto-mechanical Actuation”, Autori Horia Chiriac, Anca Emanuela Minuti, Cristina Stavila, Nicoleta Lupu – prezentare orală

11. The 68th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials, Dallas, USA, from October 30 to November 3, 2023: "Cancer cell death induced by magneto-mechanical actuation of Fe-Cr-Nb-B magnetic particles loaded with chemotherapeutic drugs, carried by Stem cells to the cancer cell area", Autori Chiriac, Horia; Stavila, Cristina; Minuti, Anca E.; Herea, Dumitru-Daniel; Lupu, Nicoleta – prezentare orală
12. Regenerative medicine in orthopedic surgery (RMOS) IIIrd Global Summit Istanbul Turkey 30 Nov-2 Dec 2023: "Magnetically enhanced adipose derived stem cell chondrogenesis", Autori: Luminita Labusca, Valentin Nastasa, Camelia Mihaela Zara Danceanu, Cristina Stavila, Anca Emanuela Minuti, Dumitru Daniel Herea, Razvan-Nicolae Malancus, Aurelian Sorin Pasca. Mihai Mares and Nicoleta Lupu – poster
13. IEEE International Magnetism Conference, INTERMAG 2024, Rio de Janeiro, Brazil, May 5-10, 2024: "Fe-Cr-Nb-B Magnetic Particles for Cancer Cell Destruction." H. Chiriac, A. Minuti, C. Stavila, N. Lupu – poster
14. The 22nd International Conference on Magnetism (ICM2024), June 30 – July 5, 2024, Bologna, Italy: „Targeted Cancer Cell Destruction Using Magneto-Mechanical Actuation of Fe-Cr-Nb-B Drug-Loaded Magnetic Particles”, autori: Horia Chiriac, Anca Emanuela Minuti, Cristina Stavilă, Nicoleta Lupu - poster