

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific:
CS I Dr. Focșan Monica

Absolvent:
Couți Anamaria

Cluj-Napoca
2023

Universitatea „Babeş-Bolyai” Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Specializarea Fizică medicală

LUCRARE DE LICENŢĂ

**Nanoparticule de albumină cu emisie de fluorescență intrinsecă
tunabilă pentru imagistică intracelulară**

Coordonator științific:

CS I Dr. Focșan Monica

Absolvent:

Couți Anamaria

Cluj-Napoca

2023

Abstract

Over the past few decades, extensive research efforts have been dedicated to devising novel strategies for combatting cancer and neurodegenerative disorders. Nanotechnology integrated into nanobiomedical applications has emerged as a promising avenue for addressing these challenges. This study focuses on the development of protein-based nanoparticles exhibiting adjustable fluorescence, which represents a crucial starting point in the early detection of Alzheimer's disease. Specifically, bovine serum albumin-based nanoparticles were synthesized using a meticulously designed two-step protocol, following established procedures in the scientific literature. Morphological and optical characterization techniques were employed to successfully evaluate these nanoparticles. Remarkably, the nanoparticles exhibited exceptional stability for a minimum duration of six months, as evidenced by the consistent hydrodynamic diameter of 26.33 ± 0.81 nm (a favorable dimension for enhanced permeability and retention effect) and a well-defined zeta potential of -18.46 ± 0.63 mV. To further investigate their stability, an experimental investigation involved subjecting the nanoparticles to varying pH conditions, simulating physiologically relevant environments, while preserving their structural integrity. Moreover, to ensure the reliability of the fluorescence properties, controlled experiments were conducted to examine the nanoparticles' response to temperature fluctuations, revealing a reversible effect. Additionally, an MTT assay was performed to ascertain the nanoparticles' favorable biocompatibility, and a cell-based copper detection assay was conducted as an additional validation. The tunable fluorescence effect, enduring stability, biocompatibility, and robust copper detection capabilities collectively support the imminent integration of these nanoparticles into advanced biomedical applications.

Cuprins:

Introducere	5
Capitolul I: Noțiuni generale	8
1.1 Introducere în domeniu și subdomeniu -Despre boala Alzheimer.....	8
1.1.1 Generalități.....	8
1.1.2 Implicațiile metalelor esențiale (Zn, Cu, Fe) in patogeneza bolii Alzheimer	9
1.2 Ce sunt nanoparticulele luminescente	15
Capitolul II: Tehnici, metode și rezultate experimentale	19
2.1 Sinteza nanoparticulelor de BSA și materiale utilizate.....	19
2.2 Caracterizarea nanoparticulelor în soluție	20
2.2.1 Caracterul emisiv de fluorescență al nanoparticulelor de BSA	20
2.2.2 Caracterizarea fizică a nanoparticulelor proteice.....	21
2.2.3 Caracterizarea nanoparticulelor de BSA în diferite medii.....	24
2.2.4 Caracterizarea nanoparticulelor de BSA la diferite temperaturi.....	29
2.3 Caracterizarea nanoparticulelor <i>in vitro</i>	31
2.3.1 Testul MTT	31
2.3.2 Vizualizarea internalizării nanoparticulelor prin microscopie electronică în transmisie (TEM)	33
2.3.3 Localizarea intracelulară a nanoparticulelor prin imagistică confocală de fluorescență	34
2.3.4 Validarea intracelulară a nanoparticulelor ca și senzori pentru detecția ionilor de Cu ²⁺	35
Concluzii și perspective	38
Bibliografie	50

Introducere

La nivel global, aplicațiile nanotehnologiei oferă alternative inovative pentru rezolvarea a diverse probleme pe care le întâlnim în viața de zi cu zi în multiple domenii, cum ar fi în industrie, branșa energiei electrice, automobile, siguranță alimentară, dar și în sectorul medical. Totodată, în ultima perioadă, atât cercetătorii cât și oamenii de știință din domeniul biomedical încearcă să găsească tratamente pentru diverse afecțiuni, cum ar fi cancerul sau boala Alzheimer. Astfel că, în acest domeniu, nanotehnologia prinde amploare prin dezvoltarea și îmbunătățirea unor agenți de contrast fluorescenți în scopuri terapeutice.

În acest context, tema aleasă de mine are un caracter interdisciplinar, înglobând arii din mai multe domenii științifice, și se referă la dezvoltarea, caracterizarea și implementarea unor nanoparticule (NP) organice cu proprietăți avantajoase pentru a fi utilizate în domeniul biomedical.

Acest tip de NP pot fi utilizate pentru transportul substanțelor de interes în organism, ca și detectori sau chiar și ca agenți de contrast fluorescenți pentru detecția cancerului sau diagnosticarea precoce a bolii Alzheimer. Unul dintre motivele care m-au determinat să demarez studiul acestor NP în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe este legat de capacitatea limitată și progresul minimal din ultimii zeci de ani a medicinei tradiționale în a găsi soluții pentru tratarea acestor afecțiuni.

NP-le pe care le-am ales să le investighez sunt unele de albumină serică bovină (eng. bovine serum albumin – BSA). Unul dintre avantajele pe care acestea le oferă sunt dimensiunea lor ajustabilă după un anumit protocol, astfel încât acestea să fie optime pentru efectul de permeabilitate și retenție amplificată (EPR). Acest efect se bazează pe direcționarea agenților sau moleculelor în zonele de interes, cum ar fi țesuturile canceroase, și respinge migrarea acestora în țesuturile sănătoase. Cele mai importante caracteristici pentru a obține acest efect de livrare țintită și controlată sunt: dimensiunea, caracteristicile de suprafață, respectiv natura încărcăturii suprafeței. De reținut este faptul că tumorile, pe parcursul dezvoltării lor, dezvoltă noi vase de sânge, pe care le transformă într-un sistem din care se alimentează. În comparație cu vascularizația unui țesut sănătos care este bine definit, cea a tumorilor prezintă o vascularizație dezordonată, fără nici o ierarhie a microvascularizației, unde venulele, arteriolele și capilarele nu se disting, dar mai mult, sunt și interconectate, prezentând anomalii structurale. Agenții de dimensiuni nanometrice

care ar putea fi injectați pentru a se livra în locurile tumorale, ar trebui să aibă dimensiuni optime astfel încât să rămână în circulație fără a fi excretate de rinichi sau ficat. În plus, medicamentele de acest tip, administrate intravenos, trebuie să circule eficient perfuzând omogen țesutul bolnav. Pentru ca un agent de dimensiune nanometrică să fie eficient, trebuie luat în considerare, așa cum este specificat mai sus, și filtrarea de la nivelul rinichilor. Aici, filtrarea plasmei se realizează la nivelul membranei bazale glomerulare. Suprafața glomerulara este încărcată negativ datorită unor radicali liberi, prin urmare, agenții cu încărcătură pozitivă sau neutră vor avea o filtrare mai eficientă. Încărcătura suprafeței nu este singurul criteriu de bază. Mobilitatea, forma sau flexibilitatea sistemelor livratoare sunt de asemenea importante, astfel că, moleculele moi pot fi filtrate mai ușor. Dimensiunea porilor acestei membrane este de aproximativ 6 nm, prin urmare o dimensiune mai mare de acest prag ar fi o dimensiune ideală pentru a păstra nanomedicamentele.

Astfel că, dimensiunea potrivită și stabilitatea în ser le face să aibă o durată mai lungă în circulație, respectiv o livrare adecvată. Un alt aspect important al excreției este cel al sistemul reticuloendotelial (eng. reticuloendothelial system RES). Acest sistem are rolul de a recunoaște în organism corpurile străine și de a le elimina, prin urmare nanomedicamentele ar trebui să fie invizibile, atât prin dimensiune, cât și prin natura suprafeței care nu ar trebui să fie foarte încărcată. Concluzionând, nanodispozitivele ar trebui să fie proiectate ca dimensiune între 6 și 300 nm, iar ca suprafețe să fie cat mai neutre, sau ușor negative pentru a putea beneficia de toate avantajele lor.[1]

Această lucrare a fost structurată în două părți. **În primul capitol** am realizat o introducere a noțiunilor din literatură cu care voi opera în continuare, un mic breviar cu privire la boala Alzheimer- implicațiile metalelor esențiale în patologia bolii, precum și o prezentare de ansamblu a NP-lor luminiscente.

Cel de-al doilea capitol reprezintă partea experimentală a acestei lucrări de licență și prezintă cum anume au fost fabricate nanoparticulele cu care am operat, respectiv caracterizarea lor atât din punct de vedere morfologic, cât și optic, având informații despre diametrul hidrodinamic, potențialul la suprafață și emisia de fluorescență pe o plajă largă a spectrului electromagnetic. Alte teste de control efectuate asupra acestora au fost cele de verificare a stabilității dimensionale în diferite medii, fabricate de mine, cu diferite pH-uri, respectiv verificarea reversibilității intensității de fluorescență atunci când mediul în care se masoară se încălzește și se răcește. Tot în acest capitol este prezentat și biocompatibilitatea lor într-o linie

celulară NIH:OVCAR3, utilizând un test MTT, dar și localizarea intracelulară prin imagistică confocală de fluorescență. Ca ultim pas în acest capitol, s-au folosit nanoparticulele proteice ca și senzori în detecția ionilor de Cu^{2+} .

Ultima parte prezintă **concluziile și perspectivele de viitor**. În acest capitol am creat un plan prin care îmi doresc să îmbunătățesc sistemul meu format prin legarea unor nanocristale semiconductoare, prin diferite metode, urmând a folosi acest nanosistem hibrid ca și senzor pentru detectarea precoce a bolii Alzheimer.

Capitolul 1: Noțiuni generale

În întreaga lume, nanotehnologia - știința care operează cu structuri materiale de dimensiuni nanometrice - se focalizează și în a găsi soluții inovatoare pentru dezvoltarea unor agenți de contrast fluorescent stabili și totodată eficienți.[2] Astfel că, NP-le pe bază de proteine se numără printre cei mai promițători candidați pentru încapsularea controlată și livrarea țintită ulterioară a diferitelor medicamente de interes pentru mai multe tipuri de celule canceroase.[2] În plus, NP-le pot fi utilizate, datorită versatilității lor, atât ca și detectori sau chiar și ca agenți de contrast fluorescenți pentru detecția cancerului, cât și pentru diagnosticarea precoce a bolii Alzheimer.[3]

1.1 Introducere în domeniu și subdomeniu -Despre boala Alzheimer

1.1.1 Generalități

Boala Alzheimer este o afecțiune care, pe lângă faptul că afectează celulele creierului, degenerându-le, este și boala cu cea mai mare contribuție pentru demență, fiind definită ca o boală cu progresie lentă. Aceasta afectează independența individul în activitățile lui de zi cu zi, creând un declin al gândirii. Factorii mediului înconjurător, bolile vasculare, vârsta înaintată, traumatismele craniene, respectiv factorii genetici, sunt doar câteva exemple care ar putea contribui la apariția bolii. Medicamentele care se administrează în prezent în cazul bolii Alzheimer, nu sunt menite în a o vindeca, ci doar a minimiza simptomatologia pacienților. Problema cu care cercetările din prezent se confruntă, este aceea de a înțelege mai bine patologia acestei boli. În prezent exista mai multe ipoteze pentru care se caută tratamente care sa fie capabile să oprească evoluția bolii. Unele dintre caracterizările acestei afecțiuni sunt: acumularea anormală a proteinei tau și apariția anormală a beta-amiloidului în lobul temporal medial și în structurile neo corticale, acestea fiind cele mai afectate zone ale creierului.[4]

Pe lângă cele menționate mai sus, un alt motiv al neurotoxicității și a leziunilor neuronale ar putea fi și dereglare fiziologică sau la nivelul nutriției pentru unele biomateriale esențiale pentru fiziologia normală neuronală (Zn, Fe, Cu). În plus, aceste metale se găsesc în creier la același nivel de abundență ca Mg, fapt ce le face extrem de importante în buna funcționare neurologică. La

capătul opus al nivelului de abundență în creier se află metale grele, cu un potențial de toxicitate ridicat, cum ar fi: Pb, Hg, Cd.[5]

În a doua jumătate a secolului XX s-a demonstrat ca Zn ionic induce insolubilitatea peptidei amyloid- β ($A\beta$), urmând a se semnala faptul că ionii Cu și Fe facilitează agregarea anormală a $A\beta$ precum și generarea de specii reactive de oxigen. Astfel că, cele trei metale (Fe, Zn și Cu) sunt asociate cu neuropatologia și fiziopatologia bolii Alzheimer. [5]

1.1.2 Implicațiile metalelor esențiale (Zn, Cu, Fe) în patogeneza bolii Alzheimer

a) Zincul și implicare sa in contextul bolii

Zn este un metal esențial în funcționarea normală a creierului, participând și la stabilizarea structurilor proteice, precum și în reacțiile catabolice. Cea mai mare parte a Zn se concentrează în materia cenușie a creierului, precum și în fanta sinaptică, contribuind la plasticitatea acesteia, ceea ce subliniază ideea că o dată cu vârsta, Zn poate să își scadă din activitate, fapt care poate duce la tulburări cognitive.[5]

După cum am menționat mai sus, în boala Alzheimer, Zn neuronal este dereglat. În figura de mai jos (*Figura 1.1 a*) este reprezentat mecanismul de pătrundere al cationului Zn^{2+} în soma neuronală prin intermediul unor peptide inhibitoare dependente de Zn (eng. Zn-Dependent Inhibitory Peptide- ZIP), iar mecanismul de părăsire este legat de o proteină numită proteină transportoare de Zn (eng. Zn Transporter- ZnT). Totodată, îmbătrânirea poate altera mitocondriile, organele celulare care sunt responsabile de producerea energiei prin intermediul procesului de respirație celulară, fapt ce duce la o tulburare a ZIP-urilor. Există mai multe tipuri de ZIP-uri, respectiv ZnT-uri, însă ZnT3 (*Figura 1.1 b*), este o proteina transportoare, care se află în strânsă legătură cu pierderile cognitive în boala Alzheimer. Aceasta se formează în timpul pierderilor de estrogeni (menopauza) sau odată cu îmbătrânirea, prin reducerea activității mitocondriilor.

Zn^{2+} este concentrat în vezicule din cauza ZnT3, împiedicând cursul normal al metalului. O altă problemă apare în agregarea cationului cu amyloid- β , ducând la insolubilitatea acestuia. [5]

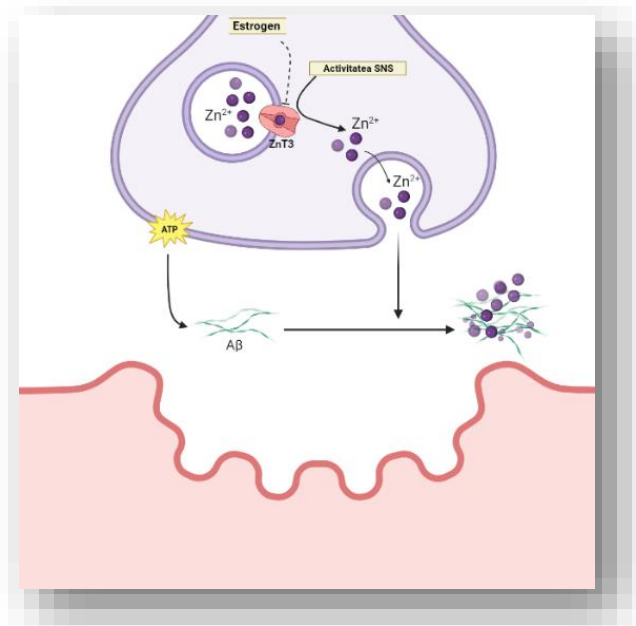


Figura 1.1 a): Mecanismul de pătrundere a Zn în celulele neuronale

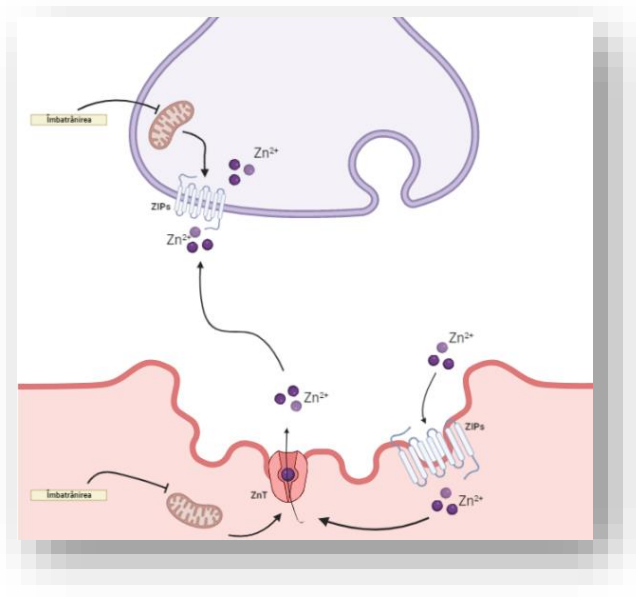


Figura 1.1 b): Agregarea Aβ cu Zn în fanta sinaptică

b) Cupru și conexiunea sa cu declinul cognitiv

Cel de-al doilea metal aflat în referință, Cu, este un metal redox-activ, cu o implicare importantă în activitățile metabolice din creier și care servește ca situs pentru o serie de cuproenzime, printre care se numără: Superoxid dismutaza (SOD 1), tirozinaza, ceruloplasmina, etc. La fel ca și în cazul Zn, afectarea neurologică este corelată cu o cantitate ridicată în mod anormal din acest metal, însă, în cazul Cuprului, o altă anomalie apare din cauza modului în care este eliberat în fanta sinaptică, și anume că acesta nu se eliberează din butonii terminali presinaptici, cum ar fi în mod normal, ci din partea post sinaptica în cea pre sinaptica. În imaginea de mai jos (*Figura 1.2*) este prezentat mecanismul de pătrundere a ionului Cu^{2+} în celulă, prin proteina transportoare numita Transportor de Cupru 1 (engl. Cooper transporter 1-CTP1), respectiv excreția acestuia, tot în mod activ prin două tipuri de proteine reglatoare care se numesc diferit în funcție de locul în care se găsesc (ATP7A- se află în țesutul nervos, pe când ATP7B- se află în ficat sau alte organe) . După cum se poate observa în figura de mai jos, în momentul în care ionul Cu^{2+} a intrat în celulă, acesta este redus prin pierderea unui electron la forma sa de Cu^+ prin mai multe tipuri de reacții redox: cu apa sau cu diferite proteine.[5]

Pe de altă parte, deși Cuprul se află în cantități mai mari ca și metal labil, acesta, ca și componentă a unei enzime (SOD 1), se află în concentrație scăzută în țesutul cerebral al pacienților cu boala Alzheimer, ducând la o modificare a distribuției Cu, deci apare un dezechilibru. În plus, toate aceste fluctuații în concentrație a Cu și Zn, în prezența lichidului cefalorahidian promovează o degenerare a $\text{A}\beta$. Acest compus $\text{A}\beta$ are ca și antecedent o altă proteină numită Proteina Precursor a Amiloidului (engl. Amyloid Precursor Protein- APP). Mecanismul de formare a neurotoxicității din cauza Cu este unul complex: prin legarea acestui material de $\text{A}\beta$, se formează un complex catalitic redox ciclic care, încorporându-se în membrana lipidică, recrutează colesterol, care mai apoi facilitează producerea de peroxid de hidrogen, promovându-se stresul oxidativ, denaturarea SOD1, respectiv epuizarea unor antioxidanți cum ar fi GSH.[5]

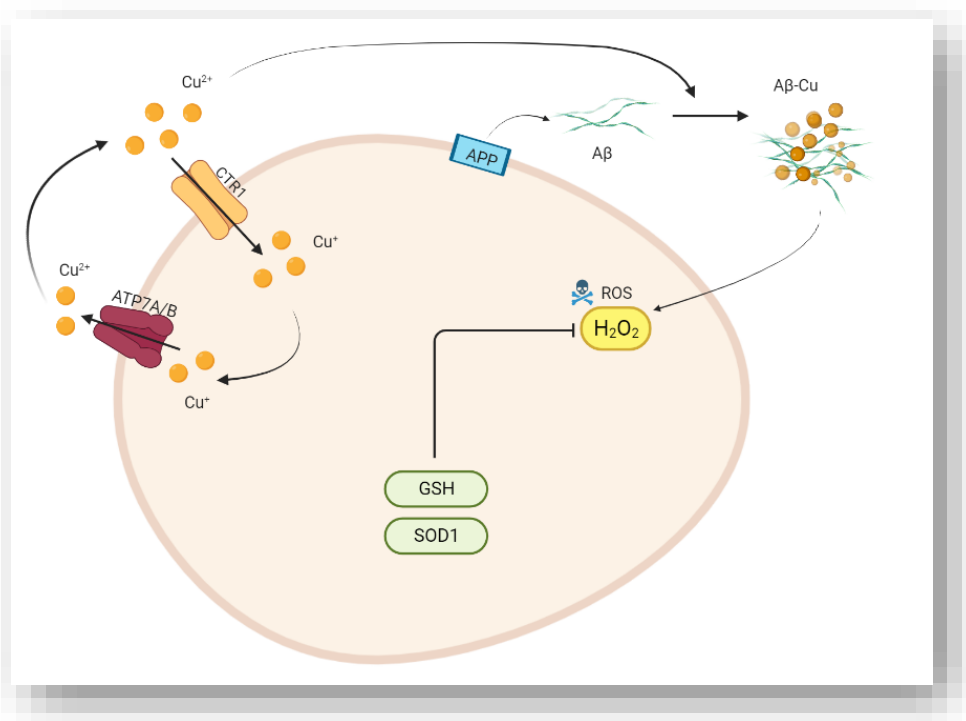


Figura 1.2: Mecanismul de pătrundere a Cu în celulele neuronale, agregarea dintre Cu și A β , precum și denaturare SOD1 și epuizarea GSH

c) Fierul și interacțiunea sa cu sănătatea creierului pacienților bolnavi

Cel de-al treilea metal care se află în strânsă legătură cu boala Alzheimer este Fe. În creier acesta este cel mai abundent metal de tranziție, și un element esențial în activitățile de bază (în mielinizarea neuronilor, sinteza neurotransmițătorilor sau sinteza mitocondriilor). În aceeași manieră, Fe prezent în creierul pacienților cu Alzheimer este o sursă de stres oxidativ, din cauza schimbării valenței între starea feros (Fe^{2+}) și starea ferică (Fe^{3+}), proces dăunător organismelor aerobe (*Figura 1.3 a*). Această reacție apare din cauza peroxidului de hidrogen (H_2O_2), care reacționând cu Fe^{2+} , se generează radicali hidroxizi ($\text{OH}\cdot$) și fier în stare ferică (Fe^{3+}). În continuare, radicalii hidroxizi reacționează cu lipidele citoplasmatică, transformându-se în peroxizi lipidici, iar o perturbare a membranei plasmatică prin ferroptoză se întâmplă, acesta fiind

un proces foarte dăunător pentru celule. Deferiprona este un medicament care poate reduce acumularea de Fe la nivel celular, împiedicând ferroptoză. În același sens, Vitamina E previne lipidele peroxidate (Lipid-OOH) în a forma ferroptoză.[5]

La nivel extracelular (*Figura 1.3 a*) Fe^{3+} se poate lega puternic de A β formând un agregat de proteine care apare în patologia bolii Alzheimer.[5]

Schimbarea valenței din interiorul celulelor este provocată de acumularea de Fe în celulă. Această acumulare este cauzată fie de îmbătrânirea celulară, care vine o dată cu vârsta pacientului, fie prin scintilarea proteinei precursora a amiloidei (engl. Amyloid Precursor Protein-APP) de către enzima de tăiere a proteinei precursora a amiloidului la situsul beta (engl. Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1-BACE1) care este supraprodusă și taie într-un mod nefavorizabil APP-ul (*Figura 1.3 b*). Astfel că, prin dezactivarea APP-ului, Fe^{2+} rămâne acumulat în celulă. În plus, APP-ul este procesat în aparatul golgi și transportat de reticulul endoplasmatic până la nivelul membranei celulare unde își îndeplinește rolul. În boala Alzheimer, tau, partea care reglează traficul de încărcături APP pentru exportul Fe, este hiperfosforilată, iar Seleniul poate inhiba această hiperfosforilare.[5]

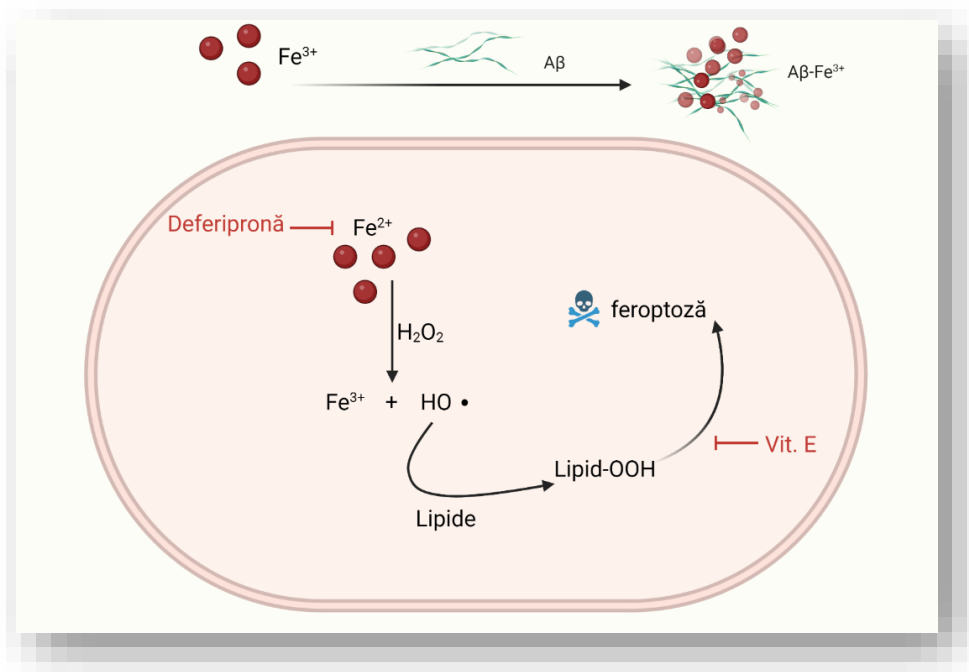


Figura 1.3 a): Mecanismul de formare a agregatelor de A β - Fe $^{3+}$ și al ferroptozei

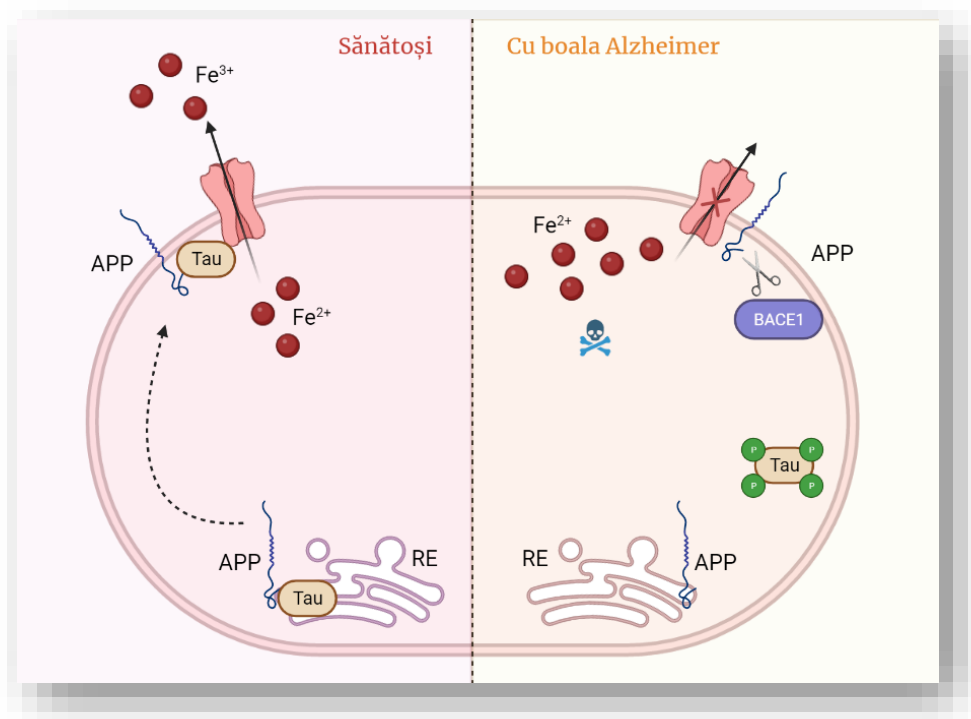


Figura 1.3 b): O paralelă asupra mecanismelor de transport al Fe în cazul pacienților cu și fără boala Alzheimer

Cu toate acestea, cercetările au demonstrat că metalele menționate mai sus (Zn, Cu, Fe) se află în strânsă legătură cu patologia bolilor neurodegenerative (printre care se numără și boala Alzheimer), însă rolul acestora în boala Alzheimer este unul mai elaborat decât agregarea și denaturarea A β . [5]

În momentul de față, numărul pacienților cu boala Alzheimer este de aproximativ 50 de milioane, la nivel global, și se estimează o dublare a acestui număr la fiecare jumătate de decadă. Statisticile oferă o aproximare de 152 de milioane de pacienți până în anul 2050, un număr alarmant de mare. [4]

Privind cele de mai sus, cercetările din ultimul deceniu se bazează pe căutarea unor noi strategii de tratament împotriva acestei boli, progresele venind din domeniul nanotehnologiei. Astfel că, NP-le pe bază de proteine se numără printre cei mai promițători candidați pentru încapsularea

controlată și livrarea țintită ulterioară a diferitelor medicamente de interes pentru mai multe tipuri de celule.[2]

De asemenea, fenomenul de fluorescență are o deosebită importanță în domeniul biomedical, motiv pentru care îmbunătățirea agenților de contrast fluorescenți actuali, sau dezvoltarea unor noi clase de agenți fluorescenți, a atras atenția în ultimii ani. Imagistica de fluorescență prinde amploare, datorită ușurinței sale de folosire, în sălile de operație, pe când, metodele clasice de imagistică (tomografia computerizată- CT, imagistica prin rezonanță magnetică RMN) au mai multe dezavantaje, după cum urmează: costuri mari, o specificitate limitatoare la 10 mm, nu pot fi utilizate în aceeași cameră în care se efectuează operația, deci nu se poate urmări în timp real desfășurarea intervenției chirurgicale. [6]

1.2 Ce sunt nanoparticulele luminiscente

Nanomaterialele par un punct de plecare tehnologic care revoluționează domeniul opticii și care au o aplicabilitate multiplă.[6] În aplicațiile biologice se utilizează de câteva decenii fluorescența deoarece are o serie de caracteristici importante în măsurători analitice și cantitative, astfel că s-au introdus o vastă paletă de NP care emit lumină, printre care se numără: nanocristale semiconductoare (eng. Quantum dots -QD), NP pe bază de Carbon, nanoclusteri metalici sau NP proteice. [7]

Două dintre efectele fizice cauzate prin interacțiunea luminii cu materia este reprezentată de fluorescență și fosforescență. În procesul de fluorescență sau fosforescență, unul sau mai mulți fotoni sunt absorbiți de o specie chimică, iar prin această absorbție, compusul chimic se excită. Procesul de dezexcitare este unul spontan, prin emisie de radiații. Cu toate acestea, în procesul de fluorescență, multiplicitatea radiației se păstrează, iar procesul de fosforescență implică un schimb al multiplicității spinului (în general de la triplet la singlet sau invers), având și un timp de viață lung. Cele două definiții de mai sus se aplică moleculelor organice, însă moleculele anorganice (QD-ți sau nanoclusteri metalici) nu pot fi legate de conceptul de multiplicitate de spin.[7]

În plus, fluorescența se atinge mai ușor, prin excitarea directă a luminii, în comparație cu fosforescența care este emisă de o altă stare excitată, stare cu o tranziție corespunzătoare radială interzisă. [7]

Pentru a exemplifica procesul de absorbție și emisie a luminii de către un compus chimic se poate utiliza o diagramă energetică ca în figura de mai jos (Figura 1.4).[7]

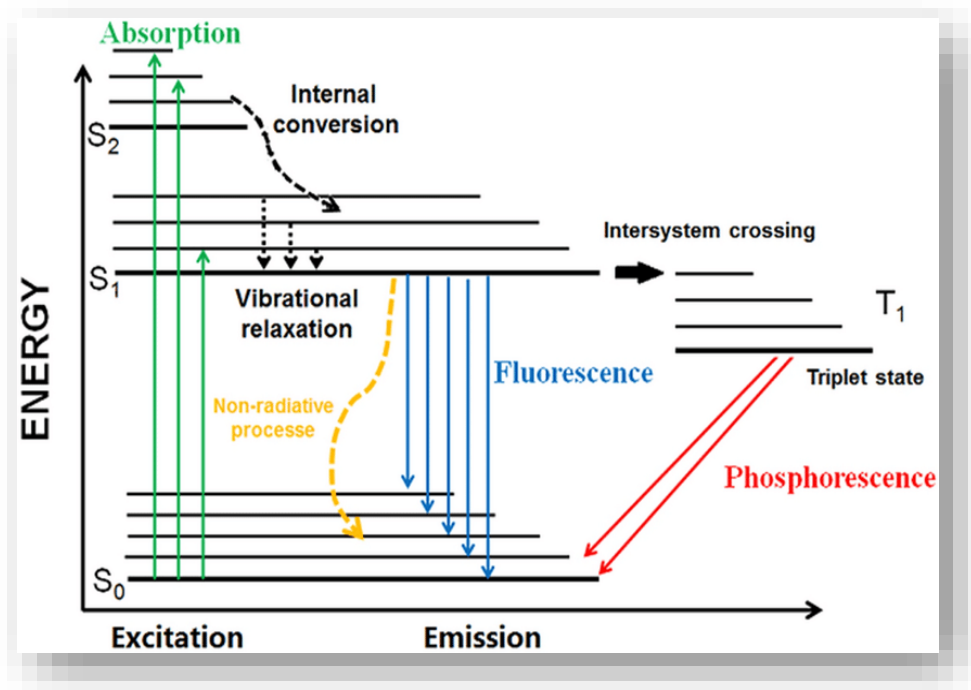


Figura 1.4: Diagrama Jablonski [8]

Această diagramă se numește diagrama Jablonski, numele provenind de la fizicianul polonez Aleksander Jablonski, care a trăit în secolul XX. În această diagramă se pot observa procese simple de absorbție și emisie de lumină, conversie internă, intersystem crossing, precum și tranzițiile posibile pe diferitele niveluri (marcate prin săgeți). În plus, fiecare strat electronic conține un număr de niveluri vibraționale, iar fiecare nivel vibrațional putând fi subdivizat în niveluri rotaționale, însă ultima descriere este omisă în această diagramă. La temperatura camerei majoritatea moleculelor de află în stare fundamentală, pe nivelul S_0 electronic și 0 vibrațional.[7]

În diagramă se pot observa tranziții prin săgeți transversale. Odată excitată molecula, există mai multe variante de dezexcitare: procese nonradiative (conversie internă sau atenuare vibrațională) și procese radiative (fluorescența -tranziția de-a lungul axei energetice dintre 2 stări electronice). În momentul în care unda electromagnetică excitatoare încetează, procesul de

fluorescență încetează, deoarece acesta este un proces scurt, aproape instantaneu, de aproximativ 10^{-8} secunde. Cât despre spectrul de emisie și absorbție, acesta poate să semene datorită faptului că tranziția S_0-0 (de la cel mai de jos nivel de vibrație al celui mai scăzut nivel electronic), la S_1-0 (cel mai de jos nivel vibrațional al primei stări excitate), este cea mai comună, restul tranzițiilor necesitând o energie mai mare. Totodată, absorbția de energie pentru a aduce o moleculă în stare excitată nu perturbă morfologia moleculei în mod semnificativ, de unde rezultă că distribuția nivelelor vibraționale este asemănătoare în cele două cazuri, astfel că spectrul de absorbție și cel de emisie sunt foarte asemănătoare, aproape în oglindă.[7]

De menționat este faptul că, în urma pierderii de energie în stare excitată din cauza relaxării vibraționale, energia de emisie de fluorescență este mai mică decât cea de absorbție. Cu alte cuvinte, valoarea lungimii de undă a fotonilor emiși este mai mare, decât cea a fotonilor absorbiți, diferență cunoscută sub numele de deplasare Stokes (*Figura 1.5*). Un alt termen folosit în spectroscopie este „timpul de viață”. Acesta se referă la durata petrecută de către un fluorofor, durată caracteristică, în starea excitată înainte de a reveni la nivelul fundamental în mod radiativ.[7]

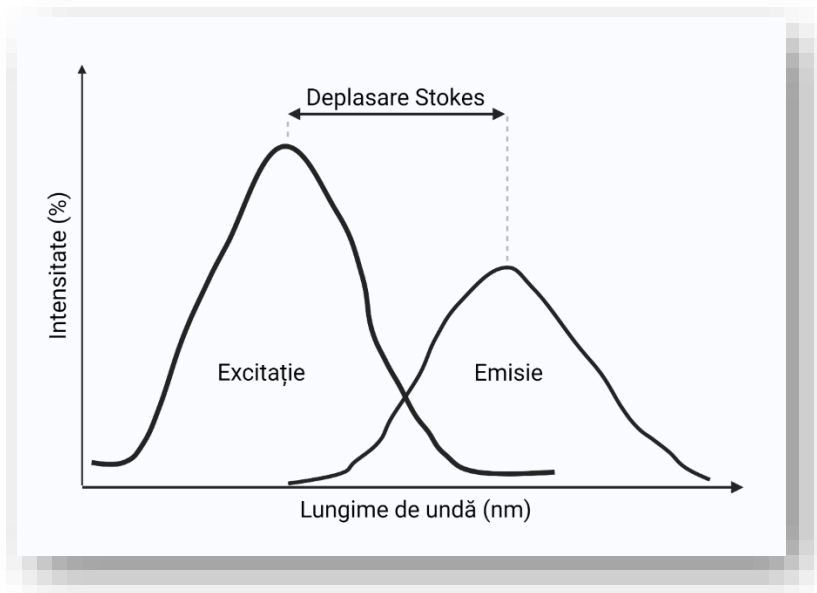


Figura 1.5: Spectrul de excitație și emisie, Deplasarea Stokes

Având în vedere cele spuse mai sus, este necesară o strategie de dezvoltare a unui sistem de livrare echivoc care să realizeze mai multe nevoi, cum ar fi: o livrare țintită și controlată, stabilitate în timp, un randament mare de încapsulare și grafare a substanțelor de interes cu o permeabilitate selectivă, dar nu în ultimul rând o luminozitate și o fotosensibilitate. Astfel că, dintre macromoleculele obișnuite, proteinele sunt cele care îndeplinesc o multitudine de funcții esențiale, cum ar fi cea de transport. Albuminele sunt proteinele cele mai abundente din plasma sanguină, reprezentând 52-62% din totalul proteinelor sanguine, în plus având și proprietatea de hidrosolubilitate. Funcția de transport pentru această biomacromoleculă este bine evidențiată prin rolul acesteia de a livra substanțe exogene sau endogene, acizi grași, ioni și molecule mici (eventual, produse farmaceutice). Cele mai apreciate și studiate tipuri de albumină la ora actuală sunt albumina serică umană (eng. human seric albumin HSA) și albumina serică bovină (eng. Bovine seric albumin BSA). Cele două tipuri sunt foarte asemănătoare din punct de vedere structural și funcțional, fiind formate amandouă dintr-un singur lanț peptidic de aproximativ 585 de reziduuri de aminoacizi, cu o greutate moleculară de aproximativ 66,8kDa, având o formă de inimă, cu trei domenii omoloage I-III, fiecare domeniu fiind format din alte 2 subdomenii notate cu A și B (*Figura 1.6*). [9]

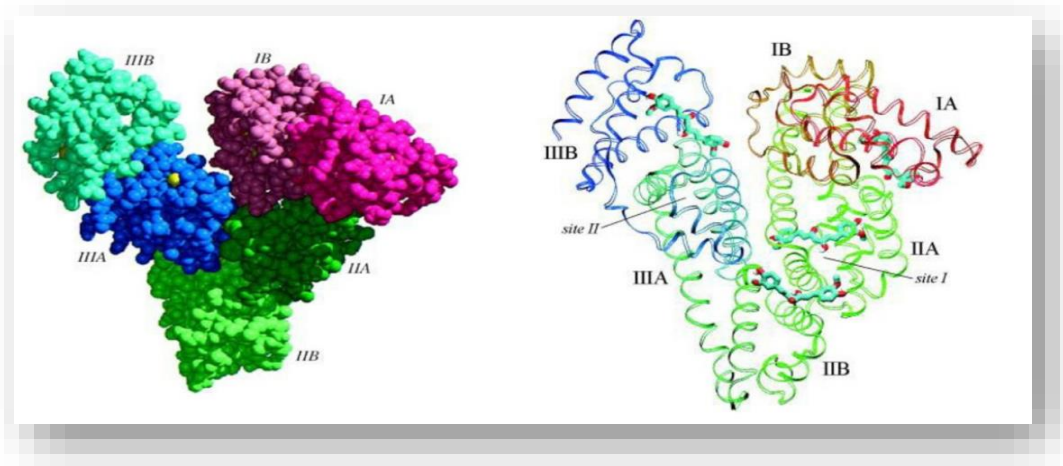


Figura 1.6: Structura BSA vs HSA[10]

Această asemănarea dintre cele două face ca BSA, proteină mai ieftină din punct de vedere al costurilor, să fie utilizată pe scară largă ca și model al HSA.[9]

Capitolul II: Tehnici, metode și rezultate experimentale

2.1 Sinteza nanoparticulelor de BSA și materiale utilizate

Nanoparticulele de albumină serică bovină (NP-le de BSA) reprezintă o posibilă soluție la cerințele enumerate mai sus, datorită suprafeței chimice versatile și biocompatibilității pe care le prezintă. Studiile legate de NP-le pe bază de BSA și de proprietățile acestora sunt limitate în literatură, însă, apreciez că interesul pentru acest tip de NP organice va prinde amploare datorită costurilor reduse, precum și posibilității de a modula diametrul acestora.[9]

Primul pas în realizarea sistemului dorit este acela de a fabrica NP-le proteice pe baza de BSA, folosind un protocol de fabricare din literatură. [2]

Protocolul de preparare a NP-lor de BSA este unul în doi pași, ilustrată schematic în *Figura 2.1*. De menționat este faptul că am folosit Proteină Serică Bovină (Aldrich), împreună cu apă ultrapură obținută de la un sistem de purificare Milli-Q, cu o rezistivitate de 18.2 MO cm, iar celelalte materiale utilizate, sunt furnizate de la diferiți comercianți.

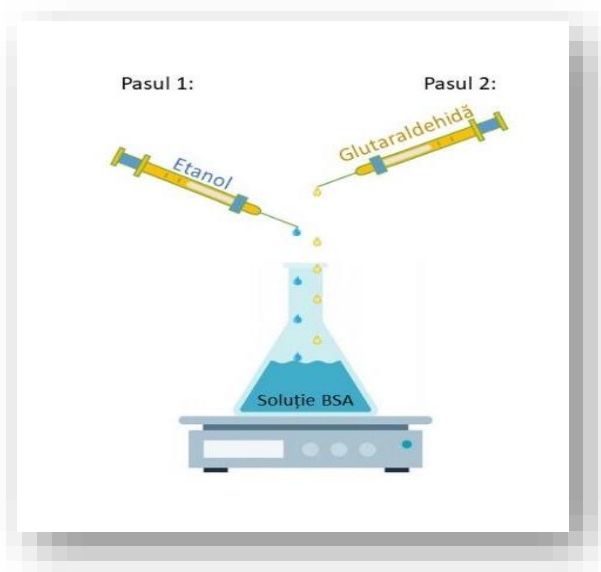


Figura 2.1: Protocol de fabricare a NP-lor de BSA

Concret, la început, proteina de BSA a fost dizolvată în apă ultrapură cu un pH ajustat la 7.4, urmând a se introduce, controlat, cu o rată de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, cu ajutorul unui aparat care conține un sistem automatic de picurare numit NE-1000-Programmable Single Syringe Pump de la New Era Pump System (New York, Statele Unite) EtOH (1:1). Ph-metrul utilizat pentru acest studiu a fost Seven Compact de la Mettler Toledo (Ohio, Statele Unite). Lichidul astfel format, a fost amestecat în continuu, timp de 15 min, urmând a se adăuga agentul stabilizator, glutaraldehida. Cantitatea de glutaraldehidă a fost calculată în raport cu cantitatea teoretică necesară pentru reticulația tuturor grupărilor amino din proteina de BSA, valorificând ceea ce s-au raportat în studiile anterioare. Soluția formată a fost agitată timp de 24 h, la 4°C , sub agitație constantă de 600 RPM folosind agitatoare magnetice de la Raypa (Spania). NP-le astfel formate, au fost purificate printr-o membrană filtru Roth de $0.22 \mu\text{m}$, urmând a se centrifuga în tuburi de centrifugă (Sartorius de 100kDa, temperatura camerei, 6000 RPM, 1h) cu o centrifugă Mikro 220 R de la Hettich (Germania).[2]

Pentru următoarele evaluări, NP-le vor fi resuspendate într-o soluție tampon fosfat-salina (eng. Phosphate-buffered saline-PBS), care are un pH de 7.4, apropiat de cel al sângelui, pentru a simula cât mai bine mediul biologic.[2]

Mai departe, am fost interesată în a evalua caracterul acestor NP (emisie de fluorescență, dimensiune și potențialul de suprafață), dar și modul în care acestea se comportă în diferite circumstanțe (mediu, temperatură).

2.2 Caracterizarea nanoparticulelor în soluție

2.2.1 Caracterul emisiv de fluorescență al nanoparticulelor de BSA

Concret, prin efectuarea unor măsurători de fluorescență staționară în soluție, se poate observa caracterul intrinsec de fluorescență al NP-lor ce se întinde pe întreg spectrul vizibil până în infraroșu apropiat. Excitând NP-le proteice la diferite lungimi de undă, respectiv 290, 490, 520,

620, 625 nm, observăm că acestea prezintă emisie de fluorescență cu maxime de intensitate la 336, 527, 540, 553, 646, 650 nm (*Figura 2.2*).

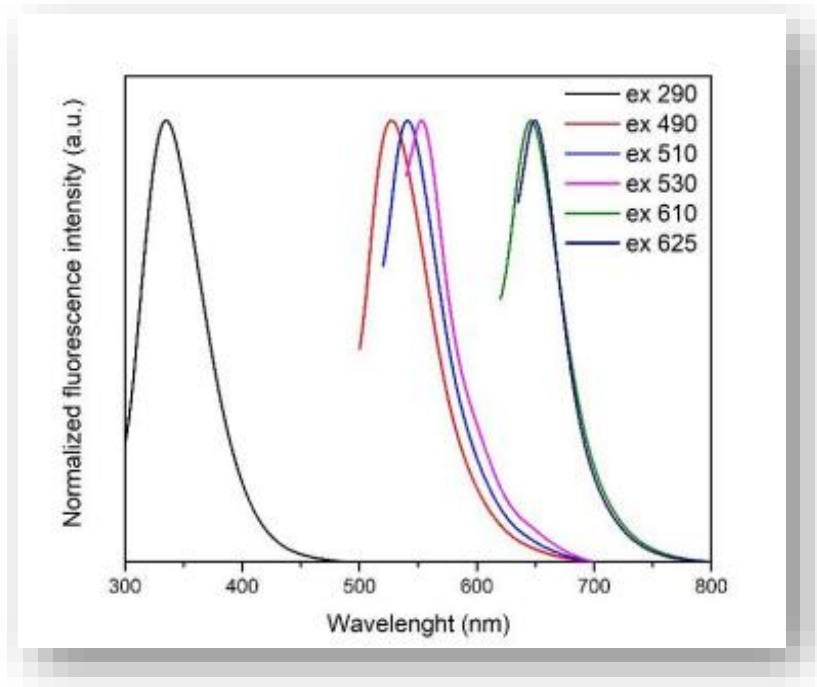


Figura 2.2. Caracterul emisiv de fluorescență tunabilă al NP-lor de BSA

Așadar, aceste NP proteice prezintă emisie de fluorescență tunabilă, proprietate care mi-a trezit interesul și pe care mi-am propus să o investighez riguros în cadrul acestei lucrări pentru a-i înțelege originea.

2.2.2 Caracterizarea fizică a nanoparticulelor proteice

Mai mult, am fost interesată să vizualizez aceste NP printr-o metodă de analiză microscopică avansată numită microscopie electronică cu transmisie (eng. Transmission Electron Microscopy- TEM). Acestea sunt ilustrate în figura de mai jos (*Figura 2.3*).

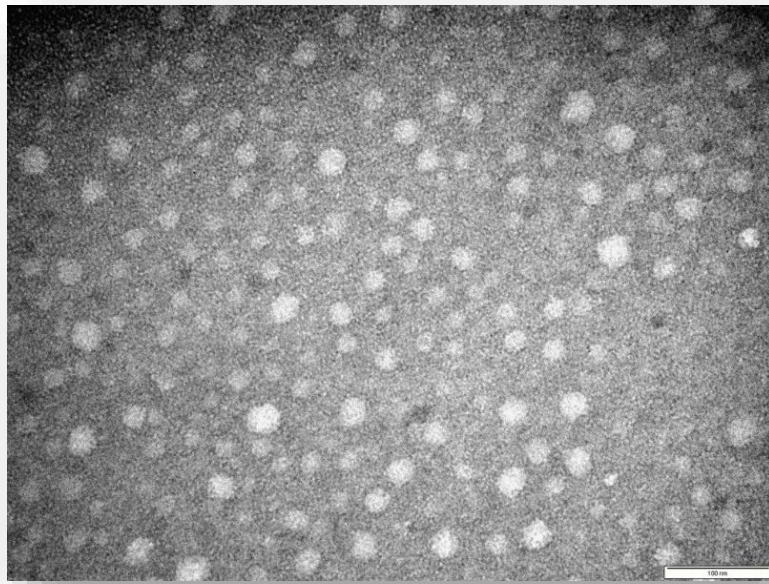


Figura 2.3: Imaginea reprezentativă a NP-lor de BSA efectuată prin TEM

O altă proprietate fizică investigată de către mine a acestor NP este dimensiunea hidrodinamică medie, care este de aproximativ 26.33 ± 0.81 nm (*Figura 2.4*).

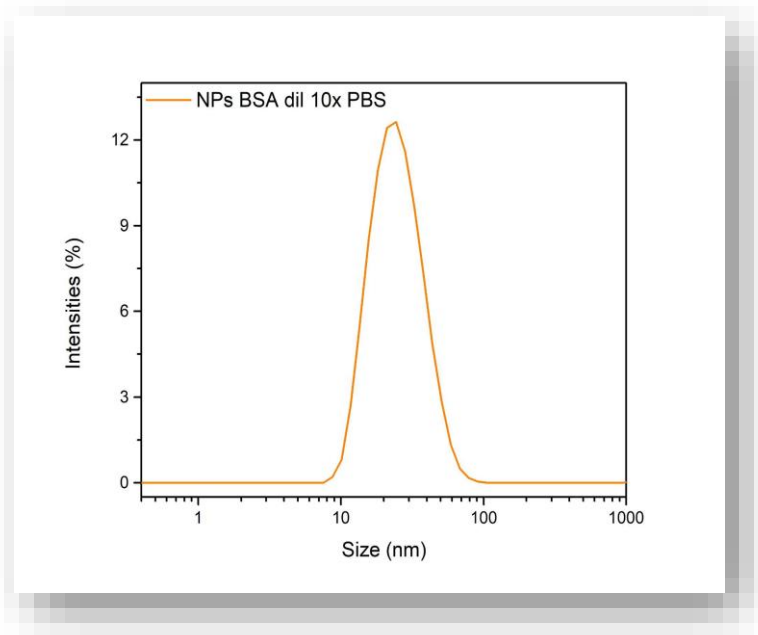


Figura 2.4: Dimensiunea NP-lor de BSA în soluție de PBS, estimată prin DLS

Suplimentar, după o perioadă de aproximativ 6 luni, am reluat măsurătoarea de dimensiune hidrodinamică medie, iar de această dată am obținut o valoare de $22.89 \pm 0.72 \text{ nm}$ (*Figura 2.5*), confirmând astfel stabilitatea în timp.

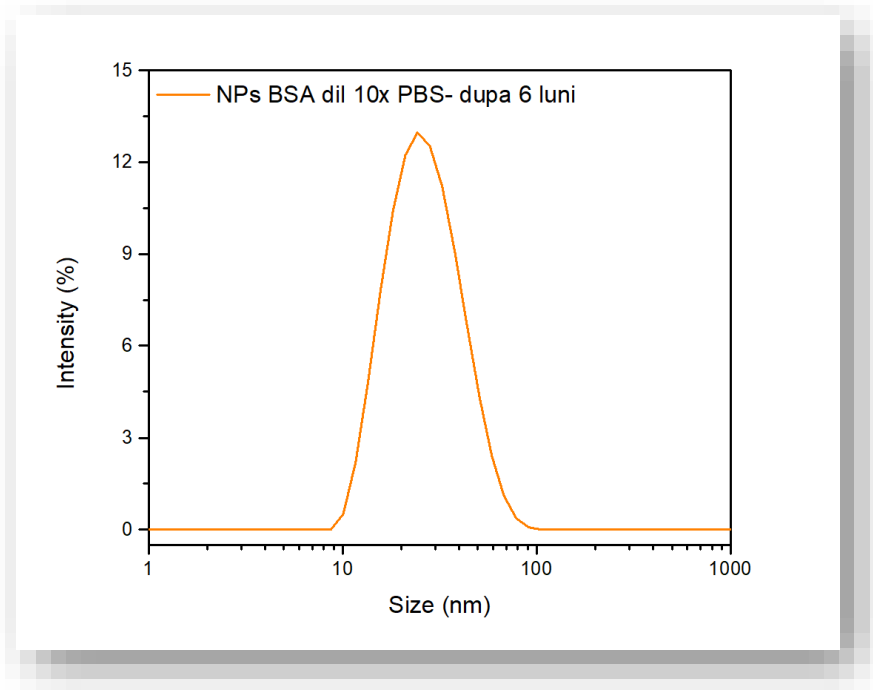


Figura 2.5: Dimensiunea NP-lor de BSA în soluție de PBS, estimată prin DLS, după 6 luni

Această dimensiune a NP-lor de BSA este una potrivită, fiind suficient de mari cât să nu fie filtrate de rinichi prin membrana glomerulară, și mai apoi eliminate din circulația sanguină.[1]

O altă caracteristică pe care am studiat-o în laborator și pe care NP-le le au este Potențialul Zeta al suprafeței. Acesta este un parametru important în caracterizarea NP-lor, care măsoară gradul acestora de încărcare electrică al dublului strat care înconjoară NP-le în soluția analizată. NP-lor cu Potențial Zeta ridicat(între -30mV și $+30\text{mV}$) sunt considerate puternic ionizate (cationice sau anionice) și pot prezenta o toxicitate mai puternică, în special cele cationice care ar putea perturba peretele celular dacă sunt introduse într-un mediu biologic. În plus, dacă potențialul de la suprafața unor NP-le este între -10mV și 10 mV se pot considera relativ neutre din punct de vedere electric.[11]

Acest Potențial Zeta, pentru NP-le fabricate de mine și suspendate în PBS are o valoare de -18.46 ± 0.63 mV, fiind negative la suprafață. (Figura 2.6)

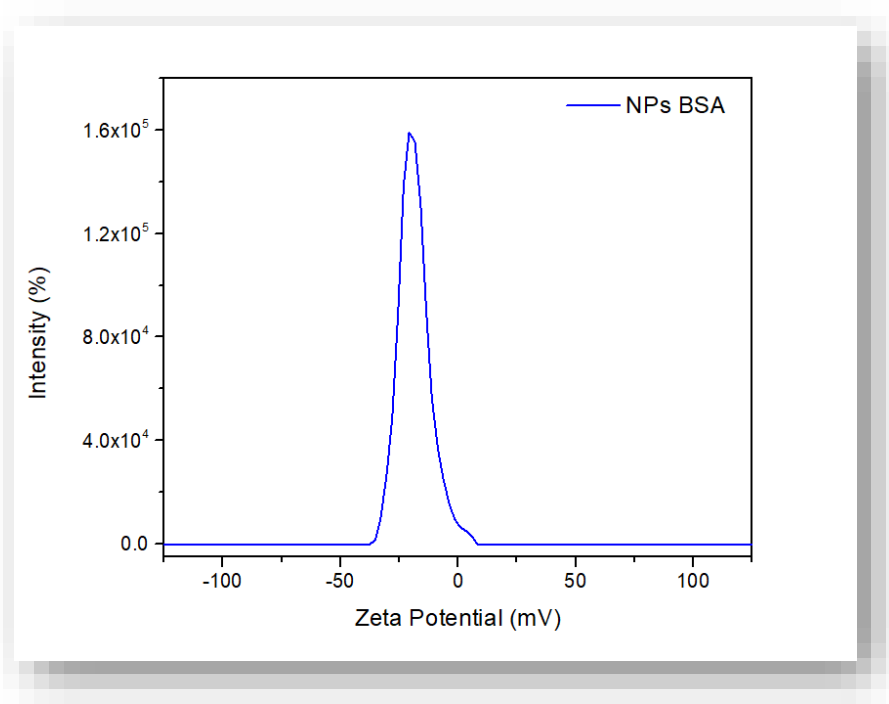


Figura 2.6: Potențialul Zeta pentru NP-le de BSA suspendate in PBS

2.2.3 Caracterizarea nanoparticulelor de BSA în diferite medii

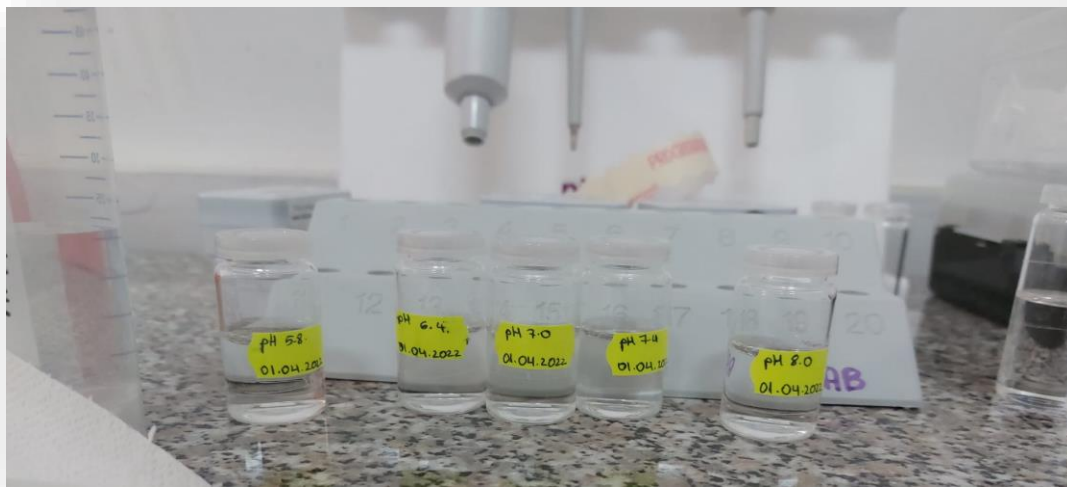
În urma observării proprietăților NP-ilor fabricate (dimensiunea stabilă în timp și un potențial negativ al suprafeței), am fost interesată să studiez dimensiunea acestora în diverse medii cu pH-uri diferite. Această investigație a fost motivată de faptul că pH-ul corpului uman poate fluctua ușor în funcție de regiunea corpului, factorii externi sau starea de sănătate a individului, de la valoarea de 7,4. Pentru a realiza această investigație, am consultat literatura de specialitate pentru a găsi rețete cu ajutorul cărora aș putea prepara diferite soluții tampon cu pH-uri variate, iar

În *Tabelul 2.1* sunt prezentate cantitățile de reactivi necesare pentru a prepara 10 mL din fiecare soluție. [12]

pH	5.8	6.4	7	7.4	7.7	8	8.4
Na ₂ H ₂ PO ₄	4600 μl	3675 μl	1950 μl	950 μl	645 μl	265 μl	169 μl
Na ₂ HPO ₄	400 μl	1325 μl	3050 μl	4050 μl	4355 μl	4735 μl	4831 μl
H ₂ O	5000 μl	5000 μl	5000 μl	5000 μl	5000 μl	5000 μl	5000 μl

Tabel 2.1: Cantitatea de substanță corespunzătoare fiecărei soluții

În imaginea de mai jos (*Imaginea 2.1*) sunt prezentate câteva dintre soluțiile cu diferite pH-uri pregătite în laborator în data de 01/04/2022 cu care am lucrat pe mai departe.



Imaginea 2.1: Imagine digitală a soluțiilor cu diferite pH-uri

Am dorit să investighez dimensiunea NP-lor în cele 7 medii pe care le-am realizat, astfel că am efectuat măsurători utilizând tehnica de analiză prin difuzie dinamică a luminii. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos (*Tabel 2.2*), iar figura de sub tabel (*Figura 2.7*) ilustrează modul în care dimensiunea NP-lor variază în funcție de pH-ul soluției în care acestea au fost suspendate, la o temperatură controlată de 25 °C. Ceea ce mi s-a părut de remarcant este faptul că acestea rămân la aceeași dimensiune indiferent de mediul în care se află.

pH	temperatura °C	dimensiune nm	PDI
5.8	25	23.89 ± 0.37	0.19 ± 0.01
6.4	25	25.42 ± 0.47	0.25 ± 0.01
7	25	24.21 ± 0.70	0.22 ± 0.03
7.4	25	24.11 ± 0.68	0.19 ± 0.02
7.7	25	26.99 ± 2.01	0.26 ± 0.04
8	25	25.79 ± 0.70	0.27 ± 0.01
8.4	25	26.25 ± 2.60	0.24 ± 0.05

Tabel 2.2: Dimensiunea NP-lor de BSA diluate în diferite medii la o temperatură constantă de 25°C

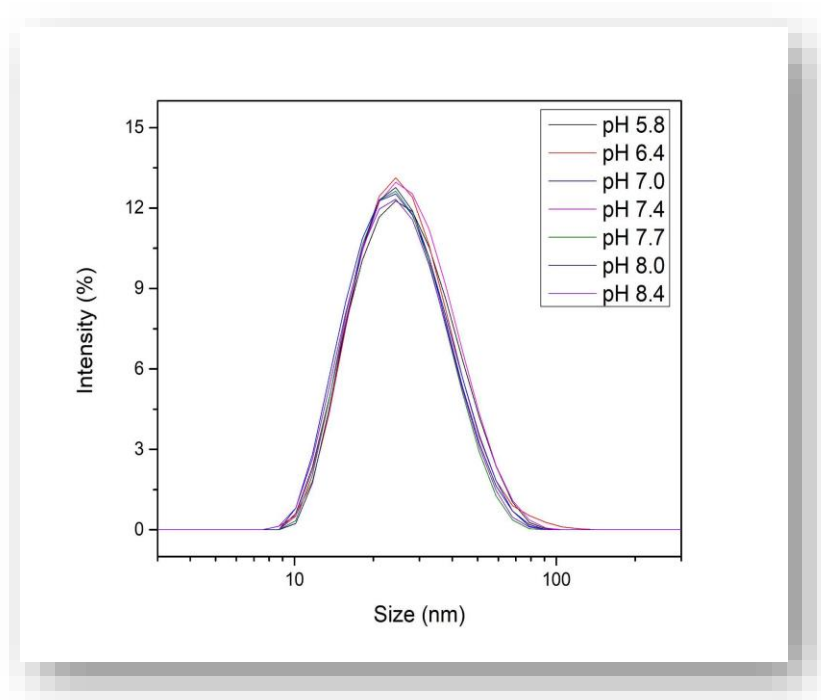


Figura 2.7: Dimensiunea NP-lor de BSA diluate în diverse medii

Tot în cadrul acestei lucrări, am urmărit explorarea unui alt aspect al NP-lor fabricate, și anume fluorescența acestora excitate cu diferite lungimi de undă în toate cele 7 medii preparate anterior (*Figurile 2.8*). Practic, obiectivul este investigarea modului în care acestea se comportă atunci când sunt excitate cu diferite lungimi de undă. Această abordare s-a ales datorită faptului că fluorescența este o proprietate importantă a NP-lor proteice, care poate fi utilizată pentru a obține informații relevante despre acestea. Prin urmare, s-a putut obține o mai bună înțelegere a caracteristicilor acestora. Prezentul set de imagini permite observarea expunerii NP-lor la cinci lungimi de undă diferite, și anume: 290, 490, 530, 610 și 625 nm. De asemenea, pH-ul mediilor în care acestea se găsesc este reprezentat prin utilizarea unor culori diferite pe aceeași schemă.

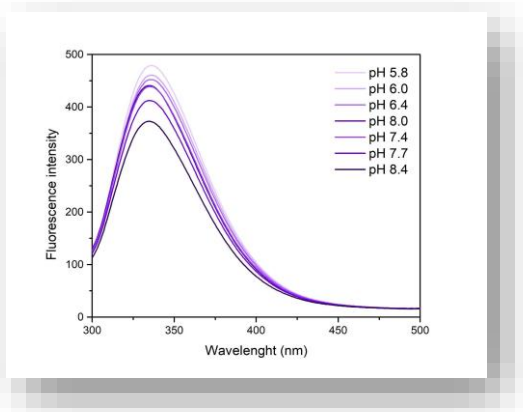


Figura 2.8 a): Excitare cu o lungime de undă de: 290nm

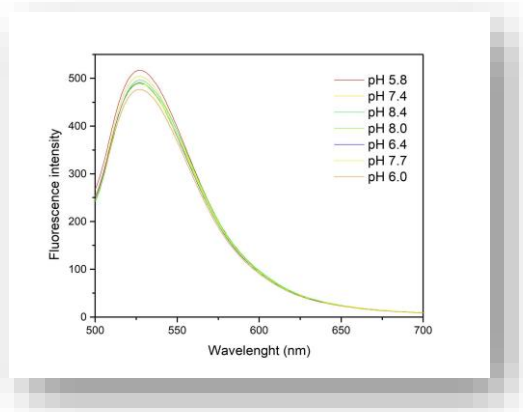


Figura 2.8 b): Excitare cu o lungime de undă de: 490nm

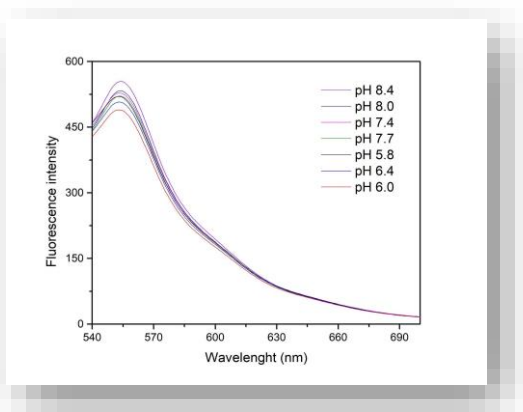


Figura 2.8 c): Excitare cu o lungime de undă de: 530nm

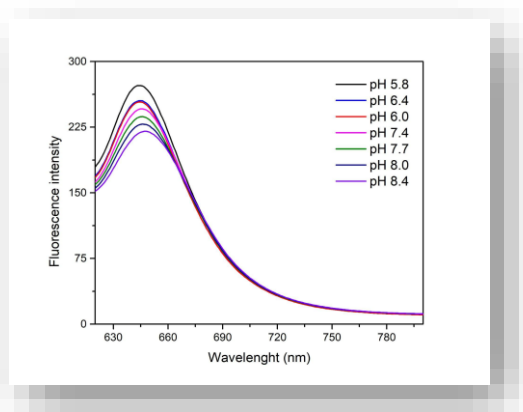


Figura 2.8 d): Excitare cu o lungime de undă de: 610nm

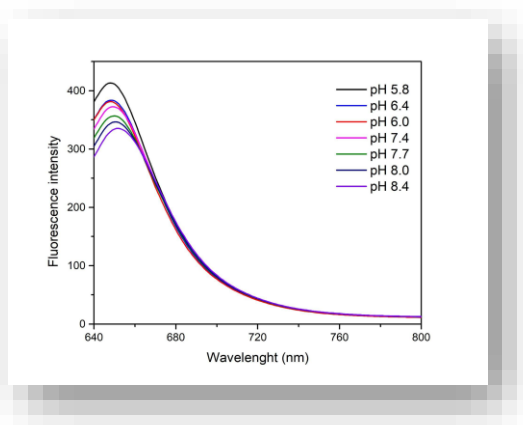


Figura 2.8 e): Excitare cu o lungime de undă de: 625nm

Concluzia dedusă din acest studiu indică faptul că, în momentul în care sunt excitate cu o sursă de radiație electromagnetică, NP-le manifestă o scădere a intensității emisiei de fluorescență odată cu reducerea pH-ului mediului, cu mențiunea că nu se respectă acest lucru în toate cazurile. În legenda fiecărui desen se poate observa ordinea intensităților, iar pentru excitarea cu lungimile de undă de 625nm și, respectiv, 610nm, scăderea se realizează, mai puțin pentru mediul cu pH de 6.4 care prezintă o intensitate a emisiei de fluorescență în neconcordanță cu restul, în timp ce pentru cele de 530 nm și 490 nm se observă o bună stabilitate a emisiei de fluorescență, diferențele intensităților fiind neglijabile. În ceea ce privește excitarea cu 290nm, la fel ca primele două lungimi de undă menționate, se poate afirma faptul că măsurătorile în cazul mediului de pH 8.0 prezintă o intensitate a emisiei de fluorescență în neconcordanță cu restul. Aceste neconcordanțe pot fi atribuite și unor erori experimentale.

2.2.4 Caracterizarea nanoparticulelor de BSA la diferite temperaturi

În general, temperatura reprezintă un factor cheie extern care influențează comportamentul fluorescent al albuminei. În acest context am investigat proprietățile de emisie ale NP-lor de BSA la diferite temperaturi relevante din punct de vedere biologic. Concret, pentru încălzire am folosit temperaturi de la 25 °C la 43 °C, iar pentru răcire de la 43 °C la 25 °C. De fapt, studiile din literatură ne confirmă că odată ce temperatura crește, reziduurile hidrofobe de albumină sunt

îngropate din cauza rearanjării lanțului polipeptidic, ducând implicit la o reducere a intensității emisiei de fluorescență.[13] Rezultatele mele experimentale obținute sunt într-o bună corelare cu rezultatele din literatură, la toate lungimile de undă de excitație studiate existând o scădere a emisiei de fluorescență a NP-ilor de BSA pe măsură ce temperatura crește, procesul fiind reversibil. De menționat este faptul ca NP-le proteice au fost suspendate în PBS.

Datele experimentale sunt ilustrate în figurile de mai jos (*Figurile 2.9*) unde în funcție de lungimea de undă cu care am excitat proba există o altă figură. Pe fiecare dintre aceste figuri am ilustrat cu un gradient de culoare, printr-o linie continuă, creșterea temperaturii, respectiv printr-o linie punctată descreșterea. În plus, intensitatea de fluorescență a fiecărei temperaturi nu este una perfectă cu intensitatea inițială, dar este una aproximativă, menținându-se totuși creșterea sau descreșterea. De menționat este și faptul că la temperaturi scăzute intensitatea este una maximă, iar pe parcursul încălzirii probei, spre 43 °C, intensitatea scade, păstrându-se în fiecare caz intensitatea minima la 43 °C. Pe parcursul revenirii la 25 °C intensitatea emisiei de fluorescență crește uniform.

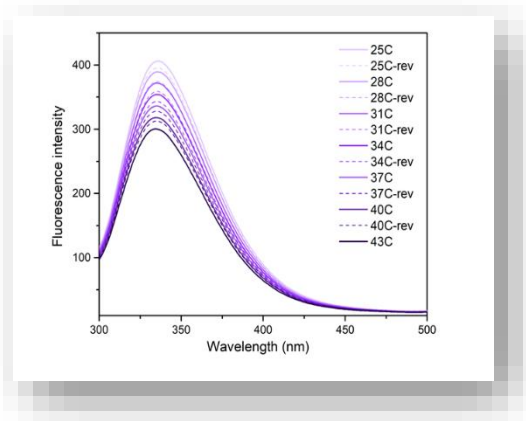


Figura 2.9 a): Excitare cu o lungime de undă de: 290nm

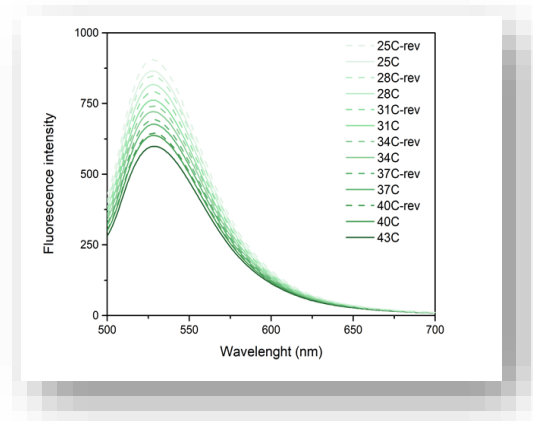


Figura 2.9 b): Excitare cu o lungime de undă de: 490nm

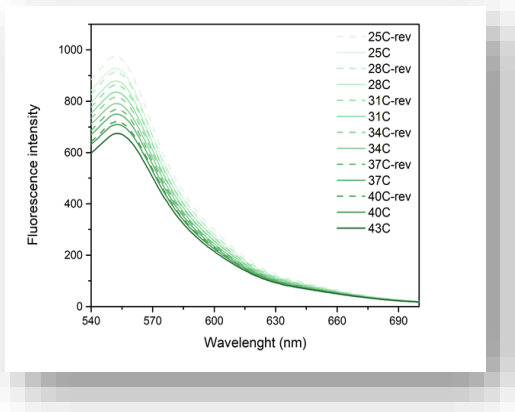


Figura 2.9 c): Excitare cu o lungime de undă de: 530nm

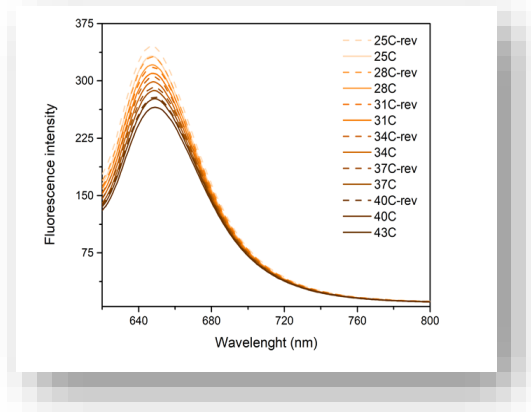


Figura 2.9 d): Excitare cu o lungime de undă de: 610nm

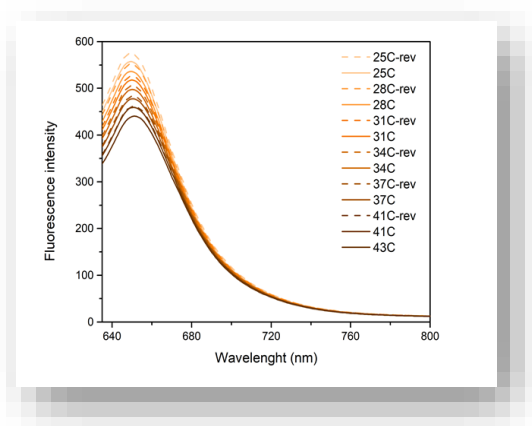


Figura 2.9 a): Excitare cu o lungime de undă de: 625nm

2.3 Caracterizarea nanoparticulelor *in vitro*

2.3.1 Testul MTT

NP-le de BSA autofluorescente, la fel ca cele pe care le-am fabricat, au fost testate pentru a le utiliza ca agenți de contrast fluorescenți și, nanosenzori, în aplicații biomedicale. Acestora li

s-a evaluat biocompatibilitatea, *in vitro*, în carcinom epitelial ovarian, mai exact linia celulară NIH:OVCAR3.

Testul MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliu bromid) utilizează conversia MTT în cristale de formazan de către celulele vii, reflectând astfel activitatea mitocondrială și numărul de celule viabile. Acest test este folosit pe scară largă pentru a evalua efectele citotoxice, *in vitro*, ale medicamentelor asupra liniilor celulare sau celulelor primare de la pacienți. Protocolul testului cuprinde etape importante și are limite și aplicații specifice. Rezultatele testului MTT au arătat că NPS-le de BSA nu au avut un impact semnificativ asupra viabilității celulelor, chiar și la concentrații ridicate de până la 4% (Figura 2.10).[14]

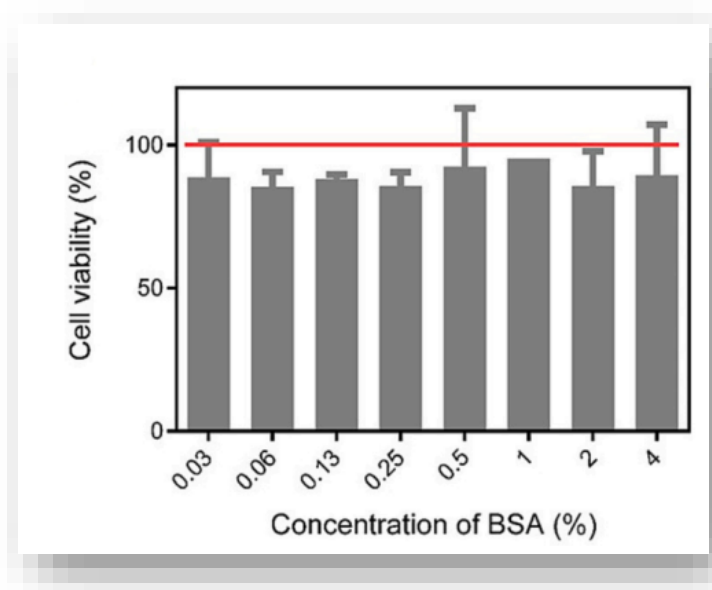


Figura 2.10: Viabilitate celulară: Testul MTT. Histograma prezintă procentul de celule NIH:OVCAR3 viabile în prezența diferitelor concentrații de NP-le de BSA: 0,03%, 0,06%, 0,13%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, raportat la grupul de control. Linia roșie reprezintă viabilitatea de 100% a grupului de control.[14]

2.3.2 Vizualizarea internalizării nanoparticulelor prin microscopie electronică în transmisie (TEM)

De asemenea, prin utilizarea microscopiei electronice cu transmisie (TEM), s-a observat că NP-le de BSA au fost internalizate în endozomii celulelor, indicând capacitatea lor de a intra în interiorul celulelor (*Figura 2.11*).[14]

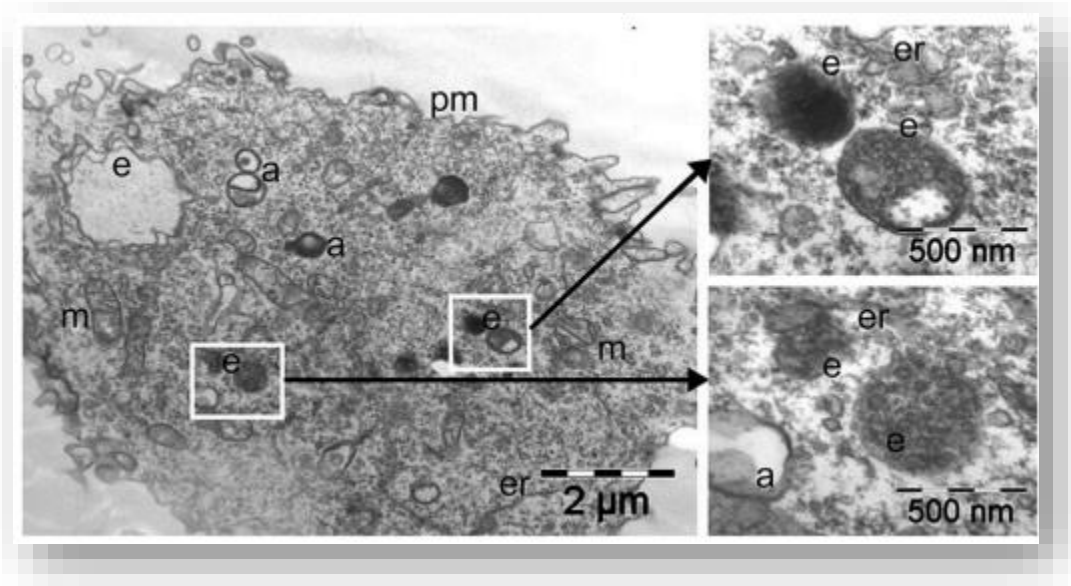


Figura 2.11: Se prezintă imagini TEM ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu NP-le de BSA, iar în inserții se poate observa o mărire mai mare a NP-ilor de BSA în interiorul endozomilor. În imaginile TEM, se pot distinge autofagosomi (a), endozomi (e), reticul endoplasmatic (er), mitocondrii (m) și membrana plasmatică (pm)[14]

2.3.3 Localizarea intracelulară a nanoparticulelor prin imagistică confocală de fluorescență

În cadrul aceleiași abordări, s-a avut intenția de a demonstra proprietatea de autofluorescență al NP-lor de BSA în interiorul celulelor, tunabilă pe tot domeniu și de a confirma internalizarea eficientă a senzorilor proteici. Pentru a realiza acest lucru, s-a utilizat tehnica de imagistică confocală de fluorescență asupra celulelor NIH:OVCAR3, tratate în prealabil cu NP de BSA. Rezultatele obținute au fost ilustrate prin intermediul imaginilor de mai jos (*Figura 2.12*), oferind o perspectivă vizuală asupra acestui fenomen. În plus, acestea au fost excitate cu 3 linii laser după cum urmează: 488, 561 și 640 nm.[14]

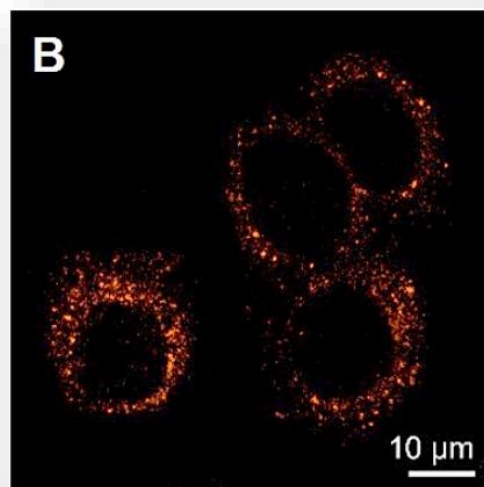
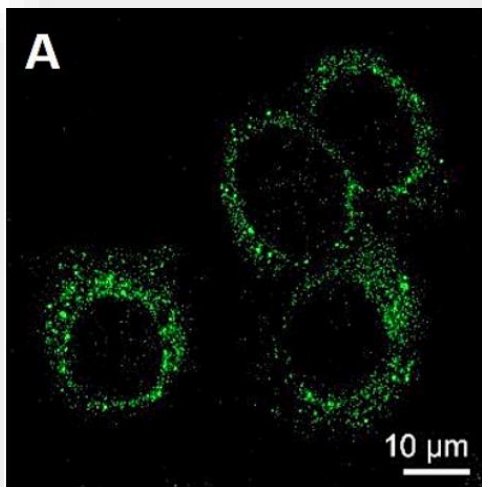


Figura 2.12 A): Imagini de fluorescență confocală ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA. Autofluorescența NP-lor de BSA atunci când sunt excitate cu 488 nm. [14]

Figura 2.12 B): Imagini de fluorescență confocală ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA. Autofluorescența NP-lor de BSA atunci când sunt excitate cu 561 nm. [14]

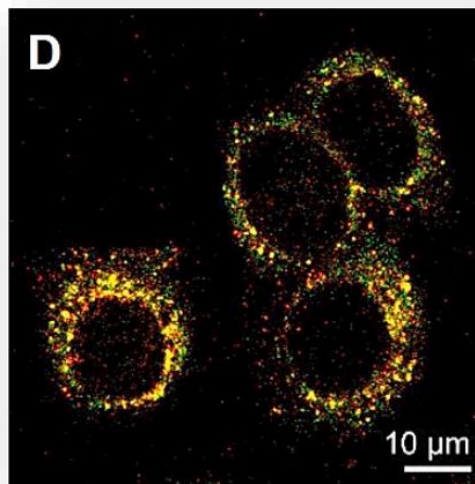
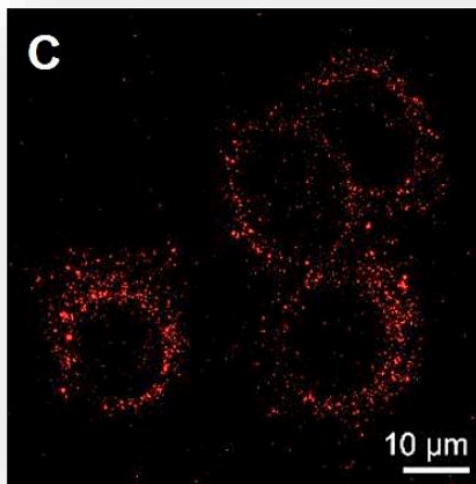


Figura 2.12 C): Imagini de fluorescență confocală ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA. Autofluorescența NP-lor de BSA atunci când sunt excitate cu 640 nm. [14]

Figura 2.12 D): Imagini de fluorescență confocală ale celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA. Imaginea combinată a imaginilor A), B) și C);[14]

Conform *Figurilor 2.12*, se poate observa că senzorii nu pătrund în nucleu, ci prezintă o distribuție doar în citoplasma celulelor NIH:OVCAR3. Semnalul de fluorescență este predominant în regiunea perinucleară. De asemenea, prin îmbinarea imaginilor ilustrată în *Figura 2.12 D)*, putem observa o suprapunere semnificativă a semnalelor de emisie specifice senzoriilor, la toate lungimile de undă de excitație. Acest lucru confirmă faptul că senzorii păstrează capacitatea lor intrinsecă de a emite în spectrul ultraviolet până la roșu în celulele testate.[14]

2.3.4 Validarea intracelulară a nanoparticulelor ca și senzori pentru detecția ionilor de Cu^{2+}

În același context, în vederea obținerii unor informații suplimentare despre NP-le de BSA introduse în celulă, s-au efectuat și studii preliminare pentru a evalua capacitatea de detecție a Cu^{2+} , metal despre care am vorbit în Introducerea lucrării. În acest studiu s-a dorit o comparație între celule care au fost tratate doar cu NP de BSA, respectiv celule tratate atât cu NP de BSA cât

și cu Cu^{2+} . Analiza a fost efectuată cu ajutorul microscopului de fluorescență (*Figura 2.13 a) și b)*, unde s-a optat pentru utilizarea unei lungimi de undă de excitare în zona albastră a spectrului electromagnetic (490 nm) și cel cu câmp luminos (*Figura 2.14 a) și b)*. Imaginile ne oferă o informație esențială, și anume, scăderea intensității de fluorescență a celulelor tratate cu Cu^{2+} . Rezultatele obținute verifică performanțele senzorului în detectarea Cu^{2+} și deschide noi posibilități în viitoarele aplicații practice. [14]

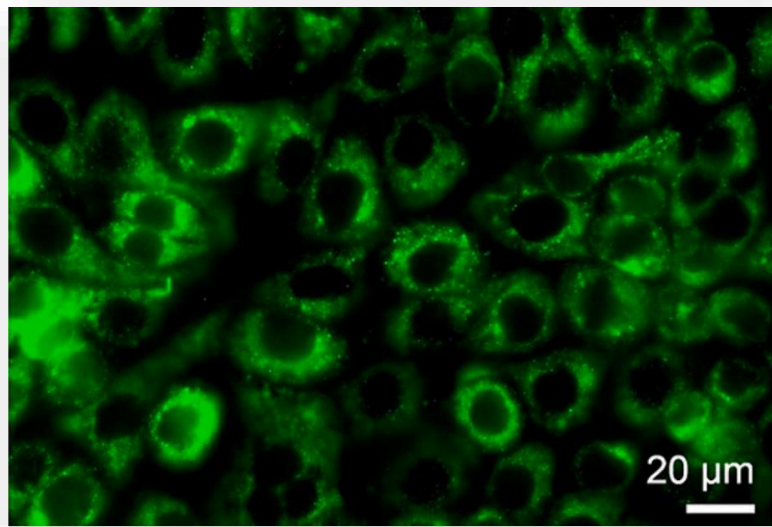


Figura 2.13 a): Imaginea de fluorescență a celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA[14]

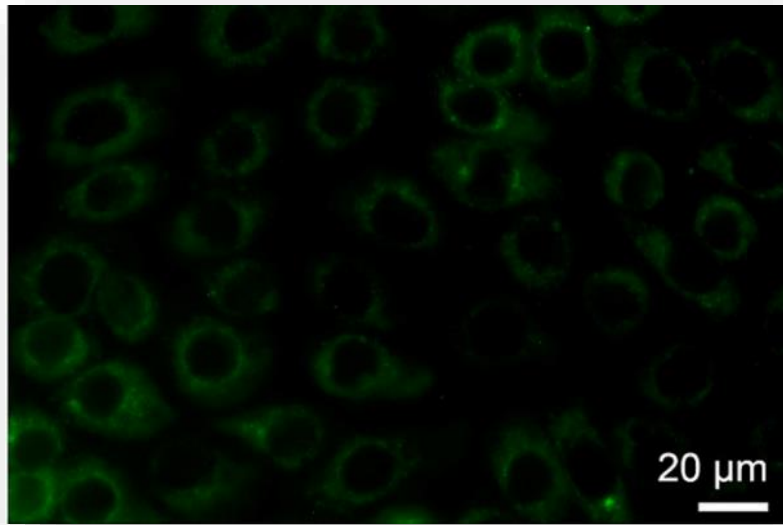


Figura 2.13 b): Imaginea de fluorescență a celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA și Cu^{2+} [14]

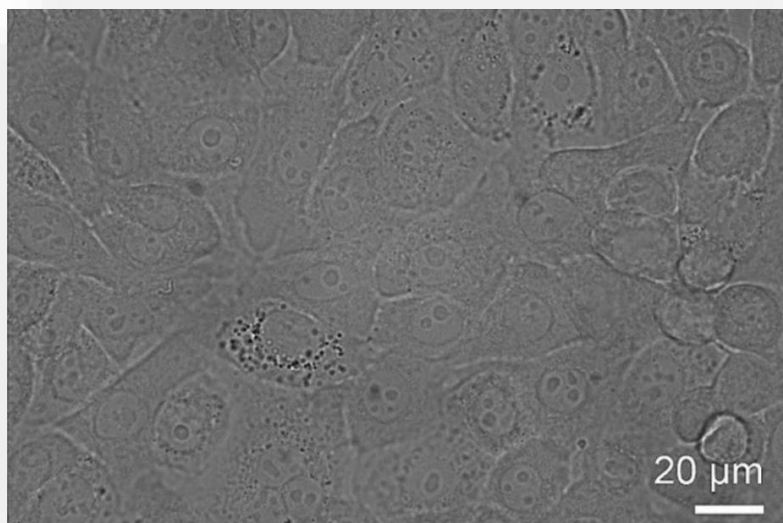


Figura 2.14 a): Imaginea de câmp luminos a celulelor NIH:OVCAR3 tratate cu senzori de NP de BSA[14]

Concluzii și perspective

În final, această lucrare a atins cu succes obiectivele propuse, respectiv fabricarea și caracterizarea unui sistem de NP-le cu autofluorescență, atât în soluție, cât și *in vitro*. Acest sistem de NP-le prezintă potențial în domeniul biodetecției și poate contribui la înțelegerea bolii neurodegenerative Alzheimer. O ipoteză importantă legată de patogeneza acestei boli se referă la fiziologia anormală a unor elemente esențiale pentru funcționarea corectă a sistemului nervos central, precum zincul (Zn), cuprul (Cu) și fierul (Fe). Detectarea precoce și precisă a acestor metale ar putea aduce beneficii semnificative prin anticiparea evoluției bolii și îmbunătățirea simptomatologiei asociate. Astfel, utilizarea NP-lor descrise în această lucrare ar putea reprezenta o abordare promițătoare pentru cercetarea și diagnosticul afecțiunilor neurodegenerative, precum Alzheimerul.

Sinteza NP-lor de albumină serică bovină (BSA) a fost realizată printr-o metodă în două etape, bazată pe o rețetă preluată din literatura de specialitate și ulterior optimizată.

Testele realizate în soluție au reprezentat un aspect crucial al cercetării, având la bază înțelegerea și optimizarea sistemului în cauză. Prin efectuarea analizei emisiei de fluorescență pe întreg domeniul vizibil, cu excitare la diferite lungimi de undă cuprinse între 290 și 625 nm, am putut obține informații relevante cu privire la comportamentul fluorescent al NP-lor de BSA evidențiindu-se un aspect deosebit: acestea prezintă o fluorescență intrinsecă ajustabilă și tunabilă.

De asemenea, am efectuat analiza morfologică a NP-lor de BSA prin utilizarea microscopului TEM. Rezultatele oferite de DLS ne-au dezvăluit o dimensiune stabilă în timp a particulelor de aproximativ 26,33 nm. Această consistență dimensională reprezintă un aspect important în caracterizarea lor și evidențiază controlul riguros exercitat în procesul de sinteză.

Pe lângă caracterizarea dimensiunii, am evaluat și proprietățile de suprafață ale acestora. Prin măsurarea Potențialului Zeta, am obținut informații despre încărcarea electrică și stabilitate. Valorile înregistrate au indicat un potențial de -18,46 mV, subliniind astfel existența unei sarcini negative și a unei dispersii stabile a particulelor.

Având în vedere scopul final al acestei cercetări și faptul că pH-ul corpului suferă ușoare modificări în funcție de zonă sau starea fizico-metabolică a pacientului, am fost determinată să studiez comportamentul dimensional al NP-lor de BSA la 25 °C în diferite medii create de mine

(începând de la un pH de 5,8 până la unul de 8,4). De asemenea, am dorit să investighez dacă există o ordine a intensității de fluorescență în aceste medii.

Rezultatele obținute au arătat că NP-le de BSA au prezentat stabilitate dimensională, menținându-și dimensiunea inițială măsurată la pH 7,4. Cu toate acestea, intensitatea de fluorescență a fost relativ stabilă, cu ușoare scăderi în intensitate în mediile alcaline. Ca teste de control suplimentare, am efectuat măsurători de fluorescență la creșterea și descreșterea temperaturii, între 25 °C și 43 °C (cu un pas de 3 °C). În acest caz, am observat o descreștere a intensității de fluorescență odată cu creșterea temperaturii, fiind evidențiat și fenomenul de reversibilitate al intensității.

Aceste rezultate demonstrează importanța studierii comportamentului și stabilității NP-lor de BSA în medii diverse, precum variațiile de pH și temperatură. Înțelegerea modului în care aceste NP-le răspund la acești factori poate contribui la dezvoltarea de aplicații mai precise și eficiente în domeniul biomedical, în special în ceea ce privește biodectarea și diagnosticarea. Mai multe investigații au fost necesare pentru a explora în profunzime relația dintre proprietățile NP-lor și mediul în care acestea sunt utilizate, în vederea optimizării și adaptării lor pentru aplicații viitoare, astfel că s-a decis și caracterizarea lor *in vitro*.

Partea *in vitro* a acestei cercetări a implicat teste de viabilitate celulară utilizând metoda MTT, prin care s-a demonstrat biocompatibilitatea NP-lor de BSA în cazul carcinomului epitelial ovarian NIH:OVCAR3. Pentru a confirma internalizarea acestor NP în celule, s-a utilizat microscopia TEM, care a permis să observăm imaginea directă a lor la nivel celular. Pentru a obține o imagine tridimensională și pentru a evidenția internalizarea precisă, s-a utilizat imagistica de fluorescență confocală.

Aceste experimente *in vitro* au oferit o înțelegere mai profundă a comportamentului NP-lor în mediul celular și au demonstrat că acestea prezintă un grad ridicat de biocompatibilitate. Rezultatele obținute prin utilizarea acestor tehnici avansate de imagistică confirmă capacitatea NP-lor de a fi internalizate în celulele țintă și oferă perspective valoroase în dezvoltarea de aplicații biomedicale și diagnosticare. Mai mult, aceste rezultate sprijină utilizarea NP-lor de BSA ca potențiali nanosenzori sau vectori de livrare în terapia țintită în cazul cancerului ovarian și în alte afecțiuni.

Ca și perspective de viitor, îmi propun cuplarea controlată a acestor nanoparticule cu un alt tip de nanosisteme luminescente, și anume NP semiconductoare (eng. Quantum dots -QDs) cu

scopul de a obține un nanosistem hibrid inovator, cu răspuns emisiv dual. Aceste QD-uri au fost selectate pentru a le cupla de NP-le proteice datorită proprietăților extraordinare pe care le au: dimensiune și structură chimică compactă, respectiv emiterea diferitelor lungimi de undă pe o gamă largă a spectrului luminos, de la vizibil, la infraroșu, posibilitate de a fi conjugată cu alte molecule/biomolecule de interes, etc. În ultimii ani, este evaluată utilizarea acestor QD-uri pentru îmbunătățirea dramatică a testelor de diagnostic clinic pentru depistarea precoce a cancerului. Utilizarea QD-urilor anunță o revoluție în domeniul imagisticii biologice, în detrimentul fluoroforilor organici clasici care prezintă unele neajunsuri, cum ar fi: semnalele provenite de la moleculele marcate pot fi ascunse de autofluorescența celulară, care apare în spectrul vizibil. Cu toate acestea, unele QD-uri sunt toxice, astfel că biocompatibilizarea acestora prin încapsulări, sau alte tehnici, reprezintă un pas esențial în viitoarele demersuri. Concret, ca și viitori pași, îmi propun o funcționalizare a NP-lor proteice cu QD-uri, care vor reprezenta un nanosistem hibrid cu emisie duală de fluorescență (*Figura 3.1*). Pentru realizarea acestui deziderat am în vedere mai multe strategii de funcționalizare i) integrarea QD-urilor în interiorul NP-lor proteice în cadrul etapei inițiale de sinteză a acestora (*Figura 3.2a*); ii) conjugare electrostatică a QD-urilor pe suprafața NP-lor proteice (*Figura 3.2 b*) și iii) conjugarea covalentă a QD-urilor pe suprafața NP-lor proteice (*Figura 3.2 c*).

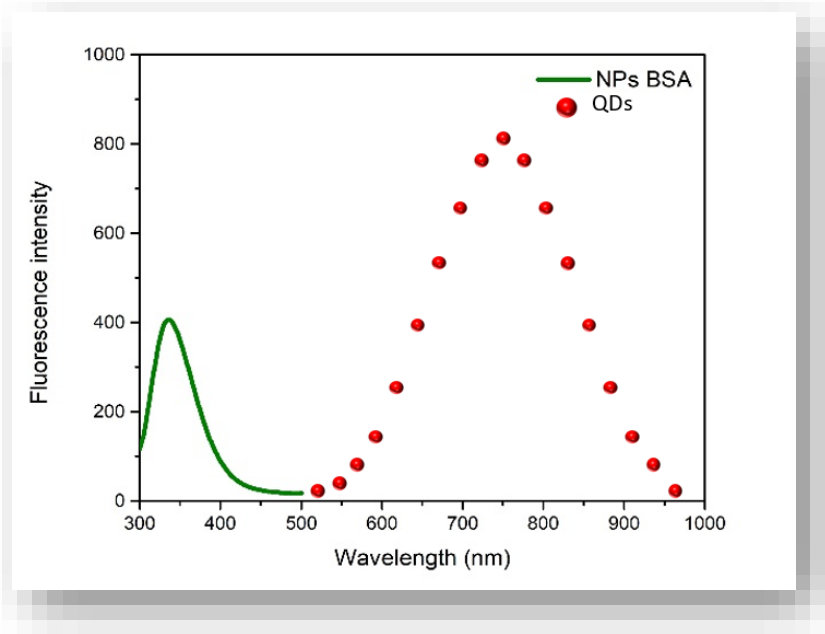


Figura 3.1 Caracterul dual de fluorescență a nanosistemului hibrid format prin funcționalizarea NP-lor de BSA cu QD

Legendă:

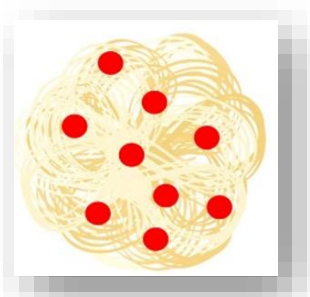


Figura 3.2 a) Înglobarea QD-urilor în NP-le de BSA

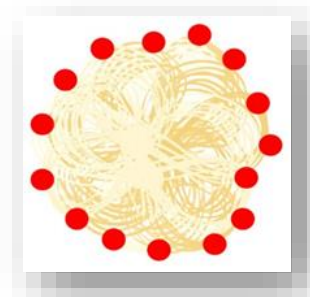


Figura 3.2 b) Legarea electrostatică a QD-urilor pe suprafața NP-lor de BSA

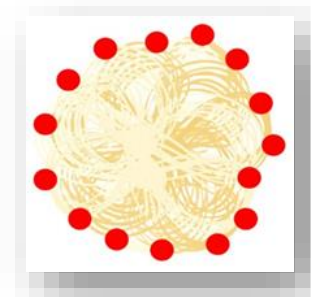


Figura 3.2 c) Conjugarea covalentă a QD-urilor de suprafața NP-lor de BSA

ANEXE

Anexa 1

Spectroscopia de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) -Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instrument (*Figura A1.1*)

Spectroscopia de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) este o tehnică de măsurare larg utilizată pentru determinarea dimensiunilor particulelor mici în soluție. Este un instrument puternic în caracterizarea particulelor coloidale, proteinelor și altor nanoparticule în domeniul nanotehnologiei și nanomedicinei. DLS se bazează pe analiza fluctuațiilor dependente de timp în intensitatea luminii împrăștiată de către particulele dintr-o suspensie sau soluție. Aceste fluctuații sunt rezultatul mișcării Browniene ale particulelor, determinate de agitația termică.

Prin înregistrarea și analiza intensității luminii împrăștiată în funcție de timp, DLS poate furniza informații valoroase despre dimensiunea și distribuția particulelor din soluție. Principiul de bază este că particulele mai mari împrăștie lumina într-un mod mai pronunțat decât particulele mai mici. DLS măsoară această împrăștiere a luminii și o corelează cu dimensiunea hidrodinamică a particulelor, care este dimensiunea efectivă a particulelor în soluție, ținând cont de influența mișcării Browniene.

DLS este deosebit de utilă în studiul particulelor de dimensiuni nanometrice, deoarece poate măsura și caracteriza particulele cu diametre cuprinse între câțiva nanometri și câteva sute de nanometri. Aceasta include, printre altele, nanoparticulele medicamentoase, nanoparticulele utilizate în livrarea medicamentelor, coloizii, microparticulele și proteinele.

Un aspect important al utilizării DLS este pregătirea adecvată a mostrei. Soluția trebuie să fie clară și să nu conțină agregate sau particule sedimentate. Este, de asemenea, important să se evite orice interferență luminoasă din cauza particulelor sau a altor contaminanți. Durata de colectare a datelor trebuie să fie suficient de lungă pentru a obține o statistică semnificativă a fluctuațiilor și a dimensiunilor particulelor.

Viteza mișcării Browniene este măsurată și convertită într-un diametru hidrodinamic prin intermediul unui software, luând în considerare temperatura probei, vâscozitatea și indexul de

refracție. Această conversie se bazează pe ecuația Stokes-Einstein, care stabilește o relație între mișcarea Browniană a particulelor și proprietățile mediului în care acestea se află.

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

unde: D_H -diametrul hidrodinamic, D -coeficientul de difuzie translațional, K -constanta Boltzmann, T –temperatura absolută și η –vâscozitatea probei.[15]



Figura A1.1. Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instrument

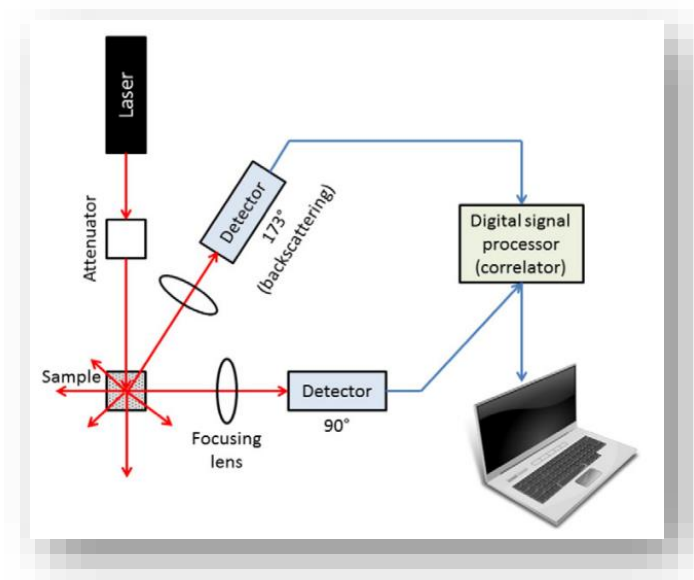


Figura A1.1 Reprezentarea schematica a principului de funcționare al DLS-ului[15]

Ca structura, aceste instrumente au trei componente majore - laserul, eșantionul și detectorul de lumină (*Figura A1.2*). Sursele laser furnizează fascicule de lumină coerentă și monocromatică, fiind urmate de un atenuator cu rol în ajustarea puterii laserului. Eșantioanele sunt fabricate din sticlă sau material plastic, curate și fără zgărieturi, de diferite dimensiuni. Acestea trebuie să fie curate, omogene și fără precipitare.dls[15]

În plus, în lucrarea mea de licență, am utilizat acest aparat pentru a determina diametrul hidrodinamic al NP-ulelor de BSA. Aceste măsurători au fost înregistrate cu ajutorul programului Malven ZS90.

Anexa 2

Potențialul Zeta – Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instrument (*Figura A2.1*)



Figura A2.1. Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instrument

Potențialul Zeta reprezintă sarcina electrică a unei particule la suprafața de separare și este utilizat pentru a măsura interacțiunile electrostatice de atracție sau respingere dintre particule. Potențialul Zeta poate fi mai bine înțeles în legătură cu dublul strat electric care înconjoară particula. În jurul particulei, stratul lichid se împarte în două regiuni distincte: o regiune inferioară, cunoscută sub numele de strat Stern, în care ioni sunt puternic legați de suprafața particulei, și o regiune exterioară, în care ioni sunt mai slab legați. Această separare între regiunile cu legături ionice diferite determină prezența dublului strat ionic în jurul particulei. (*Figura A2.2*)

În *Figura A2.3* este reprezentat schematic principiul de funcționare pentru determinarea Potențialului Zeta. Fata de DLS, pentru determinarea Potențialului Zeta, se utilizează cuve din plastic cu electrozi încorporați. Fasciculul laser este împărțit în două, unul dintre fascicule fiind îndreptat către mostra analizată, iar celălalt fiind folosit ca referință. Lumina dispersată de la mostra analizată este combinată sau amestecată optic cu fasciculul de referință pentru a determina modificarea frecvenței Doppler. Apoi, viteza particulelor (V) este calculată pe baza modificării Doppler, iar potențialul Zeta este determinat folosind o serie de ecuații matematice. [15]

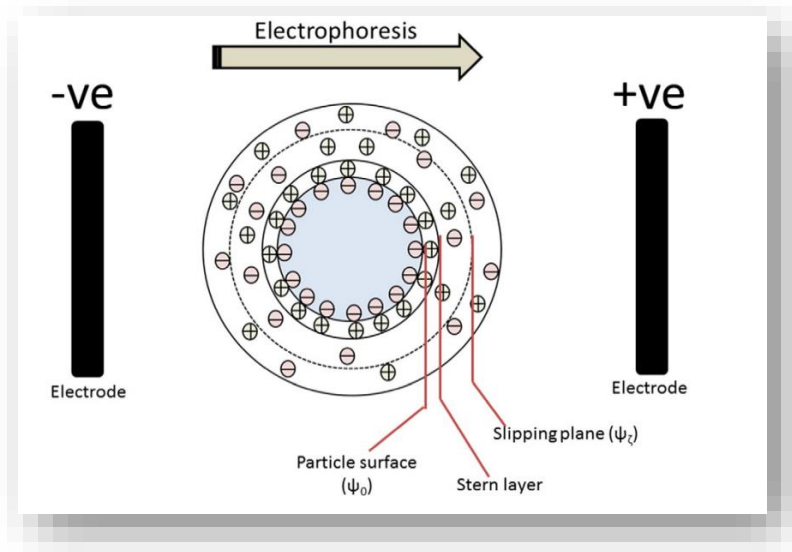


Figura A2.2 reprezentarea schematica a Potentialului Zeta[15]

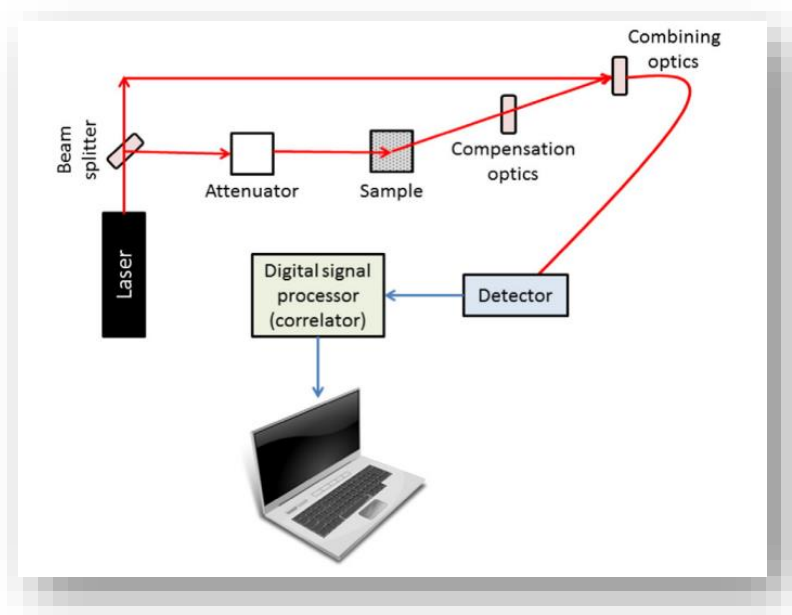


Figura A2.3 Reprezentarea schematica a principiului de funcționare a potențialului Zeta[15]

În lucrarea de față, toate măsurătorile potențialului Zeta au fost efectuate asupra NP-ulelor de BSA pentru a evalua potențialul de la suprafața acestora. Aceste măsurători au fost înregistrate cu ajutorul sistemului Malvern Nano ZS90.

Anexa 3

Spectrofluorimetrul Jasco FP6500



Fig. A3.1. Spectrofluorimetrul Jasco FP6500

În fluorimetria convențională, lumina emisă de sursa de excitație, de obicei o lampă cu xenon, este selectată prin intermediul unui filtru sau a unui monocromator și apoi direcționată către probă. O schema reprezentativă a circuitului luminii în interiorul aparatului se afla în *Figura A3.2*. Probabilitatea ca o parte din această lumină să fie absorbită de substanța fluorescentă a probei este mare, iar în urma acestei absorbții, proba emite lumină fluorescentă în diferite direcții. Din această lumină fluorescentă emisă, doar o fracțiune ajunge la detector după ce trece printr-un alt filtru. În vederea minimizării interferențelor cu lumina incidentă reflectată, detectorul este de obicei poziționat perpendicular (la un unghi de 90°) în raport cu fasciculul de lumină.

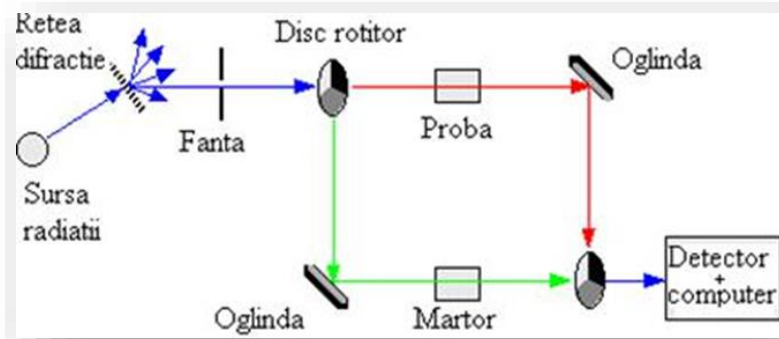


Figura A3.2 Reprezentarea schematica a principiului de functionare a Spectrofluorimetrul Jasco FP6500

În lucrarea de față, spectrele de fluorescența au fost înregistrate cu ajutorul spectrofluorimetrului Jasco FP6500.

Anexa 4

Microscopul electronic prin transmisie (TEM)

Microscopia electronică prin transmisie (TEM) este o metodă de microscopie avansată în care un fascicul de electroni este trimis printr-un specimen pentru a crea o imagine detaliată. Această tehnică permite obținerea de imagini cu o rezoluție mult mai mare decât microscopul optic datorită proprietăților particulare ale electronilor.

În TEM, un fascicul de electroni de înaltă energie este generat și focalizat prin intermediul unor lentile magnetice. Acest fascicul este apoi transmis prin specimen, iar interacțiunea electronilor cu proba dezvăluie informații despre structura internă și compoziția acesteia. Rezultatul este o imagine detaliată a specimenului.

Formarea imaginilor în TEM se bazează pe fenomenul de dispersie a electronilor. Densitatea și grosimea probei determină modul în care electronii sunt dispersați în timp ce trec prin specimen. De asemenea, grosimea secțiunii joacă un rol important în calitatea imaginii obținute. Dacă secțiunile sunt prea subțiri, se poate pierde contrastul, iar dacă sunt prea groase, imaginea poate deveni neclară.

Bibliografie

- [1] H. Kobayashi, R. Watanabe, and P. L. Choyke, “Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?,” *Theranostics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, 2014, doi: 10.7150/thno.7193.
- [2] R. Borlan *et al.*, “Design of fluorophore-loaded human serum albumin nanoparticles for specific targeting of NIH:OVCAR3 ovarian cancer cells,” *Nanotechnology*, vol. 31, no. 31, p. 315102, Jul. 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab8b90.
- [3] Y. Niu *et al.*, “Fluorescence switch of gold nanoclusters stabilized with bovine serum albumin for efficient and sensitive detection of cysteine and copper ion in mice with Alzheimer’s disease,” *Talanta*, vol. 223, no. Pt 2, p. 121745, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121745.
- [4] Z. Breijyeh and R. Karaman, “Comprehensive Review on Alzheimer’s Disease: Causes and Treatment,” *Mol. Basel Switz.*, vol. 25, no. 24, p. 5789, Dec. 2020, doi: 10.3390/molecules25245789.
- [5] P. Lei, S. Ayton, and A. I. Bush, “The essential elements of Alzheimer’s disease,” *J. Biol. Chem.*, vol. 296, p. 100105, Jan. 2021, doi: 10.1074/jbc.REV120.008207.
- [6] R. Borlan, M. Focsan, D. Maniu, and S. Astilean, “Interventional NIR Fluorescence Imaging of Cancer: Review on Next Generation of Dye-Loaded Protein-Based Nanoparticles for Real-Time Feedback During Cancer Surgery,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, pp. 2147–2171, Mar. 2021, doi: 10.2147/IJN.S295234.
- [7] B.-H. Jun, Ed., *Nanotechnology for Bioapplications*, vol. 1309. in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1309. Singapore: Springer Singapore, 2021. doi: 10.1007/978-981-33-6158-4.
- [8] “Jablonski diagram - Google Search.” https://www.google.com/search?q=Jablonski+diagram&sxsrf=AJOqlzX2wJgLU9Wqv0_8xyJAQTY_59bRkA:1676488913103&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiFoYrxn5j9AhXCmIsKHZIxAFkQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1064&bih=966&dpr=0.9#imgrc=UAzXe802GO1TrM (accessed Feb. 15, 2023).
- [9] A. Jahanban-Esfahlan, A. Ostadrahimi, R. Jahanban-Esfahlan, L. Roufegarinejad, M. Tabibiazar, and R. Amarowicz, “Recent developments in the detection of bovine serum albumin,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 138, pp. 602–617, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096.
- [10] K. M. Naik, D. B. Kolli, and S. T. Nandibewoor, “Elucidation of binding mechanism of hydroxyurea on serum albumins by different spectroscopic studies,” *SpringerPlus*, vol. 3, no. 1, p. 360, Dec. 2014, doi: 10.1186/2193-1801-3-360.
- [11] J. D. Clogston and A. K. Patri, “Zeta Potential Measurement,” in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, S. E. McNeil, Ed., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 697. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 63–70. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- [12] C. Mohan, *Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*. 2006.
- [13] R. Jaenicke *et al.*, “Protein Structure and Function at Low Temperatures [and Discussion],” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 326, no. 1237, pp. 535–553, 1990.

- [14] R. Borlan *et al.*, “Albumin nanoparticles with tunable ultraviolet-to-red autofluorescence for label-free cell imaging and selective biosensing of copper ion,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 242, p. 125129, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125129.
- [15] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential – What they are and what they are not?,” *J. Controlled Release*, vol. 235, pp. 337–351, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Couți Anamaria, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2023 , sub îndrumarea CS I Dr. Focșan Monica, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,
27.06.2023

Nume,

Semnătură

COUȚI Anamaria

