

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
Departamentul X: Chirurgie II**

**CAIZER ISABELA-SIMONA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**TERAPIA ALTERNATIVĂ, NEINVAZIVĂ ȘI FĂRĂ  
TOXICITATE A CANCERULUI MAMAR PRIN  
HIPERTERMIE SUPERPARAMAGNETICĂ CU  
NANOPARTICULE BIOCOMPATIBILE SPION- $\gamma$ -  
CICLODEXTRINE**

Conducător științific

**PROF. DR. BRATU ION-TIBERIU**

**Timișoara  
2023**

## CUPRINS

### INTRODUCERE

### PARTEA GENERALĂ

#### CAPITOLUL 1. METODE ȘI TEHNICI ACTUALE PENTRU TERAPIA ALTERNATIVĂ A CANCERULUI

- 1.1. Cancerul, cancerul mamar și terapiile convenționale
- 1.2. Metode și tehnici alternative actuale pentru tratarea cancerului
- 1.3. Hipertermia magnetică (MHT)/superparamagnetică (SPMHT) cu nanoparticule pentru terapia alternativă a cancerului
  - 1.3.1. Introducere
  - 1.3.2. Nanoparticule magnetice pentru hipertermia magnetică/ superparamagnetică și mărimi magnetice caracteristice lor
  - 1.3.3. Încălzirea nanoparticulelor magnetice în câmp magnetic alternativ. Relaxarea magnetică Néel-Brown și puterea specifică disipată (SLP)
  - 1.3.4. Considerații asupra unor mărimi și parametri importanți care influențează eficiența hipertermiei magnetice
  - 1.3.5. Biocompatibilitate, toxicitate și siguranță în utilizarea nanoparticulelor magnetice în hipertermia magnetică/ superparamagnetică
  - 1.3.6. Farmacocinetica și biodistribuția nanoparticulelor magnetice
- 1.4. Concluzii

#### CAPITOLUL 2. TERAPIA ALTERNATIVĂ ȘI NEINVAZIVĂ A CANCERULUI PRIN HIPERTERMIE MAGNETICĂ/ SUPERPARAMAGNETICĂ CU NANOPARTICULE: REZULTATE *IN VITRO*, *IN VIVO* ȘI TRIALURI CLINICE

- 2.1. Introducere
- 2.2. Hipertermia superparamagnetică *in vitro*
- 2.3. Hipertermia superparamagnetică *in vivo*
- 2.4. Hipertermia superparamagnetică în trialuri clinice
- 2.5. Concluzii

### PARTEA SPECIALĂ

#### CAPITOLUL 3. CONTRIBUȚII PRIVIND PUTEREA SPECIFICĂ DISIPATĂ MAXIMĂ ÎN HIPERTERMIA SUPERPARAMAGNETICĂ CU NANOPARTICULE SPION BIOCOMPATIBILE DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ DECORATE CU $\gamma$ -CICLODEXTRINE PENTRU TERAPIA ALTERNATIVĂ A CANCERULUI

- 3.1. Introducere și obiectivele de studiu
- 3.2. Considerații teoretice privind puterea specifică disipată în cazul nanoparticulelor magnetice biocompatibile dispersate într-un lichid
- 3.3. Rezultate și discuții
  - 3.3.1. Nanoparticulele biocompatibile de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  decorate cu  $\gamma$ -CDs și dispersate în lichid, pentru eliminarea toxicității și creșterea eficienței în hipertermia superparamagnetică
  - 3.3.2. Puterea specifică disipată maximă în cazul nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  decorate cu  $\gamma$ -CDs și dispersate în lichid
  - 3.3.3. Efectul amplitudinii și frecvenței câmpului magnetic asupra puterii specifice disipate maxime în nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs
    - 3.3.3.1. Efectul amplitudinii câmpului magnetic
    - 3.3.3.2. Efectul frecvenței câmpului magnetic

- 3.3.4. Puterea specifică disipată maximă în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs biocompatibile, în condiții optime pentru frecvența limită admisibilă

#### CAPITOLUL 4. CONTRIBUȚII PRIVIND HIPERTERMIA SUPER-PARAMAGNETICĂ CU NANOPARTICULE SPION BIOCOMPATIBILE DE $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs PENTRU APLICAREA ÎN TERAPIA ALTERNATIVĂ A CANCERULUI

- 4.1. Introducere și obiectivele de studiu
- 4.2. Calculul 3D a puterii specifice disipate în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule ‘core-shell’ de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs dispersate în soluție salină
- 4.3. Rezultate și discuții
- 4.3.1. Nanoparticule ferimagnetice de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs pentru hipertermia superparamagnetică
- 4.3.2. Puterea specifică disipată în hipertermia superparamagnetică cu bionanoparticule de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs
- 4.3.3. Relaxarea magnetică Néel - Brown în cazul nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs
- 4.3.4. Influența amplitudinii câmpului magnetic asupra puterii specifice disipate maxime în cazul nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs în suspensie
- 4.3.5. Influența frecvenței câmpului magnetic asupra puterii specifice disipate maxime în cazul nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs în suspensie
- 4.3.6. Creșterea puterii specifice disipate maxime în hipertermia superparamagnetică cu bionanoparticule de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs în suspensie

#### CAPITOLUL 5. CONTRIBUȚII PRIVIND CREȘTEREA EFICACITĂȚII ÎN HIPERTERMIA SUPERPARAMAGNETICĂ CU NANOBIOCONJUGATE INOVATIVE SPION BIOCOMPATIBILE DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) PENTRU TERAPIA ALTERNATIVĂ A CANCERULUI FĂRĂ TOXICITATE

- 5.1. Introducere și obiectivele de studiu
- 5.2. Materiale și metode
- 5.2.1. Materiale, metode și tehnici de analiză și caracterizare a nanoparticulelor ferimagnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și nanobioconjugatelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs pentru utilizarea în terapia alternativă a cancerului prin hipertermie superparamagnetică
- 5.2.2. Metoda de studiu computațional pentru puterea specifică disipată în hipertermia superparamagnetică cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)
- 5.2.3. Sinteza și tehnici de caracterizare ale nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)
- 5.2.4. Materiale și metode pentru studiile experimentale *in vitro*
- 5.2.4.1. Linia celulară și condițiile pentru cultura celulară
- 5.2.4.2. Analiza MTT în condiții standard
- 5.2.4.3. Protocolul pentru hipertermia superparamagnetică *in vitro*
- 5.2.5. Hipertermia superparamagnetică experimentală
- 5.3. Rezultate și discuții
- 5.3.1. Studiu computațional privind stabilitatea nanobiostructuri de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) și puterea specifică disipată de aceasta în hipertermia superparamagnetică
- 5.3.2. Obținerea nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) și caracterizarea lor prin XRD, FT-IR și DLS
- 5.3.3. Determinarea mărimii și distribuției nanoparticulelor magnetice prin microscopie electronică de transmisie de înaltă rezoluție (HR-TEM)

- 5.3.4. Magnetizarea nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) în câmp magnetic exterior și determinarea mărimilor magnetice caracteristice pentru hipertermia superparamagnetică
- 5.3.5. Viabilitatea celulară în condiții standard a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)
- 5.3.6. Hipertermia superparamagnetică *in vitro* cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) biocompatibile
  - 5.3.6.1. Hipertermia superparamagnetică experimentală cu nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA: diagrama de temperatura T-t în condiții calorimetrice
  - 5.3.6.2. Hipertermia superparamagnetică în cultura celulară cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs): diagrama de temperatură T-t în condiții *in vitro*
  - 5.3.6.3. Viabilitatea celulelor HaCaT după aplicarea hipertermiei superparamagnetice *in vitro*

## CAPITOLUL 6. CONTRIBUȚII PRIVIND TERAPIA EFICIENTĂ *IN VITRO* A CANCERULUI MAMAR MCF-7 PRIN HIPERTERMIA SUPERPARAMAGNETICĂ CU NANOBIOCONJUGATE INOVATOARE SPION DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)

- 6.1. Introducere și obiectivele de studiu
- 6.2. Materiale și metode pentru experimentele de hipertermie superparamagnetică *in vitro* adresate terapiei adenocarcinomului mamar uman MCF-7
  - 6.2.1. Linia celulară de cancer MCF-7
  - 6.2.2. Protocolul pentru hipertermia superparamagnetică *in vitro* în cazul celulelor tumorale de adenocarcinom mamar uman MCF7
  - 6.2.3. Testarea prin tehnica Alamar Blue
  - 6.2.4. Experimentul de hipertermie superparamagnetică
  - 6.2.5. Reprezentarea datelor și analiza statistică
- 6.3. Rezultate experimentale și discuții
  - 6.3.1. Efectul câmpului magnetic asupra viabilității celulelor canceroase mamare MCF-7
  - 6.3.2. Terapia adenocarcinomului mamar uman MCF-7 prin hipertermie superparamagnetică cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)
  - 6.3.3. Analiza viabilității celulare a adenocarcinomului mamar uman MCF-7 după terapia prin hipertermie superparamagnetică (SPMHT)
- 6.4. Concluzii

## CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

## BIBLIOGRAFIE

## ANEXE

## REZUMAT

Teza de doctorat, având titlul "*Terapia alternativă, neinvazivă și fără toxicitate a cancerului mamar prin hipertermie superparamagnetică cu nanoparticule biocompatibile SPION- $\gamma$ -ciclodextrine*", este un studiu de cercetare (v. cuprinsul lucrării) privind terapia alternativă a cancerului prin hipertermie superparamagnetică (SPMHT), utilizând nanoparticule magnetice SPION (nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetită) biocompatibilizate prin acoperirea cu gama-ciclodextrine ( $\gamma$ -CDs), ca tehnică *neinvazivă*, mai eficientă și fără toxicitate, comparativ cu tehnicile convenționale utilizate astăzi pe scară largă în acest domeniu, chimio- și radioterapia, care au un grad ridicat de toxicitate asupra organismului și în multe cazuri sunt ineficiente în tratarea cancerului. Această metodă este una alternativă la chimio- și radioterapie, și este neinvazivă și non-toxică prin utilizarea unui câmp magnetic alternativ de amplitudine mică, cu frecvența în domeniul sutelor de kHz, și a nanoparticulelor magnetice de oxid de fier (SPION) biocompatibile, având mare potențial în terapia viitoare a cancerului fără radiații și fără citostatice, așa cum arată studiile actuale în acest domeniu, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, și chiar debutul din trialurile clinice.

Pentru testarea *in vitro* a acestei terapii alternative am ales cancerul mamar, datorită incidenței lui crescute în rândul populației la femei și a gradului ridicat de mortalitate, conform Organizației Mondiale a Sănătății.

Tema abordată este de mare actualitate în domeniul terapiei *alternative* a cancerului, și poate fi metoda viitorului în tratarea cancerului, conform opiniilor cercetătorilor din domeniu, tocmai datorită caracterului său neinvaziv, netoxic și al eficacității crescute în distrugerea celulelor tumorale, ajungându-se în unele experimente *in vitro* și *in vivo* chiar până la distrugerea completă a tumorii prin utilizarea unui efect termic natural în terapie: creșterea temperaturii în tumoră la 42-43 °C sub acțiunea câmpului magnetic, ceea ce duce la distrugerea ireversibilă a celulelor canceroase prin apoptoză.

Această temă se încadrează în cercetările mondiale actuale avansate din domeniul cancerului și, totodată, în preocupările științifice actuale ale grupului de cercetare în care am lucrat, concretizate recent și într-un proiect de cercetare PN-III (2019-2022), Proiect Experimental Demonstrativ (PED), PN-III-P2-2.1-PED-2019-3067, având ca titlu "*Nanobiostructuri inovatoare bazate pe nanoparticule ferimagnetice bioconjugate cu ciclodextrine pentru creșterea eficacității și reducerea toxicității în terapia cancerului prin hipertermie superparamagnetică*", coordonator Universitatea de Vest din Timișoara (director, Conf. Dr. Dr. Habil. Caizer Costică) și partener Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara (responsabil proiect partener, Prof. Dr. Șoica Codruța, colaborator Prof. Dr. Dehelean Cristina).

Teza de doctorat a avut ca *obiectiv general* al cercetării științifice studiul privind posibilitatea utilizării hipertermiei *superparamagnetice*, ca metodă *alternativă* și *neinvazivă*, în terapia cancerului

cu *eficiență crescută* și *fără toxicitate*, utilizând *nanoparticule magnetice SPION* biocompatibile de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bioconjugate cu gama-ciclodextrine ( $\gamma$ -CDs), iar ca *obiective operaționale*, pentru implementarea obiectivului general, următoarele:

- *creșterea eficienței* în hipertermia superparamagnetică pentru terapia cancerului, prin găsirea mărimii și concentrației nanoparticulelor magnetice SPIONs, a parametrilor câmpului magnetic alternativ exterior, a protocolului de aplicare și a duratei de tratament, cele mai potrivite pentru această terapie;
- *reducerea sau chiar eliminarea toxicității celulare* în această terapie, prin utilizarea nanoparticulelor SPIONs acoperite cu gama-ciclodextrine;
- *terapia in vitro a cancerului mamar*, cu eficacitate ridicată și fără toxicitate.

Astfel, prin acest studiu am urmărit:

- influența grosimii stratului organic de gama-ciclodextrine ( $\gamma$ -CDs) asupra puterii specifice disipate *maxime* în hipertermia superparamagnetică, care duce la încălzirea nanoparticulelor magnetice SPION la temperatura de terapie (42,5-43 °C), necesară pentru distrugerea celulelor tumorale prin apoptoză;
- găsirea condițiilor optime în care hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule de magnetită, biocompatibilizate prin decorarea suprafeței lor cu gama-ciclodextrine ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs), poate fi utilizată pentru a se obține eficacitatea maximă în distrugerea celulelor tumorale;
- determinarea puterii specifice disipate maxime generată în hipertermia superparamagnetică în cazul nanoparticule de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs (nanobiostructură 'core-shell' de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs);
- găsirea condițiilor în care puterea specifică disipată devine *maximă* în cazul nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs, în funcție de mărimea nanoparticulelor, grosimea stratului biocompatibil de la suprafața nanoparticulelor și parametrii câmpului magnetic alternativ;
- influența amplitudinii și frecvenței câmpului magnetic alternativ și a concentrației nanoparticulelor magnetice asupra puterii specifice disipate maxime în hipertermia superparamagnetică cu bionanoparticule SPION- $\gamma$ -CDs;
- utilizarea în hipertermia superparamagnetică a nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) (PAA - acid poliacrilic, HP- $\gamma$ -CDs - hidroxipropil gama-ciclodextrine) într-o structură hibridă 'core-shell' ('core' - nanoparticule anorganice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și 'shell' - stratul organic de PAA-(HP- $\gamma$ -CDs de la suprafața nanoparticulelor magnetice), cu caracteristici foarte bune de disipare a căldurii și de biocompatibilitate, pentru eficacitate maximă și toxicitate minimă;
- găsirea caracteristicilor fizico-chimice potrivite pentru nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pentru a forma suspensii magnetice stabile și a fi adecvate pentru hipertermia superparamagnetică, utilizând simularea computațională 3D pentru evaluarea puterii specifice disipate (SLP, Specific Loss Power) maxime, care duce la încălzirea nanoparticulelor magnetice;

- obținerea hipertermiei superparamagnetice, atât în condiții adiabactice, cât și *in vitro*, utilizând nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) ca probe magnetice;
- evaluarea profilului biologic al nanoparticulelor magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), atât în condiții standard (37 °C), cât și induse de hipertermia magnetică (43 °C), utilizând un model *in vitro* bazat pe celulele umane sănătoase HaCaT (keratinocite umane) și folosirea celei mai consacrate tehnici de evaluare a toxicității celulare *in vitro* – analiza MTT (test colorimetric pentru evaluarea activității metabolice celulare);
- găsirea limitei biologice maxime admisibilă pentru câmpul magnetic alternativ exterior, fără afectarea celulară, pentru care hipertermia superparamagnetică poate fi aplicată în siguranță *in vitro*;
- stabilirea protocolului pentru aplicarea în siguranță *in vitro* a hipertermiei superparamagnetice cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs);
- aplicarea hipertermiei superparamagnetice *in vitro* cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pentru terapia eficientă a celulelor canceroase de adenocarcinom mamar uman (MCF-7).

Pentru atingerea obiectivelor propuse în cercetarea din domeniul tezei am studiat mai întâi teoretic (computațional), utilizând un soft profesional cu reprezentare 3D prin simularea condițiilor reale experimentale, condițiile în care poate fi obținută puterea maximă disipată în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule SPION de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -ciclodextrine ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs), care să ducă apoi la încălzirea eficientă a nanoparticulelor magnetice la temperatura de 42,5 °C, necesară pentru terapia tumorilor. Rezultatele preliminare obținute în această etapă (capitolele 3-4) au fost extrem de utile și au fost folosite ulterior pentru partea experimentală (capitolele 5-6), privind realizarea eficientă a hipertermiei superparamagnetice *in vitro* cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pentru terapia tumorilor mamare MCF-7 (adenocarcinom mamar uman), întrucât prin studiu teoretic am stabilit condițiile care trebuie realizate experimental pentru a se obține hipertermia magnetică cu eficacitate maximă.

Teza de doctorat este structurată pe 6 capitole, o introducere și concluzii (ca un alt capitol distinct, care conține și contribuțiile personale ale doctorandei).

Primele două capitole, având titlurile „*Metode și tehnici actuale pentru terapia alternativă a cancerului*” și „*Hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule magnetice SPMNP ca metodă alternativă și neinvazivă în terapia cancerului: rezultate in vitro, in vivo și trialuri clinice*”, conțin partea generală a tezei, fiind o sinteză documentată referitoare la problematica cercetării în domeniul hipertermiei magnetice/ superparamagnetice, ca metodă *alternativă* pentru terapia cancerului *in vitro* și *in vivo*, precum și stadiul actual în acest domeniu. Din aceste studii s-au desprins concluziile de mai jos, foarte importante pentru cercetarea viitoare.

Domeniul terapiei alternative a cancerului, mai ales nanomedicina cu nanoparticule magnetice, este unul în continuă dezvoltare și capătă tot mai mult interes comparativ cu metodele clasice, radio- și chimioterapia, care au un nivel ridicat de toxicitate. Dintre metodele alternative pentru terapia

cancerului, hipertermia superparamagnetică (SPMHT) s-a impus ca fiind cea mai potrivită pentru acest tip de terapie, datorită eficienței ei crescute privind puterea disipată și încălzirea nanoparticulelor magnetice, și a toxicității reduse, ca urmare a utilizării nanoparticulelor magnetice foarte mici (<15-20 nm) și a câmpurilor magnetice alternative armonice de amplitudine redusă (1-30 kA/m), cu frecvența în domeniul sutelor de kHz (100-500 kHz). Totuși, deși această metodă a evoluat mult în ultimele două decenii, rămân încă probleme care trebuie clarificate prin cercetare, înainte de a fi o terapie fezabilă pentru trialurile clinice, și de a fi aplicată apoi cu succes în terapia cancerului la om. Aceste probleme ar fi:

- (i) găsirea celor mai potrivite nanoparticule magnetice, ca tip (compoziție chimică), mărime, formă, și comportare magnetică, în termeni de eficiență în hipertermia superparamagnetică și toxicitate;
- (ii) biocompatibilitatea cea mai bună oferită de stratul organic de la suprafața nanoparticulelor magnetice, și stabilitatea nanoparticulelor în suspensie coloidală;
- (iii) biofuncționalizarea potrivită a nanoparticulelor magnetice pentru a avea și afinitate față de celulele tumorale;
- (iv) găsirea parametrilor potriviți pentru câmpul magnetic în SPMHT;
- (v) găsirea condițiilor *optime* pentru realizarea eficientă a SPMHT, a dozelor și timpilor de expunere la câmpul magnetic pentru acest tip de terapie;
- (vi) implementarea clinică a SPMHT, prin studii prealabile *in vitro*, *in vivo* și în final în trialurile clinice, cu eficacitate maximă asupra tumorilor și toxicitate minimă, sau chiar fără toxicitate.

Conform studiilor și rezultatelor obținute *in vitro*, *in vivo* și stadiului incipient din trialurile clinice, hipertermia superparamagnetică s-a dovedit a fi o metodă fezabilă ca și terapie alternativă și neinvazivă în tratarea cancerului, comparativ cu tehnicile convenționale (radio- și chimioterapie), care au un grad ridicat de toxicitate. Însă, în același timp, este nevoie de cercetări suplimentare în vederea standardizării metodei pentru aplicarea acesteia și cu eficacitate maximă în distrugerea celulelor tumorale, mai ales în cazul subiecților umani (în trialurile clinice), astfel încât să se poată elabora un protocol în vederea aplicării ei în terapiile clinice.

Următoarele patru capitole (capitolele 3-6) conțin metodologia și rezultatele cercetării obținute în cadrul tezei, atât teoretice (capitolele 3-4), cât și experimentale (capitolele 5-6). Fiecare dintre cele patru capitole cu rezultate începe cu o introducere documentată în problematica abordată în contextul cercetării internaționale actuale în domeniu, stabilindu-se totodată clar motivația și scopul/obiectivele studiului făcut.

Capitolul 3, intitulat „*Contribuții privind puterea specifică disipată maximă în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule SPION biocompatibile de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> decorate cu γ-ciclodextrine pentru terapia alternativă a cancerului*”, conține un studiu teoretic (compuțional 3D) referitor la puterea maximă disipată în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule SPION biocompatibile de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, decorate cu γ-ciclodextrine (γ-CDs), pentru terapia alternativă a cancerului, eficientă și fără toxicitate [223]. Acest studiu stabilește condițiile *optime* în care poate fi realizată hipertermia



superparamagnetică cu astfel de nanoparticule, prin studiul puterii specifice disipate maxime, pentru a se putea obține încălzirea eficientă a nanoparticulelor la temperatura de 42,5 °C necesară în hipertermia cancerului (distrugerea ireversibilă a celulelor tumorale prin apoptoză datorită temperaturii ridicate). Din acest studiu au rezultat aspectele de mai jos.

În hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule SPION de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs puterea specifică disipată este determinată, atât de procesele de relaxare magnetic Néel, cât și de procesele de relaxare Brown, ca urmare a stratului organic de la suprafața nanoparticulelor care determină un diametru hidrodinamic. Procesele de relaxare Néel sunt dominante la frecvențe mai mari, spre 400-500 kHz, iar la frecvențe mai joase, <150 kHz, ambele procese de relaxare Néel și Brown sunt prezente în proporții aproximativ egale.

Ca urmare a prezenței stratului de  $\gamma$ -CDs la suprafața nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , care contribuie semnificativ la maximul relaxării Brown la frecvențe mai joase, maximul puterii specifice disipate obținute în condiții optime pentru frecvența limită admisibilă în hipertermia superparamagnetică cu bionanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs se deplasează în intervalul de frecvențe 100-1000 kHz, de la diametrul nanoparticulelor de 18,1 nm la 100 kHz până la diametrul de 15,5 nm la 1000 kHz, deplasare care nu este influențată de mărimea câmpului magnetic.

Puterea specifică disipată maximă obținută în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs crește aproximativ liniar, atât cu creșterea câmpului magnetic în intervalul 5-50 kA/m, cât și cu creșterea frecvenței în intervalul 100-500 kHz.

La frecvențe mai joase de 250 kHz, datorită prezenței relaxării Brown, hipertermia magnetică se poate obține într-un domeniu mai larg de valori pentru diametrele nanoparticulelor, acesta extinzându-se de la 16,9 nm până spre 25-30 nm. Deși puterea specifică disipată maximă scade la aceste valori mai mari ale diametrelor, aceasta este încă suficientă pentru încălzirea nanoparticulelor la temperatura optimă de 42,5-43 °C necesară pentru distrugerea celulelor tumorale prin apoptoză.

Pentru diametre mai mari de 18,5-19 nm, hipertermia magnetică se obține exclusiv prin procesele de relaxare Brown, procesele de relaxare Néel fiind neglijabile în acest domeniu al mărimii nanoparticulelor. Acesta este un avantaj major în practică, în cazul real al existenței distribuțiilor mărimilor nanoparticulelor, care se obține de regulă prin metodele de preparare ale nanoparticulelor, întrucât diametrul nanoparticulelor în acest caz nu mai este un parametru *critic* și, deci, nu mai trebuie să aibă o valoare strictă (ex. valoarea de 17,1 nm la frecvența de 200 kHz pentru a se obține puterea disipată *maximă*). Astfel, la frecvențe joase pot fi utilizate practic distribuții largi ale mărimilor nanoparticulelor pentru obținerea hipertermiei magnetice prin relaxare Brown.

În condiții *optime* și pentru limita biologică admisibilă pentru câmp și frecvența, puterea specifică disipată maximă în hipertermia superparamagnetică cu bionanoparticule  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs se obține pentru câmpul magnetic din intervalul 10-25 kA/m și frecvența din intervalul 200-500 kHz, la diametrele nanoparticulelor cuprinse în domeniul 16,2-17,1 nm.

Acest studiu [223] permite implementarea practică a hipertermiei superparamagnetice în condiții *optime*, utilizând nanoparticulele SPION biocompatibile, de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs), pentru obținerea eficienței maxime și lipsei toxicității celulare.

Urmărind obținerea terapiei hipertermice intracelulare (din interiorul celulelor), care este mai eficientă în distrugerea celulelor tumorale, în capitolul 4, intitulat „*Contribuții privind hipertermia superparamagnetică cu nanoparticule SPION biocompatibile de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs pentru aplicarea în terapia alternativă a cancerului*”, prezintă realizarea hipertermiei superparamagnetice cu nanoparticulele de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  acoperite cu  $\gamma$ -CDs, obținute prin substituirea ionului de  $\text{Fe}^{2+}$  din structura moleculei de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), cu ionul de  $\text{Co}^{2+}$ . Studiul făcut privind puterea specifică disipată care duce la încălzirea nanoparticulelor, și care este indicatorul de bază în stabilirea eficienței în hipertermia magnetică, a condus la rezultate deosebite și total diferite față de cele obținute în cazul nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs, cu potențial ridicat în terapia eficientă a cancerului, și fără toxicitate. Concluziile acestui studiu sunt redată în continuare.

Bionanoparticulele de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs pot fi utilizate cu succes în hipertermia superparamagnetică pentru terapia alternativă a cancerului ([279]) *in vitro* și *in vivo* și pe viitor în trialuri clinice, ca urmare a creșterii eficacității asupra tumorilor și non-toxicității asupra celulelor sănătoase.

Puterea specifică disipată în hipertermia superparamagnetică cu nanoparticulele de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs în suspensie se obține exclusiv prin procese de relaxare Brown, ceea ce duce la cel puțin următoarele beneficii pentru hipertermia magnetică:

- (i) existența diametrului nanoparticulelor care conduce la maximul puterii specifice disipate, într-un domeniu larg de valori  $\sim(9-14)$  nm (în funcție de amplitudinea și frecvența câmpului magnetic), concomitent cu creșterea semnificativă a puterii specifice disipate maxime (creșterea eficienței și eficacității în terapie); acest diametru din domeniul  $\sim(9-14)$  nm este mai potrivit pentru hipertermia superparamagnetică comparativ cu diametrul de  $\sim(6-6,5)$  nm obținut în cazul nanoparticulele de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  și al relaxării Néel;
- (ii) diametrul nanoparticulelor în acest caz nu mai este un parametru *critic* (ca în cazul relaxării Néel), aceasta fiind un avantaj major în implementarea practică a hipertermiei magnetice, printre care și utilizarea nanoparticulelor cu distribuții largi ale diametrelor;
- (iii) posibilitatea utilizării câmpurilor magnetice mai mari, nefiind o limitare la câmpuri magnetice mici, ca în cazul relaxării Néel, ceea ce duce practic la posibilitatea obținerii de puteri specifice disipate semnificativ mai mari în hipertermia superparamagnetică, cu efecte benefice în hipertermie.

Totuși, puterea specifică disipată maximă este indicat a fi obținută până spre frecvența maximă de 1000 kHz, unde apare un efect de saturație a puterii maxime, iar optim pentru domeniul  $\sim(200-500)$  kHz, depinzând în principal de amplitudinea câmpului magnetic.

Modificarea amplitudinii câmpului magnetic exterior schimbă radical valoarea diametrului optim, care dă maximul puterii specifice disipate în hipertermia superparamagnetică, în contrast cu cazurile când maximul puterii este determinat de relaxarea Néel, situație în care diametrul optim nu se schimbă.

Prezența  $\gamma$ -CDs la suprafața nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , pe lângă asigurarea biocompatibilității și non-toxicității celulare în hipertermia magnetică, și eliminarea interacțiunilor dintre nanoparticulele magnetice, care sunt beneficii majore în hipertermia magnetică, permite și creșterea semnificativă a fracției volumice de împachetare a nanoparticulelor (creșterea concentrației nanoparticulelor). Aceasta duce la creșterea semnificativă a puterii specifice disipate și a temperaturii de încălzire în acest caz (a eficienței în hipertermia magnetică), comparativ cu utilizarea altor bionanostructuri mai mari, de exemplu lipozomi (cu mărimea de zeci – sute de nm), care scad semnificativ eficiența în hipertermia magnetică.

Rezultatele obținute ([279]) permit implementarea practică în condiții *optime* a hipertermiei superparamagnetice utilizând bionanoparticule de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ - $\gamma$ -CDs, pentru creșterea eficienței și eficacității în terapia cancerului fără citotoxicitate.

Studiile teoretice prezentate în capitolele 3 și 4 constituie baza pentru studiile experimentale ulterioare, prezentate în capitolele 5 și 6, privind realizarea în condiții *optime* experimentale a hipertermiei superparamagnetice *in vitro* cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), pentru terapia eficientă și fără toxicitate a cancerului mamar MCF-7 (adenocarcinom mamar uman).

Astfel, în capitolul 5, având titlul „*Contribuții privind creșterea eficacității în hipertermia superparamagnetică cu nanobioconjugate SPION biocompatibile de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pentru terapia alternativă a cancerului fără toxicitate*” sunt prezentate rezultatele experimentale obținute în urma aplicării hipertermiei superparamagnetice cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) (PAA - acid poliacrilic, HP- $\gamma$ -CDs - hidroxipropil gama-ciclodextrină) asupra liniei celulare de keratinocite umane sănătoase HaCaT, care arată eficiența și non-toxicitatea metodei asupra celulelor sănătoase. Prin acest studiu s-au conturat concluziile de mai jos.

Nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), cu structură „core-shell”, având diametrul mediu al miezului magnetic (core) al nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $\sim 16$  nm, acoperite cu stratul organic subțire (shell) de PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), de  $\sim 2$  nm grosime, care asigură o foarte bună biocompatibilitate celulară după testarea făcută pe celulele umane sănătoase HaCaT (viabilitatea celulară în jurul valorii de 100 % pentru concentrații de până la 1 mg/mL), este nanobiostructura cea mai potrivită pentru a fi utilizată în hipertermia superparamagnetică a tumorilor, cu eficiență crescută și fără toxicitate ([345]).

Stratul organic de PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) de la suprafața nanoparticulelor magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , cu grosimea redusă, de numai  $\sim 2$  nm, pe lângă biocompatibilitatea foarte bună creată nanoparticulelor magnetice, permite și creșterea semnificativă (până la o eventuală limită superioară acceptabilă a

toxicității) a fracției volumice de împachetare a nanobioconjugatelor (concentrației), respectiv a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  în suspensia injectabilă, pentru obținerea hipertermiei superparamagnetice. Acesta va duce la o creștere semnificativă a puterii specifice disipate (SLP), și implicit a temperaturii de încălzire, concomitent cu reducerea duratei de încălzire până la valoarea optimă de  $\sim 42,5^\circ\text{C}$  utilizată în hipertermia tumorilor. Cu alte cuvinte, reducerea grosimii stratului organic biocompatibil de la suprafața nanoparticulelor magnetice până la limita acceptabilă de 1,5-2 nm, permite creșterea eficienței în obținerea efectului hipertermic în hipertermia superparamagnetică, comparativ cu cazul altor biostructuri mari (ex. lipozomi sau altele), unde eficiența este redusă.

Nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , având diametrul mediu de  $\sim 16$  nm, bioconjugate cu  $\gamma$ -CDs ramificate prin intermediul biopolimerului PAA ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs)), până la concentrație de 10 mg/mL în suspensie nu au toxicitate celulară, și, prin urmare, pot fi utilizate cu succes în hipertermia superparamagnetică, cu eficiență crescută.

În condițiile experimentale *in vitro* stabilite ca fiind optime, temperatura de  $42,5^\circ\text{C}$  necesară în hipertermia magnetică a tumorilor este atinsă într-un interval de timp relativ scurt, respectiv de numai 23 min., durată care nu afectează țesuturile sănătoase în terapie.

Aplicarea *in vitro* timp de 30 min. a hipertermiei superparamagnetice cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) și parametrii stabiliți pentru câmpul magnetic alternativ exterior la limita biologică admisibilă, nu afectează celulele sănătoase de keratinocite umane HaCaT (în suspensie); hipertermia superparamagnetică a fost obținută experimental în câmpul magnetic de 15,92 kA/m și frecvența de 312,2 kHz, pentru nanoparticule cu diametrul mediu al miezului magnetic de 15,8 nm, care dau efectul *hipertermic maxim*, ce duce la temperatura de  $42,5^\circ\text{C}$  necesară în terapia tumorilor într-un timp scurt, pentru a nu fi afectate celulele sănătoase.

Nanobioconjugatele ferimagnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pot fi utilizate *în siguranță* în hipertermia superparamagnetică (fără toxicitate) și cu eficiență ridicată, datorită existenței stratului organic de PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) de la suprafața nanoparticulelor magnetice, care este potrivit pentru această tehnică terapeutică. Evaluarea biologică arată că nu există citotoxicitate a nanoparticulelor  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA și nanobioconjugatelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) asupra celulelor HaCaT după un interval de 24 h, atât pentru condiții standard ( $37^\circ\text{C}$ ), cât și în condițiile de hipertermie magnetică ( $42,5^\circ\text{C}$ ).

Studiul făcut ([345]) stabilește condițiile în care poate fi aplicată *optim* și *în siguranță* hipertermia superparamagnetică *in vitro*, utilizând nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), mai eficient și fără toxicitate celulară, pentru a fi utilizată în terapia viitoare a cancerului.

În capitolul 6 sunt prezentate rezultatele experimentale obținute în urma aplicării *in vitro* a hipertermiei superparamagnetice cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) pentru terapia adenocarcinomului de sân uman MCF-7 (celule canceroase mamare umane). Rezultatele au

demonstrat eficacitatea ridicată în terapia cancerului mamar (95,11%) prin această metodă *alternativă, neinvazivă, și fără toxicitate*. Concluziile rezultate în urma acestui studiu sunt redată mai jos.

Terapia prin hipertermie superparamagnetică (SPMHT) cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), având diametrul mediu al nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $\sim 16$  nm și diametrul mediu hidrodinamic al nanobioconjugatelor de  $\sim 20$  nm, duce la distrugerea celulelor canceroase mamare MCF-7 prin apoptoză într-un procent foarte ridicat, de 95,11 % (viabilitatea celulară de 4,89 % comparativ cu condițiile standard), după 24 h de la tratament, în următoarele condiții: durata de terapie de 30 min., temperatura de terapie de 42,9 °C, câmpul magnetic alternativ armonic aplicat cu amplitudinea de 160 Gs (12,73 kA/m) și frecvența de 312,2 kHz, concentrația de 10 mg/mL a nanoparticulelor magnetice din nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) suspendate în mediul de cultură celular.

Eficacitatea foarte bună obținută în terapia cancerului mamar *in vitro*, prin aplicarea hipertermiei superparamagnetice utilizând nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs), se datorează condițiilor experimentale *optime* găsite de noi pentru realizarea terapiei SPMHT: mărimea optimă a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , concentrația eficientă a nanoparticulelor magnetice, utilizarea ciclodextrinelor ramificate HP- $\gamma$ -CDs fără toxicitate, pentru acoperirea nanoparticulelor magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , grosimea foarte redusă ( $\sim 2$  nm) a stratului organic de la suprafața nanoparticulelor magnetice SPION de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , mărimea și frecvența câmpului magnetic alternativ exterior potrivite și durata de terapie fără afectarea celulară ([223,345,414]).

Limita biologică maximă admisibilă pentru câmpul magnetic aplicat, fără afectare celulară, poate fi extinsă semnificativ, la valoarea de  $H \times f \sim 9,5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{Hz}$  în cazul celulelor mamare MCF-7, limită care este dublă față de cea cunoscută până acum ( $5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{Hz}$ ) în experimentele de hipertermie magnetică. Rezultatul obținut este foarte important pentru implementarea practică a hipertermiei superparamagnetice (SPMHT) *in vitro* și, pe viitor, *in vivo*, deoarece permite creșterea semnificativă a câmpului magnetic care poate fi utilizat *în siguranță*. Totodată, aceasta permite reducerea semnificativă și a concentrației nanoparticulelor magnetice ce va fi utilizată în terapia prin hipertermie superparamagnetică, cu efect benefic major asupra eliminării citotoxicității în această terapie.

Procentul de distrugere a celulelor canceroase scade ușor după aplicarea hipertermiei superparamagnetice atunci când concentrația nanoparticulelor magnetice scade de la 10 mg/mL la 5 mg/mL și, respectiv, 1 mg/mL, și anume: la 90,91 % (viabilitate celulară de 9,09 %) și, respectiv, 88,68 % (viabilitate celulară de 11,32 %), rămânând însă procente la niveluri destul de ridicate.

Totuși, și în aceste cazuri terapia anticancer prin hipertermia superparamagnetică poate rămâne la fel de eficientă ca în cazul concentrației de 10 mg/mL, prin repetarea ședinței de terapie după 24 h, sau chiar creșterea duratei de terapie peste 30 min., cât s-a utilizat în experiment. Astfel, eficacitatea distrugerii celulelor canceroase ar putea fi crescută chiar până la 100 %.

Teza se încheie cu concluziile care conțin rezultatele semnificative obținute în urma studiului făcut, fiind punctate totodată și contribuțiile personale, originale, ale doctorandei.

În încheiere, ca și *concluzie finală* se poate spune că hipertermia superparamagnetică cu nanobioconjugate de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) este o tehnică neinvazivă, viabilă pentru terapia alternativă eficientă și fără toxicitate a cancerului mamar *in vitro* ([414]).

În plus, rezultatele obținute arată viabilitatea hipertermiei superparamagnetice cu nanobioconjugatele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) în terapia alternativă cancerului. Totodată, rezultatele obținute deschid noi direcții de cercetare, cum ar fi terapia și pentru alte tipuri de cancere *in vitro* (cu incidență crescută în rândul populației și grad ridicat de mortalitate, cum ar fi: melanomul malign, cancerul de prostată, glioblastomul etc.) și apoi *in vivo*, pe model animal, și în perspectivă în trialurile clinice la om.

Referințe pentru concluziile menționate în rezumatul tezei:

[223] Caizer C, Caizer IS. Study on maximum specific loss power in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles decorated with biocompatible gamma-cyclodextrins for cancer therapy with superparamagnetic hyperthermia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22, 10071.

[279] Caizer IS, Caizer C. Superparamagnetic hyperthermia study with cobalt ferrite nanoparticles covered with  $\gamma$ -cyclodextrins by computer simulation for application in alternative cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23, 4350.

[345] Caizer C, Caizer IS, Racoviceanu R, Watz CG, Mioc M, Dehelean CA, Bratu T, Soica C.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAA-(HP- $\gamma$ -CDs) Biocompatible Ferrimagnetic Nanoparticles for Increasing the Efficacy in Superparamagnetic Hyperthermia. *Nanomaterials*. 2022; 12, 2577.

[414] Caizer C, Caizer-Gaitan IS, Watz CG, Dehelean CA, Bratu T, Soica C. High Efficacy on the Death of Breast Cancer Cells Using SPMHT with Magnetite Cyclodextrins Nanobioconjugates. *Pharmaceutics*. 2023; 15(4):1145.

[87] Caizer C, Dehelean C, Coricovac DE, Caizer IS, Soica C. Magnetic nanoparticles nanoformulations for alternative therapy of cancer by magnetic/ superparamagnetic hyperthermia. In: *Nanoformulations in Human Health*; Talegaonkar S, Rai M. (Eds.), Springer, Berlin/Heidelberg, Germany. 2020.