Universitatea Națională de Științe și Tehnologie
Politehnica București

Școala Doctorală Inginerie Chimică și Biotehnologii

Rezumat Teză Doctorat

Biomateriale polimerice cu aplicații speciale

Autor

Ing. ION (căs. MIRICĂ) Andreea-Cristina

Conducător științific

Prof. Dr. Ing. Horia IOVU

București
2025

Mulțumiri

Doresc să îmi exprim cea mai profundă recunoștință față de coordonatorul meu, Prof. Horia Iovu, pentru îndrumarea necontenită, încurajarea și perspectivele valoroase oferite pe parcursul studiilor mele doctorale. De asemenea, îi mulțumesc pentru privilegiul de a-mi desfășura cercetarea în cadrul Grupului de Materiale Polimerice Avansate (APMG).

Îmi exprim recunoștința față de membrii comisiei mele de doctorat, Prof. Sorina Gârea și Prof. Paul Stănescu, pentru feedback-ul constructiv și expertiza lor, cu o mențiune specială pentru Prof. Cătălin Zaharia. Sprijinul său constant, răbdarea, inspirația și sfaturile valoroase au fost esențiale nu doar în timpul studiilor de masterat, ci și pe parcursul doctoratului meu.

Mulțumirile mele se îndreaptă către toți colegii și membrii Grupului de Materiale Polimerice Avansate pentru colaborarea și contribuțiile lor prețioase, care au îmbogățit semnificativ această lucrare. Aș dori să îi adresez mulțumiri speciale lui Ionuț Radu, a cărui mentorat a fost esențial în conturarea direcției cercetării și dezvoltării mele academice.

Sunt, de asemenea, recunoscătoare Lect. Iuliana Biru pentru măsurătorile RAMAN, Dr. Minodora Marin pentru analiza de dicroism circular, precum și Dr. Bianca Gălățeanu și Dr. Ariana Hudiță de la Facultatea de Biologie, Universitatea din București, pentru ajutorul lor generos în realizarea testelor biologice.

Doresc să le mulțumesc membrilor grupului de cercetare în care activez în prezent pentru încrederea și îndrumarea științifică oferită, în special Dr. Dana Stan și Dr. Lorena Bocancia-Mateescu, care mi-au oferit șansa de a-mi continua activitatea de cercetare. Astfel, am avut oportunitatea de a-mi extinde aria de cunoștințe, studiind și utilizând infrastructura disponibilă în cadrul DDS Diagnostic, ceea ce a fost esențial în obținerea rezultatelor prezentate în ultimul capitol al contribuțiilor originale din această teză.

Cu profundă apreciere, îmi exprim sincera recunoștință față de familia și prietenii mei dragi. Încurajarea voastră neclintită și sprijinul vostru constant au fost piatra de temelie a parcursului meu academic. Îi mulțumesc din suflet lui Adrian, soțul meu, pentru sprijinul, înțelegerea și dragostea oferite în această perioadă și pentru că a fost un pilon de susținere constant în viața mea.

Cuprins

CAPITOLUL 1. Studiul de literatură 7

1.1 Sisteme de eliberare a medicamentelor 7

1.1.1 Avantajele și limitările sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor 10

1.1.2 Sisteme de eliberare a medicamentelor responsive la stimuli 11

1.2 Materiale 13

1.2.1 Particule și nanoparticule polimerice 14

1.2.2 Fibroina din mătase naturală 21

1.2.3 Electrozi serigrafiați 27

1.3 Patogeneza cancerului și abordările terapeutice 32

1.3.1 5-Fluorouracil 34

1.3.2 Cisplatina 36

1.3.3 Bleomicina 36

Studiul experimental

CAPITOLUL 2. Dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină PEGilate pentru sisteme de eliberare a medicamentelor și studiile *in vitro* ale acestora pentru chimioterapia cu 5-fluorouracil în cancerul colorectal 39

2.1 Dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină PEGilate 40

2.1.1 Materiale și metode 40

2.1.2 Dezvoltarea soluției de fibroină 40

2.1.3 Dezvoltarea soluției de fibroină modificată cu acid acrilic 41

2.1.4 Dezvoltarea soluției de fibroină moficicată cu PEG 41

2.1.5 Dezvoltarea nanoparticulelor SF-PEF 41

2.1.6 Calea către pregătirea nanoparticulelor 41

2.1.7 Tehnici de investigare 43

2.1.7.1 Spectroscopia FTIR 43

2.1.7.2 Spectrometria RAMAN 43

2.1.7.3 Difuzia dinamica a luminii DLS 43

2.1.7.4 Microscopia electronică de baleiaj (SEM) 43

2.1.7.5 Teste de eliberare 43

2.1.8 Resultate și discuții 43

2.1.8.1 Spectroscopia FTIR 43

2.1.8.2 Spectrometria RAMAN 46

2.1.8.3 Difuzia dinamica a luminii DLS 47

2.1.8.4 Microscopia electronică de baleiaj (SEM) 48

2.1.8.5 Teste de eliberare 49
2.1.9 Concluzii 50
2.2 Studiile *in vitro* ale nanoparticulelor pentru chimioterapia cu 5-fluorouracil în cancerul colorectal 50
2.2.1 Materiale 51
2.2.2 Metode 51
2.2.2.1 Formularea și caracterizarea nanoparticulelor de fibroină de mătase PEGilate cu 5-FU. 51
2.2.2.2 Culturi celulare și design-ul experimental 52
2.2.2.3 Evaluarea concentrației inhibitorii la jumătate din maxim (IC_{50}) 52
2.2.2.4 Evaluarea citotoxicității *in vitro* 52
2.2.2.5 Teste de migrație și invazie celulară *In vitro* 54
2.2.2.6 Studiul nivelurilor de proteină TNF-α 55
2.2.2.7 Interacția sângelui cu nanoparticulele modificate de fibroină încărcate cu medicamente 55
2.2.2.8 Analiză statistică 56
2.2.3 Resultate și discuții 56
2.2.3.1 Formularea și caracterizarea nanoparticulelor de fibroină de mătase PEGilate cu 5-FU. 56
2.2.3.2 Evaluarea concentrației inhibitorii la jumătate din maxim (IC50) 58
2.2.3.3 Evaluarea citotoxicității *in vitro* 59
2.2.3.4 Teste de migrație și invazie celulară *In vitro* 62
2.2.3.5 Studiul nivelurilor de proteină TNF-α 62
2.2.3.6 Interacția sângelui cu nanoparticulele modificate de fibroină încărcate cu medicamente 63
2.2.4 Concluzii 65
2.3 Concluzii Capitol 2 66
CAPITOL 3. Sistem de eliberare țintită pentru tractul gastrointestinal bazat pe nanoparticule de fibroină modificate la suprafață 68
3.1 Materiale 68
3.1.2 Obținerea soluției de fibroină (SF) 68
3.1.3 Obținerea nanoparticulelor de fibroină 69
3.1.4 Activarea agentului de cuplare 69
3.1.5 Obținerea SF-BOC 69
3.1.6 Obținerea BOC-SF neprotejat (Amino-BOC-SF) 69
3.1.7 Obținerea platformei (SF-BOC-SF) 69
3.1.8 Obținerea formulării orale (Capsulă chitosan) 70
3.2 Metode 70

3.2.1 Caracterizare fizico-chimică cu FT-IR 70
3.2.2 Caracterizare fizico-chimică cu XPS 70
3.2.3 Evaluarea structurală utilizând spectroscopie de dichroism circular (CD) 70
3.2.4 Evaluarea morfologică prin imagistică SEM 71
3.2.5 Măsurători ale eliberării medicamentului 71
3.2.6 Testări de biocompatibilitate *In vitro* 71
3.3 Rezultate și discuții 73
3.3.1 Căi de reacție de cuplare chimică 73
3.3.2 Caracterizare fizico-chimică cu FT-IR 74
3.3.3 Caracterizare fizico-chimică cu XPS 75
3.3.4 Evaluarea structurală utilizând spectroscopie de dichroism circular (CD) 76
3.3.5 Evaluarea morfologică prin imagistică SEM 77
3.3.6 Măsurători ale eliberării medicamentului 78
3.3.7 Testări de biocompatibilitate In vitro 81
3.4 Concluzii 82
3.5 Concluzii generale ale Capitolului 3 83
CAPITOLUL 4. Dezvoltarea biosenzorilor electrochimici pentru detectarea și cuantificarea medicamentelor antineoplazice 85
4.1 Metoda optimă de curățare a electrozilor serigrafiați 85
4.1.1 Materiale 86
4.1.2 Metode 86
4.1.3 Resultate 87
4.1.3.1 Curățarea chimică a electrozilor serigrafiați 87
4.1.3.2 Curățarea electrochimică a SPE utilizând potențial negativ 93
4.1.3.3 Analiza SEM 95
4.1.3.4 EDX 97
4.1.4 Discuții și concluzii 98
4.2 Senzori pe bază de electrozi serigrafiați pentru detecția electrochimică a cisplatinei și bleomicinei în probe de ser 101
4.2.1 Materiale 101
4.2.2 Metode 101
4.2.2.1 Modificarea electrozilor din aur pentru detecția de cisplatină 102
4.2.2.2 Modificarea electrozilor serigrafiați pentru decția de bleomicină 103
4.2.3 Rezultate și discuții 103
4.2.3.1 Detecția și cuantificarea elecrochimicp a cisplatinei din ser sintetic 103

4.2.3.2 Dezvoltarea senzorului electrochimic pentru detecția bleomicinei 109
4.2.4 Concluzii 112
4.3 Concluzii generale ale Capitolului 4 112
CAPITOLUL 5. Concluzii generale 114
Diseminare 116
Lista de abrevieri 118
Bibliografie 120

Cuvinte cheie: eliberare controlată, fibroină, nanoparticule, detecție electrochimică, biosenzori, medicamente antineoplazice

CAPITOLUL 1. Studiul de literatură

1.1 Sisteme de eliberare a medicamentelor

Eliberarea medicamentelor este procesul de transport al compușilor farmaceutici către anumite locații din organism, cu scopul de a obține efecte terapeutice direcționate, minimizând în același timp efectele secundare și realizând o distribuție țintită și/sau o eliberare controlată a substanțelor active. Sistemele de eliberare a medicamentelor (DDS) au fost studiate intensiv de-a lungul anilor pentru a crește eficacitatea terapeutică prin îmbunătățirea considerabilă a modului în care medicamentele interacționează cu organismul, prin relația farmacocinetică-farmacodinamică (PK-PD). Pentru a depăși limitările legate de solubilitatea medicamentelor, biodisponibilitate, durata de circulație, răspunsul imun și pentru a realiza o țintire selectivă, DDS utilizează adesea vehicule pentru transportul substanțelor active. Vehiculele optime pentru livrarea medicamentelor ar trebui să fie sigure pentru sistemele biologice, biodegradabile, personalizabile și capabile să vizeze anumite afecțiuni [1]. Progresele în mecanismele de eliberare terapeutică au fost implementate pentru a remedia o serie de probleme critice ale metodelor tradiționale. Aspecte esențiale, precum solubilitatea redusă a medicamentelor, controlul precis al eliberării substanțelor active și prelungirea perioadei de circulație, trebuie soluționate. În plus, se depun eforturi pentru reducerea toxicității și diminuarea imunogenicității [2-4], deoarece acestea sunt direct legate de afectarea nespecifică a țesuturilor sănătoase [5, 6]. Obținerea unui răspuns terapeutic optim depinde de utilizarea unor tehnici adecvate de livrare a medicamentelor.

1.2 Materiale

Progresele rapide în ingineria la scară nano din ultimele decenii au adus o perspectivă revoluționară în tratamentul afecțiunilor cronice, în special al cancerului, prin utilizarea nanostructurilor cunoscute sub numele de nanoparticule. Acest cadru conceptual oferă un potențial semnificativ pentru transformarea tehnicilor de administrare a medicamentelor. Recent, s-a propus optimizarea eficacității terapeutice prin administrarea controlată și multiplă a medicamentelor, în contrast cu tratamentele convenționale. Atât polimerii sintetici, cât și cei naturali sunt utilizați în livrarea medicamentelor [40, 41]. În comunitatea științifică, nanotehnologia este adesea considerată știința esențială a noului mileniu. Operând la dimensiuni nanometrice (1-100 nm), nanotehnologia presupune manipularea controlată a materialelor. Acest interval dimensional găzduiește numeroase elemente biologice fundamentale implicate în diverse procese ale organismelor vii. Vehicule special concepute în această gamă de dimensiuni au fost dezvoltate, incluzând nanoparticule, dendrimeri și nanotuburi [42]. Nanoparticulele, care pot apărea sub formă de nanocapsule sau nanosfere, joacă un rol esențial în țintirea și eliberarea controlată a principiilor active, cum ar fi medicamentele, hormonii și vitaminele.

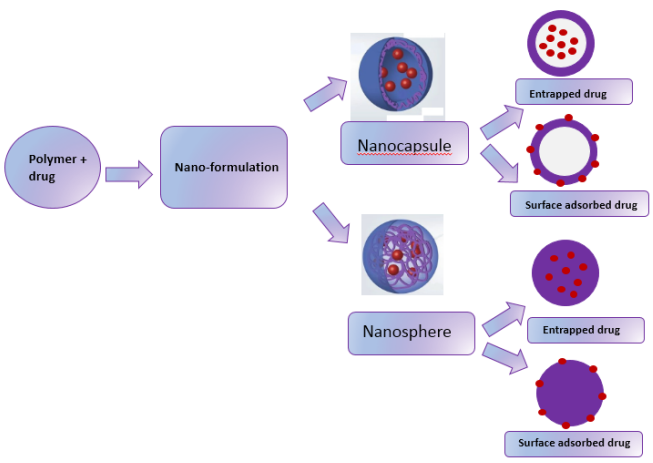


Fig. 1 Tipuri de nanoparticule biodegradabile: nanocapsule și nanosfere

Mătasea se remarcă drept o fibră naturală impresionantă, caracterizată prin proprietăți unice ca biomaterial polimeric. Datorită proprietăților sale structurale distincte, capacității de auto-asamblare, integrității structurale, proprietăților mecanice bune, flexibilității în procesare, degradabilității biologice și biocompatibilității, mătasea este un material versatil [60].

Mătasea obținută din specia de viermi de mătase *Bombyx mori* este alcătuită în principal din două proteine bine cunoscute: fibroina și sericina. Fibroina este proteina structurală responsabilă de rezistența și elasticitatea mătăsii și este cea mai studiată proteină a acesteia. Ea este formată din două componente fundamentale: fibroina cu lanț ușor (aproximativ 25 kDa) și fibroina cu lanț greu (aproximativ 325 kDa) [64]. Lanțul greu conține o secvență centrală cu repetiții de alanină-glicină. În structura coconilor de viermi de mătase, fibroina este înconjurată de un strat de sericină, o proteină adezivă care contribuie la formarea fibrelor compozite din cocon. Sericina acționează ca un adeziv, legând diferitele straturi ale fibrei continue de mătase. Proprietățile fizice și chimice ale fibroinei de mătase, inclusiv durabilitatea excepțională, rezistența chimică, proprietățile antimicrobiene, precum și flexibilitatea și alungirea limitată, se datorează în principal structurii sale cristaline.

Electrozii serigrafiați (SPEs) sunt dispozitive care măsoară reacțiile chimice prin proprietățile electrice și sunt fabricați prin imprimarea unor cerneluri conductoare pe diverse materiale suport (plastic, oxid de aluminiu sau substraturi ceramice). Acești electrozi permit o analiză rapidă, în timp real, caracterizată prin parametri ridicați utilizați pentru evaluarea performanței testelor. Performanța electrodului depinde de compoziția cernelurilor utilizate în procesul de fabricație, iar variante precum carbonul, argintul, aurul și platina influențează aceste proprietăți [93].

1.3 Patogeneza cancerului și abordări terapeutice

Cancerul se numără printre principalele cauze de deces la nivel global, cu aproximativ 10 milioane de decese raportate în 2020 [113]. Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), cele mai frecvent diagnosticate tipuri de cancer sunt: cancerul de sân (2,26 milioane de cazuri), cancerul pulmonar (2,21 milioane de cazuri), cancerul colorectal (1,93 milioane de cazuri), cancerul de prostată (1,41 milioane de cazuri), cancerul de piele non-melanom (1,20 milioane de cazuri) și cancerul gastric (1,09 milioane de cazuri) [114].

Nu există o strategie universală de tratament aplicabilă tuturor pacienților oncologici. Pentru fiecare persoană diagnosticată cu cancer, este esențială dezvoltarea unui tratament personalizat, conceput pentru a maximiza rezultatele și a minimiza efectele adverse. Această abordare poate include diverse opțiuni terapeutice, precum chimioterapia, imunoterapia, terapia hormonală, radioterapia, administrarea de medicamente, intervențiile chirurgicale și participarea la studii clinice, în funcție de tipul și stadiul cancerului.

Fluoropirimidina 5-fluorouracil (5-FU) este un medicament antineoplazic care acționează prin două mecanisme distincte împotriva celulelor canceroase: inhibarea proceselor biosintetice esențiale și interferarea cu sinteza ADN și ARN, ceea ce duce la întreruperea diviziunii și dezvoltării normale a celulelor [152]. Acest agent chimioterapeutic antimetabolit este utilizat pe scară largă în tratamentul diferitelor tumori maligne, inclusiv a cancerului de sân, colon, pancreas, stomac, piele, precum și a cancerelor de cap și gât. În ciuda progreselor în terapiile oncologice moderne, 5-FU rămâne un element esențial în tratamentul cancerului

colorectal (CRC), fiind unul dintre cele mai eficiente și frecvent utilizate medicamente în schemele de chimioterapie combinată [153].

Medicamentele care conțin platină în structura lor chimică, precum cisplatina, sunt recunoscute ca agenți care inhibă proliferarea celulară și sunt utilizate în tratamentul diverselor tipuri de cancer, inclusiv testicular, ovarian, pulmonar și al gâtului. Mecanismul de acțiune propus al cisplatinei (cis-diamino-dicloroplatina II) implică pierderea unui ligand clorură și formarea de complexe cu acizii nucleici, dintre care aproximativ 60-65% sunt aducti intra-catena GG, 25-30% aducti AG, 5% GNG (unde N poate fi orice nucleotid) și doar 1-3% aducti inter-catena GG [182, 183]. Cisplatina pătrunde în celule prin difuzie și prin transportorii de cupru Ctr1 (SLC31A1) și Ctr2 (SLC31A2) [184].

Bleomicina este un antibiotic antineoplazic utilizat frecvent în chimioterapie pentru tratarea anumitor tipuri de cancer, inclusiv limfomul Hodgkin, cancerul testicular, carcinoamele cu celule scuamoase și unele forme de cancer ovarian. Acțiunea bleomicinei, un antibiotic glicopeptidic care determină clivajul ADN prin interacțiunea cu ioni de metale de tranziție, se crede că implică interacțiunea cu ADN-ul prin intermediul moietei sale terminale peptidice. Cu toate acestea, mecanismul exact nu este încă pe deplin elucidat. Unul dintre cele mai semnificative și potențial grave efecte adverse ale bleomicinei este toxicitatea pulmonară. Aceasta poate provoca leziuni la nivelul plămânilor, ceea ce duce la apariția fibrozei pulmonare [190].

Studiul experimental

Scopurile tezei și contribuțiile originale

Scopul tezei

Scopul acestei teze de doctorat se concentrează pe dezvoltarea unor noi sisteme de administrare a medicamentelor utilizând biopolimeri cu aplicații medicale. Aceste sisteme sunt formate din vehicule, precum nanoparticule, destinate transportului terapeutic, având ca obiectiv îmbunătățirea solubilității medicamentelor, reducerea toxicității, prelungirea timpului de circulație, restrângerea biodistribuției, atingerea unei țintiri specifice și diminuarea imunogenicității. Platformele farmaceutice recent dezvoltate urmăresc să soluționeze provocările asociate metodelor convenționale de administrare a medicamentelor în terapia cancerului. Această teză prezintă metodologiile utilizate pentru dezvoltarea sistemelor de administrare a medicamentelor, tehnicile de caracterizare aplicate și rezultatele obținute. În plus, include strategii privind funcționalizarea senzorilor electrochimici adaptați pentru detectarea medicamentelor utilizate în tratamentele oncologice.

Teza este structurată în patru capitole: Capitolul 1: Studiu de literature, Capitolul 2: Dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină de mătase PEGilate pentru sisteme de administrare a medicamentelor, Capitolul 3: Sistem de livrare țintită la nivelul tractului gastrointestinal bazat pe nanoparticule de fibroină de mătase modificate la suprafață, Capitolul 4: Dezvoltarea biosenzorilor electrochimici pentru detecția și cuantificarea medicamentelor antineoplazice.

Studiul de literatură include informații referitoare la sistemele de administrare a medicamentelor, relevanța acestora în reducerea efectelor toxice ale tratamentelor convenționale, precum și interpretarea mecanismelor de eliberare controlată. Sistemele de administrare a medicamentelor au înregistrat progrese semnificative și diversificări, utilizând diverse formulări de nanoparticule pentru a îmbunătăți eliberarea controlată și livrarea țintită a agenților terapeutici. În cadrul studiului sistemelor de administrare a medicamentelor, a fost analizată o gamă variată de nanoparticule, inclusiv nanoparticulele de fibroină de mătase, pentru potențialul lor în eliberarea controlată a medicamentelor. În mod special, biocompatibilitatea fibroinei de mătase a fost subliniată ca un element esențial care demonstrează potențialul acesteia în dezvoltarea nanocarierilor pentru eliberarea controlată a 5-FU în tratamentul cancerului colorectal. Prin urmare, capitolul de literatură include o secțiune despre senzorii electrochimici pentru detectarea medicamentelor anticanceroase. În general, acest capitol oferă informații utile despre peisajul actual al terapiei cancerului și detectării medicamentelor antineoplazice și prezintă abordări potențiale pentru îmbunătățire prin tehnici inovatoare de nanomedicină.

Al doilea capitol al tezei se concentrează pe dezvoltarea nanocarierilor polimerice pe bază de fibroină de mătase (SF) modificată chimic cu polietilen glicol (PEG) ca abordare pentru administrarea controlată a medicamentelor. Îmbunătățirea eficacității terapeutice pentru medicamentul anticancerigen 5-fluorouracil (5-FU) încapsulat a fost urmărită prin modificarea dimensiunii particulelor, chimiei, eliberării medicamentului și proprietăților biologice prin funcționalizarea nanoparticulelor de SF cu PEG. Nanoparticulele de fibroină de mătase PEGilate dezvoltate sunt investigate prin evaluări biologice complexe pentru a demonstra eficiența acestora asupra liniilor celulare de cancer colorectal.

În al treilea capitol sunt descrise metodele de obținere a nanoparticulelor de fibroină de mătase modificate la suprafață pentru protejarea medicamentelor anticanceroase în tractul gastrointestinal. Mai precis, această cercetare a condus la crearea unui mecanism de administrare controlată a medicamentelor pentru administrarea orală a medicamentelor anticanceroase. Sistemul implică fibroina de mătase modificate la suprafață, încărcate cu 5-fluorouracil, înconjurate de o capsulă exterioară din chitosan/polyvinil alcool, care servește pentru a proteja medicamentul de degradare în timp ce parcurge tractul gastrointestinal. Platformele de SF au ca scop sinteza prin mai multe căi de reacție de cuplare chimică, prin legarea nanoparticulelor în aglomerate, cum ar fi arhitecturi interconectate. Astfel, platforma are rolul de a menține nanoparticulele împreună pentru a proteja și controla eliberarea 5-FU. Examinarea se concentrează pe cinetica de eliberare a medicamentului a unui sistem inovativ de administrare a medicamentelor care utilizează nanoparticule de fibroină de mătase modificate la suprafață în medii cu pH diferit. Această investigație urmărește să imite cât mai fidel condițiile de eliberare *in vivo*. Pentru a proteja 5-FU de degradare prin multiplele bariere fiziologice pe parcursul drumului către site-ul țintă (colon), platforma este închisă într-o capsulă făcută din chitosan, acoperită cu alcool polivinilic (PVA).

Ultimul capitol este dedicat detectării și cuantificării medicamentelor antineoplazice prin măsurători electrochimice. În acest capitol sunt stabilite protocoalele pentru funcționalizarea senzorilor electrochimici pentru a permite detectarea precisă a cisplatinei și bleomicinei. De asemenea, sunt documentate metodele de caracterizare și curbele de calibrare obținute din aceste tehnici.

CAPITOLUL 2: Dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină de mătase PEGilate pentru eliberarea controlată a medicamentelor și studiile *in vitro* ale nanoparticulelor pentru chimioterapia cu 5-fluorouracil în cancerul colorectal

Acest capitol prezintă dezvoltarea formulărilor de administrare a medicamentelor bazate pe nanoparticule de fibroină din mătase natural (SF) și polietilen glycol (PEG), precum și validarea acestui sistem în termeni de morfologie, eliberare a medicamentului și potențial citotoxic. Nanoparticulele de SF modificate au fost încărcate cu 5-fluorouracil pentru terapia cancerului colorectal și au fost testate atât pe celule de adenocarcinom colorectal (HT-29), cât și pe celule sanguine.

2.1 Dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină de mătase PEGilate

Acest studiu se bazează pe dezvoltarea nanoparticulelor polimerice obținute din fibroină, care au fost supuse unei modificări chimice utilizând PEG pentru scopuri de administrare a medicamentelor. Investigația morfologică și profilul de distribuție a dimensiunii nanoparticulelor au fost realizate prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și difuzia dinamica a luminii (DLS). Comportamentul de eliberare a medicamentului pentru nanoparticulele de fibroină PEGilate încărcate cu 5-fluorouracil a fost investigat.

Figura 2 evidențiază calea și sistemul care duc la dezvoltarea nanoparticulelor din acidul acrilic, fibroina de mătase și PEG. Inițial, primul pas a fost activarea grupurilor carboxil (-COOH) din acidul acrilic cu NHS. În al doilea rând, grupurile hidroxi (-OH) din structura SF (care conține în principal serină 11,9% și treonină 1%) reacționează cu acidul acrilic activat [204]. Această interacțiune duce la obținerea esterilor. În final, reacția de polimerizare are loc prin reacția dintre C=C din structurile chimice PEG/TEG diacrilate și legăturile covalente duble dintre atomii de carbon ai fibroinei modificate cu acid acrilic. La sfârșitul procesului, se adaugă acetona pentru a genera formarea nanoparticulelor, urmată de încălzirea la 60°C pentru reticularea nanoparticulelor de fibroină PEGilate.

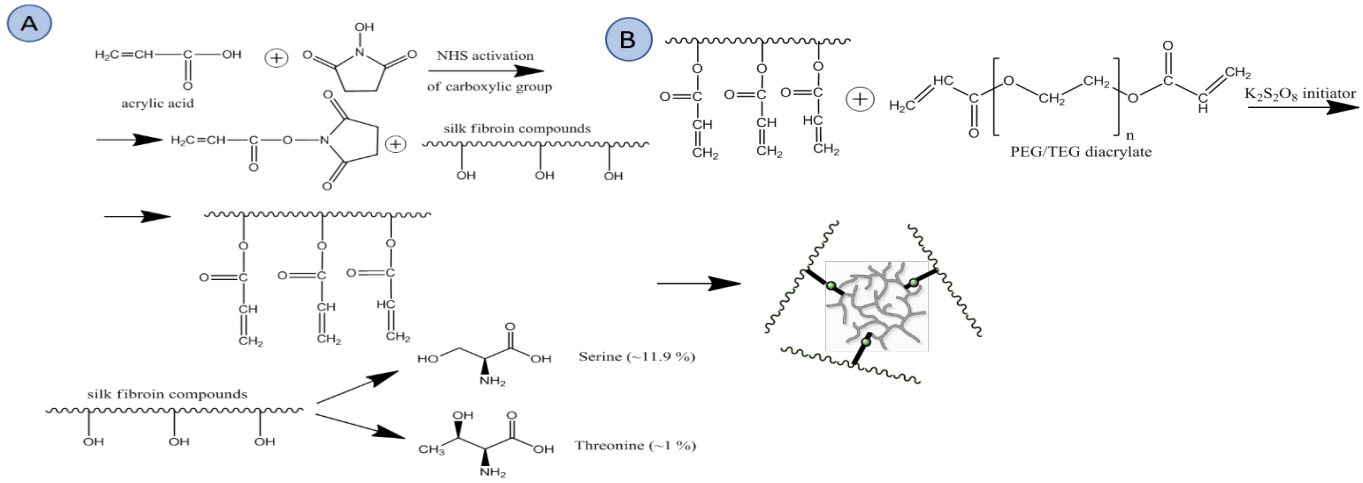


Fig. 2. Tehnica de funcționalizare chimică a formării nanoparticulelor SF-PEG: A) fibroină -acid acrilic; B) fibroină -acid acrilic și polietilenglicol

Spectrofotometrie FTIR

Vibrațiile caracteristice ale grupărilor funcționale din componența fibroinei pot fi regăsite și în probele PEGilate. Figura 3 prezintă spectrele FTIR ale PEG diacrilat (11), TEG diacrilat (22) și nanoparticulelor SF-PEG/TEG. În timpul procesului de modificare chimică, vibrația de întindere C-N (care face parte din banda amida III) se descompune în două peak-uri separate în spectru. Pozițiile acestor două peak-uri sunt legate de concentrația formulărilor de PEG (polietilen glicol).

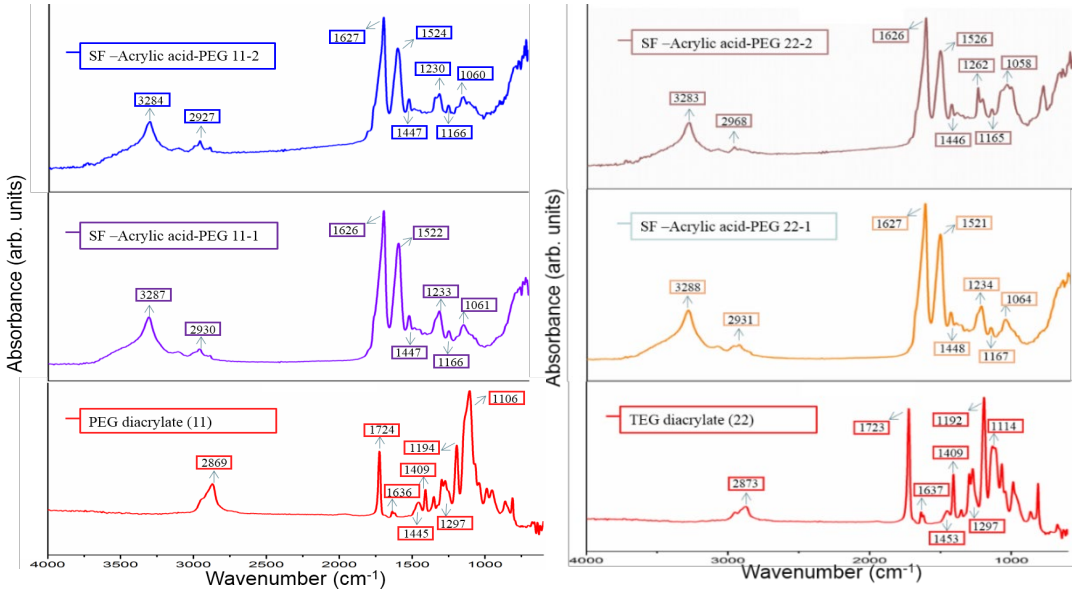


Fig. 3. Spectrul ATR-FTIR al nanoparticulelor de fibroină PEGilate

Spectrometria RAMAN

Examinarea fizico-chimică a fost realizată suplimentar utilizând analiza RAMAN. În Figura 4, sunt prezentate peak-urile fibroinei și ale SF modificate cu acid acrilic. Spectrul SF a arătat patru peak-uri principale: unul în jurul valorii de 2937 cm^{-1}, asociat cu întinderea legăturilor carbon-hidrogen (C-H), altul la 1667 cm^{-1}, care este legat de grupul carbonil (C=O), și două peak-uri în intervalul 1453/1388 cm^{-1}, care sunt legate de vibrațiile de flexie ale legăturilor carbon-hidrogen. Noua bandă la 1234 cm^{-1} din spectrul SF-Acid acrilic este probabil legată de banda amida III, în special de vibrația de întindere C-N din fibroina nativă.

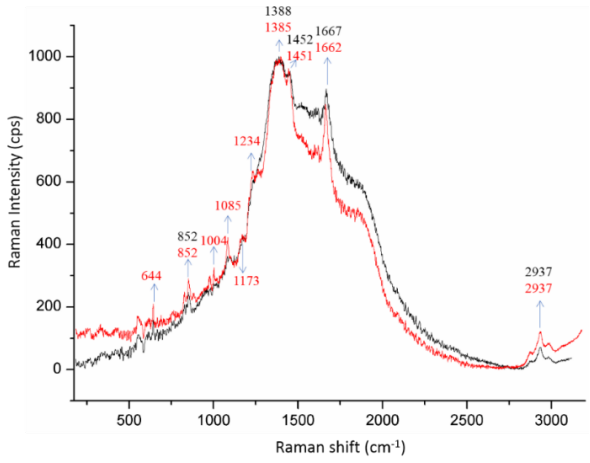
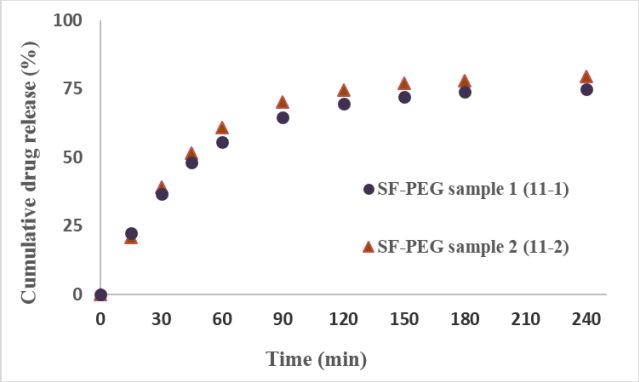


Fig. 4. Spectrul RAMAN al fibroinei - negru și fibroină modificată cu acid acrilic - roșu

Studiul de eliberare a medicamentului

Profilul de eliberare al nanoparticulelor SF PEGilate încărcate cu medicamentul antineoplazic 5-fluorouracil este ilustrat în Figura 5. Eliberarea 5-FU a fost evaluată la intervale



de 15 minute în prima oră, urmată de evaluări la intervale de 30 de minute în următoarele două ore. În final, o evaluare finală a fost realizată la 240 de minute de la începutul experimentului.

Fig. 5. Profilul de eliberare al 5-FU din nanoparticulele SF-PEG 11-1 și 11-2

2.2 Studiile *in vitro* ale nanoparticulelor pentru chimioterapia cu 5-fluorouracil în cancerul colorectal

Ultima secțiune a Capitolului 2 este dedicată investigațiilor mai detaliate privind validarea sistemului de administrare a medicamentului cu nanoparticule de fibroină PEGilate, create și descrise în secțiunile anterioare ale capitolului. În cadrul acestui studiu s-au sintetizat nanoparticule de mătase modificate cu PEG, atât simple, cât și încărcate cu medicamentul antineoplazic 5-FU, și a evaluat morfologia, dimensiunile și proprietățile de eliberare ale medicamentului. Mai mult, doza efectivă *in vitro* pentru celulele de adenocarcinom HT-29 a fost determinată, confirmând capacitatea nanoparticulelor de a fi absorbite, rezultând într-o citotoxicitate prelungită. În plus, a fost studiată capacitatea citotoxică a acestor sisteme asupra celulelor de cancer colorectal și celulelor sanguine. În final, metoda sugerată de eliberare a medicamentului 5-fluorouracil a fost evaluată pentru efectul său asupra migrației și invazivității celulelor canceroase.

Evaluarea concentrației inhibitoare de 50% (IC_{50})

Efectul citotoxic al nanoparticulelor de fibroină modificate cu PEG și încărcate cu 5-FU a fost evaluat utilizând testul de viabilitate MTT. Viabilitatea celulelor de adenocarcinom colorectal a arătat o scădere dependentă de concentrație în funcție de doza de nanocarrier încărcat cu 5-FU administrată. Concentrațiile în intervalul 2–6 mg/mL nu au influențat viabilitatea celulelor tumorale. Începând cu 8 mg/mL nanoparticule încărcate cu 5-FU, s-a observat o reducere semnificativă a dimensiunii celulelor viabile HT-29. Evaluarea datelor a permis determinarea IC_{50}. După 24 de ore de tratament cu concentrația de 12 mg/mL a nanoparticulelor încărcate cu 5-FU, viabilitatea celulelor HT-29 a arătat o scădere de 50%. Astfel, concentrația de 12 mg/mL a fost stabilită ca IC_{50}, fiind doza aplicată în toate investigațiile biologice ulterioare.

Evaluarea citotoxicității *in vitro*

Celulele tratate cu nanoparticule încărcate cu 5-FU au prezentat o schimbare semnificativă, scăzând supraviețuirea celulelor HT-29 sub 10% după 72 de ore de tratament (Figura 6A). În plus, celulele tumorale HT-29 au fost supuse colorării cu MitoTracker pentru a colora mitocondriile vii din culturi supuse stării nemodificate și nanoparticulelor modificate pentru a transporta medicamentul 5-FU pentru livrarea țintită, atât pentru 24 de ore, cât și pentru 72 de ore (Figura 6B). Impactul nanocarierului testat ± nanoparticulele 5-FU asupra

integrității membranelor celulelor HT-29 a fost evaluat prin măsurarea activității LDH în mediul extracelular după 24 și 72 de ore de tratament, așa cum este ilustrat în Figura 6C. Introducerea nanoparticulelor încărcate cu 5-FU a condus la o creștere a LDH eliberat, indicând leziuni structurale induse în celulele HT-29.

Investigația efectelor tratamentului cu nanoparticule ± 5-FU asupra viabilității și proliferării celulelor de cancer colorectal a fost validată utilizând testul live/dead (Figura 6D). Analiza microscopică a culturilor de celule HT-29 a arătat o proliferare robustă a celulelor atât în mostrele netratate, cât și în cele tratate cu nanoparticule SF/PEG pure. În examinarea rezultatelor nanoparticulelor ± 5-FU asupra producției de oxid nitric (NO), au fost măsurate nivelurile de nitrit în celulele tumorale supuse nanoparticulelor pure și celor încărcate cu 5-FU pentru 24 h și 72 h (Figura 6E). Sistemul de fibroină de mătase PEGilat netratat nu a generat modificări în producția de NO, fără diferențe vizibile în nivelurile de nitrit între mostrele tratate și controale la niciunul dintre punctele de timp. Cu toate acestea, tratamentul cu nanocarrieri încărcați cu medicament a dus la o creștere considerabilă a producției de NO.

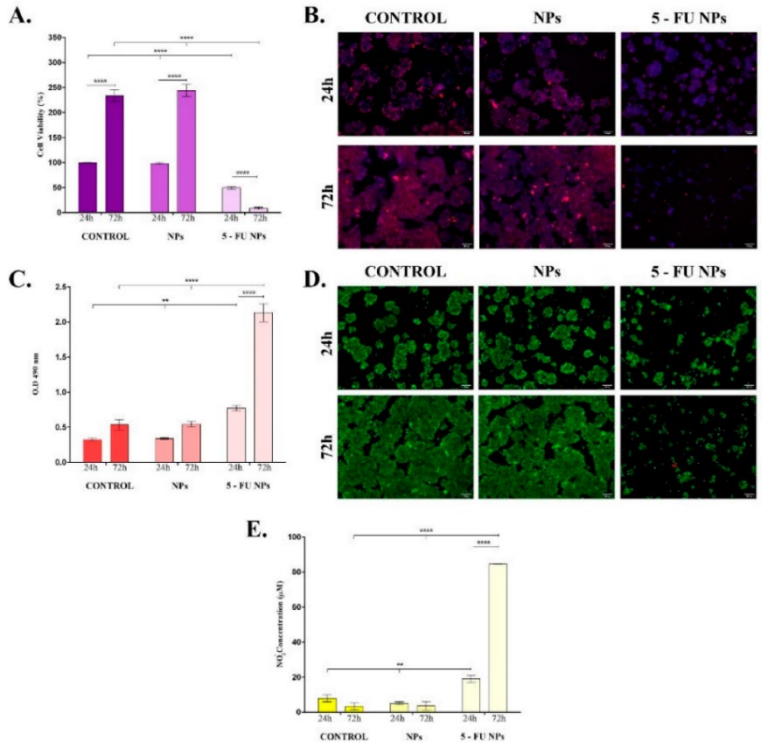


Fig. 6. Evaluarea citotoxicității *in vitro:(A)* Viabilitatea celulară; (B) Integritatea mitocondrială; (C) Eliberarea LDH; (D) Viabilitatea celulară și potențialul proliferativ; (E) Eliberarea NO.

Teste *in vitro* pentru migrarea și invazia celulară

Când celulele tumorale au fost expuse la nanoparticulele simple timp de 48 de ore, acestea au prezentat mișcare neschimbată, raportul celulelor migratoare fiind similar cu cel al celulelor netratate. Cu toate acestea, adăugarea de NPs încărcate cu 5-FU a dus la o reducere considerabilă a capacității migratorii a celulelor tumorale, rezultând o scădere de 75% în migrarea celulelor comparativ cu grupul de control. Testul de invazie a confirmat acest pattern și a relevat o ajustare semnificativă a potențialului invaziv al celulelor tumorale în urma expunerii directe la nanoparticulele încărcate cu 5-FU.

Concluzii generale ale Capitolului 2

Obiectivul semnificativ al acestui capitol în dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină PEGilate a fost crearea unui vehicul adecvat pentru livrarea medicamentului prin modificarea chimică cu polietilenglicol (PEG) și îmbunătățirea eficienței medicamentului. Integrarea PEG-

ului în nanoparticulele de proteine poate reduce opsonizarea și poate îmbunătăți livrarea către celulele tumorale.

Experimentul a implicat o serie de pași, începând cu purificarea fibroinei de mătase și modificarea acesteia printr-un proces complex utilizând acid acrilic și PEG. Nanoparticulele rezultate au fost supuse diferitelor teste analitice, inclusiv FTIR, spectroscopie Raman, dispersie a luminii dinamice (DLS), microscopia electronică de scanare (SEM) și evaluări ale eliberării medicamentului. Evaluarea FT-IR a confirmat modificarea chimică eficientă a fibroinei. În plus, spectroscopia Raman a arătat peak-uri atribuite fibroinei modificate, subliniind adăugarea acidului acrilic. Dispersia luminii dinamice (DLS) a oferit informații despre distribuția dimensiunii nanoparticulelor în soluții. Imaginile SEM au oferit o morfologie detaliată a nanoparticulelor, dezvăluind diferențe între soluțiile de diacrilat de polietilen glicol și diacrilat de tetraetilen glicol.

Nanoparticulele de fibroină de mătase PEGilate au fost sintetizate cu succes și caracterizate, analizele detaliate oferind informații esențiale despre modificările structurale, dimensiunea nanoparticulelor și profilele de eliberare a medicamentului, punând o bază solidă pentru posibile progrese în terapia cancerului. Evaluările biologice axate pe linii specifice de celule tumorale au fost esențiale pentru validarea acestor nanoparticule pentru tratamente eficiente împotriva cancerului.

Nanoparticulele SF/PEG neîncărcate prezintă o compatibilitate biologică excelentă cu celulele tumorale de colon (HT-29) și cu celulele sanguine umane. Acest lucru sugerează că au potențialul de a fi utilizate în siguranță în sisteme biologice. Nanoparticulele încărcate cu 5-FU au demonstrat o scădere semnificativă a viabilității celulelor tumorale. Tratamentul a avut și ca efect o exprimare crescută a TNF-α, ceea ce ar putea contribui la răspunsurile terapeutice împotriva celulelor canceroase. De asemenea, tratamentul cu nanocarierii încărcați cu 5-FU a redus migrarea și invazia celulelor tumorale. Aceste rezultate sugerează capacitatea lor de a preveni metastazarea celulelor canceroase, un element esențial în progresia cancerului.

CAPITOLUL 3. Sistem de livrare țintită în tractul gastrointestinal pe bază de nanoparticule de fibroină modificate la suprafață

În acest capitol este prezentată dezvoltarea unui sistem de livrare controlată a medicamentului pentru administrarea orală a medicamentelor anticancerigene utilizând fibroină de mătase (SF) modificată la suprafață, încărcată cu 5-fluorouracil și încapsulată într-o capsulă de chitosan/PVA pentru a proteja medicamentul de degradarea enzimatică și chimică în mediul gastrointestinal. Nanoparticulele de fibroină (NPs) au fost obținute prin nanoprecipitare, iar întregul sistem de livrare (platforma) a fost pregătit prin cuplarea fibroinei cu agentul de cuplare: Boc-NH-(PEG)-COOH.DCHA. Nanoparticulele modificate au fost încărcate cu 5-fluorouracil și integrate într-o capsulă de chitosan/alcool polivinilic. Modificarea chimică a fibroinei a fost evaluată prin FTIR-ATR, XPS și Dicroism circular. Caracteristicile morfologice ale nanoparticulelor de fibroină și ale arhitecturii acestora au fost investigate prin SEM. Mai mult, toate componentele individuale ale platformei, precum și sistemul asamblat au fost testate pentru citotoxicitate *in vitro* pe celulele de adenocarcinom colorectal HT-29.

Testele de eliberare a medicamentului la pH neutru și acid au evidențiat necesitatea protejării platformei polimerice. Eliberarea medicamentului în tractul gastrointestinal al capsulor încărcate cu platformele SF a arătat că doar 10-11% din medicament a fost eliberat în stomac, 23-25% în intestinul subțire și 58-62% la locul țintă (colon). Studiile indirecte *in vitro* au arătat efecte citotoxice eficiente ale platformelor asupra celulelor de adenocarcinom HT-29.

Caracterizarea fizico-chimică utilizând FT-IR

Peak-urile caracteristice fibroinei (figura 7 dreapta) constau în amida I la 1648 cm^{-1}, amida II la 1534 cm^{-1} și amida III la 1239 cm^{-1}, care sunt atribuite vibrației de întindere C=O, rezonanței N-H înclinate și rezonanței de întindere C-N, specific. După modificarea inițială cu agentul de cuplare BOC, au avut loc deplasări semnificative către valori reduse pentru toate amidele majore: amida I la 1625 cm^{-1}, amida II la 1522 cm^{-1} și amida III la 1233 cm^{-1}. Aceste deplasări sunt cauzate de legarea BOC la grupurile amino din lizină, ducând la dezvoltarea unor noi legături amidice. În plus, amidei III (vibrația de întindere C-N) s-a împărțit în două peak-uri caracteristice.

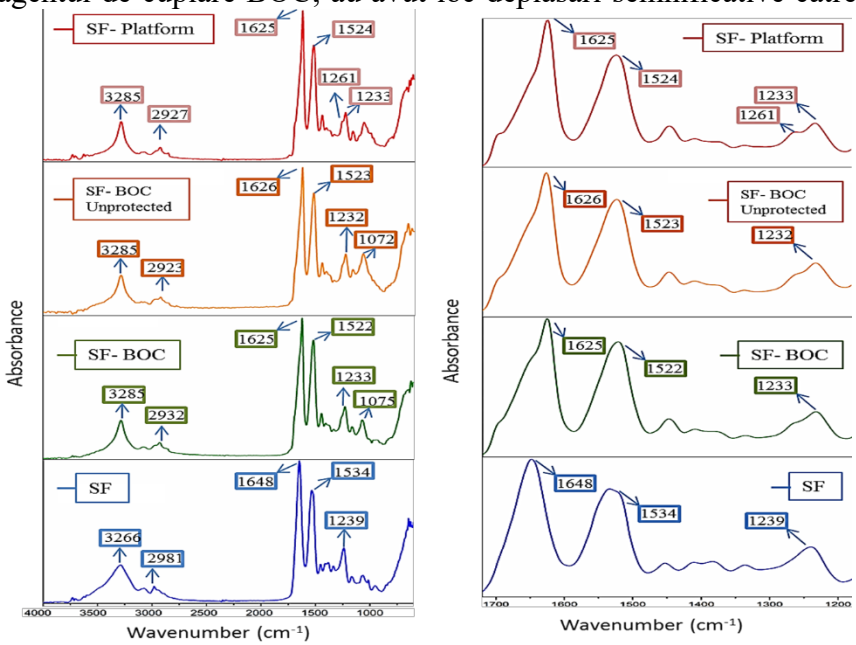


Fig. 7 Spectrele FT-IR ale fibroinei (SF), SF modificată cu BOC, SF-BOC neprotejat și platforma SF

Caracterizarea fizico-chimică utilizând Spectroscopia de Fotoelectroni cu raze X (XPS)

Investigația XPS a suprafețelor materialelor reprezintă o caracterizare fizico-chimică esențială care completează informațiile obținute din rezultatele FT-IR referitoare la dezvoltarea platformei. Fibroina de mătase modificată BOC a prezentat patru peak-uri secundare C 1s, sugerând ajustarea fiabilă a acesteia: vârful centrat la 283,70 eV, asociat cu legătura C-C, a fost deplasat la o valoare mai mică și cu o intensitate redusă; vârful centrat la 285,25 eV, asociat cu legătura C-H, a avut o valoare crescută datorită structurii agentului de cuplare care conține specii hidrocarburice. În plus, raportul dintre legătura C-C și legătura C-H a scăzut semnificativ de la 1,21 în fibroină la 0,64 în BOC-SF. Această scădere poate fi explicată prin contribuția agentului de cuplare, care adaugă mai multe grupuri C-H în raport cu legătura C-C.

Caracterizarea morfologică (SEM)

Imaginea de ansamblu a platformei de 2% arată aglomerate de nanoparticule cu o structură asemănătoare unui mănunchi. La o examinare mai detaliată a imaginii de înaltă rezoluție (figura 8), nanoparticulele au o dimensiune de aproximativ 100 nm și o suprafață netedă. În schimb, imaginea de ansamblu a platformei de 5% arată, de asemenea, aglomerate de nanoparticule. Pentru platforma de 5%, nanoparticulele constitutive sunt mai mari, în timp

ce nanoparticulele modificate SF-BOC sunt mai mici comparativ cu concentrația de 2% fibroină de mătase.

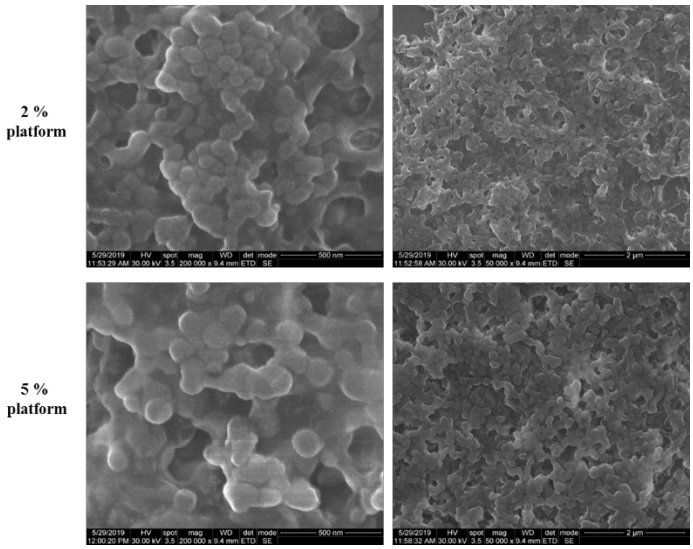


Fig. 8 Imagini SEM ale nanoparticulelor SF

Evaluarea eliberării de medicamente

Evaluarea profilurilor de eliberare a medicamentului in vitro pentru cele două platforme SF, care diferă în ceea ce privește concentrațiile de 5-FU (2%, 4%, 6% și 8% w/w), a arătat un comportament similar atât în condiții de pH neutru, cât și acid. Remarcabil, platforma de 2% SF a prezentat o eficiență de eliberare semnificativ mai mare decât platforma de 5% în ambele scenarii.

Pentru a proteja 5-FU de degradare pe măsură ce trece prin mai multe bariere fiziologice în drumul său către destinație (colon), a fost concepută o capsulă de chitosan acoperită cu APV. Studiile de eliberare efectuate în tractul gastrointestinal utilizând aceste capsule învelite cu platforme SF au arătat că o cantitate mică de 5-FU a fost eliberată în timpul fazei stomacale (10%), urmată de o eliberare mică de 25% în timpul trecerii prin intestinul subțire, și o creștere substanțială a eliberării în locația țintă - colon (aproximativ 60%).

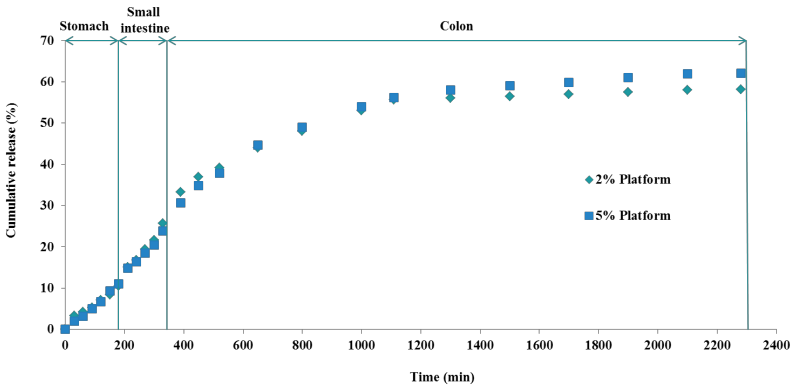


Fig. 9 Testul de eliberare a medicamentului în tractul gastrointestinal pentru platformele cu concentrații de 2% și 5%

Studiul de biocompatibilitatea indirectă a platformelor

Când celulele HT-29 au fost supuse terapiei P + 5-FU, viabilitatea acestora a scăzut considerabil, în special după 72 de ore. Acest lucru sugerează că tratamentul are un efect citotoxic semnificativ asupra acestor celule canceroase. Studiul *in vitro* sugerează puternic posibilitatea ca terapia P + 5-FU să fie citotoxică pentru celulele adenocarcinomului colorectal HT-29, dezvăluind un potențial pentru cercetări ulterioare în terapia cancerului. Totuși, înainte

ca substanța să poată fi utilizată clinic, sunt necesare studii suplimentare pentru a demonstra siguranța, securitatea și eficiența acesteia.

Concluzii generale ale Capitolului 3

Abordarea studiului privind crearea platformei, caracterizarea completă și evaluarea strategică a eliberării medicamentului de-a lungul tractului gastro-intestinal stabilește o bază solidă pentru aplicații viitoare în sistemele de eliberare controlată a medicamentelor pe cale orală, în special în terapia cancerului. Rezultatele au demonstrat modificări chimice eficiente ale fibroinei, confirmate printr-o varietate de tehnici de caracterizare, inclusiv FT-IR, XPS, CD și analiza morfologică. Caracterizarea morfologică a relevat schimbări în platformele bazate pe diferite concentrații de fibroină, care au influențat comportamentele de eliberare a medicamentului.

Studiile de eliberare a medicamentului, realizate la pH neutru și acid pentru a imita sistemul gastro-intestinal, au oferit informații cruciale. Sistemele au prezentat profile de eliberare specifice, cu eficiențe și rate diferite în stomac, intestinul subțire și intestinul gros. Rezultatele studiului arată că platformele create, în special varianta de 5%, au un potențial excelent pentru livrarea țintită a medicamentelor către colon, evitând în același timp eliberarea prematură în stomac. Eliberarea gestionată și țintită a medicamentelor sugerează că acestea pot fi utilizate pentru a maximiza tratamentul celulelor de cancer colorectal.

CAPITOLUL 4. Dezvoltarea biosenzorilor electrochimici pentru detecția și cuantificarea medicamentelor antineoplazice

Senzorii fabricați utilizând electrozi serigrafiați sunt extrem de precișsi și selectivi în detectarea diverselor analiți. Totuși, obstacole precum replicarea inegală, imperfecțiunile de suprafață și complicațiile de fabricație fac dificilă obținerea unui senzor de înaltă calitate. Procesul de curățare este un pas esențial în obținerea unor rezultate consistente. Primul subcapitol se concentrează pe curățarea electrozilor serigrafiați pentru a îmbunătăți calitatea suprafeței electrozilor de lucru realizați din aur și platină. Al doilea capitol descrie obținerea biosenzorilor pentru detectarea specifică a două medicamente antineoplazice, cisplatina și bleomicina. Cancerul este una dintre principalele cauze de mortalitate la nivel global, fiind frecvent tratat cu medicamente anticancerigene extrem de toxice. Ca urmare, monitorizarea personalizată a tratamentului cu aceste medicamente reprezintă un obiectiv, punând în prim-plan conceptele de medicină personalizată și de precizie.

4.1 Metoda optimă pentru curățarea electrozilor serigrafiați

Acest studiu a evaluat eficiența diferitelor agenți chimici și tehnici de curățare prin utilizarea a două metode de caracterizare electrochimică: voltametrie ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS). De asemenea, a fost observat potențialul metodei de curățare de a îmbunătăți calitatea suprafeței electrozilor de lucru.

Curățarea chimică a electrozilor serigrafiați

Distanța în magnitudinea curentului vârfului de oxidare/reducere observată înainte și după pasul de degresare cu acetonă pe electrodul de aur s-a dovedit a fi neimportantă (0,01 μA). Pe electrodul de platină, măsurătorile au relevat o diferență semnificativă de 7,88 μA.

Drept urmare, a fost detectată o creștere semnificativă a amplitudinii vârfului de oxidare, confirmând importanța și eficiența etapei de degresare pentru electrozii de lucru din platină.

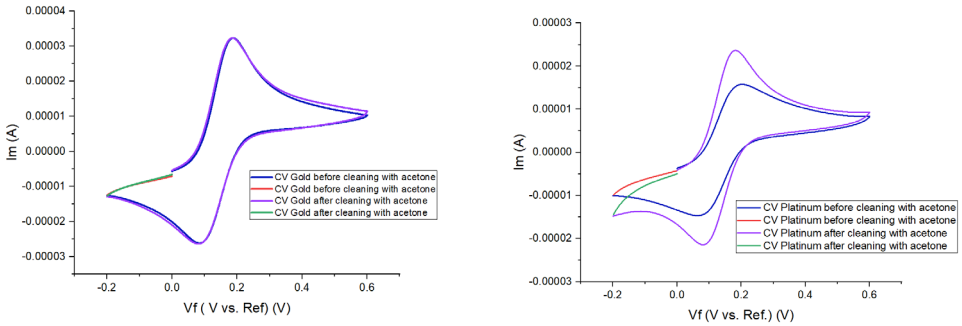


Fig. 10. Imagini CV ale electrozilor serigrafiați cu electrozi de lucru din aur și platină înainte și după pasul de degresare cu acetonă

Senzorii cu electrozi de lucru din Au și Pt a fost supus curățării electrochimice într-o soluție tampon PBS ce conține 10 mM peroxid de hidrogen. Această metodă nu doar că a eliminat eficient contaminanții, dar a avut și potențialul de a crește sensibilitatea electrozilor prin introducerea de noi grupuri C-O, așa cum este detaliat în studiile anterioare [255].

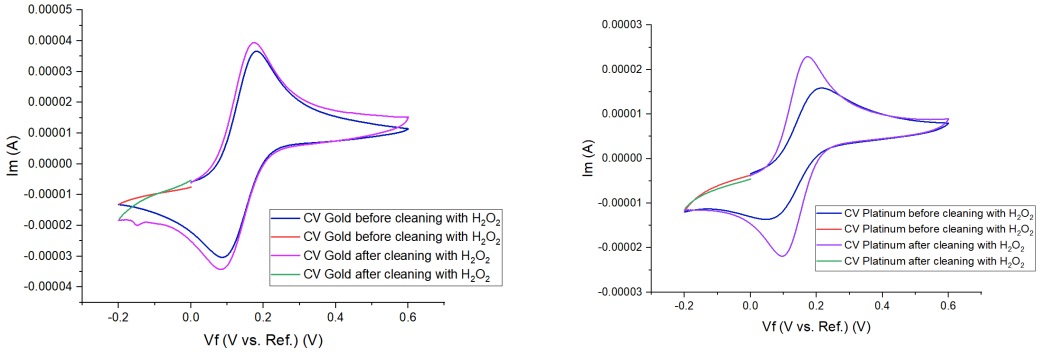


Fig. 11 Votlamograme al electrozilor de aur și platina înainte și după curățarea electrochimică

Curățarea electrochimică folosind potențial negativ

Datele de impedanță susțin eficiența procedurii de curățare. Comparând graficele EIS ale electrozilor de lucru Au înainte și după curățarea electrochimică, se observă o îmbunătățire modestă a procesului de difuzie redox. Această îmbunătățire poate fi observată prin reducerea valorii Rp cu 10,3 ohmi, așa cum se poate vedea în figura 12.

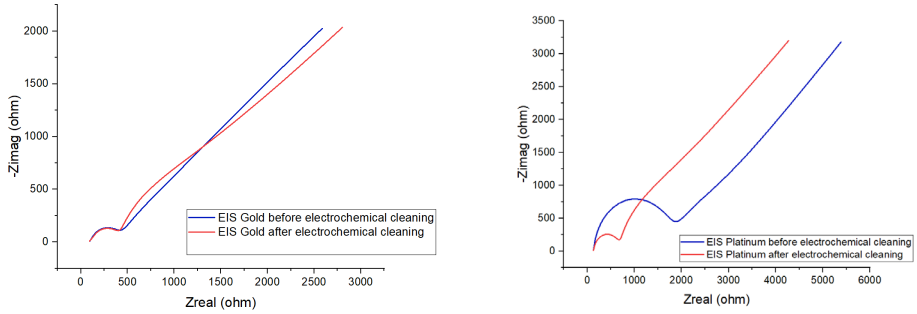


Fig. 12 Graficele Nyquist ale electrozilor de lucru (WE) înainte și după curățarea electrochimică utilizând potențial negativ

4.2 Senzori bazati pe electrozi serigrafiați pentru detecția electrochimică a cisplatinei și bleomicinei în probe de ser

Acest studiu de cercetare își propune să dezvolte două prototipuri de senzori pentru detectarea a două agenți antitumorali utilizați frecvent, cisplatină și bleomicină, în terapia cancerului în probe biologice. Prototipurile sunt destinate pentru detectarea electrochimică a diferitelor medicamente, cu scopul principal de a monitoriza și personaliza tratamentele. Monitorizarea presupune măsurarea concentrațiilor de antineoplastice în plasma sanguină a pacienților care urmează tratamente. Acest tip de biosenzor poate realiza studii de cercetare în timp real, rapide și sensibile, oferind informații despre concentrația antineoplasticele din plasmă.

Detecția și cuantificarea electrochimică a cisplatinei din ser sintetic

În principiu, cisplatina formează un aduct cu albumina serică umană (HSA) prin intermediul unor reziduuri specifice de aminoacizi, inclusiv His 105, Met 298, Met 329 și altele. Cisplatina a fost detectată prin imersarea electrodului într-o soluție de peroxid de hidrogen 50 mM, care provoacă un proces de oxidare de la Pt(II) la Pt(IV), monitorizat prin măsurători CV. Figura 13 ilustrează schema care descrie procesul de modificare funcțională a senzorului și principiul operațional din spatele cuantificării cisplatinei.

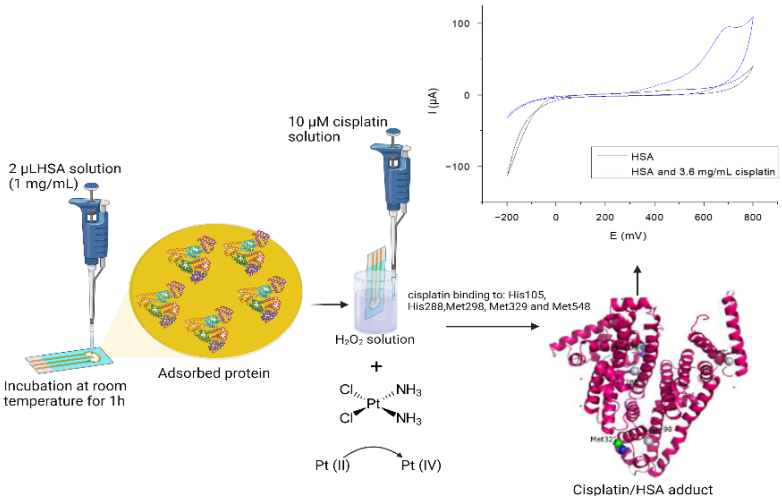
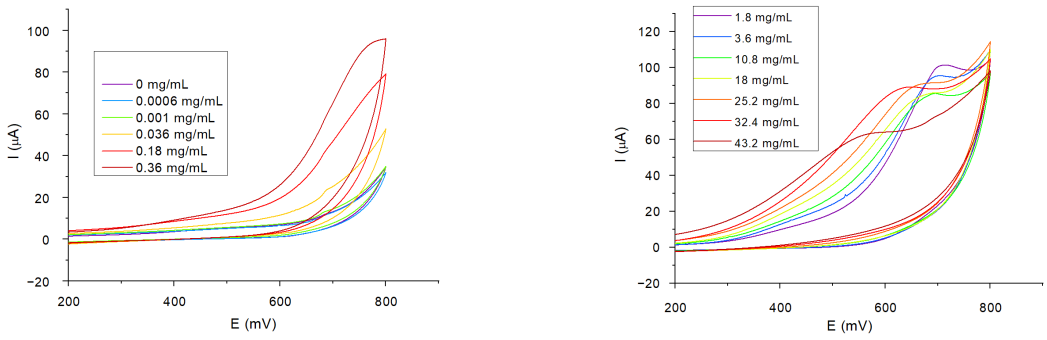


Fig. 13 Schema reprezentativă a dezvoltării unui biosenzor pentru cisplatină

Prin această metodă, au fost testate 12 concentrații diferite de cisplatin, de la 0,6 x 10^3 mg/mL la 43,2 mg/mL, într-un volum de 6 mL de H_2O_2 (5 µL de ser, adăugând volumul corect de soluție stoc de cisplatină), așa cum este prezentat în figura 14.



(**A**) (**B**)

Fig. 14 (**A**): Graficele CV ale cisplatinei între 0 mg/mL (electrod funcționalizat cu HSA) și 0,36 mg/mL (**B**): graficele CV ale cisplatinei de la 1,8 mg/mL la 43,2 mg/mL

Valoarea coeficientului de corelație pentru concentrațiile mici a fost $R^2 = 0,9936$, iar pentru concentrațiile mari a fost $R^2 = 0,9905$.

Dezvoltarea biosenzorului electrochimic pentru detecția bleomicinei

Conform literaturii, procesul de interacțiune al proteinei de rezistență la bleomicină cu bleomicina (BLE) nu este pe deplin înțeles. Mai multe posibilități sugerează că interacțiunea BRP cu BLE este similară cu legătura dintre bleomicină și ADN [265]. Figura 15 prezintă voltamogramele obținute pentru detectarea bleomicinei (BLE) în serul uman, într-un interval de concentrație de la 0,23 µg/mL la 7,56 µg/mL. Pe măsură ce concentrația de BLE crește, se observă o creștere clară a curentului diferențial, de la 3,93 µA la 0,23 µg/mL la 6,8 µA la 7,56 µg/mL. Această creștere progresivă a curentului demonstrează capacitatea protocolului electrochimic propus de a detecta cantitativ BLE în matrice biologice complexe, cum ar fi serul. Rezultatele sugerează o corelație puternică între concentrația de BLE și răspunsul curentului, indicând o performanță fiabilă a senzorului.

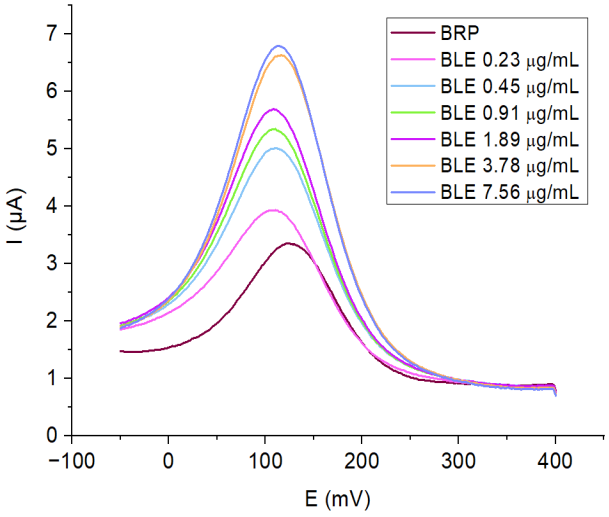


Fig. 15 Voltamogramele concentrațiilor de bleomcină între 0.23 µg/mL și 7.56 µg/mL

Concluzii generale ale Capitolului 4

Studiul de cercetare privind metodele de curățare pentru electrozii serigrafiați dezvăluie numeroase rezultate importante, cum ar fi: analizele comparative cu diferite solvenți și abordări electrochimice arată distincții în rezultatele de curățare; pentru electrozii de platina, cea mai eficientă metodă de curățare a fost aplicarea directă a etanolului pe subfața electrodului, în timp ce pentru electrozii de aur, tratamentul de curățare cu acetonă a fost mai eficient. Metoda H_2O_2/CV a fost evidențiată prin analiza SEM și analiza elementară prin subfețe mai netede și mai uniforme, iar pentru electrozii de aur, o distribuție mai bună pe suprafața electrodului. Studiul de curățare deschide calea pentru cercetări viitoare în abordările combinate de curățare și subliniază importanța proceselor cuprinzătoare de curățare a dispozitivelor. Pentru a obține specificații foarte precise ale performanței electrochimice, cum ar fi sensibilitatea, selectivitatea și acuratețea, este necesar să se stabilească o procedură de curățare personalizată

Partea a doua a studiului din Capitolul 4 a subliniat importanța dezvoltării de biosenzori extrem de sensibili pentru detectarea medicamentelor antineoplazice: cisplatina și bleomicina din probe biologice. Acești senzori sunt concepuți pentru a răspunde cerințelor speciale de monitorizare a concentrației medicamentelor în orice moment al tratamentului chimioterapic, cum ar fi sensibilitatea foarte mare. Biosenzorul pentru cisplatină a avut o limită de cuantificare de 0,6 µg/mL, în timp ce biosenzorul pentru bleomicină a avut o limită de cuantificare de 0,23 µg/mL. Ambii biosenzori necesită îmbunătățiri ale performanței, iar o perspectivă viitoare este dezvoltarea de electrozi SPEpentru monitorizarea continuă a concentrației medicamentelor în probe biologice, pentru a minimiza potențialul de efecte secundare.

CAPITOLUL 5. Concluzii generale

Rezultatele prezentate în această teză sunt caracterizate printr-un grad înalt de originalitate și subliniază două direcții de cercetare în domeniul cancerului, care includ noi metode de tratament și progrese în diagnosticul precoce și medicina personalizată. Această lucrare descrie metodologiile utilizate în dezvoltarea de noi sisteme de livrare a medicamentelor (DDS), tehnicile de caracterizare și rezultatele obținute. În plus, sunt descrise strategiile de adaptare a senzorilor electrochimici pentru detectarea medicamentelor utilizate în terapia cancerului.

În capitolul al doilea, investigațiile experimentale au oferit numeroase informații privind dezvoltarea nanoparticulelor de fibroină modificate cu PEG diacrilat pentru livrarea terapeutică și evaluarea acestora *in vitro* pentru încorporarea 5-fluorouracilului și comportamentul de eliberare în tratamentul cancerului. Cercetarea cuprinzătoare a sistemului de eliberare a medicamentelor a inclus caracterizarea sa chimică, morfologică și biologică.

Sintetizarea de succes și evaluarea nanoparticulelor de fibroină PEGilate au permis examinări considerabile care au dezvăluit ajustări structurale, dimensiunea nanoparticulelor și caracteristicile de eliberare a medicamentului. Acest lucru pune bazele unui sistem solid pentru progresele viitoare în terapia cancerului. Evaluările biologice fundamentale, cu un accent pe anumite linii de celule tumorale, au fost esențiale în validarea eficienței acestor nanoparticule pentru terapia celulelor canceroase. Eficiența de încărcare a medicamentului a fost remarcabilă, iar tiparul de eliberare a evidențiat o eliberare prelungită și susținută a medicamentului din nanoparticulele modificate. Aceasta demonstrează că aceste nanoparticule au capacitatea de a acționa ca sisteme de livrare a medicamentelor (DDS) pentru încorporarea și eliberarea 5-FU.

Acest sistem inovativ de livrare a medicamentelor, derivat din legătura fibroinei cu PEG, a demonstrat o biocompatibilitate puternică cu celulele de adenocarcinom (HT-29) și biocompatibilitate cu celulele sanguine umane. Acest lucru subliniază potențialul său pentru aplicarea fără riscuri în condiții biologice. Nanoparticulele modificate PEGilate, încărcate cu medicamentul antineoplazic 5-FU, au dus la o scădere semnificativă a supraviețuirii celulelor tumorale. În plus, tratamentul a cauzat o reglare pozitivă a TNF-α, arătând un potențial răspuns terapeutic împotriva celulelor canceroase. Motilitatea și comportamentul metastatic al celulelor tumorale HT-29 au scăzut, de asemenea, prin aplicarea nanoparticulelor SF/PEG încărcate cu 5-FU, sugerând că acestea ar putea preveni metastazarea celulelor canceroase – un aspect esențial în progresia cancerului. Potențialul nanoparticulelor SF/PEG de a deveni un sistem de eliberare a medicamentelor pentru administrare intravenoasă este demonstrat de rezultatele bune ale analizei. Totuși, studiile *in vivo* sunt necesare pentru a înțelege interacțiunile nanoparticulelor, citotoxicitatea și biodisponibilitatea acestora.

Cercetarea din faza a treia s-a concentrat pe avansarea și caracterizarea sistemelor de nanoparticule de fibroină de mătase (SF) pentru eliberarea controlată a 5-fluorouracilului. Dezvoltarea platformei a implicat strategii de modificare chimică și încorporare pentru a controla în mod specific eliberarea medicamentului pe parcursul tractului gastro-intestinal (GI). Acest proces complex de dezvoltare a dus la obținerea a două platforme pe bază de SF (2% și 5% fibroină), fiecare adaptată pentru un comportament specific de eliberare a medicamentului. Metodele de caracterizare fizico-chimică, inclusiv FT-IR, XPS și spectroscopie CD, au fost utilizate pentru a confirma succesul pașilor de modificare și ajustările

structurale pe parcursul reacțiilor de cuplare. Evaluarea morfologică prin SEM a expus densitățile diferite ale nanoparticulelor în cadrul diferitelor platforme.

Profilele de eliberare a medicamentului în medii cu pH neutru au arătat modele diferite pentru platformele 2% și 5% SF. Platforma 2% a arătat o eficiență mai mare și o eliberare inițială mai rapidă, în timp ce platforma 5% a avut un profil de eliberare mai lent și mult mai susținut. Platformele au simulat trecerea prin sistemul gastro-intestinal și au arătat o eliberare foarte mică a 5-FU în stomac, o eliberare puțin mai mare în intestinul subțire și o eliberare semnificativ mai mare în colon. Acest comportament de eliberare controlată este în concordanță cu obiceiurile așteptate, esențiale pentru un sistem de livrare țintită a medicamentului.

Rezultatele biocompatibilității au arătat un impact considerabil asupra celulelor HT-29 după expunerea la platforma SF și terapia cu 5-FU. A existat o scădere semnificativă a viabilității celulare și o creștere a eliberării LDH, indicând efecte citotoxice, iar nivelurile mărite de nitriți au arătat inducerea stresului oxidativ în celulele HT-29 tratate, ceea ce ar putea duce la apoptoza celulară. Aceste descoperiri sugerează că platformele dezvoltate, în special varianta cu concentrație de 5%, oferă un potențial promițător pentru livrarea țintită a medicamentului către colon, reducând în același timp eliberarea prematură în stomac. Cu toate acestea, sunt recomandate studii suplimentare *in vivo* pentru a valida aceste constatări și pentru a stabili aplicabilitatea practică a acestor platforme pe bază de fibroină în studiile clinice, deschizând astfel posibilități pentru tratamente mai eficiente și centrate pe pacient în viitor.

Biosenzorii pe bază de electrozi serigrafiați demonstrează acuratețe și selectivitate excelente în detectarea numeroșilor analiți. Totuși, căutarea unui senzor excepțional este împiedicată de obstacole precum reproducerea neregulată, impuritățile de suprafață și complexitatea fabricării. Un pas critic pentru asigurarea unor rezultate consistente este procesul de curățare. Capitolul 4.1 a definit performanța diferitelor compuși chimici și strategii de curățare, concentrându-se pe electrozii de aur și platina. Eficiența curățării a fost evaluată prin rezistența la polarizare (Rp), evaluarea morfologiei suprafeței prin imagistica SEM și analiza structurii elementare prin EDX. Studiul nu doar că evidențiază eficiența diferitelor metode de curățare, dar subliniază și importanța abordărilor personalizate de curățare pentru electrozii serigrafiați. Aceste descoperiri sunt esențiale pentru optimizarea metodelor de curățare și, prin urmare, pentru optimizarea proprietăților electrochimice.

În secțiunea finală a contribuțiilor originale din această teză de doctorat, dedicată detectării electrochimice a medicamentelor antineoplazice, au fost investigate metodele de funcționalizare pentru dezvoltarea biosenzorilor de cisplatină și bleomicină pe electrozi serigrafiați din aur. Biosenzorul pentru cisplatină a fost obținut prin modificarea chimică a electrodului de lucru cu HSA, profitând de afinitatea bine stabilită a medicamentelor pe bază de platină pentru proteinele plasmatice. Mai mult, BRP, care s-a dovedit a fi eficient în atașarea la analogii de bleomicină, a fost utilizat în crearea biosenzorului pentru detectarea bleomicinei. Metodele electrochimice, cum ar fi voltametria ciclică pentru detectarea cisplatinei și voltametria în unde pătratice pentru cuantificarea bleomicinei, oferă o abordare sensibilă și eficientă pentru monitorizarea modificărilor concentrației acestor medicamente, cu avantaje precum analiza rapidă, limite de detecție scăzute și potențialul pentru aplicații point-of-care.

Diseminare

I) Lista articolelor publicate în reviste cotate

1) **Andreea-Cristina Ion**, Ionut-Cristian Radu, Eugeniu Vasile, Elena Iuliana Biru, Ariana Hudita, Bianca Galateanu, Horia Iovu, Catalin Zaharia, DEVELOPMENT OF PEGylated SILK FIBROIN NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS, **U.P.B. Sci. Bull.**, Series B, Vol. 83, Iss. 4, 2021, ISSN 1454-2331, **IF 2021: 0.164**
2) Hudiță, Ariana, Ionuț Cristian Radu, Cătălin Zaharia, **Andreea Cristina Ion**, Octav Ginghină, Bianca Gălățeanu, Luminița Măruțescu, Florin Grama, Aristidis Tsatsakis, Leonid Gurevich, and et al. 2021. "Bio- and Hemo-Compatible Silk Fibroin PEGylated Nanocarriers for 5-Fluorouracil Chemotherapy in Colorectal Cancer: In Vitro Studies" Pharmaceutics 13, no. 5: 755, **IF 2021: 6.321**
3) Dana STAN, **Andreea-Cristina MIRICĂ (ION)**, Rodica IOSUB, Diana STAN, Nicolae-Bogdan MINCU, Marin GHEORGHE, Marioara AVRAM, Bianca ADIACONIȚĂ, Gabriel CRĂCIUN, Andreea-Lorena BOCANCIA-MATEESCU, What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? Processes 2022, 10, 723. https://doi.org/10.3390/pr10040723, **IF 2022: 3.5**
4) Radu, Ionut-Cristian, **Andreea-Cristina Ion Mirica**, Ariana Hudita, Eugenia Tanasa, Horia Iovu, Catalin Zaharia, and Bianca Galateanu. 2023. "Thermosensitive Behavior Defines the Features of Poly(N-isopropylacrylamide)/Magnetite Nanoparticles for Cancer Management" Applied Sciences 13, no. 8: 4870. **IF 2023: 2.7**
5) Radu, Ionut-Cristian, Iuliana-Elena Biru, Celina-Maria Damian, **Andreea-Cristina Ion**, Horia Iovu, Eugenia Tanasa, Catalin Zaharia, and Bianca Galateanu. 2019. "Grafting versus Crosslinking of Silk Fibroin-g-PNIPAM via Tyrosine-NIPAM Bridges" Molecules 24, no. 22: 4096. **IF 2019: 3.267**
6) **Andreea-Cristina Mirica (Ion)**, Dana Stan, Dragos-Cosmin Zaharia, Horia Iovu, Sorin Mocanu, Marioara Avram, and Lorena-Andreea Bocancia-Mateescu. "Screen-Printed Electrodes—A Promising Tool for Antineoplastic Drug Detection (Cisplatin and Bleomycin) in Biological Samples" International Journal of Molecular Sciences 25, 2024, no. 15: 8030. https://doi.org/10.3390/ijms25158030, **IF 2024: 4.9**

Articole trimise spre publicare

1) **Andreea-Cristina Mirică**, Ionut-Cristian Radu, Eugenia Tanasa, Horia Iovu, Catalin Zaharia, Rafael Luque, Ariana Hudita, Bianca Galateanu, CROSSLINKED SILK FIBROIN NANOPARTICLE ARCHITECTURES EMBEDDED IN CHITOSAN CAPSULES FOR ORAL DELIVERY IN CANCER MANAGEMENT. International Journal of Biological Macromolecules. **IF 2024: 8.2**

II) Participare la conferințe internaționale și naționale
Prezentări orale

1) **Andreea-Cristina Ion**, Ionut-Cristian Radu, Catalin Zaharia, Ariana Hudita, Bianca Galateanu, Eugenia Tanasa, Horia Iovu, "*Nanohydrogels platforms for drug delivery*

systems by self-assembling of hydrophilic polymers", 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, September 4-7 2019, Constanta, Romania.

2) **Andreea-Cristina Ion**, Ionut-Cristian Radu, Catalin Zaharia, Bianca Galateanu, Eugenia Tanasa, Horia Iovu, "*Silk Fibroin Self-Assembled Architectures Loaded With Antineoplastic Drug for Cancer Therapy*", BPC 21 (Bucharest Polymer Conference), June 9-11 2021, Bucharest, Romania

Prezentari postere

1) **Andreea Cristina Mirică (ION)**, Lorena Andreea Bocancia Mateescu, Sorin Mocanu, Dana Stan, Electrochemical biosensors for monitoring treatment with antineoplastic drugs, A-XIV-A Conferință Națională a asociației de medicină de laborator din România (cu participare internațională), 14-16 Iunie 2023, Timișoara

III) Brevete

1) Număr cerere de brevet A2023 00283/07.06.2023. Dana Stan, Lorena Andreea Mateescu, **Andreea-Cristina Mirică (ION)**. PROCEDEU DE OBȚINERE BIOSENZOR PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A CISPLATINEI DIN PROBE DE PLASMĂ ARTIFICIALĂ

Lista de abrevieri

3D - tridimensional
5-FU - 5-fluorouracil
Ala - Alanină
ATR - Reflectanță totală atenuată
BOC - Boc-NH-(PEG)-COOH.DCHA
CB - albastru de celestină
CE – Contra electrod
CFU - unități formatoare de coloni
CNF - nanofibre de carbon
CRC - cancer colorectal
CTN - nanotuburi de carbon
CV - Voltametrie ciclică
DAPI - 4′,6-diamidino-2-fenilindol
DDSs - Sisteme de eliberare a medicamentelor
DLS – Difuzia dinamică a luminii
DMEM - Mediul modificat Dulbecco Eagle
DNA - Acid deoxiribonucleic
DOX - Doxorubicină
DPD - dihidropirimidină dehidrogenază
EDTA - Acid etilen-diamin-tetraacetic
EDX - Analiză dispersivă de raze X
EIS - Spectroscopie de impedanță electrochimică
ELISA - Test imunozorbent legat de enzimă
EPR - Permeabilitate și retenție îmbunătățită
FDA - Administrația pentru Alimente și Medicamente
FT-IR - Spectroscopie infraroșu cu transformare Fourier
Gly - Glicină
GSH - Glutation
HCV - Virusul hepatitei C
HIV - Virusul imunodeficienței umane
HPLC - Cromatografie lichidă de înaltă performanță
ICPMS - Spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv
IR - eliberare imediată
LC-MS - Cromatografie lichidă – spectrometrie de masă
LOD - limită de detecție
mAb - anticorpi monoclonali
MDR - rezistență la mai multe medicamente
MNPs - nanoparticule magnetice
MR - eliberare modificată
MTT - 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoliu bromid

MWCNT - nanotuburi de carbon cu pereți multipli
NED - N-1-naftil etilen diamină dihidroclorură
NHS - N-hidroxisuccinimidă
NIPAM - N-izopropil acrilamidă
NPs - nanoparticule
PBS - Soluție tampon fosfat
PCA - poli(alkilciano acrilate)
PEG - Polietilenglicol
PGA - poli(acid glicolic)
PLA - Polilactic acid
PLGA - poli(lactic-co-glycolic acid)
PNIPAM - Poli(N-izopropil acrilamidă)
PTX - Paclitaxel
PVA - Polivinil alcool
PVP - polivinilpirrolidonă
RE - electrod de referință
RESOLV - Expansiunea rapidă a soluției supercritice într-un solvent lichid
RESS - Expansiunea rapidă a soluției supercritice
SAMs - monostraturi autoasamblate
scCO2 - dioxid de carbon supercritic
SEM - microscopia electronică de baleiaj
Ser - Serină
SERS - spectroscopie Raman îmbunătățită de suprafață
SF - fibroină din mătase naturală
SPEs - electrozi serigrafiați
TFA - acid trifluoroacetic
Thr - treonină
TNF-α - factorul de necroză tumorală-α
UHPLC - Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă
UV-VIS - Ultraviolet-Visibil
Val - Valină
WE - Electrod de lucru
WHO - Organizația Mondială a Sănătății

Bibliografie selectată

[1]. Yixue Su; Zhiwei Xie; Gloria B. Kim; Cheng Dong; Jian Yang. Design strategies and applications of circulating cell-mediated drug delivery systems. ACS Biomaterials Science & Engineering, Volume 1, American Chemical Society, 2015

[2]. Su, Y., Xie, Z., Kim, G. B., Dong, C., & Yang, J. (2015). Design Strategies and Applications of Circulating Cell-Mediated Drug Delivery Systems. ACS Biomaterials Science & Engineering, 1(4), 201–217. doi:10.1021/ab500179h

[3]. Grund, S., Bauer, M., & Fischer, D. (2011). Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends. Advanced Engineering Materials, 13(3), B61–B87. doi:10.1002/adem.201080088

[4]. Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in drug delivery. Curr. Opin. Chem. Biol. 2001, 5, 447–451. doi: 10.1016/s1367-5931(00)00227-1

[5]. Tong, R., & Langer, R. (2015). Nanomedicines Targeting the Tumor Microenvironment. The Cancer Journal, 21(4), 314–321. doi:10.1097/ppo.0000000000000123

[6]. Luo X, Zhang Q, Chen H, Hou K, Zeng N, Wu Y. Smart Nanoparticles for Breast Cancer Treatment Based on the Tumor Microenvironment. Front Oncol. 2022 May 26;12:907684. doi: 10.3389/fonc.2022.907684. PMID: 35720010

[40]. G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K. Bannerjee, "Drug delivery systems: An updated review", in International Journal of Pharmaceutical Investigation, vol. 2, no. 1, January 2012, pp. 2-11

[41]. S. Mukherjee, S. Ray, R.S. Thakur, "Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System", in Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 71, no. 4, July2009, pp. 349-358

[42]. I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis", in Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 54, no. 5, September 2002, pp. 631-651

[60]. Yao X, Zou S, Fan S, Niu Q, Zhang Y. Bioinspired silk fibroin materials: From silk building blocks extraction and reconstruction to advanced biomedical applications. Mater Today Bio. 2022 Aug 6;16:100381. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100381

[61]. https://www.inaturalist.org/taxa/47157-Lepidoptera accessed on 14 January 2024

[62]. Bakhshandeh B, Nateghi SS, Gazani MM, Dehghani Z, Mohammadzadeh F. A review on advances in the applications of spider silk in biomedical issues. Int J Biol Macromol. 2021 Dec 1;192:258-271. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.201

[63]. A. Glisovic, F. Vollrath, "Mulberry Silk, Spider Dragline and Recombinant Silks", Industrial Applications of Natural Fibres: Structure, Properties and Technical Applications, John Wiley & Sons Ltd., 2010

[64]. Numata K, Kaplan DL. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Dec 30;62(15):1497-508. doi: 10.1016/j.addr.2010.03.009

[93]. Renedo, O.D.; Alonso-Lomillo, M.A.; Arcos Martínez, M.J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. Talanta 2007, 73, 202–219.

[114]. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer accessed on January 2024

[152]. Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer, 3(5), 330–338. doi:10.1038/nrc1074

[153]. Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2019). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. Pharmacology & Therapeutics, 107447. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.107447

[154]. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin. 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763

[155]. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492

[156]. Hagan S, Orr MC, Doyle B. Targeted therapies in colorectal cancer-an integrative view by PPPM. EPMA J. 2013 Jan 28;4(1):3. doi: 10.1186/1878-5085-4-3

[157]. Marshall JL, Haller DG, de Gramont A, Hochster HS, Lenz HJ, Ajani JA, Goldberg RM. Adjuvant Therapy for Stage II and III Colon Cancer: Consensus Report of the International Society of Gastrointestinal Oncology. Gastrointest Cancer Res. 2007 Jul;1(4):146-54.

[158]. Nikolouzakis TK, Vassilopoulou L, Fragkiadaki P, Mariolis Sapsakos T, Papadakis GZ, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tsiaoussis J. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). Oncol Rep. 2018 Jun;39(6):2455-2472. doi: 10.3892/or.2018.6330

[159]. Kuhn JG. Fluorouracil and the new oral fluorinated pyrimidines. Ann Pharmacother. 2001 Feb;35(2):217-27. doi: 10.1345/aph.10096

[160]. Benson AB 3rd. New approaches to the adjuvant therapy of colon cancer. Oncologist. 2006 Oct;11(9):973-80. doi: 10.1634/theoncologist.11-9-973

[161]. Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, Díaz-Rubio E, Santoro A, Van Cutsem E. Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. Ann Oncol. 2003;14 Suppl 2:ii7-12. doi: 10.1093/annonc/mdg723

[162]. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet. 1989 Apr;16(4):215-37. doi: 10.2165/00003088-198916040-00002

[180]. Karmali, P. P., & Simberg, D. (2011). Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. Expert Opinion on Drug Delivery, 8(3), 343–357. doi:10.1517/17425247.2011.554818

[190]. Reinert, T., Baldotto, C. S. da R., Nunes, F. A. P., & Scheliga, A. A. de S. (2013). Bleomycin-Induced Lung Injury. Journal of Cancer Research, 2013, 1–9. doi:10.1155/2013/480608

[210]. Qu, C.-Y.; Zhou, M.; Chen, Y.; Chen, M.; Shen, F.; Xu, L.-M. Engineering of lipid prodrug-based, hyaluronic acid-decorated nanostructured lipid carriers platform for 5-fluorouracil and cisplatin combination gastric cancer therapy. Int. J. Nanomed. 2015, 10, 3911.

[242]. Paul-Octavian Stanescu, Ionut-Cristian Radu, Rebeca Leu Alexa, Ariana Hudita, Eugenia Tanasa, Jana Ghitman, Oana Stoian, Aristidis Tsatsakis, Octav Ginghina, Catalin Zaharia, Mikhail Shtilman, Yaroslav Mezhuev & Bianca Galateanu (2021) Novel chitosan and bacterial cellulose biocomposites tailored with polymeric nanoparticles for modern wound dressing development, Drug Delivery, 28:1, 1932-1950, DOI: 10.1080/10717544.2021.1977423

[243]. Kang, G.-D., Nahm, J.-H., Park, J.-S., Moon, J.-Y., Cho, C.-S., & Yeo, J.-H. (2000). Effects of poloxamer on the gelation of silk fibroin. Macromolecular Rapid Communications, 21(11), 788–791. doi:10.1002/1521-3927(20000701)21:1

[261]. Hu, J.-B., Li, Q.-L., & Shang, J. (2010). Studies on Electrochemical Behavior of Bleomycin and Its Interaction with DNA at a Co/GC Ion Implantation Modified Electrode. Chinese Journal of Chemistry, 20(3), 267–271. doi:10.1002/cjoc.20020200311

[262]. Stan, D.; Mirica, A.-C.; Iosub, R.; Stan, D.; Mincu, N.B.; Gheorghe, M.; Avram, M.; Adiaconita, B.; Craciun, G.; Bocancia Mateescu, A.L. What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? Processes 2022, 10, 723. https://doi.org/10.3390/pr10040723

[263]. Wang J, Tao J, Jia S, Wang M, Jiang H, Du Z. The Protein-Binding Behavior of Platinum Anticancer Drugs in Blood Revealed by Mass Spectrometry. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Jan 29;14(2):104. doi: 10.3390/ph14020104

[267]. Kilkuskie, R. E., Macdonald, T. L., & Hecht, S. M. (1984). Bleomycin may be activated for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P-450 reductase. Biochemistry, 23(25), 6165–6171. doi:10.1021/bi00320a042

[268]. Rohs R, Sklenar H. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: continuum treatment of salt effects. India