

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

NANOPARTICULE DE OXID DE FIER CU ÎNVELIȘ POLAR:
PROPRIETĂȚI ȘI PERSPECTIVE BIOMEDICALE

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Prof. univ. dr. NEAMȚU JOHNY

STUDENT DOCTORAND:
BUTEICĂ SANDRA ALICE

CRAIOVA
2014

Cuprins

STADIUL CUNOAȘTERII	3
CONTRIBUȚII PERSONALE	3
Capitolul IV. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu înveliș polar de acid salicilic	3
Capitolul V. Modele de studiu pentru investigarea proprietăților biologice ale nanoparticulelor de Fe ₃ O ₄ /acid salicilic	4
Implantarea xenogrefelor tumorale de melanom malign murin	4
Determinarea biodisponibilității nanoparticulelor de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic	5
Studiul biocompatibilității dispersiei de nanoparticule de Fe ₃ O ₄ /acid salicilic	5
Studiul <i>in vivo</i> al comportamentului intravascular al dispersiei de nanoparticule feromagnetice pe modelul membranei corioalantoidiene.....	5
Capitolul VI. Studiul direcționării magnetice a nanoparticulelor de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic în vasele tumorale	6
Testarea acțiunii dispersiei de nanoparticule asupra celulelor tumorale GB3B	6
Capitolul VII. Studiul <i>in vivo</i> al acțiunii nanoparticulelor asupra melanomului malign murin ..	7
Testarea acțiunii nanoparticulelor de Fe ₃ O ₄ /acid salicilic asupra celulelor tumorale.....	8
CONCLUZII	9
Bibliografie selectivă	10

Cuvinte cheie: nanoparticule magnetice cu înveliș polar, biocompatibilitate, direcționare țintită, model CAM, model murin

STADIUL CUNOAȘTERII

Nanotehnologia este știința care studiază obținerea, caracteristicile și aplicațiile materialelor proiectate la dimensiuni nano. Nanoparticulele sunt particule cu cel puțin o dimensiune mai mică decât un micron, care sunt amorfe sau cristaline și cu suprafețe ce pot avea rol de transportor pentru picături de lichide sau gaze (1).

Câteva aplicații ale nanoparticulelor în domeniul biomedical sunt: eliberarea substanțelor medicamentoase și a genelor, detecția proteinelor și a agenților patogeni, cercetarea structurii ADN-ului, markeri biologici fluorescenți, separarea și purificarea celulelor și a biomoleculilor, studii fagocinetice, distrugerea cu ajutorul căldurii a tumorilor (hipertermia) (2).

Nanoparticulele de magnetită sunt considerate ca fiind cele mai studiate nanobiomateriale datorită metodelor variate de sinteză cu obținerea nanoparticulelor cu diametre între 2 - 50 nm, a proprietăților magnetice specifice, a toxicității reduse asupra organismului uman demonstrată prin numeroase studii *in vitro* și *in vivo* (3). Nanoparticulele magnetice cu diametre între 50 - 100 nm nu pot străbate peretele vascular și sunt metabolizate la nivel hepatic de către celulele Kupffer, iar cele cu diametre de peste 200 nm sunt reținute de capilarele splenice (4). Datorită proprietăților superparamagnetice, nanoparticulele de ferită cu diametre în jurul dimensiunii de 50 nm sunt cele mai studiate (5).

Un design corespunzător al nanoparticulei și proprietățile unice ale nanosistemelor pot conduce la utilizarea ca *mijloc teranostic*, îmbinând cele două direcții de aplicabilitate ale acestora, atât în terapeutică cât și în diagnostic (6).

Odată cu dezvoltarea industriei farmaceutice orientată spre formularea de noi sisteme de eliberare controlată a moleculelor, a crescut potențialul utilizării membranei corioalantoidiene (chorioalantoic membrane, CAM) în studierea acestora, rezultând în literatura de specialitate așa-numitele metode CAM sau modelele *in vivo* CAM (7). Se folosesc embrionii de pui și pentru evaluarea activității, toxicității, farmacocineticii, biodistribuției și nu în ultimul rând a biocompatibilității unor substanțe medicamentoase și conform United States Food and Drug Administration unele țin loc de studii preclinice.

Numeroase cercetări amintesc diferitele aplicații ale modelului CAM în studierea ingineriei tisulare (8), a biomaterialilor și implanturilor (9), în vindecarea plăgilor (10), în angiogeneză și antiangiogeneză (11), în invazia celulară tumorală și metastazare (12), cancer intestinal (13), gliom (14), cancer de prostată (15), leucemie (16), osteosarcom (17), cancer ovarian (18).

Vasele sanguine se formează prin două mecanisme (19):

- Vasculogeneza – reprezintă procesul de formare directă a vaselor sanguine, ca urmare a diferențierii in situ a precursorilor celulari ai angioblaștilor;
- Angiogeneza – reprezintă procesul de formare a vaselor noi din vase preexistente, capilare și venule postcapilare.

Membrana corioalantoidiană se folosește și pentru studierea macromoleculilor cu efect angiogenic și anti-angiogenic asupra celulelor tumorale (20). La 72 - 96 ore de la stimularea angiogenică se observă creșterea densității vasculare cu dispunere radială în jurul implantului tumoral, iar în urma stimulării cu un component anti-angiogenic se observă scăderea densității vasculare sau chiar dispariția vascularizației.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul IV. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu înveliș polar de acid salicilic

Procesul de sinteză al nanoparticulelor de Fe₃O₄/acid salicilic s-a realizat prin parcurgerea următoarelor etape, astfel (21):

1. prepararea soluției 1: 10 g KOH, acid salicilic 0,5 g și 250 mL de apă ultrapură;
2. prepararea soluției 2: 2 g FeCl₃, 1,25 g FeSO₄ și 250 mL de apă ultrapură.
3. după obținerea celor două soluții, soluția 2 a fost adăugată încet peste soluția 1 și amestecul obținut a fost lăsat timp de 30 de minute la temperatura de 50°C.

4. apoi amestecul a fost supus separării magnetice prin utilizarea unui magnet puternic de NdFeB, Q-51-51-25-N, 38–40 Moe;
5. spălare repetată cu apă ultrapură urmată de separare magnetică;
6. agitare timp de 10 minute în mediu de KOH 30 % (etapa de ionizare);
7. spălare repetată cu apă ultrapură cu separare magnetică;
8. dispersare rapidă în apă ultrapură sub acțiunea câmpului magnetic;
9. filtrare printr-o sită de politetrafluoroetilen cu diametrul de 22 μm .

În paralel au fost sintetizate nanoparticule de Fe_3O_4 , care au fost obținute în același mod, însă fără adăugarea acidului salicilic în soluția 1. Procedeu de sinteză s-a finalizat cu o etapă de uscare a nanoparticulelor obținute la o temperatură de 120°C , pentru 12 ore.

Analiza probei prin XRD s-a realizat cu ajutorul unui spectrometru Rigaku Ultima IV, cu geometrie Bragg–Brentano, cu unghiuri cuprinse în domeniul 10° – 100° , cu pasul setat la 2s și $0,05^\circ$, având sursă $\text{CuK}\alpha$. În urma analizei comparative a difractogramelor de raze X ale nanoparticulelor de oxid de fier au fost evidențiate picurile caracteristice magnetitei.

În spectrele FT-IR se observă o bandă de absorbție caracteristică magnetitei la 550 cm^{-1} și benzi de absorbție specifice nanoparticulelor cu înveliș de acid salicilic la: 1557, 1411, 1329, 1026 cm^{-1} (bandă specifică salicilatului). Există o bandă de absorbție caracteristică prezenței grupării carboxilice la $1,657\text{ cm}^{-1}$ pe spectrul acidului salicilic, la $1,617\text{ cm}^{-1}$ pe spectrul salicilatului de fier (III) și la $1,557\text{ cm}^{-1}$ pe spectrul corespunzător nanoparticulei de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic.

Pentru analiza TEM a fost utilizat un microscop de transmisie electronică de înaltă rezoluție Tecnai TM G2 F30 S-TWIN (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Modul de operare al microscopului este setat la 300 kV cu rezoluția punctului de 2 Å, iar rezoluția liniei de 1 Å. Analiza probelor arată că în urma sintezei au fost obținute nanoparticule de Fe_3O_4 /acid salicilic cu diametrul mediu de 60 nm, cu forma sferică și dispersate.

Distribuția mărimii particulelor și determinarea valorii potențialului Zeta au fost realizate prin metoda Dynamic Light Scattering (DLS), cu ajutorul unui aparat Brookhaven 90 PLUS. Rezultatele obținute indică o distribuție omogenă a mărimii particulelor pentru fiecare lot studiat, iar pentru loturile cu dimensiunea nanoparticulelor sub 210 nm, potențialul Zeta determinat are valoarea de peste 40 mV, fapt care susține stabilitatea îndelungată în apă a acestor dispersii de nanoparticule de Fe_3O_4 cu înveliș de acid salicilic.

Capitolul V. Modele de studiu pentru investigarea proprietăților biologice ale nanoparticulelor de Fe_3O_4 /acid salicilic

În studierea mecanismelor de producere și tratare a cancerului, unul dintre cele mai utilizate modele de studiu *in vivo* este modelul murin. Acest model prezintă următoarele caracteristici și avantaje: dimensiuni reduse, asemănarea cu oamenii, datorită genomului ordonat similar (22), testarea facilă a noilor substanțe medicamentoase, implantarea cu ușurință a grefelor tumorale și dezvoltarea rapidă a tumorilor, costuri relativ scăzute, etc.

În ultimii ani, cercetările din domeniul medical au fost orientate și pe utilizarea membranei corioalantoidiene ca model de studiu *in vivo*, îndeosebi pentru studierea diferitelor mecanisme implicate în tumorigeneză. Caracteristicile acestui model permit descrierea atât a micromediului tumoral, a interacțiilor dintre celulele tumorale și țesuturile stromale, cât și a etapelor diseminării diferitelor tipuri de celule tumorale: gliom, carcinom colorectal, fibrosarcom, etc (23). Aceste argumente au stat la baza alegerii membranei corioalantoidiene ca unul dintre modelele de studiu *in vivo* a compatibilității și acțiunii dispersiei de nanoparticule de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic.

Implantarea xenogrefelor tumorale de melanom malign murin

Când embrionii de pui au atins vârsta de 8 zile, au deja formată membrana corioalantoidiană ale cărei vase sunt în perioada de angiogeneză prin intususcepție, perioadă care permite vascularizarea rapidă a tumorilor implantate pe suprafața membranei.

Pentru implantarea xenogrefelor tumorale, ouăle sunt scoase din incubator și sunt așezate pe un suport termoizolant (polistiren). După îndepărtarea benzii autoadezive de la nivelul ferestrei s-a examinat viabilitatea embrionului de pui și stadiul de dezvoltare al membranei corioalantoidiene, cu ajutorul unui stereomicroscop Zeiss cu iluminare laterală.

Dacă membrana corioalantoidiană nu a fost suficient de dezvoltată sau se observă anomalii în evoluția embrionului, oul respectiv a fost îndepărtat din experiment. Dacă membrana corioalantoidiană a fost normal dezvoltată, pe suprafața acesteia s-a inoculat în condiții sterile, cu ajutorul unui ac de seringă, o cantitate mică de 0,1 mL țesut tumoral aspirat de la nivelul melanoamelor dezvoltate la nivelul modelelor murine.

După realizarea inoculării cu țesut tumoral, ouăle au fost reintroduse în incubator și urmărite zilnic cu ajutorul stereomicroscopului până în ziua a 16-a de dezvoltare, când toate xenogrefele tumorale au fost recoltate împreună cu membrana corioalantoidiană înconjurătoare și fixate în soluție neutră de formol 10% pentru prelucrările histologice ulterioare.

Determinarea biodisponibilității nanoparticulelor de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic

Determinarea timpului de circulație a dispersiei apoase de nanoparticulele feromagnetice cu înveliș de acid salicilic la nivelul circulației membranei corioalantoidiene a embrionului de pui este o etapă esențială pentru definirea biodisponibilității nanoparticulelor. Cunoașterea timpilor de circulație este necesară pentru schițarea oricărui experiment *in vivo*, care necesită utilizarea acestor nanoparticule. Pentru efectuarea acestui experiment s-au utilizat trei loturi de embrioni de pui aflați în ziua a 12-a de dezvoltare, când vasele membranei corioalantoidiene sunt foarte bine dezvoltate și permit efectuarea manevrei de injectare intravenoasă în condiții optime.

Din analiza datelor obținute, se pot nota următoarele observații referitoare la timpul de circulație al nanoparticulelor feromagnetice cu înveliș de acid salicilic în sistemul vascular al embrionului de pui:

1. pentru doze injectate de MNP, mai mici de 0,1 mL, există o tendință de scădere bruscă a cantității de nanoparticule circulante; imaginile achiziționate după expunerea timp de 5 minute la acțiunea câmpului magnetic static și la 90 minute de la injectare nu mai pun în evidență agregate de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic acumulate pe peretele intern al arteriolei;

2. pentru doze injectate de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic mai mari de 0,1 mL, există o tendință de scădere bruscă a cantității de nanoparticule circulante în primele 120 minute, până la atingerea unei concentrații de nanoparticule circulante, care se modifică apoi foarte puțin, pe perioade lungi de timp (peste 15 ore).

Studiul biocompatibilității dispersiei de nanoparticule de Fe₃O₄/acid salicilic

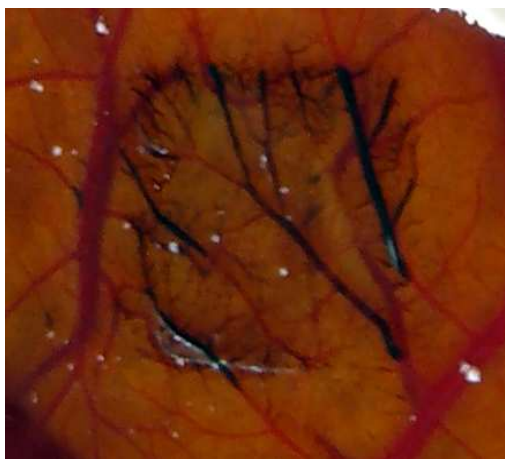
Determinarea biocompatibilității dispersiei de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic s-a efectuat *in vivo* pe modelul membranei corioalantoidiene, prin studierea efectului acesteia asupra dezvoltării normale a embrionului. În acest studiu s-au utilizat 3 loturi de câte 5 embrioni de pui cu vârsta de 11 zile, din care un lot a fost martor.

Un număr de 5 embrioni (lot I) au fost injectați cu o singură doză de 0,2 mL de dispersie de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic, iar ceilalți 5 embrioni (lot II) cu două doze consecutive, la interval de 24 ore. După injectare, toate ouăle au fost reintroduse la incubator și examinate zilnic cu ajutorul unui stereomicroscop prevăzut cu o cameră DCM 510, până la momentul eclozării. Toți embrionii cărora li s-a administrat intravenos dispersie de nanoparticule au supraviețuit, s-au dezvoltat normal și au eclozat la termen, fără a prezenta macroscopic, anomalii de dezvoltare, până la vârsta de patru luni.

Studiul *in vivo* al comportamentului intravascular al dispersiei de nanoparticule feromagnetice pe modelul membranei corioalantoidiene

Pentru acest experiment s-a folosit un lot de 15 embrioni de pui cu vârsta de 11 zile. La 10 embrioni de pui s-au injectat câte 0,2 mL de soluție apoasă de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic cu o concentrație de 0,19%. Un număr de 5 embrioni au fost folosiți ca lot martor.

După injectare, pe membranele corioalantoidiene ale tuturor embrionilor (injectați sau neinjectați cu soluție de nanoparticule), s-a aplicat un magnet NdFeB cu puterea de 0,18T pentru o perioadă de 30 minute, iar apoi embrionii au fost reintroduși în incubator. După 7 zile de la injectare, un număr de 5 embrioni au fost sacrificați și fixați în soluție neutră de formol 4%, după care membranele corioalantoidiene au fost recoltate pentru prelucrarea prin metode histologice standard. La nivelul arteriolelor și venulelor membranelor corioalantoidiene ale embrionilor injectați cu soluție de nanoparticule se observă acumularea de agregate de nanoparticule feromagnetice în zona de aplicare a câmpului magnetic static.



Acumularea intravasculară a nanoparticulelor feromagnetice sub acțiunea unui câmp magnetic static de 0,18T aplicat timp de 30 minute

Acumularea agregatelor de nanoparticule are loc doar la nivelul vaselor care vin în contact direct cu magnetul, vasele circulației viteline aflate în profunzime față de membrana corioalantoidiană nefiind blocate de acumulări de nanoparticule, la nivelul acestora câmpul magnetic fiind incapabil de a bloca agregatele de nanoparticule, care sunt îndepărtate rapid de fluxul sanguin. Aceste observații arată potențialul acestei dispersii de nanoparticule pentru blocarea strictă a vaselor într-o anumită zonă de interes, prin adaptarea intensității câmpului magnetic la volumul vaselor și la condițiile hemodinamice locale.

Lipsa blocării vaselor din vecinătatea zonei de acțiune a magnetului arată că agregatele scăpate de sub acțiunea câmpului magnetic sunt dispersate rapid și nu blochează capilarele din aval, fiind o dovadă a potențialului emboligen scăzut al acestei dispersii.

Urmărirea în timp (la 24 de ore și 48 de ore), cu ajutorul stereomicroscopului a zonelor la care s-a practicat blocajul vascular prin aglomerarea nanoparticulelor în câmp magnetic, a evidențiat persistența efectului de nanoblocaj vascular doar la nivelul arteriilor precapilare și al capilarelor care iau naștere din acestea.

Pe toate secțiunile histologice studiate nu s-au observat depozite de nanoparticule localizate intra- sau extravascular în afara zonelor expuse acțiunii câmpului magnetic static, fapt care confirmă încă odată potențialul slab emboligen al agregatelor de nanoparticule mobilizate de la nivelul vaselor blocate.

Capitolul VI. Studiul direcționării magnetice a nanoparticulelor de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic în vasele tumorale

Testarea acțiunii dispersiei de nanoparticule asupra celulelor tumorale GB3B

Pentru studiul comportamentului dispersiei de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic la nivelul vaselor tumorale, s-a utilizat un lot de 10 embrioni de pui în vârstă de 6 zile. Pe membranele corioalantoidiene ale acestora s-au implantat câte 2 - 3 picături din mediul de cultură standard (MEM) conținând 10^5 celule de glioblastom (GB3B) pe picătură. După implantare, embrionii au fost incubați până în ziua a 11-a de dezvoltare, perioadă în care xenogrefele s-au dezvoltat. Șapte dintre embrioni au fost injectați intravenos cu câte o doză de 0,2 mL de dispersie de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic cu concentrația de 0,19%.

După injectarea dispersiei de nanoparticule s-a aplicat pe suprafața xenogrefei tumorale un magnet NdFeB de 0,18T timp de 15 minute. În continuare ouăle au fost reintroduse în incubator până în ziua a 16-a, când xenogrefele tumorale au fost recoltate împreună cu membrana corioalantoidiană înconjurătoare și fixate în formol neutru 4% timp de 24 ore.

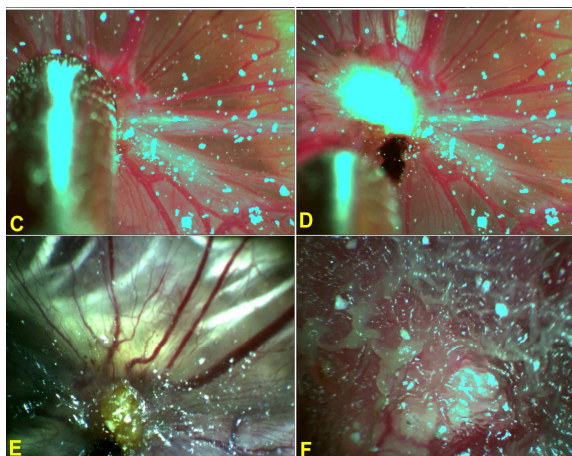
La 120 de ore de la implantarea celulelor tumorale de glioblastom GB3B, apar multiple tumorete pe suprafața membranei corioalantoidiene, care stimulează angiogeneza la nivelul vaselor membranare, tradusă prin apariția de numeroase vase cu dispoziție caracteristică de "spițe de roată" în jurul lor

Se observă o tendință a celulelor tumorale de a migra de-a lungul vaselor din jurul xenogrefei, cu îngroșarea membrane corioalantoidiene, care începe să devină opacă la examinarea mezosopică.

După injectarea intravenoasă a dispersiei de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic și aplicarea magnetului pe xenogrefa tumorală timp de 15 minute, se poate observa blocarea parțială a vaselor membranei corioalantoidiene din jurul xenogrefei tumorale prin acumularea de nanoparticule feromagnetice.

În cazul embrionilor injectați intravenos cu soluție de nanoparticule feromagnetice, tumorile nu se mai dezvoltă, dar continuă să exercite un efect angiogenic asupra vaselor membranei corioalantoidiene din vecinătate. Analiza macroscopică a membranei corioalantoidiene din jurul tumorii blocate arată că aceasta nu este îngroșată, este transparentă și prin examinarea stereomicroscopică se observă vase bine evidențiate.

La cei 3 embrioni din lotul martor, care nu au fost injectați intravenos cu soluția de nanoparticule, se observă că tumorile continuă să crească și să se unească pentru a forma o zonă de tip cerebriform pe suprafața membranei corioalantoidiene. La aceștia, membrana corioalantoidiană din zona xenogrefei tumorale este îngroșată, opacă, iar vasele greu de vizualizat cu ajutorul stereomicroscopului.



Aspectul stereomicroscopic al xenogrefelor de glioblastom implantate pe membrana corioalantoidiană a embrionului de pui. C) aplicarea magnetului pe zona tumorală după injectarea intravenoasă a soluției de nanoparticule feromagnetice; D) blocajul vaselor peritumorale sub acțiunea câmpului magnetic; E) aspectul tumorii la 168 de ore de la injectare; F) aspectul xenogrefei tumorale la lotul martor, neinjectat cu dispersie de nanoparticule

Aceste rezultate au pus în evidență o blocare a dezvoltării xenogrefei tumorale și a tendinței de metastazare perivasculară a acesteia, la lotul injectat cu nanoparticule cu înveliș de acid salicilic.

În urma acestui experiment este greu de afirmat dacă efectul de blocare al dezvoltării xenogrefei tumorale se datorează acțiunii directe a nanoparticulelor sau efectului de reducere a fluxului sanguin la nivelul xenogrefei prin nanoblocajul în câmp magnetic al vaselor membrane corioalantoidiene din vecinătate, răspunzătoare de susținerea viabilității xenogrefei.

Capitolul VII. Studiul *in vivo* al acțiunii nanoparticulelor asupra melanomului malign murin

Pentru acest studiu s-a recurs la modelul murin al melanomului malign. S-a ales melanomul malign știut fiind faptul că acest tip de tumoră este foarte agresivă, iar celulele de melanom malign prezintă fenomenul de angiotropism. Acest fenomen a fost studiat pentru prima dată și a fost descris la nivel de mecanism, pe xenogrefe de melanom uman implantate pe membrana corioalantoidiană a embrionului de pui și constă în proprietatea unor celule tumorale de a metastaza la distanță deplasându-se prin peretele vaselor de sânge (24).

Realizarea acestui studiu a parcurs mai multe etape :

1. realizarea modelului murin al melanomului murin;
2. testarea proprietății metastazante a celulelor tumorale de melanom murin pe modelul membranei corioalantoidiene;
3. tratarea melanoamelor murine dezvoltate cu nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic administrate pe cale orală.

Pentru realizarea modelului murin al melanomului malign, au fost inoculați șoareci rasa C57BL/6 cu celule tumorale de tip B16F1 (potențial metastazant redus), suspendate în ser fiziologic

sau celule tumorale B16F10 (potențial metastazant crescut). Pentru experiment s-au utilizat câte două femele C57BL/6 pentru fiecare linie celulară, cărora li s-au injectat subcutanat 250000 celule/mL ser fiziologic. După 14 zile de la momentul implantării s-a observat apariția unor tumorete vizibile macroscopic, la nivelul locului de injectare subcutanată a suspensiei de celule tumorale. Această tumoretă începe să se dezvolte rapid și atinge dimensiuni de circa 10 mm diametru după 21 zile de la inoculare.



Aspectul zonei de implantare (săgeata neagră) cu celule tumorale din linia B16F10 (250000 celule/doză) la 21 zile de la implantare

Realizarea modelului experimental al melanomului malign pe suprafața membranei corioalantoidiene a embrionului de pui cu vârsta de 8 zile, a presupus recoltarea prin puncție aspirativă fină a țesutului tumoral de la nivelul tumorilor primare induse prin injectarea subcutanată a celulelor B16F1 și B6F10 la șoareci și inocularea la nivelul membranei (25).

Pentru realizarea transplantului de xenogrefă tumorală murină pe membrana corioalantoidiană au fost parcurse următoarele etape:

1. Recoltarea țesutului tumoral;
2. Transplantarea xenogrefei tumorale pe membrana corioalantoidiană.

Analiza zilnică a membranelor corioalantoidiene a evidențiat două tipuri distincte de evoluție a țesutului tumoral de melanom malign murin B16F10 dezvoltat pe suprafața acestora. Se poate observa o dezvoltare locală redusă a xenogrefei tumorale B16F10, lipsa angiogenezei la nivelul vaselor membranei corioalantoidiene din jurul xenogrefei și tendința de migrare precoce a celulelor tumorale ale xenogrefei pe suprafața membranei corioalantoidiene.

În experimentul în care s-au folosit celulele tumorale B16F1, cu potențial metastazant scăzut, s-a observat o stimulare a angiogenezei în vasele membranei corioalantoidiene din jurul xenogrefei tumorale (aspect de "spiță de roată" în dispunerea vaselor membranei corioalantoidiene), cu o creștere în volum a tumorii, vizibilă după 3 zile de la implantare. Concluzia acestui experiment este că xenogrefa de melanom murin dezvoltată pe membrana corioalantoidiană a embrionului de pui păstrează caracteristicile histologice și potențialul metastazant al tumorii murine primare.

Prin urmare, acest model poate fi folosit cu succes pentru verificarea caracterului metastazant al tumorii primare de melanom malign. Această verificare este necesară pentru a confirma caracterul metastazant al tumorilor dezvoltate la nivelul șoarecilor, care au fost tratați zilnic cu dispersie de nanoparticule de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic.

Testarea acțiunii nanoparticulelor de Fe_3O_4 /acid salicilic asupra celulelor tumorale

Pentru investigarea potențialului efect asupra celulelor tumorale de tip B16F1, respectiv de tip B16F10, al nanoparticulelor de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic, am utilizat șoareci rasa C57BL/6, femele, cu vârsta de 6 luni, cu greutate corporală de 23 – 29 g.

În studiul efectuat au fost incluse 13 animale, care au fost divizate în două loturi: **lotul I:** 8 șoareci, cărora li s-au implantat celule tumorale de tip B16F10 (din care doi au fost martori), **lotul II:** 5 șoareci cărora li s-au implantat celule tumorale de tip B16F1 (un animal martor). Animalelor din ambele loturi li s-au injectat subcutanat, 0,5 mL suspensie tumorală (250000 celule/mL) în coapsa stânga spate. Toate animalele incluse în experiment au fost hrănite corespunzător și crescute în condiții optime de temperatură (22°C) și umiditate (46%). Timp de două săptămâni după inocularea suspensiei tumorale, toate animalele au fost monitorizate macroscopic pentru observarea evoluției tumorilor și s-a constatat un singur deces la animalele din lotul B16F1, la 24 de ore de la injectare,

probabil produs de formarea unui embol tumoral. Din ziua a 14-a de la inoculare, toate animalele incluse în studiu (mai puțin animalele din loturile martor), au fost așezate în cuști separate și li s-a administrat buvabil dispersie de MNP (0,19% cu diametrul mediu de 60 nm), în apa de băut. Doza administrată/animal a fost de 0,5 mL dispersie la 4,5 mL apă de băut/24 de ore (26).

Studiul nostru a confirmat validitatea utilizării acestei combinații de modele de studiu a melanomului malign și pentru testarea potențialului efect al dispersiei apoase de nanoparticule. Prin utilizarea modelului membranei corioalantoidiene a embrionului de pui ca model pre-screening se va reduce substanțial numărul de animale utilizate în astfel de studii, ceea ce furnizează o modalitate de lucru mult mai favorabilă atât din punct de vedere etic cât și economic.

Rezultatele experimentale, efectuate pe șoareci cu xenogrefe tumorale de tip B16F1/B16F10, înregistrate în urma finalizării studiului care a urmărit evaluarea acțiunii dispersiei de nanoparticule prin administrarea buvabilă a acestora, au fost:

- dezvoltarea tumorilor la locul de implantare la 90% din animalele luate în studiu;
- creșterea duratei de viață doar în cazul animalelor care au primit zilnic disperse de nanoparticule în apa de băut (0,5 mL:4,5 mL)
- reducerea apariției numărului de metastaze, similar cu evoluția xenogrefelor tumorale implantate pe CAM și tratate iv cu MNP

CONCLUZII

1. În urma folosirii metodei Massart modificată s-au sintetizat nanoparticule de oxid de fier cu înveliș de acid salicilic, a căror structură a fost confirmată prin metode specifice: microscopie TEM, spectrometrie FT-IR, DLS, XRD, gravimetrie.
2. Nanoparticulele de Fe_3O_4 /acid salicilic sintetizate și testate în studiile ulterioare au avut diametrul mediu de 60,3 nm și un potențial Zeta de 67 mV, caracteristici care le conferă o stabilitate crescută a dispersiei apoase.
3. Testarea *in vivo* a dispersiei de nanoparticule feromagnetice cu înveliș de acid salicilic, realizată pe vasele membranei corioalantoidiene a embrionului de pui, a demonstrat biocompatibilitatea crescută în urma administrării intravenoase. Rata de supraviețuire a embrionilor luați în studiu a fost de peste 80%, aceștia prezentând evoluție și dezvoltare în parametrii normali.
4. În funcție de doza de MNP administrată s-a observat existența unei capacități de reținere rapidă a nanoparticulelor la nivelul structurilor embrionului, iar pentru dozele care depășesc capacitatea de reținere rapidă a nanoparticulelor, se poate evidenția o persistență de lungă durată (peste 12 ore) în circulația sistemică.
5. Din punct de vedere al comportamentului intravascular, dispersia de MNP a dovedit un risc de embolizare scăzut, în urma administrării enterale și parenterale.
6. Posibilitatea direcționării și acumulării nanoparticulelor în vasele tumorale cu ajutorul câmpului magnetic static, sugerează posibilitatea utilizării în domeniul biomedical al nanoparticulelor feromagnetice cu înveliș de acid salicilic, prin posibilitatea controlului magnetic al blocării fluxului sanguin din zona de interes (vase tumorale).
7. Studiul *in vitro* realizat pe linii celulare de glioblastom și fibroblaști umani, evidențiază faptul că, în urma tratării celulelor cu concentrații mici de MNP, pentru o perioadă de 24, 48 și 72 de ore, nu s-a înregistrat efect citotoxic.
8. Rezultatele obținute în urma testării *in vivo* a acțiunii dispersiei de MNP administrată intravenos asupra xenogrefelor tumorale de glioblastom și de cancer mamar implantate pe CAM, au pus în evidență o blocare a dezvoltării xenogrefelor tumorale și a tendinței de metastazare perivasculară a acesteia. În urma acestui experiment este greu de afirmat dacă efectul de blocare al dezvoltării xenogrefei tumorale se datorează acțiunii directe a nanoparticulelor sau efectului de reducere a fluxului sanguin la nivelul xenogrefei, prin nanoblocajul în câmp magnetic al vaselor membranei corioalantoidiene din vecinătate, răspunzătoare de susținerea viabilității xenogrefei.
9. Testarea acțiunii dispersiei de nanoparticule administrată buvabil, la șoareci rasa C57BL/6 cu xenogrefe tumorale de tip B16F10 și B16F1, a evidențiat faptul că animalele tratate au avut o durată de viață mai mare decât animale aparținând loturilor martor; de asemenea, la animalele tratate a fost observată o frecvență scăzută a dezvoltării metastazelor, comparativ cu animalele martor.

Bibliografie selectivă

1. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17-MR71.
2. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.
3. Ou Q, Zhou L, Zhao S, Geng H, Hao J, Xu Y, et al. Self-templated synthesis of bifunctional Fe₃O₄@MgSiO₃ magnetic sub-microspheres for toxic metal ions removal. *Chemical Engineering Journal*. 2012;180:121-7.
4. Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005;293(1):483-96.
5. Medeiros S, Santos A, Fessi H, Elaissari A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International journal of pharmaceutics*. 2011;403(1):139-61.
6. Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Souce M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2013;169(1):48-61.
7. Spanel-Borowski K. The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials. *Research in Experimental Medicine*. 1989;189(1):69-75.
8. Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM, Stark GB. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue engineering*. 2003;9(3):441-50.
9. Klueh U, Dorsky DI, Moussy F, Kreutzer DL. Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel model for evaluation of tissue responses to biomaterials and implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;67(3):838-43.
10. Valdes T, Klueh U, Kreutzer D, Moussy F. Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for testing biosensors. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;67(1):215-23.
11. Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*. 2003;3(2):155-85.
12. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(6):1119-30.
13. Demir R, Dimmler A, Naschberger E, Demir I, Papadopoulos T, Melling N, et al. Malignant progression of invasive tumour cells seen in hypoxia present an accumulation of β -catenin in the nucleus at the tumour front. *Experimental and molecular pathology*. 2009;87(2):109-16.
14. Strojnik T, Kavalar R, Barone TA, Plunkett RJ. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. *Anticancer research*. 2010;30(12):4851-60.
15. Wittig-Blaich SM, Kacprzyk LA, Eismann T, Bewerunge-Hudler M, Kruse P, Winkler E, et al. Matrix-dependent regulation of AKT in Hepsin-overexpressing PC3 prostate cancer cells. *Neoplasia*. 2011;13(7):579-IN2.
16. Taizi M, Deutsch VR, Leitner A, Ohana A, Goldstein RS. A novel and rapid in vivo system for testing therapeutics on human leukemias. *Experimental hematology*. 2006;34(12):1698-708.
17. Balke M, Neumann A, Kersting C, Agelopoulos K, Gebert C, Gosheger G, et al. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC research notes*. 2010;3(1):58.
18. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(8):9959-70.
19. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
20. Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *International review of cell and molecular biology*. 2008;270:181-224.
21. Mihaiescu DE, **Buteică AS**, Neamțu J, Istrati D, Mîndrilă I. Fe₃O₄/Salicylic acid nanoparticles behavior on chick CAM vasculature. *Journal of nanoparticle research*. 2013;15(8):1-10.

22. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(9):654-8.
23. Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC cancer*. 2014;14(1):339.
24. Lugassy C, Vernon SE, Busam K, Engbring JA, Welch DR, Poulos EG, et al. Angiotropism of human melanoma: studies involving in transit and other cutaneous metastases and the chicken chorioallantoic membrane: implications for extravascular melanoma invasion and metastasis. *The American journal of dermatopathology*. 2006;28(3):187.
25. **Alice Sandra Buteică**, M. Meșină, B. Mîndrilă, I. Mîndrilă. IN VIVO MODELS COMBINATION FOR B16 MURINE MELANOMA STUDY. *Revista Romana de Anatomie functionala si clinica, macro- si microscopica si de Antropologie*. 2014;Vol. XIII (2):143-7.
26. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behavior genetics*. 2002;32(6):435-43.