

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

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonatori științifici:

CS I Dr Monica Focșan

Conf Dr Dana Maniu

Absolvent:

Daria Ioana Stoia

Cluj-Napoca

2023

Universitatea „Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca
Facultatea de Fizică
Specializarea Biofizică și Fizică medicală

LUCRARE DE DISERTAȚIE

**Microcapsule polimerice hibride pentru livrarea țintită și eliberarea
stimulată în NIR a moleculei terapeutice Avastin la nivelul retinei
umane**

Coordonatori științifici:
CS I Dr Monica Focșan
Conf Dr Dana Maniu

Absolvent:
Daria Ioana Stoia

Cluj-Napoca
2023

Abstract

One of the major challenge faced in biomedicine is represented by inefficient drug administration at the posterior segment of the eye. Herein, we propose an innovative and minimally invasive strategy to treat diabetic retinopathy, a diabetic complication of the eye. We reported novel NIR light-responsive hybrid microcapsule that present excellent loading efficiency of a NIR photothermally-active fluorophore – 75% – and an even better ability to bind on their surface the therapeutic drug Avastin – 98%. These polymeric hybrid microcapsules, developed through the Layer-by-Layer deposition technique, act as microcarriers for the targeted delivery of Avastin at retina level, while releasing the therapeutic drug *in vitro* under NIR laser exposure. The Avastin-targeted microsystem was developed and evaluated in terms of morphology, phototherapeutic capacity, NIR-light stimulated release and their ability to act as fluorescent contrast agents for *in vitro* imaging. According to Re-Scanning Microscopy and Scanning Electron Microscopy imaging, we obtained $4.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ spherical microcapsules, that successfully preserved their stability in time over a 7 months period. The binding of the Avastin onto the microsystem's surfaces was demonstrated *via* several spectroscopic methods. We first evaluated the capacity of the microsystem to act as phototherapeutic agents in solution, followed by the investigation of the shell's rupture and the release of therapeutic drug *in vitro* in human retina cells. Using the WST-1 assay, we demonstrated the biocompatibility of the microcapsules. Conventional Fluorescence Microscopy, 3D Confocal Microscopy and Transmission Electron Microscopy were employed for the microcapsule's localization inside human D407 retina cells. Last but not least, we induced diabetes to the retina cells and evaluated the therapeutic effect of Avastin-conjugated microsystem upon NIR irradiation. The therapeutic effect of the as-presented hybrid microsystem was validated *in vitro*, proving its capacity to act as effective drug delivery and release system to replace conventional diabetic retinopathy treatment strategies.

Cuprins

Introducere	4
Capitolul I: Avantajul nanotehnologiei în dezvoltarea tratamentelor alternative în domeniul biomedical	6
I.1 Retinopatia diabetică și tratamentele actuale.....	7
I.2 Metode de livrare la nivelul retinei umane.....	9
I.3 Sisteme noi de livrare de agenți terapeutici anti-VEGF în segmentul ocular posterior	11
Capitolul II: Tehnici și metode experimentale	17
II.1 Materiale.....	17
II.2 Metode.....	17
II.2.1 Sinteza microcapsulelor polimerice hibride conjugate cu Avastin.....	17
II.2.2 Eficiența de încărcare a fluoroforului ICG.....	18
II.2.3 Eficiența de conjugare a agentului terapeutic Avastin.....	19
II.2.4 Caracterizarea optică și morfologică a microcapsulelor hibride.....	19
II.2.5 Studiul eliberării medicamentului Avastin în soluție în urma iradierii cu laseri în NIR.....	21
II.2.6 Testarea viabilității celulare	21
II.2.7 Imagistică <i>in vitro</i>	22
II.2.8 Eliberarea fotoindusă <i>in vitro</i> a medicamentului Avastin	23
Capitolul III: Rezultate experimentale și discuții	25
III.1 Fabricarea și caracterizarea microcapsulelor hibride conjugate cu Avastin.....	25
III.2 Eficiența de încărcare a fluoroforului ICG și eficiența de conjugare a moleculei terapeutice.....	29
III.3 Evaluarea performanțelor fototerapeutice a microcapsulelor hibride targetate cu Avastin la iradierea în soluție.....	29
III.4 Studii de citotoxicitate celulară <i>in vitro</i>	33
III.5 Imagistică <i>in vitro</i>	34
III.6 Iradierea celulelor <i>in vitro</i> și analiza citotoxicității în condiții simulate de retinopatie diabetică.....	37
Concluzii finale și perspective viitoare	40
Bibliografie	

Introducere

În ultimii ani s-au raportat tot mai multe persoane care suferă de diabet ¹, o boală metabolică care vine la pachet cu multe alte afecțiuni și care nu afectează doar persoanele înaintate în vârstă, ci și pe cei tineri. Astfel, personalul medical împreună cu oamenii de știință caută noi tratamente inovative și minim invazive pentru lupta împotriva diabetului și a afecțiunii acestuia. Dezvoltarea și implementarea de noi agenți terapeutici din domeniul nanotehnologiei promite a aduce mari progrese în combaterea și prevenirea acestei boli. În acest context, dezvoltarea microcapsulelor polimerice hibride ca agenți terapeutici eficienți în domeniul NIR, cu proprietatea de a livra țintit molecule terapeutice de interes și de a elibera controlat medicamente la nivel celular, este extrem de importantă în aplicații clinice, ca scheme alternative de tratament.

Concret, în lucrarea de față mi-am propus să realizez, printr-un protocol de sinteză dezvoltat și optimizat de către mine, în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bionanoștiințe, un sistem de livrare versatil compus din microcapsule polimerice pe baza unui miez de carbonat de calciu, prin tehnica de depunere strat-cu-strat, pentru a administra țintit molecule terapeutice la nivelul retinei umane. Mai mult, mi-am propus să înglobez între straturile de polielectroliți, un fluorofor activ în NIR, atât pentru dezvoltarea microsistemului ca agent de contrast fluorescent, dar și pentru a beneficia de proprietatea sa fototerapeutică. Mai exact, am sintetizat microcapsulele hibride prin adăugarea succesivă a doi polielectroliți cu sarcini opuse pe un miez de carbonat de calciu. Fluoroforul activ în NIR a fost înglobat între straturile de polielectroliți iar în final, stratul exterior a fost decorat cu molecula terapeutică de interes. Astfel, am dezvoltat agenți terapeutici sub forma unor microcărăuși pentru a livra țintit și a elibera fotoindus medicamentul la nivelul celulelor de retină, pentru a trata retinopatia diabetică.

Lucrarea de față este structurată în patru capitole. **Primul capitol** oferă o prezentare generală a retinopatiei diabetice, a modurilor actuale de livrare de molecule terapeutice în regiunea posterioară a ochiului, cu avantaje și dezavantaje, și prezintă sistemele noi de livrare dezvoltate în ultimii ani. În plus, prezintă componenta teoretică a terapiei laser, mai exact a terapiei fototermice, împreună cu nevoia utilizării domeniului NIR pentru aplicații laser în domeniul biomedical.

Al doilea capitol descrie protocolul implementat pentru dezvoltarea microcapsulelor polimerice hibride și targetate cu molecula terapeutică folosit în lucrarea de față împreună cu metodele utilizate pentru a studia eficiența de încărcare a fluoroforului și eficiența de conjugare a medicamentului. De asemenea, prezintă tehnicile spectroscopice (spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR, spectrofluometria, potențialul zeta, spectroscopia de absorbție FT-IR) și tehnicile microscopice (microscopia electronică de baleiaj, microscopia de fluorescență confocală) utilizate

în caracterizarea optică, respectiv morfologică a microsistemului. Tot în acest capitol am explicat tehnica utilizată pentru evaluarea efectului fototerapeutic al microcapsulelor în soluție în urma iradierii și am prezentat metoda de calcul pentru coeficientul fototermic de conversie. Mai mult, sunt prezentate testele utilizate pentru analizarea viabilității microcapsulelor *in vitro* în celule umane și tehnicile de microscopie utilizate pentru a localiza și monitoriza microsistemului în interiorul celulelor umane (microscopia de fluorescență convențională, microscopia confocală cu re-scanare, microscopia electronică în transmisie).

În capitolul al treilea am prezentat rezultatele experimentale obținute împreună cu discuții pe baza spectrelor și a imaginilor de microscopie. Am caracterizat riguros microcapsulele hibride în comparație cu microcapsulele încărcate doar cu fluorofor, fără medicament. Am dovedit legarea cu succes a medicamentului de suprafața microcapsulelor prin trei tehnici de spectroscopie diferite. Am prezentat efectul fototermic indus de proprietățile optice a fluoroforului în NIR și am testat eliberarea medicamentului atât în soluție cât și *in vitro* în celule umane ca răspuns la expunerea la lumină din domeniul spectral NIR. De asemenea, am studiat viabilitatea celulelor umane tratate cu microcapsule hibride înainte și în urma iradierii, utilizând testul WST-1.

În final, **ultimul capitol** sumarizează concluziile și perspectivele de viitor a acestei lucrări.

Rezultatele obținute în lucrarea de față au fost diseminate în două articole științifice, în calitate de prim-autor, publicate în reviste internaționale ISI. Primul articol, intitulat „*Hybrid polymeric therapeutic microcarriers for thermoplasmonic-triggered release of resveratrol*” a fost publicat în *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (IF: 5.999), iar al doilea articol, „*NIR photothermal-activable drug-conjugated microcapsules for in vitro targeted delivery and release: an alternative treatment of diabetic retinopathy*” a fost publicat în *International Journal of Pharmaceutics* (IF: 6.51). De asemenea, rezultatele experimentale au fost prezentate la două conferințe internaționale: ”Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences – IC-ANMBES 2022” (8 – 10 Iunie 2022, Brașov, România) și ”The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Material – ICM2022” (19 – 21 Octombrie 2022, Barcelona, Spania).

Mai mult, pe perioada masteratului, am efectuat un stagiul de practică de 4 luni la Universitatea din Messina, Italia, sub îndrumarea Prof. Dr. Anna Piperno, în care am studiat interacțiunea grafenei cu un polimer biocompatibil. În cele din urmă, am dezvoltat cu succes un sistem de livrare pe bază de grafenă conjugată cu polimer, peste care am legat electrostatic nanobipiramide de aur pentru a obține efectul fototerapeutic în NIR. Rezultatele experimentale sunt în curs de redactare și de trimitere spre publicare.

Capitolul I: Avantajul nanotehnologiei în dezvoltarea tratamentelor alternative în domeniul biomedical

Nanotehnologia este știința care studiază proprietățile, caracteristicile și aplicațiile materialelor din domeniul 0.1 – 100 nm. Atunci când dimensiunea materialelor se află pe scală nanometrică, toate proprietățile acestor materiale se modifică și apar proprietăți noi, unice. Acest domeniu științific este într-o continuă dezvoltare și este utilizat într-o gamă largă de domenii: de la electronică, chimie, biologice, științe ale mediului, biomateriale energetice, până la aplicații medicale. În medicină, nanotehnologia se utilizează pentru a obține și a dezvolta tratamente alternative care se bazează pe: i) nanoparticule cu suprafața funcționalizată, pentru livrarea țintită; ii) nanoparticule hibrid care să acționeze și se elibereze molecule terapeutice controlat, ca răspuns la un stimul; iii) nanoparticule ”cărăuș”, care să posede proprietatea de a îngloba și transporta o cantitate mare de medicament; și multe alte nanoparticule cu proprietăți excepționale, care să ofere noi metode de tratament, noi direcții de dezvoltare de medicamente și în special să ofere posibilitatea de a prezice și a monitoriza boli ². Nanotehnologia a adus mari progrese în depistarea, monitorizarea și tratarea bolilor, iar pacienții care suferă de diabet s-au bucurat la rândul lor de aplicațiile acestui domeniu.

Diabetul se numără printre cele mai frecvente boli cronice răspândite în întreaga lume, cu o creștere dramatică în numărul victimelor ce suferă de complicații severe care apar ca urmare a acestei boli ³. Diabetul este o boală metabolică care afectează o mare parte a populației din întreaga lume cu vârstă înaintată, în special diabetul de tip II care este responsabil pentru 80% din totalul cazurilor de diabet în întreaga lume și care este asociat cu obezitatea și cu un stil de viață nesănătos ^{4,5}. Concentrația de glucoză din sânge este reglată de către două componente în corpul uman: i) celulele beta, care secretă insulină; și ii) țesutul sensibil la insulină (ex: ficat, țesut, mușchi), care răspunde la producerea de insulină. Incapacitatea celulelor beta de a secreta insulină, rezistența țesutului de a răspunde la producerea insulinei sau o combinație între aceste două fenomene apare ca urmare a unui dezechilibru al concentrației glucozei din sânge ⁶. Diferența între diabetul de tip I (cel insulino-dependent) și tip II stă în faptul că diabetul de tip I este o boală moștenită genetic, care se declanșează la pacienți tineri, în timp ce diabetul de tip II se dezvoltă în timp datorită stilului de viață nesănătos. Celulele beta din pancreas, cele care produc insulină, sunt atacate și apoi distruse de către sistemul imunitar în cazul diabetului de tip I ⁷. Prin urmare, diabetul necontrolat poate duce la complicații serioase pe termen lung, afectând sănătatea și viața de zi cu zi a bolnavilor.

I.1 Retinoapția diabetică și tratamente actuale

Una dintre cele mai serioase și agresive complicații întâlnite în pacienții care suferă de diabet este retinopatia diabetică (RD), o boală ce afectează atât nervul optic cât și retina ^{8,9}. Din cauza hiperglicemiei, vasele de sânge din retină suferă de un nivel ridicat de zahăr și astfel crește permeabilitatea vasculară, care duce la acumularea de fluid în jurul retinei și cauzează apariția edemului și necroza celulelor nervoase. Nivelul ridicat de zahăr în sânge provoacă de asemenea deteriorarea barierei sânge-retină și favorizează proliferarea de noi vase de sânge, care promovează la rândul lor dezlipirea retinei ². Mai mult, această complicație este caracterizată de ischemie și de inflamații oculare care se pot agrava și pot provoca deficiențe și tulburări vizuale, iar în final orbire ^{4,9}. Din nefericire, peste 2.6 milioane de oameni în întreaga lume suferă pierderi semnificative de vedere cauzate de RD ¹⁰. Astfel, pacienților le este afectată dramatic activitatea zilnică și calitatea vieții este scăzută ⁴. Momentan, tratamentele curente ce se administrează pentru a minimiza și a trata RD sunt bazate pe administrarea orală de medicamente, injecții intraoculare cu anti- factori de creștere endoteliali vasculari (eng. *anti-vascular endothelial growth factors* - anti-VEGF) - ex: Bevacizumab, Ranibizumab – sau administrarea de corticosteroizi în paralel cu fotocoagulare laser ^{9,11,12}. Însă, majoritatea medicamentelor utilizate în tratarea RD nu prezintă doar efecte secundare severe, ci sunt dificil de livrat sau ineficiente ¹³.

Terapia ce se bazează pe administrarea de medicamente este dezvoltată în așa fel încât acestea să reducă permeabilitatea vasculară pentru a scădea expresia VEGF. Ca urmare a selectivității și a sensibilității mari a anticorpilor monoclonali, aceștia sunt exploatați în prezent în tratarea RD, a cancerului și a altor afecțiuni ¹⁴. Medicamentele de tipul anti-VEGF inhibă acești factori VEGF și reduc astfel formarea neovascularizării în zona retinei ². În momentul de față, sunt trei medicamente anti-VEGF disponibile – Bevacizumab, Ranibizumab și Aflibercept – ce sunt utilizate la scală largă în combaterea degenerării maculare neovasculare, ce apare odată cu înaintarea în vârstă, și sunt utilizate la nivel global în tratarea complicațiilor cauzate de VEGF ^{15,16}. Mai exact, Avastin – medicament ce conține Bevacizumab ca moleculă activă – este un anticorp IgG1 monoclonal umanizat, aprobat de către Administrația pentru Alimente și Medicamente (eng. *Food and Drug Administration* – FDA), ce țintește factorii VEGF și neutralizează toate isoformele de VEGF-A pentru a preveni evoluția tumorilor ¹⁴. Totodată, un neajuns important al anticorpului Avastin îl reprezintă timpul de viață intravitreal relativ scurt al acestuia, fiind necesare administrări intraoculare dese pentru a menține eficiența terapeutică dorită ^{17,18}. Aceste administrări frecvente prin injecții intraoculare sunt neeficiente și cauzează reacții adverse severe, cum ar fi inflamații intraoculare, infecții și detașări a retinei, reprezentând un disconfort major pentru pacienți ¹⁸.

O altă strategie de tratament împotriva RD este terapia laser ². Prin iradierea retinei cu lumină din spectrul vizibil, fasciculul laser este absorbit și acumulat în mare măsură de melanina din bariera de celule epiteliale pigmentate de retină (RPE), unde se produce încălzirea locală și implicit moartea celulelor RPE prin hipertermie, fără a distruge fotoreceptorii, în final vindecând țesutul vizat ¹⁹. Cu toate acestea, terapia laser poate distruge o mare parte a celulelor de retină și poate cauza tulburări vizuale permanente ²⁰. Terapia cu laser pentru fotocoagulare poate încetini proprietatea ochilor de a se adapta de la lumină la întuneric și poate deforma vederea nocturnă ^{21,22}. Fotocoagularea laser a retinei blochează în mare parte zonele ischemice din jurul retinei și scade posibilitatea hemoragiilor intraoculare. Însă, cel mai mare dezavantaj îl reprezintă necesitatea a minim două operații chirurgicale pentru a conserva retina în stare bună ²³.

Terapia fotodinamică (eng. *Photodynamic therapy* – PDT) se numără printre strategiile de tratare a RD. Această terapie utilizează laseri în infraroșu apropiat (eng. *near infrared* – NIR) de lungime de undă 689 nm, ce au energie joasă, pentru a activa moleculele fotosensibilizatoare și a ținti neovascularizațiile retinei ⁹. PDT se bazează pe administrarea sistemică de verteporfin, molecula fotosensibilizatoare, care se distribuie țintit la endoteliul neovascularizat, iar în urma expunerii la laserul NIR, aceasta se activează. Când verteporfin se activează cu succes în prezența oxigenului, acesta produce radicali liberi care au proprietatea de a deteriora regiunea activată ²⁴.

O altă metodă de tratare a RD și a altor afecțiuni oculare, ce utilizează laseri, este terapia fototermică (eng. *Photothermal therapy* – PTT). Această terapie implică două elemente, și anume: i) radiația electromagnetică de o anumită lungime de undă și ii) molecule fotosensibilizatoare, care au rolul de a absorbi radiația și de a converti energia în căldură. Concret, în urma expunerii agenților fotosensibilizatori la radiația electromagnetică, aceștia trec într-o stare excitată superioară, ca mai apoi să se dezexcite pe nivelul fundamental prin diferite procese de eliberare de energie, printre care se numără procesul neradiativ de generare de căldură. Datorită acestei încălziri, proteinele și componentele celulare din vecinătatea agentului fotosensibilizator denaturează, determinând diferite procese terapeutice. Nanoparticulele de aur (AuNPs) dețin proprietatea de a absorbi o cantitate mare de energie de diferite lungimi de undă, datorită benzilor plasmonice ²⁵. Aceste nanoparticule metalice au fost utilizate în ultimii ani în tratarea afecțiunilor oculare prin PTT. Din păcate, operația pentru tratarea cataractei poate duce la opacificarea capsulei posterioare ²⁶. Valorificând AuNPs și proprietățile fototerapeutice a acestora, s-a modificat o lentilă intraoculară ce se utilizează în tratarea cataractei ²⁷. Aceste lentile intraoculare comerciale au fost funcționalizate cu AuNPs și iradiate cu un laser de 808 nm. Fotonii laserului au penetrat barierele oculare a unor șoareci utilizați în acest studiu și au exercitat efectul fototermic. Autorii

acestui articol au raportat succesul studiului, obținând o scădere de 60% în opacificarea capsulei posterioare, în doar 30 de zile de la tratament.

Pentru acest tip de terapie, se pot utiliza unde electromagnetice din diferite domenii, de la microunde, vizibil sau infraroșu ²⁸. Însă, pentru aplicații biomedicale, radiația electromagnetică din domeniul NIR (700 – 1400 nm) este ideală, deoarece aceasta penetrează țesutul mai în profunzime (de la 500 μm până la 1-2 cm) și fluidele și țesuturile biologice prezintă un minim de absorbție în această regiune. În acest domeniu, căldura indusă de radiația laser în NIR este generată doar de agenții PTT, de fotosensibilizatori, iar țesutul biologic din jur nu este afectat de această expunere la laser ²⁹.

I.2 Metode de livrare la nivelul retinei umane

În timp ce administrarea de medicamente anti-VEGF reprezintă o metodă terapeutică eficientă în tratarea multiplelor boli ale retinei, această metodă de tratament prezintă și neajunsuri. Dezavantajul utilizării anti-VEGF este în primul rând reprezentat de modul de administrare. Acestea trebuie administrate în multiple injecții intravitroase pentru a obține efectul terapeutic dorit. Spre deosebire de administrarea topică, injecțiile intraoculare generează o varietate de complicații oculare, de la hemoragie subconjunctivală, presiune intraoculară crescută, dezlipirea retinei, risc crescut de inflamații, până la endoftalmită cu risc crescut de pierdere a vederii ³⁰⁻³². În ciuda evoluției medicale și a farmaceuticelor, administrarea de durată și minim invazivă a unei concentrații eficiente de factori anti-VEGF în regiunea oculară posterioară rămâne o provocare. Ochiul este împărțit anatomic în două regiuni, regiunea anterioară și regiunea posterioară (**Fig. I.1**). Medicamentele pot ajunge la segmentul anterior prin diferite metode de administrare: administrare topică, aplicații perioculare, injecții intraoculare sau administrare sistemică. Însă, fiecare dintre aceste metode de administrare trebuie să treacă prin mai multe bariere anatomice și fiziologice ale ochiului, pentru a ajunge la segmentul posterior, scăzând astfel concentrația de medicament și eficacitatea acestuia ³³.

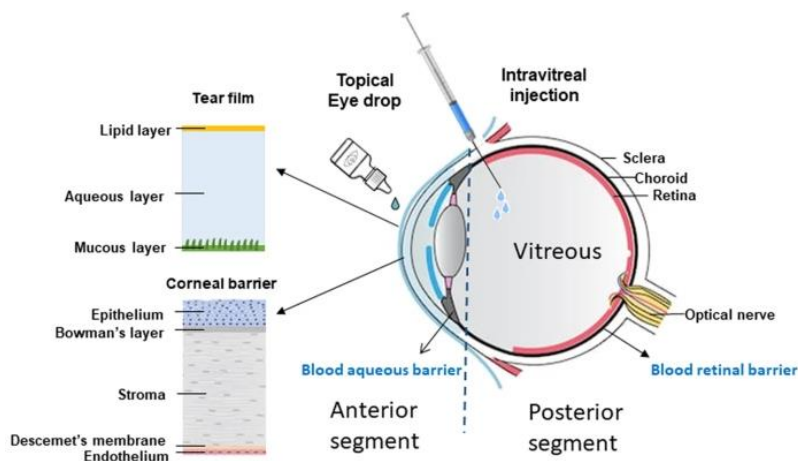


Fig. I.1 Segmentele anterioare și posterioare ale globului ocular, împreună cu barierele de care trebuie să treacă factorii anti-VEGF pentru a ajunge la retină. Figură preluată din ¹².

Administrarea topică de medicamente, prin picături sau unguente, este o metodă non invazivă de livrare de medicamente pe suprafața oculară. Această metodă de administrare se pretează pentru livrarea de medicamente în segmentul anterior al ochiului, fiind foarte dificil de utilizat pentru a livra concentrații eficiente de medicament în regiunea posterioară. Factorii anti-VEGF administrați topic trebuie să traverseze mai multe straturi ale corneei și să treacă prin multiple bariere ca să penetreze cu succes straturile interioare ale retinei și să ajungă la vasele de sânge ³⁴. Chiar dacă suficiente molecule terapeutice trec cu succes de stromă, fibrele de collagen, care sunt foarte bine aranjate și au o permeabilitate scăzută, împiedică traversarea moleculelor ³⁵. Cel mult 5% din cantitatea de molecule terapeutice aplicate topic penetrează cu succes suprafața oculară ³⁶, iar la țesutul retinei, în segmentul posterior, ajunge mai puțin de 0.0001% din concentrația medicamentului administrat ³⁷⁻³⁹.

Cu toate că au fost raportate metodele de administrare trans-conjunctivale și trans-scleare, acestea prezintă eficiență scăzută și limitată în administrarea factorilor anti-VEGF ⁴⁰. Medicamentele administrate prin această metodă difuzează prin conjunctivă spre scleră și în coroid înainte de a ajunge la retină, astfel determinând eliminarea rapidă a medicamentului și administrarea unei doze sub-terapeutice la nivelul retinei ¹².

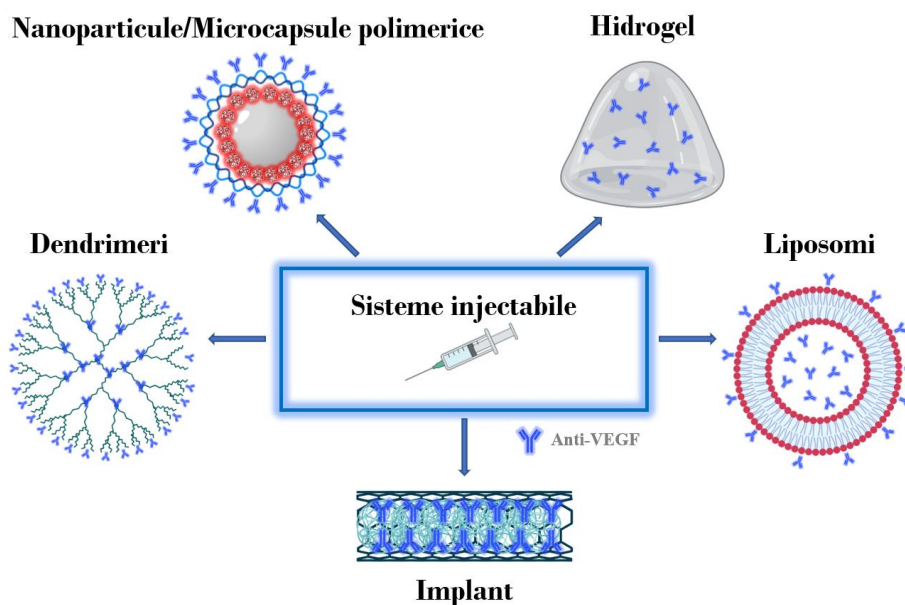
Administrarea perioculară reprezintă administrarea medicamentelor în imediata vecinătate a globului ocular, mai exact în zona subconjunctivală, peribulbară sau juxtascleral posterioară ⁴¹. Prin aceste metode, medicamentele sunt administrate direct în țesutul ocular și astfel, acestea pot penetra cu succes sclera, coroidul și celulele RPE ⁴². Cu toate că riscul expunerii corneei este scăzut, expunerea la doze mari de medicamente a conjunctivalului și a sclerei poate duce la toxicitate oculară mare ⁴³.

Administrarea factorilor anti-VEGF prin injecții intraoculare este singura metodă eficientă care livrează 100% din cantitatea de medicament administrată în zona posterioară țintită și care deține un risc scăzut de toxicitate asupra segmentului anterior al ochiului ⁴³⁻⁴⁵. Injecțiile intraoculare reprezintă standardul de aur a administrării tratamentelor terapeutice în regiunea posterioară a ochiului și presupun injectarea unei substanțe lichide, printr-un ac de dimensiuni foarte mici, direct în umoarea vitroasă ⁹. Prin administrarea intravitreală, concentrația medicamentelor este maximă în momentul administrării injecției și scade în timp datorită eliminării medicamentului ⁴⁶. Cu toate că administrarea medicamentelor prin injecții intraoculare reprezintă cea mai frecventă și eficientă metodă de a livra molecule terapeutice în regiunea posterioară a ochiului, este totuși asociată cu multiple dezavantaje și neajunsuri, cum ar fi: riscul ca pacientul să dezvolte endoftalmită, dezlipire de retină, hemoragie oculară sau presiune intraoculară crescută ^{30,32}. Nevoia administrării injecțiilor intraoculare repetate, lunar sau chiar de mai multe ori pe lună, nu crește doar riscurile menționate mai sus, ci este un inconvenient major pentru pacienți. Mulți dintre ei întrerup tratamentul din cauza neplăcerii cauzate de către aceste injecții, scăzând astfel eficiența medicamentului ⁴⁷⁻⁴⁹.

I.3 Sisteme noi de livrare de agenți terapeutici anti-VEGF în segmentul ocular posterior

În contextul clinic actual, este nevoie urgentă de dezvoltare a unor sisteme de livrare noi și sustenabile de factori anti-VEGF la nivelul retinei umane pentru a trata RD. Este nevoie de sisteme care să scadă toxicitatea administrării anti-VEGF și care să reducă povara acestor tratamente atât asupra pacienților, cât și a personalului medical și a sistemului sanitar.

Biomaterialele utilizate în livrarea intraoculară de medicamente trebuie să îndeplinească următoarele condiții: i) să posede o eficiență de încapsulare mare a medicamentului de interes; ii) livrare țintită; iii) eliberarea agenților anti-VEGF pe termen lung; iv) să prezinte sensibilitate la lumină; v) stabilitate și în final vi) să fie biocompatibile. În momentul de față, sistemele de livrare de medicamente în zona oculară posterioară se pot împărți în două categorii: implanturi și nanomateriale lichide (**Schema 1**).



Schema I.1 Biomateriale și dispozitive injectabile utilizate pentru a livra agenți anti-VEGF în sectorul posterior al globului ocular.

Implanturile sunt dispozitive introduse chirurgical în anumite țesuturi oculare pentru a elibera medicamente pe termen lung. Aceste implanturi oculare pot fi amplasate în multiple regiuni ale ochiului, dar cel mai des se amplasează în umoarea vitreoasă de unde ajunge cea mai mare cantitate de medicament în segmentul posterior, la retină⁵⁰. În zilele noastre, există câteva implanturi comerciale aprobate de FDA, care livrează cu succes medicamente în regiunea posterioară a ochiului. Implantul OZURDEX[®] a fost aprobat de FDA în 2009 și conține medicamentul Dexametazona. Acest medicament este dispersat în matricea unui polimer biocompatibil, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), făcând ca dispozitivul să fie biodegradabil. Acesta se administrează ocular prin injecții intravitreale și exercită eliberarea medicamentului pe o perioadă de 4 luni^{51,52}. RETISERT[®] este un implant non-biodegradabil, aprobat de FDA în 2005, ce conține medicamentul Fluocinolon acetonid. Acest dispozitiv are un rezervor în care este încărcat medicamentul iar acest rezervor deține un orificiu într-o membrană de PVA prin care se eliberează mecanic medicamentul pe o perioadă de 2 ani și jumătate^{53,54}. În 2021 a fost aprobat de FDA implantul SUSIVMO[®], un dispozitiv reîncărcabil, înglobat cu agenți anti-VEGF Ranibizumab și care se inserează intraocular printr-o incizie chirurgicală. Acest implant non-biodegradabil asigură eliberarea moleculelor terapeutice pe o perioadă de 6 luni^{55,56}.

Sistemele de livrare de medicamente pe bază de polimeri sunt din ce în ce mai căutate și dezvoltate pentru aplicații de eliberare intraoculară de medicamente. În comparație cu implanturile, care sunt de cele mai multe ori non-biodegradabile, nanoparticulele (NPs) și microcapsulele (MCs) polimerice sunt în general biodegradabile și biocompatibile. NPs au în

general o dimensiune cuprinsă între 1 – 1000 nm, în timp ce MCs prezintă dimensiuni de 1 – 1000 μm ¹². Polimerii biodegradabili utilizați în dezvoltarea NPs sau MCs pot fi produși atât sintetic, cât și natural⁵⁷. Cei mai comuni polimeri sintetici sunt acidul polilactic (PLA), PLGA și poly(styrene sulfonic acid) sodium salt (PSS)^{58–60}, iar albumina și chitosanul sunt doi dintre cei mai comuni polimeri naturali^{57,61–63}. Medicamentul de interes se poate incorpora prin mai multe metode în particulele polimerice, în funcție de proprietățile și aplicațiile dorite. Acesta poate sta la baza particulelor, drept ”miez”, peste care se adaugă straturi de polimeri, poate fi dispersat în matricea polimerică sau poate funcționaliza suprafața particulei de polimer pentru a oferi o livrare țintită, tehnică des întâlnită în NPs și MCs dezvoltate pentru aplicații oncologice⁶⁴. Biocompatibilitatea, cinetica eliberării medicamentului și înglobarea sa sunt influențate de dimensiunea NPs sau MCs. O provocare majoră în dezvoltarea sistemelor de livrare de medicamente pe bază de NPs/MCs o reprezintă dezvoltarea acestor particule de dimensiuni ideale, pentru a obține caracteristicile menționate anterior, deoarece dimensiunea particulelor determină rata la care se eliberează molecula terapeutică încapsulată⁶⁵. Medicamentul Avastin a fost încapsulat cu succes în MCs compuse din miez de chitosan și un strat de polimer PCL¹⁷. Aceste MCs polimerice au realizat o eliberare inițială a medicamentului de 25% în primele zile de la administrare, urmată de eliberare pe termen lung pe o perioadă de 6 luni. Același medicament a fost utilizat pentru a acoperi NPs de PLA prin liofilizare⁶⁶. Aceste PLA-Avastin NPs au fost apoi amestecate cu MCs de PLGA. Prin expunerea la CO₂ supercritic, au rezultat particule de PLGA poroase cu micropori în care se regăseau NPs cu medicament. Studiile *in vitro* au demonstrat o eliberare inițială de 25% și o eliberare pe termen lung timp de 4 luni, în timp ce studiile *in vivo* pe șoricei au demonstrat o eliberare pe termen lung pe o perioadă de 2 luni. J. Liu *et al.*⁶⁷ au folosit o altă abordare. Aceștia au dezvoltat prima dată NPs polimerice înglobate cu medicamentul Dexamteazona, peste care au prins covalent sau electrostatic medicamentul Avastin. Rezultatele *in vitro* a acestui studiu au demonstrat eliberarea prelungită pe o perioadă de cel puțin 5 zile, în timp ce rezultatele *in vivo* pe iepuri au demonstrat eliberarea prelungită pe o perioadă de 28 de zile.

Hidrogelul este un material bifazic, format dintr-o rețea 3D de polimeri hidrofilici care se umflă în prezența apei și absoarbe cantități mari de apă⁶⁸. În general, polimerii hidrofilici au proprietatea de a interacționa cu moleculele de apă și astfel posedă o solubilitate crescută în soluții apoase. Însă, datorită lanțurilor de polimeri hidrofilici ce formează rețeaua în hidrogel, acesta este capabil să absoarbă o cantitate mare de apă fără a se dezmembra, datorită interacțiunii ”cross-link” ce are loc între lanțurile de polimeri⁶⁹. În ultimii ani, progresele științei polimerilor au dus către formarea hidrogelilor ”smart”, ce se umflă, se degradează sau efectuează tranziții sol-gel ca răspuns la stimuli fiziologici sau externi, ideali pentru aplicații biomedicale^{70–72}. Acești hidrogeli

reprezintă o clasă de nanomateriale ideale pentru livrarea agenților anti-VEGF, datorită proprietăților unice pe care le posedă. Hidrogelul poate încapsula o cantitate mare de anti-VEGF datorită structurii sale poroase. În același timp, matricea de polimeri are rolul de a proteja moleculele terapeutice de interes împotriva factorilor din mediul înconjurător și împotriva solvenților organici ce pot denatura proteinele terapeutice ⁶⁹. Mai mult, hidrogelul "smart" ce acționează ca răspuns la stimuli precum pH, temperatură, câmp electromagnetic sau factori fiziologici, permit controlul eliberării medicamentului cu o precizie spațio-temporală foarte bună ^{73,74}. Totodată, datorită conținutului mare de apă, între 70 – 99%, hidrogelul este în general biocompatibil ^{68,75}. Toate aceste caracteristici oferă hidrogelului potențialul de a acționa ca un sistem excelent de livrare și de eliberare de agenți anti-VEGF în aplicații intraoculare ⁷⁶. B. Xie *et al.* ⁷⁷ au raportat un sistem de livrare a medicamentului Avastin în segmentul posterior al globului ocular, bazat pe hidrogel termosensibili. Soluția apoasă de polimeri PLGA-PEG-PLGA a fost amestecată cu moleculele terapeutice la o temperatură scăzută de 4 °C înainte de a fi injectate. Studiile *in vitro* au demonstrat o eliberare inițială de 8 - 15% în primele 4 ore de la administrare, urmată de eliberarea susținută pe durata a 14 zile. Mai mult, studiile *in vivo* pe șoricei au indicat faptul că medicamentul se afla în concentrația maximă în umoarea vitrosă și în retină, la doar o zi de la administrare, iar eliberarea s-a efectuat timp de 6 săptămâni. Aceași metodă de dezvoltare a hidrogelului înglobat cu Bevacizumab a fost implementată și de către un grup de cercetători din Pittsburgh, Pennsylvania, care au format hidrogel de PEG-PSHU amestecat cu soluția de Bevacizumab la 4 °C ^{78,79}. Studiile *in vitro* ale acestei publicații demonstrează eliberarea medicamentului pe o durată de 16 săptămâni, cu o eliberare inițială minimă, în timp ce studiile *in vivo* pe iepuri au demonstrat o eliberare inițială semnificativ crescută față de studiile inițiale, și o eliberare continuă timp de 60 de zile. Nu în ultimul rând, în 2020 s-au raportat microsferă termosensibile de hidrogel, înglobate cu medicamentul Aflibercept, și studiate *in vivo* pe maimuțe ⁸⁰. În cazul respectiv, medicamentul a fost incorporat în microsferă de polimer PLGA iar apoi suspendat în soluția de polimeri termosensibili, pentru a forma sistemul de livrare biocompatibil. În urma injectării intraoculare în maimuțe, sistemul a eliberat o concentrație constantă de medicament timp de 5 luni.

Dendrimerii sunt polimeri așezați în structuri foarte ordonate și ramificate, ce au o dimensiune nanometrică între 2 – 100 nm ⁸¹. Structura acestora are trei elemente importante: miezul, ramurile interioare și învelișul exterior ce conține grupări funcționale ⁸². Acești dendrimeri pot fi modificați și li se pot atribui proprietăți speciale, cum ar fi livrarea țintită sau eliberarea prelungită, prin funcționalizarea ramurilor de la suprafață. Mai mult, molecula terapeutică de interes se poate încapsula atât în miezul dendrimerilor, cât și de ramurile de suprafață prin

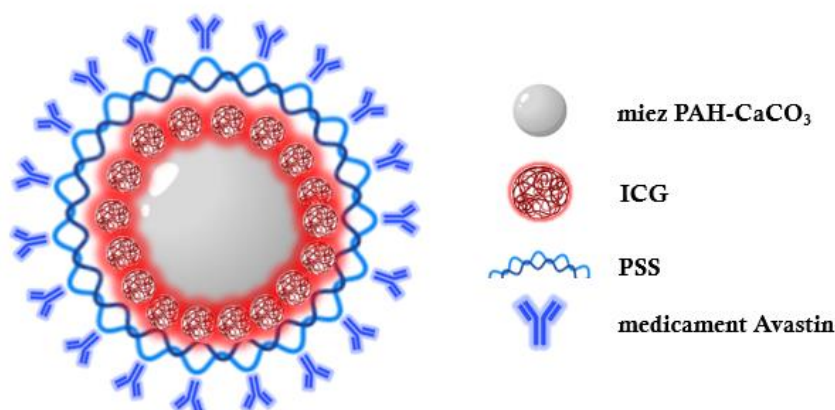
conjugare sau interacțiune ionică^{81,82}. În prezent, poli(amidoamina) – PAMAM – este cea mai investigată și studiată clasă de dendrimeri, datorită biocompatibilității pe care o posedă și a proprietății de a fi solubilă în apă⁸³. Marano *et al.*⁸⁴ au raportat dendrimeri conjugați cu oligonucleotide anti-VEGF pentru neovascularizarea coroidei induse de laser, *in vivo* în șobolani. Dendrimerii au fost capabili să încapsuleze oligonucleotidele și să le livreze țintit pe lanțul ADN, prin membrana celulară a celulelor de retină. Eliberarea oligonucleotidelor din acești dendrimeri în regiunea posterioară a ochiului a fost observată până la 6 luni de la administrare. Un alt studiu a evaluat dendrimeri de PAMAM, de dimensiuni cuprinse într 132 și 184 nm, ca sisteme de livrare de medicament Dexametazona intravitreal și subconjunctival⁸⁵. Analizele *in vitro* au demonstrat o eliberare încetinită, de doar 8% în 6 zile de la administrare, în timp ce analizele *in vivo* au sugerat îndepărtarea completă a dendrimerilor din umoarea vitroasă și din retină la 24 de ore de la administrare.

Un alt nanomaterial, lipozomii, este studiat pentru a acționa ca sistem de livrare de agenți anti-VEGF în regiunea posterioară a globului ocular, datorită biocompatibilității sale și a abilității de a îngloba cantități mari de medicament. Lipozomii sunt compuși din vezicule apoase sferice, unde se încapsulează medicamentul de interes, înconjurate de un dublu strat de lipide, compuse din fosfolipide și colesterol. Lipozomii prezintă o toxicitate redusă, în comparație cu sistemele de livrare bazate pe NPs sau MCs, deoarece fosfolipidele se metabolizează ușor odată ce lipozomii se descompun¹². Numeroase sisteme de livrare pe bază de lipozomi au demonstrat că sunt biocompatibile și că eliberează cu succes agenți anti-VEGF pe perioade mai lungi de o lună de la administrarea intravitroasă, în studii *in vivo* pe animale^{86,87}. Mu *et al.*⁸⁶ au dezvoltat lipozomi multi-veziculari cu un raport de 95:5 componente apoase la componente lipidice. Acești lipozomi au prezentat o eficiență excelentă de încapsulare a medicamentului Avastin și biocompatibilitatea acestora a fost demonstrată *in vivo* pe șobolani. Cu toate acestea, chiar dacă lipozomii posedă o mulțime de avantaje, încă nu se știe exact cum interacționează aceștia cu procesele fiziologice ce au loc în corpul uman. Eliberarea medicamentelor din lipozomi în corpul uman reprezintă un proces extrem de complex care poate fi afectat foarte ușor de către mediul înconjurător. Spre exemplu, lipozomii pot fi destabilizați de către macrofage⁸⁸ sau pot fi deformați de către schimbări ale pH-ului sau de către reacții enzimatică⁸⁹. Mai mult, aceștia pot deforma și cauza vedere încețoșată odată injectați în umoarea vitroasă, datorită fosfolipidelor⁹⁰.

În contextul clinic actual, în care se depun eforturi considerabile pentru a dezvolta și optimiza sisteme de livrare capabile să încapsuleze o cantitate mare de medicament, să ofere livrare țintită și eliberare pe termen lung în regiunea posterioară a ochiului, scopul acestui studiu a fost de a dezvolta un astfel de sistem. Astfel, am dezvoltat un microsistem pe bază de MCs polimerice

fluorescente, sensibile la lumina din NIR, targetate cu factori anti-VEGF, pentru tratarea RD (**Schema 2**). Acest microsistem "smart" oferă livrare țintită și eliberare controlată a moleculelor terapeutice ca răspuns la expunerea la laseri în NIR. Am înglobat cu succes un fluorofor activ în NIR – Verde de indocianină (ICG) – și am decorat suprafața MCs cu medicamentul Avastin (molecula activă Bevacizumab). Astfel, acest microsistem sferic hibrid prezintă un efect fototerapeutic eficient și, datorită încălzirii MCs, acestea denaturează și oferă eliberarea medicamentului la locul țintit, atât în soluție cât și *in vitro* în celule umane RPE de retină. Acest studiu prezintă o metodă nouă de a dezvolta sisteme de livrare de agenți anti-VEGF pe bază de MCs hibride și "smart", ce posedă fotosensibilitate crescută și o eficiență de încapsulare mare a fluoroforului împreună cu o eficiență excelentă de legare a moleculei terapeutice, ca și metodă nouă și minim invazivă de tratare a RD.

Microcapsule polimerice hibride



Schema I.2 Microcapsule polimerice hibride, înglobate cu fuoroforul activ în NIR – ICG – și decorate cu medicamentul Avastin pentru o livrare țintită și eliberare stimulată de lumină în NIR.

Capitolul II: Tehnici și metode experimentale

II.1 Materiale

Următorii reactivi au fost procurați de la Sigma-Aldrich (Missouri, USA) și utilizați fără purificări suplimentare: poly (allylamine hydrochloride) (PAH), Verde de Indocianină (ICG) și iodură de propidiu (IP). Poly (styrene sulfonic acid) sodium salt (PSS) a fost achiziționat de la Alfa Aesar, ThermoFisher GmbH (Kandel, Germania). Clorura de calciu (CaCl_2) a fost achiziționată de la Cristal R. Chim (București, România). Carbonatul de sodiu (Na_2CO_3) și clorura de sodiu (NaCl) au fost achiziționate de la Chempur (Karlsruhe, Germania). De la Life Technologies (California, USA) s-a achiziționat Calceina-AM. Avastin (Bevacizumab, 25 mg/mL) a fost procurat de la Roch România SRL, România. Apa ultrapură a fost obținută de la sistemul de purificare Milli-Q (Millipore, Merck, Massachusetts, USA) și utilizată pentru toate soluțiile apoase.

Testul acidului bicinchoninic (test BCA) a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich (Missouri, USA) împreună cu sulfatul de cupru (II). Albumina serică bovină (BSA) a fost procurată de la Merck (Massachusetts, USA).

Linia celulară umană epitelială de retină pigmentată D407 a fost obținută de la Dr Richard Hunt (Universitatea din Carolina de Sud, USA). Reactivii utilizați pentru studiile culturii celulare: mediul Eagle modificat Dulbecco (DMEM), ser fetal bovin (FBE) 10%, L-glutamină 2%, mix de antibiotic 1%, tripsină-EDTA (0.05%), și soluția salină tamponată cu fosfat (PBS) au fost achiziționați de la Gibco (Massachusetts, USA). De la Sigma-Aldrich (Missouri, USA) a fost achiziționat și reactivul WST-1 pentru studiul proliferării celulelor.

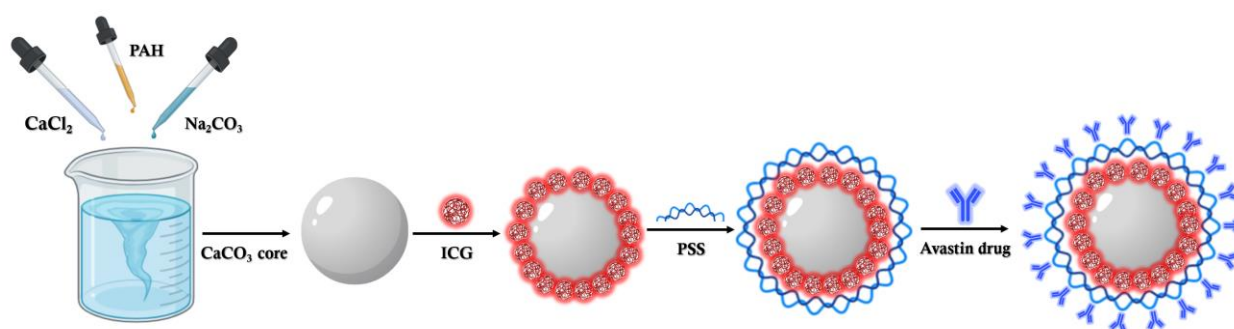
II.2 Metode

II.2.1 Sinteza microcapsulelor polimerice conjugate cu Avastin

În cadrul acestei etape a lucrării, am proiectat noi microcapsule (MCs) polimerice hibride, încărcate cu un fluorofor activ în domeniul NIR - care posedă proprietăți fototermice - și decorate cu o moleculă terapeutică cu rol dublu: i) deține proprietatea de a livra MCs țintit la locul dorit și ii) are rol terapeutic în urma iradierii cu laserul în NIR. Proprietățile fizico-chimice a fluoroforului ICG, cu emisia de fluorescență în domeniul spectral NIR, susțin integrarea acestuia între straturile de polielectroliți depuși succesiv pe miezul de carbonat de calciu (CaCO_3), utilizat pentru fabricarea MCs hibride. Scopul integrării acestui fluorofor în structura MCs se datorează potențialului său de a opera atât ca și agent fototermic, dar și de a marca fluorescent MCs pentru a le putea localiza și monitoriza *in vitro*. Una din provocările majore pentru realizarea acestor

microstructuri terapeutice o reprezintă conjugarea unei cantități semnificative de molecule terapeutice la suprafața MCs.

Astfel, pentru integrarea eficientă a ICG-ului între straturile de polielectroliți și pentru a conjuga cu succes o cantitate cât mai mare de medicament Avastin pe suprafața MCs, am urmat protocolul de sinteză menționat mai jos (**Schema II.1**):



Schema II.1 Ilustrare schematică a procesului de încapsulare a ICG-ului și a decorării MCs cu molecula terapeutică. Prin tehnica de depunere strat-cu-strat, ICG este depus pe suprafața miezului de CaCO₃-PAH urmat de un strat de PSS încărcat negativ, care prinde și sigilează fluoroforul între straturile de polielectroliți. MCs sferice sunt apoi decorate cu molecula terapeutică Avastin, care are rol dublu: i) asigură livrarea țintită a MCs și ii) are rol terapeutic.

Am sintetizat MCs hibride (în continuare denumite **core-ICG@Avastin**) prin tehnica de depunere "strat-cu-strat", amestecând părți egale de CaCl₂ (0.15 M) și Na₂CO₃ (0.15 M) împreună cu 500 μl polielectrolit pozitiv – PAH, pe un agitator magnetic setat la 400 RPM pentru 15 min, pentru a crea un miez de CaCO₃ prin metoda co-precipitării. După 15 min, am adăugat 300 μl de ICG (1.2×10^{-4} M) și am pus toată soluția pentru 1 h în Thermoshaker la temperatura camerei la 1200 RPM, urmată de 20 min de centrifugare la 12000 RPM la 20 °C pentru a înlătura excesul de ICG. Mai apoi, am adăugat 200 μl PSS per 1000 μl probă, pentru a sigila ICG-ul cu un strat de polielectrolit negativ, iar soluția a fost pusă 15 min la Thermoshaker și 20 min în centrifugă la parametrii menționați mai sus. În final, medicamentul Avastin, în concentrație de 1 mg/mL, a fost adăugat în sinteză și lăsat la Thermoshaker pentru 1 h la 900 RPM pentru a permite legarea electrostatică între medicament și suprafața capsulelor. După 20 min de centrifugare, am îndepărtat supernatantul core-ICG@Avastin iar acestea au fost spălate cu apă ultrapură și stocate la 4 °C. Mai mult, împreună cu MCs hibrid sintetizate, am sintetizat și MCs înglobate doar cu fluorofor, **core-ICG**, pentru a putea compara cele două sinteze.

II.2.2 Eficiența de încărcare a fluoroforului ICG

În continuare, pentru a stabili eficiența de încărcare a fluoroforului ICG între straturile de polielectroliți ale core-ICG@Avastin, am monitorizat intensitatea emisiei de fluorescență a 5 concentrații diferite și cunoscute (10^{-4} , 7.5×10^{-5} , 5×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 10^{-5} M) de fluorofor în stare liberă, împreună cu intensitatea emisiei de fluorescență a MCs hibride. Pe baza acestor rezultate, am efectuat curba de calibrare pe care am analizat-o în regiunea 795 – 805 nm și am determinat eficiența de încărcare a fluoroforului în NIR, între straturile MCs, pe baza **Ecuatiei 1**:

$$\text{Eficiența de încapsulare (\%)} = \frac{\text{Cantitatea finală de ICG}}{\text{Cantitatea inițială de ICG}} \times 100 \quad \text{Ecuatia 1}$$

II.2.3 Eficiența de conjugare a agentului terapeutic Avastin

Pentru a cuantifica cantitatea totală a medicamentului terapeutic Avastin legat de core-ICG@Avastin, am utilizat testul acidului bincinronic (eng. *The Bincinchoninic Acid protein assay* - BCA). Acest test este o metodă colorimetrică de determinare a concentrației medicamentului din proba analizată și implică două reacții chimice distincte. În mediu alcalin și la temperaturi înalte, ionii de Cu^{2+} sunt reduși de legăturile peptidice și grupările funcționale din structura medicamentului, la ioni Cu^+ . Ionii de Cu^+ sunt mai apoi complexați de către acidul bincinronic și rezultă un chelat puternic colorat în violet, cu maximul de absorbție la 562 nm. Intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația medicamentului. Mai întâi, se realizează o soluție standard de BSA 1 mg/mL care este apoi diluată în apă utrapură pentru a obține următoarele concentrații: 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015 and 0 mg/mL. Fiecare concentrație este depusă pe o placă cu 96 godeuri, 25 μl /godeu, în triplicat. Probele de Avastin în stare liberă și supernatantul obținut în urma spălării core-ICG@Avastin sunt depuse în triplicat într-o concentrație de 25 μl /godeu. Se prepară un amestec de acid bincinronic și sulfat de cupru (II) iar în urma reacției amestecului cu probele depuse în placa cu 96 de godeuri se obține valoarea procentuală a medicamentului din supernatant.

II.2.4 Caracterizarea optică și morfologică a microcapsulelor hibride

Următoarea etapă vizează caracterizarea optică și morfologică a MCs fabricate, utilizând o combinație de tehnici spectroscopice precum: măsurători de absorbție UV-Vis, măsurători de emisie de fluorescență, măsurători de potențial zeta, măsurători de absorbție în infraroșu, dar și de tehnici microscopice: microscopie electronică de baleiaj și microscopie de fluorescență confocală.

Molecula terapeutică Avastin și fluoroforul ICG în stare liberă au fost analizate în prealabil cu ajutorul spectrofotometrului UV-Vis-NIR achiziționat de la Jasco International Co., Ltd. (Tokyo, Japonia), cu o rezoluție spectrală de 1 nm, utilizând cuve de cuarț (drum optic 2 mm) de

la Hellma (Germania). Aceste măsurători au fost efectuate pentru a determina maximul de absorbție a celor două molecule utilizate în sinteza de core-ICG@Avastin. S-a utilizat programul Spectra Manager pentru a înregistra spectrele.

Spectrele de emisie de fluorescență prezentate în cadrul acestei lucrări au fost achiziționate cu ajutorul spectrofluorimetrului Jasco FP6500 de la Jasco International Co., Ltd (Tokyo, Japonia). Am efectuat măsurătorile la temperatura camerei, cu o rezoluție spectrală de 1 nm și cu o lampă cu xenon ca sursă de excitație, de 150 W. Măsurătorile au fost obținute atât la lungimea de undă de 270 nm, lungime de undă specifică maximului de emisie a medicamentului Avastin, cât și la 760 nm, lungime de undă specifică maximului de emisie a fluoroforului ICG. S-a folosit o lățime a benzilor de excitație și emisie de 3, respectiv 5 nm, folosind cuve de cuarț de 5x5 mm de la Hellma (Germania) iar spectrele au fost analizate folosind programul Spectra Manager.

Pentru a determina diametrul hidrodinamic al MCs hibride, am efectuat măsurători de împrăștiere dinamică a luminii (eng. *dynamic light scattering analysis* - DLS), utilizând echipamentul Zetasizer NanoZS90 de la Malvern Panalytical Ltd. (Worcestershire, UK). Echipamentul este dotat cu un laser He-Ne (633 nm, 5 mW) iar toate măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei. Măsurătorile au fost efectuate în triplicat și am utilizat cuve de unică folosință. Utilizând același echipament, Zetasizer NanoZS90, am efectuat măsurători de potențial zeta, atât pentru core-ICG cât și pentru core-ICG@Avastin. Potențialul zeta a fost înregistrat în triplicat pentru ambele probe și am prezentat valoarea medie. Am utilizat un set de celule *dip cell* (ZEN1002) și s-a aplicat o tensiune de 5 mV.

Pentru a demonstra conjugarea cu succes a medicamentului Avastin de suprafața MCs, precum și pentru a demonstra eliberarea acestuia în soluție în urma expunerii la laserul în NIR, am implementat tehnica de analiză a absorbției în infraroșu – spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR). Spectrele FT-IR au fost obținute în pastile de KBr utilizând spectrometrul Jasco 6600 FT-IR (Tokyo, Japonia) în regiunea 400 – 4000 cm^{-1} , cu o rezoluție spectrală de 4 cm^{-1} . De menționat, toate probele analizate FT-IR au fost liofilizate în prealabil cu ajutorul liofilizatorului Biobase BK-FD10S (China).

Cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (SEM), am investigat morfologia și dimensiunea MCs conjugate cu Avastin, utilizând microscopul electronic cu fascicul dublu FEI Quanta 3D FEG ce operează la 5 și 10 kV. Înainte de investigarea SEM, core-ICG@Avastin au fost ultrasonicate pentru 5 sec pentru a preveni agregarea MCs în soluție. Acestea au fost apoi depozitate prin picurare pe un substrat de sticlă și uscate la temperatura camerei.

Imaginile SEM au fost achiziționate cu ajutorul Dr Adriana Vulpoi, Centrul de Materiale Nanostructurate și Bionanointerfețe, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România.

II.2.5 Studiul eliberării medicamentului Avastin în soluție în urma iradierii cu laseri în NIR

În continuare, am evaluat eliberarea medicamentului terapeutic Avastin în urma expunerii core-ICG@Avastin la doi laseri în NIR. Acest studiu a fost efectuat evaluând core-ICG@Avastin în comparație cu core-ICG și soluții control (MCs fără ICG și fără Avastin – core, ICG în stare liberă, Avastin în stare liberă, apă ultrapură). Am expus 100 μl din fiecare probă la cei doi laseri în NIR, 785 (laserul unui spectrometru Raman portabil R-3000 CN, Raman System) și 808 nm (Therapy Laser DRL-BCD-01 echipat cu un laser SL1 cu o diodă de 808 nm), pentru 15 min și am comparat potențialul terapeutic a MCs sintetizate împreună cu abilitatea de a genera căldură ca urmare a iradierii în NIR a acestora. Utilizând o camera IR Optris PI 450 (Remscheid, Germany), am colectat cu succes imagini termice la fiecare 30 sec pe parcursul iradierii. După cele 15 min de iradiere, laserul a fost oprit iar temperatura probei a scăzut rapid la temperatura inițială de 34 °C, temperatură relevantă d.p.d.v. biologic⁹¹.

Mai mult, am calculat eficiența de conversie fototermică (η) a core-ICG@Avastin, core-ICG și ICG în stare liberă pe baza **Ecuatiei 2**⁹²:

$$\eta = \frac{h \cdot A \Delta T - I \zeta}{I(1-\zeta)(1-10^{-A\lambda})} \quad \text{Ecuatie 2}$$

unde h – coeficientul de transport al căldurii; A – secțiunea transversală iradiată; ΔT – diferența de temperatură; I – puterea incidentă a laserului; ζ – fracția de energie absorbită de către Eppendorf și solvent; A_λ – absorbanta probei la lungimea de undă excitată.

În plus, pentru a demonstra spargerea MCs în urma iradierii lor, core-ICG@Avastin au fost depuse pe substrat de sticlă și uscate la temperatura camerei înainte și după expunerea la laser pentru a fi analizate cu microscopul confocal de fluorescență (RCM-NIR).

II.2.6 Testarea viabilității celulare

În această etapă, am evaluat viabilitatea celulelor umane epiteliale pigmentate de retină (RPE) D407 în prezența core-ICG și core-ICG@Avastin. Astfel, celulele au fost depozitate într-un incubator umed (95%) cu 5% CO₂ la 37 °C în mediu DMEM cu 10% FBS, 2% L-glutamină și 1% antibiotic (penicilin-streptomycină). Am utilizat testul colorimetric WST-1 pentru a determina toxicitatea core-ICG, respectiv core-ICG@Avastin asupra celulelor RPE D407. Am însămânțat pe plăcuțe cu 96 de godeuri, 8 x 10³ celule/godeu și am testat 8 concentrații diferite (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 și 150 microcapsule/celulă) din ambele probe, iar 3 godeuri au rămas netratate, drept control. Pentru fiecare concentrație s-au făcut 5 repetări. După 24 h de tratament, reactivul WST-1 (15 μM) a fost incubat împreună cu celulele pentru 30 min. În urma reacției de reducere a sării

de tetrazoliu, absorbanta compusului colorat obținut s-a măsurat la 420 nm cu ajutorul HT BioTek Synergy microplate reader (BioTek Instruments, USA). Experimentul a fost realizat în duplicat pentru fiecare din cele două probe analizate și am analizat statistica rezultatelor obținute cu programul Graph Pad – analiza one-way ANOVA. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate față de control (0). Am considerat 100% viabile celulele control (0).

Pentru a evalua efectele biologice *in vitro* a core-ICG@Avastin în urma expunerii la laserul în NIR, am simulat condițiile retinopatiei diabetice în celulele umane RPE D407. Am analizat două seturi de probe, celule D407 tratate cu core-ICG@Avastin înainte și respectiv după iradierea cu laserul 808 nm. Mai întâi, am administrat glucoză (30 μ M) ambelor seturi de probe. După 24 h, probele au fost tratate cu 8 concentrații diferite (0, 5, 10, 20, 60, 80, 100 și 150 microcapsule/celulă) de core-ICG@Avastin. După încă 24 h de tratament, primul set de probe a fost incubat cu reactivul WST-1 pentru analiza citotoxicității, în timp ce al doilea set de probe a fost iradiat pentru 15 min cu 808 nm pentru fiecare concentrație. În final, al doilea set a fost incubat pentru alte 24 h, urmând să fie analizat cu testul WST-1.

Analizele de viabilitate celulară au fost efectuate de Dr Mădălina Nistor, Facultatea de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe ale Agriculturii și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, România.

II.2.7 Imagistică *in vitro*

Monitorizarea și localizarea individuală a core-ICG@Avastin în celule umane RPE D407 au fost investigate cu ajutorul microscopiei convenționale de fluorescență, microscopiei confocal de re-scanare (RCM) și a microscopiei electronice în transmisie (TEM).

Imaginile de fluorescență convențională a celulelor RPE D407 tratate cu MCs hibride au fost achiziționate cu ajutorul microscopului inversat Axio Observer Z1 de la Carl Zeiss, echipat cu o sursă de lumină compactă, lampă cu mercur, HXP 120 °C. Pentru a achiziționa imaginile de fluorescență, am utilizat un obiectiv cu ulei de imersie de 63x (N.A. = 0.7 – 1.4, Zeiss) și o camera digitală AxioCam MRc Carl Zeiss. Pentru a vizualiza nucleul (marcat cu DAPI), lumina a fost reflectată de o oglindă dichroică, utilizând filtrul de excitație G 365 (Zeiss G 365), un filtru a benzii de emisie BP 445/50 și o oglindă dichroică cu trecere lungă 395 nm (Zeiss FT 395). Filamentele de actină (marcate cu Alexa Fluor 488 Phalloidin) au fost vizualizate cu ajutorul unui filtru de excitație BP 470/40, un filtru de emisie 535/50 și o oglindă dichroică cu trecere lungă 495 nm (Zeiss FT 495). În final, pentru a vizualiza core-ICG@Avastin în celulele RPE, am folosit un filtru de excitație BP 640/30, un filtru de emisie BP 690/50 și o oglindă dichroică cu trecere lungă 660 nm (Zeiss FT 660).

Imaginile confocale de fluorescență au fost colectate asupra core-ICG@Avastin înainte, respectiv după expunerea la laserul în NIR, utilizând un laser RCM-NIR achiziționat de la Confocal.nl (Amsterdam, The Netherlands), montat pe un microscop inversat (Nikon) ECLIPSE Ti2-E, echipat cu un obiectiv plan-apocromat 20x (N.A. = 0.75). MCs conjugate cu Avastin și cu răspuns termic au fost excitate cu o diodă laser de 808 nm (TOPTICA Photonics AG, Germany). Localizarea intracelulară cu succes a core-ICG@Avastin în celulele umane RPE a fost determinată pe baza unei imagini RCM 3D în profunzime, utilizând sistemul descris mai sus. Celulele au fost expuse la laseri cu lungimi de undă de 405, 488 și 785 nm (RCM-405, RCM-488 și RCM-785) pentru a vizualiza atât nucleul, cât și filamentele de actină și core-ICG@Avastin. Toate imaginile confocale de fluorescență și hărțile 3D au fost achiziționate de camera digitală CCD Hamamtsu (ORCA-Flash 4.0 V3) pentru modulul RCM-NIR, și de camera digitală CCD PCO EDGE 4.2 pentru modulul RCM-Vis, iar mai apoi au fost analizate de software-ul NIS Elements (versiunea 5.11.02).

Pentru a studia morfologia și structura celulelor umane RPE tratate cu MCs hibride, am folosit microscopul electronic în transmisie (TEM, Hitachi SU 8230). Celulele D407 au fost crescute în plăci de cultură până la o confluență de 80%, mai apoi au fost tratate cu core-ICG@Avastin și în continuare tripsinizate și centrifugate la 1500 RPM. Probele au fost fixate cu soluție de glutaraldehidă (2.7% în PBS), apoi cu soluție de tetroxid de osmiu (1% în PBS). În continuare, probele tratate cu core-ICG@Avastin au fost polimerizate la 60 °C, tăiate și secționare la 70 nm cu ultramicrotome (Leica UC7; Leica Microsystem GmbH, Germany), iar în final marcate cu soluție de uraniless (Electron Microscopy Sciences) și soluție de citrat de plumb (3% în apă). Secțiunile de celulă au fost investigate cu ajutorul microscopului Jeol JEM1010 (Jeol, Japan) la 80 kV și micrografele au fost obținute cu ajutorul camerei digitale MegaView III (Soft Imaging System GmbH, Germania).

Investigațiile TEM au fost efectuate de către Dr Maria Suci, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca, România.

II.2.8 Eliberarea fotoindusă *in vitro* a medicamentului Avastin

În continuare, am studiat efectul eliberării fotoinduse NIR a moleculei terapeutice în celule umane D407 tratate cu glucoză. Am administrat 30 μ M glucoză celulelor RPE iar acestea au fost însămânțate pe plăci Ibidi μ -Dish 35 mm pentru 24 h și tratate cu core-ICG@Avastin. Pe urmă, mediul acestora a fost schimbat cu PBS și am expuse celulele la laserul NIR 808 nm pentru 15 min, utilizând aceeași parametrii experimentali folosiți pentru iradierea în soluție. Pentru a evalua viabilitatea sau moartea celulelor, acestea au fost marcate cu Calceină-AM (concentrația finală de

1 μM – incubat pentru 15 min la 37 °C și ferit de lumină), în timp ce moartea celulară a fost observată prin marcarea celulelor cu IP (concentrație finală 10 μM – incubat pentru 15 min la 37 °C și ferit de lumină). Probele au fost analizate utilizând microscopul convențional de fluorescență Axio Observer Z1 (obiectiv 20x). Pentru a vizualiza Calceina-AM și IP, am utilizat oglinzi dichroice cu seturi de filtre de excitație BP 470/40 și de emisie BP 535/50, respectiv filtre de excitație BP 546/12 și de emisie BLP 647. Am folosit PBS pre-încălzit la 37 °C pentru a prepara soluțiile care au marcat celulele.

Capitolul III. Rezultate experimentale și discuții

III.1 Fabricarea și caracterizarea microcapsulelor hibride conjugate cu Avastin

Primul pas a fost de a obține core-ICG@Avastin prin fabricarea miezului de CaCO_3 -PAH prin tehnica de co-precipitare. În continuare, am marcat miezul cu fluoroforul ICG pentru ca MCs să beneficieze de proprietatea sa fototermică, dar și pentru a le utiliza ca și cărauși fluorescenți, pentru imagistica *in vitro*. Fluoroforul a fost sigilat de un strat de PSS iar în final, microsistemul cu răspuns în NIR a fost funcționalizat cu anticorpul terapeutic Avastin pentru o livrare țintită la nivelul retinei umane, unde Avastin va fi eliberat *in vitro* în urma expunerii la laserul în NIR.

În urma fabricării MCs hibride, am analizat morfologia și dimensiunea acestora utilizând tehnicile DLS și SEM. Mai mult, microscopia confocală de fluorescență a fost utilizată pentru a analiza capacitatea core-ICG@Avastin de a emite fluorescență la nivel individual. Astfel, analiza DLS a demonstrat diametrul hidrodinamic al microsistemului hibrid ca fiind $4.61 \pm 0.33 \mu\text{m}$, PdI: 0.43 ± 0.10 (**Fig. III.1A**). În plus, **Fig. III.1B** prezintă o imagine SEM a core-ICG@Avastin. Această figură confirmă diametrul MCs ca fiind $4.5 \pm 0.35 \mu\text{m}$, argumentat și de histograma distribuției dimensiunii particulelor din **insetul Fig. III.1B**, și demonstrează forma sferică regulată a acestora. Pentru efectuarea histogramei am analizat 100 de MCs. De asemenea, dimensiunea acestora este în concordanță cu dimensiunea obținută pe baza imaginilor achiziționate cu microscopul confocal de re-scanare (**Fig. III.1C**), care confirmă atât dimensiunea și forma sferică a acestora, cât și proprietatea lor de a emite fluorescență în NIR. MCs hibride au fost depozitate pe substrat de sticlă și uscate la temperatura camerei înainte de a fi analizate la microscop. În plus, stabilitatea excelentă a dimensiunii și a formei MCs a fost analizată și demonstrată prin microscopia RCM-NIR (**Fig. III.1D**). În urma sintezei de microcapsule, acestea au fost depozitate la temperatura de 4°C , ferite de lumină, pentru 7 luni.

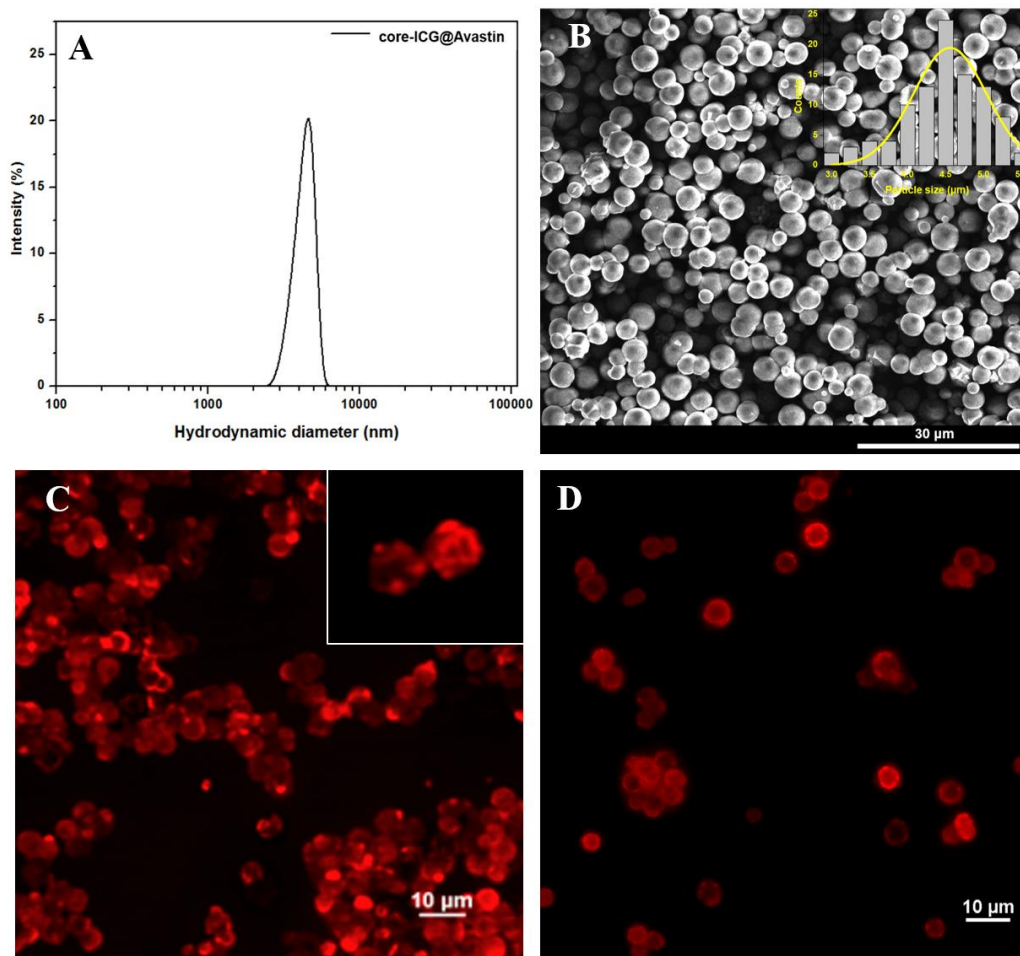


Fig. III.1 A Spectrul DLS al core-ICG@Avastin, confirmând diametrul hidrodinamic de $4.61 \pm 0.33 \mu\text{m}$. B Imagine SEM reprezentativă obținută asupra core-ICG@Avastin; inset: histograma dimensiunii MCs, cu o medie a diametrului de $4.5 \mu\text{m}$ $0.35 \mu\text{m}$. C Imagine RCM-NIR colectată asupra core-ICG@Avastin; inset: două MCs individuale. D Imagine RCM-NIR reprezentativă obținută asupra core-ICG@Avastin depozitate la $4 \text{ }^\circ\text{C}$, ferite de lumină, pentru 7 luni, demonstrând stabilitatea acestora.

Pentru a confirma prinderea cu succes a medicamentului Avastin de suprafața MCs, am analizat în primul rând core-ICG@Avastin prin măsurători de potențial zeta și am comparat cu core-ICG (**Fig. III.2A**). Core-ICG (roșu) prezintă un potențial zeta puternic negativ, $-55.2 \pm 1.7 \text{ mV}$, datorită stratului negativ de PSS de la suprafața MCs. În urma decorării microsistemului cu molecula terapeutică Avastin, potențialul zeta a core-ICG@Avastin (negru) ajunge la $-28.4 \pm 1.5 \text{ mV}$. Suprafața core-ICG@Avastin este de asemenea negativă, însă sarcina de la suprafață este influențată datorită Avastinului care este ușor pozitiv. Această deplasare spre valori mai pozitive este o primă confirmare a conjugării cu succes a moleculei terapeutice de MCs.

În continuare, am comparat core-ICG (roșu) și core-ICG@Avastin (negru) prin măsurători de excitație și emisie de fluorescență, atât pentru a caracteriza microcapsulele targetate cu Avastin, cât și pentru a avea o dovadă suplimentară a conjugării cu succes a medicamentului Avastin de

suprafața MCs. Am efectuat și analizat spectrele de excitație în domeniul NIR (**Fig. III.2B**) a celor două probe pentru a observa eventualele diferențe semnificative și pentru a determina lungimea de undă optimă pentru a excita MCs. Astfel, am obținut următoarele spectre de emisie de fluorescență (**Fig. III.2C**), excitând probele în jurul maximelor obținute, mai exact 760 nm. Se poate observa din **Fig. III. 2C** faptul că maximul de emisie de fluorescență a core-ICG este situat la 804 nm, în timp ce maximul de emisie a core-ICG@Avastin este situat la 801 nm. Această deplasare de 3 nm se datorează prinderii cu succes a medicamentului Avastin de MCs.

Mai mult, am obținut informații suplimentare legate de conjugarea cu succes a moleculei terapeutice de suprafața MCs din spectrele de emisie de fluorescență a acestora în regiunea specifică emisie Avastinului (**Fig. III.2D**). Am analizat Avastin în stare liberă și am observat că acesta posedă maximul de emisie de fluorescență la 344 nm (albastru). În schimb, am observat că, odată legat electrostatic de MCs, core-ICG@Avastin (negru) nu prezintă emisie de fluorescență în regiunea specifică moleculei terapeutice, datorită fenomenului de inhibare a fluorescenței ce apare la interacțiunea moleculei terapeutice și a suprafeței microsistemului. Datorită transferului de energie între Avastin și MCs, fluorescența core-ICG@Avastin este redusă semnificativ.

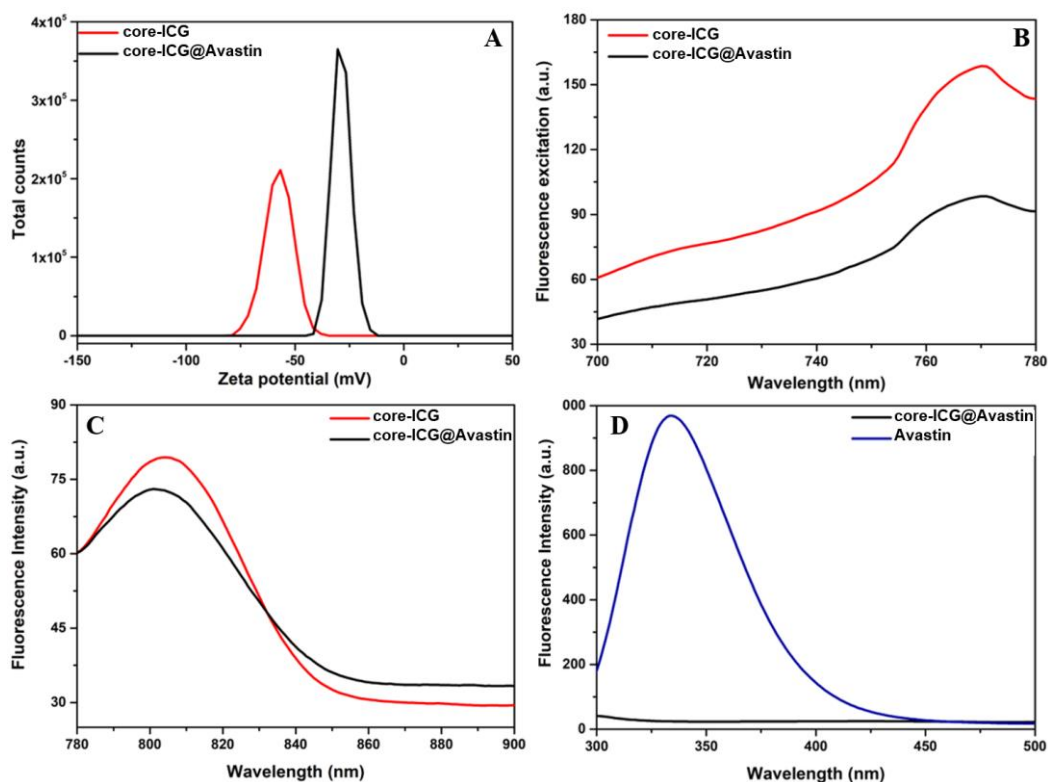


Fig. III.2 A Măsurători de potențial zeta a core-ICG (roșu) și core-ICG@Avastin (negru). B Spectre de excitație în regiunea NIR a core-ICG (roșu) și core-ICG@Avastin (negru). C Spectre de emisie de fluorescență în regiunea NIR a core-ICG (roșu) și core-ICG@Avastin (negru). D Spectre de emisie de fluorescență în regiunea specifică medicamentului, a Avastinului în stare liberă (albastru) și a core-ICG@Avastin (negru).

Totodată, pentru a sprijini ipoteza conjugării cu succes a moleculei terapeutice de suprafața MCs polimerice, am utilizat tehnica spectroscopică vibrațională FT-IR pentru a investiga interacțiunile chimice care apar între Avastin și stratul exterior de PSS al microcapsulelor. Toate probele (Avastin în stare liberă, core-ICG și core-ICG@Avastin) au fost liofilizate înainte de a fi analizate prin această tehnică spectroscopică. Spectrul Avastinului (**Fig. III.3A** – spectrul albastru) prezintă benzi vibraționale specifice la 1642 cm^{-1} , caracteristice amidelor I, provenind de la vibrația de întindere $\text{C}=\text{O}^{93}$, și la 1542 cm^{-1} , caracteristice amidelor II, datorată în mare parte combinației între deformarea legăturii N-H și întinderea legăturii $\text{C}-\text{N}^{94}$, precum și o bandă specifică la 990 cm^{-1} ce corespunde vibrațiilor de întindere C-C și $\text{C}-\text{O}^{95}$. Aceste benzi caracteristice pot fi identificate cu ușurință în spectrul core-ICG@Avastin (**Fig. III.3B** – spectrul negru), dovedind legarea cu succes a medicamentului Avastin de MCs hibride. Mai mult, banda localizată la 3419 cm^{-1} a spectrului poate fi atribuită vibrației de întindere $-\text{O}-\text{H}$ al medicamentului, dar de asemenea se poate datora unor molecule de apă rămase în probă în urma procesului de liofilizare. În schimb, din spectrul FT-IR al core-ICG (**Fig. III.3B** – spectrul roșu), se pot observa benzile de absorbție specifice CaCO_3 la 712 , 875 și 1418 cm^{-1} , ce corespund vibrațiilor de deformare în- și în afara planului, respectiv a vibrației asimetrice de întindere a $\text{O}-\text{C}-\text{O}^{96}$. Cu toate acestea, scăderea în intensitate a benzilor caracteristice Avastinului în proba core-ICG@Avastin indică faptul că vibrația moleculei terapeutice este în mare parte inhibată, datorită atașării acesteia de suprafața MCs.

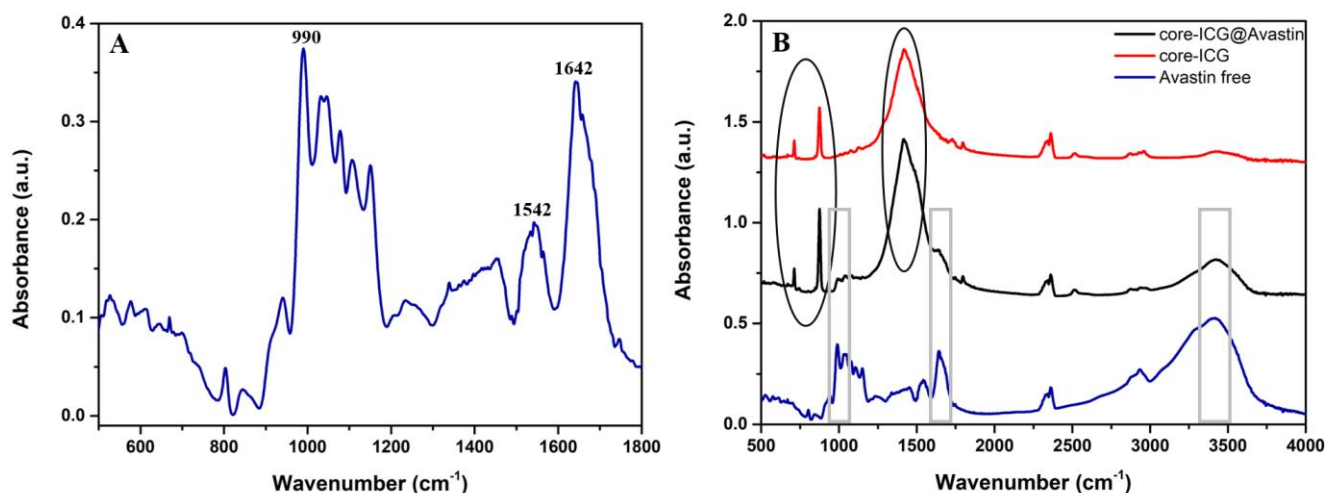


Fig. III.3 A Spectrul de absorbție FT-IR al Avastinului în stare liberă, în regiunea $500 - 1800\text{ cm}^{-1}$. B Spectrul de absorbție FT-IR al core-ICG@Avastin (negru), core-ICG (roșu) și al Avastinului în stare liberă (albastru), în regiunea $500 - 4000\text{ cm}^{-1}$.

III.2 Eficiența de încărcare a fluoroforului ICG și eficiența de conjugare a moleculei terapeutice

Monitorizând intensitatea emisie de fluorescență a diferitelor concentrații de ICG împreună cu intensitatea emisie core-ICG@Avastin (**Fig. III.4A**), am efectuat curba de calibrare a ICG-ului (**Fig. III.4B**). Aceasta, împreună cu **Ecuția 1**, au determina eficiența de încapsulare a fluoroforului ICG și am obținut valoarea de $75.7 \pm 3.6 \%$. Această valoare dovedește capacitatea MCs de a îngloba o cantitate mare de fluorofor în NIR. Eroarea standard a fost calculată prin analiza în triplicat a probelor.

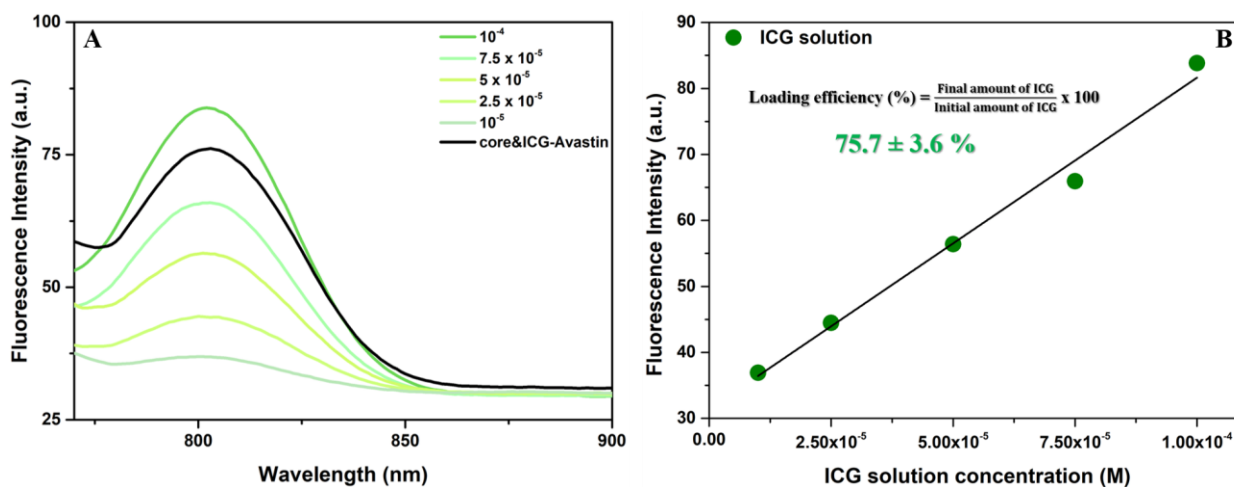


Fig. III.4 A Spectre de emisie de fluorescență a diferitelor concentrații de ICG și a core-ICG@Avastin. **B** Curba de calibrare efectuată pe baza spectrelor de fluorescență.

Totodată, în această etapă, am cuantificat cantitatea totală a moleculei terapeutice Avastin legată de core-ICG@Avastin utilizând testul BCA. Amestecând acidul bicinchoninic și sulfatul de cupru (II) cu probele depuse în placa cu 96 de godeuri, am obținut valoarea de 2.8 % a medicamentului Avastin în supernatantul MCs hibride. Astfel, prin această metodă indirectă, am demonstrat proprietatea extraordinară a MCs de a lega o cantitate foarte mare de medicament, **97.2 %** din cantitatea inițială, și de a o transporta țintit.

III.3 Evaluarea performanțelor fototerapeutice a microcapsulelor hibride targetate cu Avastin la iradierea în soluție

Pentru a valida potențialul terapeutic a core-ICG@Avastin în soluție, am evaluat capacitatea MCs targetate cu medicamentul terapeutic Avastin de a converti lumina în căldură, în urma expunerii la doi laseri în NIR – 785, respectiv 808 nm - și de a elibera molecula terapeutică în soluție în urma iradierii. Astfel, am efectuat studii fototermice în soluție prin expunerea core-ICG@Avastin, core-ICG, dar și a soluțiilor control - ICG în stare liberă, Avastin în stare liberă,

core și apă ultrapură – la cele două linii laser în NIR pentru 15 min, pornind de la temperatura relevantă d.p.d.v. biologic de 34 °C.

Astfel, **Fig. III.5A** prezintă imaginile termice la începutul expunerii (T0) și pe parcursul iradierii la diferiți timpi (3, 6, 9, 12 și 15 min) a celor trei probe relevante care conțin ICG: core-ICG, core-ICG@Avastin și ICG în stare liberă. Conform scalei de culoare, se poate observa o creștere dramatică în temperatura probelor expuse la laserul de 808 nm, față de cele expuse la 785 nm. Prin urmare, la expunerea laserului de 785 nm, core-ICG se încălzesc cu 10.8 °C iar core-ICG@Avastin cu 10.1 °C. În schimb, la expunerea laserului 808 nm, se obține o creștere majoră a ΔT_{\max} a probelor, și anume core-ICG se încălzesc cu 26.3 °C iar core-ICG@Avastin cu 25.9 °C. În **Fig. III.5B** sunt prezentate curbele de încălzire a probelor investigate. Acest comportament, împreună cu faptul că soluțiile control ce nu conțin ICG nu sunt active d.p.d.v. fototermic, confirmă faptul că ICG este o moleculă fotoactivă care cauzează încălzirea MCs. În continuare, această încălzire se va utiliza pentru a produce deteriorarea și spargerea MCs, eliberând astfel medicamentul Avastin legat de suprafața core-ICG@Avastin. În **Tabelul III.1** sunt prezentate valorile ΔT_{\max} a tuturor probelor investigate.

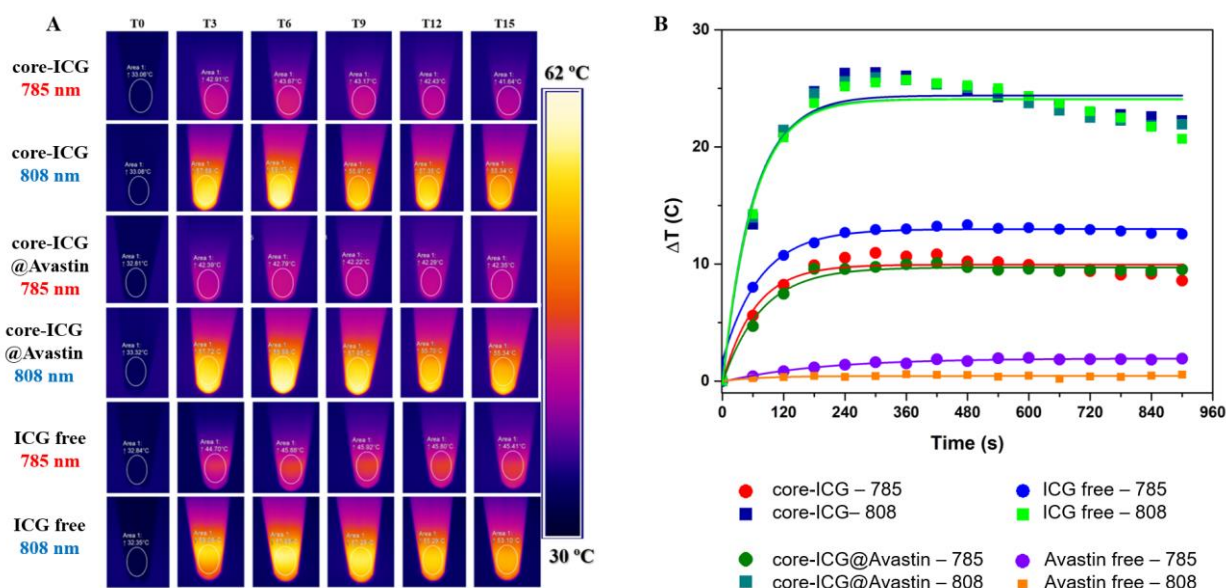


Fig. III.5 A Imagini termice înregistrate în timp real pe parcursul de 15 min de iradiere, la fiecare 3 min, a core-ICG, core-ICG@Avastin precum și a soluției ICG în stare liberă. Iradierile au fost efectuate atât cu laserul 785 nm cât și cu cel de 808 nm. **B** Curbele de încălzire a core-ICG, core-ICG@Avastin și a soluțiilor control în timpul iradierii cu 785 și 808 nm.

Tabel III.1. Media ΔT_{\max} temperaturii fiecărei probe iradiate cu cei doi laseri în NIR, pornind de la temperatura ambientală de 34 °C.

PROBĂ	ΔT_{\max} 785 nm	ΔT_{\max} 808 nm
core-ICG	10.8 °C	26.3 °C
core-ICG@Avastin	10.1 °C	25.9 °C
ICG liber	13.3 °C	25.7 °C
core	1.8 °C	1.5 °C
Avastin liber	0.9 °C	0.6 °C
H ₂ O up	0.9 °C	0.5 °C

În continuare, am determinat coeficientul fototermic de conversie (η) a core-ICG, core-ICG@Avastin și a ICG-ului în stare liberă pentru ambele linii laser, utilizând **Ecuatia 2**. Fluoroforul ICG în stare liberă iradiat cu 785 nm prezintă $\eta = 49\%$ ⁹⁷. Însă, după încapsularea lui înăuntrul MCs hibride, performanța fototermică a core-ICG scade la 21%. Conjugarea medicamentului Avastin de suprafața MCs nu afectează semnificativ performanța fototermică a core-ICG@Avastin ($\eta = 20\%$). Se observă un comportament similar în cazul expunerii probelor la laserul 808 nm: ICG în stare liberă prezintă coeficientul de conversie fototermic de 77% iar, după încapsularea fluoroforului, core-ICG prezintă $\eta = 72\%$. Aceeași performanță fototermică este observată și în cazul MCs decorate cu Avastin. **Tabelul III.2** sumarizează aceste valori. Performanțele fototermice a fluoroforului ICG sunt conservate în mare măsură în urma formării MCs, precum și în urma formării MCs hibride targetate cu molecula terapeutică. Faptul că acest microsistem hibrid se încălzește într-o perioadă scurtă de timp cu ~10 °C prin expunerea la laserul 785 nm, respectiv cu ~25 °C prin expunerea la laserul 808 nm, rezultă faptul că MCs decorate cu Avastin prezintă rezultate promițătoare în încercarea de a dezvolta un sistem de livrare capabil de a elibera molecule terapeutice ca răspuns la iradierea cu lumină în NIR.

Tabel III.2. Coeficientul fototermic de conversie a celor trei probe marcate cu fluorofor – ICG în stare liberă, core-ICG și core-ICG@Avastin – în urma iradierii cu cei doi laseri în NIR.

PROBĂ	η (785 nm)	η (808 nm)
ICG liber	49 %	77 %
core-ICG	21 %	72 %
core-ICG@Avastin	20 %	72 %

Odată demonstrată eficiența fototermică, am investigat eliberarea medicamentului Avastin din core-ICG@Avastin în soluție în urma expunerii la laser în NIR prin tehnica spectroscopică

vibrațională FT-IR (**Fig. III.6A**). În urma iradierii core-ICG@Avastin pentru 15 min, utilizând atât laserul de 785 cât și cel de 808 nm, probele au fost centrifugate pentru 30 min la 12000 RPM iar peletul a fost resuspendat în apă ultrapură și liofilizat înainte de a fi analizat prin spectroscopia FT-IR. În **Fig. III.6A** sunt prezentate spectrele core-ICG@Avastin înainte de iradiere (negru), respectiv a MCs hibride după iradierea cu 785 (portocaliu) și cu 808 nm (verde). Benzile de absorbție specifice a CaCO_3 menționate în secțiunea **III.1 Fabricarea și caracterizarea microcapsulelor hibride conjugate cu Avastin**, pot fi identificate cu ușurință în ambele probe iradiate, mai exact benzile caracteristice situate la 712, 875 și 1418 cm^{-1} (marcate în chenare gri). Însă, și mai important, benzile specifice Avastinului, marcate cu săgeți negre în spectrul core-ICG@Avastin înainte de iradiere, nu sunt vizibile în spectrul probelor iradiate, demonstrând indirect eliberarea cu succes a medicamentului Avastin de pe suprafața MCs hibride în urma expunerii la lumină în NIR. Mai mult, eliberarea moleculei terapeutice în soluție a fost demonstrată și prin creșterea în intensitate a emisiei de fluorescență în regiunea specifică Avastinului (**Fig. III.6B**). Core-ICG@Avastin înainte de iradiere (negru) prezintă efectul de inhibare a fluorescenței, pe când în urma iradierii, emisia de fluorescență a medicamentului este semnificativ crescută odată ce molecula terapeutică este eliberată cu succes de pe suprafața microsistemului. Această creștere în intensitate a emisiei de fluorescență a medicamentului Avastin la expunerea laserilor în NIR dovedește încă odată eliberarea cu succes a moleculei terapeutice (**Fig III.6B** – spectrul portocaliu și verde).

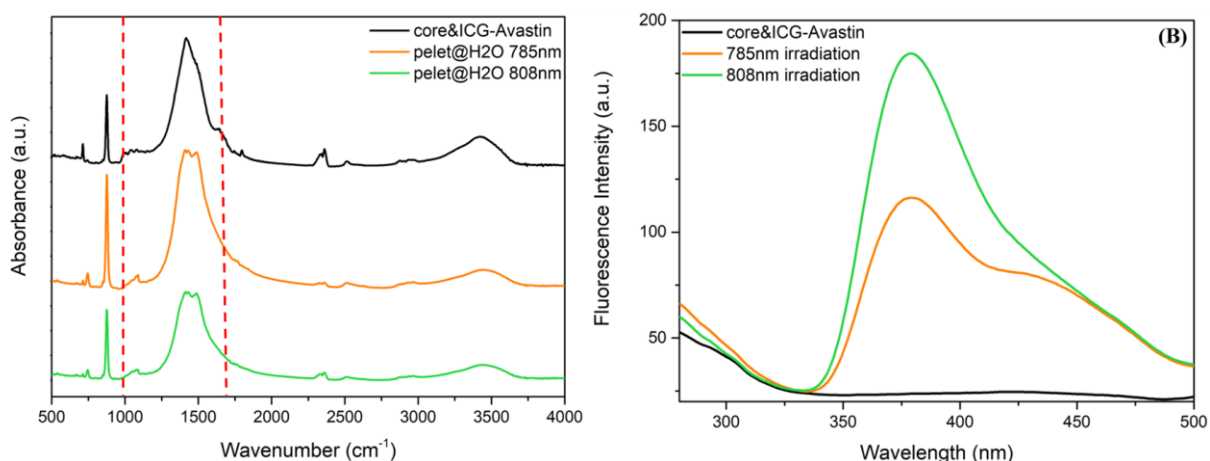
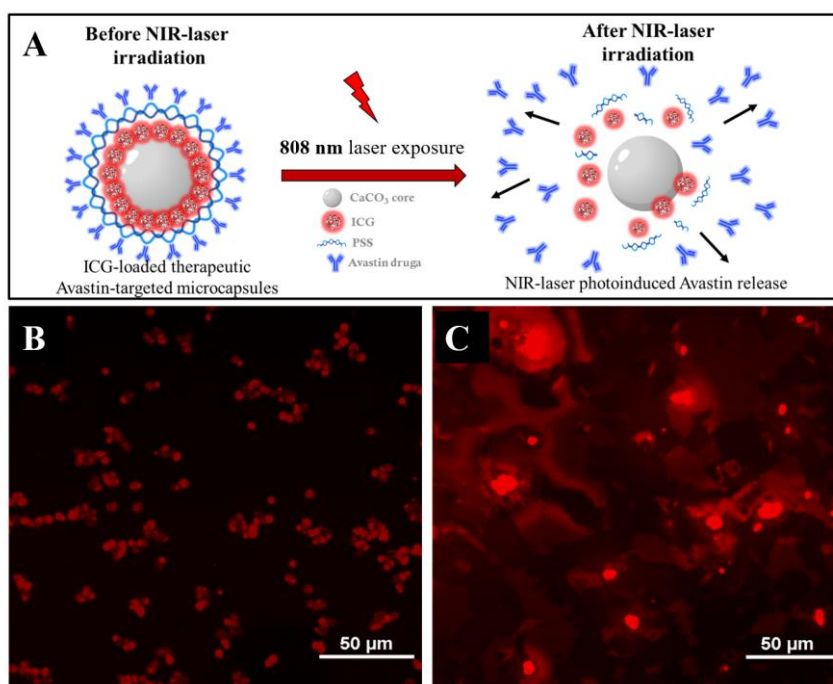


Fig. III.6 A Spectrul experimental FT-IR a core-ICG@Avastin înainte de iradiere (negru) și peletul MCs colectat în urma iradierii cu 785 nm (portocaliu) și 808 nm (verde) înregistrat în regiunea 500 – 4000 cm^{-1} . **B** Spectrul emisiei de fluorescență a core-ICG@Avastin înainte de iradiere (negru), respectiv în urma iradierii cu 785 nm (portocaliu) și cu 808 nm (verde) colectat în regiunea specifică emisiei medicamentului Avastin.

Astfel, se poate concluziona faptul că, utilizând laserul 808 nm pentru a iradia core-ICG@Avastin, proprietățile fototermice a ICG-ului sunt semnificativ sporite în comparație cu

linia laser 785 nm. Acest rezultat este în corelație cu cantitatea crescută de Avastin eliberat de către microsistemul fabricat și expus la laserul de 808 nm, dovedit de către spectrele de fluorescență.

Ulterior, am colectat imagini RCM-NIR pentru a evalua dacă morfologia MCs a suferit modificări în urma expunerii la laseri în NIR, ce generează încălzirea MCs hibride și implicit eliberarea moleculei terapeutice. **Schema III.1A** ilustrează grafic ruperea core-ICG@Avastin și eliberarea medicamentului, induse de laserul NIR 808 nm, împreună cu imagini RCM-NIR achiziționate asupra MCs înainte (**Schema III.1B**) și în urma iradierii cu 808 nm (**Schema III.1C**). În **Schema III.1B** se poate observa forma sferică specifică și regulată a microsistemului hibrid. Din **Schema III.1C** se poate deduce faptul că MCs targetate cu Avastin au fost deteriorate cu succes de către radiația NIR și astfel a rezultat ruperea straturilor de polielectroliți și implicit eliberarea ICG-ului în afara microsistemului (a se vedea emisia roșie din jurul microcapsulelor), împreună cu eliberarea anticorpului Avastin în soluție. Ruperea și spargerea core-ICG@Avastin demonstrează faptul că interacțiunea laser-microsistem, prin procese termice, este responsabilă pentru eliberarea medicamentului terapeutic Avastin în soluție.



Schema III.1 **A** Reprezentare schematică a mecanismului fotoindus de eliberare a Avastinului în soluție. **B** Imagine RCM-NIR a core-ICG@Avastin înainte și **C** în urma expunerii la laserul 808 nm. Core-ICG@Avastin au fost depuse pe substrat de sticlă și uscate la temperatura camerei înainte de a fi analizate.

III.4 Studii de citotoxicitate celulară *in vitro*

Primul pas către caracterizarea *in vitro* al MCs targetate cu Avastin a fost de a studia și monitoriza biocompatibilitatea MCs în urma tratării celulelor umane RPE D407 cu core-ICG@Avastin, prin intermediul testului de citotoxicitate WST-1. Astfel, am analizat răspunsul

celulelor umane D407 în urma tratamentului cu core-ICG și core-ICG@Avastin după 24 h de incubare. În ambele cazuri am analizat nouă concentrații diferite (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 și 150 microcapsule/celulă) pentru a determina concentrația optimă de MCs hibride, pentru a fi utilizate în studiile *in vitro* ulterioare.

Prin urmare, am observat o scădere a viabilității celulelor, într-o manieră dependentă de concentrația MCs administrate, atât pentru celulele tratate cu core-ICG, cât și pentru cele tratate cu core-ICG@Avastin, existând o relație indirect proporțională între viabilitate și concentrația de MCs. Diferențe semnificative de descreștere a viabilității se observă doar în cazul celulelor tratate cu core-ICG@Avastin (**Fig. III.7B**), la concentrațiile 20 – 150 microcapsule/celulă față de control. Cu toate acestea, în cazul ambelor tratamente (**Fig. III.7A și B**), valoarea viabilității celulare nu scade sub pragul IC50. Astfel, se poate concluziona caracterul non-toxic al celor două tipuri de MCs asupra celulelor umane de retină D407, chiar și la cele mai mari concentrații.

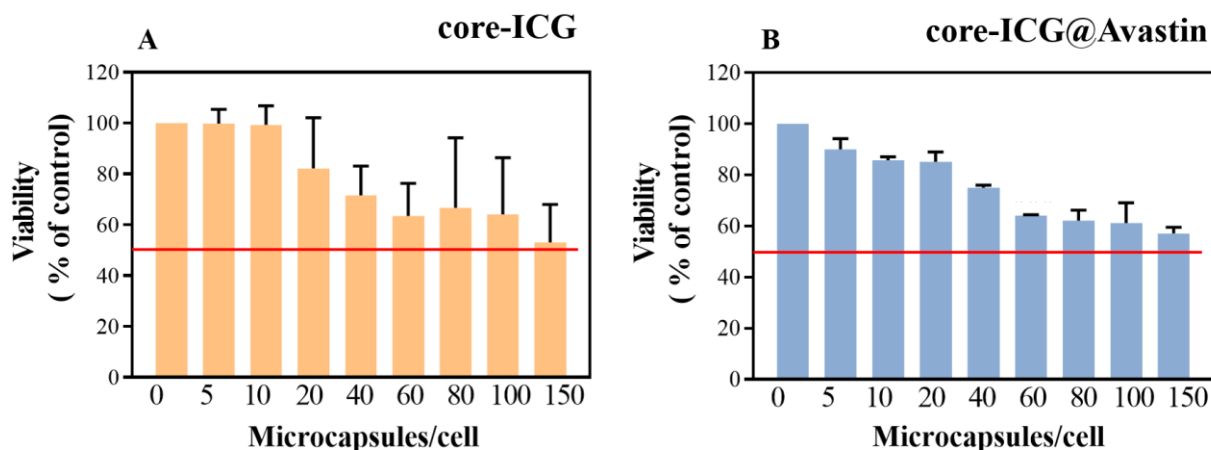


Fig. III.7 A Comparație între testele WST-1 efectuate asupra celulelor umane de retină D407 tratate cu core-ICG și B core-ICG@Avastin. Rezultatele au fost exprimate ca procent de viabilitate față de control iar celulele control (0) au fost considerate 100% viabile. Experimentele au fost realizate în duplicat pentru fiecare din cele două probe iar analiza statistică a rezultatelor obținute a fost realizată cu ajutorul programului Graph Pad – analiza one-way ANOVA.

III.5 Imagistică *in vitro*

Internalizarea și localizarea MCs individuale a fost analizată prin imagini de microscopie de fluorescență convențională, fiind un prim pas în monitorizarea internalizării core-ICG@Avastin în celule umane RPE D407. Celulele umane de retină D407 au fost tratate cu MCs targetate cu Avastin într-o concentrație de 10 microcapsule/celulă pentru 24 h. Biocompatibilitatea microsistemului hibrid, dovedită prima dată de către studiile de citotoxicitate, se observă și din imaginile de microscopie de fluorescență. Aceste imagini prezintă structura celulară foarte bine conservată în urma tratamentului cu core-ICG@Avastin. În **Fig. III.8** este prezentată imaginea de fluorescență achiziționată asupra celulelor umane de retină, nucleul fiind marcat cu DAPI

(albastru), filamentele de actină cu Alexa Fluor 488 (verde) iar microsistemul hibrid prezintă fluorescența marcată cu roșu, datorită proprietății fluorescente a ICG-ului. Se observă un număr mare de core-ICG@Avastin captate în celulele D407, reprezentată de punctele roșii fluorescente din interiorul celulelor.

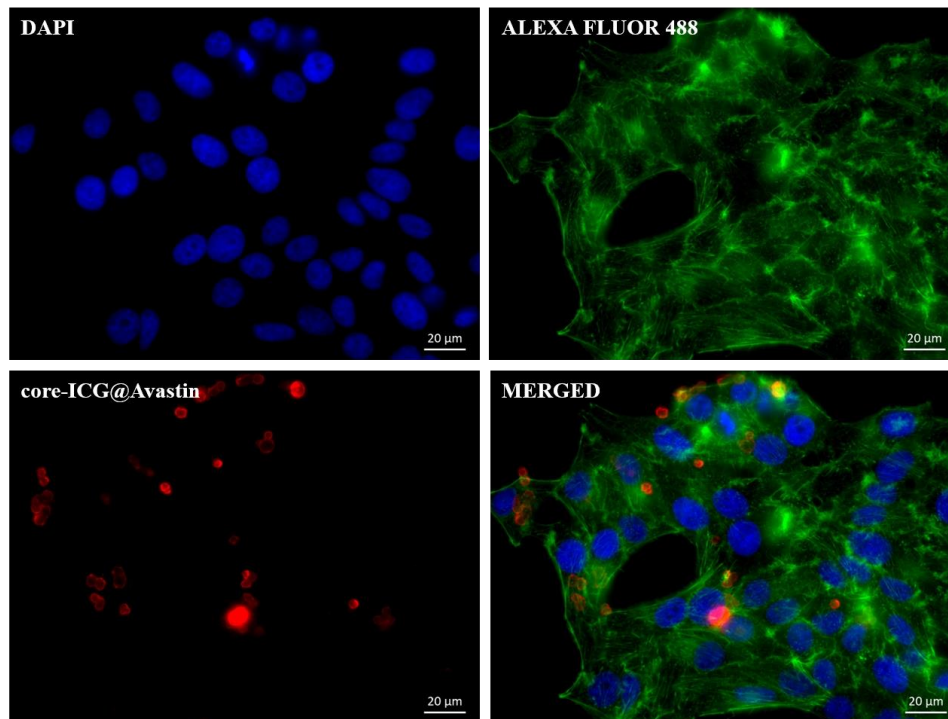


Fig. III.8 Imagine de microscopie de fluorescență achiziționată asupra celulelor umane RPE D407 tratate cu core-ICG@Avastin. Nucleul este marcat cu DAPI (albastru), filamentele de actină cu Alexa Fluor 488 (verde), core-ICG@Avastin prezintă fluorescență roșie iar în final avem o imagine suprapusă.

În paralel cu imaginile de fluorescență convențională, am achiziționat imagini de microscopie confocală de fluorescență, prin sistemul RCM, pentru a confirma internalizarea cu succes a MCs hibride în interiorul celulelor umane de retină D407, nu doar aderarea acestora pe suprafața celulelor, dar și pentru a obține detalii asupra distribuției spațiale a acestora. RCM este o tehnică non-invazivă ce permite achiziționarea de imagini cu o calitate foarte bună, la o rezoluție mai mare decât a microscopiei de fluorescență convențională și care, de asemenea, este capabilă de a scana proba în adâncime în întreg volumul, obținând secțiuni ortogonale a imaginilor 3D a celulelor investigate. Imaginile 3D RCM (**Fig. III.9A** și **B**) dovedesc faptul că celulele umane de retină D407 au fost capabile să internalizeze un număr mare de core-ICG@Avastin în interiorul lor. După cum se pot observa săgețile marcate cu portocaliu, MCs targetate cu Avastin se află într-adevăr în interiorul citoplasmei celulelor D407, lângă nucleu.

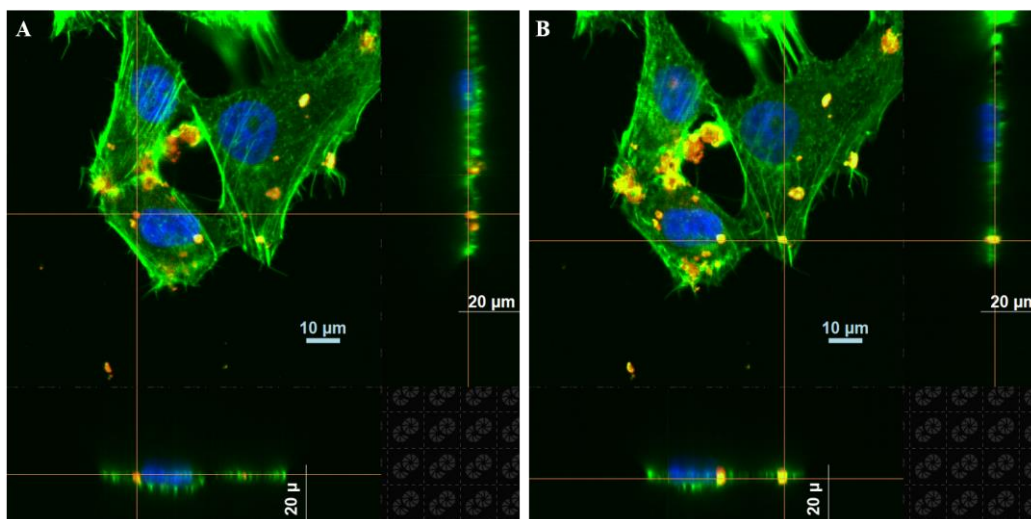


Fig. III.9 Imagini RCM cu secțiuni ortogonale z-stack (RCM-405, RCM-488, RCM-785) ce monitorizează două MCs hibride distincte (fluorescența roșie), marcate cu săgeți portocalii (A și B), în interiorul aceleiași celule umane RPE D407. Panoul de pe partea dreaptă reprezintă secțiunea transversală x-z, în timp ce panoul de jos reprezintă secțiunea transversală y-z a imaginii suprapuse RCM și prezintă distribuția în celulele D407 a core-ICG@Avastin.

Pentru a înțelege mai în profunzime internalizarea și localizarea celulară a core-ICG@Avastin, am folosit tehnica de microscopie TEM. Imaginile TEM (**Fig. III.10**) dezvăluie MCs sferice localizate în celule umane de retină D407, chiar lângă nucleu, ca și în cazul imaginilor 3D RCM. Celulele de retină prezintă nuclee mari și compacte care ocupă o parte mare din volumul total al celulei, și în general au câte doi lizozomi mari per celulă. Forma și procesele celulare limitate sunt o consecință a tripsinizării înainte de fixare și nu influențează metabolismul celular.

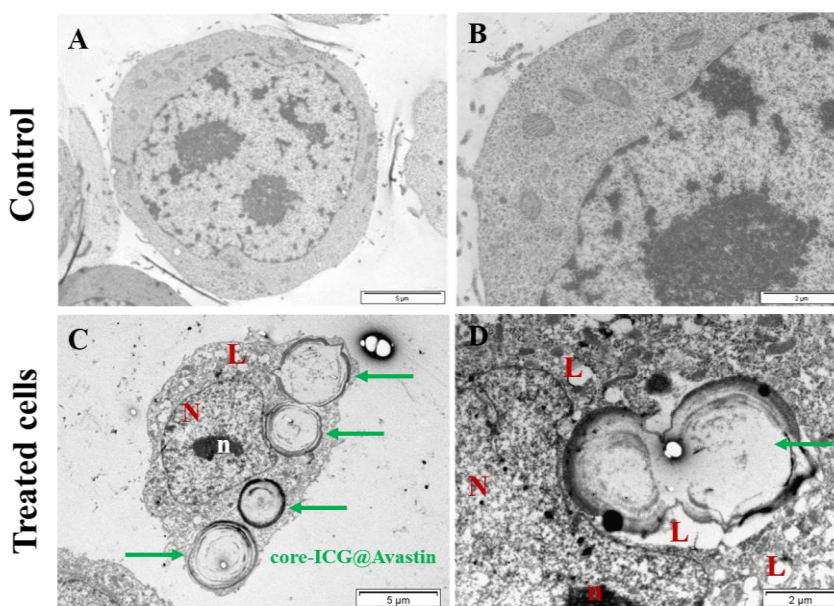


Fig. III.10 A,B Imagini TEM colectate asupra celulelor umane RPE D407 netratate (control) și C, D trate cu core-ICG@Avastin. N – nucleul, n – nucleuolus, L – lizozomi. Săgețile verzi indică MCs hibride targetate cu Avastin.

Celulele tratate cu core-ICG@Avastin prezintă MCs în citoplasmă, în vecinătatea membranei celulare și în apropierea nucleului (**Fig. III.10C și D**). Datorită contrastului mare a cristalelor de carbonat de calciu, se pot identifica cu ușurință core-ICG@Avastin în interiorul celulelor D407. MCs conjugate cu Avastin din interiorul celulelor de retină D407 prezintă forma sferică și dimensiunea de $4.5 \pm 0.35 \mu\text{m}$. La această dimensiune, procesul de endocitoză este implicit dependent de ligand sau apare prin intermediul macropinocitozei/fagocitozei. Se poate observa faptul că MCs hibride nu prezintă un înveliș membranar în citoplasmă iar majoritatea dintre ele se află în apropierea membranei celulare. Se presupune posibilitatea ca MCs hibride să intre în citoplasma celulelor de retină D407 prin formarea unor pori de intrare prin membrană în celulă, care nu dereglează metabolismul celular.

III.6 Iradierea celulelor *in vitro* și analiza citotoxicității în condiții simulate de retinopatie diabetică

În ultima etapă a acestei lucrări, am analizat activitatea fototermică a MCs targetate cu Avastin asupra celulelor umane RPE D407. Concret, în urma studiilor efectuate în soluție, am decis să utilizez laserul 808 nm pentru experimentele *in vitro*, datorită faptului că am dovedit eliberarea medicamentului Avastin într-o cantitate mai mare decât dacă am utilizat laserul 785 nm. Astfel, pentru a evalua efectul terapeutic *in vitro* al core-ICG@Avastin în urma iradierii, am studiat în prealabil citotoxicitatea MCs hibride *in vitro* asupra celulelor umane RPE D407 în condiții de hiperglicemie, utilizând testul WST-1. Tratamentul cu core-ICG@Avastin s-a administrat în 8 concentrații diferite: 0, 5, 10, 20, 60, 80, 100 și 150 microcapsule/celulă. În primul rând, am simulat hiperglicemia fiziologică (>14 mM glucoză) regăsită în pacienții bolnavi de RD, apoi am analizat două seturi de probe, mai exact am analizat viabilitatea celulelor umane D407 hiperglicemice tratate cu core-ICG@Avastin în paralel cu viabilitatea celulelor umane D407 hiperglicemice tratate cu MCs hibride și iradiate cu laserul în NIR. Prin urmare, celulele RPE D407, aflate în condiții de stres hiperglicemic, au prezentat modificări ale proliferării celulelor umane ca răspuns la tratamentul cu MCs hibride în diferite concentrații (**Fig. III.11A**). Începând cu 10 microcapsule/celulă, viabilitatea celulară a scăzut datorită concentrațiilor mari de MCs, însă fără a scădea sub pragul IC50. Astfel, se confirmă faptul că MCs hibride targetate cu Avastin, în intervalul de tratament 5 – 150 microcapsule/celulă, nu prezintă efect citotoxic semnificativ asupra celulelor umane RPE D407.

Mai mult, în urma iradierii cu 808 nm a celulelor tratate cu același interval de concentrații menționat mai sus, apar modificări în populația celulară, după cum se poate observa în **Fig. III.11B**. De la concentrația de 10 microcapsule/celulă, viabilitatea celulelor aflate în condiții de

stres hiperglicemic începe să prolifereze și continuă să crească direct proporțional cu concentrația de tratament administrată. Astfel, se atinge maximul de proliferare de 200 % în cazul terapiei cu 80 microcapsule/celulă. Pe baza rezultatelor obținute, creșterea viabilității celulelor D407 ca răspuns la iradierea în NIR demonstrează ruperea microsistemului în urma expunerii la lumină în NIR și eliberarea medicamentului Avastin *in vitro*. Aceste rezultate sugerează efectul protector și curativ al medicamentului terapeutic Avastin asupra celulelor umane RPE D407 aflate în condiții de diabet.

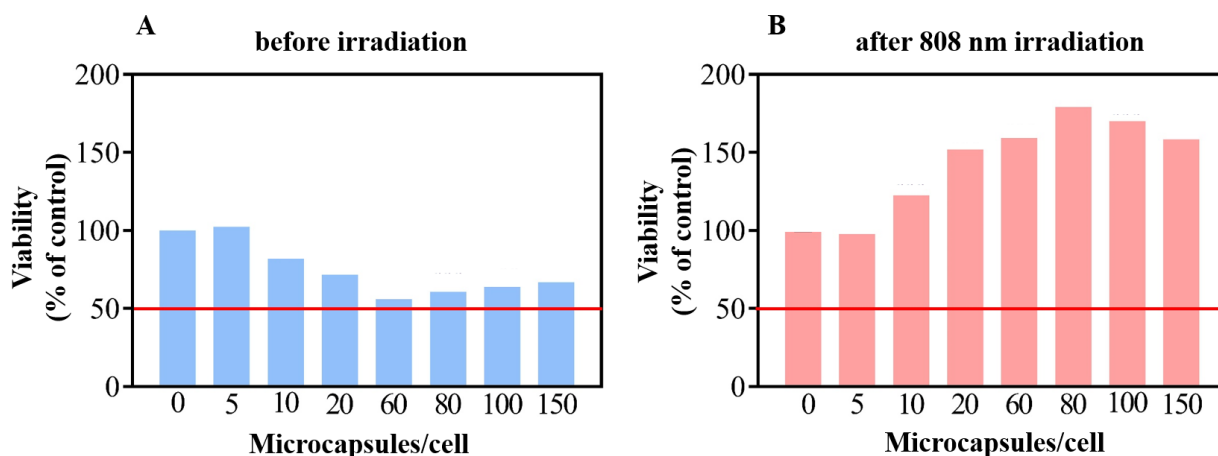


Fig. III.11 A Influența core-ICG@Avastin asupra proliferării celulelor umane RPE D407, în urma tratamentului cu diferite concentrații de MCs (0 – 150 microcapsule/celulă) înainte, respectiv B în urma iradierii cu laserul 808 nm, în condiții de hiperglicemie (30 mM glucoză). Viabilitatea celulară a fost măsurată cu ajutorul testului WST-1. Experimentele au fost realizate în triplicat pentru fiecare din cele două probe iar analiza statistică a rezultatelor obținute a fost realizată cu ajutorul programului Graph Pad – analiza one-way ANOVA.

În final, viabilitatea și moartea celulară a celulelor umane RPE D407 tratate cu core-ICG@Avastin, în urma expunerii pentru 15 min la laserul 808 nm și în urma marcării cu Calceină-AM și IP, au fost evaluate utilizând microscopia convențională de fluorescență. Colorantul Calceină-AM se utilizează pentru a determina viabilitatea celulelor vii; datorită activității esterazei intracelulare în celulele vii, acesta se activează odată ce pătrunde în celule și marchează fluorescent nucleul acestora. Aceasta este o metodă de orientare generală pentru a demonstra viabilitatea și vitalitatea celulelor. În comparație, coloantul IP se utilizează în determinarea celulelor moarte, deoarece acesta nu poate pătrunde în celulele vii care au membrana celulară intactă, doar în celulele ce au suferit modificări și rupturi de membrană și sunt implicit moarte. Imaginile de microscopie convențională de fluorescență (**Fig. III.12**) determină că majoritatea celulelor au fost marcate cu Calceină-AM (fluorescența verde), doar un număr neglijabil de celule au fost pozitive pentru IP (fluorescența portocalie). Astfel, am demonstrat faptul că, eliberarea fotoindusă a medicamentului Avastin din microsistem nu afectează negativ celulele umane RPE vii, din contră,

acestea se vindecă de diabet și proliferază. Aceste rezultate susțin utilizarea core-ICG@Avastin ca agenți fototermici activi pentru tratarea RD.

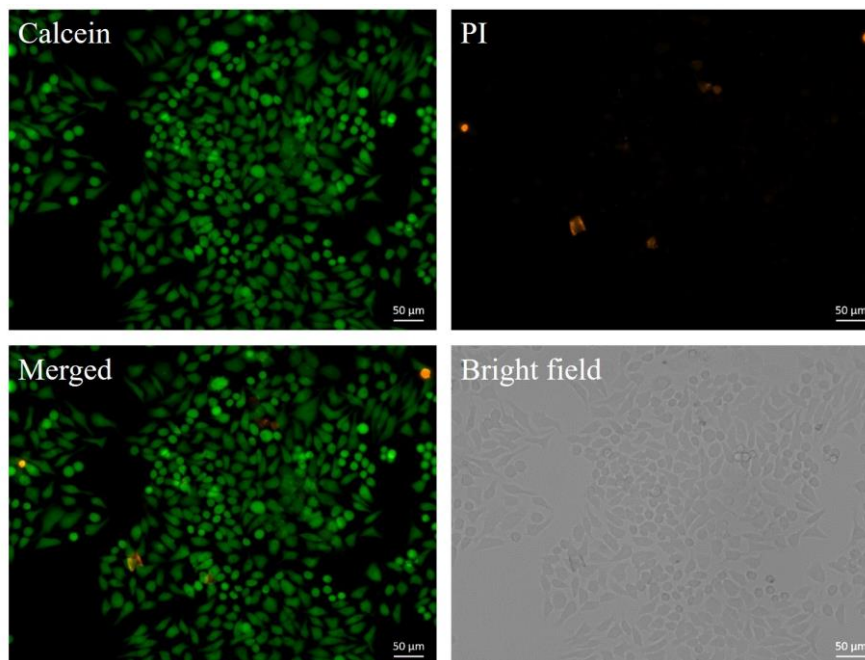


Fig. III.12 Eliberarea fotoindusă (iradiere 15 min) *in vitro* a medicamentului Avastin, utilizând celulele umane RPE D407 tratate cu core-ICG@Avastin. Celulele au fost marcate în urma iradierii cu Calceină-AM (fluorescența verde) și cu IP (fluorescența portocalie).

Pe baza acestei analize și a întregului studiu *in vitro*, propunem un tratament alternativ și minim invaziv, ce se administrează printr-o singură injecție intraoculară și un singur interval de iradiere a microsistemului cu un laser în NIR. Rezultatele obținute până în momentul de față susțin livrarea țintită și eliberarea medicamentului terapeutic cu precizie spațiotemporală excelentă în urma expunerii la lumina din NIR. Administrând o singură doză de tratament, se depășește dezavantajul administrării repetate a medicamentelor ce se folosesc la ora actuală în tratarea RD, care sunt dificil de livrat și necesită mai multe intervenții pentru a obține efectul terapeutic dorit. Astfel, microsistemul hibrid, conjugat cu molecula terapeutică Avastin, s-a dovedit a fi o unealtă de livrare și eliberare de medicament extrem de eficientă și minim invazivă în încercarea de a trata RD.

Concluzii finale și perspective viitoare

La finalul acestui studiu, am raportat și validat noi agenți terapeutici activi fototermic *in vitro*, compuși din MCs polimerice hibrid, înglobate cu ICG și conjugate cu Avastin, nou fabricate prin tehnica de depunere strat-cu-strat pentru o livrare țintită și eliberarea moleculei terapeutice ca răspuns la iradierea în NIR, ca tratament alternativ al RD. Forma sferică regulată și dimensiunea medie de $4.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ este confirmată atât de investigațiile DLS și SEM, cât și RCM-NIR. Aceste MCs hibride targetate cu Avastin prezintă o eficiență de încărcare foarte bună a fluoroforului ICG, de 75 %, împreună cu o eficiență excelentă de conjugare a moleculei terapeutice Avastin de suprafața MCs, de peste 95 %. În plus, prinderea cu succes a medicamentului Avastin de microsistem este confirmată în primul rând prin măsurători de potențial zeta, mai apoi de diferența în maximul emisiei de fluorescență a celor două probe analizate, core-ICG și core-ICG@Avastin, iar în final, prin analiza benzilor vibraționale specifice Avastinului în spectroscopia FT-IR. Astfel, am validat proprietatea fototermică a core-ICG@Avastin în urma iradierii cu doi laseri în NIR, 785 și 808 nm, dovedită de creșterea de 10 °C după doar 15 min de iradiere cu laserul 785 nm, și de creșterea de 25 °C după expunere la laserul 808 nm. Mai mult, MCs hibride conjugate cu Avastin posedă capacitatea de a opera ca agenți fototerapeutici eficienți prin convertirea luminii în căldură la iradierea cu laserul în NIR în soluție, pentru eliberare fotoindusă a Avastinului. Core-ICG@Avastin au obținut coeficientul fototermic de conversie excelent de 20% în urma iradierii cu 785 nm și de 72 % în urma iradierii cu 808 nm. Proprietatea fototermică a fluoroforului ICG induce deformarea și ruperea straturilor de polielectroliți a MCs hibride ca răspuns la iradierea în NIR și implicit permite eliberarea medicamentului Avastin. Studiile *in vitro*, efectuate pe baza testelor citotoxice WST-1, dovedesc biocompatibilitatea și caracterul non-toxic al microsistemului asupra celulelor umane RPE D407. Localizarea și monitorizarea core-ICG@Avastin în interiorul celulelor RPE D407 a fost demonstrată atât prin imagistica de fluorescență convențională și confocală, cât și pe baza imaginilor TEM. Totodată, am testat efectul terapeutic *in vitro* al core-ICG@Avastin în urma expunerii la 808 nm și rezultatele s-au dovedit a fi promițătoare în condiții simulate de RD. Practic, am administrat glucoză celulelor umane RPE D407 și s-a analizat viabilitatea celulelor hiperglicemice tratate cu core-ICG@Avastin și iradiate și s-a dovedit proprietatea terapeutică a microsistemului, celulele diabetice proliferând ca urmare a acestui tratament. Prin urmare, acest studiu sugerează potențialul terapeutic al microsistemului hibrid inovator, ce posedă activitate fototermică pentru eliberarea fotoindusă a medicamentului terapeutic Avastin, ca un tratament alternativ și non-invaziv împotriva RD.

Ca activitate științifică vizată pe viitor, îmi propun să studiez în detaliu mecanismul de eliberare controlată a medicamentului Avastin în urma iradierii în NIR și să efectuez experimente suplimentare pentru a cuantifica cantitatea eliberată din microsistemul hibrid în funcție de timp. De asemenea, doresc să funcționalizez acest microsistem cu alte molecule bioactive de interes, pentru o livrare țintită și o eliberare controlată a unei game largi de medicamente, ca schemă de tratament pentru diferite afecțiuni și boli (ex: biofuncționalizarea cu acid folic pentru țintirea și tratarea celulelor de cancer ovarian).

Bibliografie

1. Evidenta Evoluției Diabetului Zaharat in Perioada 2010_2021.pdf.
2. Liu, Y. & Wu, N. Progress of Nanotechnology in Diabetic Retinopathy Treatment. *Int. J. Nanomedicine* Volume 16, 1391–1403 (2021).
3. Shaw, J. E., Sicree, R. A. & Zimmet, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14 (2010).
4. Rugină, D. *et al.* Resveratrol-delivery vehicle with anti-VEGF activity carried to human retinal pigmented epithelial cells exposed to high-glucose induced conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 181, 66–75 (2019).
5. Coman, C., Rugina, O. D. & Socaciu, C. Plants and Natural Compounds with Antidiabetic Action. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 40, 314 (2012).
6. Wilkin, T. J. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 44, 914–922 (2001).
7. Cryer, P. Hypoglycaemia: The limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II Diabetes*. *Diabetologia* 45, 937–948 (2002).
8. Antonetti, D. A., Klein, R. & Gardner, T. W. Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 366, 1227–1239 (2012).
9. Alshaikh, R. A., Waeber, C. & Ryan, K. B. Polymer based sustained drug delivery to the ocular posterior segment: barriers and future opportunities for the treatment of neovascular pathologies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 187, 114342 (2022).
10. Flaxman, S. R. *et al.* Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 5, e1221–e1234 (2017).
11. Carol Y Cheung, Fangyao Tang, Daniel Shu Wei Ting, Gavin Siew Wei Tan, & Tien Yin Wong. Artificial Intelligence in Diabetic Eye Disease Screening. *Asia-Pac. J. Ophthalmol.* 8, 158–164 (2019).
12. Seah, I. *et al.* Use of biomaterials for sustained delivery of anti-VEGF to treat retinal diseases. *Eye* 34, 1341–1356 (2020).
13. Radhakrishnan, K. *et al.* Hollow Microcapsules as Periocular Drug Depot for Sustained Release of Anti-VEGF Protein. *Pharmaceutics* 11, 330 (2019).
14. Brown, K. A., Rajendran, S., Dowd, J. & Wilson, D. J. Rapid characterization of structural and functional similarity for a candidate bevacizumab (Avastin) biosimilar using a multipronged mass-spectrometry-based approach. *Drug Test. Anal.* 11, 1207–1217 (2019).
15. Chakravarthy, U. *et al.* Ranibizumab versus Bevacizumab to Treat Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 119, 1399–1411 (2012).

16. Heier, J. S. *et al.* Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 119, 2537–2548 (2012).
17. Jiang, P. *et al.* Injectable biodegradable bi-layered capsule for sustained delivery of bevacizumab in treating wet age-related macular degeneration. *J. Controlled Release* 320, 442–456 (2020).
18. Liu, J. *et al.* Highly bioactive, bevacizumab-loaded, sustained-release PLGA/PCADK microspheres for intravitreal therapy in ocular diseases. *Int. J. Pharm.* 563, 228–236 (2019).
19. Lavinsky, D. & Palanker, D. NONDAMAGING PHOTOTHERMAL THERAPY FOR THE RETINA: Initial Clinical Experience With Chronic Central Serous Retinopathy. *Retina* 35, 213–222 (2015).
20. Rohrschneider, K. *et al.* Scanning laser ophthalmoscope fundus perimetry before and after laser photocoagulation for clinically significant diabetic macular edema. *Am. J. Ophthalmol.* 129, 27–32 (2000).
21. Lee, H.-J., Kang, T., Kwak, B.-S., Jo, Y.-J. & Kim, J.-Y. Long-term Effect of Panretinal Photocoagulation on Spectral Domain Optical Coherence Tomography Measurements in Diabetic Retinopathy. *Curr. Eye Res.* 42, 1169–1173 (2017).
22. Seiberth, V., Alexandridis, E. & Feng, W. Function of the diabetic retina after panretinal argon laser coagulation. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 225, 385–390 (1987).
23. Deschler, E. K., Sun, J. K. & Silva, P. S. Side-Effects and Complications of Laser Treatment in Diabetic Retinal Disease. *Semin. Ophthalmol.* 29, 290–300 (2014).
24. Amselem, L., Monés, J. M. & Arias, L. Photosensitizers and photodynamic therapy verteporfin. in *Retinal Pharmacotherapy* 297–305 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-1-4377-0603-1.00048-X.
25. Masse, F., Ouellette, M., Lamoureux, G. & Boisselier, E. Gold nanoparticles in ophthalmology. *Med. Res. Rev.* 39, 302–327 (2019).
26. Walker, T. D. Pharmacological attempts to reduce posterior capsule opacification after cataract surgery - a review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 36, 883–890 (2008).
27. Lin, Y.-X. *et al.* Photothermal Ring Integrated Intraocular Lens for High-Efficient Eye Disease Treatment. *Adv. Mater.* 29, 1701617 (2017).
28. Eskiizmir, G., Baskın, Y. & Yapıcı, K. Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis. in *Fullerens, Graphenes and Nanotubes* 331–374 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813691-1.00009-9.
29. Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J. & El-Sayed, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41, 2740–2779 (2012).

30. Ghasemi Falavarjani, K. & Nguyen, Q. D. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye* 27, 787–794 (2013).
31. Irigoyen, C., Ziahosseini, K., Morphis, G., Stappler, T. & Heimann, H. Endophthalmitis following intravitreal injections. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250, 499–505 (2012).
32. Sampat, K. M. & Garg, S. J. Complications of intravitreal injections. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 21, 178–183 (2010).
33. Cholkar, K., Dasari, S. R., Pal, D. & Mitra, A. K. Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. in *Ocular Transporters and Receptors* 1–36 (Elsevier, 2013). doi:10.1533/9781908818317.1.
34. Edwards, A. & Prausnitz, M. R. Predicted permeability of the cornea to topical drugs. *Pharm. Res.* 18, 1497–1508 (2001).
35. Ahmed, I. The Noncorneal Route in Ocular Drug Delivery. in *Ophthalmic Drug Delivery Systems, Second Edition* (ed. Mitra, A.) 335–363 (CRC Press, 2003). doi:10.1201/9780203912072.ch11.
36. Urtti, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1131–1135 (2006).
37. Maurice, D. M. Drug Delivery to the Posterior Segment from Drops. *Surv. Ophthalmol.* 47, S41–S52 (2002).
38. Loftsson, T., Jansook, P. & Stefánsson, E. Topical drug delivery to the eye: dorzolamide. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 90, 603–608 (2012).
39. Brazzell, R. K., Wooldridge, C. B., Hackett, R. B. & McCue, B. A. Pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor imirestat following topical ocular administration. *Pharm. Res.* 07, 192–198 (1990).
40. Ambati, J. *et al.* Diffusion of High Molecular Weight Compounds through Sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1181–1185 (2000).
41. Waite, D., Wang, Y., Jones, D., Stitt, A. & Raj Singh, T. R. Posterior drug delivery via periocular route: challenges and opportunities. *Ther. Deliv.* 8, 685–699 (2017).
42. Raghava, S., Hammond, M. & Kompella, U. B. Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1, 99–114 (2004).
43. Thackaberry, E. A., Lorget, F., Farman, C. & Bantseev, V. The safety evaluation of long-acting ocular delivery systems. *Drug Discov. Today* 24, 1539–1550 (2019).
44. Wang, M. *et al.* PHARMACOKINETIC COMPARISON OF KETOROLAC AFTER INTRACAMERAL, INTRAVITREAL, AND SUPRACHOROIDAL ADMINISTRATION IN RABBITS. *Retina* 32, 2158–2164 (2012).

45. Hosseini, K. *et al.* Pharmacokinetic Study of Dexamethasone Disodium Phosphate using Intravitreal, Subconjunctival, and Intravenous Delivery Routes in Rabbits. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 24, 301–308 (2008).
46. Rimpelä, A.-K., Kiiski, I., Deng, F., Kidron, H. & Urtili, A. Pharmacokinetic Simulations of Intravitreal Biologicals: Aspects of Drug Delivery to the Posterior and Anterior Segments. *Pharmaceutics* 11, 9 (2018).
47. Jumper, J. M., Dugel, P., Chen, S., Blinder, K. & Walt, J. Anti-VEGF treatment of macular edema associated with retinal vein occlusion: patterns of use and effectiveness in clinical practice (ECHO study report 2). *Clin. Ophthalmol.* Volume 12, 621–629 (2018).
48. Holz, F. G. *et al.* Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 99, 220–226 (2015).
49. Ehlken, C., Helms, M., Böhringer, D., Agostini, H. T. & Stahl, A. Association of treatment adherence with real-life VA outcomes in AMD, DME, and BRVO patients. *Clin. Ophthalmol.* Volume 12, 13–20 (2017).
50. Kim, H. *et al.* Controlled Drug Release from an Ocular Implant: An Evaluation Using Dynamic Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 45, 2722 (2004).
51. Castro-Navarro, V. *et al.* Intravitreal dexamethasone implant Ozurdex® in naïve and refractory patients with different subtypes of diabetic macular edema. *BMC Ophthalmol.* 19, 15 (2019).
52. Mathew, R., Pearce, E., Muniraju, R., Abdul-Hey, A. & Sivaprasad, S. Monthly OCT monitoring of Ozurdex for macular oedema related to retinal vascular diseases: re-treatment strategy (OCTOME Report 1). *Eye* 28, 318–326 (2014).
53. Sadiq, M. A. *et al.* Sustained-release fluocinolone acetonide intravitreal insert for macular edema: clinical pharmacology and safety evaluation. *Expert Opin. Drug Saf.* 14, 1147–1156 (2015).
54. Haghjou, N., Soheilian, M. & Abdekhodaie, M. J. Sustained release intraocular drug delivery devices for treatment of uveitis. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 6, 317–329 (2011).
55. Campochiaro, P. A., Gune, S., Maia, M., Ding, H. T. & Maass, K. Pharmacokinetic profile of the Port Delivery System with ranibizumab (PDS) in the phase 3 Archway trial. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 62, 350–350 (2021).
56. Chen, E. R. & Kaiser, P. K. Therapeutic Potential of the Ranibizumab Port Delivery System in the Treatment of AMD: Evidence to Date. *Clin. Ophthalmol.* Volume 14, 1349–1355 (2020).

57. Lu, Y. *et al.* Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats. *Int. J. Ophthalmol.* 7, 1–7 (2014).
58. Kim, H. & Csaky, K. G. Nanoparticle–integrin antagonist C16Y peptide treatment of choroidal neovascularization in rats. *J. Controlled Release* 142, 286–293 (2010).
59. Sakai, T., Ishihara, T., Higaki, M., Akiyama, G. & Tsuneoka, H. Therapeutic Effect of Stealth-Type Polymeric Nanoparticles with Encapsulated Betamethasone Phosphate on Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52, 1516 (2011).
60. Arranz-Romera, A. *et al.* Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma. *J. Controlled Release* 297, 26–38 (2019).
61. Suh, W., Nguyen, H. K., Lee, J. E. & Jeong, J. H. Therapeutic effect of apatinib-loaded nanoparticles on diabetes-induced retinal vascular leakage. *Int. J. Nanomedicine* Volume 11, 3101–3109 (2016).
62. Kim, K. E. *et al.* Neuroprotective Effects of Human Serum Albumin Nanoparticles Loaded With Brimonidine on Retinal Ganglion Cells in Optic Nerve Crush Model. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 56, 5641 (2015).
63. Puras, G. *et al.* Low molecular weight oligochitosans for non-viral retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 131–140 (2013).
64. Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. & Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 2, 8–21 (2006).
65. Robinson, R. *et al.* Nanospheres Delivering the EGFR TKI AG1478 Promote Optic Nerve Regeneration: The Role of Size for Intraocular Drug Delivery. *ACS Nano* 5, 4392–4400 (2011).
66. Yandrapu, S. K., Upadhyay, A. K., Petrash, J. M. & Kompella, U. B. Nanoparticles in Porous Microparticles Prepared by Supercritical Infusion and Pressure Quench Technology for Sustained Delivery of Bevacizumab. *Mol. Pharm.* 10, 4676–4686 (2013).
67. Liu, J. *et al.* Anti-Angiogenic Activity Of Bevacizumab-Bearing Dexamethasone-Loaded PLGA Nanoparticles For Potential Intravitreal Applications. *Int. J. Nanomedicine* Volume 14, 8819–8834 (2019).
68. Li, J. & Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* 1, 16071 (2016).
69. Yasin, H. & Yousaf, Z. Synthesis of hydrogels and their emerging role in pharmaceuticals. in *Biomedical Applications of Nanoparticles* 163–194 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816506-5.00009-7.

70. Chai, Q., Jiao, Y. & Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* 3, 6 (2017).
71. Li, X., Sun, Q., Li, Q., Kawazoe, N. & Chen, G. Functional Hydrogels With Tunable Structures and Properties for Tissue Engineering Applications. *Front. Chem.* 6, 499 (2018).
72. Alonso, J. M., Andrade del Olmo, J., Perez Gonzalez, R. & Saez-Martinez, V. Injectable Hydrogels: From Laboratory to Industrialization. *Polymers* 13, 650 (2021).
73. Kang Derwent, J. J. & Mieler, W. F. Thermoresponsive hydrogels as a new ocular drug delivery platform to the posterior segment of the eye. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 106, 206–213; discussion 213-214 (2008).
74. Matanović, M. R., Kristl, J. & Grabnar, P. A. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 472, 262–275 (2014).
75. Anwary, M., Kumar, P., du Toit, L. C., Choonara, Y. E. & Pillay, V. Polymeric, injectable, intravitreal hydrogel devices for posterior segment applications and interventions. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 46, 1074–1081 (2018).
76. Lau, C. M. L., Yu, Y., Jahanmir, G. & Chau, Y. Controlled release technology for anti-angiogenesis treatment of posterior eye diseases: Current status and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 126, 145–161 (2018).
77. Xie, B. *et al.* An injectable thermosensitive polymeric hydrogel for sustained release of Avastin® to treat posterior segment disease. *Int. J. Pharm.* 490, 375–383 (2015).
78. Park, D., Shah, V., Rauck, B. M., Friberg, T. R. & Wang, Y. An Anti-angiogenic Reverse Thermal Gel as a Drug-Delivery System for Age-Related Wet Macular Degeneration: An Anti-angiogenic Reverse Thermal Gel *Macromol. Biosci.* 13, 464–469 (2013).
79. Rauck, B. M. *et al.* Biocompatible Reverse Thermal Gel Sustains the Release of Intravitreal Bevacizumab In Vivo. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 55, 469 (2014).
80. Kim, S. *et al.* Safety and Biocompatibility of Aflibercept-Loaded Microsphere Thermo-Responsive Hydrogel Drug Delivery System in a Nonhuman Primate Model. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 9, 30 (2020).
81. Abbasi, E. *et al.* Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 247 (2014).
82. Kambhampati, S. P. & Kannan, R. M. Dendrimer Nanoparticles for Ocular Drug Delivery. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29, 151–165 (2013).
83. Chaplot, S. P. & Rupenthal, I. D. Dendrimers for gene delivery – a potential approach for ocular therapy? *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 542–556 (2014).

84. Marano, R. J., Toth, I., Wimmer, N., Brankov, M. & Rakoczy, P. E. Dendrimer delivery of an anti-VEGF oligonucleotide into the eye: a long-term study into inhibition of laser-induced CNV, distribution, uptake and toxicity. *Gene Ther.* 12, 1544–1550 (2005).
85. Yavuz, B. *et al.* Dexamethasone – PAMAM dendrimer conjugates for retinal delivery: preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 1010–1020 (2016).
86. Mu, H. *et al.* Multivesicular liposomes for sustained release of bevacizumab in treating laser-induced choroidal neovascularization. *Drug Deliv.* 25, 1372–1383 (2018).
87. Abrishami, M. *et al.* PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IN VIVO EVALUATION OF NANOLIPOSOMES-ENCAPSULATED BEVACIZUMAB (AVASTIN) FOR INTRAVITREAL ADMINISTRATION. *Retina* 29, 699–703 (2009).
88. Moein Moghimi, S. & Patel, H. M. Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 984, 384–387 (1989).
89. Yatvin, M. B., Kreutz, W., Horwitz, B. A. & Shinitzky, M. pH-Sensitive Liposomes: Possible Clinical Implications. *Science* 210, 1253–1255 (1980).
90. Honda, M. *et al.* Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. *Int. J. Nanomedicine* 495 (2013) doi:10.2147/IJN.S30725.
91. Purslow, C. & Wolffsohn, J. S. Ocular Surface Temperature: A Review. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 31, 117–123 (2005).
92. Campu, A., Craciun, A.-M., Focsan, M. & Astilean, S. Assessment of the photothermal conversion efficiencies of tunable gold bipyramids under irradiation by two laser lines in a NIR biological window. *Nanotechnology* 30, 405701 (2019).
93. Ferreira, N. N. *et al.* Alginate-Based Delivery Systems for Bevacizumab Local Therapy: In Vitro Structural Features and Release Properties. *J. Pharm. Sci.* 108, 1559–1568 (2019).
94. Foggia, M., Taddei, P., Torreggiani, A., Dettin, M. & Tinti, A. Self-assembling peptides for biomedical applications: IR and Raman spectroscopies for the study of secondary structure. *Proteomics Res. J.* 2, 231–272 (2012).
95. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1767, 1073–1101 (2007).
96. Noah, A. Z., El Semaary, M. A., Youssef, A. M. & El-Safty, M. A. Enhancement of yield point at high pressure high temperature wells by using polymer nanocomposites based on ZnO & CaCO₃ nanoparticles. *Egypt. J. Pet.* 26, 33–40 (2017).
97. Campu, A. *et al.* ICG-loaded gold nano-bipyramids with NIR activatable dual PTT-PDT therapeutic potential in melanoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 194, 111213 (2020).

Declarație

Subsemnata Daria Ioana Stoia, declar că Lucrarea de disertație “ *Microcapsule polimerice hibride pentru livrarea țintită și eliberarea stimulată de lumină în NIR a moleculei terapeutice Avastin la nivelul retinei umane*”, pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică din cadrul Universității Babeș-Bolyai, sub îndrumarea CS I Dr Monica Focșan și Conf Dr Dana Maniu, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Cluj-Napoca, 13.06.2023

Absolvent:

Daria Ioana Stoia

