

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINA

Neoplasmul de colon - o nouă abordare.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MIRCEA BEURAN

Student-doctorand:

ALINA MIHAELA PRODAN

2022

Cuprins

INTRODUCERE GENERALĂ	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 1: NOȚIUNI GENERALE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL CANCERULUI DE COLON	Error! Bookmark not defined.
1.1. Epidemiologie	Error! Bookmark not defined.
1.2. Factorii de risc pentru apariția cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.2.1. Factorii de risc asociați cu mediul.....	Error! Bookmark not defined.
1.2.2. Factorii de risc asociați cu terenul pacientului	Error! Bookmark not defined.
1.3. Genetica cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.4. Anatomia colonului.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1. Vascularizația colonului	Error! Bookmark not defined.
1.5. Tabloul clinic	Error! Bookmark not defined.
1.6. Diagnostic și tratament	Error! Bookmark not defined.
1.6.1. Diagnosticul cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.6.2. Diagnosticul clinic al cancerului de colon.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.3. Tratamentul cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.6.4. Tipuri de intervenții chirurgicale în funcție de localizarea tumorii primare	Error! Bookmark not defined.
1.6.5. Tratamente moleculare țintite.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.6. Citostatice utilizate în tratamentul metastazelor neoplasmului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.6.7. Linii de tratament folosite pentru terapia cancerului de colon .	Error! Bookmark not defined.
1.6.8. Tratamentul cancerului de colon cu metastaze....	Error! Bookmark not defined.
1.6.9. Metode moderne de tratament ale cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.6.10. Limitările tratamentului chimioterapic actual..	Error! Bookmark not defined.
1.6.11. Rolul nanomedicinii și a nanoparticulelor în tratamentul cancerului de colon	Error! Bookmark not defined.
1.6.12. Nanoparticule utilizate pentru terapia cancerului de colon ..	Error! Bookmark not defined.
1.7. Concluzii	Error! Bookmark not defined.

CAPITOLUL 2: CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIILE FIZICO-CHIMICE ȘI BIOLOGICE ALE OXIDULUI DE FIER CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN TRATAREA CANCERULUI DE COLON **Error! Bookmark not defined.**

- 2.1. Materiale și tehnici de caracterizare **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.1.1. Materiale **Error! Bookmark not defined.**
- 2.2. Tehnici de caracterizare **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.2.1. Studii de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) și Potențial Zeta **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.2.2. Microscopie electronică în transmisie (MET) **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.2.3. Microscopie electronică de baleiaj (MEB) **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.2.4. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR) **Error! Bookmark not defined.**
- 2.3. Studii biologice *in vitro* **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.3.2. Studii hematologice și biochimice ale sângelui... **Error! Bookmark not defined.**
- 2.4. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.1. Studii DLS și potențial Zeta **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.2. Studii MEB și MET **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.3. Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.4. Teste de citotoxicitate *in vitro* (MTT) **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.5. Evidențierea modificărilor de morfologie celulară prin microscopie în contrast de fază **Error! Bookmark not defined.**
 - 2.4.6. Studii hematologice **Error! Bookmark not defined.**
- 2.5. Concluzii **Error! Bookmark not defined.**

CAPITOLUL 3: CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL *IN VIVO* AL EFECTULUI NANOPARTICULELOR DE OXID DE FIER FUNCȚIONALIZATE CU CHIMIOTERAPIC **Error! Bookmark not defined.**

- 3.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**
- 3.2. Determinarea toxicității nanoparticulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ după administrarea intraperitoneală **Error! Bookmark not defined.**
 - 3.2.1. Metode **Error! Bookmark not defined.**
 - 3.2.2. Rezultate și discuții **Error! Bookmark not defined.**
- 3.3. Determinarea toxicității nanoparticulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ după instilarea intratraheală **Error! Bookmark not defined.**
 - 3.3.1. Metode **Error! Bookmark not defined.**

3.3.2. Rezultate	Error! Bookmark not defined.
3.4. Studiul efectului nanoparticulelor de γ -Fe ₂ O ₃ . funcționalizate cu 5-Fluorouracil (5-FU) și Doxorubicină (DOX).	Error! Bookmark not defined.
3.4.1. Metode	Error! Bookmark not defined.
3.4.2. Contribuții privind studiul <i>in vivo</i> al efectului nanoparticulelor de γ -Fe ₂ O ₃ . funcționalizate cu Doxorubicină (DOX).	Error! Bookmark not defined.
3.5. Contribuții privind studiul <i>in vivo</i> al efectului nanoparticulelor de γ -Fe ₂ O ₃ . funcționalizate cu 5 Fluorouracil (5-FU).....	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 4: CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	Error! Bookmark not defined.
defined.	
BIBLIOGRAFIE	Error! Bookmark not defined.
ANEXE.....	Error! Bookmark not defined.

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste de specialitate (selecție)

1. **Prodan AM**, Iconaru SI, Predoi MV, Predoi D, Motelica-Heino M, Turculet CS, et al. Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Layers Obtained by Sol-Gel Spin Coating Procedure. *Coatings*, 10, 14, 2019. <https://doi.org/10.3390/coatings10010014>. **IF = 2.436**
2. **Prodan AM**, Beuran M, Turculet CS, Popa M, Andronescu E, Bleotu C, et al. *In vitro* evaluation of glycerol coated iron oxide nanoparticles in solution. *Romanian Biotechnological Letters*, 23, 13901-13908, 2018. DOI:10.26327/RBL2018.219. **IF = 0.765**
3. Predoi D, Predoi MV, Iconaru SL, Ech Cherif El Kettani M, Leduc D, **Prodan AM**. Ultrasonic Measurements on β Cyclodextrin/Hydroxyapatite Composites for Potential Water Depollution. *Materials*, 10(6), 681, 2017. <https://doi.org/10.3390/ma10060681>. **IF = 2.467**
4. Predoi D, Iconaru SL, Deniaud A, Chevallet M, Michaud-Soret I, Buton N, **Prodan AM**. Textural, Structural and Biological Evaluation of Hydroxyapatite Doped with Zinc at Low Concentrations. *Materials* 10(3), 229, 2017. <https://doi.org/10.3390/ma10030229>. **IF = 2.467**
5. Beuran M, Negoii I, Vartic M, Runcanu A, Ciubotaru C, Cruceru A, **Prodan A**. Nonelective Left-Sided Colon Cancer Resections are Associated with Worse Postoperative and Oncological Outcomes: A Propensity-Matched Study. *Chirurgia* 113(2), 218–226, 2018. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.113.2.218>. **Revistă indexată în baze de date internaționale (BDI)**

6. Iconaru SL, Turculet C, Le Coustumer P, Bleotu C, Chifiriuc MC, Lazar V, Surugiu A, Badea M, Iordache FM, Soare M, **Prodan AM**. Biological studies on dextrin coated iron oxide nanoparticles. *Romanian Reports in Physics*, 68, 1536-1544, 2016. http://www.rrp.infim.ro/2016_68_4/A16.pdf **IF = 1.467**
7. Surugiu A, Andronescu E, Turculet C, Badea, M L, Iordache FM, **Prodan AM**. Antimicrobial studies on iron oxide nanoparticles in a silica matrix. *Scientific Bulletin Series B Chemistry and Materials Science*, 78, 53-62, 2016. https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/rez2bf_333399.pdf **Revistă indexată în baze de date internaționale (BDI)**
8. Popa CL, Andronescu E, Turculet C, Beuran M, Le Coustumer P, Badea ML, Surugiu A, **Prodan AM**. Preliminary histological studies on the influence of glycerol-iron-oxide nanoparticles. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 17, 1576, 2015. <https://joam.inoe.ro/articles/preliminary-histological-studies-on-the-influence-of-glycerol-iron-oxide-nanoparticles/fulltext> **IF = 0.383**
9. Ciobanu CS, Iconaru SL, Predoi D, Trușcă R-D, **Prodan AM**, Groza A, et al. Fabrication of Novel Chitosan–Hydroxyapatite Nanostructured Thin Films for Biomedical Applications. *Coatings* 11,1561, 2021. <https://doi.org/10.3390/coatings11121561>.
10. ESCP Enhanced Recovery Collaborating Group. An international assessment of the adoption of enhanced recovery after surgery (ERAS®) principles across colorectal units in 2019–2020. *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 23, 2980– 2987, 2021. <https://doi.org/10.1111/codi.15863>
11. Ciobanu SC, Iconaru SL, Predoi D, **Prodan AM**, Predoi MV. Physico-Chemical Properties and *In Vitro* Antifungal Evaluation of Samarium Doped Hydroxyapatite Coatings. *Coatings*, 10, 827, 2020. <https://doi.org/10.3390/coatings10090827>.
12. Groza A, Iconaru SL, Jiga G, Chapon P, Gaiaschi S, Verga N, Beuran M, **Prodan AM**, Matei M, Marinescu SA, Trusca R, Predoi D. The Effect of the Ionizing Radiation on Hydroxyapatite–Polydimethylsiloxane Layers. *Polymer Engineering & Science*, 59, 2406-2412, 2019. <https://doi.org/10.1002/pen.25247>
13. Iordache F, **Prodan A**, Beuran M, Gachabayov M, Bergamaschi R. Pilot study on bacterial contamination of the pelvis in proctectomy for cancer. *Colorectal disease : the*

- official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 20(9), 823-825, 2018. doi:10.1111/codi.14315
14. Turculet CS, **Prodan AM**, Negoii I, Teleanu G, Popa M, Andronescu, E, et al. Preliminary evaluation of the antifungal activity of samarium doped hydroxyapatite thin films. *Romanian Biotechnological Letters*, 23, 13928-13932, 2018. <http://www.rombio.eu/vol23nr5/4.pdf>
 15. The 2017 European Society of Coloproctology (ESCP) international snapshot audit of left colon, sigmoid and rectal resections - Executive Summary. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 20, 13-14, 2018. <https://doi.org/10.1111/codi.14391>
 16. An international multicentre prospective audit of elective rectal cancer surgery; operative approach versus outcome, including transanal total mesorectal excision (TaTME). *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 20,33-46, 2018. <https://doi.org/10.1111/codi.14376>
 17. Safety of primary anastomosis following emergency left sided colorectal resection: an international, multi-centre prospective audit. *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 20, 47-57, 2018. <https://doi.org/10.1111/codi.14373>
 18. Association of mechanical bowel preparation with oral antibiotics and anastomotic leak following left sided colorectal resection: an international, multi-centre, prospective audit. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 20, 15-32, 2018. <https://doi.org/10.1111/codi.14362>
 19. Beuran M, Tache C, Ciubotaru C, Vartic M, Hostiuc S, **Prodan A**, Sartelli M, Griffiths EA, Hernandez M, Negoii I. Sarcopenia is a Predictive Factor for Postoperative Morbidity and Mortality in Patients Having Radical Gastrectomy for Cancer. *Chirurgia*, 113(5), 678–686, 2018. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.113.5.678>
 20. Lică M, Radu V Ghe, Chelariu A, **Prodan A**, Chiotoroiu A, Beuran M. Fixarea atraumatică a plasei în cura laparoscopică (TAPP) a herniei inghinale. *Romanian Journal of Medical Practice*, 13 (2), 162-168, 2018. https://rjmp.com.ro/articles/2018.2/RJMP_2018_2_Art-16.pdf

21. Negoii I, **Prodan AM**, Marinescu Ș, Vartic M, Beuran M. D3 lymphadenectomy for right-sided colon cancer– a mini-review. *Journal of surgical Sciences*, 4(1), 34-37, 2017.
22. Iordache FM, **Prodan A**, Beuran M. Bacterial Contamination Of The Peritoneal Cavity During Left-Sided Resection With Closed Or Open Rectal Stump: A Randomized Controlled Trial. *World Journal of Colorectal Surgery*, 6(5), 5, 2017.
23. Popa CL, **Prodan AM**, Ciobanu CS, Predoi D. The tolerability of dextran-coated iron oxide nanoparticles during *in vivo* observation of the rats. *General physiology and biophysics*, 35 (3), 299-310, 2016. doi: 10.4149gpb_2016004
24. Popa CL, **Prodan AM**, Chapon P, Turculeț C, Predoi D. Inhibitory effect evaluation of glycerol-iron oxide thin films on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 465034, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/465034>
25. Iconaru SL, **Prodan AM**, Ciobanu CS, Motelica-Heino M, Predoi D. *In vivo* toxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in a silica matrix. *FEBS JOURNAL*, 281, 748-748, 2014.
26. Popa C L, Andronescu E, Stoicea M, Le Coustumer P, Galaup S, Beuran M, **Prodan A M**. Fabrication, characterization, toxicity and biocompatibility evaluation of iron oxide nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 9(1), 19-25, 2014. https://chalcogen.ro/19_Popa.pdf

Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale

Lucrări prezentate la congrese de chirurgie (selecție)

1. Iordache F, Smith B, Turculeț C, **Prodan A**, Ene D, Jianu G, V. Grama, M. Beuran. Clinicopathological correlations in right colon cancer. National Congress of Surgery (XXVII) 21 to 24 May 2014, Sinaia, Romania.
2. Turculeț C, Smith B, Iordache F, **Prodan A**, Ene D, Beuran M. Iatrogenic biliary lesions. National Congress of Surgery (XXVII) 21 to 24 May 2014, Sinaia, Romania.
3. Smith B, Iordache F, Turculeț C, **Prodan A**, Ene D, Vartic M, Grințescu I, Beuran M. Advanced gastric cancer - an experience of 3 years. National Congress of Surgery (XXVII) 21 to 24 May 2014, Sinaia, Romania.
4. Iordache F, Bergamaschi R, **Prodan A**, Beuran M. During Peritoneal bacterial contamination rectal resections with open or closed rectal stump. A randomized

controlled trial. 23rd Congress of the European Association of Endoscopic Surgery (EAES), June 3-6, 2015.

5. Iordache F, **Prodan A**, Damaceanu M, Turculeț C, Beuran M, Smith B, Ene D. Age of possible problems is a marker for Cholecystectomy laparoscopic gallbladder lithiasis - a case study control. 23rd Congress of the European Association of Endoscopic Surgery (EAES), June 3-6, 2015.
6. **Prodan AM**, Beuran M, Turculeț C, Negoii I, Teleanu G, Matei M, Avram P. Iron oxide nanoparticles used in cancer treatment. AMR 2021, apr 2017.
7. Florea L I, **Prodan A**, Mihai M. An uncommon approach to a large incisional hernia case combining Botulinum Toxin A administration with Posterior Component Separation. The International Medical Students' Congress of Bucharest, 5-9 decembrie 2018.

Lucrări prezentate la congrese din domeniul nanomedicinii (selecție)

1. **Prodan AM**, Popa CL, Stoicea M, Ciobanu CS, M Motelika HEINO, Sizaret S, D Predoi Characterization and Toxicity Evaluation of Iron Oxide in Silica Matrix by the *in vitro* and *in vivo* Assays ISOS XVII BERLIN 2014 - The 17th International Symposium on Silicon Chemistry, Berlin, Germany, 2014, Poster.
2. **Prodan AM**, Ciobanu CS, Beuran M, Turculeț C, Teleanu G, Motelika Heino M, Sizaret S, Predoi D. Effect of annealing temperature on antibacterial activity of silver doped hydroxyapatite films for Environmental Applications. 20th International Conference on Magnetism (ICM2015) "5 to 10 Jul2015, Barcelona, Spain, Poster.
3. **Prodan AM**, Ciobanu C S, Beuran M, C Turculeț, Pavelescu C, Teleanu G, Chapon P, Predoi D. Dextran coated iron oxide Evaluation of magnetic nanoparticles toxicity after intratracheal instillation. 15th EUROPEAN CONFERENCE ON SOLID STATE CHEMISTRY (15 ECSSC) . 23 to 26 august 2015, Viena, Austria.
4. **Prodan AM**, Ciobanu CS, Iconaru SL, Popa CL, Voicu G, Predoi D. Antimicrobial activity of collagen/silver doped hydroxyapatite composites against gram-positive and gram-negative bacteria. European Chemistry Congress, Roma, Italia (14-19 iunie 2016).
5. Iconaru S L, Popa CL, Ciobanu CS, Gaiaschi S, Chapon P, **Prodan AM**, Beuran M, Turculeț C, Predoi D. Evaluation of inhibitory effect of Glycerol-Iron oxide layers on MRSA", "8th International GD Day", Paris, Franta (14-18 septembrie 2016).

6. Predoi SA, Iconaru SL, Popa CL, Ciobanu CS, Gaiaschi S, Chapon P, Beuran M, Turculet C, **Prodan AM**. "Structural And Biological Evaluation Of Iron Oxide-Dextran Nanostructures Thin Films". 8th International GD Day", Paris, Franta (14-18 septembrie 2016).
7. Iconaru SL, Predoi SA, Beuran M, Ciobanu CS, Trusca R, Ghita R, Negoii I, Teleanu G, Turculet SC, Matei M, Badea M, **Prodan AM**. Fabrication and Characterization of Iron Oxide Dextran Composite Layers, AIP Conference Proceedings 1932, 030019 (2018).
8. Predoi D, Iconaru SL, **Prodan A M**, Ciobanu CS, Beuran M, Turculet CS, Soare M. In Vivo Toxicity Of Glycerol Coated Iron Oxide Nanoparticles. The 9th Conference on "Times of Polymers (TOP) & Composites, 17-21 June 2018, Ischia, Italy.
9. **Prodan AM**, Iconaru S L, Predoi M V, Motelica-Heino M, Guegan R, Lupescu O, Matei M, Predoi D. Biological properties of iron oxide-hydroxyapatite biocomposites. 5th International Conference on Mechanics of Composites (MECHCOMP5), Lisbon, Portugal 1-4 July 2019.

Premii

European Exhibition of Creativity and Innovation (EURO INVENT) – **Gold medal** – Rectal cancer treatment - a new approach. **Prodan AM**, Beuran M.

Brevete de invenție

1. Predoi D; Iconaru S L ; Soare M ; Nanescu F; Nicolaescu DA; Mocanu AC.; Predoi MV; Beuran M; **Prodan A M**. " Aplicarea spectroscopiei ultrasonice în analiza suspensiilor coloidale cu accent pe materialele biocompatibile ". A / 2017/00768.
2. Predoi D; Ghita R; Iconaru SL; Beuran M; **Prodan AM**; Chifiriuc M C. "Biopansament pe bază de hidroxiapatită dopată cu argint în matrice de colagen". A / 2017/00769.

Contracte de cercetare

1. Proiect PN II 131/2014: "Studiul prin imunofluorescență a efectului nanoparticulelor de oxid de fier funcționalizate asupra celulelor tumorale rectale maligne (DIAGTHR)";- **membru in echipa de cercetare**
2. Proiect PNII 259/2014: "Compozite bioceramice cu aplicatii locale in terapia antibacteriana (HAPAGTHR)"- **membru in echipa de cercetare**
3. Proiect 43 /PCCDI/2018: "Bionanomateriale inovative pentru tratament si diagnostic (BIONANOINOV) ". Proiecte componente:"Bionanomateriale pentru regenerarea

tesuturilor, diagnosticul, prevenția și tratamentul osteoporozei"; "Nanocompozite inteligente pentru diagnosticul și tratamentul cancerului osos" "Sonde Nanostructurate Pentru Diagnostic" - **membru în echipa de cercetare**

4. Proiect POCU/468/4/9/128106: "ROCCAS Dezvoltarea și implementarea la nivel național a cadrului organizatoric necesar inițierii screeningului în cancerul colorectal"; - **membru în echipa de cercetare**
5. Proiect PN-III-P2-2.1-PED-2019-1375: "Elaborarea de noi antiseptice pe baza de oxid de zinc pentru tratarea clinică a plăgilor" (MANAGEWOUND)" - **director de proiect**

INTRODUCERE GENERALĂ

Studii recente au evidențiat faptul că neoplasmul de colon ocupă primele locuri în rândul celor mai mortale și mai diagnosticate cancere din lume [1]. La ora actuală cunoaștem faptul că în apariția acestui tip de neoplasm sunt implicați mulți factori, însă cei mai importanți sunt reprezentați de stilul de viață alimentar „occidental”, mai ales dacă discutăm despre țările aflate în curs de dezvoltare, de obezitate, lipsa activității fizice susținute, consumul de carne roșie, alcool și tutun [1,2].

Toate aceste lucruri au determinat oamenii de știință din întreaga lume să depună eforturi susținute pentru îmbunătățirea metodelor de diagnostic, cât și a celor de tratament [3]. În ultimul secol tratamentul cancerului de colon a cunoscut o evoluție importantă, atât în ceea ce privește tratamentul chirurgical, cât și în ceea ce privește tratamentul radio și chimioterapic. Apariția testelor genetice a adus un beneficiu major în ceea ce privește metodele de diagnostic.

Secolul XX a adus o serie de tratamente neoadjuvante pentru cancerul de colon, însă pe lângă avantajele aduse de aceste tratamente au apărut și o serie de efecte adverse, ceea ce i-a determinat pe cercetători să caute soluții pentru limitarea acestor inconveniente. Acest lucru a condus la apariția unei ramuri medicale noi numită nanomedicina, care și-a găsit aplicabilitate atât în diagnosticul bolilor, cât mai ales în tratamentul acestora, inclusiv al neoplasmelor.

Rezultatele studiilor realizate pe nanoparticule au demonstrat faptul că datorită proprietăților lor unice, chimice, fizice, optice, electronice și magnetice, nanoparticulele pot fi utilizate cu succes în biotehnologie și biomedicină. Există o serie de avantaje în cazul utilizării acestor nanoparticule, ca de exemplu, îmbunătățirea solubilității, diminuarea ratei de degradare a substanțelor administrate, toxicitate sistemică scăzută toate acestea conducând la o eficacitate clinică îmbunătățită. Sistemele de nanoparticule magnetice care primesc cea mai mare atenție

din partea sferei medicale sunt oxizii de fier (magnetita și maghemita), datorită ușurinței de preparare și a stabilității la stresul oxidative. Acestea au în plus și o biocompatibilitate ridicată.

Având în vedere atât numărul mare de tumori de colon care apare anual [1], mortalitatea provocată de aceasta patologie, cât și problemele cauzate de tratamentul acestor tumori am hotărât să realizăm o abordare multidisciplinară în cazul acestui tip de neoplasm, bazată pe terapii inovative. Cu toate studiile existente la ora actuală în domeniu, trebuie să specificăm că cele mai importante date existente, referitoare la comportamentul nanoparticulelor *in vivo* se bazează pe date obținute pe animale, iar aplicarea acestora la oameni constituie un domeniu de cercetare în plină dezvoltare.

În cadrul acestui studiu, toxicitatea *in vivo* a nanoparticulelor, pe baza de oxizi de fier a fost testată pe animale de laborator. Ulterior, studii *in vivo* au fost realizate și cu nanoparticule de oxid de fier ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) funcționalizate cu medicamente chioterapice 5-Fluorouracil (5-FU) și Doxorubicina (DOX), în scopul studierii efectelor acestora, atât asupra diferitelor tipuri de tumori induse animalelor de laborator, cât și asupra organelor acestora. Lucrarea de față este structurată în patru capitole.

Capitolul I este dedicat prezentării generale a datelor din literatură cu privire la cancerul de colon. Am realizat o documentare amănunțită a metodelor actuale de diagnostic și tratament folosite în cazul acestui neoplasm. De asemenea sunt prezentate date generale în ceea ce privește terapiile inovative folosite în tratamentul cancerului de colon. Sunt descrise pe larg tipurile de nanoparticule utilizate la ora actuală în aplicațiile medicale, proprietățile magnetice ale acestora, principiile generale ale nanoparticulelor multifuncționale, strategiile terapeutice și de diagnostic.

Capitolul II prezintă metodele de preparare și tehnicile de caracterizare morfologică și structurală a oxidului de fier și a oxidului de fier funcționalizat cu medicamente chimioterapice. De asemenea, în cadrul acestui capitol sunt prezentate rezultatele studiilor fizico-chimice, analizelor hematologice precum și rezultatele studiilor de citotoxicitate *in vitro* realizate pe diverse linii celulare. Astfel, este prezentat comportamentul *in vitro* al nanoparticulelor de oxid de fier și al nanoparticulelor de oxid de fier funcționalizate cu medicamente chimioterapice. Pentru studiul dimensiunii, a structurii chimice și a morfologiei probelor am utilizat: microscopie electronică în transmisie (MET), microscopie electronică în transmisie cu rezoluție

înalta (HRTEM), difracție de electroni pe arie selectată (SAED) și microscopie electronică de baleiaj (MEB).

Studiile de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier au fost utilizate pentru a demonstra prezența maximelor specifice atât oxidului de fier cât și a chimioterapicelor în probele analizate. Tot aici este prezentată influența nanoparticulelor de maghemită asupra viabilității celulare în funcție de concentrația nanoparticulelor, cât și timpul de expunere a celulelor la acțiunea nanoparticulelor.

Capitolul III prezintă rezultate originale obținute prin testarea *in vivo* a nanoparticulelor de oxid de fier și a particulelor de oxid de fier funcționalizate cu agent chimioterapic, 5-FU, respectiv DOX. De asemenea a fost studiată influența câmpului magnetic, atunci când acesta este administrat asupra unor tumori în care s-a injectat γ -Fe₂O₃ funcționalizat cu DOX, respectiv 5-FU. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu au demonstrat biocompatibilitatea particulelor de γ -Fe₂O₃. Studiile au demonstrat faptul că, spre deosebire de chimioterapicul simplu, γ -Fe₂O₃ funcționalizat cu chimioterapice, împreună cu administrarea unui câmp electromagnetic, ajută la scăderea dimensiunii tumorii și împiedică apariția metastazelor la animalele de laborator.

Capitolul IV este destinat concluziilor. Aici doctoranda Alina Mihaela Prodan prezintă rezultatele originale obținute în cadrul acestui studiu și subliniază necesitatea dezvoltării unor studii ulterioare pe subiecți umani, pentru înțelegerea interacțiunilor dintre aceste nanoparticule și organismul uman și a provocărilor legate de chimia acestora.

CAPITOLUL 2: CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIILE FIZICO-CHIMICE ȘI BIOLOGICE ALE OXIDULUI DE FIER CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN TRATAREA CANCERULUI DE COLON

În ultimul timp o atenție deosebită a fost concentrată asupra studiului mai multor tipuri de nanoparticule de oxid de fier (magnetita (Fe_3O_4) și maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)), datorită proprietăților sale speciale. Fluidele magnetice biocompatibile, pe bază de apă au fost intens cercetate, în scopul dezvoltării de noi aplicații biomedicale, ca de exemplu, administrarea de medicamente țintite, imagistica prin rezonanță magnetică, terapia prin hipertermie intracelulară etc. O serie de nanoparticule pe baza de nanoparticule de oxid de fier sunt acum aprobate de Administrația pentru Alimente și Medicamente din Statele Unite (FDA) și sunt utilizate cu succes în domeniul medical(ex. Feridex I.V).

Suspensiile de oxid de fier (P1) și suspensiilor de oxid de fier funcționalizat cu 5FU (P3) s-au obținut printr-o metodă de coprecipitare adaptată în laborator. În condițiile descrise mai sus s-au obținut și suspensiile pe bază de oxid de fier funcționalizat cu doxorubicină.

Proprietățile fizico-chimice ale probelor obținute au fost analizate utilizând studii de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) și Potențial Zeta; Microscopie electronică în transmisie (MET); Microscopie electronică de baleiaj (MEB) și Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR).De asemenea, biocompatibilitatea suspensiilor pe bază de oxid de fier cât și a celor pe bază de oxid de fier funcționalizat cu agent chimioterapic a fost studiată prin studii *in vitro* pe mai multe linii celulare (Caco-2 (HTB-37, ATCC) - celule umane de adenocarcinom colorectal; linia celulară HeLa; celule osteoblaste umane primare (obținute din partea superioara

a femurului). Mai mult, sângele șobolanilor injectați cu soluția P3 a fost studiat prin analize hematologice și biochimice. Dimensiunea medie a nanoparticulelor probelor P1, P2 și P3 determinată prin DLS a fost estimată ca fiind de 47 nm (P1), 58nm (P2) și 67nm (P3). După cum se poate observa, diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor în suspensie a crescut în cazul probei P3, unde avem nanoparticule de maghemită funcționalizate cu 5-Fluorouracil. Rezultatele studiilor MEB privind morfologia probelor P2 și P3 este redată în Figurile 2.4. Așadar se poate observa că particulele au dimensiuni nanometrice, cu o pronunțată tendință de a se aglomera.

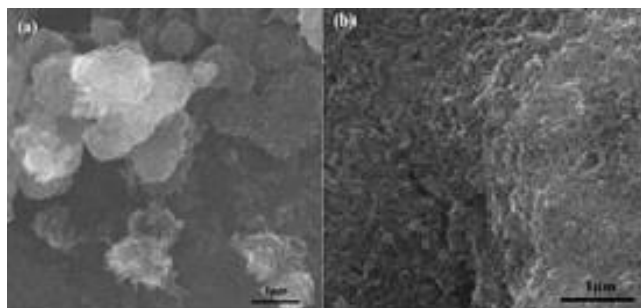


Figura 2.4. Micrografiile MEB specifice P2 (a) și suspensiei P3 (b).

În spectrul EDX obținut pe proba P3 (Figura 2.7.) se pot observa atât elementele constituente ale 5-FU (C, F, N, O), cât și elementele chimice specifice structurii oxidului de fier (Fe și O). Sunt prezente și maxime ce sunt atribuite elementelor chimice caracteristice port probei pe care a fost pusă proba pentru a putea fi analizată.

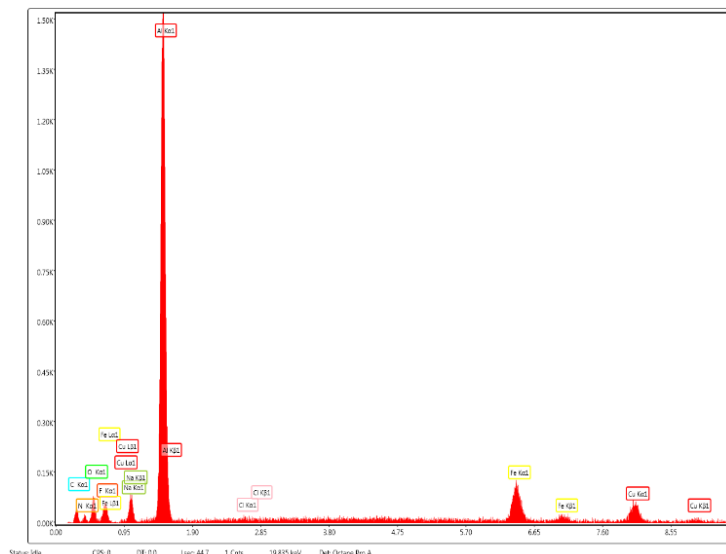


Figura 2.7. Spectrul EDX caracteristic suspensiei de oxid de fier/5-FU (P3).

Spectrele FTIR obtinute pe probele analizate evidențiază maximele specifice grupărilor vibraționale din structura oxidului de fier/5-FU. Am evaluat viabilitatea celulară prin testul cantitativ MTT. Studiile de viabilitate celulară efectuate au evidențiat faptul că expunerea celulelor tumorale de colon la nanoparticulele de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, în concentrații cuprinse între 0.1 – 100 $\mu\text{g/mL}$ Fe nu a determinat o scădere a viabilității celulare, demonstrând astfel biocompatibilitatea lor sporită.

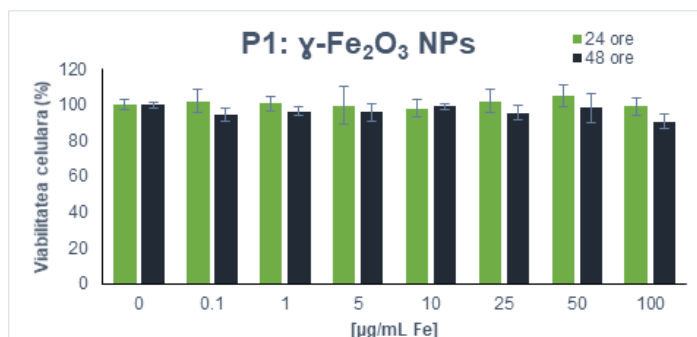


Figura 2.18. Viabilitatea celulelor Caco-2 după expunerea timp de 24 și 48 de ore la diferite concentrații de NPs între 0.1 și 100 $\mu\text{g/mL}$ Fe.

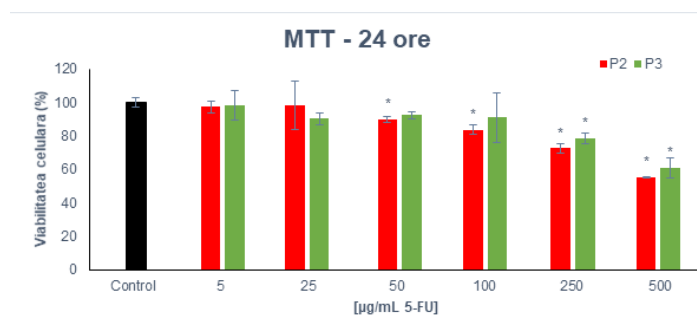


Figura 2.19. Viabilitatea celulelor Caco-2 după expunerea timp de 24 de ore la diferite concentrații de 5-FU între 5 și 500 $\mu\text{g/mL}$ din probele P2 și P3. Rezultate semnificative statistice au fost considerate cele cu valoarea lui $p < 0.05$ (*).

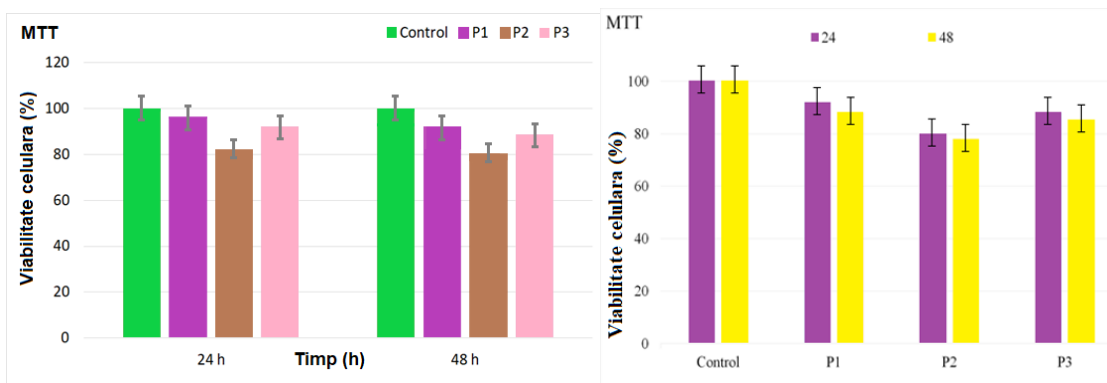


Figura 2.21. Viabilitatea celulelor HeLa după incubare timp de 24 si 48 h cu probele P1-P3(stanga). Viabilitatea celulelor osteoblaste după incubare timp de 24 si 48 h, cu probele P1-P3(dreapta).

Mai mult, rezultatele testului MTT au evidențiat că, după 48 de ore de incubare, a fost observată o scădere ușoară a viabilității celulelor HeLa pentru cele trei probe. Rezultatele au aratat, de asemenea, că viabilitatea celulelor osteoblaste a fost dependentă nu numai de tipul probelor, ci și de perioada de incubare. Analiza microscopică a câmpurilor de celule Caco-2 netratate (C) și tratate timp de 24 și 48 de ore cu suspensiile (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de NPs și 5-FU a pus în evidență modificări semnificative ale morfologiei celulelor tumorale. După cum se poate observa în Figura 2.24, aceste celule au prezentat un aspect deteriorat, comparativ cu celulele control. Aspectul a fost caracteristic unor celule apoptotice. Mai mult, s-a observat o scădere a densității celulare fapt ce a confirmat rezultatele testului MTT. Pe de altă parte, celulele care au fost expuse la nanoparticulele simple au prezentat un aspect normal, cu contur regulat și margine bine definită similar celulelor netratate (control).

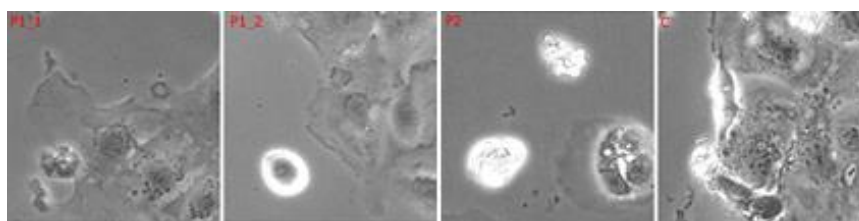


Figura 2.24. Câmpuri cu celule Caco-2 netratate (C) și tratate timp de 48 de ore cu suspensiile de NPs și 5-FU (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Magnificatie 20X.

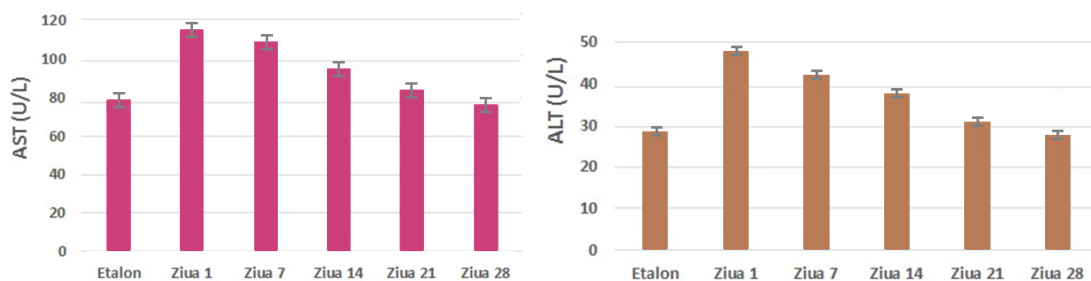


Figura 2.36. Funcția hepatică la șobolani, evaluată prin aspartataminotransferaza (AST)-*stanga* și prin alaninaminotransferaza (ALT)-*dreapta*.

Putem concluziona că studiile hematologice și biochimice realizate în cadrul acestei teze de doctorat nu au evidențiat modificări importante în cazul parametrilor biochimici studiați. Rezultatele obținute au accentuat faptul că probele P1 și P3 sunt candidate bune pentru a fi utilizate în dezvoltarea dispozitivelor biomedicale cu aplicabilitate în tratamentul cancerului [270-274].

CAPITOLUL 3: CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL *IN VIVO* AL EFECTULUI NANOPARTICULELOR DE OXID DE FIER FUNCȚIONALIZATE CU CHIMIOTERAPIC

Scopul acestui studiu a fost reprezentat de dezvoltarea unui sistem de livrare a medicamentelor chimioterapice care să țintească strict țesutul tumoral. În acest sens am sintetizat nanoparticule de oxid de fier ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), pe care le-am testat atât *in vivo*, cât și *in vitro*, pentru a le determina biocompatibilitatea la nivelul țesuturilor. Ulterior am funcționalizat aceste nanoparticule cu două medicamente chimioterapice utilizate des în tratamentul cancerului colorectal și anume 5-Fluorouracil (5-FU) și Doxorubicina (DOX).

3.1. DETERMINATEA TOXICITĂȚII NANOPARTICULELOR DE $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Așa cum am menționat anterior, în scopul determinării nivelului de toxicitate exercitat de nanoparticulele de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ la nivelul organismului am realizat experimente *in vivo*, pe animale de laborator. Au fost utilizați șoareci nude, adulți, de sex masculin, având o greutate ~

30 ± 5 g. Acești șoareci sunt imunosuprimați datorită absenței timusului și datorită unui număr redus de celule T, fapt ce favorizează dezvoltarea rapidă a tumorilor. Animalele au fost achiziționate de la Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie “Cantacuzino”, București. În concordanță cu Ghidul NIH pentru Îngrijirea și Utilizarea Animalelor de Laborator, înainte de realizarea experimentelor, toți șoarecii au fost găzduiți în condiții identice, au avut o dietă standard, au fost expuși la un ciclu de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric, au fost ținuti într-un mediu cu temperatură și umiditate ($60 \pm 10\%$) controlate. Toate animalele au fost menținute într-un mediu fără agenți patogeni. Pentru analizarea biodistribuției nanoparticulelor, respectiv a oxidului de fier, *in vivo*, șoarecii nude au fost împărțiți în două grupuri ($n=4$) și un grup martor. Ulterior animalele de laborator au fost injectate la nivelul cavității peritoneale cu o suspensie ce conține γ -Fe₂O₃, în ser fiziologic. Au fost folosite concentrații de γ -Fe₂O₃ de 1 și 1,5 ml/kg. După injectarea acestor suspensii a fost studiată toxicitatea la diferite intervale de timp, respectiv 24h și 72h. În acest sens a fost realizată analiza histopatologică a diferitelor țesuturi și organe, ca de exemplu, ficat, rinichi și splină, prelevate de la șoarecii nude injectați cu aceste suspensii.

Organele prelevate de la șoarecii nude au fost introduse în recipiente de plastic, ulterior au fost fixate cu formaldehidă 10%. Recipientele au fost inscripționate pe etichetă cu datele fiecărui animal de laborator în parte. Pentru fiecare animal de laborator am realizat o fișă de prelevare, pe care am inscripționat următoarele date: datele de identificare ale animalului de laborator, data prelevării țesutului, data primirii în laboratorul de histopatologie, tipul organului prelevat, soluția folosită pentru fixare, medicul trimițător, tipul și scopul examenului solicitat.

Analiza histopatologică, respectiv influența nanoparticulelor de γ -Fe₂O₃ asupra țesuturilor prelevate a fost realizată pe lamele de sticlă acoperite cu parafină, pe care s-a depus hematoxilină și eozină. Interpretarea rezultatului histopatologic a fost analizată de un medic anatomopatolog din cadrul Spitalului Clinic de Urgență București, fiind înregistrată ulterior în foaia de însoțire a animalului de laborator. Precizăm că după administrarea γ -Fe₂O₃ au supraviețuit toate animalele de laborator folosite în cadrul acestui experiment. De asemenea, acestea nu au înregistrat modificarea comportamentului, scădere ponderală sau apariția altor efecte secundare.

Compararea celor două grupuri, respectiv grupul în care a fost administrată suspensia de γ -Fe₂O₃, cu cel de control, căruia i s-a administrat ser fiziologic, după 24 și 72 h de la injectarea

intraperitoneală, nu a evidențiat modificări histopatologice ireversibile la nivelul organelor prelevate, pentru niciuna dintre concentrațiile testate. Având în vedere rezultatele obținute prin injectarea suspensiei de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ la nivelul cavității peritoneale, am decis continuarea studiilor și testarea efectului nanoparticulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ prin instilare intratraheală, în concentrații similare cu cele administrate pe cale intraperitoneală. În acest sens am folosit, un număr similar de animale de laborator, ca și în experimentul precedent. Aceste animale le-am administrat pe cale intratraheală, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, în diferite concentrații, respectiv 1 și 1,5 ml/kg. Ca și în cazul administrării intraperitoneale a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la sfârșitul experimentului, animalele au fost sacrificate, iar organele au fost analizate din punct de vedere histopatologic în scopul determinării efectului nanoparticulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, administrat intratraheal asupra organelor.

Menționăm că toate animalele de laborator au supraviețuit administrării de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la toate concentrațiile testate și nu au prezentat semne de disconfort, ca de exemplu, vărsături sau diaree, pe toată durata experimentului. Am analizat modificările induse de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ asupra țesutului pulmonar, hepatic și splenic. Ca și în cazul administrării intraperitoneale, aceste modificări induse de nanoparticulele de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ au fost dependente de concentrațiile utilizate și de intervalul de timp scurs de la momentul instilării nanoparticulelor. Așa cum am demonstrat prin analiza histopatologică realizată la nivelul organelor prelevate de la animalele de laborator, nu există un efect toxic al nanoparticulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, exercitat asupra țesuturilor și celulelor la 24, respectiv 72 ore de la administrarea a 1, respectiv 1,5 mg / kg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Rezultatele noastre demonstrează că administrarea particulelor de oxid de fier prin instilare intratraheală, nu are efect toxic la nivelul țesuturilor analizate. O dată stabilită biocompatibilitatea particulelor de oxid de fier, am decis testarea acestora în tratamentul tumorilor induse animalelor de laborator

3.4. STUDIUL EFECTULUI NANOPARTICULELOR DE $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. FUNCTIONALIZATE CU 5-FLUOROURACIL (5-FU) ȘI DOXORUBICINA (DOX).

Unul din medicamentele chimioterapice utilizate în tratamentul cancerului de colon este reprezentat de Doxorubicină (DOX) [331]. Acest medicament este folosit în tratamentul mai multor tipuri de neoplasme, ca de exemplu, cancerul de colon, sân, cancerul de vezică urinară, cancerul pulmonar, cancerul ovarian [332], având un spectru larg antitumoral [333].

Deși acest medicament este considerat a fi un chimioterapic eficient, folosirea acestuia la scară largă a condus la scăderea eficienței, ducând la apariția rezistenței și a numeroaselor

efecte secundare la nivelul întregului organism, ca de exemplu nefrotoxicitatea, inhibarea funcției hematopoiezei medulare și la cardiotoxicitate [333-334]. În vederea testării suspensiei de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, funcționalizate cu Doxorubicină, *in vivo* am utilizat șoareci nude. Animalelor de laborator le-au fost induse tumori, prin injectarea celulelor tumorale colorectale, HT 29. Pentru obținerea acestor tumori am injectat 19 șoareci nude, la nivelul regiunii anterioare a coapsei, cu 7×10^6 celule neoplazice colorectale, HT 29. Aceștia au avut o greutate de 25 ± 5 g. Ei au fost achiziționați de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare și Imunologie “Cantacuzino”, București. Pe tot parcursul experimentului șoarecii nude au fost ținuți în conformitate cu ghidul NIH pentru îngrijire și folosirea animalelor de laborator. La aproximativ trei, patru săptămâni de la injectarea celulelor tumorale au fost obținute tumori, cu dimensiuni cuprinse între 1-2 cm la nivelul regiunii anterioare a coapsei.

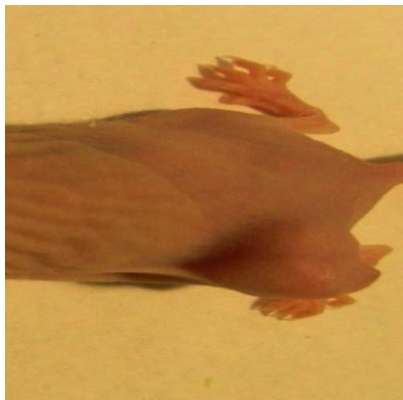


Figura 3.35. Tumoră obținută la o luna de la inocularea a 7×10^6 celule neoplazice colorectale, HT 29, la nivelul regiunii anterioare a coapsei.

În cadrul acestui studiu s-a dorit atât analizarea efectului $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, funcționalizat cu Doxorubicină, cât și a efectului câmpului magnetic asupra acestor formațiuni tumorale. Aplicarea unui câmp magnetic asupra zonelor neoplazice s-a realizat cu ajutorul unui instrument realizat de firma Nuclear NDT, în cadrul proiectului de cercetare 131- PN-II-PT-PCCA-2013-4-0006. Căldura care rezultă de aici poate fi folosită pentru diverse aplicații. Ea induce apoptoza celulelor tumorale prin hipertermie. De asemenea, ajută la accelerarea eliberării medicamentelor antitumorale.

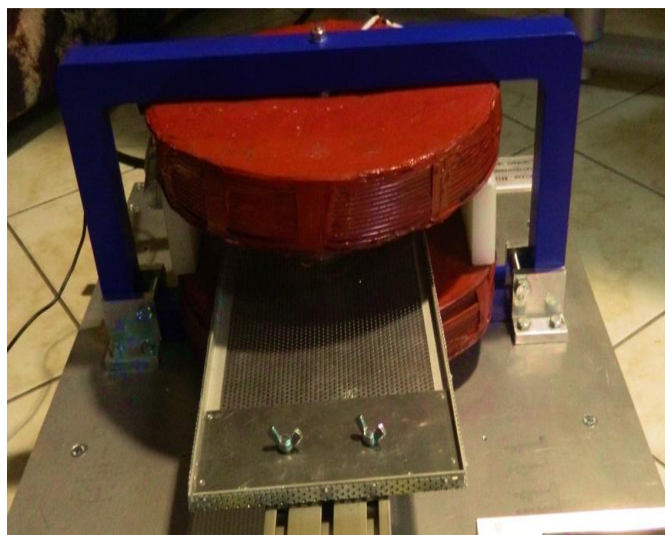


Figura 3.36. Electromagnet realizat de firma Nuclear NDT, în cadrul proiectului de cercetare 131- PN-II-PT-PCCA-2013-4-0006 [335].

Testele realizate pe animalele de laborator au fost făcute în funcție de mai mulți parametri și anume: concentrația soluțiilor utilizate, de timpul scurs de la administrarea soluției și de câmpul magnetic aplicat. Am împărțit animalele de laborator în opt grupuri ($n=2$ animale/grup). Acestea au fost injectate după următorul protocol: primele două grupuri au fost injectate cu o soluție 1, respectiv 1,5 mg / kg suspensie de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu Doxorubicina ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ _DOX), cele din grupurile 3 și 4 au fost injectate cu aceleași cantități de suspensie. În plus, acestor două grupuri le-a fost aplicat și un câmp magnetic produs de o bobină alimentată la o tensiune de 8V. Grupurile 5 și 6 au fost injectate cu 1, respectiv 1,5 mg / kg suspensie de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu Doxorubicina ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ _DOX). Asupra acestora s-a aplicat un câmp magnetic produs de o bobină alimentată la o tensiune de 12 V. Grupurile 7, 8 au fost injectate cu Doxorubicina (DOX) simplă, 0,5, respectiv 1 mg /kg. Un soarece a fost considerat etalon.

Soluțiile obținute au fost administrate la 24 h, 72 h, 7 zile și 10, zile prin injectare la nivelul tumorii. Pentru obținerea soluțiilor injectabile s-au folosit 0.5ml $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ și 0.5 ml DOX, respectiv 0.5ml $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ și 1 ml DOX. La fiecare administrare intratumorală a suspensiilor, respectiv 24h, 72h, 7 zile și 10 zile, grupurile 3-6 au fost expuse la un electromagnet, căruia i-au fost aplicate tensiuni diferite, respectiv 8 V și 12 V. Intensitatea maximă a câmpului magnetic a fost orientată la nivelul regiunii tumorale. Timpul de expunere a fost de 7 minute. La sfârșitul

experimentului, după 14 zile de la debutul tratamentului, animalele au fost eutanasiate, iar organele lor au fost prelevate.



Figura 3.38. Aplicarea țintită a câmpului magnetic asupra regiunii tumorale [335].

În scopul identificării efectului substanțelor administrate, cât și a câmpului magnetic, asupra formațiunilor tumorale și a organelor animalelor de laborator am realizat analiza histopatologică a acestora pe țesuturi hepatice, renale și splenice. Menționăm că după administrarea suspensiilor au supraviețuit toate animalele de laborator folosite în cadrul acestui experiment. Nu au fost depistate modificari în comportamentul animalelor, precum scădere ponderală sau apariția altor efecte secundare. Atât la administrarea soluțiilor, cât și la expunerea animalelor de laborator la câmpul magnetic am folosit 0,01ml/Kg Xilazina pentru anestezie. Comparând grupurile la care am administrat Doxorubicină simplă, cât și grupurile la care s-a administrat γ -Fe₂O₃_DOX și ulterior un câmp magnetic, cu etalonul, nu am constatat modificări macroscopice la nivelul organelor prelevate.

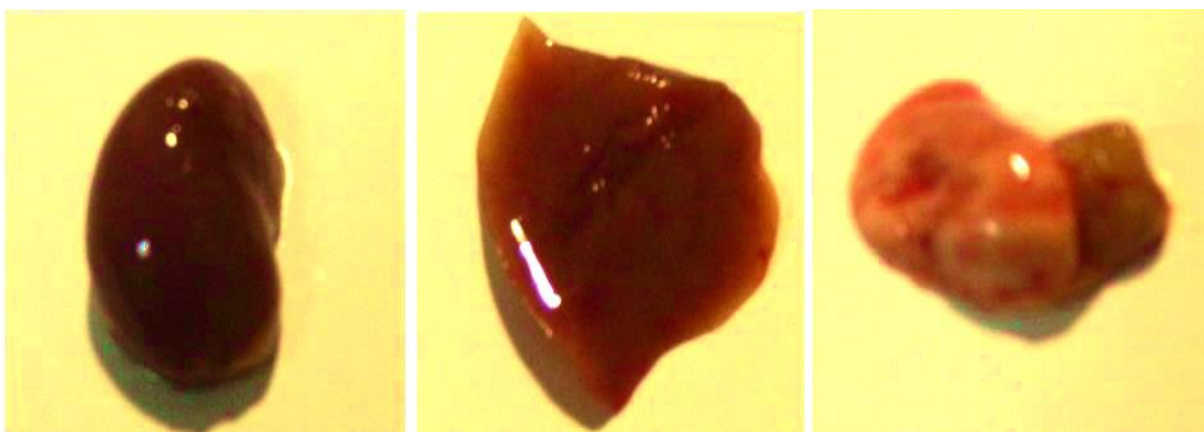


Figura 3.39. Aspectul macroscopic al rinichiului, ficatului, și plămânului la 14 zile de la injectarea unei soluții de γ Fe₂O₃_DOX și câmp magnetic alimentat la o tensiune de 12 V

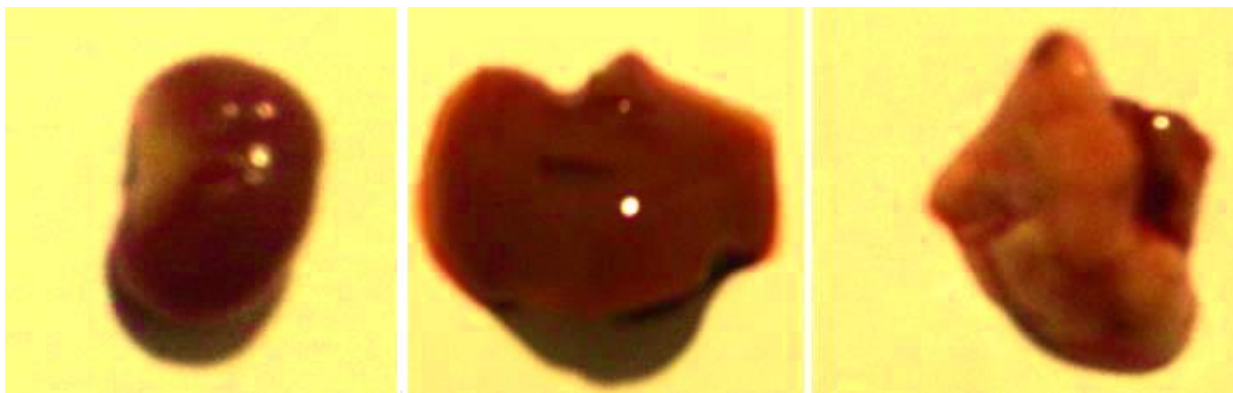


Figura 3.40. Aspectul macroscopic al rinichiului, ficatului, și plămânului la 14 zile de la injectarea unei soluții de DOX



Figura 3.41. Aspectul tumorii la 7 zile de la injectarea unei soluții de γ - Fe₂O₃_DOX și aplicarea unui câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 12V



Figura 3.42. Aspectul tumorii la 14 zile de la injectarea unei soluții de γ - Fe₂O₃_DOX și

aplicarea unui câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 12V



Figura 3.43. Aspectul tumorii la 14 zile de la injectarea unei soluții de Doxorubicină simplă.

Analiza histopatologică a țesuturilor prelevate de la animalele de laborator nu a identificat modificări în ceea ce privește țesutul renal, la animalele de laborator analizate, după administrarea $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-DOX}$ și Doxorubicinei simple, la niciuna din concentrațiile testate. În cazul țesuturilor pulmonare și hepatice nu au fost observate modificări patologice și nici apariția unor determinări secundare în cazul grupurilor la care s-a administrat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-DOX}$ și câmp magnetic, alimentat o o tensiune de de 8V, respectiv 12V.

În cazul animalelor de laborator la care a fost administrată Doxorubicina simplă, am constatat atât creșterea în dimensiune a formațiunii tumorale, la 14 zile de la începerea tratamentului, cât și apariția unor determinări secundare la nivelul țesutului pulmonar și hepatic, în cazul a doi șoareci nude. În urmă experimentelor făcute pe animalele de laborator la care am injectat suspensii de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-DOX}$ și după aplicarea unui câmp magnetic produs de o bobină alimentată la o tensiune de 8, respectiv 12 V am constatatat diminuarea dimensiunilor tumorilor, cât și lipsa apariției unor determinări secundare la nivelul celorlalte organe. Pentru studierea efectului $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu 5-FU am folosit un număr identic de animale de laborator, ca și în cazul Doxorubicinei. Am folosit același protocol de obținere al tumorilor ca și în cazul testării Doxorubicinei. Tratamentul a fost început la 4 săptămâni de la injectarea celule neoplazice colo-rectale HT 29 la nivelul regiunii anterioare a coapsei animalelor de laborator. Suspensiile au fost administrate după următorul protocol: primele două grupuri au fost injectate cu o soluție 1, respectiv 1,5 mg / kg suspensie de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu 5-FU ($\gamma\text{-$

Fe_2O_3 _5-FU), cele din grupurile 3 și 4 au fost injectate cu aceleași cantități de suspensie. În plus, acestor două grupuri le-a fost aplicat și un câmp magnetic alimentat la o tensiune de 8V. Grupurile 5 și 6 au fost injectate cu 1, respectiv 1,5 mg / kg suspensie de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu 5-FU ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ _5-FU). Asupra acestora s-a aplicat un câmp magnetic produs de o bobină alimentată la o tensiune de 12 V. Grupurile 7, 8 au fost injectate cu 5-FU simplu, 0,5, respectiv 1 mg /kg. Un soarece a fost considerat etalon. Suspensiile obținute au fost administrate la 24 h, 72 h, 7 zile și 10, zile prin injectare la nivelul tumorii. Pentru obținerea soluțiilor injectabile s-au folosit 0.5ml $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ și 0.5 ml 5-FU, respectiv 0.5ml $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ și 1 ml 5-FU.

La fiecare aplicare a tratamentului, respectiv 24h, 72h, 7 zile și 10 zile, grupurile 3-6 au fost expuse la un electromagnet, căruia i-au fost aplicate tensiuni diferite, 8 V și 12 V. Intensitatea maximă a câmpului magnetic a fost aplicată la nivelul regiunii tumorale. Ca și în cazul Doxorubicinei, timpul de expunere a fost de 7 minute. După 14 zile de la debutul tratamentului, animalele au fost eutanasiate, iar organele lor au fost prelevate.

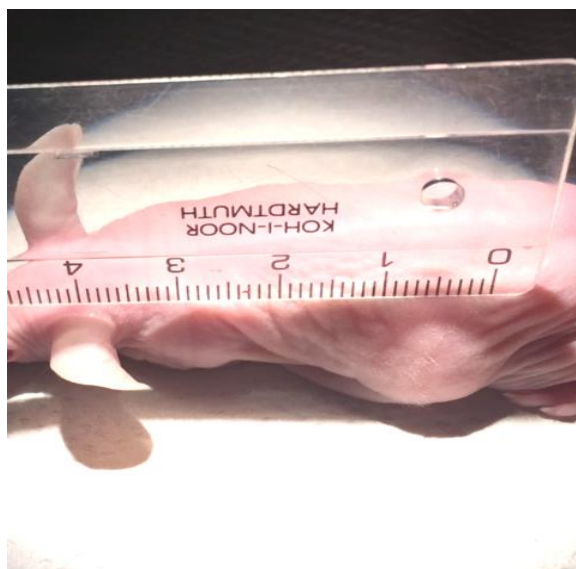


Figura 3.52. Aspectul tumorii la 7 zile de la injectarea unei soluții de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ _5-FU și aplicarea unui câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 12V



Figura 3.53. Aspectul tumorii la 14 zile de la injectarea unei soluții de γ - Fe_2O_3 _5-FU și aplicarea unui câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 12V

La două săptămâni de la începerea tratamentului cu γ - Fe_2O_3 _5-FU s-a observat o scădere a dimensiunii tumorale de aproximativ 0,5-0,9 cm, la toate animalele de laborator care au primit tratament cu γ - Fe_2O_3 _5-FU, respectiv γ - Fe_2O_3 _5-FU și câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de de 8V, respectiv 12V. De asemenea, am observat faptul că animalele din grupurile care au primit tratament cu γ - Fe_2O_3 _5-FU, respectiv 5-FU simplu, au înregistrat scădere ponderala de 3-5 g, în comparație cu etalonul, care și-a pastrat greutatea relativ constantă. În ceea ce privește supraviețuirea, nu au fost observate diferențe pe tot parcursul tratamentului. La 14 zile toți șoarecii au fost sacrificați, iar organele lor au fost analizate din punct de vedere histopatologic. Nu au fost constatate modificări macroscopice pentru niciunul din cele 8 grupuri analizate.



Figura 3.54. Aspectul macroscopic al rinichiului, ficatului, și plămânului la 14 zile de la injectarea unei soluții de γ Fe₂O₃-5-FU și aplicarea unui câmp magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 12 V

Testele anatomopatologice realizate la nivelul țesuturilor renale, hepatice, pulmonare și splenice nu au identificat modificări ireversibile. De asemenea spre deosebire de animalele la care am administrat Doxorubicina simplă, în cazul de față nu am observat apariția metastazelor pentru niciuna din suspensiile testate. Singură diferența între administrarea de 5-FU și γ -Fe₂O₃-5-FU, împreună cu câmpul magnetic obținut după aplicarea unei tensiuni de 8V, și respectiv 12V, a fost reprezentată de diferența de scădere a dimensiunii tumorale la nivelul grupurilor. Pentru grupurile la care au fost administrat 5-FU simplu, scăderea dimensiunilor tumorale a fost de 0,3-0,5 cm, în timp ce pentru γ -Fe₂O₃-5-FU, administrat împreună cu câmpul magnetic, scăderea dimensiunii tumorale a fost situată între 0,5-1 cm.

Capitolul 4. CONCLUZII SI CONTRIBUTII PERSONALE

Cancerul colorectal este a treia, cea mai frecventă boală neoplazică la nivel mondial, iar numărul pacienților noi aparuți este în continuă în creștere. Deși s-au făcut eforturi impotante în scopul îmbunătățirii atât a tratamentului chirurgical, cât mai ales a tratamentului chimioterapic, la ora actuală există o serie de neajunsuri pe care le-am dezbătut pe larg în cadrul acestei teze

de doctorat. Tratatamentul chirurgical a înregistrat un progres semnificativ, intervențiile chirurgicale cu viza oncologică având o rată mare de supraviețuire.

Studiul de față a încercat găsirea unei soluții pentru îmbunătățirea efectelor medicației chimioterapice folosite la ora actuală, cât mai ales pentru scăderea efectelor adverse datorate administrării acestor medicamente. Astfel, s-au obținut particule de oxid de fier la dimensiuni nanometrice și morfologie sferică printr-o metodă de coprecipitare adaptată. De asemenea, s-au obținut suspensii pe bază de oxid de fier funcționalizat cu 5FU și doxorubicină.

În spectrele EDX obținute pe probele analizate se observă prezența principalelor elemente chimice constitutive atât ale 5FU cât și cele ale oxidului de fier, și anume: Carbon (C), Fluor (F), Azot (N), Oxigen (O) și Fier (Fe). Mai mult, rezultatele au pus în evidență și faptul că probele P1 și P3 nu au prezentat o toxicitate ridicată față de toate tipurile de celule studiate (Caco 2, HeLa și osteoblaste), pentru nici unul din intervalele de timp studiate (24 și 48 de ore), comparativ cu controlul. Spre deosebire de acestea, proba P2 (5 Fluorouracil) a prezentat toxicitate pentru toate tipurile de celule studiate și pentru toate intervalele de timp studiate.

Determinarea biocompatibilității particulelor de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a fost realizată prin inocularea acestora, șoarecilor nude de laborator pe diverse cai de administrare. Aceste studii au demonstrat faptul că, atât în cazul administrării $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pe cale intraperitoneală, cât și pe cale intratraheală, animalele de laborator nu au prezentat semne clinice de toxicitate și nici modificări ale parametrilor sanguini analizați. De asemenea, nu au fost înregistrate nici modificări histopatologice ireversibile la nivelul țesuturilor, pentru niciuna din concentrațiile testate. În acest fel am demonstrat faptul că nanoparticulele de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sunt biocompatibile, nu produc modificări macroscopice sau microscopice la nivelul organelor. O dată stabilită biocompatibilitatea acestor nanoparticule, s-a încercat determinarea eficacității lor atunci când sunt funcționalizate cu diferite chimioterapice, respectiv 5-FU și Doxorubicină. Tumorile au fost obținute prin injectarea șoarecilor nude la nivelul regiunii anterioare a coapsei, cu celule HT 29.

La nivelul acestor tumori au fost injectate suspensii de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu 5-FU, respectiv Doxorubicină, la diferite concentrații și la diferite intervale de timp. De asemenea, a fost analizată influența aplicării unui câmp magnetic asupra acestor nanoparticule, în scopul îmbunătățirii efectelor antitumorale. Rezultatele obținute au fost încurajatoare, demonstrând de asemenea că nanoparticulele funcționalizate cu diverse medicamente chimioterapice produc

micșorarea dimensiunilor tumorilor, fără a afecta celelalte organe și sisteme, așa cum reiese din evoluția clinică a animalelor de laborator, analiza histopatologică realizată organelor prelevate de la aceste animale, precum și din determinările biologice analizate. Am demonstrat faptul că atât funcționalizarea nanoparticulelor, cât și direcționarea lor cu ajutorul unui câmp magnetic a garantat o eficiență ridicată a medicamentului, diminuând în același timp efectele secundare. Spre deosebire de animalele de laborator la care a fost administrat $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcționalizat cu chimioterapic și la care a fost aplicat un câmp magnetic, animalele care au primit chimioterapic simplu (Doxorubicina) au prezentat determinări secundare pulmonare și hepatice. Având în vedere rezultatele studiilor prezentate în cadrul tezei de doctorat putem spune că obiectivele tezei au fost atinse în proporție de 100% datorită faptului că am obținut particule cu dimensiuni nanometrice cu o biocompatibilitate superioară demonstrată atât de rezultatele studiilor *in vitro* cât și de cele *in vivo*.

Considerăm că rezultatele studiilor realizate de noi ar putea reprezenta baza pentru viitoare studii clinice de faza I și II, care să determine eficacitatea acestor nanoparticule atât în tratamentul, cât și în diagnosticul neoplasmului de colon, la subiecții umani.

Bibliografie selectivă

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 65(2), 87–108, 2015.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.*, 65(1), 5–29, 2015.

- [3] Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL. Colon and rectum. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. Trotti A (Eds). Springer NY, USA, 143–164 (2010).
- [4] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds). Colon and rectum. In: *TNM Classification of Malignant Tumours*. International Union Against Cancer, Wiley-Blackwell Chichester, Sussex, UK; NJ, USA, 309 (2010).
- [5] Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annu. Rev. Med.*, 66, 83–95, 2015.
- [6] Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337, 2012.
- [7] Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125–134, 2016.
- [8] Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 5(1), 65–72, 2005.
- [9] Field KM, Kosmider S, Jefford M, Jennens R, Green M, Gibbs P. Chemotherapy treatments for metastatic colorectal cancer: is evidence-based medicine in practice? *J. Oncol. Pract.*, 4(6), 271–276, 2008.
- [10] Hill BT, Moran E, Etievant C et al. Low-dose twice-daily fractionated X-irradiation of ovarian tumor cells in vitro generates drug-resistant cells overexpressing two multidrug resistance-associated proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Drugs*, 11(3), 193–200, 2000.
- [11] Emmert M, Pohl-Dernick K, Wein A et al. Palliative treatment of colorectal cancer in Germany: cost of care and quality of life. *Eur. J. Health Econ.*, 14(4), 629–638, 2013.
- [12] Quach C, Sanoff HK, Williams GR, Lyons JC, Reeve BB. Impact of colorectal cancer diagnosis and treatment on health-related quality of life among older Americans: a population-based, case–control study. *Cancer*, 121(6), 943–950, 2015.
- [13] Deeken JF, Slack R, Weiss GJ et al. A Phase I study of liposomal-encapsulated docetaxel (LE-DT) in patients with advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71(3), 627–633, 2013.
- [14] McGowan I, Gomez K, Bruder K et al. Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel(VivaGel) in sexually active young women (MTN-004). *AIDS*, 25(8), 1057–1064, 2011.

- [15] Yang K, Wen Y, Wang C. Clinical application of anticancer nanoparticles targeting metastasis foci of cervical lymph nodes in patients with oral carcinoma. *West China Journal of Stomatology*, 21(6), 447–450, 2003.
- [16] Matsumura Y, Hamaguchi T, Ura T et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle- encapsulated doxorubicin. *Br. J. Cancer*, 91(10), 1775–1781, 2004.
- [17] Graf N, Bielenberg DR, Kolishetti N et al. alpha(V)beta(3) integrin-targeted PLGA-PEG nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy of a Pt(IV) prodrug. *ACS Nano*, 6(5), 4530–4539, 2012.
- [18] Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J. Natl Cancer Inst.*, 101(19), 1308–1324, 2009.
- [19] Muguruma N, Ito S, Bando T et al. Labeled carcinoembryonic antigen antibodies excitable by infrared rays: a novel diagnostic method for micro cancers in the digestive tract. *Intern. Med.*, 38(7), 537–542, 1999.
- [20] Benezra M, Phillips E, Overholtzer M et al. Ultrasmall integrin-targeted silica nanoparticles modulate signaling events and cellular processes in a concentration-dependent manner. *Small*, 11(14), 1721–1732, 2014.
- [270] Popa CL, Prodan AM, Ciobanu CS, Predoi D. The tolerability of dextran-coated iron oxide nanoparticles during in vivo observation of the rats. *General physiology and biophysics*, 35 (3), 299-310, 2016.
- [271] Popa C L, Andronescu E, Stoicea M, Le Coustumer P, Galaup S, Beuran M, Prodan AM. Fabrication, characterization, toxicity and biocompatibility evaluation of iron oxide nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 9(1), 19-25, 2014.
- [272] Prodan AM, Beuran M, Turculet CS, Popa M, Andronescu E, Bleotu C, et al. In vitro evaluation of glycerol coated iron oxide nanoparticles in solution. *Romanian Biotechnological Letters*, 23, 13901-13908, 2018.
- [273] Iconaru SL, Turculet C, Le Coustumer P, Bleotu C, Chifiriuc MC, Lazar V, Surugiu A, Badea M, Iordache FM, Soare M, Prodan AM. Biological studies on dextrin coated iron oxide nanoparticles. *Romanian Reports in Physics*, 68, 1536-1544, 2016.

- [274] Prodan AM, Ciobanu C S, Popa CL, Iconaru SL, Predoi D. Toxicity evaluation following intratracheal instillation of iron oxide in a silica matrix in rats. *BioMed Research International*, 2014, 134260, 2014. doi: 10.1155/2014/134260
- [331] Kaminskas L. M., Mcleod V. M., Kelly B. D., Sberna G., Boyd B. J., Williamson M., et al. A Comparison of Changes to Doxorubicin Pharmacokinetics, Antitumor Activity, and Toxicity Mediated by PEGylated Dendrimer and PEGylated Liposome Drug Delivery Systems. *Nanomedicine*, 8, 103–111, 2012.
- [332] Kim T. W., Lee Y. S., Yun N. H., Shin C. H., Hong H. K., Kim H. H., et al. MicroRNA-17-5p Regulates EMT by Targeting Vimentin in Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer*, 123, 1123–1130, 2020.
- [333] Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects ; what Is the Appropriate Target. *Theranostics*, 4, 81–89, 2013.
- [334] Lee CC, Gillies ER, Fox M E, Guillaudeu S J, Fréchet J M, Dy E E, et al. A Single Dose of Doxorubicin-Functionalized Bow-Tie Dendrimer Cures Mice Bearing C-26 Colon Carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103, 16649–16654, 2006.