

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE,
„CAROL DAVILA" BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ**



***CONTRIBUȚIA METODELOR BIOFIZICE ÎN
EVALUAREA UNOR PARAMETRI CELULARI ÎN
CONDIȚII PATOLOGICE ȘI DE TERAPII CU
NANOPARTICULE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MIHAELA GEORGETA MOISESCU

Doctorand:

CHRISTIEN OKTAVIANI MATEI

2025

CONȚINUT

Introducere 1

I PARTE GENERALA 3

1.	Metode biofizice de evaluare a parametrilor celulari relevanți pentru studiile 1 și 24	
1.1.	Măsurarea potențialului membranei de repaus	5
1.2.	Măsurarea fluidității membranei	6
1.3.	Măsurarea ROS	7
1.4.	Test de agregare	8
1.5.	Testul conținutului de adenosin trifosfat (ATP)	9
1.6.	Măsurarea viabilității celulelor	10
1.7.	Măsurarea gradului de fragmentare a ADN-ului	11
2.	Structura și funcțiile trombocitelor; Afecțiuni patologice	12
2.1.	Trombocite	12
2.1.1.	Formarea trombocitelor	12
2.1.2.	Structura trombocitelor	14
2.1.3.	Activarea trombocitelor	16
2.2.	Mecanismele antitrombotice ale acidului acetilsalicilic (ASA)	19
2.3.	Leucemie limfocitară cronică (LLC)	20
2.3.1.	Aspecte introductive	20
2.3.2.	Clase chimioterapeutice în leucemia limfocitară cronică (LLC)	21
2.4.	Neoplasm mieloproliferativ cronic (MPN)	22
2.4.1.	Aspect introductiv	22
2.4.2.	Clase chimioterapeutice în neoplasmul mieloproliferativ cronic	23
3.	Oxid de zinc nanoparticule și oxid de fier/ dioxid de titan nanocompozite	23
3.1.	Oxid de zinc nanoparticule	23
3.1.1.	Avantaje structurale	24
3.1.2.	Metode de sinteză pentru uz biologic	24
3.1.3.	Aplicații biomedicale și biologice	24
3.1.4.	Provocări și perspective	26
3.2.	Nanocompozite de oxid de fier/dioxid de titan	26
3.2.1.	Avantaje structurale	27
3.2.2.	Metode de sinteză pentru uz biologic	27
3.2.3.	Aplicații biomedicale și biologice	27
3.2.4.	Provocări și perspective	28

II.	CONTRIBUȚII PERSONALE	29
4.	Ipoteza de lucru și obiectivele generale	30
4.1.	Ipoteza de lucru:	30
4.2.	Obiective generale:	30
5.	Metode generale de cercetare	31
5.1.	Populația de studiu și analiza eșantionului	31
5.2.	Analiza datelor	32
6.	Studiul 1: Starea trombocitelor în leucemia limfocitară cronică, neoplasmele mieloproliferative și tulburările trombotice	33
6.1.	Introducere	33
6.2.	Metode de cercetare	35
6.2.1.	Selectarea pacienților	35
6.2.2.	Pregătirea suspensiilor PLT	37
6.2.3.	Potențialul membranei de repaus plachetelor (RMP)	38
6.2.4.	Fluiditatea membranei trombocitare (MF)	40
6.2.5.	Evaluarea producției de specii reactive de oxigen	40
6.2.6.	Măsurarea ATP a trombocitelor	41
6.2.7.	Test de agregare a trombocitelor	42
6.2.8.	Analiza datelor	43
6.3.	Rezultate și discuții	44
6.3.1.	Efectul AAS la pacienții sănătoși de control și trombotici	44
6.3.2.	Pacienți cu LLC fără tromboză	55
6.3.3.	Pacienți cu NPM cu și fără tromboză	62
6.4.	Concluzie	80
7.	Studiul 2: Expunerea la nanoparticule pe culturi celulare	82
7.1.	Introducere	82
7.1.1.	Dezvoltarea și caracterizarea oxidului de zinc (ZnO) Nanoparticule	82
7.1.2.	Dezvoltarea și caracterizarea nanocompozitelor de oxid de fier/TiO ₂	84
7.2.	Metode de cercetare	85
7.2.1.	Prepararea nanoparticulelor și nanocompozitelor	86
7.2.2.	Testul de viabilitate celulară (test MTS)	87
7.2.3.	Evaluarea producției ROS	88
7.2.4.	Gradul de fragmentare a ADN-ului (testul cometei)	89
7.2.5.	Testul lactat dehidrogenază (LDH)	92

7.2.6. Analiza datelor	92
7.2.7. Seturi experimentale de cercetare	92
7.3. Rezultate și discuții	97
7.3.1. Experimentul 1: Testul de interferență al testului MTS al suspensiilor NP/NC (control fără celule)	97
7.3.2. Experimentul 2: Analiza biocompatibilității nanoparticulelor de oxid de zinc	99
7.3.3.	106
7.3.4. Experimentul 3: Analiza biocompatibilității nanocompozitelor Fe/TiO ₂	106
7.4. Concluziile	110
8. Concluzie și contribuții personale	112
8.1. Concluzie	112
8.2. Contribuții personale	116
8.3. Perspective:	116
9. Bibliografie	118
Apendice	123

Introducere

Progresele recente în tehnicile de imagistică celulară și în metodele biofizice ne-au îmbunătățit capacitatea de a studia structura și funcția celulară în timp real, aprofundând atât procesele normale, cât și cele patologice. Această teză explorează biofizica celulară în contextul malignităților hematologice și al nanomedicinii oncologice prin două studii. Prima examinează funcția trombocitară în leucemia limfocitară cronică (LLC) și neoplasmele mieloproliferative (MPN), unde proprietățile biofizice modificate pot servi drept markeri de diagnostic. Al doilea evaluează efectele nanoparticulelor ZnO:Mn și Fe₃O₄/TiO₂ asupra celulelor sănătoase și canceroase prin măsurarea potențialului membranar, fluidității, ROS, ATP și deteriorării ADN-ului. Împreună, aceste studii evidențiază rolul instrumentelor biofizice în caracterizarea bolilor și dezvoltarea terapeutică.

I. PARTE GENERALĂ

1. Metode biofizice de evaluare a parametrilor celulari relevanți pentru studiile 1 și 2

Sănătatea și funcția celulară pot fi evaluate prin parametri biofizici cheie, cum ar fi potențialul de membrană, fluiditatea, speciile reactive de oxigen (ROS), conținutul de ATP, viabilitatea, comportamentul de agregare și integritatea ADN-ului [1]. Potențialul membranelor de repaus, menținut de canalele ionice și transportori, reflectă excitabilitatea celulară și este măsurat folosind tehnici precum patch-clamp sau fluorofori sensibili la voltaj [2]. Fluiditatea membranei, esențială pentru funcția și semnalizarea proteinelor, depinde de compoziția lipidică și este analizată în mod obișnuit prin metode bazate pe fluorescență [2]. ROS, deși importante în semnalizare, provoacă daune oxidative atunci când sunt crescute și sunt detectate prin sonde fluorescente sau chemiluminiscentă [3,4]. Testele ATP indică activitatea metabolică, cu metode luminometrice bazate pe luciferază care oferă o sensibilitate ridicată [5,6]. Viabilitatea celulară este evaluată prin integritatea membranei, teste metabolice (de exemplu, MTT, Alamar Blue) sau markeri de citotoxicitate precum eliberarea LDH [7]. Testele de agregare evaluează comportamentul de grupare al celulelor sau particulelor - utilizate în analiza funcției trombocitare [8] sau în studiile de stabilitate a nanoparticulelor - în timp ce testele de fragmentare a ADN-ului (de exemplu, testul cometei, TUNEL) dezvăluie leziuni genomice legate de apoptoză sau stres genotoxic [9]. Împreună, aceste măsurători oferă o perspectivă cuprinzătoare asupra fiziologiei celulare, patologiei și răspunsurilor la stimuli externi.

2. Structura și funcțiile trombocitelor; Afecțiuni patologice

Trombocitele sunt fragmente celulare de mici dimensiuni, anucleate (2-5 μm) derivate din megacariocite, jucând roluri centrale în hemostazie, inflamație și reparare vasculară [8]. La leziuni vasculare, acestea se activează rapid, eliberează granule și se agregă prin remodelarea citoscheletică [10]. Dincolo de hemostaza primară, disfuncția trombocitară este un factor cheie care contribuie la tromboza patologică, în special în leucemia limfocitară cronică (LLC) și neoplasmul mieloproliferativ (MPN). În MPN, mutațiile de tip driver (de exemplu, JAK2, CALR, MPL) duc la proliferarea mieloidă și la o încărcătură trombotică ridicată din cauza funcției trombocitare modificate și a hipercoagulabilității [12]. Agenții chimioterapeutici, cum ar fi hidroxiureea și inhibitorii JAK-kinazei (de exemplu, ruxolitinib)

reduc riscul trombotic prin modularea numărului de trombocite, a stării redox și a potențialului membranar [13]. Acidul acetilsalicilic (AAS) rămâne la baza terapiei antitrombotice prin inhibarea ireversibilă a COX-1, suprimând agregarea mediată de tromboxan A₂ [14]. Astfel, integrarea profilului biofizic trombocitar cu strategiile terapeutice oferă potențialul de a îmbunătăți managementul trombozei și de a personaliza tratamentul în malignitățile hematologice.

3. Nanoparticule de oxid de zinc și nanocompozite de oxid de fier/dioxid de titan

Nanoparticulele de oxid de zinc (ZnO) și nanocompozitele de oxid de fier/dioxid de titan (Fe₃O₄/TiO₂) reprezintă două platforme promițătoare de nanomateriale în biomedicină, fiecare oferind avantaje fizico-chimice și funcționale distincte [15]. Nanoparticulele de ZnO, sintetizate prin metode sol-gel, hidrotermale sau verzi, prezintă o suprafață mare, fotoluminiscentă și citotoxicitate selectivă, permițând aplicarea lor în bioimagistică, administrarea medicamentelor, vindecarea rănilor și terapia cancerului [16]. Activitatea lor biologică este mediată în mare măsură de generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), eliberarea de ioni Zn²⁺ și perturbarea membranei, deși rămân provocări în modularea toxicității și prevenirea agregării. În paralel, nanocompozitele Fe₃O₄/TiO₂ combină răspunsul magnetic al oxidului de fier cu proprietățile fotocatalitice și biocompatibile ale TiO₂, permițând aplicații multifuncționale, inclusiv RMN, hipertermie, livrare de medicamente și terapie antibacteriană [17]. Aceste compozite permit localizarea precisă și răspunsurile terapeutice activate de lumină, dar necesită o optimizare suplimentară pentru activarea în infraroșu (NIR), sinteza scalabilă și biocompatibilitatea pe termen lung. Împreună, aceste nanostructuri subliniază potențialul materialelor ingineresti în terapia terapeutică, subliniind în același timp importanța evaluării standardizate și a validării in vivo pentru o traducere clinică sigură.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Această teză explorează intersecția dintre biofizica celulară, malignitățile hematologice și nanomedicina aplicată în oncologie prin două studii experimentale.

Obiectivul general al acestui studiu este de a demonstra utilitatea metodelor biofizice în detectarea modificărilor funcționale ale trombocitelor de la pacienții cu MPN și în evaluarea răspunsurilor celulare la terapiile cu nanoparticule.

- Studiul 1 își propune să evalueze parametrii biofizici (potențial de membrană, fluiditate, ROS, ATP și agregare) în trombocitele de la pacienții cu MPN și LLC pentru a identifica modificările legate de boală.
- Studiul 2 evaluează efectele nanoparticulelor de ZnO:Mn și Fe₃O₄/TiO₂ asupra celulelor normale și canceroase folosind teste de viabilitate, producție de ROS și fragmentarea ADN-ului pentru a determina impactul terapeutic.

5. Metode generale de cercetare

Acest studiu a implicat două modele experimentale. Studiul 1 a inclus voluntari sănătoși și pacienți cu afecțiuni hematologice (tromboză, LLC, NMP) de la Spitalul Colentina, București, care au semnat în prealabil un consimțământ informat aprobat de Comisia de Etică. Parametrii trombocitari - producția de RMP, MF și ROS au fost măsurați folosind spectrofotometria de fluorescență, în timp ce conținutul de ATP folosind chemiluminiscența și testul de agregare folosind agregarea prin transmisie de lumină (LTA). Studiul 2 a folosit nanoparticule ZnO:Mn și Fe₃O₄/TiO₂ sintetizate în colaborare cu Institutul Național de Fizică a Materialelor. Liniile celulare standardizate au fost cultivate în condiții 2D, iar testele biofizice (MTS, LDH, ROS, cometă) au evaluat efectele nanoparticulelor. Datele au fost procesate folosind Excel, SPSS v27, Phyton și Origin 8.0. Normalitatea a fost evaluată prin testele Shapiro-Wilk și Kolmogorov-Smirnov, cu metode statistice parametrice sau neparametrice adecvate. Semnificația a fost stabilită la $p < 0,05$.

6. Studiul 1: Starea trombocitelor în leucemia limfocitară cronică, neoplasmele mieloproliferative și tulburările trombotice

Proprietățile biofizice ale membranei plachetare, inclusiv potențialul membranei în repaus (RMP), fluiditatea membranei (MF) și producția de specii reactive de oxigen (ROS), sunt esențiale pentru activarea, agregarea și funcția trombocitelor. În tumorile maligne hematologice, cum ar fi neoplasmele mieloproliferative (MPN) și leucemia limfocitară cronică (LLC), precum și tulburările trombotice, atât anomaliile trombocitare cantitative, cât și calitative contribuie la complicații trombotice și hemoragice [13]. MPN-urile implică

proliferarea hematopoietică clonală determinată de mutații (de exemplu, JAK2 V617F), în timp ce LLC este asociată cu disfuncția trombocitară, în special sub tratament cu inhibitori de tirozin kinază Bruton (BTK), cum ar fi ibrutinib. Acest studiu investighează modificările trombocitare la pacienții cu MPN, LLC și trombotici prin evaluarea RMP, MF, ROS, ATP intracelular și funcția de agregare, cu accent pe efectele tratamentelor farmacologice și ale bolilor, inclusiv AAS și terapii citoreductive. Scopul este de a distinge modificările trombocitare specifice bolii de cele induse de evenimente trombotice sau medicamente.

6.1. Metode de cercetare

Acest studiu a inclus 261 de participanți: 55 de voluntari sănătoși și 206 pacienți de la Departamentele de Cardiologie și Hematologie ale Spitalului Colentina, toți înrolați cu consimțământul informat și aprobarea comitetului de etică. Grupul de control a fost format din 55 de persoane sănătoase, dintre care 25 au fost reevaluate după 14 zile de acid acetilsalicilic în doze mici zilnice (ASA, 75 mg) pentru a evalua modificările trombocitare de-a lungul vieții. Cohorta de pacienți a inclus 18 persoane cu evenimente trombotice fără legătură cu neoplasmele mieloproliferative (MPN) și 153 de pacienți diagnosticați cu MPN, stratificați în continuare după istoricul trombozei și statusul chimioterapiei: MPN-T (fără tromboză, n=109) și MPN+T (cu tromboză, n=44), cu subgrupuri care au primit sau nu chimioterapie. În plus, au fost incluși 35 de pacienți cu leucemie limfocitară cronică (LLC), împărțiți în cei tratați cu ibrutinib (n=25) și netratați (n=10), toți fără tromboză. Clasificarea diagnostică a urmat ghidurile OMS și IWCLL, cu stratificare suplimentară în funcție de tipul de tratament (de exemplu, hidroxiuree, ruxolitinib, ibrutinib). Criteriile de excludere au inclus infecții active, alte tumori maligne, evenimente cardiovasculare majore sau abuz de substanțe [17,18].

Sângele venos a fost colectat în tuburi de citrat de sodiu cu manipulare blândă pentru a preveni activarea trombocitelor. Plasma bogată în trombocite (PRP) a fost izolată prin centrifugare ($130-150 \times g$, 10 min) și purificată prin filtrare cu gel Sepharose CL-2B în tampon Tyrode fără calciu cu apirază (0,2 U/mL). Plasma săracă în trombocite (PPP) a fost preparată la $2000 \times g$ (15 min) pentru a fi utilizată ca martor de agregare. Potențialul membranei de repaus (RMP) a fost evaluat folosind fluorescența DiSC₃(5), calibrată prin valoromicină și titrare de potasiu. Fluiditatea membranei a fost măsurată prin anizotropie folosind TMA-DPH. Producția de ROS a fost cuantificată folosind testul DCFDA și nivelurile de ATP prin chemiluminiscență (CellTiter-Glo). Agregarea a fost evaluată folosind agregometria cu transmisie a luminii cu PRP expus la ADP, collagen, epinefrină sau

ristocetină. Datele au fost analizate în SPSS folosind Shapiro-Wilk pentru normalitate, urmate de Kruskal-Wallis și testele mediane ($p < 0,05$), cu rezultate grafice din corelația Origin, PowerPoint și heatmap bazată pe Python.

6.2. Rezultate și discuții

6.2.1. Efectul AAS la pacienții sănătoși de control și trombotici

Profilul biofizic trombocitar a evidențiat modificări distincte asociate cu tromboza și tratamentul ASA (Figura 1). Potențialul membranal în repaus (RMP) nu a prezentat nicio corelație cu vârsta sau sexul și a rămas neschimbat la persoanele sănătoase după 14 zile de administrare a ASA (-58,2 mV vs. -57,3 mV, $p = 0,885$). În schimb, pacienții trombotici au prezentat RMP semnificativ hiperpolarizate (-70,5 mV, $**p < 0,001$), sugerând o excitabilitate trombocitară crescută.

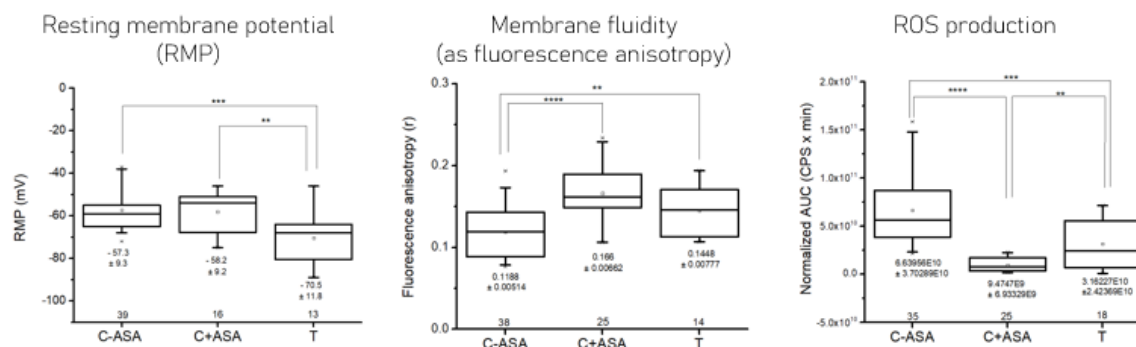


Figura 1 Parametrii RMP, MF și ROS de la pacienții în lotul control cei trombotici și tratamentul cu AAS

Fluiditatea membranei, măsurată prin anizotropia fluorescenței, a fost, de asemenea, neafectată de factorii demografici, dar a scăzut semnificativ după tratamentul cu ASA (0,1188 până la 0,1660, $***p < 0,0001$), indicând o rigiditate crescută a membranei. Pacienții trombotici au prezentat anizotropie intermediară (0,1448), mai mare decât grupul de control netratat ($p < 0,01$), reflectând dinamica membranei afectate.

Nivelurile ROS au fost cele mai ridicate la martorii netratați și au redus semnificativ post-ASA ($**p < 0,0001$), în timp ce au rămas moderat crescute la pacienții trombotici, în concordanță cu stresul oxidativ în curs. ASA a afectat, de asemenea, agregarea indusă de ADP, reducând amplitudinea, ASC și crescând dezagregarea. Pacienții trombotici au prezentat o agregare suplimentară afectată și răspunsuri întârziate la stimularea ADP, collagen și epinefrină, în timp ce răspunsurile la ristocetină au rămas intacte, indicând o funcție păstrată vWF-GPIb. Analiza hărții termice a confirmat răspunsuri slăbite la agoniștii cheie

atât în grupurile tratate cu ASA, cât și în cele trombotice. Aceste descoperiri sugerează că hiperpolarizarea membranei și fluiditatea redusă pot contribui la semnalizarea disfuncțională a trombocitelor și la agregarea în stări trombotice. Efectele ASA asupra ROS și agregării susțin rolul său dincolo de inhibarea COX, implicând potențial acetilarea proteinelor membranare [19]. Împreună, RMP și fluiditatea membranei apar ca markeri sensibili ai reactivității trombocitare și potențiale ținte terapeutice în tromboză.

6.2.2. Pacienți cu LLC fără tromboză

În leucemia limfocitară cronică (LLC), funcția trombocitară este influențată atât de starea bolii, cât și de terapia cu ibrutinib, cu modificări biofizice clare (Figura 2). Potențialul membranal în repaus (RMP) a rămas stabil la pacienții cu LLC netratați, dar a fost semnificativ depolarizat la cei care au primit ibrutinib (-42,2 mV față de -57,3 mV, $p < 0,01$), indicând o excitabilitate a membranei modificată.

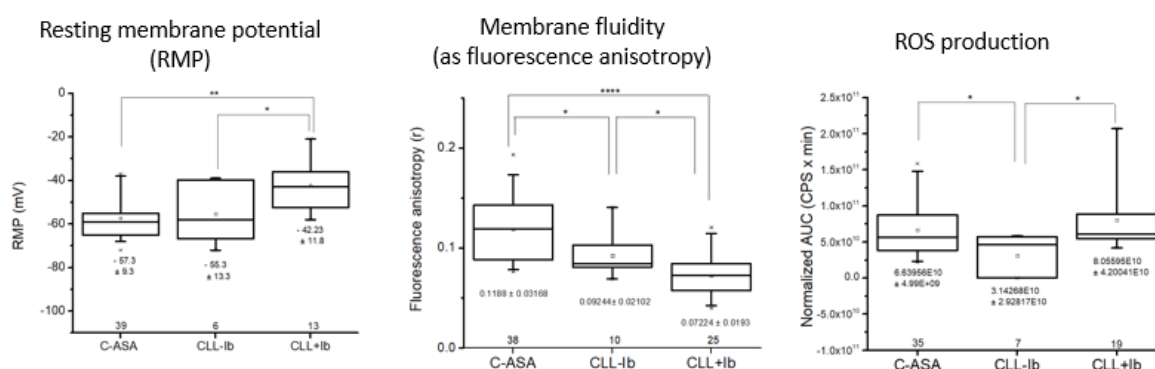


Figura 2 Parametrii RMP, MF și ROS de la pacienții control și LLC cu și fără ibrutinib

Fluiditatea membranei a crescut în ambele grupuri de LLC, în special cu tratamentul cu ibrutinib ($p < 0,0001$), sugerând o întrerupere a organizării lipidelor. Nivelurile ROS au fost reduse în LLC netratată, dar semnificativ crescute sub ibrutinib ($p < 0,05$), reflectând o schimbare oxidativă indusă de terapie. Agregarea plachetară a fost progresiv afectată - în special ca răspuns la ADP și collagen - în timpul progresiei bolii și a inhibării BTK, în timp ce răspunsurile la epinefrină au fost întârziate și răspunsurile la ristocetină au rămas neafectate. Aceste modele sugerează disfuncție selectivă în căile dependente de BTK și COX-1 [17]. Din punct de vedere biofizic, triada depolarizării membranei, fluiditatea crescută și stresul oxidativ la pacienții tratați cu ibrutinib compromise semnalizarea trombocitară și poate contribui la riscul de sângerare. Peroxidarea lipidică condusă de ROS modifică probabil dinamica membranei, afectând gruparea receptorilor. În ciuda funcției păstrate GPIb-vWF, defectele de agregare evidențiază necesitatea monitorizării biofizice în

LLC pentru a gestiona mai bine strategiile antitrombotice și a prezice complicațiile hemoragice.

6.2.3. Pacienți cu NPM cu și fără tromboză

Trombocitele de la pacienții cu neoplasme mieloproliferative (MPN), în special cei cu tromboză (MPN+T) și pacienții trombotici non-MPN (T), au prezentat potențiale de membrană de repaus (RMP) semnificativ hiperpolarizate în comparație cu controalele sănătoase (Figura 3), în timp ce pacienții cu MPN-T nu au prezentat nicio diferență semnificativă [18]. Această tendință a fost consecventă între subtipurile de MPN - policitemie vera (PV), trombocitemie esențială (ET) și MPN neclasificate (UMN) - cu excepția mielofibrozei primare (PMF).

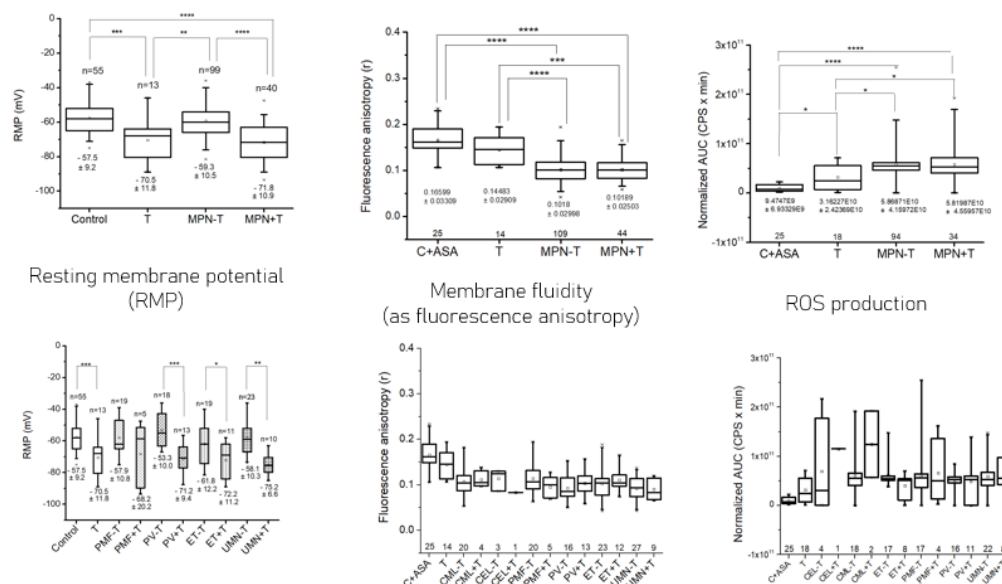


Figura 3 Parametrii RMP, MF și ROS de la pacienții control, trombotici și MPN cu și fără tromboză

Chimioterapia, în special hidroxiureea, a inversat parțial hiperpolarizarea RMP (Figura 4), în timp ce inhibitorii kinazei nu au avut niciun efect [18]. Fluiditatea membranei a fost crescută în toate grupurile MPN, indiferent de tromboză, cu creșteri persistente ale MPN+T chiar și sub tratament, reflectând dinamica remodelării lipidice. Nivelurile ROS au fost uniform crescute în toate subtipurile de NMP, independent de starea trombotică, cu cea mai mare variabilitate observată în leucemia eozinofilică cronică (CEL) și leucemia mieloidă cronică (LMC).

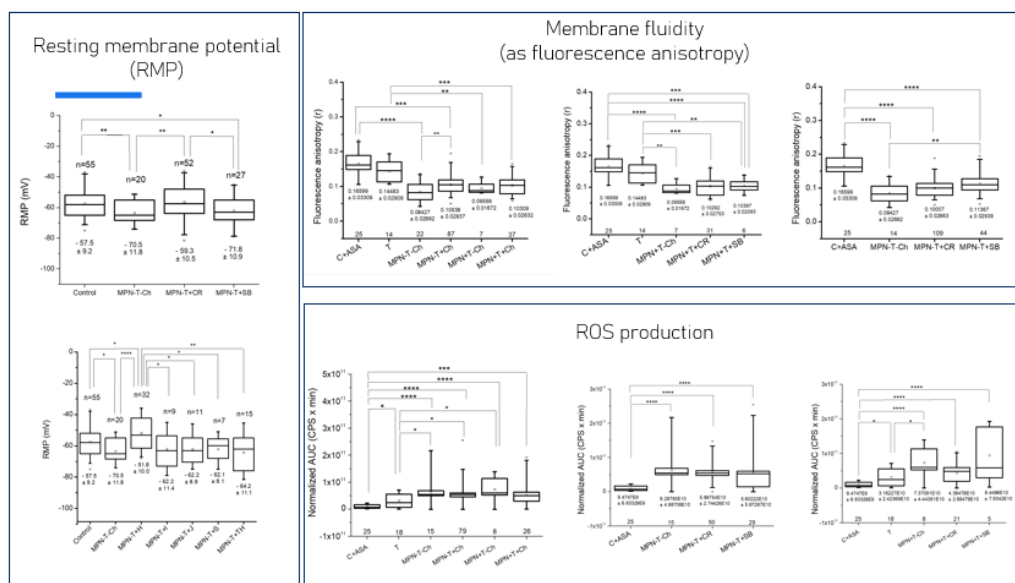


Figura 4 RMP trombocitar, fluiditatea membranei și nivelurile ROS la pacienții control, trombotici și MPN, grupate în funcție de tromboză și statut de chimioterapie

Hidroxiureea și ruxolitinib au crescut variabilitatea ROS, în timp ce terapia cu interferon a redus-o ușor. Nivelurile de ATP s-au corelat pozitiv cu RMP, sugerând că schimbările RMP rezultă din canalul ionic sau modificări metabolice, mai degrabă decât din epuizarea ATP. Tratamentul cu ASA a crescut nivelurile de ATP, aliniindu-se cu rapoartele anterioare de biogeneză mitocondrială îmbunătățită și activare Sirt1. Agregarea plachetară a fost afectată în toate grupurile MPN, prezentând dezagregare indusă de ADP, răspunsuri întârziate la collagen, pantă redusă a epinefrinei și activitate redusă indusă de ristocetină. Aceste deficiențe funcționale s-au corelat cu hiperpolarizarea RMP și nivelurile ridicate de ROS. În general, MPN-urile sunt asociate cu o constelație de anomalii trombocitare biofizice și funcționale - exacerbate de tromboză și parțial receptive la hidroxiuree - care evidențiază interacțiunea dintre dinamica membranei, stresul oxidativ și disfuncția de agregare, subliniind importanța abordărilor personalizate pentru gestionarea riscului trombo-hemoragic la pacienții cu MPN.

6.3. Concluzie

Împreună, aceste descoperiri arată că disfuncția trombocitară în MPN, LLC și tulburări trombotice implică RMP hiperpolarizat, fluiditate crescută a membranei, ROS crescut și agregare afectată, în special în tromboze și cazuri netratate. Hidroxiureea normalizează eficient RMP și ROS, în timp ce ASA modifică dinamica membranei dincolo de inhibarea COX-1. Pacienții cu LLC tratați cu ibrutinib prezintă modificări pronunțate ale membranei

și oxidative. Aceste rezultate sugerează că disfuncția trombocitară este determinată mai mult de modificările de semnalizare la nivel de receptor decât de defectele intrinseci ale membranei, evidențiind potențialul biomarkerilor biofizici pentru evaluarea riscurilor și monitorizarea tratamentului.

7. Studiul 2: Expunerea la nanoparticule pe culturi celulare

7.1. Introducere

Nanoparticulele de ZnO dopate cu Mn au fost sintetizate folosind agenți tensioactivi PVP și SHMTP pentru a controla forma și dimensiunea, producând structuri sferice (~23 nm) și, respectiv, asemănătoare tijelor (~30 nm) [20]. Dopajul cu mangan a modificat proprietățile fizico-chimice ale ZnO, iar NP-urile au fost caracterizate prin XRD, TEM, FTIR, EPR și analiza suprafeței [16]. Citotoxicitatea lor a fost evaluată în liniile celulare murine prin evaluarea viabilității (MTS), a producției de ROS și a deteriorării ADN-ului (testul cometei). În paralel, nanocompozitele $\text{Fe}_x\text{O}_x/\text{TiO}_2$ au fost dezvoltate pentru potențiale aplicații biomedicale, cu diferite rapoarte Fe/Ti formând structuri miez-înveliș sau mixte. Biocompatibilitatea a fost testată în celule normale folosind testele MTS și LDH.

7.2. Metode de cercetare

Toate sintezele de nanoparticule și tratamentele termice au fost efectuate în colaborare cu Institutul Național de Fizica Materialelor, Măgurele, România. Nanomaterialele ZnO și $\text{Fe}_x\text{O}_x/\text{TiO}_2$ dopate cu Mn au fost sterilizate prin autoclavare și dispersate în medii de cultură adecvate pentru a crea suspensii stoc de 2000 $\mu\text{g/ml}$. Pentru a asigura omogenitatea, NP-urile de ZnO au fost sonicate timp de 1 oră, în timp ce nanocompozitele Fe/TiO₂ (NC) au fost supuse 6 ore de sonicare. Diluțiile în serie au fost utilizate pentru a trata celulele pre-însămânțate cu 24 de ore înainte. Viabilitatea celulară a fost evaluată prin testul MTS, producția de ROS prin imagistica fluorescentă H₂DCFDA, deteriorarea ADN-ului prin testul cometei alcaline și citotoxicitatea folosind cuantificarea eliberării de LDH. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD și analizate folosind ANOVA unidirecțională cu testul post-hoc al lui Tukey ($p < 0,05$).

Studiul ZnO NP a evaluat șase variante (nedopate și dopate cu Mn la 50, 500 și 2000 ppm), stabilizate fie cu PVP, fie cu SHMTP, pe patru linii celulare (NIH 3T3, OK, CaCo-2, MCF-7). Controalele fără celule au confirmat că nu există interferențe cu testul, iar concentrațiile $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ au fost în general noncitotoxice. Testele ulterioare pe celulele NIH

3T3 au arătat efecte dependente de surfactant și dopaj, cu un conținut mai mare de Mn - în special în formulările SHMTP - reducând producția de ROS și deteriorarea ADN-ului, probabil datorită încorporării îmbunătățite a Mn confirmată de EPR.

În paralel, biocompatibilitatea Fe/TiO₂ NC a fost testată în fibroblastele NIH 3T3 și HS27. Au fost evaluate trei formulări (NC-PP-50/400, -200/400, -500/400), care au dezvăluit toxicitatea dependentă de doză și compoziție în celulele NIH 3T3, în special cu un conținut mai mare de Fe. Celulele HS27, cu toate acestea, au prezentat pierderi minime de viabilitate și eliberare scăzută de LDH în toate condițiile. Microscopia a indicat interacțiuni de suprafață mai puternice și agregare în culturile NIH 3T3. Aceste rezultate subliniază rolul compoziției nanoparticulelor și al tipului de celule în determinarea biocompatibilității, sprijinind dezvoltarea continuă a nanomaterialelor Mn-ZnO și Fe/TiO₂ pentru aplicații biomedicale.

7.3. Rezultate și discuții

7.3.1. Experimentul 1: Testul de interferență al testului MTS al suspensiilor NP/NC (control fără celule)

Testele MTS fără celule au confirmat interferențe minime atât de la nanoparticulele de oxid de zinc (ZnO), cât și de la nanocompozitele de oxid de fier/dioxid de titan (Fe/TiO₂) în intervalele de concentrație testate. Pentru ZnO și MnO NP, au fost observate ușoare creșteri ale absorbanței la concentrații $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ - în special pentru ZnO (ZnO15) acoperit cu PVP - dar toate valorile au rămas aproape de valoarea inițială la concentrații $\leq 250 \mu\text{g/mL}$, validând compatibilitatea lor cu testul MTS pentru testarea citotoxicității. În mod similar, nanocompozitele Fe/TiO₂ (CS, B, B2) suspendate fie în mediu complet, fie în HBSS nu au prezentat interferențe semnificative ale testului. Valorile absorbanței au fost stabile, cu doar variații minore observate în HBSS din cauza potențialei împrăștieri a nanoparticulelor, confirmând adecvarea lor pentru analizele ulterioare de viabilitate celulară.

7.3.2. Experimentul 2: Analiza biocompatibilității nanoparticulelor de oxid de zinc

Viabilitatea celulară pe 4 linii celulare

Șase tipuri de ZnO NP (nedopate și dopate cu Mn la 500/5000 ppm; PVP sau SHMTP) au fost testate pe celule NIH 3T3, OK, CaCo-2 și MCF-7. Toate au prezentat citotoxicitate dependentă de doză (Figura 5), celulele OK fiind cele mai rezistente. Toxicitatea a crescut peste $10 \mu\text{g/mL}$, fără diferențe majore între agenții tensioactivi sau

în timp ce celulele HS27 au fost mai rezistente, subliniind importanța optimizării raportului Fe/Ti și a selecției modelului în evaluările nanotoxicității [21].

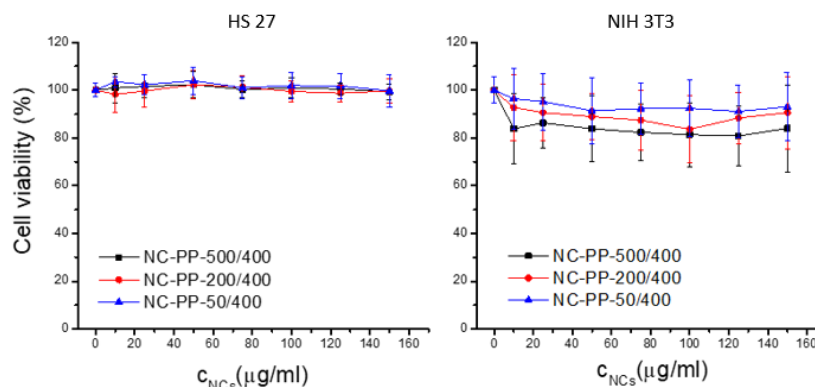


Figura 6 Test de viabilitate a celulelor pe HS27 și NIH3T3 expuse cu oxid de fier/TiO₂ NC [21]

8. Concluzie și contribuții personale

8.1. Concluzie

Această cercetare doctorală a demonstrat aplicarea cu succes a metodelor biofizice pentru a evalua disfuncția trombocitară în tulburările hematologice și efectele celulare ale nanoparticulelor modificate, oferind o perspectivă valoroasă asupra mecanismelor bolii și a siguranței nanomedicinii.

Studiul 1 – Biofizica trombocitară în tulburările hematologice (Capitolul 6):

Analiza multiparametrică a arătat că disfuncția trombocitară în MPN, LLC și afecțiunile trombotice implică potențialul membranar modificat, dezechilibrul redox și efectele chimioterapiei.

- Trombocitele de la pacienții cu MPN, în special cei cu tromboză, au prezentat hiperpolarizare RMP și ROS crescute, chimioterapia (de exemplu, hidroxiureea) normalizând parțial acești parametri.
- ASA a modificat fluiditatea membranei independent de COX-1, contribuind potențial la acțiunea sa antitrombotică.
- În LLC, pacienții tratați cu ibrutinib au avut mai multe membrane plachetare fluide, RMP mai scăzut și ROS crescut, corelându-se cu riscurile de sângerare.
- Nu toate disfuncțiile au fost determinate de membrană, sugerând un rol pentru modificările la nivel de receptor.
- RMP și ROS pot servi ca potențiali biomarkeri pentru riscul trombotic și răspunsul la tratament.

Studiul 2 – Citocompatibilitatea nanoparticulelor și răspunsul la stres (Capitolul 7):

Testele biofizice au fost optimizate pentru a evalua citotoxicitatea și stresul oxidativ din nanomaterialele ZnO și Fe/TiO₂ dopate cu Mn.

- NP-urile de ZnO sintetizate cu PVP sau SHMTP au prezentat proprietăți de dimensiune și suprafață dependente de surfactant și dopaj.
- Viabilitatea celulară a rămas ridicată la $\leq 10 \mu\text{g/mL}$ în toate NP-urile de ZnO, NP-urile bazate pe SHMTP prezentând leziuni reduse ale ROS și ADN-ului datorită încorporării mai mari de Mn.
- Nanocompozitele Fe/TiO₂ au indus citotoxicitate ușoară, dependentă de Fe în celulele NIH 3T3, în timp ce fibroblastele HS27 au prezentat toleranță ridicată și integritate a membranei.
- Testele MTS fără celule au confirmat interferențe minime, validând abordarea testului.
- Rezultatele subliniază importanța proiectării structurale a nanoparticulelor - dopajul cu Mn și alegerea surfactantului au fost esențiale pentru îmbunătățirea biocompatibilității.

Contribuții personale:

- Protocoale dezvoltate și optimizate pentru evaluarea RMP, fluiditatea membranei, ROS și agregarea trombocitară.
- Am proiectat și executat toate experimentele de expunere la nanoparticule pe modele de celule murine și umane.
- Am efectuat analiza datelor pentru viabilitate, ROS, deteriorarea ADN-ului și testele LDH.
- Rezultatele sunt sintetizate și validate într-un cadru care combină proprietățile biofizice de impactul terapeutic și siguranța pacienților în nanomedicina oncologică.

8.2. Perspective:

Această cercetare doctorală a optimizat metodele biofizice pentru a evalua disfuncția trombocitară și efectele nanoparticulelor asupra celulelor maligne, stabilind o platformă pentru evaluarea RMP, fluiditatea membranei și stresul oxidativ. Aceste instrumente prezintă promisiuni pentru îmbunătățirea diagnosticării în MPN și CLL. În nanomedicină, studiul a

evidențiat modul în care dopajul Mn și alegerea surfactantului pot îmbunătăți biocompatibilitatea nanoparticulelor ZnO și Fe/TiO₂. Lucrările viitoare ar trebui să exploreze aceste efecte în modele avansate și să abordeze provocări cheie precum siguranța pe termen lung și livrarea țintită. Integrarea testelor biofizice cu designul inteligent al nanoparticulelor oferă o cale către terapii mai sigure și personalizate în oncologie și tromboză.

9. Bibliografie

1. Pasternak, C.A., *Canalele transmembranare și bolile în Funcția celulară și boala*, H. Eisenberg, editor. 1989, Springer SUA: Boston, MA. p. 109-114.
2. Alberts, B., et al., *Biologia moleculară a celulei*. 6 ed. 2014, New York: Garland Science.
3. Boron, W.F. și E.L. Boulpaep, *Fiziologie medicală*. 3 ed. 2016, Philadelphia: Elsevier.
4. Winterbourn, C.C., A.J. Kettle și M.B. Hampton, *Specii reactive de oxigen și antioxidanți în inflamație: o revizuire*. Biologie și medicină a radicalilor liberi, 2016. **40**(2): p. 215-257.
5. Lomakina, G.Y., Y.A. Modestova și N.N. Ugarova, *Test de bioluminescență pentru viabilitatea celulară*. Biochimie (Moscova), 2015. **80**(6): p. 701-713.
6. Imamura, H., et al., *Abordări pentru monitorizarea nivelurilor de ATP în celulele vii: unde ne aflăm?* Jurnalul FEBS, 2021. **288**(11): p. 3602-3626.
7. Riss, T.L., et al., *Manual de ghidare a testelor*. 2004, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company și Centrul Național pentru Avansarea Științelor Translaționale.
8. Michelson, A.D., *Trombocite*. 4 ed. 2019, Cambridge, MA: Academic Press.
9. Olive, P.L. și J.P. Banáth, *Testul cometei: o metodă de măsurare a deteriorării ADN-ului în celulele individuale*. Protocoale naturale, 2006. **1**(1): p. 23-29.
10. La revedere, AP, AJ Unsworth și JM Gibbins, *Modificările formei trombocitelor și dinamica citoscheletului ca noi ținte terapeutice pentru medicamentele antitrombotice*. Jurnalul de tromboză și hemostază, 2016
11. Wang, M., et al., *Inhibitori care vizează tirozin kinaza lui Bruton în cancer: progrese în dezvoltarea medicamentelor*. Leucemie, 2021. **35**: p. 312-326.
12. Papadakis, E., R. Hoffman și B. Brenner, *Complicații trombohemoragice ale tulburărilor mieloproliferative*. Blood Rev, 2010. **24**(6): p. 227-32.
13. Gianazza, E., et al., *Trombocite în stări sănătoase și de boală: de la descoperirea biomarkerilor până la identificarea țintelor medicamentelor prin proteomică*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).
14. Halkar, M. și A.M. Lincoff, *Terapia antiplachetară dublă pentru sindroamele coronariene acute: cât timp să continue?* Cleve Clin J Med, 2016. **83**(9): p. 675-88.
15. Sukhanova, A., et al., *Dependența toxicității nanoparticulelor de proprietățile lor fizice și chimice*. Scrisori de cercetare la scară nanometrică, 2018. **13**: p. 1-21.
16. Popescu, T., et al., *Influența nanoparticulelor de ZnO dopate cu Mn adaptate surfactantului asupra producției de ROS și a deteriorării ADN-ului induse în celulele fibroblastelor murine*. Rapoarte științifice, 2020. **10**(1): p. 18062.
17. Popov VM, Matei CO, Omer M, Onisai M, Matei MB, Savopol T, Bumbea H, Moisescu MG. Efectele Ibrutinib asupra parametrilor biofizici ai trombocitelor la pacienții cu leucemie limfocitară cronică. Am J Blood Res. 2020 15 decembrie; **10**(6):311-319.
18. Matei, C.O., et al., *Evaluarea potențialului membranelor al trombocitelor de la pacienții cu neoplasme mieloproliferative cronice și tromboză*. Revista Română de Fizică, 2025. **62**(9-10):
19. Talabieke, S., et al., *Acidul arahidonic sinergizează cu aspirina prevenind leziunile de ischemie miocardică-reperfuzie și atenuează riscul de sângerare*. Cercetare cardiovasculară, 2025. **121**(5): p. 775-787.
20. Zhang, Y., et al., *Aplicații biomedicale ale nanomaterialelor de oxid de zinc*. Medicină moleculară actuală, 2013. **13**(10): p. 1633-1645.

- 21 Popescu, T., et al., *Sinteză ușoară a nanocompozitelor de oxid de fier/TiO(2) cu toxicitate scăzută cu proprietăți hipertermice și de foto-oxidare*. Sci Rep, 2022. 12(1): p. 6887.

Articole publicate:

- **Ibrutinib asupra parametrilor biofizici ai trombocitelor la pacienții cu leucemie limfocitară cronică**
Popov, Viola & **Matei, Christien Oktaviani** & Omer, Meilin & Matei, Mircea & Savopol, Tudor & Bumbea, Horia & Moiescu, Mihaela. (2020). Efectele al. Jurnalul american de cercetare a sângelui. 10. 311-319.
- *(Acest articol este acoperit în capitolul 6.3.2 Pacienți cu LLC fără tromboză)*
- **Influența nanoparticulelor de ZnO dopate cu Mn asupra producției de ROS și a deteriorării ADN-ului induse în celulele fibroblastelor murine**
Popescu, T., **Matei, C.O.**, Vlaicu, I.D. *et al.* Influența nanoparticulelor de ZnO dopate cu Mn adaptate surfactantului asupra producției de ROS și a deteriorării ADN-ului induse în celulele fibroblastelor murine. Rapoarte științifice 10, 18062 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74816-0>
- *Acest articol este abordat în capitolul 7.3.2. Experimentul 2: Analiza biocompatibilității nanoparticulelor de oxid de zinc)*
- **Sinteză ușoară a nanocompozitelor de oxid de fier/TiO₂ cu toxicitate scăzută, cu proprietăți hipertermice și de foto-oxidare.**
Popescu, Traian & **Matei, Christien Oktaviani** & Culita, Daniela & Maraloiu, Valentin-Adrian & Rostas, Arpad & Diamandescu, L. & Iacob, Nicusor & Savopol, Tudor & Ilas, Monica & Feder, Maik & Lupu, Andreea & Iacoban, Alexandra & Vlaicu, Ioana & Moiescu, Mihaela. (2022). Rapoarte științifice. 12. 10.1038/s41598-022-11003-3.
- *Acest articol este abordat în capitolul 7.3.3. Experimentul 3: Analiza biocompatibilității nanocompozitelor Fe/TiO₂)*
- **Evaluarea potențialului membranelor al trombocitelor de la pacienții cu neoplasme mieloproliferative cronice și tromboză**
C.O. Matei, V.M. Popov, M.B. Matei, E. Kovacs, M.G. Moiescu, T. Savopol. (2025). Revista Română de Fizică
(Acest articol este acoperit în capitolul 6.3.3. pacienți cu MPN cu și fără tromboză)