

Complecși multifuncționali de tip nanolipid-microbule pentru eliberare țintită optimizată a agenților antitumorali prin ultrasonografie (mTARGESON)

Cod proiect: PN-III-P4-PCE-2021-0378(contractul de finanțare PCE 86/2022)

Etapa 3 (1 Ianuarie -30 Iunie 2023) Caracterizare fizică și chimică și Studii *in vitro*: evaluare comparativă a ratei de incorporare și a localizării complecșilor

Etapa 4 (1 Iulie -31 Decembrie 2023) Administrarea *in vivo* a complecșilor MB-NLC-aC și MB-Lipo-aC

Rezumatul activităților realizate în anul 2023

Conform planului de realizare a proiectului mTARGESON, rezultatele raportate în anul anterior (2022) au îndeplinit obiectivele aferente etapelor 1 și 2. În cursul anului 2023 au fost realizate activitățile aferente etapelor 3 și 4, care au vizat

1. Caracterizarea fizică și chimică a compușilor de tip aC (Doxorubicina-DOXO, acidul betulinic-AB și extractul standardizat de triterpene-TT) în formă liberă și incluși în nanostructuri de tip lipozomal (Lipo-aC) și nanolipide (NLC-aC), cu măsurarea dimensiunii prin difracție (DLS0 și prin microscopie cu fluorescență.
2. Studii *in vitro* privind efectul nanostructurilor NLC-aC, Lipo-aC, dar și a supracomplecșilor legați de microbule(MB), MB-Lipo-aC și MB-NLC-aC, cu sau fără sonoporaie, în diferite culturi celulare, cu măsurarea ratei de încorporare, a viabilității celulare prin markeri biochimici și fluorescență după sonoporaie MB
3. Experimente *in vivo* privind efectul sistemelor aC libere, NLC-aC, Lipo-aC, MB-Lipo-aC și MB-NLC-aC, cu sau fără sonoporaie, după administrarea intravenoasă la diferite loturi de șobolani cu tumori Walker 256, și aplicarea terapiei CEUS (Contrast Enhances Ultrasonography).

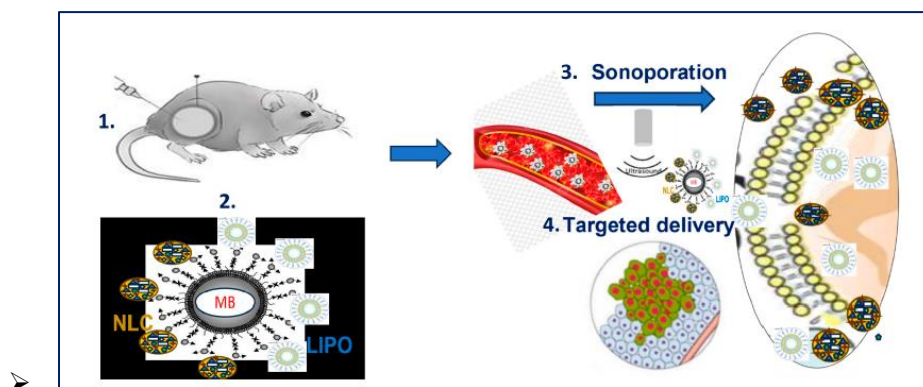
In **etapa 3** s-a dezvoltat tehnici optimizate de preparare și caracterizare a complecșilor lipozomali (Lipo-aC), NLC (NLC-aC) și a supracomplecșilor cu microbule (MB-Lipo-aC, MB-NLC-aC), de determinare a ratei de incorporare *in vitro* pe două tipuri de culturi celulare de melanoma și Tumori Walker 256 (cu sau fără sonoporaie).

- S-au făcut evaluări spectrometrice UV-Vis, și prin cromatografie de înaltă performanță HPLC-UV.
- S-au făcut măsurători de dimensiuni ale nanoparticulelor folosind difracția cu laser (DLS), s-au obținut imagini prin microscopie electronică de transmisie (TEM) și microscopie de fluorescență.

- S-a urmărit viabilitatea (supraviețuirea pe durata a 4-48-72 ore) dependent de tipul și doza administrată în fiecare caz. S-au realizat astfel toate activitățile propuse și s-au îndeplinit obiectivele aferente etapei 3.

In etapa 4 s-au derulat activitățile legate de administrarea *in vitro* și *in vivo* a MB-Lipo-aC, MB-NLC-aC comparativ cu formele intermediare, aC liberi, NLC-aC, Lipo-aC. S-au obținut și caracterizat sisteme de supracomplecși cu microbule (MB), și anume MB-NLC-aC și MB-Lipo-aC prin metode fizice bazate pe capacitatea MB de a incorpora nanocomplecșii, ca să permită eliberarea țintită și controlată a agenților anticancerigeni (aC) în celule tumorale.

- S-a măsurat efectul *in vitro* al sistemelor MB-NLC-aC și MB-Lipo-aC, cu și fără sonoporație asupra viabilității celulelor de tip Walker 256, prin markeri biochimici (testul MTT) și microscopie de fluorescență. Au fost înregistrate imagini de microscopie de fluorescență care indică incorporarea MB înainte și după formarea complecșilor MB-NLC-aC și MB-Lipo-aC. Aceste experimente vor continua și în etapele următoare, fiind mai complexe, și de mare interes științific și aplicativ, pentru a putea reproduce procese care au loc și *in vivo*.
- Au fost inițiate și efectuate experimente complexe *in vivo* privind efectul compușilor aC (DOXO, AB, TT), al complecșilor de tip NLC-aC, Lipo-aC și al supracomplecșilor MB-NLC-aC și MB-Lipo-aC, comparativ cu formele libere aC și grupuri control (loturi de șobolani inoculați cu tumori solide de tip Walker 256). Prin administrarea intravenoasă s-a aplicat terapia cu ultrasunete, cu sau fără sonoporație, cu înregistrare de imagini de înaltă rezoluție (CEUS- sistem Vevo2100). În fiecare din experimente, s-au demarat și investigații post-mortem (examinări histologice și analize metabolomice din ser) pentru a măsura efectul acestor tipuri de nanocomplecși. S-au realizat astfel toate activitățile propuse și s-au îndeplinit obiectivele aferente etapei 4.



Experiența dobândită și rezultatele obținute în anul 2023 au fost valorificate prin 2 articole și o participare la o Conferință Internațională. Activitățile experimentale vor fi continuate și valorificate în etapa 5 (anul 2024) care vizează extinderea studiilor *in vivo*, conform planului de activitate.