

## *Raport științific 2019*

### *Proiecte complexe de cercetare de frontieră (PCCF)*

privind implementarea proiectului **Cod PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0112,**

**Nr.6/2018**

cu titlul:

### **Nanomateriale magnetoplasmonice multifunctionale pentru aplicatii de tip point of care**

*în perioada ianuarie 2019 – decembrie 2019*

#### *Faza unică 2019*

#### *Rezumat*

În cadrul proiectului au fost preparate nanoparticule de magnetită precum și magnetită dopată cu ioni de zinc și studiate proprietățile fizice ale acestora. Plecând de la aceste studii au fost sintetizate nanoparticule de oxizi de fier superparamagnetice precum și cu înveliș de SiO<sub>2</sub> și aur. Proprietățile plasmonice ale acestor nanohibridi multifuncționali au fost studiate prin absorbție UV-Vis și spectroscopie Raman.

Studiile au vizat deasemenea discriminarea între grupul pacienților cu leucemie mieloidă acută (AML) și grupul control, pe baza spectrelor SERS obținute pe probe de ADN extras din sânge periferic. Studiul SERS demonstrează că tiparul de metilare ADN specific cancerului se traduce prin diferențe spectrale specifice. Astfel, ADN-ul extras dintr-o linie de celule de leucemie mieloidă acută (AML) a prezentat o intensitate scăzută a benzii de 5-metilcitozină, poziționată la valoarea 1005 cm<sup>-1</sup> comparativ cu ADN-ul normal, în conformitate cu hipometilarea bine descrisă a ADN-ului tumoral. Modelul unic de metilare a ADN-ului tumoral influențează, de asemenea, geometria de adsorbție a ADN-ului, rezultând intensități ale benzilor SERS de la adenină mai mari pentru ADN-ul tumoral. Posibilitatea detectării ADN-ului tumoral pe baza spectrului SERS a fost validată pe probe de ADN genomic din sânge periferic de la n=17 pacienți AML și n= 7 probe control, obținând o acuratețe a discriminării de 82% pe baza benzii de 1005 cm<sup>-1</sup> din 5-metilcitozină. Prin demonstrarea potențialului SERS în evaluarea stării de metilare în cazul probelor de ADN din viața reală, studiul deschide calea pentru noi metode de diagnostic a cancerului.

Rezultatele cercetărilor în cadrul proiectului au fost publicate (sau sunt în curs de publicare) în 20 lucrări în reviste cotate internațional (ISI) cu factori de impact importanți.

Un număr de 15 lucrări au fost prezentate la conferințe internaționale.

**Planul de realizare** a proiectului pe anul 2019 are drept obiectiv

Etapa 1: Sinteza nanoparticulelor miez magnetice cu proprietăți controlabile, dezvoltarea unor metode de preparare a nanoparticulelor core-shell, studiul proprietăților fizico-chimice și evaluarea biocompatibilității.

- 2.1 Achiziția echipamentelor de cercetare prevăzute în cererea de finanțare
- 2.2 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabilele.
- 2.3 Depunerea shell-ului plasmonic de grosime controlabilă pe suprafața exterioară a MNPs
- 2.4 Caracterizarea fizico-chimică și testarea biocompatibilității nanoparticulelor magnetice cu proprietăți controlabile
- 2.5 Sinteza nanoparticulelor core-shell magnetoplasmonice.
- 2.6 Caracterizarea fizico-chimică și testarea biocompatibilității nanoparticulelor magnetoplasmonice core-shell
- 2.7 Activități de informare și reclamă
- 2.8 Diseminare & alte activități privind vizibilitatea
- 2.9 Achiziția serviciilor de audit
- 2.10 Raportare

### ***2.1 Achiziția echipamentelor de cercetare prevăzute în cererea de finanțare***

S-au achiziționat toate echipamentele prevăzute pentru anul 2019 în cererea de finanțare și anume:

- Microscop hiperspectral
- Instrument de măsurare-calorimetru
- Cuptor cu încărcare frontală cu flux de aer îmbunătățit
- Centrifuga 5430
- Rotor F
- Sistem de măsură automat de tip cryogen free cu circuit de heliu închis pentru măsurători la temperaturi joase în câmpuri magnetice variabile -VSM

### ***2.2 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabilele.***

S-au achiziționat toate materialele și dispozitivele avute în vedere pentru realizarea proiectului.

## 2.3 Depunerea shell-ului plasmonic de grosime controlabilă pe suprafața exterioară a MNPs

### 2.5 Sinteza nanoparticulelor core-shell magnetoplasmonice.

În cadrul acestei activități vom descrie pentru început modul de preparare a nanoparticulelor de magnetită precum și proprietățile fizice ale acestora.

Vom analiza apoi prepararea particulelor cu înveliș plasmonic (shell-ului) de grosime controlabilă și respectiv sinteza nanoparticulelor miez-înveliș (core-shell) magnetoplasmonice.

### Prepararea și studiul proprietăților fizice ale nanoparticulelor pe bază de magnetită cu aplicații în medicină

Nanoparticulele magnetice pe bază de oxizi de fier având o toxicitate scăzută precum și biocompatibilitate sunt studiate în prezent în particular pentru interesul prezentat prin utilizarea lor în medicină.

În cadrul fazei de contract am preparat și studiat un număr relativ mare de nanoparticule pe bază de magnetită, precum și nanoparticule cu înveliș de SiO<sub>2</sub> și respectiv aur.

#### 2.3.1. Nanoparticule având o formă sferică și cubică pe bază de magnetită.

Nanoparticule cristaline de magnetită au fost preparate prin descompunerea termică a unui amestec de tris (acetylacetonato)Fe(III), acid oleic, oleilamina și dibensil eter (probe S1), precum și suplimentar alcool cetonic (probe S2, S3). Amestecurile au fost agitate timp de 15 min și încălzite cu o viteză de 3° C/min până la 200°C și păstrate la această temperatură timp de 2 ore (probe S1, S2) și 30 min (S3). Amestecul astfel obținut a fost apoi încălzit la 300 °C cu o rată de 3 °C/min (probe S1, S2) și respectiv 12 °C/ min (probe S3) și menținute la această temperatură timp de o oră.

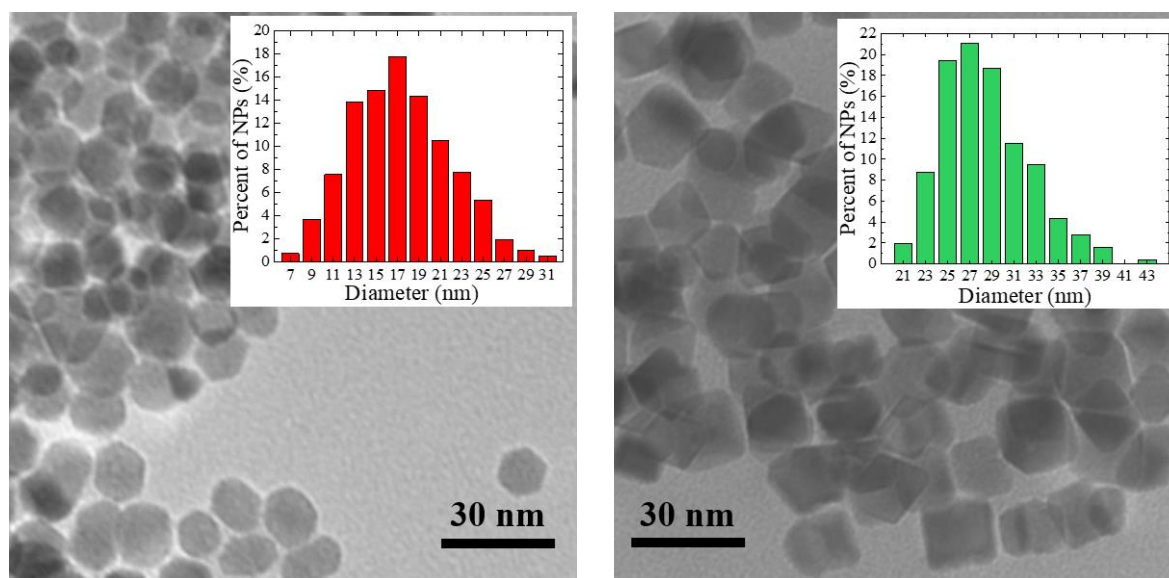
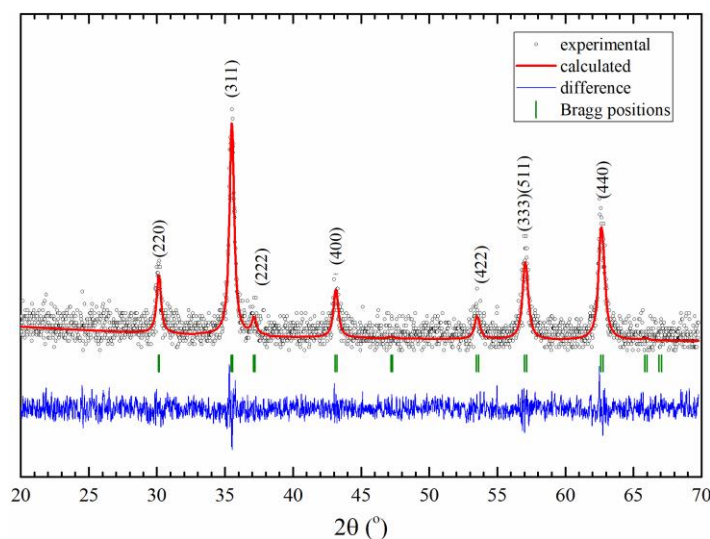


FIG. 1. Imagini TEM pentru proba S1 (stânga) respectiv S3 (dreapta).

Imaginile obținute prin microscopie electronică de transmisie în cazul probelor S1 evidențiază prezența unor nanoparticule de formă sferică, în timp ce în cazul probelor S3 acestea au o formă cubică. Prezența alcoolului etilic favorizează morfologii cu fețe plane – *Fig. 1*. În cazul probelor S2 s-a evidențiat un număr relativ mic de particule cu fețe plane alături de cele cu formă sferică. S-au determinat distribuțiile de particule după dimensiuni, valorile medii ale acestora fiind,  $17 \pm 1$  nm (S1),  $22 \pm 1$  nm (S2) și respectiv  $27 \pm 1$  nm (S3).

Analiza de tip Rietveld a spectrelor de difracție prin raze X evidențiază că probele cristalizează într-o structură de tip spinelic, grupul spațial  $Fd\bar{3}m$  – *Fig.2*. Dimensiunile medii ale particulelor determinate prin raze X sunt apropiate de cele obținute prin microscopie electronică și anume  $20 \pm 1$  nm,  $27 \pm 1$  nm și  $29 \pm 1$  nm, pentru nanoparticulele de tip S1, S2 și respectiv S3. Parametrii de rețea sunt situații între  $a = 0,8386$  nm, (S1) și  $0,8381$  nm (S3) apropiate de constanta de rețea a magnetitei ( $a = 0,8384$  nm) ceea ce confirmă o compoziție corespunzând cu cea a magnetitei.



**Fig. 2.** Difractograma de raze X pentru compusul S1.

Dependențele de temperatură ale magnetizărilor probelor răcite în lipsa câmpului magnetic (ZFC) precum și în câmp magnetic (FC),  $\mu_0H = 0,05$  T, evidențiază prezența unei tranziții de tip Verwey, la temperaturile  $T_V$ , care scad odată cu micșorarea dimensiunilor nanoparticulelor – *Fig.3*

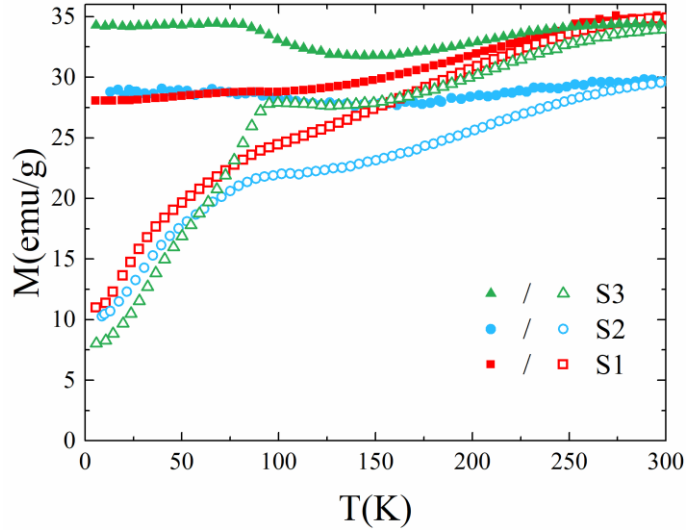


FIG. 3. Dependențele de temperatură ale magnetizărilor măsurate FC respectiv ZFC.

Analiza izotermelor de magnetizare, la  $T = 5$  K, arată că saturația a fost obținută în câmpuri mai mari de  $\mu_0 H = 2$  T – Fig.4.. Anizotropia magnetocristalină a celor trei serii de probe crește în secvența  $S1 > S2 > S3$ .

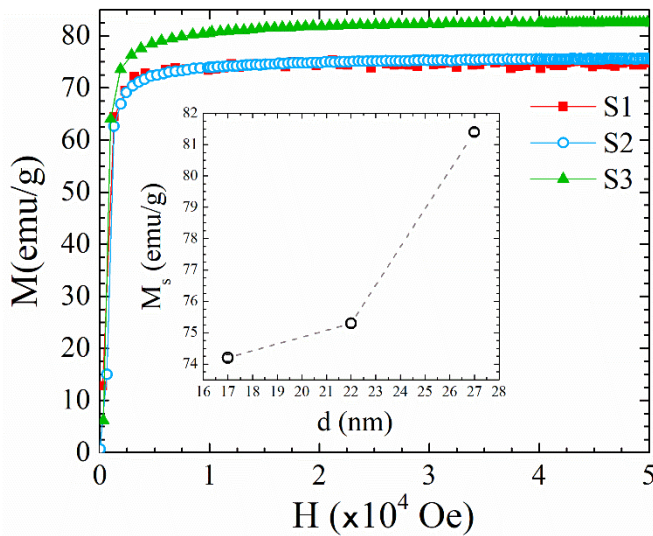
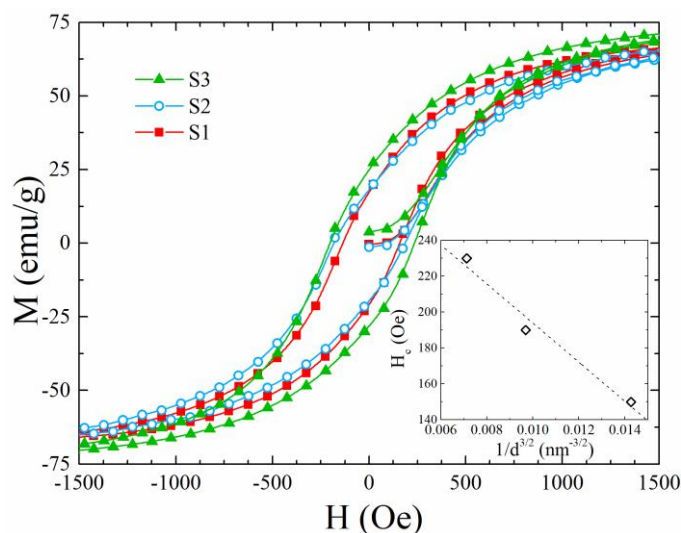


FIG. 4. Izoterme de magnetizare la temperatura de 5 K.

Câmpul coercitiv,  $H_c$ , determinat din curbele de histereză – Fig.5 urmează o dependență de dimensiune tipică unui ansamblu de particule unidomeniale

$$H_c = a + b d^{-3/2}$$

cu  $a = 0.0303$  T și  $b = 1.09 \text{ T/nm}^{-3/2}$



**FIG.5.** Curbe de histereză măsurate în câmpuri de până la 1500Oe. Inset : Dependența câmpului coercitiv de inversul dimensiunii la puterea 3/2

Presupunând o distribuție normal logaritmică a nanoparticulelor de magnetită au fost estimate dimensiunile „domeniilor” magnetice. Acestea sunt situate între 7,0 – 7,5 nm, ceva mai mici decât dimensiunile nanoparticulelor. Valori mai mici decât dimensiunile particulelor au fost evidențiate și în alte lucrări și sunt rezultatul aproximațiilor folosite în elaborarea modelului de analiză.

Am analizat procesele de magnetizare în sistemele de particule corespunzătoare celor 3 serii, plecând de la un ansamblu de particule unidomeniale care nu interacționează. Modelul prezice că raportul dintre magnetizarea remanentă  $M_r$  și cea la saturație,  $M_s$   $a = M_r/M_s = 0,5$ . Datele noastre evidențiază valori ceva mai mici  $a = (0,25 - 0,32)$ . Comportarea evidențiată experimental poate fi corelată cu prezența unor interacțiuni între nanoparticulele de magnetită care pot conduce la unele frustrări magnetice.

Constantele de anizotropie determinate sunt situate între 3,1 și 6 kJ/m<sup>3</sup>, corespunzătoare pentru utilizarea lor în medicină.

În concluzie, menționăm faptul că metoda utilizată de preparare a condus la obținerea de nanoparticule cu dimensiuni între 17 și 30 nm. Distribuția de particule este relativ îngustă. Atât magnetizările precum și câmpurile coercitive cresc pe măsura ce dimensiunile nanoparticulelor devin mai mari. Datele de mai sus evidențiază faptul că probele preparate pot fi folosite ca materiale de plecare în obținerea de particule miez-înveliș (înveliș pe bază de SiO<sub>2</sub> și aur), pentru aplicații în medicină. O parte din datele obținute au fost prezentate la o conferință internațională iar lucrarea elaborată este acceptată spre publicare

**Roxana Dudric, Gabriela Souca,  Szatmri, Tamás Szilárd, Stefan Nitica, Cristian Iacovita, Alin Iulian Moldovan, Rares Stiuffuc, Romulus Tetean and Emil Burzo**

Magnetite Nanoparticles for Medical Applications

AIP Conf. Proc (in press) (cota ISI)

### **2.3.2. Nanoparticule de magnetită dopate**

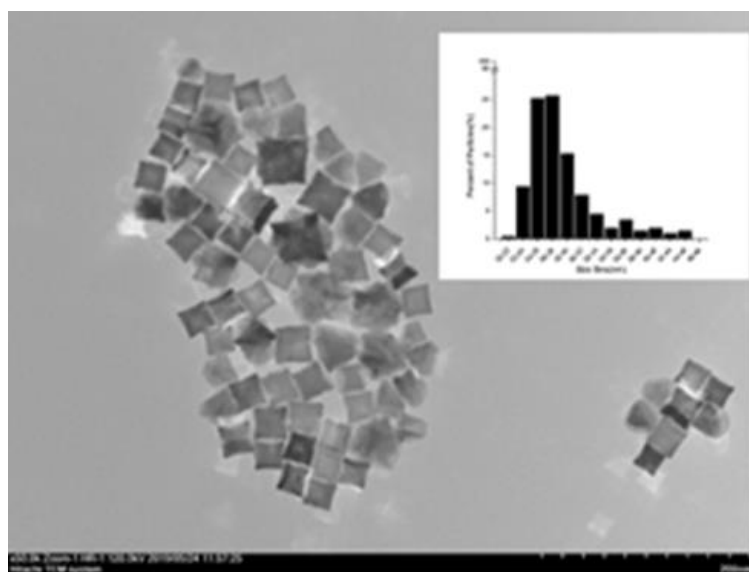
Ca urmare a acoperirii particulelor de magnetită printr-un strat nemagnetic magnetizările, pe unitatea de volum sau greutate, scad. Ca atare este de interes a analiza condiiile în care magnetizările nanoparticulelor de magnetită pot crește ca urmare a unor substituii în poziii octaedrale, în structura de tip spinelic invers. In acest context am studiat proprietile structurale i magnetice ale nanoparticulelor de tip  $[Fe_{1-x}Zn_x^{2+}]_O[Fe_{1+x}^{3+}Fe_{1-x}^{2+}]_T O_4$ . Admitnd compoziiile de mai sus, magnetizările la saturație pot fi teoretic descrise prin relaia

$$M_s = (4+6x) \mu_B/f.u.$$

n care magnetizările depind liniar de coninutul de zinc.

In acelai timp prezența ionilor  $Zn^{2+}$ , diminuează interacțiunile magnetice între ioni de fier, situai în poziii octaedrice i respectiv tetraedrice, i ca atare este de ateptat ca temperaturile Curie să scadă.

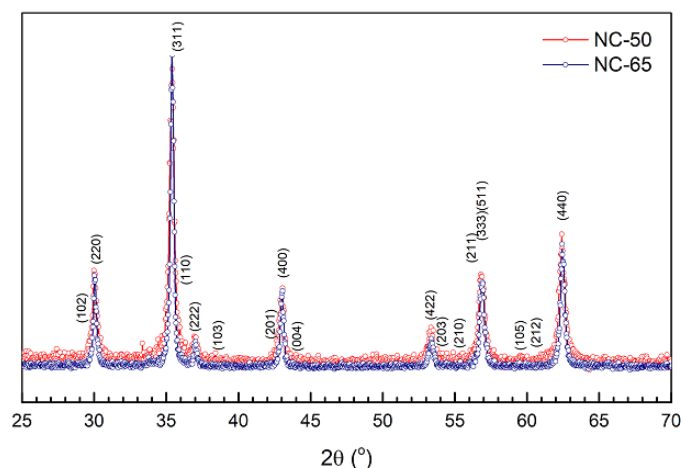
Nanoparticulele de magnetită dopată au fost preparate plecnd de la un amestec de 0,7 nmol  $Fe(acac)_8$ , 1,05 nmol  $Zn(acac)_2$  (probe NC50) sau 1,0 nmol  $Fe(acac)_3$ , 1,5 nmol  $Zn(acac)_2$  (probe NC65) cu 3,78 nmol acid oleic i 52,6 dibenzileter. Amestecurile menionate mai sus au fost încălzite la 295 C, cu o rată de 5 C/min i menținute la această temperatură timp de 30 min. După spălare cu alcool etilic, probele au fost supuse unui tratament cu ultrasunete i apoi separate din soluie.



**FIG. 6.** Imagini TEM si distribuia de particule

Imaginile obținute prin Microscopie Electronică prin Trasmisie (TEM) evidențiază că particulele au forme octaedrice, fețele acestora fiind acoperite cu un strat subțire de acid oleic. Ca urmare a ratei de încălzire folosite, se formează particule cu fețe de tip  $\{111\}$  care au o energie mai mică superficială comparativ cu planele  $\{011\}$  sau  $\{101\}$  - Fig.6.

Distribuția dimensiunilor nanoparticulelor formate evidențiază valori medii  $d = 26$  nm (NC50) și respectiv  $d = 75$  nm (NC65).

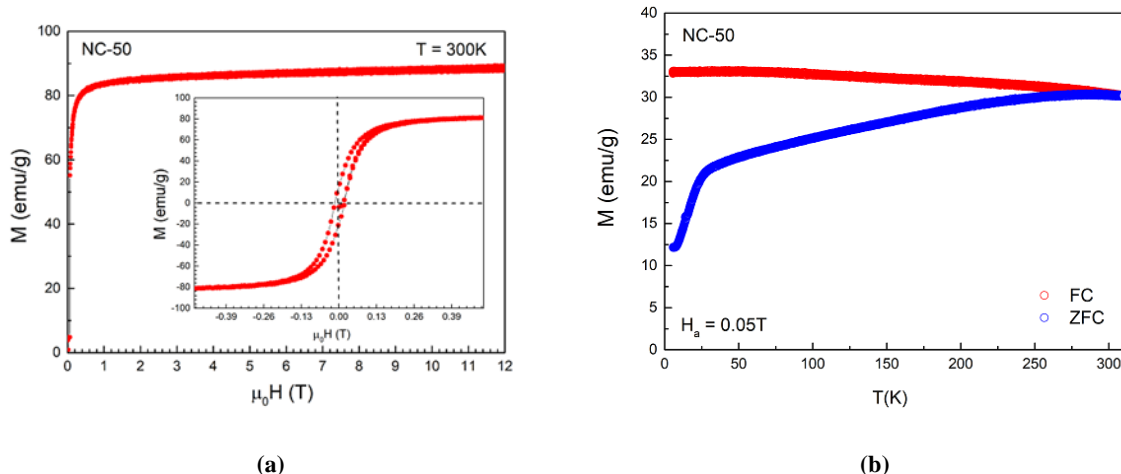


**FIG.7.** Difractogramele de raze X pentru probele NC-50 respectiv NC-65.

Imaginile obținute prin difracție de raze X evidențiază că probele cristalizează într-o structură cubică, de tip spinelic – Fig.7. Parametrii de rețea sunt mai mari comparativ cu a magnetitei pure. Această comportare este rezultatul înlocuirii ionilor de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $r = 0,645$  Å) sau  $\text{Fe}^{3+}$  ( $r = 0,75$  Å), prin ioni de zinc ( $r = 0,74$  Å). Conținutul de zinc în probe este de  $x = 0,1$ .

Izotermele de magnetizare evidențiază că saturația a fost obținută la câmpuri externe  $\mu_0 H > 2$  T, atât la  $T = 5$  K precum și la 300 K – Fig.8. La  $T = 5$  K magnetizările obținute,  $\cong 5 \mu_B/\text{f.u.}$ , sunt cu 20 % mai mari decât a magnetitei pure. Magnetizările scad ușor pe măsură ce dimensiunile nanoparticulelor sunt mai mici ca rezultat al efectelor de suprafață.





**FIG.8.** a) izoterma de magnetizare la 300 K pentru proba NC-50 (inset curba de histereză); b) Curbele de magnetizare ZFC respectiv FC.

Curbele de histereză evidențiază prezența unor câmpuri coercitive mici la temperatura mediului ambiant, și anume  $\mu_0 H_c = 0,01$  T (NC 50) și respectiv 0,02 T (NC-65), sugerând că nanoparticulele sunt în esență superparamagnetice (proba NC-50), la temperatura mediului ambiant; câmpul coercitiv este generat de un număr mic de particule având de asemenea  $d > 35$  nm. Raportul dintre magnetizările remanente și respectiv cele la saturatie la temperatura mediului ambiant sunt de  $M_r/M_s \cong 0,1$  (NC-50) și respectiv  $M_r/M_s = 0,22$  (NC-65) în acord prezența unui număr relativ mare de particule superparamagnetice precum și cu existența unor nanoparticule implicate în interacțiuni dipolare. Constantele de anizotropie  $K$ , au fost determinate, admitând la temperaturi mai mici decât cele de blocare  $T_B$ , prezența unei anizotropii uniaxiale

$$H_c = 2K/\mu_0 M_s \quad (1)$$

Constantele de anizotropie, la temperatura mediului ambiant  $0,48 \cdot 10^4$  J/m<sup>3</sup> (NC-65) și  $0,22 \cdot 10^4$  J/m<sup>3</sup> (NC-50) sunt ceva mai mici decât cele ale magnetitei

**TABELUL 1**

Proprietățile structurale și magnetice ale nanoparticulelor – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

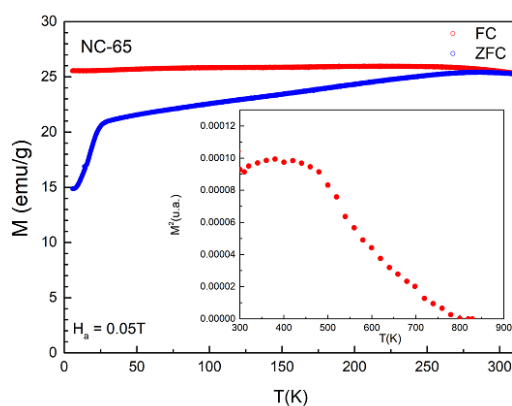
Proba	d (nm)	Parametrul de rețea (nm)	$M_s$ ( $\mu_B$ /f.u.)		$\mu_0 H_c$ (T)		$T_c$ (K)	$t_v$ (R)
			T = 5 K	T = 300 K	T = 5 K	T = 300 K		
NC-50	27	0,841(3)	4,91	3,95	0,04	0,02	378	25
NC-65	50	0,840(9)	4,82	3,51	0,05	0,01		28

Proba	$K \cdot 10^4$ (J/m <sup>3</sup> )		$T_B$	$K \cdot 10^4$ (J/m <sup>3</sup> )
	T = 5 K	T = 300 K		
NC-50	1,2	0,48	400	0,22
NC-65	0,9	0,22	310	0,70

Dependențele de temperatură ale magnetizărilor probelor răcite în câmp magnetic nul (ZFC) și respectiv în câmp magnetic (FC)  $\mu_0H = 0,05$  T evidențiază prezența unor tranziții de tip Verwey la  $T = 25-30$  K – Fig. 9. Temperaturile  $T_B$  caracteristice efectului de blocare sunt  $T_B = 310$  K (NC-50) și respectiv  $T_B = 400$  K (NC-65), acestea scăzând odată cu dimensiunile nanoparticulelor. Valorile  $T_B$  descriu temperaturile la care energia termică devine comparabilă cu energia de anizotropie. Astfel plecând de la valorile  $T_B$  am determinat constantele de anizotropie, în acord cu relația

$$T_B = KV/25 k_B$$

unde  $V$  = este volumul particulelor.



**FIG.9.** Curbele de magnetizare ZFC respectiv FC pentru proba NC-65. Inset: Dependența de temperatură a pătratului magnetizării.

Valorile  $K$  astfel obținute sunt apropiate de cele estimate plecând de la câmpurile coercitive – Tabelul 1.

Am determinat dimensiunile magnetice ale nanoparticulelor,  $d_m$ , plecând de la valorile susceptibilităților inițiale și respectiv ale magnetizărilor la saturație. Acestea sunt  $d_m = 11$  nm (NC-50) și respectiv 9,4 nm (NC-65).

Analiza datelor evidențiază, ca prin dopare cu ioni de  $Zn^{2+}$ , magnetizările la saturație atât la  $T = 5$  K, precum și la  $T = 300$  K cresc cu  $\cong 20$  %, pentru un conținut mic de zinc și anume substituția a cca 3 % de atomi de fier. Anizotropiile magnetocristaline sunt apropiate de cele ale magnetitei pure. Rezultatele sunt în curs de publicare.

**Gabriela Souca, Roxana Dudric, Cristian Iacovita, Alin Iulian Moldovan, Tiberiu Frentiu, Rares Stiufiuc, Romulus Tetean and Emil Burzo**

*Zn-doped  $Fe_3O_4$  nanoparticles*

J. Opt. Adv. Mat. (trimisă spre publicare)

### *2.3.3 Depunerea shell-ului plasmonic de grosime controlabilă pe suprafața exterioară a MNPs.*

## *2.4 Caracterizarea fizico- chimică și testarea biocompatibilității nanoparticulelor magnetice cu proprietăți controlabile*

### *2.5 Sinteza nanoparticulelor core-shell magnetoplasmonice*

Unul dintre obiectivele majore ale proiectului NanoTEX în anul 2019 a fost reprezentat de obținerea de nanoparticule magneto-plasmonice care să conțină o entitate magnetică și una plasmonică care să le permită interacțiunea cu un câmp magnetic extern respectiv cu o radiație laser, preferabilă din domeniul NIR. În vederea elaborării unor astfel de nanostructuri multifuncționale, în cadrul proiectului NanoTEX au fost abordate două strategii principale de sinteză:

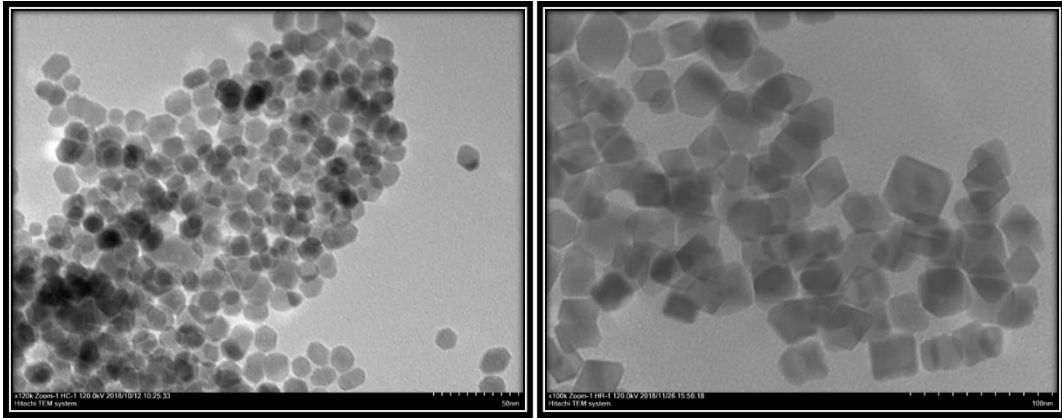
*2.3.3 Sinteza unor nanoparticule magneto-plasmonice de tip core – shell care să conțină un miez magnetic și care să posedă un înveliș (shell) plasmonic*

*2.5 Sinteza unor nanostructuri multifuncționale magnetoplasmonice hibride care să aibă în interiorul lor un nucleu alcătuit din magnetolipozomi cationici care să fie decorați cu nanoparticule plasmonice de aur anionice.*

În cele ce urmează vom detalia rezultatele obținute în cele două tipuri de materiale.

#### *Nanoparticule magnetoplasmonice de tip core-shell*

Prima etapa a acestui proces a constat în sinteza unor nanoparticule magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  care să fie utilizate drept miezuri care să fie mai apoi decorate cu un înveliș uniform plasmonic de aur. Nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  au fost sintetizate în principal folosind metoda descompunerii termice menționată deja. S-a pornit de la acetil acetat de fier  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  și s-au variat soluțiile de oleilamină respectiv acid oleic. Amestecul a fost încălzit folosind diferite rampe de creștere a temperaturii și diferite intervale de timp. A fost evaluată influența pe care raportul dintre oleilamină și acid oleic o are asupra formei și dimensiunilor nanoparticulelor sintetizate. A fost evaluată și influența rampei de încălzire și a intervalului de timp în care are loc sinteza asupra aceluiași parametri. S-a reușit astfel sinteza unor nanoparticule sferice și cubice de diferite dimensiuni.



**FIG 10.** Imagini TEM ale nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sintetizate

O imagine tipică a acestora este prezentată în – *Fig. 10*. În figura din stânga sunt prezentate nanoparticule sferice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  iar în imaginea din dreapta sunt prezentate nanoparticule cubice/octaedrice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obținute prin metoda descompunerii termice.

Dat fiind faptul că nanoparticulele de magnetită au un caracter hidrofob s-a trecut la etapa de hidrofilizare a lor, în vederea producerii ulterioare a unui strat uniform de  $\text{SiO}_2$  care să permită la rândul său depunerea stratului plasmonic de aur.

Au fost dezvoltate două strategii de hidrofilizare care implică folosirea TMAOH-ului (hidroxid de tetrametilamoniu) respectiv a  $\text{NaIO}_4$  (periodatul de sodiu). În urma investigațiilor efectuate s-a observat faptul că cele mai bune rezultate au fost obținute prin utilizarea periodatului de Na.

Foarte sintetic cele două metode de hidrofilizare pot fi descrise astfel:

- **Procedeul cu TMAOH**

- Amestecare probă conținând NP magnetice hidrofobe cu sol. TMAOH (v:v = 1:1), ultrasonicare și incubare de pe o zi pe alta
- Rezultate modeste

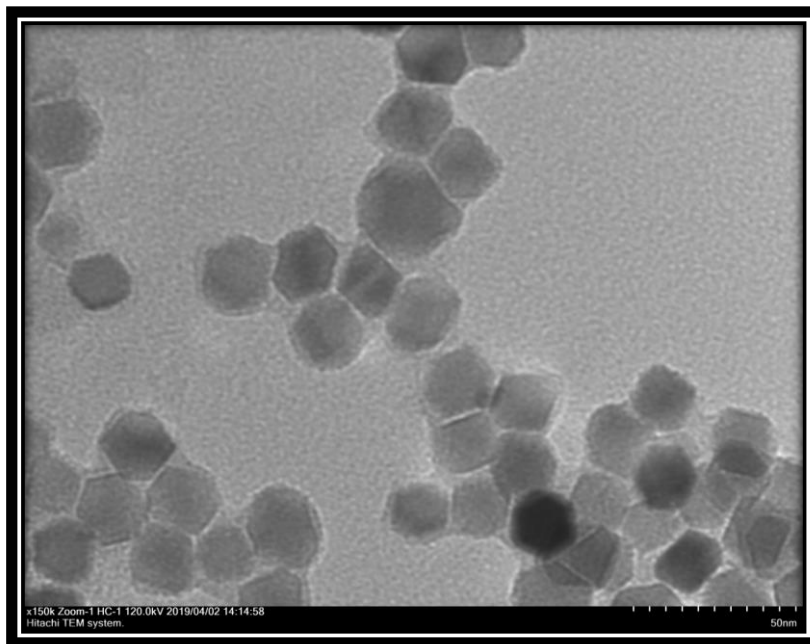
- **Procedeul cu  $\text{NaIO}_4$**

- Agitare mecanică a 2 faze (organică – NPMag și apoasă – sol.  $\text{NaIO}_4$ )
- Rezultate bune

După încheierea etapelor de hidrofilizare s-a trecut la etapa de silicare care urmărește depunerea unui strat uniform de  $\text{SiO}_2$  la suprafața nanoparticulelor magnetice. Una dintre rețetele utilizate poate fi descrisă astfel:

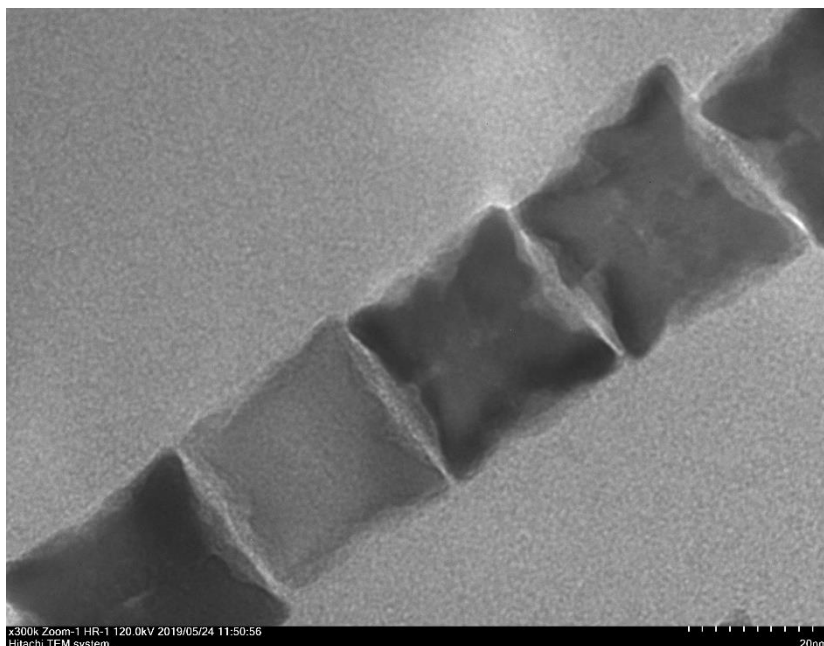
- 1 mL suspensie NPMag  $\text{Fe}_3\text{O}_4$
- 30 mL EtOH
- 4 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- 2 mL TEOS
- 0.3 mL  $\text{NH}_3(\text{aq})$  25%
- ultrasonicare timp de 1 h (30 min x 2) pentru descompunerea hidrolitică a TEOS
- rezultatele obținute sunt promițătoare

O imagine tipică a nanoparticulelor magnetice acoperite cu un strat uniform de siliciu este redată în *Fig. 12*.



**FIG. 11.** Imagine TEM a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ca înveliș de  $\text{SiO}_2$ .

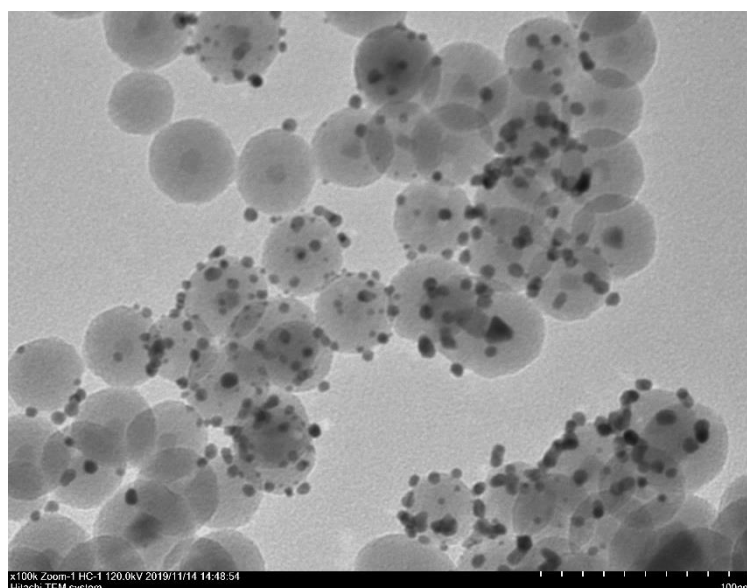
Totodată așa cum am prezentat în secțiunea 2.3.2 au fost sintetizat și nanoparticule magnetice dopate cu Zn de formă ortorombică/cubică având diferite dimensiuni. În acest caz s-a urmărit modul în care substituția cu Zn poate să îmbunătățească proprietățile magnetice ale



**FIG. 12.** Imagine TEM a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de formă ortorombică/cubică dopate cu Zn.

nanoparticulelor de magnetită. O imagine tipică a unor astfel de nanostructuri este prezentată în *Fig. 13*.

În etapa finală a fost dezvoltată procedura de depunere a aurului pe nanoparticulele silicate având un miez magnetic. Procedura a constat în reducerea unor seed-uri de aur la suprafața nanoparticulelor silicate. Rezultatele sunt îmbucurătoare așa cum se poate vedea și din imaginea TEM atașată.



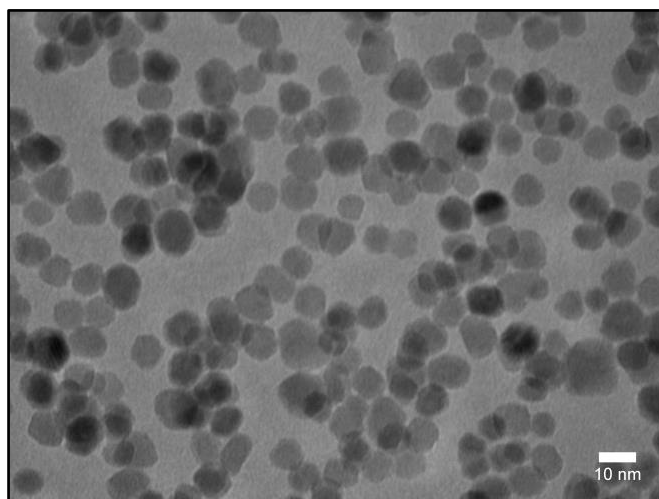
**FIG. 13.** Imagine TEM a nanoparticulelor magnetice silicate care au atașate de suprafața lor seed-uri de aur

## 2.5 Nanostructuri multifuncționale magnetoplasmonice

Elementul central al nanostructurilor hibride propuse îl constituie lipozomii cationici care conțin în bistratul lipidic nanoparticule de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Nanoparticulele magnetice au fost sintetizate prin descompunere termică pornind de la diverși precursori. O descriere detaliată a metodelor de sinteză utilizate este descrisă în secțiunea 2.3.1.

Nanoparticulele magnetice utilizate în această etapă au fost obținute printr-o sinteză de tip descompunere termică. Analiza prin microscopie electronică în transmisie a relevat faptul că aceste nanostructuri magnetice au o formă quasi-sferică. Diametrul lor este inferior valorii de 12 nm, condiție absolut necesară în vederea înglobării lor ulterioare în bistratul lipozomal.

În *Fig. 14* este prezentată o imagine TEM obținută în cazul nanoparticulelor magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



**FIG 14.** Imagine TEM a nanoparticulelor magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Nanoparticulele magnetice au fost investigate prin difracție de raze X. În *Fig. 15* este prezentată o difractogramă tipică obținută. Analiza prin difracție de raze X confirmă faptul că nanoparticulele sintetizate sunt de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetită) având o structură cristalină de tip spinel invers.

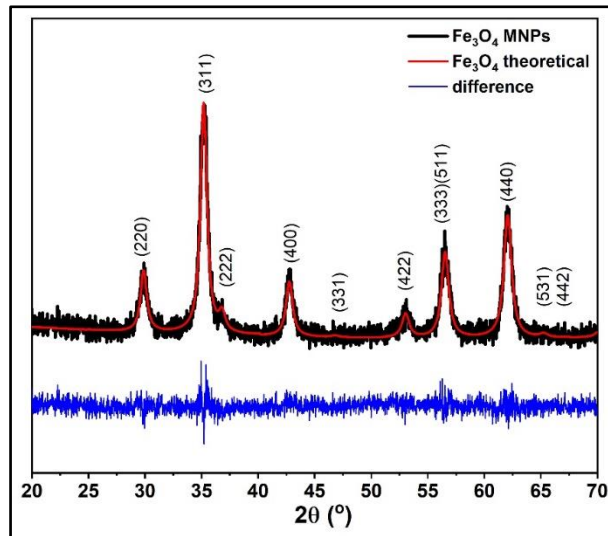


FIG. 15. Difractogramă de raze X obținută pe pulberea de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Analiza prin difracție de raze X a permis calcularea parametrului de rețea, valoarea acestuia fiind de  $8.375 \text{ \AA}$  apropiată de cea magnetitei. Dimensiunea nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sintetizate a fost estimată pornind de la valoarea picului de difracție (311) folosind formula Debye-Scherrer. Valoarea obținută a fost de  $\sim 13\text{nm}$ , apropiată de cea obținută prin microscopie electronică.

S-au studiat proprietățile magnetice ale nanoparticulelor sintetizate. Curbele de histereză magnetică respectiv ZFC și FC obținute la 300K respectiv 5K sunt prezentate în Fig. 16 și 17.

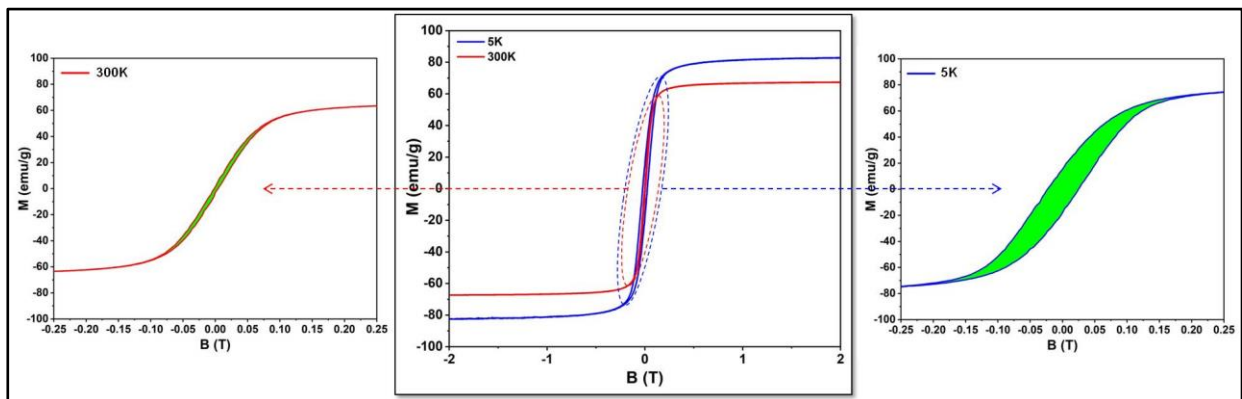


FIG 16. Curbele de histereză magnetică măsurate la  $T = 5 \text{ K}$  respectiv  $300 \text{ K}$  pe probele de SPIONs

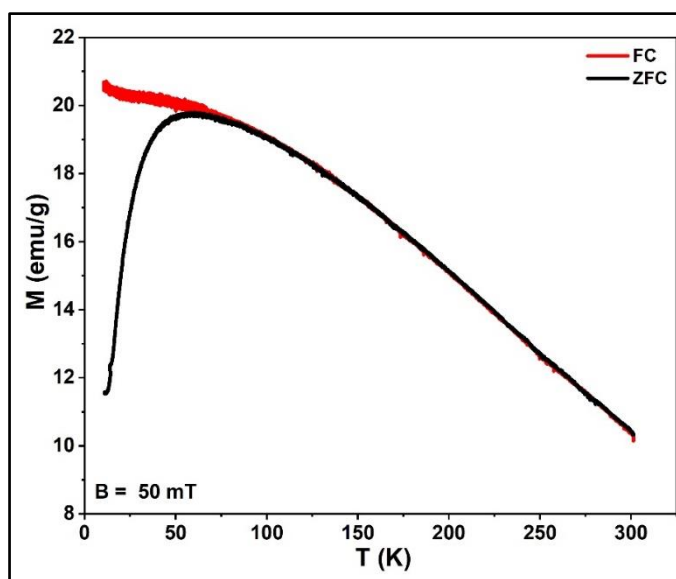
Curbele de histereză magnetică demonstrează faptul că la temperaturi joase ( $T = 5 \text{ K}$ ) nanoparticulele magnetice au un comportament de tip ferimagnetic în timp ce la temperatura camerei ( $T = 300 \text{ K}$ ) acestea devin superparamagnetice (SPION). Valorile magnetizării la



saturație scad de la  $\sim 80$  emu/g la 5K la  $\sim 60$  emu/g la temperatura camerei, drept rezultat al efectului termic. Micile deviații de la comportamentul descris de ecuația de tip Bloch pot fi atribuite efectelor de spin canting, care sunt pronunțate în cazul nanoparticulelor magnetice de dimensiuni reduse.

Valoarea câmpului coercitiv măsurată la 5K este de 200mT (insertul din dreapta, *Fig. 16*). La 300K devine aproape nul (insertul din stânga, *Fig. 16*), confirmând comportamentul superparamagnetic al nanoparticulelor.

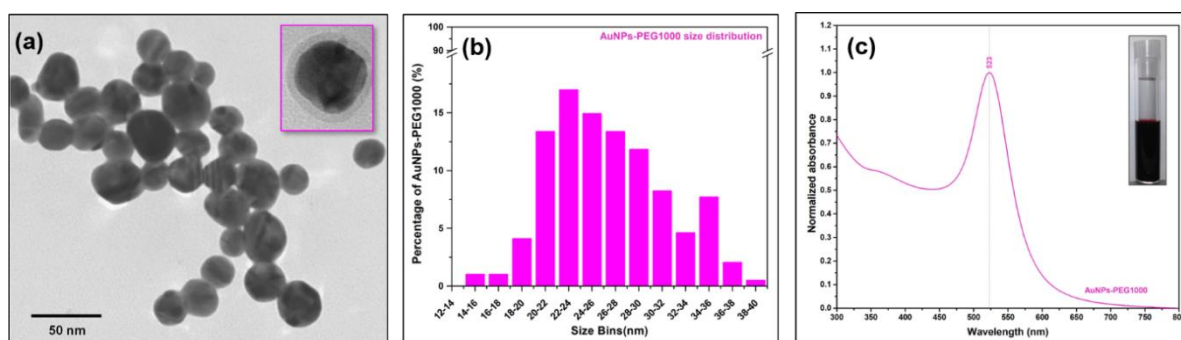
Acest comportament este confirmat și de curbele de magnetizare ZFC/FC prezentate în *Fig. 17*, care se suprapun la o temperatură de  $\sim 100$ K, valoare net inferioară temperaturii camerei. De altfel temperatura la care curba ZFC prezintă un maxim pronunțat, atribuit temperaturii de blocare sau temperaturii la care are loc tranziția ferimagnetică – superparamagnetică, este de 59K.



**FIG. 17.** Curbele de ZFC și FC obținute pe probele se SPIONs

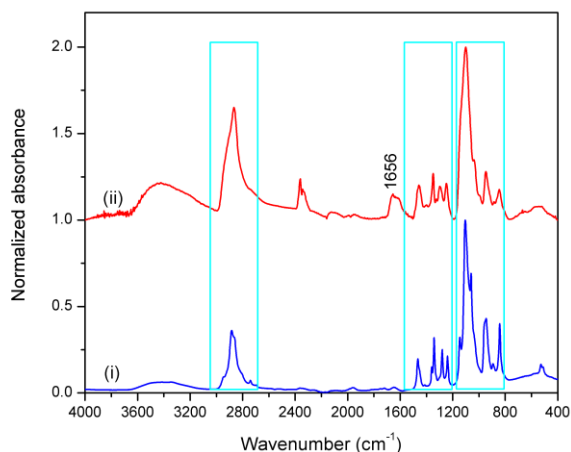
După sinteza și caracterizarea nanoparticulelor magnetice hidrofobe s-a trecut la sinteza nanoparticulelor plasmonice de aur. S-a optat pentru utilizarea unor nanoparticule anionice de aur având o formă sferică. Metoda de sinteză a fost dezvoltată anterior de grupul implicat în proiect și implică utilizarea PEG-ului (polietilen glicol) atât ca și agent reducător cât și ca și agent stabilizator.

O imagine tipică a nanoparticulelor pegylate sferice de aur este prezentată în *Fig. 18*.



**FIG. 18.** Imagine TEM a nanoparticulelor pegylate de aur (a); Imaginea TEM a unei singure nanoparticule de aur arată prezența stratului de polietilen glicol (PEG) care înconjoară nanoparticula (NP) (insertul a); Distribuția statistică a dimensiunilor NPs calculată din imaginile TEM (b); Spectrul de absorbție UV-Vis al coloidului de aur (c); Imagine optică a coloidului de aur (insertul c).

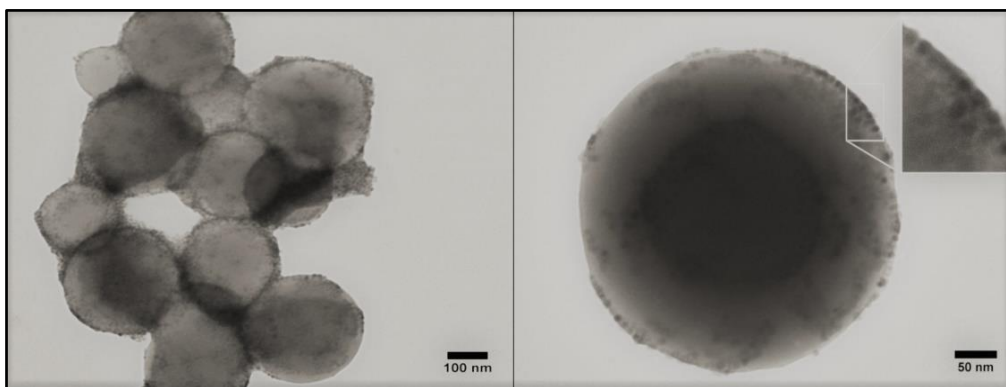
Prezența moleculelor de PEG la suprafața nanoparticulelor plasmonice de aur a fost confirmată folosind spectroscopia FT-IR, așa cum se poate observa din *Fig. 19*.



**FIG. 19.** Spectrul FT-IR obținut pe probe de PEG1000 pur (i) respectiv pe NP de Au PEGylate (ii)

După finalizarea sintezei celor două clase de nanostructuri, s-a trecut la sinteza magnetolipozomilor cationici. În acest sens au fost utilizate două clase de lipide (cationice – DOTAP respectiv neutre SPC) iar metoda de sinteză utilizată a fost cea de hidratare a stratului lipidic. Metoda permite sinteza unor nanostructuri lipozomale unilamelare cationice având dimensiuni cuprinse între 50-150 nm. Totodată, în funcție de raportul lipidic DOTAP/SPC se poate controla și sarcina de suprafață.

Elementul de noutate pe care l-am dezvoltat în cadrul proiectului a fost reprezentat de inserarea SPION-ilor în bistratul lipidic lipozomal. Utilizând interacțiunile hidrofobe dintre SPIONi și acizii grași care alcătuiesc bistratul lipidic au fost testate mai multe concentrații de SPIONi. Soluțiile organice conținând SPIONi au fost amestecate cu lipidele, după care s-a trecut la formarea filmului lipidic. Au fost determinați parametrii optimi pentru sinteza lipozomilor. O imagine tipică a unui astfel de magneto-lipozom, obținută prin microscopie electronică în transmisie, este prezentată în *Fig. 20*. În insert-ul din *Fig. 20* pot fi observate distinct nanoparticulele magnetice inserate în bistratul lipidic. Imaginea a fost obținută fără utilizarea unei substanțe de contrast.



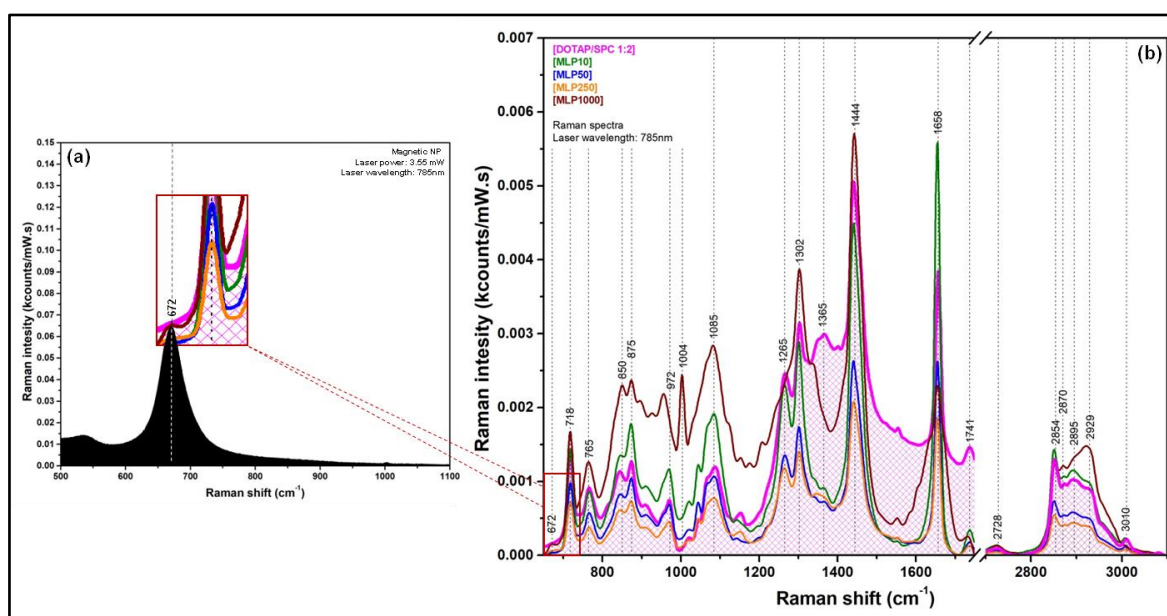
**FIG. 20.** Imagini TEM ale magneto-lipozomilor (MLP50) (stânga); Imaginea TEM nemodificată a unui singur magneto-lipozom (MLP50) (dreapta).

Folosind măsurători de potențial zeta și PCS (Photon Correlation Spectroscopy) au fost determinate dimensiunile și sarcinile de suprafață ale celor două clase de nanostructuri dezvoltate: nanoparticule anionice de Au respective magnetolipozomi cationici. Aceste valori au fost de  $\sim -30$  mV în cazul nanoparticulelor de Au respectiv cuprinse între +43 și +59 mV în cazul magnetolipozomilor. Diametrele magnetolipozomilor s-au situat între 180 și 380 nm în funcție de cantitatea de nanoparticule magnetice care au fost introduse în bistratul lipidic.

Ca și un element de noutate absolut, în cadrul acestui studiu a fost utilizată pentru prima dată spectroscopia Raman în vederea demonstrării internalizării nanoparticulelor magnetice în interiorul bistratului lipidic. Au fost măsurate probe lipozomiale pure, respectiv conținând cantități de nanoparticule magnetice în intervalul 10 și 1000 de  $\mu\text{L}$ .

Au fost identificate principalele maxime vibraționale, atribuite lipidelor care compun bistratul lipozomal. Principalul element de noutate îl reprezintă faptul că în cazul magnetolipozomilor care conțin cea mai mare cantitate de nanoparticule magnetice (1000  $\mu\text{L}$ ) a fost pus în evidență o bandă vibrațională aparținând nanoparticulelor magnetice, așa cum se poate vedea în *Fig. 21*.

În egală măsură spectroscopia vibrațională Raman a fost capabilă să demonstreze faptul că în cazul încărcării unei cantități prea mari de nanoparticule magnetice în interiorul bistratului lipidic structura magnetolipozomilor devine instabilă, fapt confirmat de lărgirea unor benzi vibraționale specifice.



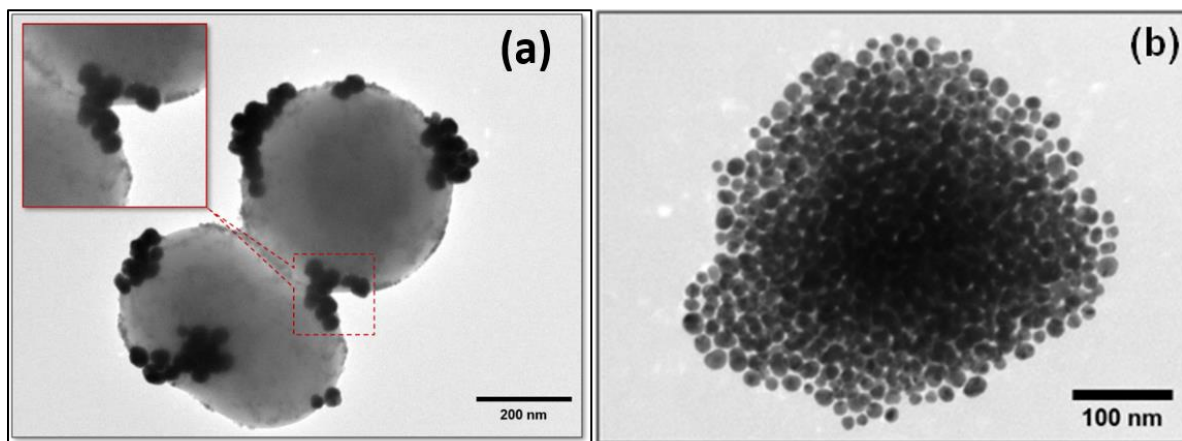
**FIG. 21.** Spectrelor Raman (suprapuse) măsurate pe lipozomii puri (curba magenta) cu cele măsurate pe cele 4 clase de magnetolipozomi (b). Spectrul Raman (a) a fost înregistrat pe pulbere de SPIONi

După încheierea etapei de sinteză și caracterizare a celor două blocuri funcționale (magnetolipozomi cationici respectiv nanoparticule plasmonice anionice) s-a trecut la etapa finală care implică utilizarea interacțiunilor electrostatice dintre cele două tipuri de nanostructuri în vederea obținerii unor nanostructuri hibride magnetoplasmonice. Mai exact se urmărește decorarea magnetolipozomilor cu nanoparticule plasmonice sferice de aur.

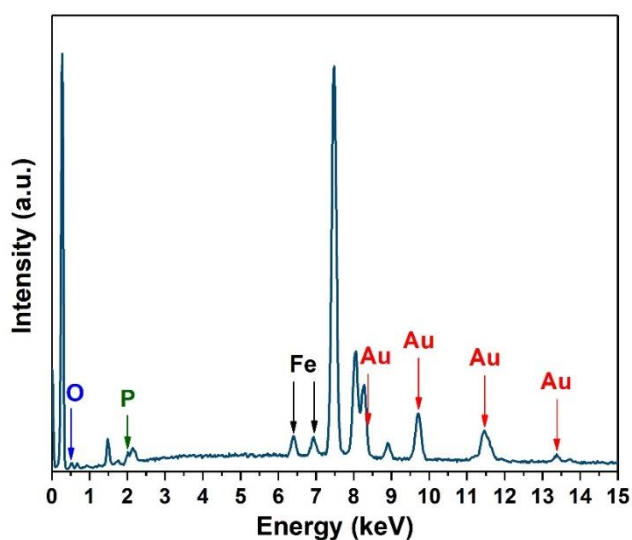
În acest sens au fost testate mai multe concentrații de magnetolipozomi respectiv nanoparticule anionice de aur. În *Fig.22* sunt prezentate două imagini TEM, corespunzătoare unui nanohibrid multifuncțional incomplet (stânga) respectiv complet (dreapta) decorat.

În insetul din *Fig. 22a* pot fi distinse atât nanoparticulele magnetice inserate în bistratul lipidic cât și nanoparticulele plasmonice utilizate pentru decorarea magnetolipozomilor.

Pentru a confirma prezența celor două tipuri de nanostructuri au fost efectuate măsurători de EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). Spectrul prezentat în *Fig. 23* confirmă prezența elementelor principale din care sunt alcătuite nanoparticulele investigate: Fe, O, P, și respectiv Au.

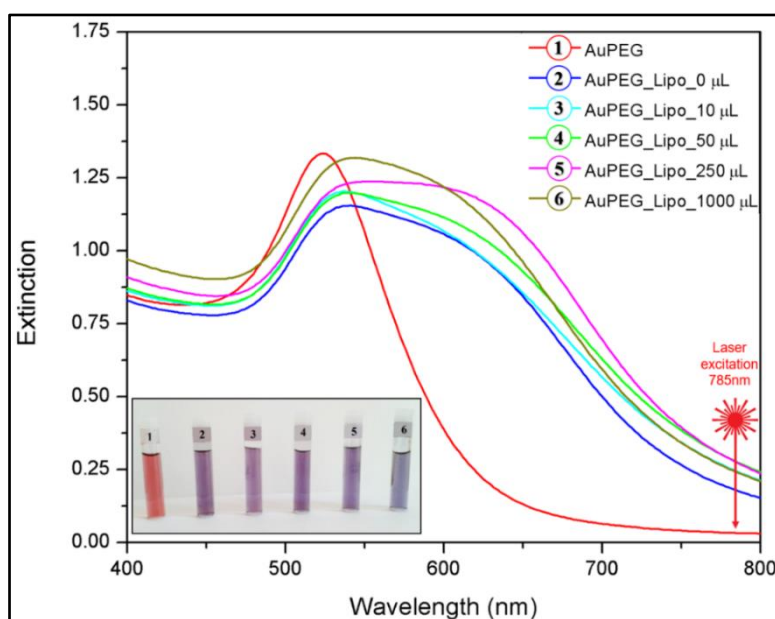


**FIG.22.** Imaginea TEM a magneto-lipozomilor decorați incomplet (MLP50). Insetul evidențiază prezența AuNPs PEGylate pe suprafața exterioară a lipozomilor și a SPIONI-lor în interiorul bistratului lipidic (a).  
Imaginea TEM a unui singur magneto-lipozom plasmonic (b)



**FIG.23.** Analiza EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) a unui magnetolipozom

În final au fost testate proprietățile fototermice ale nanohibridilor sintetizați, apărute ca urmare a interacțiunii cu o radiație laser din domeniul NIR (785nm). Rezultatele au fost comparate cu cele obținute în cazul nanoparticulelor de aur simple. S-a constatat faptul că în cazul nanohibridilor multifuncționali magnetoplasmonici valoarea SAR-ului (Specific Absorbtion Rate) crește cu aproximativ 50%, în raport cu valoarea obținută în cazul nanoparticulelor de aur pegylate (450 W/g vs. 327 W/g). Acest lucru se datorează în principal apariției modurilor plasmonice colective datorate interacțiunii puternice care se manifestă între nanoparticulele de aur care decorează suprafața magnetolipozomilor. În Fig. 24 este prezentat un spectru de absorbție UV-Vis care confirmă prezența acestor moduri plasmonice colective.



**FIG.24.** Spectrul de absorbție UV-Vis a coloizilor de aur PEGylati (1) și ale complexelor pe care le-au format cu lipozomii puri (2) respectiv cu magnetolipozomii care conțin cantități diferite de nanoparticule magnetice în bistrat (3-6). Insertul prezintă imagini optice a coloizilor de aur și ale complexelor lipozomale (1- 0  $\mu\text{L}$ , 2-10  $\mu\text{L}$ , 3-50  $\mu\text{L}$ , 4-250  $\mu\text{L}$ , 5-1000  $\mu\text{L}$ ). Probele au fost diluate de 4 ori înainte de înregistrarea imaginii.

Rezultatele cercetărilor privind nanoparticulele plasmonice au apărut în lucrarea:

**Gabriela Fabiola Știufiuc, Ștefan Nițică, Valentin Toma, Cristian Iacoviță, Dietrich Zahn, Romulus Tetean, Emil Burzo, Constantin Mihai Lucaciu, Rareș Ionuț Știufiuc,** *Synergistical Use of Electrostatic and Hydrophobic Interactions for the Synthesis of a New Class of Multifunctional Nanohybrids: Plasmonic Magneto-Liposomes*, *Nanomaterials*, 9, 1623, (2019), doi:10.3390/nano9111623, IF 4, Rank Q1.



## 2.6 Caracterizarea fizico-chimică și testarea biocompatibilității nanoparticulelor magnetopalsmonice core-shell

ADN-ul celulelor canceroase prezintă un model unic de metilare care diferă atât cantitativ precum și calitativ de ADN-ul din celule netumorale. Comparativ cu ADN-ul normal, ADN-ul tumoral prezintă o scădere globală a procentului de citozine metilate [1]. Mai mult, reziduurile de citozină metilată ale ADN-ului tumoral sunt grupate în așa-numitele insule CpG care preced genele, în timp ce alte zone ale ADN-ului tumoral sunt aproape lipsite de citozine metilate [2]. Tiparul caracteristic de metilare al ADN-ului tumoral a fost propus pentru îmbunătățirea metodelor de diagnostic, cum ar fi as next-generation sequencing (NGS), a ADN-ului tumoral circulant [3].

Sina și colab. au demonstrat că modelul de metilare a ADN-ului asociat cancerului este, de asemenea, responsabil pentru o creștere a afinității ADN-ului cancerului pe suprafețele aurii, caracteristică care a permis detectarea sensibilă prin metode electrochimice [4]. Fig.25-26 prezintă în mod sugestiv rezultatele raportate de Sina și colab. [4].

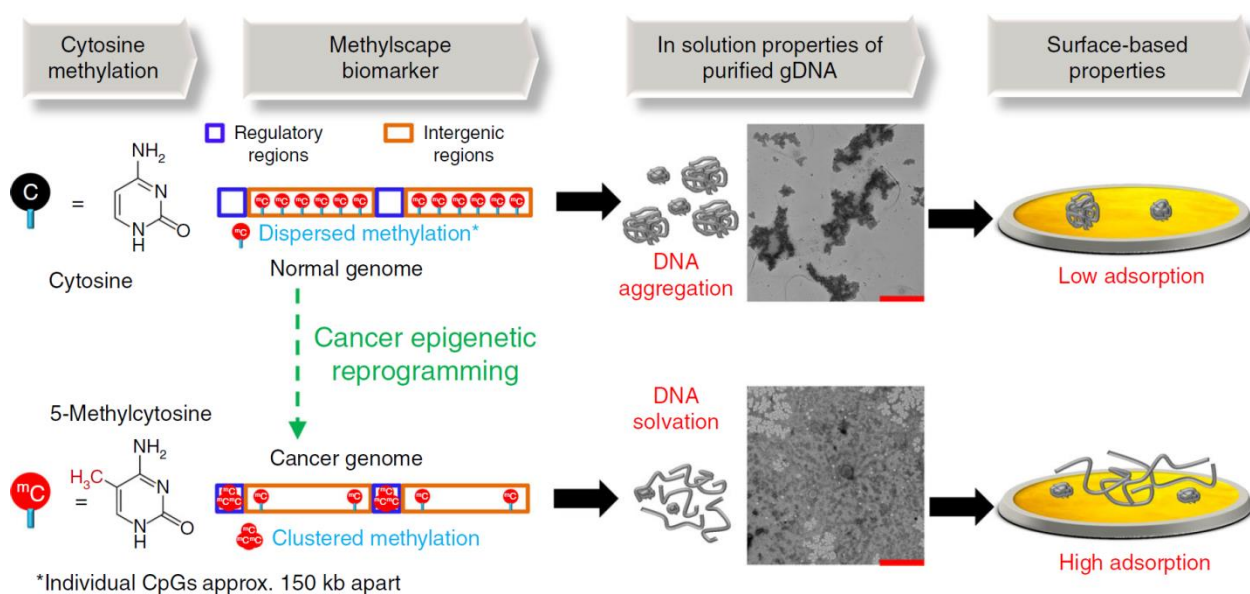


FIG.25-26. Prezentare ilustrativă a proprietăților fizice a structurilor ADN tumorale și normale.

Pornind de la premisele lucrării publicate de Sina și colab., am inițiat prezentul studiu cu presupunerea că afinitatea crescută a ADN-ului tumoral pentru suprafețele metalice ar putea fi exploatată pentru detectarea acestuia pe baza împrăștierii SERS, o metodă analitică Raman care necesită adsorbția analiților pe nanosubstrate metalice [5, 6]. Spectroscopia Raman este un

tip de spectroscopie vibrațională care se bazează pe împrăștierea inelastică a fotonilor laser, oferind informații cu privire la structura moleculară a probei. Sensibilitatea scăzută a împrăștierii Raman poate fi îmbunătățită semnificativ prin tehnica SERS, o metodă care utilizează nanostructuri metalice pentru amplificarea semnalului Raman al moleculelor [7].

În acest studiu, am dezvoltat un protocol optimizat pentru facilitarea chemisorbției ADN-ului pe nanoparticulele de Ag și am evaluat prin tehnica SERS starea de metilare a ADN-ului genomic extras din celule din sânge periferic, precum și din liniile celulare cultivate *in-vitro*. Substratul SERS a fost reprezentat de o soluție coloidală de nanoparticule de Ag, sintetizată prin reducere cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs). Nanoparticulele hya-AgNPs au fost activate cu  $\text{Ca}^{2+}$   $5 \times 10^{-4}$  M pentru a promova chemisorbția ionilor de  $\text{Cl}^-$  pe suprafața de argint, care la rândul lor formează site-uri active SERS, specifice pentru structuri ADN [5, 6].

Având în vedere că modificările stării de metilare a citosinei ADN sunt cunoscute ca fiind un marker pentru progresia cancerului, în cadrul studiului ne-am concentrat pe detectarea prin SERS a diferențelor spectrale ce apar din cauza modelului unic de metilare observat în ADN-ul tumoral. Pentru aceasta, am înregistrat spectrele SERS ale citozinei și 5-metilcitozinei pentru identificarea unor benzi ce sunt specifice citosinei metilate. În continuare, am analizat probele de ADN extrase din linia celulară normală și o linie celulară de leucemie mieloidă acută umană (AML), cu scopul de a demonstra că hipermetilarea asociată cancerului poate fi evidențiată prin tehnica SERS chiar și în probe ADN genomice. În cele din urmă, am validat strategia de detectare a ADN-ului tumoral pe baza tehnicii SERS pe probe de ADN genomic din sângele periferic recoltat de la voluntari sănătoși ( $n = 17$ ) și pacienți diagnosticați cu AML ( $n = 17$ ). Leucemia prezintă caracteristici convenabile pentru validarea metodelor de biopsie lichidă pe bază de ADN deoarece sângele este principalul component afectat de malignitate și pentru că există cunoștințe ample despre mecanismul de biologie moleculară din spatele debutului și evoluției cancerului. După cunoștințele noastre, acest studiu reprezintă ***primul studiu privind detectarea tiparului de metilare*** a ADN-ului asociat cancerului în probe reale provenite de la pacienți.

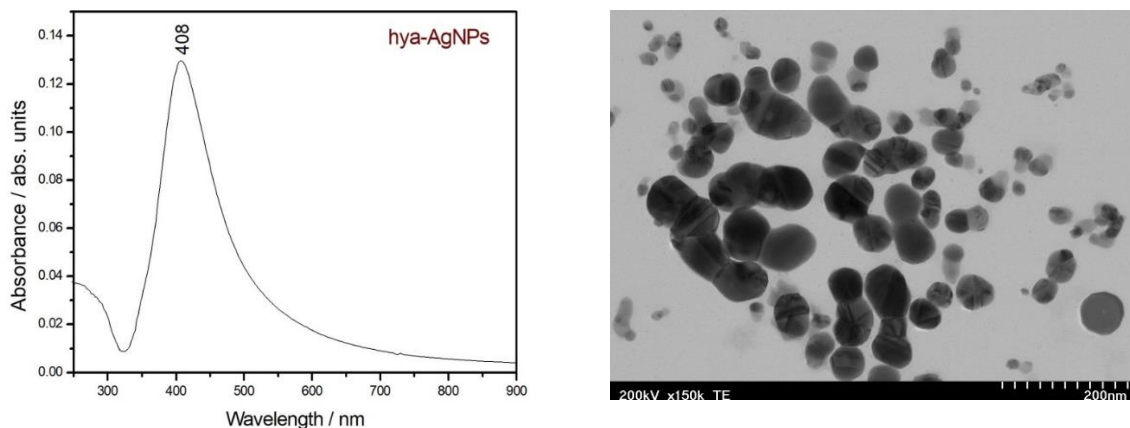
Materiale si metode

*Sinteza nanoparticulelor de argint.* Nanoparticulele de Ag au fost obținute prin reducerea cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs) folosind metoda introdusă de Leopold și Lendl [7]. Protocolul de sinteză și spectrul UV-vis al coloidalilor hya-AgNPs sunt prezentate mai jos.

Pentru prepararea hya-AgNPs, au fost dizolvați 17 mg de azotat de argint în 90 ml de apă ultrapură. Într-un recipient separat, 17 mg de clorhidrat de hidroxilamină și 1.2 ml soluție de



hidroxid de sodiu (1%) au fost amestecate în 10 ml de apă ultrapură. Coloidul de argint a fost obținut la temperatura camerei prin adăugarea rapidă, sub agitare puternică, a soluției de nitrat de argint cu amestec de clorhidrat / hidroxid de sodiu. Coloidul rezultat a fost agitat în continuare timp de 5 minute. Fig. 27 prezintă spectrul Uv-Vis și o imagine de microscopie electronică reprezentativă pentru coloidul de argint sintetizat.



**FIG.27.** Caracterizarea hya-AgNPs prin spectroscopie de absorbție UV-Vis, ce prezintă banda caracteristică de rezonanță plasmonică cu un maxim la valoarea 408 nm. Soluția coloidală a fost diluată de 100 de ori în apă ultrapură înainte de a efectua măsurarea UV-Vis. Caracterizarea hya-AgNPs prin măsurători de microscopie electronică TEM. Micrografia prezintă predominant particule AgNPs sferice, cu un diametru mediu de 50 nm. Imaginile TEM au fost achiziționate cu un microscop electronic Hitachi HD-2700 (STEM).

Pentru toate experimentele SERS pentru detecția ADN, hya-AgNPs au fost activate cu  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$   $5 \times 10^{-4}$  M [5, 6]. Nanoparticulele coloidale hya-AgNPs conțin, de asemenea,  $\text{Cl}^-$  în concentrație de 2.4 mM, eliberat în timpul reacției de sinteză, aceștia având un rol crucial în medierea adsorbției ADN-ului pe suprafața metalului [5, 6].

*Extragerea ADN-ului din celule.* ADN-ul genomic tumoral a fost extras dintr-o linie de celule imortalizate AML umane (THP-1) (American Type Culture Collection), în timp ce ADN-ul normal a fost extras din keratinocitele umane imortalizate (HaCaT) (Thermo Fisher Scientific) folosind un sistem de extracție în fază solidă (PureLink Genomic ADN mini kit, Thermo Fischer). THP-1 este o linie de celule monocitice umane imortalizate, derivată de la un pacient diagnosticat cu leucemie monocitară acută, în timp ce HaCaT este o linie de celule cheratinocite umane imortalizate derivată din pielea umană. Au fost detașate folosind tripsină, aproximativ  $5 \times 10^6$  celule cultivate în condiții de cultură celulară standard, centrifugate și apoi resuspendate în 200  $\mu\text{L}$  PBS. Celulele au fost apoi incubate timp de 2 minute la temperatura camerei cu 20  $\mu\text{L}$  Proteinază K și 20  $\mu\text{L}$  RNază A. Celulele au fost apoi incubate cu 200  $\mu\text{L}$  de tampon (PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer) timp de 10 minute la 55°C pentru a promovează digestia proteinelor.

Soluția rezultată a fost amestecată cu 200  $\mu\text{L}$  etanol, adăugată la o coloană PureLink™ și apoi centrifugată la 10.000×g timp de 1 minut la temperatura camerei. Coloana a fost apoi spălată prin centrifugare la 10.000×g timp de 1 minut la temperatura camerei cu două tampoane de spălare (500  $\mu\text{L}$ ) furnizate în kit. În cele din urmă, ADN-ul a fost eluat cu 50  $\mu\text{L}$  de tampon de

eluție genomică PureLink™ prin centrifugarea coloanei la 10.000×g timp de 1 minut la temperatura camerei.

*Colecția ADN-ului genomic din sângele periferic.* Probele de ADN genomic din sânge periferic au fost colectate de la n=17 controale și n=17 pacienți AML supuși unui transplant de celule stem hematopoietice la Institutul Clinic de Urologie și Transplant, Cluj-Napoca. Vârsta medie a pacienților cu AML a fost de 47±12 ani, în timp ce vârsta medie a subiecților de control a fost de 40±15 ani. În ambele grupuri, vârsta a avut o distribuție parametrică (testul de normalitate D'Agostino și Pearson omnibus, p> 0.05), iar diferența dintre vârsta celor două grupuri nu a fost statistică diferită (testul cu două cozi nepereche, p> 0.05). 5 pacienți din grupul AML și 7 subiecți din grupul de control au fost femei. Probele de ADN au fost resturi din analiza de potrivire a HLA și au reprezentat deșeuri medicale. Toate probele au fost anonimizate. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Institutului Clinic de Urologie și Transplant, Cluj-Napoca, iar experimentele au fost realizate în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki.

ADN-ul genomic a fost extras automat din sânge integral cu 5% EDTA folosind sistemul InnuPure C16 (Analytik Jena), conform protocolului producătorului. Concentrația și puritatea ADN-ului au fost determinate automat folosind aparatul NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Puritatea ADN-ului a fost calculată pe baza raportului dintre absorbanta la 260 și 280 nm (A260 / A280). Concentrația și puritatea probelor de ADN sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 2:** Concentrația și puritatea probelor ADN de la pacienții cu leucemie mieloidă acută (AML) și subiecții control (CTRL).

	Nr. de probe	Media concentrației ADN (domeniul de concentrație) ng/μL	Media raportului 260/280 (domeniul)
<b>AML</b>	17	43.20 (4.25-91)	1.78 (0.88-2.05)
<b>CTRL</b>	17	47.73 (21.5-132)	1.82 (1.74-193)

*Achiziția spectrelor SERS.* Pentru achiziția spectrelor SERS ADN, a fost utilizat un spectrometru InVia Raman (Renishaw), echipat cu un laser Nd:YAG cu frecvență dublată ce emite la 532 nm, și care a fost focalizat pe probă printr-un obiectiv 5X (Leica, NA 0.12).

Pentru măsurătorile SERS ADN extras din sângele periferic și din liniile celulare cultivate, s-au amestecat 5 μL hya-AgNPs cu 5 μL ADN. După aceea, s-au adăugat 0.5 μL Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (concentrația finală 5x10<sup>-4</sup> M). 5 μL din acest amestec au fost pipetați pe o lamelă de microscop acoperită cu folie de Al și analizați prin SERS sub formă de picătură lichidă. Pentru fiecare probă, au fost mediate 3 măsurători. Pentru fiecare spectru, s-a utilizat un timp de integrare de 40 de secunde, puterea laserului pe probă fiind de aproximativ 50 mW.

Toate spectrele SERS ADN genomic extras din sânge periferic au fost obținute folosind același lot de nanoparticule pentru a preveni orice diferențe spectrale datorate substratului SERS.

*Prelucrarea spectrelor și analiza statistică.* Spectrele SERS au fost preprocesate prin scăderea liniară a fundalului și normalizarea la unitate, folosind soft-ul de analiză statistică *The Unscrambler* (Camo Software, 10.1). Analiza statistică ulterioară a fost realizată în programul MATLAB (Mathworks), folosind toolbox-ul de statistici și machine learning.

Pentru analiza statistică univariată, s-a ales intensitatea normalizată a benzii de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  alocată benzii de vibrație de deformare a metil din 5-metilcitozină, pentru care s-a calculat curba caracteristică ROC. Punctul de întrerupere a fost calculat pe baza statisticilor J ale lui Youden.

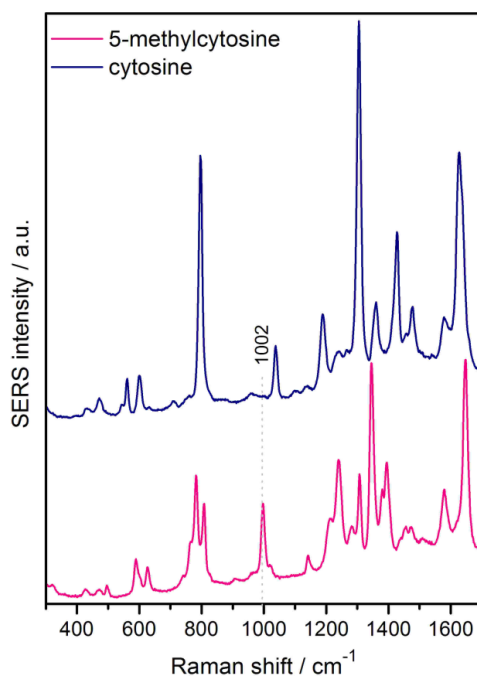
Pentru analiza spectrelor SERS ADN genomic, s-a folosit algoritmul SVM (support vector machine) și analiza PCA-LDA (principal component *analysis-linear discriminant analysis*). Pentru PCA-LDA, s-au folosit primele 7 componente principale (PC-uri) ca input, ce au fost în prealabil inspectate vizual și conțin benzi SERS semnificative. Astfel, discriminarea celor două grupuri se face strict pe baza semnalului SERS conținut în cele 7 PC-uri. Pentru fiecare test, am utilizat un algoritm de validare încrucișată. Astfel, 80% din spectre au fost utilizate pentru a antrena modelul de clasificare, în timp ce spectrele rămase au fost utilizate pentru validare.

## Rezultate

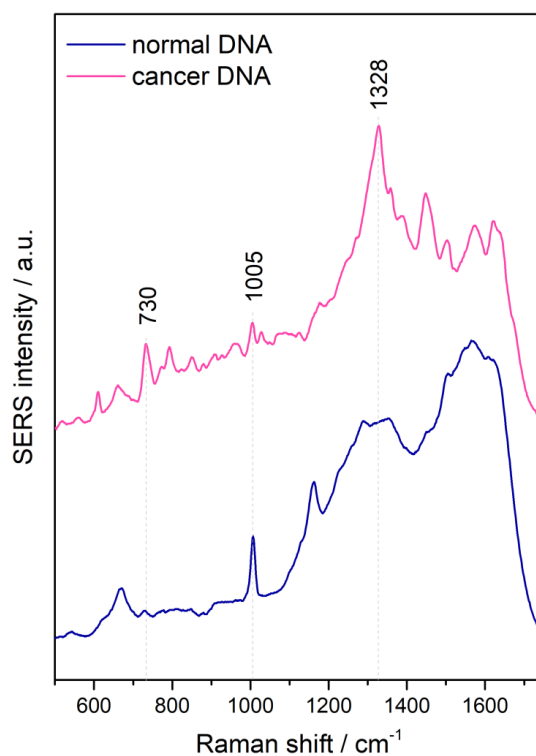
În acest studiu, substratul SERS a fost reprezentat de nanoparticule coloidale hya-AgNPs, care conțin o concentrație de  $2.4\text{ mM Cl}^-$  eliberată în procesul de sinteză. Nanoparticulele hya-AgNP au fost SERS activate cu  $\text{Ca}^{2+} 5 \times 10^{-4}\text{ M}$ , deoarece în studiile noastre anterioare am arătat că atunci când ioni precum  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{Cl}^-$  adsorb pe suprafața nanoparticulelor metalice, generează site-uri active SERS specifice [5, 6]. Activarea suprafeței metalice cu ioni  $\text{Ca}^{2+}$  favorizează chemisorbția ionilor  $\text{Cl}^-$  pe suprafața metalică. Mai mult, ionii  $\text{Cl}^-$  mediază chemisorbția ADN-ului pe suprafața metalului, jucând astfel un rol crucial în înregistrarea spectrelor SERS ale ADN-ului [5, 6, 8]. Rolul ionilor poate fi înțeles observând că spectrele SERS ale ADN-ului genomic sunt dominate de benzi specifice nucleotidelor ce conțin grupări încărcate pozitiv [9]. Mai precis, benzile la  $730$  și  $1330\text{ cm}^{-1}$  pot fi atribuite adeninei, în timp ce benzile SERS de la  $680$  și  $1005\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite citozinei. Astfel, ionii încărcăți negativ, facilitează chemisorbția analiților pozitivi [10, 11].

Pentru a arăta că gradul de metilare al citosinei din ADN poate fi evidențiat prin tehnica SERS, am comparat mai întâi spectrele SERS de citozină și 5-metilcitozină (*Fig. 28*). Comparativ, spectrul SERS al citozinei și 5-metilcitozinei arată că aceasta din urmă prezintă o bandă distinctă la  $1002\text{ cm}^{-1}$ , atribuită vibrației de deformare a grupării  $-\text{CH}_3$  din nucleotidele de citozină metilată [12]. Banda este absentă în spectrul SERS al citozinei. Astfel, banda de  $1002\text{ cm}^{-1}$  reprezintă o caracteristică spectrală a citozinei metilate.

Pentru a evidenția diferențele spectrale dintre probele de ADN genomic tumoral și normal, în ceea ce privește gradul de metilare, am înregistrat spectrele SERS ale probelor de ADN genomic extrase dintr-o linie celulară normală (HaCaT) și o linie celulară AML (THP-1), spectrele SERS fiind reprezentate în *Fig. 29*. În figură sunt prezentate spectrele SERS caracteristice ADN-ului normal și ADN-ului tumoral, indicând că intensitatea benzii SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită vibrației de deformare a grupării  $-\text{CH}_3$  în nucleotidele citozină metilată, prezintă o intensitate mai slabă în cazul ADN-ului tumoral, comparativ cu ADN-ul normal. Acest rezultat este în



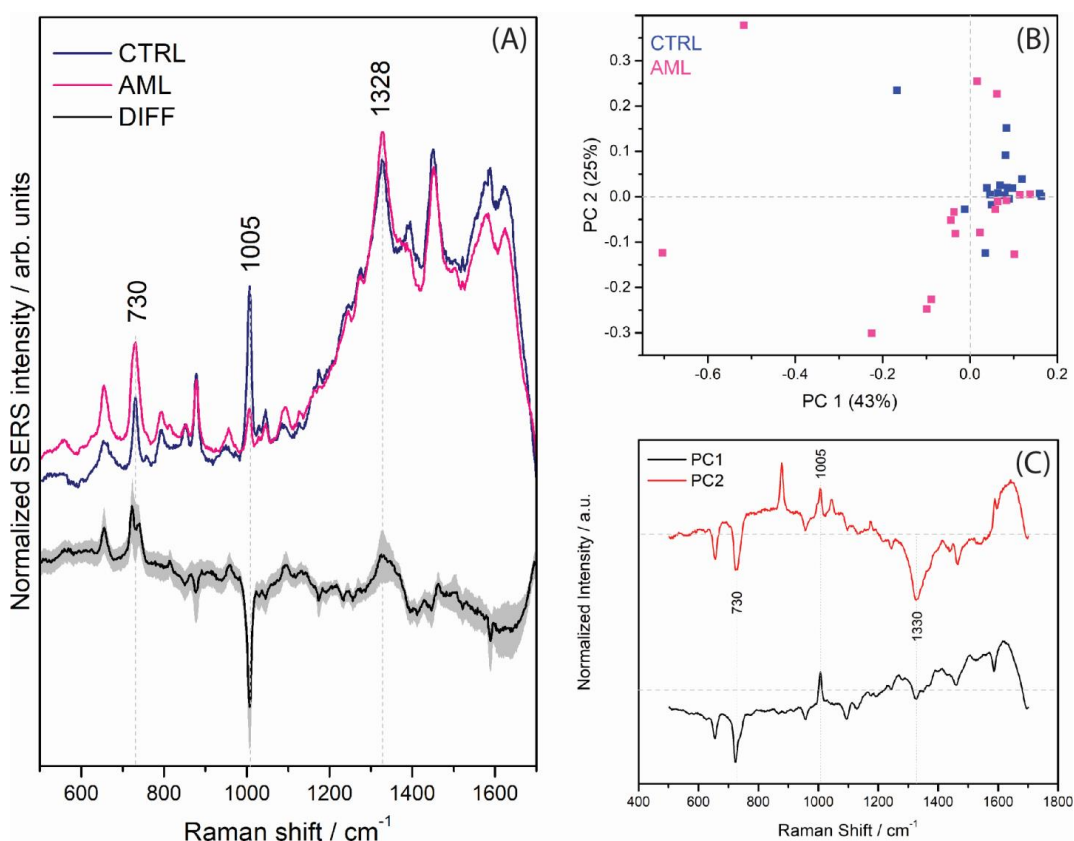
**FIG. 28.** Spectre SERS ale citozinei și 5-metilcitozinei (100 ng/μL) obținute cu hya-AgNPs (lungime de undă de excitație de 532 nm, timp de integrare de 10 sec și putere laser de 20 mW). Vibrația de deformare a grupei -CH<sub>3</sub> a 5-metilcitozinei la 1002 cm<sup>-1</sup> este evidențiată ca o bandă SERS distinctivă, care lipsește în cazul citozinei nemetilate [12].



**FIG.29.** Spectrele SERS ale ADN-ului normal și ADN-ului tumoral (10 ng/μL) extras din linii celulare cultivate. Sunt evidențiate benzile SERS atribuite 5-metilcitozinei (1005 cm<sup>-1</sup>) și adeninei (730 și 1328 cm<sup>-1</sup>).

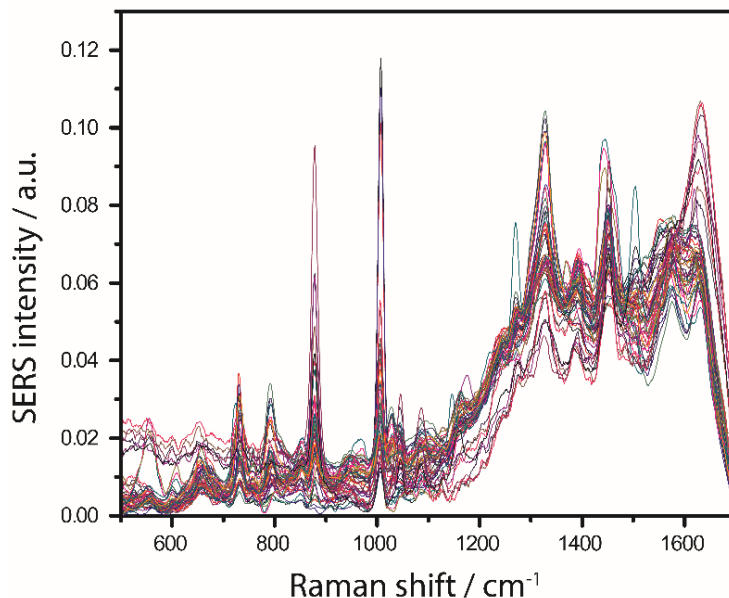
conformitate cu cunoscuta hipometilare globală a ADN-ului tumoral, ce apare în timpul transformării maligne a celulelor [1]. Mai mult, o altă caracteristică spectrală distinctivă, evidențiată în *Fig.29*, este reprezentată de intensitățile diferite ale benzilor SERS la 730 și 1328  $\text{cm}^{-1}$  atribuite adeninei [13]. Astfel, intensitățile SERS ale benzilor la 730 și 1328  $\text{cm}^{-1}$  au fost mai mari în cazul ADN-ului tumoral, comparativ cu ADN-ul normal. Diferențele în intensitate ale benzilor SERS de adenină provin și din gradul de metilare a ADN-ului tumoral, influențând geometria de adsorbție pe suprafața metalului. Aceste rezultate sunt în conformitate cu concluziile raportate de Sin și colab., care au arătat că gradul de metilare al ADN-ului tumoral determină o afinitate mai mare a ADN-ului tumoral pentru suprafața nanoparticulelor metalice [4].

Am analizat ADN-ul genomic extras din sânge periferic de la  $n=17$  pacienți cu leucemie mieloidă acută ce au fost în remisie hematologică și  $n=17$  voluntari sănătoși, cu scopul de a evidenția diferențele spectrale dintre cele două grupuri. Benzile SERS caracteristice, atribuite 5-metilcitozinei (1005  $\text{cm}^{-1}$ ) și adeninei (730 și 1328  $\text{cm}^{-1}$ ) sunt evidente în spectrele medii (*Fig.30A*), iar diferențele de intensitate ale acestor benzi SERS între grupul AML și grupul control, oglindesc perfect comportamentul spectral observat în cazul ADN-ului extras din liniile celulare cultivate (*Fig.29*).



**FIG. 30.** (A) Spectrele SERS medii ale ADN-ului genomic din sângele periferic din grupul leucemiei mieloid acute (AML), grupul control (CTRL) și spectrul diferență (DIFF). Spectrele au fost prelucrate în prealabil prin scăderea liniară a liniei de bază și normalizarea spectrelor la unitate. Zona umbră reprezintă abaterea standard; (B) Diagrama de scor pentru primele 2 PC-uri obținute prin analiza componentelor principale (PCA); (C) Reprezentările loading a primelor 2 PC-uri obținute prin analiza PCA. Graficele loading confirmă corelația negativă între benzile 1005  $\text{cm}^{-1}$  (pozitive) și benzile SERS 1330 și 730  $\text{cm}^{-1}$  (negative).

Astfel, spectrele de SERS ADN de la pacienții AML prezintă o intensitate mai mică a benzii 5-metilcitozinei la  $1005\text{ cm}^{-1}$  și o intensitate mai mare a benzilor de adenină la  $730$  și  $1328\text{ cm}^{-1}$  în comparație cu spectrele control (Figura 5A). Spectrele SERS individuale de ADN extrase din sângele periferic sunt prezentate Fig. 31.



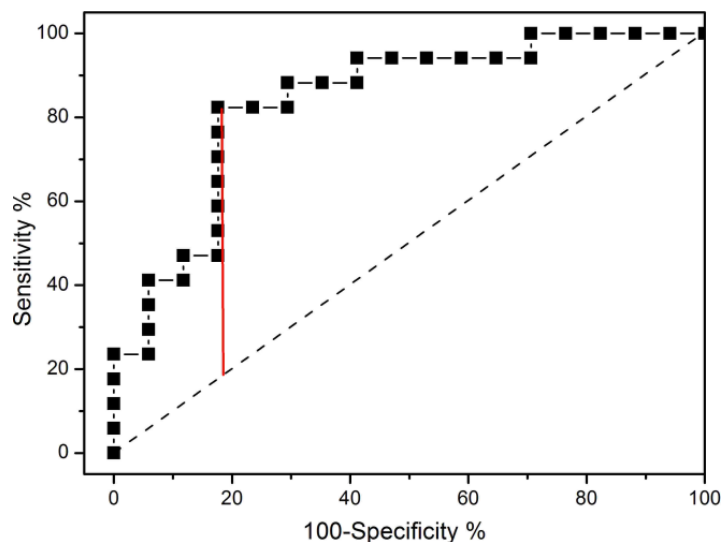
**FIG.31:** Spectrele SERS ale probelor ADN genomic ( $n = 34$ ) extrase din sângele periferic. Semnalul de fundal a fost scăzut folosind o transformare liniară și spectrul SERS a fost normalizat la unitate.

Pentru a vizualiza mai bine diferențele spectrale dintre semnalul SERS AML și grupul control, am efectuat o analiză PCA, o metodă de analiză statistică multivariată folosită pentru reducerea dimensionalității și pentru evidențierea benzilor SERS ce prezintă o variație semnificativă în setul de date. Tabloul scorurilor și loadings sunt prezentate în Fig.30B și Fig. 30C și prezintă corelația negativă între banda  $1005\text{ cm}^{-1}$  a 5-metilcitozinei și benzilor de adenină la benzile SERS  $730$  și  $1328\text{ cm}^{-1}$ .

Pe baza formei spectrale SERS a probelor de ADN, probele AML și control pot fi discriminate folosind tehnici de analiză a datelor, univariate și multivariate. În cazul analizei univariate, am utilizat intensitatea normalizată a benzii de  $1005\text{ cm}^{-1}$ , pentru care s-a obținut o suprafață sub curba (AUC) de  $0.837$  (Fig.32).

Pe baza indicelui Youden, valoarea optimă de reducere a intensității normalizate a benzii de  $1005\text{ cm}^{-1}$  a fost de  $0.028$ , ceea ce a corespuns la o sensibilitate de  $82.35\%$ , o specificitate de  $82.35\%$  și o precizie generală de  $82.35\%$  (linia roșie în Fig.32).

Coeficientul de corelație Spearman între concentrația probelor de ADN și intensitatea normalizată de  $1005\text{ cm}^{-1}$  a fost de 0.038, ceea ce exclude concentrația de ADN ca factor de confuzie pentru discriminarea dintre ADN tumoral și ADN normal.



**FIG. 32.** Curba caracteristicilor operaționale (ROC) pentru intensitatea SERS normalizată a benzii de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei. Aria de sub curbă este de 0.837. Valoarea optimă a fost aleasă pe baza indicelui Youden (linia roșie).

## Analiză

Acest studiu demonstrează că spectroscopia SERS este capabilă să sesizeze modelul unic de metilare al ADN-ului tumoral, o strategie care ar putea fi folosită pentru diagnosticarea și urmărirea pacienților cu AML. Rezultatele obținute pe probe de ADN genomic din sângele periferic de la pacienți reali au arătat că pacienții și controalele cu AML pot fi discriminate cu o sensibilitate de 82%, specificitate de 82% și o precizie generală de 82%. Acest rezultat este remarcabil, deoarece sugerează că ADN-ul tumoral poate fi detectat chiar și în prezența ADN-ului normal, așa cum se întâmplă în cazul ADN-ului extras din sângele periferic al pacienților AML în remisie hematologică. Similitudinea dintre sensibilitate și specificitate sugerează, de asemenea, că probabilitatea pacienților AML de a afișa niveluri anormale de metilare ADN este similară cu cea a subiecților de control pentru a afișa niveluri normale de metilare ADN. Acest rezultat este în conformitate cu un studiu raportat de Sin și colab., care a demonstrat că tiparul de metilare al ADN-ului tumoral conduce la autoasamblarea preferențială a ADN-ului tumoral pe nanoparticule metalice în comparație cu ADN-ul normal [4].

Datele prezentate sunt de mare potențial în utilizare în clinică pentru pacienții cu AML care se supun transplantului de celule stem alogenice. În prezent, progresia tumorală a pacienților cu leucemie este monitorizată prin NGS sau citometrie de flux [14, 15]. Cu toate

acestea, enorma complexitate genomică și fenotipică a AML face ca monitorizarea să fie deosebit de dificilă [16]. Astfel, în cazul în care testul bazat pe SERS este validat, acesta ar oferi clinicienilor un instrument valoros pentru urmărirea pacienților cu AML care sunt supuși unui transplant alogenic de celule stem. Detectarea ADN-ului de cancer circulant bazat pe modelul său specific de metilare a fost recent demonstrată folosind imunoprecipitarea cu anticorpi împotriva 5-metilcitozinei, urmată de NGS al ADN-ului tumoral circulant [3]. Cu toate acestea, detectarea ADN-ului tumoral de către NGS necesită amplificarea ADN-ului, ceea ce limitează utilizarea acestuia în medii clinice și de cercetare.

Spre deosebire de majoritatea studiilor SERS anterioare efectuate pe ADN, care sunt concentrate pe ADN-ul cu catenă monocatenară scurtă și dublă sintetizată chimic [17, 18], în studiul nostru asupra probelor de ADN genomic a fost identificată cu succes banda la  $1005\text{ cm}^{-1}$  ce provine de la starea de metilare a reziduurilor de citozină, una dintre cele mai bine înțelese forme de reglare epigenetică. Modificările epigenetice, inclusiv metilarea citozinei, sunt de asemenea absente în cazul ADN-ului complementar [19], care rezultă din ARN prin transcriere inversă. În plus față de banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$ , modificările epigenetice perturbă și adsorbția ADN-ului pe suprafețele metalice [4], ceea ce se traduce prin forme spectrale modificate, cum ar fi creșterea benzilor SERS de la adenină. Astfel, studiul nostru crește conștientizarea importanței metilării citozinei și eventual a altor modificări epigenetice atunci când analizăm ADN-ul prin SERS.

Deși analiza SERS a ADN-ului genomic din liniile de celule canceroase a fost raportată înainte [20], analiza ADN-ului genomic de la pacienții cu AML este mult mai dificilă, deoarece conține atât ADN malign, cât și ADN non-malign din hematopoieză normală. Un studiu realizat de Trau și colab. a descris detectarea directă prin SERS a ADN-ului complementar de la pacienții cu cancer de prostată [19]. Cu toate acestea, ADN-ul complementar diferă de ADN-ul genomic, deoarece lipsește orice modificare epigenetică. În plus, autorii și-au amplificat eşantioanele înainte de analiza SERS folosind amplificare transcripție-recombinant polimerază (RT-RPA), prin urmare, protocolul nostru nu a implicat nicio etapă de amplificare a ADN-ului. Studiul nostru reprezintă unul dintre primele studii cu privire la analiza modificărilor epigenetice a ADN-ului genomic din probe reale prin SERS, deschizând noi căi pentru diagnosticul și urmărirea pacienților cu cancer.

## **Concluzii**

În acest studiu preliminar, am demonstrat utilizarea SERS pentru detectarea ADN-ului tumoral pe baza modelului său de metilare caracteristic, fără amplificarea prealabilă a ADN-ului. S-au observat caracteristici spectrale SERS distincte prin intensitatea benzilor SERS ale



5-metilcitozinei ( $1005\text{ cm}^{-1}$ ) și adeninei ( $730$  și  $1328\text{ cm}^{-1}$ ). Astfel, ADN-ul tumoral a prezentat o intensitate redusă a benzii de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  de la 5-metilcitozină în comparație cu ADN-ul normal, în linie cu hipometilarea bine descrisă a ADN-ului tumoral. Deasemenea, intensitățile SERS ale benzilor de adenină la  $730$  și  $1328\text{ cm}^{-1}$  au fost mai mari în cazul ADN-ului tumoral, comparativ cu ADN-ul normal. Diferențele în intensitățile SERS ale benzilor de adenină provin și din modelul de metilare ADN specific cancerului care influențează geometria adsorbției ADN pe suprafața metalului. ADN-ul genomic din sânge de la pacienții cu AML a fost discriminat cu o acuratețe totală de 82,35% ( $ASC = 0,837$ ) pe baza benzii de  $1005\text{ cm}^{-1}$  de la citosina metilată. PCA-LDA și SVM au obținut o acuratețe totală de clasificare de 82,2%, respectiv 75,3%. Detectarea SERS a ADN-ului tumoral fără a necesita nicio etapă de amplificare a ADN-ului reprezintă o strategie promițătoare care ar putea fi tradusă într-un cadru clinic pentru screening și urmărirea pacienților cu cancer.

Rezultatele acestor studii, au fost publicate în reviste de specialitate cotate internațional sau prezentate la conferințe internaționale, cu mențiunea proiectelor în cadrul căruia au fost efectuate cercetările.

#### **Reviste științifice:**

- [1]. Pasca S, **Tomuleasa C**, Teodorescu P, Ghiaur G, Dima D, Moisoiu V, Berce C, Stefan C, Ciechanover A, Einsele H. *KRAS/NRAS/BRAF Mutations as Potential Targets in Multiple Myeloma*. Front Oncol. 2019 Oct 24;9:1137. doi: 10.3389/fonc.2019.01137.  
**IF: 4.317, rank Q2.**
- [2]. Zimta AA, **Tomuleasa C**, Sahnoune I, Calin GA, **Berindan-Neagoe I**. **Long Non-coding RNAs in Myeloid Malignancies**. Front Oncol. 2019 Oct 18;9:1048. doi: 10.3389/fonc.2019.01048.  
**IF: 4.317, rank Q2.**
- [3]. Moisoiu V, Teodorescu P, Parajdi L, Pasca S, Zdrenghea M, **Dima D**, Precup R, **Tomuleasa C**, Soverini S. *Assessing Measurable Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. BCR-ABL1 IS in the Avant-Garde of Molecular Hematology*. Front Oncol. 2019 Sep 23;9:863. doi: 10.3389/fonc.2019.00863.  
**IF: 4.317, rank Q2.**
- [4]. Dobrowolski J, Pasca S, Teodorescu P, Selicean C, Rus I, Zdrenghea M, **Bojan A**, Trifa A, Fetica B, Petrushev B, Rosu AM, **Berindan-Neagoe I**, **Tomuleasa C**, **Dima D**. *Persistent Basophilia May Suggest an "Accelerated Phase" in the Evolution of CALR-*

*Positive Primary Myelofibrosis Toward Acute Myeloid Leukemia.* Front Oncol. 2019 Sep 6;9:872. doi: 10.3389/fonc.2019.00872.

**IF: 4.317, rank Q2.**

- [5]. Sas V, Moisoiu V, Teodorescu P, Tranca S, Pop L, Iluta S, Pasca S, Blag C, Man S, Roman A, Constantinescu C, Rus I, Buse M, Fetica B, Marian M, **Selicean C, Berindan-Neagoe I**, Petrushev B, Bumbea H, Tanase A, Zdrenghea M, Fuji S, Kitano S, **Tomuleasa C**; *Romanian-Japanese Working Group of the Romanian Society for Bone Marrow Transplantation. Approach to the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Patient.* J Clin Med. 2019 Aug 6;8(8). pii: E1175. doi: 10.3390/jcm8081175.

**IF: 5.688, rank Q1.**

- [6]. Constantinescu C, Bodolea C, Pasca S, Teodorescu P, **Dima D**, Rus I, Tat T, Achimas-Cadariu P, Tanase A, **Tomuleasa C**, Einsele H. *Clinical Approach to the Patient in Critical State Following Immunotherapy and/or Stem Cell Transplantation: Guideline for the On-Call Physician.* J Clin Med. 2019 Jun 20;8(6). pii: E884. doi: 10.3390/jcm8060884.

**IF: 5.688, rank Q1.**

- [7]. Sas V, Blag C, Zaharie G, Puscas E, Lisencu C, Andronic-Gorcea N, Pasca S, Petrushev B, Chis I, Marian M, **Dima D**, Teodorescu P, Iluta S, Zdrenghea M, **Berindan-Neagoe I**, Popa G, Man S, Colita A, Stefan C, Kojima S, **Tomuleasa C**. *Transient leukemia of Down syndrome.* Crit Rev Clin Lab Sci. 2019 Jun;56(4):247-259.

**IF: 4.817, rank Q1.**

- [8]. Bocsa CD, Moisoiu V, Stefancu A, Leopold LF, **Leopold N**, Fodor D (2019) *Knee osteoarthritis grading by resonant Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) analysis of synovial fluid.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 20. doi:10.1016/j.nano.2019.04.015

**IF 5.570, rank Q1- MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL**

- [9]. Stefancu A, Badarinza M, Moisoiu V, Iancu SD, Serban O, **Leopold N**, Fodor D (2019) *SERS-based liquid biopsy of saliva and serum from patients with Sjögren's syndrome.* Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007/s00216-019-01969-x

**IF 3.286, rank Q1- CHEMISTRY, ANALYTICAL**

- [10]. V. Moisoiu, A. Stefancu, S.D. Iancu, T. Moisoiu, L. Loga, L. Dican, C.D. Alecsa, I. Boros, A. Jurj, **D. Dima**, C. Bagacean, **R. Tetean**, **E. Burzo**, **C. Tomuleasa**, F. Elec, **N. Leopold**, *SERS assessment of the cancer-specific methylation pattern of genomic DNA. Towards the detection of acute myeloid leukemia in patients undergoing hematopoietic*

*stem cell transplantation*, Analytical and Bioanalytical Chemistry accepted for publication, 2019, DOI: 10.1007/s00216-019-02213-2.

**IF 3.286, rank Q1- CHEMISTRY, ANALYTICAL**

- [11]. S.D. Iancu, A. Stefancu, V. Moisoiu, L.F. Leopold, **N.Leopold**, *The role of Ag<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> adions in the SERS turn-on effect of anionic analytes*, Beilstein Journal of Nanotechnology, Manuscript ID: 17374642, accepted for publication, 2019

**IF 2.269, rank Q2-PHYSICS, APPLIED**

- [12]. A. Stefancu, S.D. Iancu, L.F. Leopold, **N. Leopold**, *Contribution of chemical interface damping to the shift of surface plasmon resonance energy of gold nanoparticles*, submitted to Romanian Reports in Physics, submitted manuscript, October 2019.

**IF 1.940, rank Q2-PHYSICS, MULTIDISCIPLINARY**

**Participări la conferințe:**

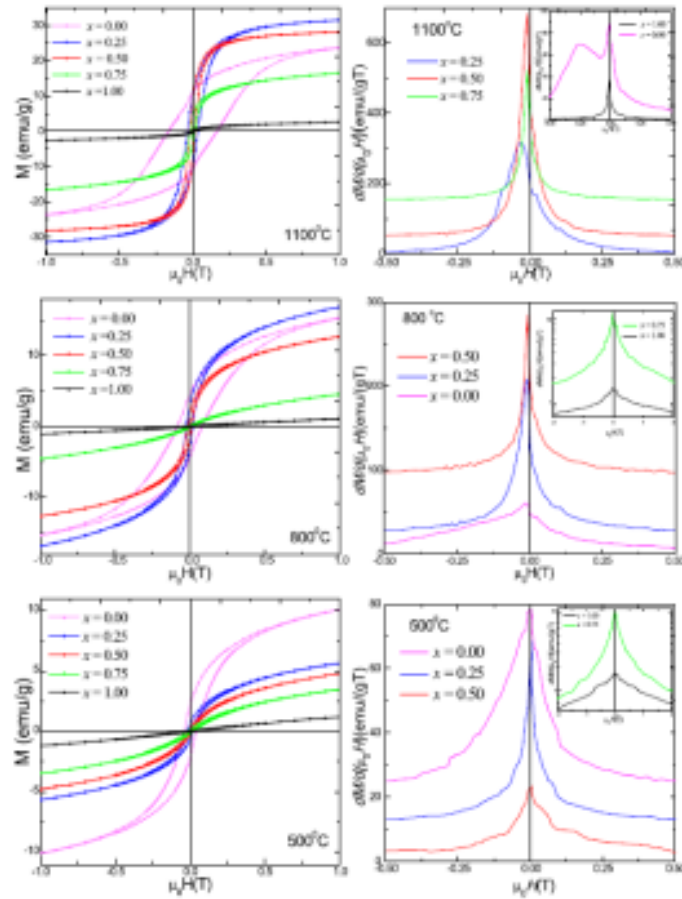
1. **N. Leopold**, A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, F. Elec, **C. Tomuleasa**, *Probing the methylation landscape of genomic DNA by SERS*, 17<sup>th</sup> Confocal Raman Imaging Symposium, September 28<sup>th</sup>–30<sup>th</sup>, 2019, Ulm, Germany, Book of Abstracts, page 56 (P)
2. **N. Leopold**, A. Stefancu, S.D. Iancu, V. Moisoiu, L.F. Leopold, *Specific and selective chemisorption of molecules to silver nanoparticles and SERS switch-on effect*, The seventh International Conference on Advanced Applied Raman Spectroscopy, 24<sup>th</sup>–25<sup>th</sup> June 2019, Oxford, United Kingdom, Book of Abstracts, page 66.
3. A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, **N. Leopold**, L.F. Leopold, *Detecting methylation landscape of genomic DNA by surface-enhanced Raman scattering*, The 18<sup>th</sup> International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 26<sup>th</sup>–28<sup>th</sup> September, 2019 Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 69.
4. **N. Leopold**, *Nanoparticle-based liquid biopsy of biofluids* - oral presentation, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation, 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> of November 2019, Imogen Research Centre, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 16.
5. V. Moisoiu, **N. Leopold**, A. Stefancu, S.D. Iancu, F. Elec, **C. Tomuleasa**, *Probing the methylation landscape of genomic DNA by SERS*, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation, 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> of November 2019, Imogen Research Centre, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 34.
6. A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, **N. Leopold** *Silver nanoparticles as albuminuria sensor*, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation,

### ***3. Nanocomposite de tip $Zn_xCo_{1-x}Fe_2O_4$ , $Ni_xCo_{1-x}Fe_2O_4$ și $Ni_xZn_{1-x}Fe_2O_4$ înglobate în silice***

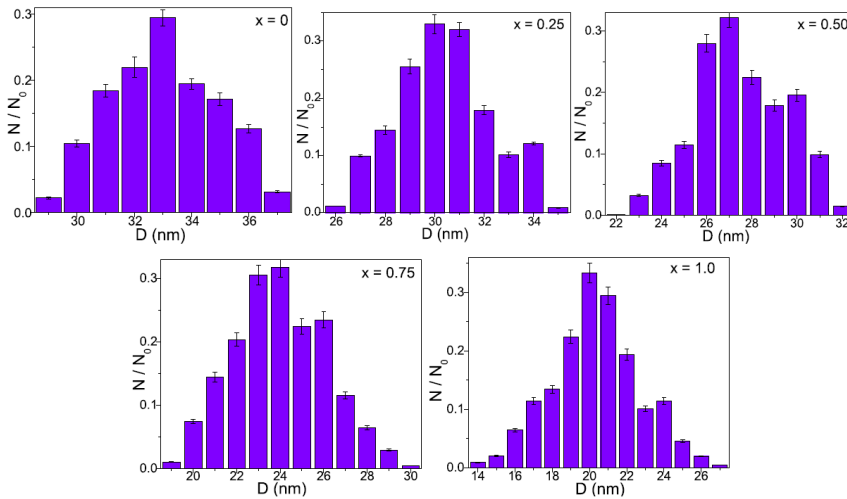
În cadrul proiectului au fost preparate și studiate și proprietățile fizice ale nanocompozitelor cu structură de tip spinelic înglobate într-o matrice de  $SiO_2$ . În acest context au fost studiate sistemele  $MFe_2O_4$  cu  $M = (Ni, Co), (Zn, Co)$  și respectiv  $(Ni, Zn)$ .

**3.1** Nanocompozitele  $Zn_xCo_{1-x}Fe_2O_4/SiO_2$  ( $x = 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00$ ) au fost investigate prin măsurători structurale, morfologice și magnetice. Datele obținute în urma măsurătorilor de difracție de raze X și spectroscopie Mossbauer au indicat prezența spinelilor micști nanocristalini. Parametrii de rețea descresc treptat cu creșterea conținutului de Zn urmărind legea lui Vegard. Dimensiunile cristalitelor, densitatea și porozitatea descresc cu creșterea concentrației de zinc. Dimensiunile nanoparticulelor (32.0-6.5, 17.5-8.1 și 36.2-18.6 nm) pentru nanoparticulele tratate termic la 500, 800 și respective la 1100 °C,) au fost determinate prin măsurători TEM. Spectrele Mossbauer au caracteristicile magnetice tipice ale spinelilor dopați cu Co și Zn. Forma curbelor de histerezis magnetic au relevant dependența comportării superparamagnetice de proprietățile structurale după cum se poate constata din *Fig. 32*. Magnetizarea la saturație ( $M_s$ ) și câmpul coercitiv ( $H_c$ ) sunt, de asemenea influențate de substituția cobaltului cu Zn, indicând atât deprecierea valorilor  $M_s$  cât și  $H_c$ . Substituția magnetocristaline și a câmpului coercitiv  $H_c$ .

**3.2** Nanocompozite de tip  $Ni_xCo_{1-x}Fe_2O_4/SiO_2$  ( $x = 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00$ ) au fost preparate printr-o metodă sol-gel modificată. În graficile de difracție de raze X indică fazele cristaline și dimensiunile cristalitelor în funcție de temperatură de tratament termic și de conținutul de Ni. Constantele de rețea, volumul celulei, densitatea, distanțele dintre ionii magnetici din pozițiile A și B (hopping lengths), dimensiunile medii ale cristalitelor și cristalinitatea relativă, calculate din rezultatele măsurătorilor prin raze X sunt în concordanță bună cu structura spinelică mixtă. Imaginile TEM relevă forma sferică a nanoparticulelor și faptul că mărimea lor crește o dată cu creșterea temperaturii de tratament termic. Distribuția dimensiunilor particulelor este prezentată în *Fig. 33*. Spectrele Mössbauer pe nucleul  $^{57}Fe$  au alura tipică a spinelilor de Co și cobaltului  $Co^{2+}$  cu ionul de  $Zn^{2+}$  nemagnetic, induce o reducere treptată a anizotropiei Ni.

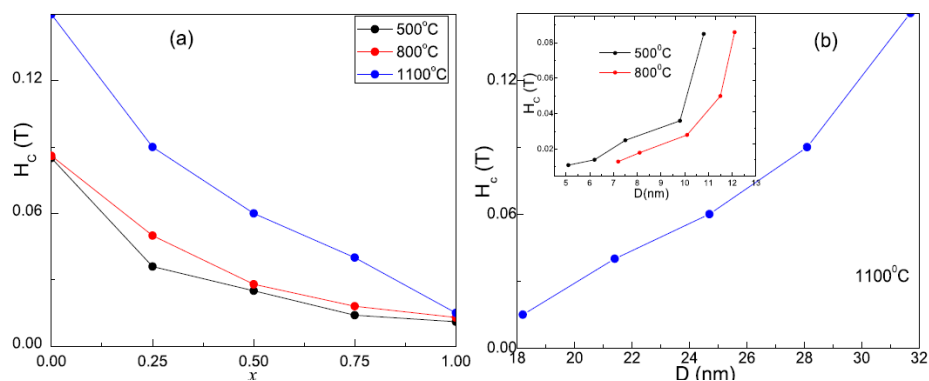


**FIG. 32.** Curbele de histereză magnetică și derivatele magnetizărilor pentru nanocompozitele tratate termic la 500, 800 și 1100°C.



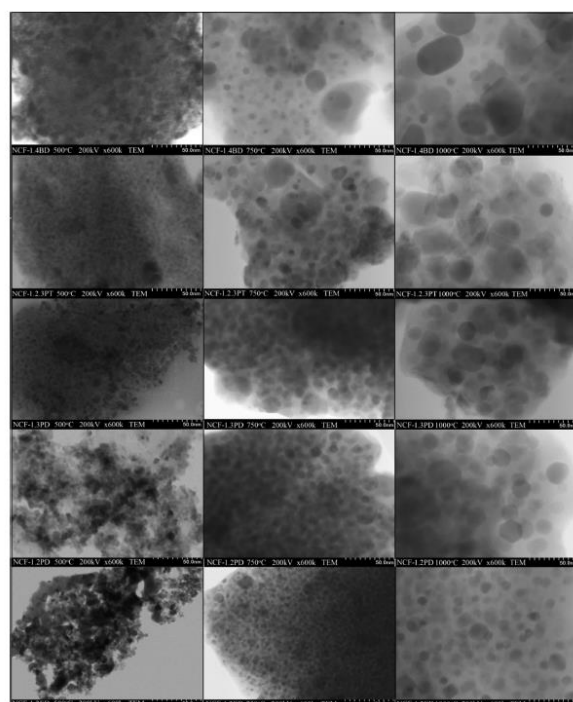
**FIG. 33.** Câmpul coercitiv ca funcție de  $x$  (a) și de dimensiunile medii ale particulelor (b) pentru nanocompozitele tratate termic la 500, 800 și 1100°C.

Proprietățile magnetice, precum în magnetizarea la saturație (MS), magnetizarea remanentă (Mr), câmpul coercitiv (Hc), momentul magnetic per formula unitate, anizotropia magnetocristalină scad o data cu creșterea conținutului de Ni, dar cresc cu temperatura de tratament termic datorită modificării compoziției și a ocupării pozițiilor rețelei cristaline de către cationic Fig. 34. Nanocompozitele care au conținut ridicat de Ni prezintă o comportare superparamagnetică, în timp ce nanocompozitele sărace în Ni au proprietăți de tip ferimagnetic.

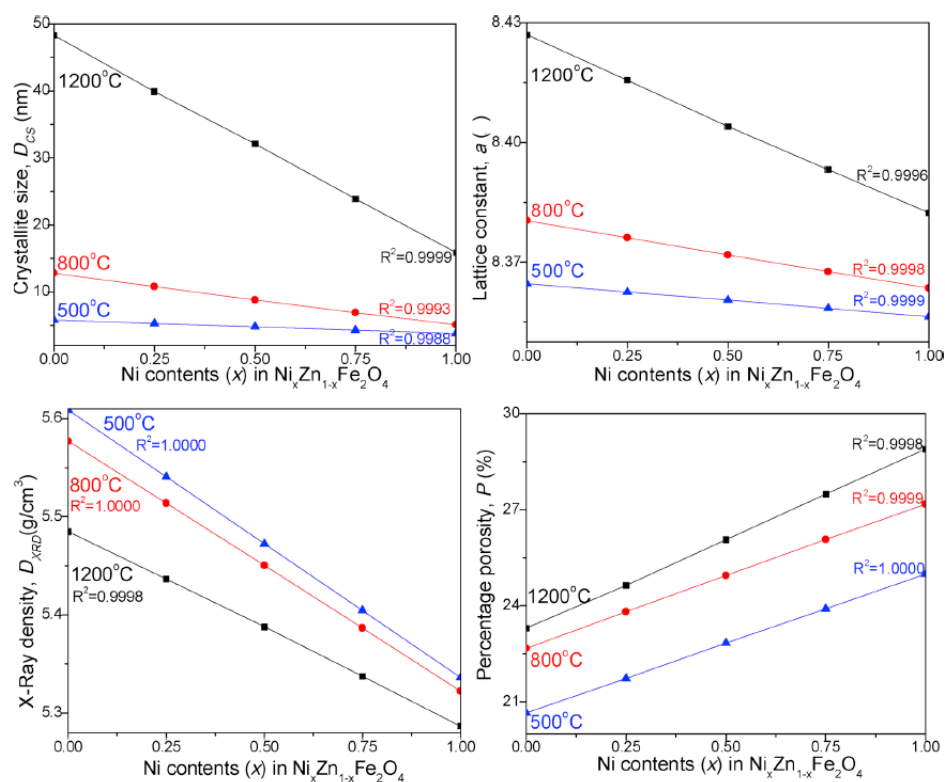


**FIG. 34.** Distribuțiile de dimensiuni ale particulelor pentru nanocompozitele de  $\text{Ni}_x\text{Co}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tratate la  $1100^\circ\text{C}$ .

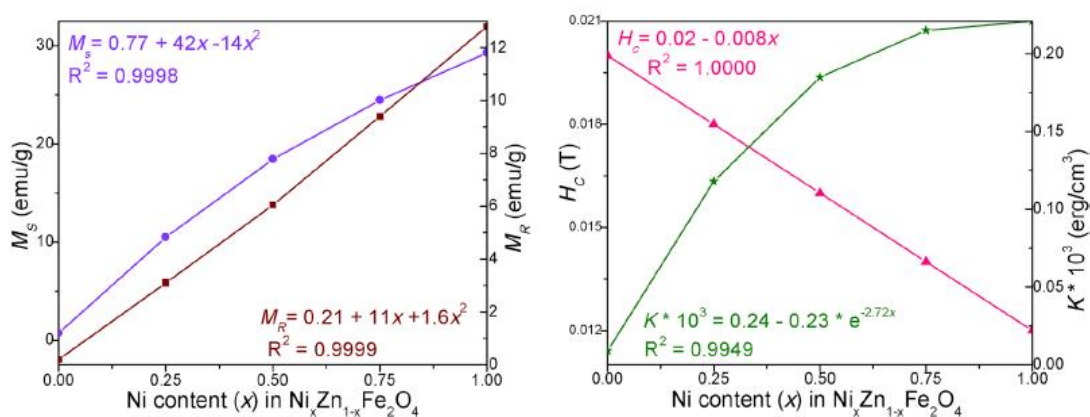
**3.3** In cazul particular al feritei  $\text{Ni}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$  s-a studiat influența structurii polioliilor asupra formei și proprietăților fizice ale nanoparticulelor obținute prin metode sol-gel. S-a urmărit formarea carboxilaților metalici înglobați în silice prin utilizarea nitrăților de Co, Fe și Ni și a unor polioli cu diferite structuri și mase moleculare (1,2-ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,4 butanediol, 1,2,3-propanetriol). Comportarea termică a precursorilor carboxilați, este similară pentru toți polioli utilizati, atât formarea cât și descompunerea apărând în două trepte. Pierderea de masă crește ușor cu creșterea lungimii lanțului diol și crește în măsură semnificativă cu prezența unui grup secundar hidroxil. Studiul prin difracția de raze X indică formarea unei faze de NiO sau a unui amestec de NiO și  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  la  $T < 750^\circ\text{C}$  respectiv a unei monofaze de ferită de Co-Ni la tratamentul termic la  $T = 1100^\circ\text{C}$ , în timp ce spectroscopia prin IR cu transformata Fourier, confirmă formarea matricii de silice și formarea și descompunerea precursorilor carboxilați. Investigațiile prin TEM arată nanoparticule de formă sferică de dimensiuni diferite așa cum se poate vedea în Fig. 35. Dimensiunile nanocristalitelor de  $\text{Ni}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$  (4.3–28.1 nm) și cristinitatea relativă (4–100 a.u.) cresc odată cu creșterea temperaturii de tratament termic, cu lungimea lanțului diolului și cu distanța



**FIG. 35.** Imagini TEM ale gelurilor NCF-1.2ED, NCF-1.2PD, NCF-1.3PD, NCF-1.2.3PT, NCF-1.4BD tratate termic la 500, 750 și 1000 °C.



**FIG. 36.** Variația dimensiunii cristalitelor, a parametrului de rețea, a densității și porozității, de conținutul de Ni în naocompozitele  $\text{Ni}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$



**FIG. 37.** Magnetizarea la saturație ( $M_s$ ), magnetizarea remanentă ( $M_r$ ), câmpul coercitiv ( $H_c$ ) și anizotropia ( $K$ ) funcție de compoziție nanocompozitele de tip  $\text{Ni}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tratate termic la  $1200^\circ$

dintre grupările hidroxil. Câmpul coercitiv (0.015–0.6 T) și magnetizarea la saturație ale gelurilor tratate termic la  $1000^\circ\text{C}$ , cresc de asemenea cu lungimea lanțurilor diolilor.

**3.4** Un alt aspect al cercetărilor noastre a constat în studiul proprietăților structurale și magnetice ale nanocompozitelor de tip  $\text{Ni}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  obținute printr-o metodă sol-gel modificată. Formarea precursorilor succinați de Ni, Zn și Fe ( $< 200^\circ\text{C}$ ) și descompunerea lor în ferite ( $< 400^\circ\text{C}$ ) a fost confirmată de analiza termică și de spectroscopia IR de transformată Fourier. Imaginile TEM arată nanoparticule de formă sferică cu dimensiuni crescând cu creșterea temperaturii de tratament termic. Conform cu rezultatele difracției de raze X, în urma tratamentului termic la  $1200^\circ\text{C}$ , au fost evidențiate ferite mono-fazice cristaline în probele cu conținut redus de Ni și concentrație mare de Zn. A fost pusă în evidență o dependență lineară a dimensiunii cristalitelor, a parametrilor de rețea, a densității și porozității de conținutul de Ni al nanocompozitelor (Fig.36). Proprietățile magnetice precum magnetizarea la saturație ( $M_s$ ), magnetizarea remanentă, câmpul coercitiv ( $H_c$ ) și anizotropia magnetorezistenței ( $K$ ) sunt dependente de conținutul de Ni în nanocompozite (vezi Fig. 37). Forma curbelor de histereză magnetică indică comportări superparamagnetice și de tip ferrimagnetic ale nanocompozitelor în funcție de metoda de preparare

## Bibliografie

- [1]. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. Epigenomics, 2009;1(2):239-59.



- [2]. Kelly AD, Kroeger H, Yamazaki J, Taby R, Neumann F, Yu S, et al. A CpG island methylator phenotype in acute myeloid leukemia independent of IDH mutations and associated with a favorable outcome. *Leukemia*, 2017;31(10):2011-9.
- [3]. Shen SY, Singhanian R, Fehring G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*, 2018;563(7732):579-83.
- [4]. Sina AA, Carrascosa LG, Liang Z, Grewal YS, Wardiana A, Shiddiky MJA, et al. Epigenetically reprogrammed methylation landscape drives the DNA self-assembly and serves as a universal cancer biomarker. *Nat Commun*, 2018;9(1):Article number: 4915.
- [5]. Leopold N, Stefancu A, Herman K, Todor IS, Iancu SD, Moisoiu V, et al. The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering enhancement. *Beilstein J Nanotechnol*, 2018;9:2236-47.
- [6]. Stefancu A, Moisoiu V, Bocsa C, Bálint Z, Cosma DT, Veresiu IA, et al. SERS-based quantification of albuminuria in the normal-to-mildly increased range. *Analyst*, 2018;143(22):5372-9.
- [7]. Leopold N, Lendl B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B*, 2003;107(24):5723-7.
- [8]. Stefancu A, Moisoiu V, Bocsa C, Balint Z, Cosma DT, Veresiu IA, et al. SERS-based quantification of albuminuria in the normal-to-mildly increased range. *Analyst*, 2018;143(22):5372-9.
- [9]. Srinivasan AR, Sauers RR, Fenley MO, Boschitsch AH, Matsumoto A, Colasanti AV, et al. Properties of the Nucleic-acid Bases in Free and Watson-Crick Hydrogen-bonded States: Computational Insights into the Sequence-dependent Features of Double-helical DNA. *Biophys. Rev.*, 2009;1(1):13-20.
- [10]. Doering WE, Nie S. Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *J. Phys. Chem. B*, 2002;106(2):311-7.
- [11]. Leopold N, Stefancu A, Herman K, Tódor IS, Iancu SD, Moisoiu V, et al. The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering enhancement. *Beilstein J Nanotechnol*, 2018;9:2236-47.
- [12]. Sánchez-Cortés S, Garcia-Ramos JV. SERS of cytosine and its methylated derivatives on metal colloids. *J. Raman Spectrosc.*, 1992;23(1):61-6.

- [13]. Xu L-J, Lei Z-C, Li J, Zong C, Yang CJ, Ren B. Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of DNA with Single-Base Sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015;137(15):5149-54.
- [14]. Orsmark-Pietras C, Lilljebjörn H, Rissler M, Lazarevic V, Arvanitakis A, Ehinger M, et al. Comprehensive Prospective Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, 2015;126(23):3830.
- [15]. Chen X, Cherian S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. *Clin Lab Med*, 2017;37(4):753-69.
- [16]. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2013;368(22):2059-74.
- [17]. Garcia-Rico E, Alvarez-Puebla RA, Guerrini L. Direct surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy of nucleic acids: from fundamental studies to real-life applications. *Chem. Soc. Rev.*, 2018;47(13):4909-23.
- [18]. Panikkanvalappil SR, Mahmoud MA, Mackey MA, El-Sayed MA. Surface-enhanced Raman spectroscopy for real-time monitoring of reactive oxygen species-induced DNA damage and its prevention by platinum nanoparticles. *ACS Nano*, 2013;7(9):7524-33.
- [19]. Wang J, Koo KM, Wee EJH, Wang Y, Trau M. A nanoplasmonic label-free surface-enhanced Raman scattering strategy for non-invasive cancer genetic subtyping in patient samples. *Nanoscale*, 2017;9(10):3496-503.
- [20]. Panikkanvalappil SR, Mahmoud MA, Mackey MA, El-Sayed MA. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Real-Time Monitoring of Reactive Oxygen Species-Induced DNA Damage and Its Prevention by Platinum Nanoparticles. *ACS Nano*, 2013;7(9):7524-7233.

## 2.7 *Activități de informare și reclamă*

Rezultatele obținute au fost comunicate în seminarii științifice și la conferințe internaționale. Pe lângă prezentarea principalelor rezultate obținute în cadrul proiectului participații au fost informați despre finanțarea care a permis realizările comunicate. Deasemenea au fost prezentate de fiecare dată temele de cercetare ale membrilor echipei, echipamentele existente și posibilitățile de cooperare cu colective de la universități/laboratoare de cercetare de prestigiu din UE, SUA, Japonia.

## 2.8 *Diseminare & alte activități privind vizibilitatea*

Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului au fost publicate sau sunt în curs de publicare în 20 lucrări științifice în reviste bine cotate internațional:

- [1]. **Gabriela Fabiola Știufiuc, Ștefan Nițică, Valentin Toma, Cristian Iacoviță, Dietrich Zahn, Romulus Tetean, Emil Burzo, Constantin Mihai Lucaciu, Rareș Ionuț Știufiuc, Synergistical Use of Electrostatic and Hydrophobic Interactions for the Synthesis of a New Class of Multifunctional Nanohybrids: Plasmonic Magneto-Liposomes**, *Nanomaterials*, 9, 11, 1623, (2019), doi:10.3390/nano9111623, IF 4, Rank Q1.
- [2]. **Roxana Dudric, Gabriela Souca, Adam Szatmari, Tamas Szilard, Stefan Nitica, Cristian Iacoviță, Alin Iulian Moldovan, Rares Stiufiuc, Romulus Tetean, Emil Burzo, Magnetite nanoparticles for medical applications**, *AIP Conf. Proc.* (acceptat pentru publicare)
- [3]. **Gabriela Souca, Roxana Dudric, Cristian Iacovita, Alin Iulian Moldovan, Rares Stiufiuc, Romulus Tetean and Emil Burzo, Zn-doped Fe3O4 nanoparticles**, *J. Opt. Adv. Mat.* (trimisă spre publicare)
- [4]. Pasca S, **Tomuleasa C**, Teodorescu P, Ghiaur G, **Dima D**, Moisoiu V, Berce C, Stefan C, Ciechanover A, Einsele H. *KRAS/NRAS/BRAF Mutations as Potential Targets in Multiple Myeloma*. *Front Oncol.* 2019 Oct 24;9:1137. doi: 10.3389/fonc.2019.01137. **IF: 4.317, rank Q2.**
- [5]. Zimta AA, **Tomuleasa C**, Sahnoune I, Calin GA, **Berindan-Neagoe I. Long Non-coding RNAs in Myeloid Malignancies**. *Front Oncol.* 2019 Oct 18;9:1048. doi: 10.3389/fonc.2019.01048. **IF: 4.317, rank Q2.**
- [6]. Moisoiu V, Teodorescu P, Parajdi L, Pasca S, Zdreghea M, **Dima D**, Precup R, **Tomuleasa C**, Soverini S. *Assessing Measurable Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. BCR-ABL1 IS in the Avant-Garde of Molecular Hematology*. *Front Oncol.* 2019 Sep 23;9:863. doi: 10.3389/fonc.2019.00863. **IF: 4.317, rank Q2.**
- [7]. Dobrowolski J, Pasca S, Teodorescu P, Selicean C, Rus I, Zdreghea M, **Bojan A**, Trifa A, Fetica B, Petrushev B, Rosu AM, **Berindan-Neagoe I, Tomuleasa C, Dima D. Persistent Basophilia May Suggest an "Accelerated Phase" in the Evolution of CALR-**

*Positive Primary Myelofibrosis Toward Acute Myeloid Leukemia.* Front Oncol. 2019 Sep 6;9:872. doi: 10.3389/fonc.2019.00872.

**IF: 4.317, rank Q2.**

- [8]. Sas V, Moisoiu V, Teodorescu P, Tranca S, Pop L, Iluta S, Pasca S, Blag C, Man S, Roman A, Constantinescu C, Rus I, Buse M, Fetica B, Marian M, Selicean C, Berindan-Neagoe I, Petrushev B, Bumbea H, Tanase A, Zdrenghea M, Fuji S, Kitano S, Tomuleasa C; *Romanian-Japanese Working Group of the Romanian Society for Bone Marrow Transplantation. Approach to the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Patient.* J Clin Med. 2019 Aug 6;8(8). pii: E1175. doi: 10.3390/jcm8081175.

**IF: 5.688, rank Q1.**

- [9]. Constantinescu C, Bodolea C, Pasca S, Teodorescu P, Dima D, Rus I, Tat T, Achimas-Cadariu P, Tanase A, Tomuleasa C, Einsele H. *Clinical Approach to the Patient in Critical State Following Immunotherapy and/or Stem Cell Transplantation: Guideline for the On-Call Physician.* J Clin Med. 2019 Jun 20;8(6). pii: E884. doi: 10.3390/jcm8060884.

**IF: 5.688, rank Q1.**

- [10]. Sas V, Blag C, Zaharie G, Puscas E, Lisencu C, Andronic-Gorcea N, Pasca S, Petrushev B, Chis I, Marian M, Dima D, Teodorescu P, Iluta S, Zdrenghea M, Berindan-Neagoe I, Popa G, Man S, Colita A, Stefan C, Kojima S, Tomuleasa C. *Transient leukemia of Down syndrome.* Crit Rev Clin Lab Sci. 2019 Jun;56(4):247-259.

**IF: 4.817, rank Q1.**

- [11]. Bocsa CD, Moisoiu V, Stefanu A, Leopold LF, Leopold N, Fodor D (2019) *Knee osteoarthritis grading by resonant Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) analysis of synovial fluid.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 20. doi:10.1016/j.nano.2019.04.015

**IF 5.570, rank Q1- MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL**

- [12]. Stefanu A, Badarinza M, Moisoiu V, Iancu SD, Serban O, Leopold N, Fodor D (2019) *SERS-based liquid biopsy of saliva and serum from patients with Sjögren's syndrome.* Analytical and Bioanalytical Chemistry. doi:10.1007/s00216-019-01969-x

**IF 3.286, rank Q1- CHEMISTRY, ANALYTICAL**

- [13]. V. Moisoiu, A. Stefanu, S.D. Iancu, T. Moisoiu, L. Loga, L. Dican, C.D. Alecsa, I. Boros, A. Jurj, D. Dima, C. Bagacean, R. Tetean, E. Burzo, C. Tomuleasa, F. Elec, N. Leopold, *SERS assessment of the cancer-specific methylation pattern of genomic DNA. Towards the detection of acute myeloid leukemia in patients undergoing hematopoietic*

*stem cell transplantation*, Analytical and Bioanalytical Chemistry accepted for publication, 2019, DOI: 10.1007/s00216-019-02213-2.

**IF 3.286, rank Q1- CHEMISTRY, ANALYTICAL**

- [14]. S.D. Iancu, A. Stefancu, V. Moisoiu, L.F. Leopold, **N.Leopold**, *The role of Ag<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> adions in the SERS turn-on effect of anionic analytes*, Beilstein Journal of Nanotechnology, Manuscript ID: 17374642, accepted for publication, 2019

**IF 2.269, rank Q2-PHYSICS, APPLIED**

- [15]. A. Stefancu, S.D. Iancu, L.F. Leopold, **N. Leopold**, *Contribution of chemical interface damping to the shift of surface plasmon resonance energy of gold nanoparticles*, submitted to Romanian Reports in Physics, submitted manuscript, October 2019.

**IF 1.940, rank Q2-PHYSICS, MULTIDISCIPLINARY**

- [16]. **R Dudric, R Bortnic, G Souca, R Ciceo-Lucacel, R Stiufiuc, R Tetean**, *XPS on Nd<sub>0.6-x</sub>Bi<sub>x</sub>Sr<sub>0.4</sub>MnO<sub>3</sub> nano powders*, Applied Surface Science 487, 17-21 (2019)

**IF: 5.155 Q1**

- [17]. Dippong Thomas, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, **Deac Iosif-Grigore**, Diamandescu Lucian, Borodi Gheorghe, *Effect of Zn content on structural, morphological and magnetic behavior of Zn<sub>x</sub>Co<sub>1-x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites*, JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS, **792** (2019) 432-443.

- [18]. Dippong Thomas, Levei Erika Andrea, Cadar Oana, **Deac Iosif-Grigore**, Diamandescu Lucian, Barbu-Tudoran Lucian, *Effect of nickel content on structural, morphological and magnetic properties of Ni<sub>x</sub>Co<sub>1-x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites*, JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS, **786** (2019) 330-340.

- [19]. Dippong Thomas, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, **Deac Iosif-Grigore**, Goga Firuta, Borodi Gheorghe, Barbu-Tudoran Lucian, *Influence of polyol structure and molecular weight on the shape and properties of Ni<sub>0.5</sub>Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles obtained by sol-gel synthesis*, CERAMICS INTERNATIONAL, **45** (2019) 7458-7467.

- [20]. Thomas Dippong, Erika-Andrea Levei, **Iosif Grigore Deac**, Firuța Goga, Oana Cadar, *Investigation of structural and magnetic properties of Ni<sub>x</sub>Zn<sub>1-x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> (0 ≤ x ≤ 1) spinel-based nanocomposites*, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 144 (2019) 104713 (1-12).

Rezultatele științifice au fost diseminate și prin prezentarea acestora la 15 conferințe internaționale:

1. **N. Leopold**, A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, F. Elec, **C. Tomuleasa**, *Probing the methylation landscape of genomic DNA by SERS*, 17<sup>th</sup> Confocal Raman Imaging Symposium, September 28<sup>th</sup>–30<sup>th</sup>, 2019, Ulm, Germany, Book of Abstracts, page 56 (P)
2. **N. Leopold**, A. Stefancu, S.D. Iancu, V. Moisoiu, L.F. Leopold, *Specific and selective chemisorption of molecules to silver nanoparticles and SERS switch-on effect*, The seventh International Conference on Advanced Applied Raman Spectroscopy, 24<sup>th</sup>–25<sup>th</sup> June 2019, Oxford, United Kingdom, Book of Abstracts, page 66.
3. A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, **N. Leopold**, L.F. Leopold, *Detecting methylation landscape of genomic DNA by surface-enhanced Raman scattering*, The 18<sup>th</sup> International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 26<sup>th</sup>–28<sup>th</sup> September, 2019 Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 69.
4. **N. Leopold**, *Nanoparticle-based liquid biopsy of biofluids* - oral presentation, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation, 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> of November 2019, Imogen Research Centre, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 16.  
Oral presentation
5. V. Moisoiu, **N. Leopold**, A. Stefancu, S.D. Iancu, F. Elec, **C. Tomuleasa**, *Probing the methylation landscape of genomic DNA by SERS*, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation, 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> of November 2019, Imogen Research Centre, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 34.
6. A. Stefancu, V. Moisoiu, S.D. Iancu, **N. Leopold**, *Silver nanoparticles as albuminuria sensor*, Conference on Biomedical and Imaging Approaches in the Management of Atrial Fibrillation, 7<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> of November 2019, Imogen Research Centre, Cluj-Napoca, Romania, Book of Abstracts, page 33.
7. **R. Dudric**, **G. Souca**, **A. Szatmari**, **T. Szilard**, **S. Nitica**, **C. Iacoviță**, **A. I. Moldovan**, **R. Stiuftuc**, **R. Tetean**, **E. Burzo**, *Magnetite nanoparticles for medical applications*, Int. Conf TIM 19, Timișoara, Romania, poster
8. **R. Bortnic**, **R. Dudric**, **G. Souca**, R. Ciceo-Lucacel, **N. Leopold**, **I. Gr. Deac**, **R. Stiuftuc**, **R. Tetean**, *Physical properties of nanostructured  $Nd_{0.6-x}Bi_xSr_{0.4}MnO_3$  compounds*, IBWAP 2019, Iulie, Constanta, Romania, Oral Presentation
9. **R.A. Bortnic**, **Á. Szatmári**, **S. Tamás**, **G. Souca**, **R. Dudric**, **R. Stiuftuc**, **A. I. Moldovan**, **I.G. Deac**, **E. Burzo**, **R. Tetean**, *Physical Properties of Size and Shape Controlled  $CoFe_2O_4$  Nanoparticles for Biomedical Applications*, Collaborative Conference on Advanced Materials, august 2019, St. Julian, Malta, Oral Presentation

10. **T. Romulus, G. Stiuftuc, V. Toma, A. I. Moldovan, R. Stiuftuc**, *A new method for the synthesis of cyclodextrins capped gold nanoparticles*, 6<sup>th</sup> European Conference on Cyclodextrins, octombrie 2019, Santiago de Compostella, Spania-poster
11. **Rareș Ionuț Știuftuc, Valentin Toma, Romulus Tetean, Gabriela Fabiola Știuftuc, Vasile Chiș and Constantin Mihai Lucaci**, *The role of cyclodextrins in chiral separation of pharmaceutical compounds by means of SERS*, 6th European Conference on CycloDextrins, 2-4 Octombrie 2019, Santiago de Compostella, Spania, Oral Presentation.
12. **Gabriela Stiuftuc, Valentin Toma, Alin Moldovan, Cristian Moldovan, Cristian Iacovita, Stefan Nitica, Romulus Tetean, Constantin Mihai Lucaci and Rares Ionut Stiuftuc**, *Hybrid multifunctional nanosystems for drug delivery applications*, 6<sup>th</sup> NanoToday Conference, 16-20 Iunie 2019, Lisabon, Portugalia.
13. **Gabriela Fabiola Știuftuc, Valentin Toma, Ștefan Nițică, Alin Iulian Moldovan, Radu Mărginean, Constantin Mihai Lucaci, and Rareș Ionuț Știuftuc**, *Solid plasmonic substrates synthesized using TFF purified colloidal silver for cancer detection by means of SERS analysis of blood plasma*, American Chemical Society Conference, 25-29 August 2019, San Diego, USA, Oral Presentation
14. Thomas Dippong, **Iosif Grigore Deac**, *Magnetic properties of (Ni;Co)Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites*, 20th International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science IBWAP 2019 Constanta, 16-19 iulie, Oral Presentation
15. T. Dippong, R. Tetean, **Iosif G. Deac**, *Magnetic properties of (Ni;Zn;Co)Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites*, Collaborative Conference on Advanced Materials (CCAM 2019), 26-30 August, St. Julian, Malta, Oral Presentation

Plecând de la rezultatele obținute s-a investigat rolul expansiunii clonale în afecțiunile hematologice maligne, prin definirea rolului bazofilelor și al transcriptelor BCR-ABL, în colaborare cu University of Wurzburg, University of Bologna și Tehnion Institute of Technology – prof. Aaron Ciechanover, laureat al Premiului Nobel pentru Chimie în 2004.

Pentru dezvoltarea domeniului investigat s-au făcut două propuneri de proiecte de cercetare în programele ERC Synergy Grant 2020, Horizont 2000 și respectiv programul național PNCDI III, care să abordeze aspecte adiacente prezentului proiect.