

## Raport de activitate

privind implementarea proiectului **Cod PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0112, Nr.6/2018**

cu titlul:

### **Nanomateriale magnetoplasmonice multifuncționale pentru aplicații de tip point of care** *ianuarie 2021 – decembrie 2021, Faza unică 2021*

#### **Rezumat**

În cadrul proiectului au fost preparate nanostructuri miez-înveliș de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ . Au fost analizate structurile cristaline, forma și distribuția dimensiunilor nanoparticulelor precum și proprietățile magnetice și optice ale acestora. Ca urmare a acoperirii miezurile magnetice cu un înveliș de  $\text{SiO}_2$  și apoi aur s-au diminuat interacțiunile magnetice/dipolare dintre nanoparticule și astfel a rezultat o „ecranare” magnetică. Au fost evaluate capacitățile de amplificare a spectrelor Raman ale nanostructurilor, folosind drept analit molecule de Rodamină. Gradul de amplificare a fost de 40-50. Nanostructurile elaborate au fost funcționalizate cu aptameri anti-CD117 conjugați cu fluofoarul Cy3, pentru a investiga capacitatea acestora de a se lega de celulele care exprimă proteinele, pe suprafața lor. Folosind metoda SERS au fost analizați exozomii obținuți din diferite fluide în vederea dezvoltării unei metode rapide de diagnosticare a cancerului. Folosind tehnica de analiză SERS s-a studiat gradul de metilare al ADN-ului provenit de la celulele unor pacienți cu leucemie acută și respectiv tranzitorie, precum și pacienți cu recidiva SNC și respectiv în remisie. Rezultatele cercetărilor științifice efectuate în cadrul proiectului au fost publicate (sau acceptate spre publicare) în 19 lucrări în reviste cotate internațional (ISI) cu factori de impact importanți, 6 lucrări au fost prezentate la conferințe internaționale iar alte două la conferințe naționale.

#### **Plan de realizare pentru anul 2021, etapa a 4-a:**

***Izolarea magnetică a Tex, detecția și cuantificarea conținutului de exozomi în probele de ser. Activități prevăzute:***

**Act. 4.1** Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabile.

**Act. 4.2** Sinteza nanoparticulelor multifuncționale hibride având proprietăți dorite în vederea testării lor în practica clinică.

**Act. 4.3** Prepararea probelor de ser pentru izolarea și detecția Tex.

**Act. 4.4** Incubarea nanoparticulelor multifuncționale cu amestecuri de exozoni CD117 pozitiv și CD117 negativ și cuantificarea capacității senzorialice.

**Act. 4.5** Incubarea nanoparticulelor multifuncționale cu probe de ser de la pacienții AML și validarea conceptului în context clinic.

**Act. 4.6** Metode statistice multivariate

**Act. 4.7** Activități pentru obținere, validare și protejarea drepturilor de proprietate intelectuală și industrială.

**Act. 4.8** Diseminarea și alte activități privind vizibilitatea Act.

**Act. 4.9** Achiziția serviciilor de audit Act.

**Act. 4.10** Raportarea

#### **Act. 4.1 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabile**

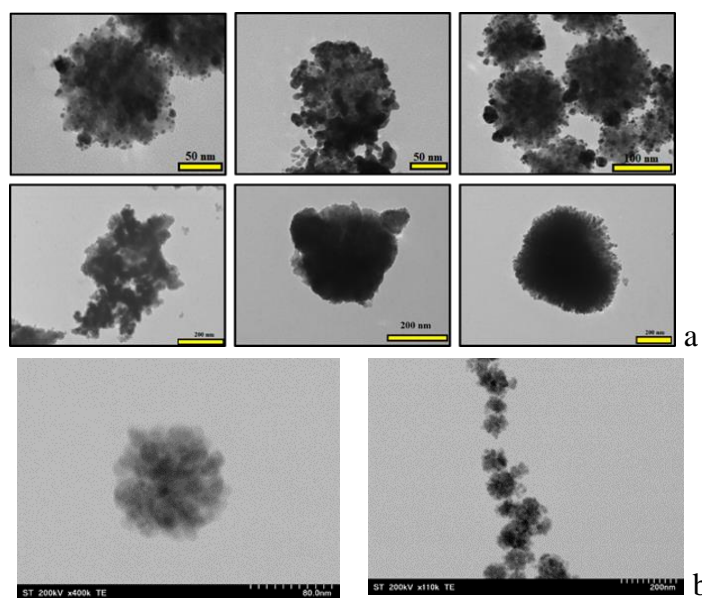
Pe parcursul anului 2021 au fost achiziționate chimicalele, obiectele de laborator precum și consumabilele necesare realizării fazei a 4-a a proiectului.

#### **Act. 4.2 Sinteza nanoparticulelor multifuncționale hibride având proprietăți dorite în vederea testării lor în practica clinică.**

În cadrul acestei faze au fost sintetizate și caracterizate proprietățile fizice a două serii de nanostructuri magneto-plasmonice de tip core-shell,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ , formate din nanoparticule magnetice (core), acoperite la suprafață cu un strat de oxid de siliciu (strat intermediar) și respectiv nanoparticule de aur (shell). Nanostructurile au fost analizate prin microscopie electronică în transmisie (TEM), măsurători magnetice, difracție de raze X și analiza vibrațională Raman. Un obiectiv important l-a constituit obținerea unor sisteme „izolate” magnetic în care interacțiunile magnetice/dipolare dintre particulele constituente să fie diminuate considerabil.

##### **4.2.1 Nanostructuri de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ și $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$**

Nanoparticulele (NPs) magnetice de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  au fost obținute prin procedeul hidrotermal, prezentat în fazele anterioare ale proiectului. La suprafața nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  s-a depus un strat de  $\text{SiO}_2$  iar ulterior au fost crescute nanoparticule de aur pe suprafața oxidului de siliciu. Figura 4.2.1 prezintă imaginile TEM a nanostructurilor astfel obținute, evidențiind omogenitatea decorării cu aur atât a nanostructurilor de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  precum și  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ .

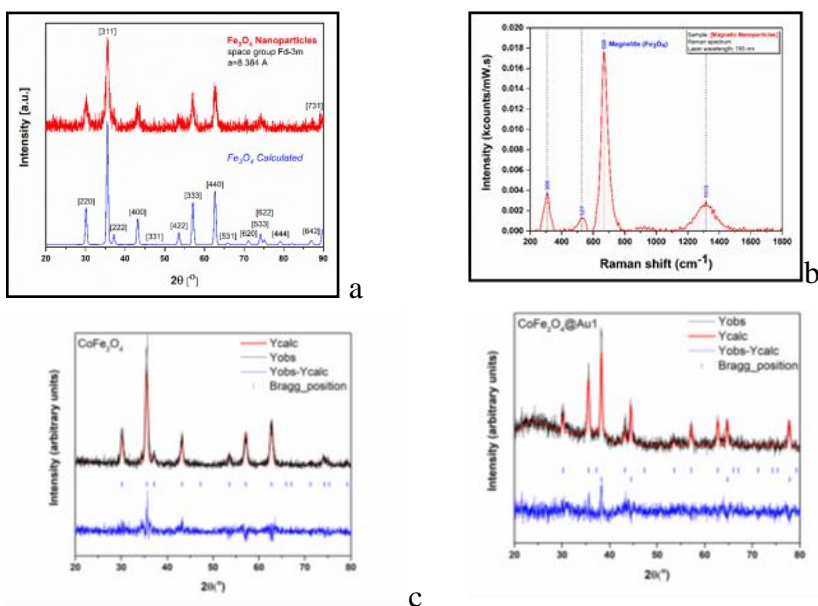


**Figura 4.2.1:** Nanostructuri magnetice având un miez magnetic de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) și  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ (b) cu înveliș de oxid de siliciu, decorate cu aur

Nanoparticulele au o formă cvasi-sferică, o polidispersivitate scăzută, având diametre medii cuprinse între 10 și 35 nm în cazul sistemului pe baza de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și ceva mai mari în cazul nanostructurilor de tip  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ - Figura 4.2.1.

Spectrele de difracție de raze X evidențiază prezența unei singure faze. În prima serie, parametrii de rețea determinați sunt aproape identici cu cei ai magnetitei-Fig.4.2.2a. Structura cristalină a fost confirmată și prin măsurători vibraționale Raman-Fig.4.2.2b. Prezența benzilor

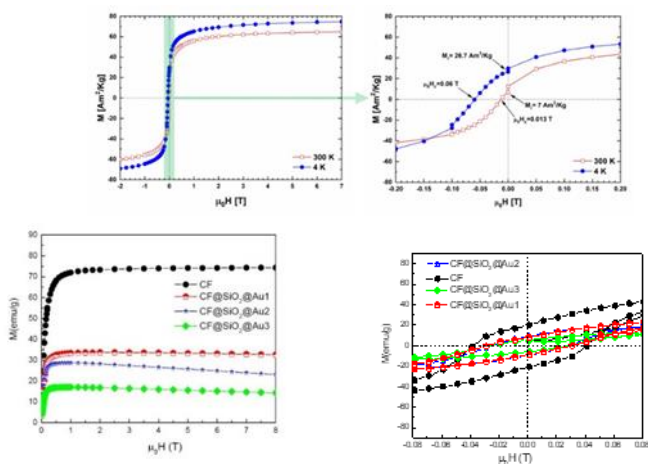
vibraționale, caracteristice  $Fe_3O_4$ , sunt o confirmare suplimentară a faptului că metodele de sinteză dezvoltate în cadrul proiectului permit obținerea unor nanostructuri de dimensiuni și forme controlabile.



**Figura 4.2.2 :** Difractogramele de raze X obținute pe nanoparticulele de  $Fe_3O_4$  sintetizate, precum și spectrul calculat (a). Spectrul Raman pe aceleași probe, obținut cu un laser excitator de 785 nm (b). Spectrele de raze X pentru sistemul  $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$  sunt redată în (c) și (d)

Spectrele de raze X ale nanocompozitelor  $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$  evidențiază prezența nanoparticulelor de  $CoFe_2O_4$  precum și ale celor de aur. Dimensiunile cristalitelor sunt în jur de 20 nm pentru  $CoFe_2O_4$  și respectiv 15-19 nm pentru cele din aur. Miezul magnetic are o structură cristalină cubică, de tip  $Fd\bar{3}m$ . Constantele de rețea ( $a=0.8374-0.8379$  nm) sunt apropiate de cele ale feritei de cobalt, în stare masivă și depind puțin de compoziția nanostructurii. Aurul cristalizează într-o rețea cubică având grupul spațial  $Fm\bar{3}m$ , parametrul de rețea fiind  $a=0.4074(1)$  nm.  $SiO_2$  se află în stare amorfă. Prezența acestuia poate fi evidențiată prin linia largă de la unghiuri de difracții mici,  $2\theta$ , situate între  $15^\circ$  și  $28^\circ$ .

Măsurătorile magnetice au fost efectuate la 4K și respectiv 300K, în câmpuri externe de până la 7 T- Fig. 4.2.3. Magnetizările la saturație ale nanocompozitelor  $Fe_3O_4@SiO_2@Au$  corespund cu cele ale continutului de magnetita din probă. Câmpurile coercitive ale nanoparticulelor, la temperatura mediului ambiant, sunt în jur de  $\mu_0H=0.013$  T- Fig. 4.2.3b.



**Figura 4.2.3:** Curbele de magnetizare la 4 K și respectiv 300 K ale unor nanoparticule magnetice de  $Fe_3O_4$  (a,b) și respectiv nanocompozite  $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$  (c,d).

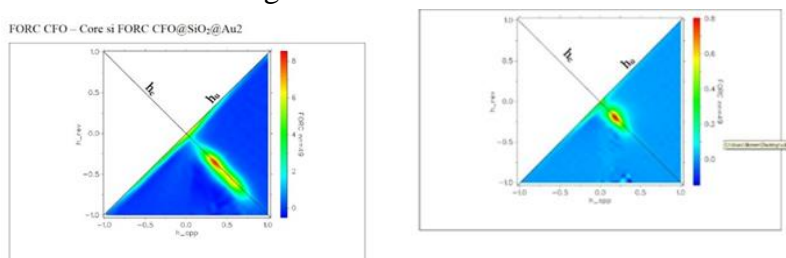
Analiza comportării magnetice a nanostructurilor de tip  $Fe_3O_4@SiO_2@Au$  și respectiv  $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$  a permis determinarea interacțiunilor dintre particule și astfel a gradului de “izolare” magnetică a acestora, rezultat al formării structurilor de tip core-shell. Referindu-ne la izotermele de magnetizare ale nanostructurilor de tip  $CoFe_2O_4@SiO_2@Au$ , magnetizarea  $CoFe_2O_4$  crește ușor cu câmpul magnetic, comportare caracteristică atât apropierei de saturație sau determinată de prezența unei componente magnetice de tip sticlă de spin, generată

de atomii de Fe aflați la suprafața nanoparticulelor, suprapusă peste o ordonare de tip ferimagnetic. Magnetizările nanostructurilor  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  descresc odată cu creșterea câmpului extern. Acest tip de comportare este o consecință a prezenței  $\text{SiO}_2$  și Au. Ambele componente prezintă o comportare de tip diamagnetic. Plecând de la compozițiile nanostructurilor,  $x\text{CoFe}_2\text{O}_4y\text{SiO}_2z\text{Au}$ , dependențele de compoziție și câmp ale magnetizărilor pot fi descrise prin relația:

$$M_{xyz} = xM_{\text{CoFe}_2\text{O}_4} - (y\chi_{\text{SiO}_2} + z\chi_{\text{Au}})H \quad (1)$$

Am notat prin  $M_{\text{CoFe}_2\text{O}_4}$  magnetizarea la saturație a feritei  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  iar prin  $\chi_{\text{SiO}_2}$  și  $\chi_{\text{Au}}$  valorile absolute ale susceptibilităților magnetice ale  $\text{SiO}_2$  și respectiv Au. Relația (1) descrie corect valorile magnetizărilor la saturație  $xM_{\text{CoFe}_2\text{O}_4}$  precum și dependențele de câmp ale acestora. Scăderea cu câmpul magnetic a magnetizărilor este mai mare decât cea așteptată dacă plecăm de la susceptibilitățile magnetice ale  $\text{SiO}_2$  și respectiv Au. Silica este un izolator și astfel susceptibilitatea magnetică nu este afectată de dimensiunea particulei. Prezența unui diamagnetism gigant în nanoparticulele de aur, este o consecință a curenților induși de câmp și a interacțiunilor cu electronii aflați la suprafața nanoparticulelor.

Câmpul coercitiv al nanostructurilor  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  scade pronunțat comparativ cu cel determinat în nanoparticulele de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , evidențiind efectul  $\text{SiO}_2$  și respectiv al aurului în “izolarea” magnetică-Fig.4.2.3d. Valorile câmpurilor coercitive, în nanostructurile investigate, au fost analizate pe baza diagramele FORC. Datele obținute în cazul probelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  și  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}_2$  sunt redată în spațiul  $h_u$ - $h_c$ -Fig.4.2.4. Valorile  $h_u$  descriu distribuția interacțiunilor (câmpurile de inversare) iar  $h_c$  distribuția câmpurilor coercitive (câmpurile de revenire), în coordonate reduse. Probele neacoperite prezintă două centre de distribuție ale corcivităților, la câmpuri aplicate reduse de 0.04 și 0.06. Adăugarea învelisului de  $\text{SiO}_2$  și Au a redus considerabil distribuția câmpurilor coercitive, maximul distribuției scăzând sub 0.02, contribuind astfel la “izolarea” magnetică a nanostructurilor.



**Figura.4.2.4.** Diagramele FORC pentru  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (a) și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}_2$  (b)

S-au studiat totodată și proprietățile fizice ale unor nanocompozite pe bază de ferite, cu înveliș de  $\text{SiO}_2$ , precum  $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ,  $\text{Zn}_{0.6}\text{Mn}_{0.4}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ , și respectiv  $\text{Sr}_2\text{Fe}_{1-x}\text{Ni}_x\text{MoO}_6$ . Rezultatele obținute sugerează posibilitatea acestor nanostructuri de a fi utilizate în cercetarea științifică

din domeniul medical.

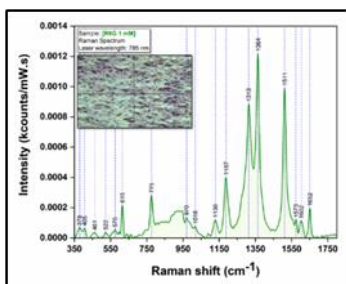
#### **Act.4.3 Prepararea probelor de ser pentru izolarea și detecția Tex.**

#### **Act. 4.4 Incubarea nanoparticulelor multifuncționale cu amestecuri de exozoni CD117 pozitiv și CD117 negativ și cuantificarea capacității senzoriciste.**

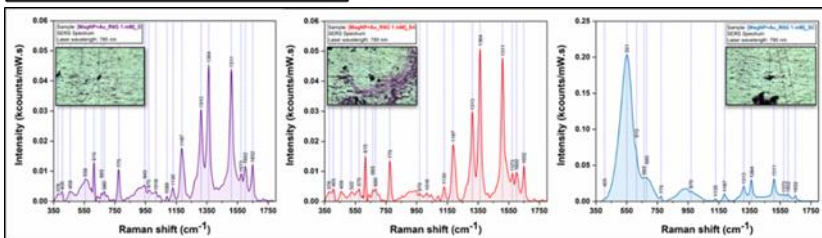
##### **4.3.1 Evaluarea capacității de amplificare a semnalului Raman de către nanostructurile magneto-plasmonice folosind un analit test (R6G)**

În vederea utilizării ca substrat plasmonic, nanostructurile multifuncționale de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  au fost analizate cu ajutorul tehnicii SERS pentru a evalua capacitatea lor de a amplifica semnalul Raman al unor analiți „standard” și anume molecula de Rodamină 6G (R6G), cu o concentrație de 1 mM. Acest analit test are o secțiune de împrăștiere Raman mare și este utilizat frecvent pentru testarea diferitelor substrat plasmonice. Într-o primă etapă a fost înregistrat spectrul Raman al analitului de interes (R6G). În Figura 4.3.1

prezentăm spectrul Raman al R6G iar în Figura 4.3.2 sunt redată spectrele SERS ale R6G, folosind ca substrat plasmonic diferite clase de nanostructuri magnetoplasmonice pe baza de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , sintetizate în cadrul proiectului. Gradul de amplificare EF a acestor sisteme a fost între 40 și 50.



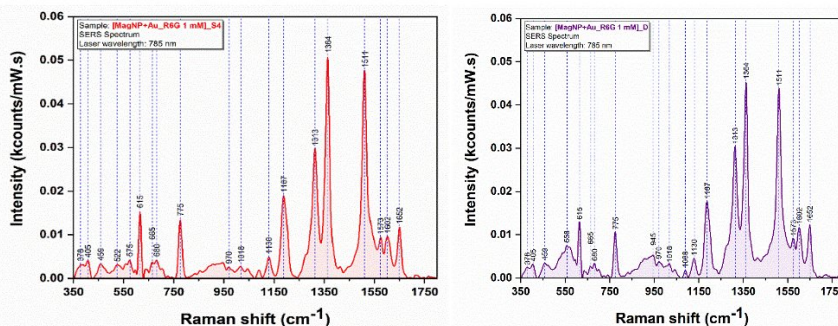
**Figura 4.3.1:** Spectrul Raman al R6G folosind un laser excitator de 785 nm



**Figura 4.3.2.** Spectrul SERS al R6G înregistrat pe diferite substrat plasmonice folosind un laser de 785 nm

Evaluarea proprietăților plasmonice ale nanostructurilor  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au$  s-a făcut de asemenea folosind tehnica SERS, utilizând ca și sursă de radiație excitatoare un laser din domeniul NIR (785 nm) iar ca analit molecula de Rodamină 6G (R6G). Spectrul Raman al moleculei R6G este similar cu cel relatat în literatura de specialitate, dominat de 3 peakuri intense localizate la 1319, 1364 respectiv 1511  $\text{cm}^{-1}$  - Fig.4.3.3. Aceste picuri sunt

atribuite unor vibrații de tip bending ale legăturii N-H ( $1310 \text{ cm}^{-1}$ ), respectiv ale unor vibrații de tip stretching ale legăturii C-C ( $1511 \text{ cm}^{-1}$  &  $1654 \text{ cm}^{-1}$ ). Dacă fiind reproductibilitatea spectrelor înregistrate, intensitatea benzilor vibraționale a fost reprezentată în unități de tip kcounts/(mW·s) care să poată furniza și informații cantitative.



**Figura 4.3.3.** Spectrele SERS pentru nanostructurile  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au1$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au2$ .

Spectrele SERS ale nanostructurilor de tip  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au$  reprezintă mediile obținute pentru 15 achiziții spectrale. Spectrele SERS pentru probele  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au1$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au2$  sunt redată Fig.4.3.3 iar pentru proba  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au4$  în Fig.4.3.4.

Spectrele SERS ale nanostructurilor magnetoplasmonice  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au1$  și respectiv  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au2$  sunt similare cu spectrul Raman al R6G, fiind dominate de benzile vibraționale menționate anterior. Factorul de amplificare calculat pentru aceste două clase de nanostructuri, EF este în jur de 40. Reproductibilitatea foarte ridicată a spectrelor constituie o dovadă a potențialului aplicativ al acestor nanostructuri hib

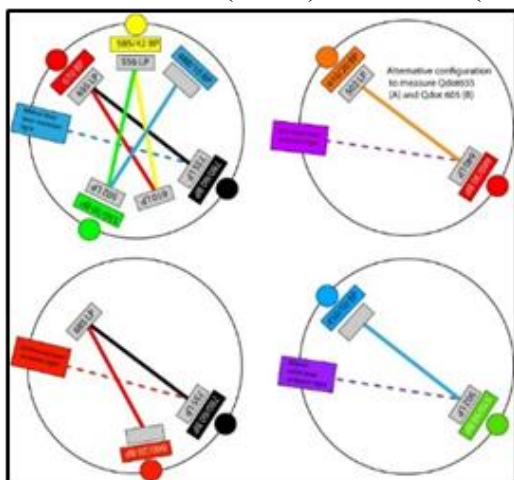
Rezultatele prezentate mai sus, evidențiază capacitatea nanostructurilor de tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@Au$  și  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2@Au$  de a amplifica semnalul Raman al unor analiți „standard” și anume molecula de Rodamina 6G (R6G).

#### 4.3.2 Utilizarea citometriei de flux pentru determinarea markerilor de suprafață CD117

În această etapă a proiectului s-a evaluat capacitatea celulelor de leucemie acută mieloidă DAMI (megacarioblaști) de a exprima pe suprafața membranelor, anticorpi anti-human CD117-APC. În acest scop, într-o primă etapă s-au cultivat celule DAMI (megacarioblasti umani) CRL-9792™, ATCC, în mediu de cultură RPMI 1640 Medium (Thermo Fischer) folosind următorii suplimentari: Penicilin-Streptomycin și Glutamin (Thermo Fischer). Concomitent s-au cultivat și celule LX-2, celule hepatice stelate (SCC064 de la Sigma-Aldrich) și LnCap, carcinom de prostată, (CRL-1740™, ATCC), după aceeași rețetă de cultivare ca și a celulelor DAMI, pentru 2 săptămâni, timp în care s-au efectuat patru pasaje. Liniile celulare LX-2 și LnCap au fost folosite ulterior ca și control negativ, rezultatele urmând să fie validate la Citometrul de flux.

Citometria de flux reprezintă o metodă versatilă în cercetarea din domeniul hematologiei și imunologiei, prin posibilitatea diagnosticării eficiente și ultra-rapide a cazuisticii clinice. Această tehnică relativ nouă (ultimul deceniu) constă în bombardarea particulelor de interes (celulele în cazul nostru) cu o radiație laser excitatoare urmată de înregistrarea radiației electromagnetice emise de aceste particule corespunzătoare fluoroforului cu care au fost inițial marcate (după cum se poate observa și pe siteul *life-sciences/flow-cytometry*).

Pentru analiza probelor s-a utilizat citometrul de flux de tip BD FACS Canto II (Becton Dickinson, USA), cu o configurație de 3 lasere: 20 mW argon în stare solidă, la 488 nm (blue), 17 mW neon-helium (NeHe), la 633 nm (red) și laserul violet la 405 nm (Figura 4.3.6).



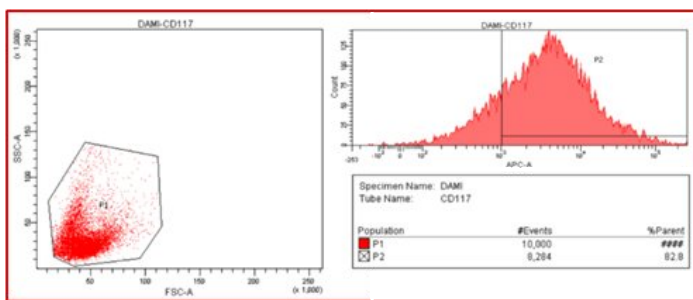
**Figura 4.3.6.** Disponerea laserelor la citometru de flux BD FACS Canto II

În vederea obținerii unor rezultate calitative am verificat sensibilitatea citometrului folosind calibrări specifice și am utilizat un protocol dedicat metodei de colorare cu anticorpi monoclonali conjugați cu diferiți fluorocromi ai celulelor.

*Pregătirea celulelor în vederea analizei cu Citometrul de flux a urmat etapele:*

1. După cultivarea celulelor în flask-uri, acestea au fost spălate și centrifugate. Aproximativ 100.000 celule au fost marcate cu anticorpii anti CD117-APC. La un volum de 50  $\mu$ L de suspensie celulară s-au adăugat 3  $\mu$ L de anticorp anti CD117-APC și au fost lăsate la incubat la întuneric timp de 15 min.
2. Celulele marcate au fost spălate cu 1 mL de PBS 1X și s-au resuspendat în 400  $\mu$ L de PBS 1X cu PI (iodură de propidiu (colorant care indică viabilitatea celulară)).
3. Suspensia rezultată a fost analizată la Citometrul în flux BD FACS Canto II. Citometrul a fost setat să capteze radiația emisă de fluoroforul APC (FL-5) în urma excitării acestuia cu radiația de 633 nm provenită de la un laser monocrom. În această fază au fost examinate 10.000 celule din fiecare linie (DAMI, LX2 și LNCAP).

În urma măsurătorilor a rezultat că linia celulară DAMI este pozitivă la CD117-APC iar celelalte 2 linii celulare nu au prezentat acest marker de suprafață. Rezultatele analizelor noastre au fost ulterior procesate cu ajutorul unei platforme software dedicate BD FACSDiva 8.0, care permite vizualizarea intensității fluorescențelor. Vom prezenta în cele ce urmează rezultatele obținute în urma achizițiilor efectuate cu ajutorul BD FACS Canto II, în cadrul Laboratorului de Medicină Translațională, MedFuture, UMF Cluj-Napoca.

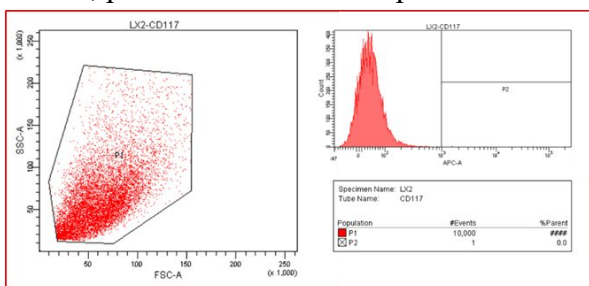


**Figura 4.3.7.** Rezultatele analizei prin citometrie de flux a liniei celulare DAMI.

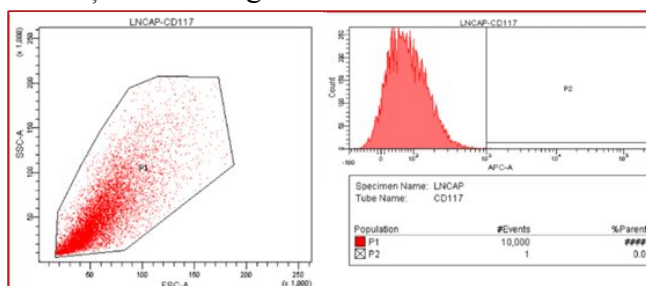
După cum se observă în Figura 4.3.7, populațiile P1, care corespund celulelor megacrioblastice Dami, sunt pozitive, în proporție de 82,8% la CD 117, un marker specific pentru progenitori limfoizi timpurii precum și celule non-hematopoietice.

Din cele 10.000 de evenimente (celule) înregistrate de Citometrul de flux, din

linia LX-2 (Fig.4.3.8), se observă cu certitudine de 100%, că acestea sunt negative la anticorpus anti CD 117, putând fi folosite în experimentele viitoare ca și control negativ.



**Figura 4.3.8.** Rezultatele analizei prin citometrie de flux a liniei celulare LX2.



**Figura 4.3.9.** Rezultatele analizei prin citometrie de flux a liniei celulare LnCap.

Linia LnCap se poate folosi de asemenea în experimente ca fiind negativă la marcarea cu CD 117, celulele ne reprezentând markeri membranari de suprafață pentru anticorpus amintit mai sus. Din 10.000 de evenimente înregistrate, toate s-au dovedit negative la colorarea cu CD117-Fig. 4.3.9.

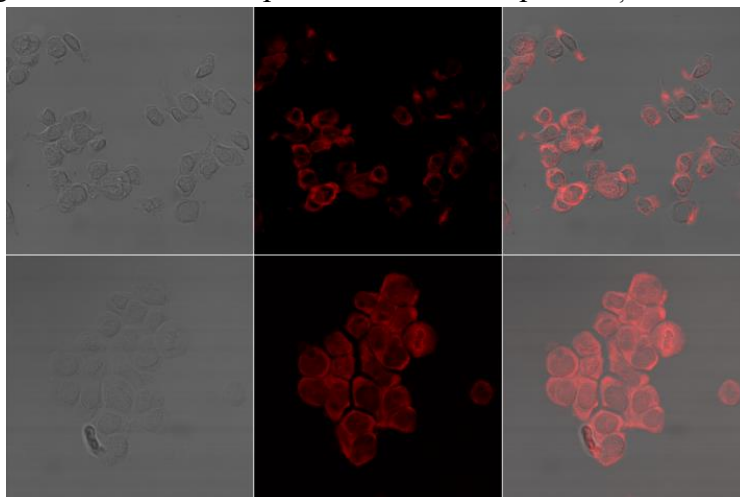
### 4.3.3 Funcționalizarea nanoparticulelor magnetice cu aptameri capabili să recunoască proteinele CD117 în vederea utilizării lor pentru separare magnetică.

Nanostructurile magnetice au fost funcționalizate cu aptameri anti-CD117 conjugați cu fluoroforul Cy3 pentru a investiga capacitatea acestora de a se lega de celulele care exprimă proteinele CD117 pe suprafața lor. Ca un prim pas, a fost stabilirea concentrației optime de aptamer anti-CD117 conjugat cu Cy3 pentru marcarea celulelor astfel încât fluorescența acestuia să fie detectabilă. Aceste experimente s-au realizat prin studii *in vitro* pe liniile celulare de leucemie cu ajutorul microscopiei confocale de fluorescență. Având în vedere că dintre liniile celulare investigate, doar linia celulară DAMI exprimă CD117, majoritatea acestor determinări s-au realizat folosind această linie celulară.

Pentru a evalua concentrația potrivită de molecule de aptamer anti-CD117 pentru marcarea fluorescentă a liniei celulare DAMI, un număr de  $10^4$  celule/godeu au fost însămânțate pe un chamberslide. Astfel, după 24 h de la însămânțare, mediul celular s-a îndepărtat și peste celule s-au adăugat diferite soluții de mediu cu următoare concentrații de aptamer anti-CD117 conjugat cu Cy3:  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$  și  $10^{15}$  molecule/ $\mu$ l. După o perioadă de incubare de aproximativ 4h, celulele au fost fixate cu PFA 4% și apoi lama a fost montată pentru analiza fluorescenței la microscopul confocal Olympus FLUOVIEW FV1200. Achiziția imaginilor (Fig. 4.3.10) s-a realizat cu ajutorul obiectivului UPLSAPO40  $\times$  2 (0.95 NA) și prin intermediul software-ului FV10-ASW 4.2, iar apoi procesate cu ajutorul software-ului ImageJ.

La concentrații mai mici, respectiv de  $10^9$  și  $10^{11}$  molecule, nu s-a putut detecta fluorescența. Mai mult, intensitatea fluorescenței la o concentrație de  $10^{13}$  molecule aptamer a fost de aproximativ jumătate față de concentrația de  $10^{15}$  molecule, care s-a dovedit a fi cea optimă pentru studiile

ulterioare. Aceste concentrații de aptamer au fost mai apoi utilizate pentru funcționalizarea nanoparticulelor magnetice utilizate în separarea exozomilor proveniți de la celulele de leucemie.



**Figura 4.3.10.** Linia celulară DAMI incubată  $10^{15}$  molecule de aptamerul anti-CD117 - Cy3

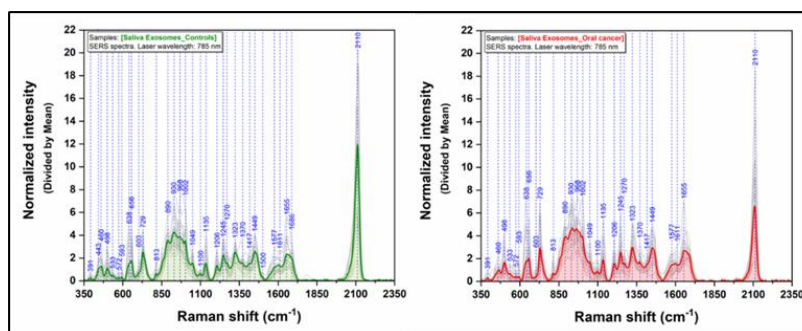
#### **Act. 4.4 Incubarea nanoparticulelor multifuncționale cu amestecuri de exozoni CD117 pozitiv și CD117 negativ și cuantificarea capabilității senzorialice.**

##### **4.4.1 Analiza SERS a exozomilor**

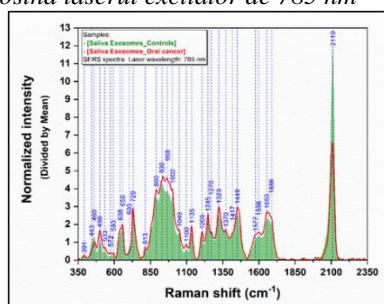
Unul dintre cele mai importante obiective ale proiectului îl reprezintă analiza prin metoda SERS a exozomilor obținuți din diferite biofluide în vederea dezvoltării unei metode rapide de diagnostic a cancerului. Mai precis dorim să utilizăm analiza multivariată a spectrelor SERS colectate pe exozomi extrași din biofluide provenite de la pacienți cu cancer, respectiv de la donatori sănătoși în vederea diagnosticării timpurii a cancerului.

*Exozomii* sunt vezicule de dimensiuni nanometrice secretate de diferite tipuri de celule. Ele înglobează, la suprafața și în interiorul lor, diferite biomolecule specifice tipului de celule care i-a produs și care conțin atât informații biologice (proteine – integrine, imunoglobuline, factori de creștere, etc) cât și genetice (acizi nucleici – mRNA, miRNA, tRNA, etc). Exozomii au dimensiuni cuprinse între 30 și 150 nm și sunt înveliți într-o membrană bi-lipidică reflectând astfel originea lor din compartimentele endocitare intracelulare. Exozomii sunt secretați prin exocitoză de o mare varietate de celule, inclusiv celulele canceroase. Ulterior ei sunt capabili să comunice cu celulele țintă prin intermediul proteinelor de semnalizare de la suprafață, sau prin transferul de lipide, acizi nucleici sau alte biomolecule. Această comunicare intercelulară mediată de exozomi joacă un rol extrem de important în reglarea proceselor celulare și fiziologice. Activitățile exozomilor influențează răspunsurile imune, proliferarea celulară și semnalizarea neuronală. Exozomii influențează și ARN-ul din celulele țintă datorită transferului de biomolecule care sunt capabile să moduleze activ aceste ARN-uri.





**Figura 4.4.1.** Spectrele SERS ale probelor exozomale provenite de la donatori sănătoși respectiv de la pacienți cu cancer, folosind laserul excitator de 785 nm



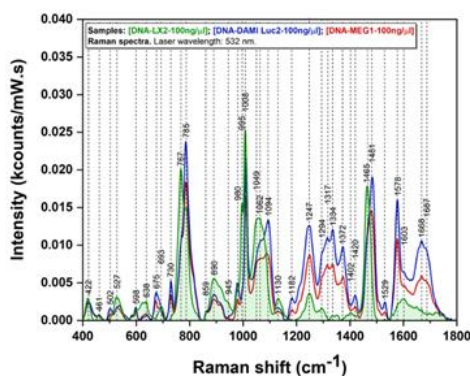
**Figura 4.4.2.** Media spectrelor SERS ale probelor exozomale provenite de donatori sănătoși (verde) respectiv de la pacienți cu cancer (rosu), folosind linia laser de 785 nm

În cadrul proiectului am analizat prin SERS un număr de 20 de probe de exozomi extrași din biofluide provenite de la pacienți diagnosticați cu cancer. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor obținute au fost colectați exozomi și din biofluide prelevate de la donatorii sănătoși. În Figura 4.4.1 redăm spectrele brute ale celor 2 categorii de exozomi (control respectiv cancer). Pentru a pune în evidență posibilele diferențe spectrale care pot să apară între cele 2 categorii de probe am suprapus în același tablou spectral doar mediile spectrale ale spectrelor individuale (Fig. 4.4.2). Mediile probelor de cancer sunt reprezentate în roșu respectiv ale celor de control în verde.

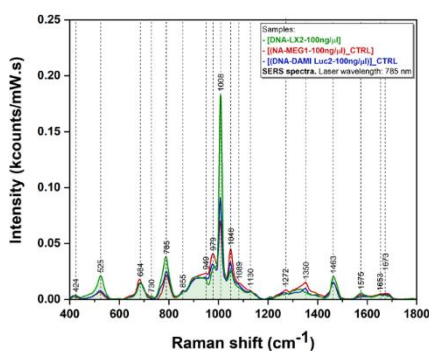
Pentru a putea înțelege diferențele spectrale care au fost identificate în spectrele SERS ale exozomilor colectați de la pacienții cu cancer respectiv de la donatorii sănătoși și ținând cont de faptul că literatura de specialitate indică faptul că exozomii conțin în interiorul lor o mare cantitate de acizi nucleici, am inclus în cadrul acestui proiect un studiu care a vizat analiza SERS a probelor de ADN colectate de la 3 linii celulare distincte.

#### **4.4.2 Investigarea la scară nanometrică a demetilării ADN-ului în celulele leucemice folosind spectroscopia vibrațională ultrasensibilă**

În cadrul acestui studiu am analizat prin tehnica Raman/SERS probe de ADN colectate de la 3 linii celulare (DAMI Luc2, MEG 01 și LX2) în vederea evaluării gradului de demetilare a probelor de ADN colectate. Liniile celulare DAMI și MEG 01 au fost izolate de la pacienți diagnosticați cu leucemie în timp ce linia LX2 este o linie celulară normală. Folosind un protocol de extracție a ADN-ului genomic, au fost izolate și purificate probe de ADN având concentrații de aproximativ 100 ng/μL. Purity acestora a fost evaluată cu ajutorul tehnicii NanoDrop folosind un sistem NanoDrop 2000c. Totodată a fost investigat și efectul pe care tratamentul cu un agent farmaceutic demetilant (5-Azacidina – 5-AzaC), utilizat frecvent în tratamentul pacienților diagnosticați cu leucemie, îl are asupra modificărilor epigenetice ale ADN-ului. Acest agent terapeutic a fost testat in-vitro pe cele două linii celulare leucemice.



**Figura 4.4.3.** Spectrele Raman ale probelor de ADN genomic extrase de la cele 3 linii celulare (LX2 – verde, DAMI – albastre, MEG - rosu) folosind o radiație excitatoare de 532 nm



**Figura 4.4.4** Spectrele SERS ale probelor de ADN genomic izolate de la cele 3 linii celulare (LX2 – verde, DAMI – albastru si MEG - rosu). S-a utilizat un laser de 785 nm

utilizată pentru denaturarea ADN-ului în analiza Real Time PCR (RT-PCR). Astfel, probele de ADN genomic au fost încălzite la o temperatură de 94<sup>0</sup>C timp de 4 minute, împreună cu soluția coloidală de Ag. În acest fel ADN-ul dublu catenar a devenit monocatenar, atașându-se de suprafața NP de Ag. În figura 4.4.4 sunt prezentate spectrele SERS ale celor 3 probe de ADN. Datorită tratamentului termic la care ADN-ul genomic a fost supus, spectrele sunt dominate de peak-ul de la 1008 cm<sup>-1</sup> care poate fi atribuit 5 metil citozinei.

#### **Act. 4.5 Incubarea nanoparticulelor multifuncționale cu probe de ser de la pacienții AML și validarea conceptului în context clinic.**

#### **Act. 4.6 Metode statistice multivariate**

Acest studiu pornește de la ipoteza conform căreia există un grad de hipometilare al ADN-ului în afecțiunile maligne. Prin tehnica de analiză SERS am studiat gradul de metilare al ADN-ului provenit din celulele aparținând probelor de aspirat medular ale pacienților cu leucemie acută asociată cu trisomia 21 (sindrom Down – SD) (LA-SD) și cu leucemie tranzitorie asociată SD (TL-DS) și am evaluat dacă există diferențe semnificative între acestea cu scopul de a identifica modificări ce stau la baza progresiei pas cu pas din faza de leucemie tranzitorie spre leucemie acută din SD.

Faptul că ADN-ul din celulele AL-DS este hipometilat în comparație cu ADN-ul din celulele TL-DS reprezintă o oportunitate pentru a demonstra potențialul SERS în evaluarea peisajului global de metilare. În urma acestui studiu s-a evidențiat un grad redus de metilare al ADN-ului celulelor din

Într-o primă fază a fost stabilită doza IC50 cu care au fost tratate cele două linii celulare. Valorile lor au fost 690 nM pentru linia DAMI respectiv 1604 nM pentru linia MEG 01. Și în acest caz ADN-ul genomic a fost izolat și purificat atât înainte precum și după tratamentul cu 5-AzaC. În Figura 4.4.3 sunt reprezentate spectrele Raman ale probelor de ADN izolate de la cele 3 linii celulare studiate.

Spectrul Raman al probelor de ADN genomic colectat de la celulele canceroase este spectroscopic mai bogat în comparație cu spectrul Raman al ADN-ului normal. Benzile vibraționale asociate bazelor azotate ale ADN-ului sunt dominante în toate cele 3 spectre. Diferențele spectrale apărute pot fi explicate doar dacă se ia în calcul geometria diferită de agregare a ADN-ului normal în raport cu cel canceros. Cel mai important indiciu al unei geometrii diferite de agregare este reprezentat de banda vibrațională de la 1094 cm<sup>-1</sup> atribuită grupării fosfatice.

În vederea evaluării gradului de demetilare a ADN-ului genomic au fost efectuate măsurători SERS pe probe de ADN tratate termic într-o manieră similară cu cea

aspiratul medular aparținând pacienților cu LA-SD față de cei cu TL-DS, sugerând existența unui proces de reducere a gradului de metilare al ADN-ului pe măsură ce celulele progresează dintr-o fază preleucemică spre leucemie acută. Acest aspect a fost observat și în cazul pacienților cu leucemie acută mieloidă și neoplazie mieloproliferativă, considerată o fază preleucemică și care nu asociază SD.

În acest studiu evidențiem faptul că analiza împrăștierii Raman SERS surprinde hipometilarea relativă a ADN-ului de la pacienții cu leucemie acută asociată cu sindromul Down (AL-DS), în comparație cu pacienții diagnosticați cu leucemie tranzitorie asociată cu sindromul Down (TL-DS), o informație dedusă din spectre SERS pe baza benzii de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei. Analiza ROC (Receiver Operating Characteristics) a ariei benzii SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  prezintă o valoare a ariei de sub curbă (AUC) de 0.77 la diferențierea între grupurile AL-DS și TL-DS. În plus, ADN-ul de la pacienții cu neoplasm mieloproliferativ non-DS (non-DS-MPN) este hipometilat în comparație cu non-DS-AL, aria de sub banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$  prezentând o valoare AUC de 0.78 în discriminarea dintre non-DS-MPN și non-DS-AL. În general, aria benzii marker SERS ADN de  $1005\text{ cm}^{-1}$  indică o scădere treptată a metilării globale a ADN-ului pe măsură ce celulele progresează de la o pre-leucemie la o leucemie acută, evidențiind astfel potențialul metodei SERS ca un metodă emergentă de analiză a gradului de metilare a ADN-ului în contextul genezei și progresiei leucemiei.

Metilarea ADN-ului (împreună cu alte modificări epigenetice) este un factor cheie care contribuie la rezistența celulelor canceroase la orice formă de tratament. Într-adevăr, dovezi tot mai mari sugerează că schimbările epigenetice orchestrează plasticitatea fenotipică care permite celulelor canceroase să scape practic de orice formă de tratament, fie că este vorba de chimioterapie, radioterapie, chirurgie sau imunoterapie. Astfel, se crede că o mai bună înțelegere a mecanismelor epigenetice din spatele debutului și progresiei cancerului este esențială pentru dezvoltarea de noi strategii de tratament a cancerului. Cu toate acestea, încă lipsesc modalități eficiente de a studia acest peisaj de metilare aberant.

Împrăștirea Raman SERS este o tehnică de spectroscopie moleculară care utilizează nanosubstrate metalice pentru amplificarea semnalului Raman al moleculelor. Un proces cheie în amplificarea semnalului Raman este adsorbția (fizică sau chimică) a moleculei pe suprafața metalului. Având în vedere că peisajul unic de metilare al ADN-ului cancerului a fost descris recent, pentru a determina auto-asamblarea preferențială pe suprafețe metalice, ne-am gândit că acest fenomen poate fi exploatat pentru analiza peisajului de metilare ADN asociat cancerului pe baza SERS. Pornind de la această ipoteză, am demonstrat recent că spectrele SERS ale ADN-ului de la pacienții cu leucemie acută (AL) prezintă o intensitate scăzută în banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei în comparație cu ADN-ul subiecților de control, permițând o diferențiere rapidă și eficientă între cele două grupuri. Rezultatele au sugerat că analiza SERS surprinde hipometilarea globală a ADN-ului canceros, una dintre primele schimbări epigenetice specifice cancerului descrise încă din 1983.

Din câte se cunoaste, în cazul ADN-ului genomic, metilarea este singura modificare epigenetică care poate fi detectată prin SERS. Alte modificări epigenetice ale bazelor ADN descrise anterior în cancer (acetilare, hidroximetilare etc.) au fost raportate numai pentru bazele ADN sintetice. Pe baza acestor rezultate, ne-am concentrat în acest studiu pe pacienții cu sindrom Down (DS) diagnosticați cu leucemie acută [denumită leucemie acută asociată cu SD (AL-DS)]. Am ales această patologie deoarece s-a demonstrat că ADN-ul pacienților cu AL-DS prezintă o hipometilare globală caracteristică, fiind astfel ideal pentru a pune în evidență potențialul metodei SERS în evaluarea peisajului de metilare ADN. Pentru comparație, am analizat pacienții cu DS care au

dezvoltat o formă de pre-leucemie numită leucemie tranzitorie asociată cu DS (TL-DS), o entitate despre care s-a demonstrat anterior că prezintă ADN hipermetilat. Faptul că ADN-ul din celulele AL-DS este hipometilat în comparație cu ADN-ul din celulele TL-DS reprezintă o oportunitate excelentă pentru a demonstra potențialul SERS în evaluarea peisajului global de metilare.

În plus, am fost, de asemenea, interesați de diferențele spectrale SERS între condițiile pre-leucemice și leucemice în afara cadrului DS. În acest scop, am inclus în analiza noastră pacienți cu neoplasme mieloproliferative (MPN), care este o formă bine caracterizată de pre-leucemie, precum și pacienți cu AL. Pentru a le distinge de pacienții cu DS, am numit aceste grupuri ca non-DS-MPN și, respectiv, non-DS-AL.

În prezentarea activităților prevăzute în **Act.5**, includem și metodele statistice multivariante folosite în analiza datelor, în planul de realizare această acțiune fiind inclusă la poziția **Act.6**.

#### **4.5.2 Materiale și metode**

##### **4.5.2.1 Extracția ADN.**

În acest studiu au fost incluși 8 pacienți cu LA-SD, 8 pacienți cu TL-DS, 9 pacienți cu MPN-nonSD (neoplazie mieloproliferativă) și 5 pacienți cu LA-nonSD. Studiul a fost aprobat de Comisia pentru Studii Clinice din cadrul Institutului Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, România. Lamele colorate conținând ADN din aspiratul medular al pacienților incluși în studiu, au fost tratate cu 10  $\mu$ l soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) și s-au raclat. Materialul obținut de pe fiecare lamă a fost transferat într-un tub cu 190  $\mu$ l PBS și s-a folosit pentru extracția ADN-ului kitul Qiagen DNA Blood Mini Kit, respectând protocolul prevăzut de producător cu câteva mici modificări. Inițial s-a adăugat 20  $\mu$ l de RNase R (Purelink, ThermoScientific), apoi proba a fost incubată la 56°C pentru 30 de minute (în loc de 10 minute), iar la final ADN-ul a fost separat în 40  $\mu$ l soluție AE tampon. Probele ADN au fost cuantificate utilizând NanoDrop (ThermoScientific), proba având o concentrație de 1.4 ng/ $\mu$ l și 16.8ng/ $\mu$ l, cu raport 260/280 între 1.99-6.61.

##### **4.5.2.2 Analiza SERS.**

Pentru analiza SERS a ADN-ului, s-au folosit nanoparticule de argint sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină, procedeu descris anterior (Leopold and Lendl 2003). Astfel, 17 mg de AgNO<sub>3</sub> au fost dizolvați în 90 de ml de apă ultrapură (Millipore) sub agitare. Separat, 17 mg de clorhidrat de hidroxilamină au fost dizolvați în 8.8 ml de apă ultrapură urmat de adăugarea a 1.2 mL de NaOH 1%, la soluția de hidroxilamină. În final, acest amestec a fost adăugat rapid, sub agitare în soluția de AgNO<sub>3</sub>, sinteza de AgNPs fiind indicată prin modificarea imediată a culorii în galben-brun. Soluția coloidală de argint a fost stocată la temperatura mediului ambiant. Toate materialele au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich.

Pentru prepararea probelor, 2 ml de AgNPs au fost spălați prin centrifugare timp de 15 min la 7300g și resuspendați în 2ml apă ultrapură. 8  $\mu$ L de AgNPs au fost amestecați cu 2  $\mu$ L din ADN-ul extras și 0.5  $\mu$ L de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (concentrație finală  $5 \times 10^{-4}$  M). Amestecul a fost omogenizat pentru 30 s pentru a asigura adsorbția ADN-ului pe suprafața AgNPs și apoi 5  $\mu$ l din acest amestec au fost plasați pe o folie de aluminiu acoperind o lamă de microscop pentru analiza SERS.

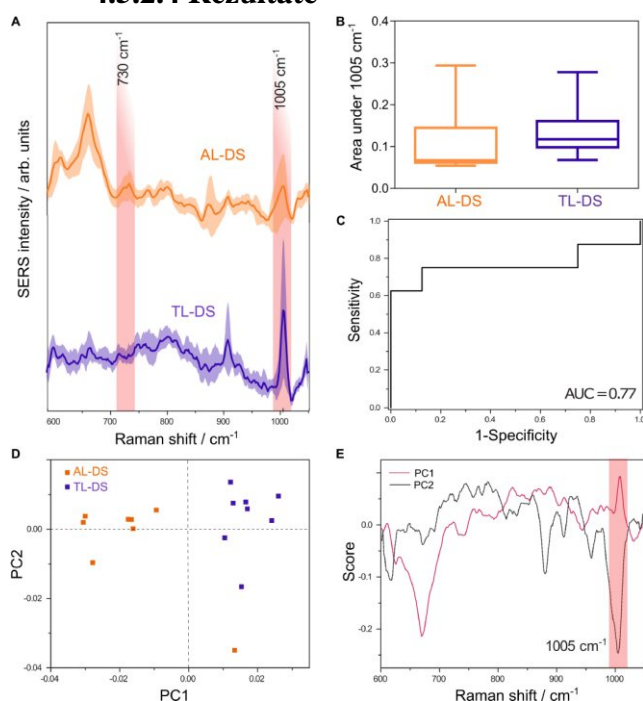
Toate măsurătorile SERS au fost făcute cu probe sub formă de picături lichide, cu același lot de nanoparticule. Pentru achiziția spectrului SERS al ADN-ului a fost folosit spectrometrul InVia Raman (Renishaw) și un laser Nd:YAG cu dublă frecvență și emisie la 532 nm și care a fost focalizat la picăturile lichide printr-un obiectiv 5X(Leica, NA 0.12). Puterea fascicului laser, la nivelul probei a fost de aprox. 25 mW. Pentru fiecare măsurătoare s-a calculat media analizelor, fiecare analiză având o durată de 40 s.

### Act. 4.6 și 4.5.2.3 Analiza statistică.

PCA (principal component analysis) constituie o tehnică multivariată, care reduce dimensiunea setului de date, prevenind în același timp pierderea informațiilor. PCA furnizează un set de scoruri (reprezentare grafică) și vectorii componentelor principale corespunzătoare (grafice de încărcare). Graficele de încărcare evidențiază benzile SERS care au o variație semnificativă în setul de date. PCA a fost efectuat utilizând The Unscrambler X (Camo Software).

Pentru analiza univariată, zona situată sub benzile SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  a fost evaluată folosind software-ul MATLAB R2019. Software-ul D'Agostino & Pearson a fost utilizat pentru efectuarea testului de normalitate a datelor. Diferența dintre medii a fost analizată prin testul T student (pentru distribuția parametrică) și Mann-Whitney U test (pentru distribuția non-parametrică), urmat de analiza ROC (receiver operating characteristic). Pentru toate analizele statistice, datele din fundal au fost eliminate din spectrale neprelucrate SERS prin aplicarea unei transformări lineare urmată de normalizarea în zona unitară.

#### 4.5.2.4 Rezultate



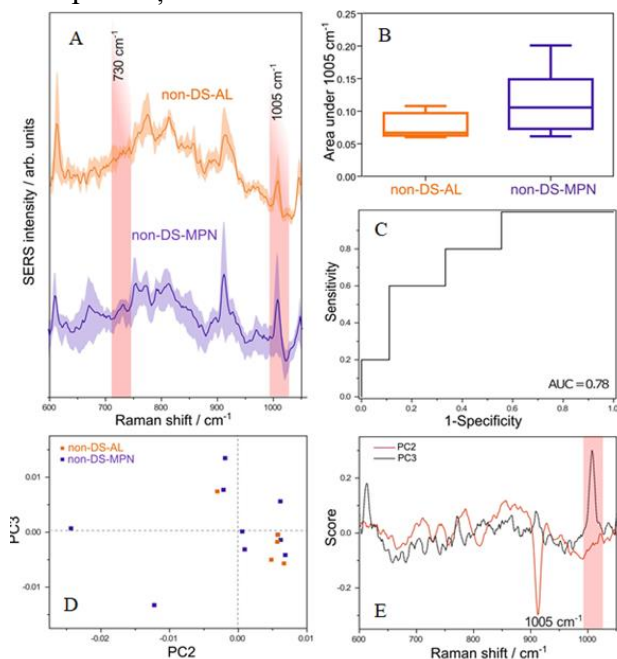
**Figura 4.5.1.** A) Media spectrelor SERS al ADN-ului de la pacienți cu LA-SD și TL-DS. B) Aria medie sub banda SERS  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei. C) Curba ROC de diferențiere între LA-SD și TL-DS, cu AUC 0.77 ( $p=0.07$ ). D) Reprezentare grafică a PC1 și PC2 rezultate din analiza PCA a spectrelor SERS rezultate din ADN-ului de la pacienți cu LA-SD și TL-DS. E) Graficele tip loadings corespunzătoare PC1 și PC2.

calculat ROC, rezultând AUC (area under the curve) de 0.77 ( $p=0.07$ ), Figura 4.5.1C.

Analiza PCA a spectrelor SERS evidențiază o distribuție sub formă de clustere nesupervizate, a celor două grupuri de pacienți LA-SD respectiv TL-DS. Cea mai bună separare între cele două grupuri a fost realizată pe baza PC1 și PC2 (Fig.4.5.1D). Analiza vizuală în detaliu al graficului de încărcare PC1 evidențiază faptul ca banda de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  este intens pozitivă (Figura 4.5.1E) ceea ce înseamnă că această bandă contribuie semnificativ la separarea celor două grupuri de pacienți.

Media spectrelor SERS ale ADN-ului de la pacienții cu LA-SD și TL-DS cuprinse între  $600\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$  sunt reprezentate în Figura 4.5.1. Spectrul SERS a fost dominat de benzile situate la:  $1005\text{ cm}^{-1}$ , atribuită vibrațiilor de balansare ale 5-metilcitozinei, de la  $730\text{ cm}^{-1}$  alocată provizoriu adeninei și respectiv de la  $680\text{ cm}^{-1}$ , alocată provizoriu citozinei. Aria de sub banda SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$ , care reflectă statusul de metilate al ADN-ului, a avut o distribuție non-parametrică atât în grupul LA-SD (D'Agostino & Pearson omnibus normality test,  $p=0.01$ ), cât și în grupul TL-DS (D'Agostino & Pearson omnibus normality test,  $p=0.01$ ). Aria medie de sub banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$  a fost mai mică în cazul pacienților cu LA-SD comparativ cu pacienții cu TL-DS (one tailed Mann-Whitney U test,  $p=0.04$ )-Fig.4.5.1. Aceste date sugerează că ADN-ul pacienților cu LA-SD apare relativ hipometilat comparativ cu ADN-ul pacienților cu TL-DS. Pentru a cuantifica această diferență s-a

Astfel, PCA sugerează că spectrul SERS al ADN-ului pacienților cu LA-SD poate fi diferențiat de cel al pacienților cu TL-DS ca urmare a diminuării intensității benzii SERS situate la  $1005\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.5.2.** A) Media spectrelor SERS al ADN-ului de la pacienți cu LA-nonSD și MPN-nonSD. B) Aria medie sub banda SERS  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei. C) Curba ROC de diferențiere între LA-nonSD și MPN-nonSD, cu AUC 0.78 ( $p=0.09$ ). D) Reprezentare grafică a PC1 și PC2 rezultate din analiza PCA a spectrelor SERS rezultate din ADN-ului de la pacienți cu LA-nonSD și MPN-nonSD. E) Graficele de încărcare corespunzătoare PC1 și PC2

nesupervizată a datelor de la grupul LA-nonSD în cadranul inferior drept (Figura 4.5.2D) corespunzător capătului terminal pozitiv al axei PC2 și valori negative pe axa PC3. Corelat cu intensitatea benzii  $1005\text{ cm}^{-1}$  în graficul de încărcare pentru PC3 (Figura 4.5.2E), distribuția cluster a grupului LA-nonSD la valorile negative ale axei PC3, sugerează că intensitatea redusă a benzii SERS  $1005\text{ cm}^{-1}$  este un factor cheie ce contribuie la această distribuție.

Metilarea ADN dobândește modificări în celulele maligne față de celulele normale. ADN-ul celulelor maligne se caracterizează printr-o hipometilare globală, iar din punct de vedere calitativ există o alternanță între regiunile hipermetilate și regiunile lipsite de 5-metilcitozin.

În acest studiu am inclus 30 de probe de aspirat medular ale unor pacienți diagnosticați cu leucemie acută asociată DS, leucemie tranzitorie a SD și leucemie sau MPN non-DS pentru detectarea diferențelor în gradul de metilare al ADN-ului. Am aplicat metoda descrisă anterior pentru promovarea chemisorpției ADN-ului pe nanoparticulele de Ag și am evaluat prin SERS starea de metilare a ADN-ului genomic extras din probe de măduvă osoasă.

Rezultatele prezente arată că spectrul SERS al ADN-ului de la pacienții cu LA-SD sau TL-DS, dar și de la pacienții cu LA-nonSD sau MPN-nonSD este dominat de banda SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$ , atribuită 5-metilcitozinei. ADN-ul de la pacienți cu LA-SD apare relativ hipometilat comparativ cu ADN-ul de la pacienți cu TL-DS (AUC 0.77). Spectrul SERS al ADN-ului de la pacienții cu LA prezintă în medie o intensitate scăzută în banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$ , în linie cu rezultatele obținute la pacienții cu SD (AUC 0.78). Aceste rezultate sunt în consens cu cercetările anterioare care au arătat

S-a comparat ADN-ul pacienților cu LA non-SD cu cel al pacienților cu MPN non-SD. Mediile spectrelor SERS ale ADN-ului provenite de la pacienții din cele două grupuri sunt redată în Figura 4.5.2A. Aria de sub banda SERS  $1005\text{ cm}^{-1}$  are o distribuție parametrică pentru grupul MPN-nonSD (D'Agostino & Pearson omnibus normality test,  $p=1.10$ ). Pentru grupul LA-nonSD, numărul de probe a fost insuficient pentru efectuarea testului de normalitate al datelor. Figura 4.5.2B evidențiază că aria de sub banda SERS  $1005\text{ cm}^{-1}$  este mai redusă în grupul LA-nonSD comparativ cu grupul MPN-nonSD aceasta fiind o stare prelucremică (one tailed Mann-Whitney U test,  $p=0.05$ ).

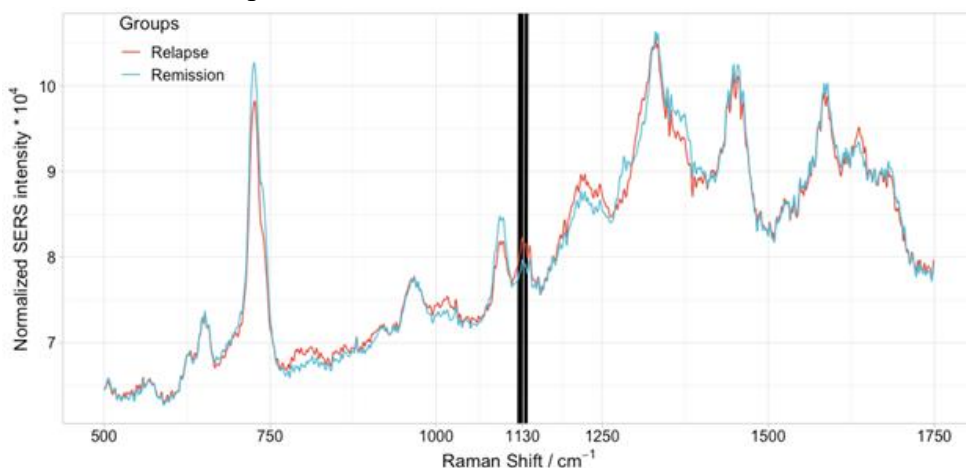
Analiza ROC a evidențiat AUC de 0.78, pentru diferențierea între cele două grupuri ( $p=0.09$ ) (Figura 4.5.2C). Analiza PCA a spectrelor SERS ale ADN-ului pacienților cu LA-nonSD și MPN-nonSD a arătat o tendință de distribuție sub formă de cluster

că ADN-ul extras dintr-o linie celulară de leucemie mieloidă acută a prezentat o intensitate în scădere a benzii  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită 5-metilcitozinei, comparativ cu ADN-ul normal.

Spectroscopia SERS poate detecta patternul unic de metilare al ADN-ului în cancer, o strategie care ar putea fi folosită nu doar pentru screening, dar și pentru urmărirea pacienților cu leucemie mieloidă acută. Pe lângă leucemia acută, tehnica SERS aplicată probelor de sânge, reprezintă o metodă promițătoare în diagnosticul tumorilor solide fiind capabilă să diferențieze între martori și diferite tipuri de cancer. Rezultatele acestui studiu evidențiază un grad redus de metilare al ADN-ului celulelor din aspiratul medular aparținând pacienților cu LA-SD față de cei cu TL-DS, sugerând existența unui proces de reducere a gradului de metilare al ADN-ului pe măsură ce celulele progresează dintr-o fază preleucemică spre leucemie acută. Acest aspect a fost observat și în cazul pacienților cu leucemie acută mieloidă și neoplazie mieloproliferativă, considerată o fază preleucemică și care nu asociază SD.

#### 4.6.1 Rolul SERS în diagnosticul infiltrării SNC

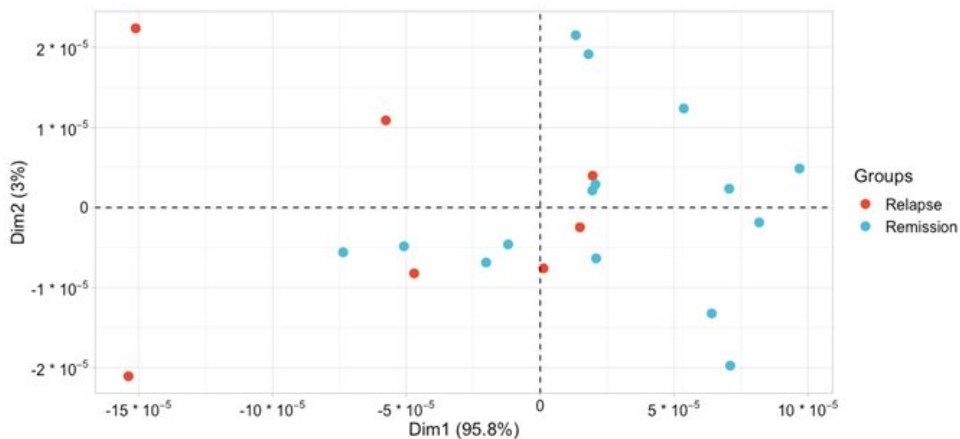
Afectarea secundară a cancerului sinusoidal, SNC, este neobișnuită în majoritatea limfoamelor sistemice care apar la mai puțin de 1% din limfoamele indolente și mai puțin de 5% din limfoamele agresive; totuși, apare până la 50% dintre pacienții cu Burkitt limfoblastic limfom când nu se administrează profilaxia a SNC



**Figura.4.5.3** Spectrele SERS medii pentru grupuri de recidivă și remisiune

Manifestarea clinică a afectării SNC poate fi rapid devastatoare și ireversibilă, mulți pacienți sunt tratați doar pe baza unui diagnostic prezumtiv fără confirmare histologică sau citologică.

Folosind procedeul prezentat în acest raport, s-a studiat posibilitatea de diagnosticare prin SERS a infiltrării SNC. În studiul prezent am inclus 7 pacienți cu recidivă SNC și 15 pacienți în remisie. Spectrele SERS medii pentru grupurile de recidivă și remisiune sunt prezentate în Figura 4.5.3. Cele mai importante diferențe spectrale au fost observate în banda SERS la  $1130\text{ cm}^{-1}$  atribuită carotenoizilor, care a fost mai intensă în cazul pacienților recidivați, și în banda SERS de la  $730\text{ cm}^{-1}$ , atribuită acidului uric, care a fost mai intensă în cazul pacienților în remisie. Am efectuat în continuare PCA utilizând valorile Raman Shift /  $\text{cm}^{-1}$  care au prezentat diferențe semnificative statistic în analiza anterioară-Fig. 4.5.4. În plus, am aplicat un clasificator random forrest folosind aceleași valori ca în PCA și am observat o rată de eroare out of the bag de 36,36% și următorul tabel de contingență (Tabelul 4.5.1).



**Figura 4.5.4**  
Rezultatul analizei PCA  
a datelor

După cum se poate observa, algoritmul nu a fost capabil să prezică în mod fiabil recidiva, dar a fost capabil să prezică remisiunea cu o eroare de clasă oarecum scăzută. Acest lucru este în conformitate cu PCA (Fig.4.5.4) în care, în unele cazuri, s-a putut observa o suprapunere între eşantioanele de recidivă și remisiune.

**Tabelul 4.5.1** Rata de contingentă

	Recidivă	Remisie	Clasa de eroare
Recidivă	2	5	71.42%
Remisie	3	12	20.00%

Datele prezentate au o mare utilitate potențială pentru pacienții cu infiltrare a sistemului nervos central. În prezent, evaluarea creierului pacienților cu infiltrare a SNC este monitorizată prin puncție lombară sau citometrie în flux. Complexitatea enormă genomică și fenotipică a infiltrației SNC face monitorizarea deosebit de dificilă. Astfel, dacă strategia SERS este validată, aceasta ar oferi medicilor un instrument valoros pentru urmărirea pacienților cu infiltrare a SNC. Prin urmare, studiul nostru preliminar extinde rapoartele anterioare privind detectarea directă a ADN-ului malign bazat pe SERS și deschide noi căi pentru integrarea clinică a tehnologiei SERS.

**Studiile preliminare**, efectuate în cadrul proiectului au evidențiat **utilitatea metodei SERS în detectarea ADN-ului malign**, pe baza arhitecturii sale caracteristice de metilare, fără amplificarea prealabilă a ADN-ului. Pe baza benzii de  $1005\text{ cm}^{-1}$  atribuită reziduurilor de citozină metilate, ADN-ul genomic extras din LCR de la pacienții cu infiltrație în SNC a fost discriminat de cel extras de la subiecții de control. Spectrele SERS ale cancerului și ADN-ului normal extras din liniile celulare au arătat că ADN-ul malign prezintă două comportamente de absorbție diferite, în funcție de concentrație. Astfel, comportamentul de absorbție al ADN-ului malign este determinat de modelul de metilare caracteristic, care implică o distribuție neomogenă a resturilor de 5-metilcitozină, precum și hipometilarea globală. Ca atare, banda de  $1005\text{ cm}^{-1}$ , atribuită resturilor de citozină metilate este mult mai puțin intensă în cazul ADN-ului malign și devine evidentă doar la concentrații mai mari.

Analiza comparativă a semnalului SERS al ADN-ului dobândit, folosind cit-AgNP fără Cl și substraturi SERS care conțin Cl, sugerează că anionii precum Cl<sup>-</sup> mediază absorbția ADN-ului pe nanoparticulele de argint, conform mecanismului chimic al SERS. Detectarea directă de către SERS a ADN-ului malign, fără a reveni la nicio etapă de amplificare a ADN-ului, este o strategie promițătoare care ar putea fi implementată în practica clinică pentru screening-ul și urmărirea pacienților cu determinări cerebrale



**Act. 4.7 Activități pentru obținere, validare și protejarea drepturilor de proprietate intelectuală și industrială.**

Prin publicarea rezultatelor cercetărilor efectuate în cadrul acestui proiect s-a asigurat dreptul de proprietate conform standardelor internaționale.

**Act. 4.8 Diseminarea și alte activități privind vizibilitatea.**

Rezultatele științifice obținute în tematica proiectului, au fost valorificate prin publicarea acestora/acceptarea publicării, în reviste de largă circulație internațională, cu factor de impact ridicat. Acest fapt confirmă originalitatea datelor cuprinse în cele 19 lucrări apărute sau care urmează să apară în anul 2021. Totodată, au fost prezentate 6 lucrări la conferințe internaționale, alte 2 în cadrul unor conferințe organizate în țară. Redăm în continuare lista cu lucrările aparute și respectiv prezentate la conferințe științifice.

1. Fermi Level Equilibration at the Metal-Molecule Interface in Plasmonic Systems.  
Stefancu, A.; Lee, S.; Zhu, L.; Liu, M.; Lucacel, R. C.; Cortés, E.; Leopold, N.,  
*Nano Letters* 2021, 21 (15), 6592-6599, IF: 11.189
2. SERS-Based Evaluation of the DNA Methylation Pattern Associated With Progression in Clonal Leukemogenesis of Down Syndrome.  
Moisoiu, V.; Sas, V.; Stefancu, A.; Iancu, S. D.; Jurj, A.; Pasca, S.; Iluta, S.; Zimta, A. A.; Tigu, A. B.; Teodorescu, P.; Turcas, C.; Blag, C.; Dima, D.; Popa, G.; Arghirescu, S.; Man, S.; Colita, A.; Leopold, N.; Tomuleasa, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2021, 9, IF: 5.89
3. SERS Liquid Biopsy: An Emerging Tool for Medical Diagnosis.  
Moisoiu, V.; Iancu, S. D.; Stefancu, A.; Moisoiu, T.; Pardini, B.; Dragomir, M. P.; Crisan, N.; Avram, L.; Crisan, D.; Andras, I.; Fodor, D.; Leopold, L. F.; Socaciu, C.; Bălint, Z.; Tomuleasa, C.; Elec, F.; Leopold, N., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2021, 208.
4. Unexplained Hemorrhagic Syndrome? Consider Acquired Hemophilia A or B.  
C. Constantinescu, C. Jitaru, S. Pasca, D. Dima, N. Dirzu, D. Coriu, J. Zdziarska, G. Ghiaur, J. Mahlangu, C. Tomuleasa. *Blood Reviews*, 2021, in press. IF: 8.25.
5. The Predictive Role of Modified Early Warning Scores in 174 Hematological Patients at Risk for Transfer to the Intensive Care Unit.  
C. Constantinescu, S. Pasca, S. Iluta, G. Gafencu, M. Santa, C. Jitaru, P. Teodorescu, D. Dima, M. Zdrengea, C. Tomuleasa. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, in press, IF: 4.241.
6. Coagulopathy in Acute Promyelocytic Leukemia: Can We Go Beyond Supportive Care?  
B. C. Hambley, C. Tomuleasa, G. Ghiaur, *Frontiers in Medicine*, 2021, in press IF: 5.091.
7. Mobile Health Technology for the Personalized Therapy of Hemophilia.  
N. Dirzu, I. Hotea, M. Brinza, M. C. Peters, K. Gal, L. Popescu, C. Blag, M. Marian, E. Pal, M. Stanescu, D. Cenariu, C. Tarniceriu, M. Serban, D. Dima, D. Coriu, C. Tomuleasa, *Frontiers in Medicine*, 2021, in press, IF: 5.091.
8. Azacytidine Plus Olaparib for Relapsed Acute Myeloid Leukemia, Ineligible for Intensive Chemotherapy, Diagnosed with a Synchronous Malignancy.  
S. Iluta, A. Jurj, G. Gafencu, S. Pasca, A. Terec, P. Teodorescu, C. Selicean, C. Jitaru, M. Iordache, C. Constantinescu, R. Feder, R. Munteanu, D. Dima, D. Gulei, T. Ciuleanu, C. Tomuleasa. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, in press. IF: 4.486.
9. The Possible Non-Mutational Causes of FVIII Deficiency: Non-Coding RNAs and Acquired Hemophilia A  
A. A. Zimta, I. Hotea, M. Brinza, C. Blag, S. Iluta, C. Constantinescu, A. Bashimov, E. A.

- Marchis-Hund, A. Coudsy, L. Muller-Mohnssen, N. Dirzu, D. Gulei, D. Dima, M. Serban, D. Coriu, C. Tomuleasa, *Frontiers in medicine*, 8 (2021) 654197.
10. Quantifying Cytosolic Cytochrome c Concentration Using Carbon Quantum Dots as a Powerful Method for Apoptosis Detection  
C. S. Moldovan, A. Onaciu, V. Toma, R. Marginean, A. Moldovan, A. B. Tigu, G. F. Stiuftuc, C. M. Lucaciu, R. I. Stiuftuc, *Pharmaceutics* (MDPI), 13(10), 1556, IF = 6.321
  11. Proving Nanoscale Chiral Interactions of Cyclodextrins and Propranolol Enantiomers by Means of SERS Measurements Performed on a Solid Plasmonic Substrate  
G.F.Ştiuftuc, V. Toma, A. Onaciu, V. Chiş, C. M. Lucaciu, R. I. Ştiuftuc, *Pharmaceutics* (MDPI), 13(10), 1594, Q1, IF = 6.3211
  12. Magnetic properties of  $\text{Sr}_2\text{Fe}_{1-x}\text{Ni}_x\text{MoO}_6$  perovskites,  
E. Burzo, G. Souca, *Journal of Materials Science: Mater. Electron.* 32, 2200 (2021) IF= 2.6
  13. Magnetic nanoparticles in nanomedicine in *Magnetic Nanoparticles in Human Health and Medicine; Current Medical Applications and Alternative Therapy of Cancer*,  
G. F. Stiuftuc, C. Iacovita, V. Toma, R. I. Stiuftuc, R. Tetean, C. M. Lucaciu, Editors: Caizer, Costica / Rai, Mahendra I. Edition November 2021, p 37-58, Wiley & Sons Ltd , ISBN: 978-1-119-75467-1, John Wiley & Sons
  14. The effect of cation distribution and heat treatment temperature on the structural, surface, morphological and magnetic properties of  $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  nanocomposites,  
T. Dippong, M. D. Lazar, I. G. Deac, P. Palade, I. Petean, G. Borodi, O. Cadar, *Journal of Alloys and Compounds*, in press (2021), IF=5,316
  15. Effect of Silica Embedding on the Structure, Morphology and Magnetic Behavior of  $(\text{Zn}_{0.6}\text{Mn}_{0.4}\text{Fe}_2\text{O}_4) \delta / (\text{SiO}_2) (100 - \delta)$  Nanoparticles  
T. Dippong, I. G. Deac, O. Cadar, E. A. Levei, *Nanomaterials*, 11 (2021) 2232, IF=5,076
  16. Effect of heat-treatment temperature and zinc addition on magnetostructural and surface properties of manganese nanoferrite prepared by an ecofriendly sol-gel synthesis  
T. Dippong, I. G. Deac, M. D. Lazar, I. Petean, E. A. Levei, Gh. Borodi, O. Cadar, *Journal of Materials Research and Technology*, 15 (2021) 6528-6540, IF=5,039
  17. A narrative review of central nervous system involvement in acute leukemias  
D. Deak, N. Gorcea-Andronic, V. Sas, P. Teodorescu, C. Constantinescu, S. Iluta, S. Pasca, I. Hotea, C. Turcas, V. Moisoiu, A.A. Zimta, S. Galdean, J. Steinheber, I. Rus, S. Rauch, C. Richlitzki, R. Munteanu, A. Jurj, B. Petrushev, C. Selicean, M. Marian, O. Soritau, A. Andries, A. Roman, D. Dima, A. Tanase, O. Sigurjonsson, C. Tomuleasa, *Ann. Transl. Med.* 9, 1 (2021) 68, IF=3,932
  18. Current therapeutic approaches in the management of hemophilia—a consensus view by the Romanian Society of Hematology  
I. Hotea, M. Brinza, C. Blag, A.A. Zimta, N. Dirzu, C. Burzo, I. Rus, D. Apostu, H. Benea, M. Marian, A. Mester, S. Pasca, S. Iluta, P. Teodorescu, C. Jitaru, M. Zdrenghia, A. Bojan, T. Torok-Vistai, R. Niculescu, C. Tarniceriu, D. Dima, C. Truica, M. Serban, C. Tomuleasa, D. Coriu, *Annals of Translational Medicine*, 9, 13 (2021) 1091, IF= 3,932
  19. The Potential Equivalents of TET2 Mutations  
S. Pasca, A. Jurj, M. Zdrenghia, C. Tomuleasa, *Cancers*, 13, 7 (2021) 1499 IF=6,639

#### **Lucrări prezentate la conferințe internaționale și naționale, în anul 2021**

1. The role of adsorbed ions (adions) at metal molecule interface in plasmonic nanoparticles,

- A. Stefancu, S.D. Iancu, N. Leopold, T6-I *13th International Conference on Physics of Advanced Materials*, September 24-30, 2021, Sant Feliu de Guixols, Spain, Book of Abstracts p.282-283, invited presentation.
2. Proving nanoscale chiral interactions between cyclodextrins and propranolol enantiomers by means of SERS. Highlighting the key role played by the plasmonic substrate,  
G. F. Știufiuc, V. Toma, A. Onaciu, C. Moldovan, V. Chiș, C. M. Lucaciu, R. I. Știufiuc T8-I, *13th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-13) and the 4th Autumn School on Physics of Advanced Materials (PAMS 4)*, 24-30 septembrie, 2021, Sant Feliu de Guixols, Spain, Book of Abstracts p.137-138, invited presentation.
  3. Synthesis and characterization of magneto/plasmonic  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  with biomedical applications in biosensing and bioseparation  
R.-A. Bortnic, A. Szatmári, R. Hirian, G. Souca, R. Dudric, V. Vinteler, V. Toma, R. Știufiuc, E. Burzo, R. Tetean , – T10-O, *ICPAM-13, 13<sup>th</sup> International Conference on Physics of Advanced Materials* , September 24-30, 2021, Sant Feliu de Guixols, Spain, Book of Abstracts p.102-103, oral presentation.
  4. Magnetic Properties of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  Nanoparticles  
R. Bortnic, A. Szatmári, G. Souca, R. Dudric, R. Știufiuc, A. Moldovan, I. Deac, E. Burzo, R. Tetean , – T4-O, *ICPAM-13, 13<sup>th</sup> International Conference on Physics of Advanced Materials* , September 24-30, 2021, Sant Feliu de Guixols, Spain - Book of Abstracts p.131, oral presentation.
  5. Magnetic properties of  $(\text{Zn};\text{Ni}(\text{Co}))\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nanocomposites,  
T. Dippong, R. Tetean, I.G. Deac, T6-I, *ICPAM-13, 13<sup>th</sup> International Conference on Physics of Advanced Materials*, September 24-30, 2021, Sant Feliu de Guixols, Spain, Book of Abstracts p.143-144, invited presentation.
  6. Structural and morphological properties of core-shell  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  nanoparticles, A. Szatmari, R. Bortnic, R. Hirian, G. Souca, R. Dudric, V. Vinterel, V.Toma, R.Știufiuc, E.Burzo, R.Tetean, *PAMS-4, 4th Autumn School on Physics of Advanced Materials* September 24-30, 2021, Sant Feliu de Guixols, Book of Abstracts p.90-91, poster presentation
  7. Noi metode de sinteza a lipozomilor plasmonici si magnetoplasmonici pentru aplicatii de tip drug delivery, A.Gheņț, C.Moldovan, V.Toma, G.Știufiuc, R.Hirian, C.M.Lucaciu, R.I.Știufiuc *Conferința Științifică Centenarul Insitutului Național Cantacuzino*, aprilie,2021.prezentare orala
  8. Nanostructuri lipidice multifunctionale cu aplicatii in domeniul biomedical  
V.Toma, G.Știufiuc, C.Moldovan, A.Gheņț, R.Hirian, C.M.Lucaciu, R.Știufiuc, *Conferința Științifică Centenarul Insitutului Național Cantacuzino*, 1-3 aprilie,2021, prezentare orala

Publicațiile apărute asigură o largă diseminare, pe plan internațional, a rezultatelor științifice obținute în cadrul proiectului. Originalitatea și importanța rezultatelor rezultă și din modul în care acestea sunt preluate în literatura de specialitate, prin citare. Astfel, lucrările științifice publicate de cercetătorii implicați în proiect, axate pe tematica acestuia, numără peste 350 citari. Lucrările listate în prezentul raport de fază, apărute în 2021, sunt deja preluate în literatura de specialitate, însumând 12 citări.

Studentii doctoranzi au contribuit la realizarea proiectului prin următoarele activități desfășurate în anul 2021:

Student doctorand **Ádám Szatmári**: sinteza nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  prin metoda hidrotermală; separarea nanoparticulelor din soluție si spălarea acestora în vederea pregătirii pentru

acoperire; caracterizarea structurală și morfologică a nanoparticulelor de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ; prezentarea unei lucrări la școala de vară “Physics of Advanced Materials School” (PAMS) 2021.

Student doctorand **Bortnic Rareș-Adrian**: asamblarea invelisului de  $\text{SiO}_2$ , precum și a celui de aur prin metode de depunere chimică; spălarea particulelor miez-invelis și pregătirea acestora pentru analize; caracterizarea structurală și morfologică a particulelor miez-invelis  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{Au}$ ; prezentarea unei lucrări la conferința “International Conference on Physics of Advanced Materials” (ICPAM), 2021

Student doctorand **Gabriela Souca**: caracterizarea structurală și morfologică a particulelor core-shell  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{Au}$ ; pregătirea nanostructurilor de tip miez și miez-invelis, pentru efectuarea de măsurători magnetice; caracterizarea proprietăților magnetice ale nanostructurilor.

Student doctorand **Minodora Desmirean** a pregătit probele de ADN extrase de la pacienții incluși în studiu pentru analiza ADN, atât de la subiecții de control cât și de la pacienți cu BCL (limfoame cu celule B), TCL (limfoame cu celule T) și Met (metastaze ganglionare de cancer epitelial) pentru analiza SERS. Pentru analiza SERS a ADN-ului, a preparat nanoparticule de argint sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină. A participat la măsurătorile SERS, la prelucrarea și la analiza rezultatelor.

Director Proiect,  
Acad. Prof. Dr. Emil Burzo