



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00919**

(22) Data de depozit: **21/11/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **UNIVERSITATEA BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.91-95, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **IONIȚĂ MIOARA DANIELA, STR. JIULUI NR. 6, BL. 6, SC. B, AP. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PRODANA MARIANA, BD. TIMIȘOARA, NR.35A, BL.T9, SC.1, ET.8, AP.100, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BADEA NICOLETA, STR.LEREȘTI NR.3, BL.A 2, SC.6, ET.4, AP.88, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DINISCHIOTU ANCA, CALEA MOȘILOR, NR.124A, SC.1, ET.1, AP.2, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BALAS MIHAELA, BLD.RÂMNICU SĂRAT, NR.22, BL.7A, SC.2, ET.5, AP.20, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **SISTEME PE BAZĂ DE NANOTUBURI DE CARBON UTILIZATE ÎN TERAPIA CANCERULUI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compoziții cu acțiune antitumorală. Procedeu, conform invenției, constă în contactarea timp de 24 h a nanotuburilor de carbon cu soluții etanoliche de medicamentele Pemetrexet (Pm) și Quercitină (Q), centrifugare la 8000 rpm, timp de 30 min, urmată de filtrare, rezultând compoziții formate din sisteme de nanotuburi

de carbon conjugate cu Pm în raport 1:1, nanotuburi de carbon conjugate cu Q în raport 1:0,1, respectiv nanotuburi de carbon conjugate cu Pm și Q, în raport 1:1:0,1.

Revendicări: 4
Figuri: 9



Sisteme pe baza de nanotuburi de carbon utilizate in terapia cancerului – Descriere

Nanotuburile de carbon, reprezintă nanoparticule de carbon, alcătuite din foi subțiri de inele benzenice în formă tubulară, utilizate în domeniul biomedical datorită proprietăților lor fizico-chimice deosebite. Nanotuburile de carbon fac parte din familia fulerenelor și reprezintă a treia formă alotropă a carbonului, alături de grafit și diamant. În urma a numeroase cercetări s-a ajuns la concluzia că pot fi utilizate atât la detectarea celulelor canceroase, cât și la livrarea medicamentelor anticancerigene. Datorită suprafeței superioare a nanotuburilor de carbon, este posibilă prinderea moleculelor, cum ar fi a celor de medicament sau de alte molecule cu rol benefic pentru organism (peptide, acizi nucleici).

Trecând la structura lor, acestea pot exista sub două forme: nanotuburi cu un singur perete (SWCNTs) și nanotuburi de carbon cu mai mulți pereți (MWCNTs). Invenția se referă la utilizarea nanotuburilor cu mai mulți pereți datorită proprietăților lor care sunt superioare celor cu un singur perete. Nanotuburile de carbon cu mai mulți pereți prezintă avantaje, atât datorită fabricării lor cu ușurință și în cantități mari, cât și stabilității lor fizico-chimice. Cele cu un singur perete își pot schimba aceste proprietăți datorită defectelor care apar la nivelul structural al peretelui.

Invenția se referă la asocierea unui medicament utilizat în domeniul oncologiei, mai precis în tratarea cancerului pulmonar, numit Pemetrexed disodic cu Quercetina, un flavonoid cu proprietăți antiioxidante, cu scopul de a reduce toxicitatea nanotuburilor de carbon utilizate la transportul medicamentului. Quercetina (3,5,7,30,40 -pentahidroxiflavona) este elementul principal din subclasa de flavonoli, datorită proprietăților antiioxidante, antiinflamatorii, antialergice și anticancerigene, ceea ce o face potrivită pentru cererea de brevet. A fost demonstrat faptul că o doză mică din acest flavonoid este responsabilă de “inhibarea proliferării celulare prin provocarea apoptozei și/sau a opririi ciclului celular”.

Pemetrexedul s-a dovedit a fi benefic în tratarea a două tipuri de cancer: cancerul mezoteliom pleural și cancerul pulmonar “altul decât cel cu celule mici”. De asemenea, Pemetrexed poate fi utilizat și în tratarea altor tipuri de cancer. S-a observat o mai bună funcționare a Pemetrexedului în combinație cu Cisplatina, în cazul pacienților care nu au fost tratați anterior prin chimioterapie și a pacienților cu cancer care nu poate fi operat.

In literatura de specialitate s-au efectuat diferite studii avand ca subiect utilizarea diferitelor combinatii pe baza de medicamente si nanotuburi de carbon.

In brevetul WO2014159760A1, "Liposome oxaliplatin compositions for cancer therapy" inventator William Mcghee, cesionar Mallinckrodt Llc (2014) prezinta o compoziție pentru tratamentul cancerului. Compoziția include: (a) lipozomi zwitterionici constând în 50-70 mol. % lipide fosfatidilcoline sau un amestec de lipide fosfatidilcoline, 25-45 mol. % colesterol, 2-8% lipidae-PEG; și (b) oxaliplatina, încapsulată în lipozomi într-o cantitate astfel încât raportul dintre greutatea totală a lipidelor și greutatea oxaplatinei este de la aproximativ 20:1 până la aproximativ 65:1. Metodele pentru prepararea oxaliplatinei lipozomale și tratamentul cancerului sunt, de asemenea, prezentate.

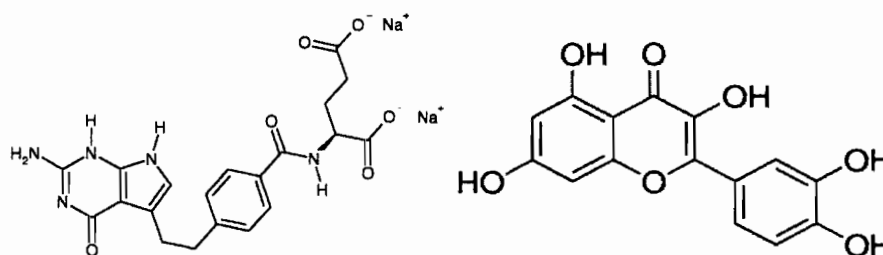
Brevetul US8440704B2 "Quercetin-containing compositions", inventator Thomas Christian Lines, cesionar Quercegen Pharmaceuticals LLC (2013) prezintă o compoziție care conține quercetină, vitamina B3 și vitamina C, în care raportul în greutate dintre quercetină, vitamina B3 și vitamina C este 1: 0,02-1: 0,2-2,5. Compoziția, fie în formă uscată, fie sub formă lichidă poate fi folosită pentru tratarea unor boli, printre care si diferite cancere.

Brevetul US9107944B2 "Immunologically modified carbon nanotubes for cancer treatment", inventator Wei R. Chen, cesionar University of Central Oklahoma (2015) prezintă o metodă pentru construirea unui compus de nanotuburi modificate imunologic și o metodă de utilizare a compusului pentru a elibera imunoadjuvanți la celulele tumorale și pentru a produce reacții fotofizice și imunologice sinergice vizate, pentru tratamentul cancerului. Pentru a prepara nanotuburile modificate imunologic, nanotuburile de carbon sunt dizolvate într-o soluție de chitosan glicat, un imunostimulant, prin urmare, folosind chitosan glicat ca surfactant pentru stabilizarea soluției apoase de nanotuburi. Compusul poate fi utilizat pentru tratamentul cancerului. Nanotubul servește ca un purtător pentru a elibera imunoadjuvanții celulelor tumorale și servește ca agent de absorbție a luminii într-un corp celular al unei tumori într-o gazdă.

Partea I-a - Materiale si metode.

Pregătirea probelor

Au fost preparate 3 probe pe bază de MWCNT- COOH în triplicat astfel: 10 mg de MWCNT-COOH au fost puse în contact cu 10 mL soluție de pemetrexed (Pm) de concentrație 1g/L, 10 mL quercitină (Q) 0,1 g/L, respectiv 10 mL amestec Pm și Q (1 g/L Pm și 0.1 g/L Q). Probele au fost lăsate în contact 24 ore și apoi centrifugate la 8000 rpm timp de 30 minute, iar sedimentul a fost analizat.



Analiza FT-IR

Legarea pemetrexedului, respectiv a quercitinei de MWCNTs a fost evidențiată prin spectroscopie ATR-IR când s-au observat următoarele aspecte (Fig. 1):

- Prezența unor benzi extinse la 3419 – 3289 cm^{-1} în spectrul probei MWCNTs-Q caracteristice grupărilor OH fenolice provenite din structura quercitinei și grupări C-O la 1000 cm^{-1} ;
- proba MWCNT- Pm prezintă pik-uri caracteristice pemetrexedului, astfel în regiunea 1345-1266 cm^{-1} apar benzi specifice grupărilor C-N, la 1671 cm^{-1} legături dublelor C=O, iar între 1621 și 1401 cm^{-1} legăturile duble C=C provenite din inelele aromatice ale pemetrexedului;
 - în cazul probei MWCNTs-Pm-Q analiza FTIR a evidențiat prezența unor benzi caracteristice celor două substanțe: 3290 cm^{-1} pentru grupările OH provenite din quercitină, dar și la 2917 cm^{-1} aferente grupărilor N-H și la 1317 cm^{-1} pentru legături C-N provenite de la pemetrexed. De asemenea, se observă un peak intens la 1028 cm^{-1} caracteristic grupărilor C-O provenite de la cele două substanțe;

Determinarea stabilității fizice

Potentialul electrocinetic (ζ) este o mărime ce depinde de sarcina superficială a particulei, valoarea acestuia oferă o indicație asupra stabilității fizice a sistemelor de nanoparticule. În cazul cercetării prezente, valoarea potențialului zeta a MWCNT-COOH este mic (-8,27 mV) ceea ce denotă o stabilitate scăzută a nanotuburilor de carbon în soluție de tampon fosfat, pH=7,4 indicând fenomene de agregare a acestora. În schimb, în cazul celorlalte probelor valorile potențialului indică o stabilitate moderată, cea mai bună stabilitate o prezintă

proba MWCNT-Pm, $\zeta = -23.9$ mV (Fig. 2), datorită sarcinilor electrice din structura pemetrexedului.

Determinarea dimensiunii prin metoda DLS

Determinarea dimensiunii medii (Z_{av}) a probelor a fost realizată utilizând metoda împrăstierii dinamice a luminii (DLS). Rezultatele obținute sunt în corelație cu valoarea potențialului zeta, astfel cele mai mici dimensiuni le prezintă proba cu potențialul cel mai negativ, MWCNT-COOH-Pm (369 nm).

Referitor la distribuția dimensiunii probelor pe bază de MWCNT-COOH în tampon fosfat, reflectată prin valorile indicelui de polidispersitate (PdI), s-a observat că în majoritatea cazurilor PdI a fost < 0.3 , ceea ce scoate în evidență existența unei populații de particule destul de restrânse, monomodale, excepție făcând proba MWCNTs care prezintă un indice PdI de 0.694 aceasta având o distribuție bimodală a particulelor (2 populații). În cazul asocierii medicamentelor cu nanotuburile de carbon, datorită sarcinilor electrostatice care apar în sistem, potențialele zeta sunt mai negative, fenomenele de agregare sunt mai slabe și dimensiunile sunt mai mici comparativ cu dimensiunile agregatelor de MWCNT în soluția de tampon (696 ± 5.79 nm).

Eliberare controlata

Studiile de eliberare a pemetrexedului și a quercitinei s-au realizat în tampon fosfat la pH-uri diferite. Astfel, probele pe bază de MWCNT, Pm, Q și amestec PM-Q după centrifugare timp de 30 min, 8000 rpm, au fost separate și s-au introdus în 10 mL de soluție tampon. Soluțiile astfel obținute au fost introduse în saci de dializa, și apoi în mediul receptor (100 mL soluție tampon fosfat la pH de 5,5, respectiv de 7,4) sub agitare. La anumite intervale de timp, din mediul receptor s-au recoltat 5 mL de probă și s-au introdus 5 mL tampon.

Cantitatea de Pm și Q eliberată a fost determinată spectrofotometric folosind curba de calibrare pentru Pm la 226 nm (domeniul de concentrație 0.8 - 10 mg/L, $R^2 = 0,9974$), quercitină la 330 nm pentru pH=7.4 (2-15 mg/L $R^2 = 0,9972$), respectiv 365 nm pentru quercitină la pH=5.5 (2-20 mg/L $R^2 = 0,9976$). Pentru quercitină s-au realizat două curbe de calibrare la lungimi de undă diferite, deoarece quercitina este influențată de variația de pH, astfel la pH=5.5 prezintă picuri la 203,5 nm, 252.5 nm, 292 nm (u), respectiv 365 nm. La pH 7.4 spectrul quercitinei suferă o deplasare batocromă, spectrul prezentând picuri la 211 nm, 263 nm, 325 nm, respectiv 376 nm. Această comportare a quercitinei poate fi explicată datorită deprotonării grupărilor OH din structura flavonei [1]

In cazul probei MWCNT-Pm-Q cantitatea de Pm si Q eliberată a fost determinată prin utilizarea metodei Vierodt pentru a elimina interferențele dintre Pm și Q. Utilizând absorbantele amestecurilor de la 226 nm si 330 nm respectiv 360 nm, concentrația fiecărui compus individual a fost calculată cu următorul sistem de ecuații: [2]:

$$E_{mixture226} = \varepsilon_{226} \cdot C_{Pm} \cdot l + \varepsilon_{226} \cdot C_Q \cdot l \quad (1)$$

$$E_{mixture330/360} = \varepsilon_{330/365} \cdot C_{Pm} \cdot l + \varepsilon_{330/365} \cdot C_Q \cdot l$$

unde: E = absorbanța la 226 nm, 330 nm/365 nm; ε_{226} , ε_{330} , ε_{365} = coeficienții molari de extincție la lungimile de undă caracteristice; C_{Pm} , C_Q , în mg/L; l = drumul optic.

Utilizând mai multe modele cinetice incluzând: modelul de ordinul 0, 1, Higuchi, Peppas–Korsmeyer și Hixson Crowell datele obținute la eliberarea controlată *in vitro* a pemetrexedului si a quercitinei au fost fitate, iar parametrii cinetici obținuți: constanta de viteză k , coeficientul de corelație R^2 și coeficientul de eliberare, n sunt prezentați în tabelul 1.

In cazul eliberării pemetrexedului in primele 8 h nu se observă diferențe notabile, eliberarea fiind puțin influențată de variația pH-ului sau de tipul probei, dar după 8 h se constată o eliberare mai lentă la pH 5,5. După 72 de ore în cazul probei MWCNT-Pm se constată că s-a eliberat pemetrexedul 15,18 % la pH 5,5 și 19,89% la pH= 7,4, iar în cazul sistemului MWCNT-PM-Q la pH=5,5 se eliberează 22,65 % , respectiv 25,28% la pH=7,4 (Fig. 4). Aceste rezultate sunt în corelație cu datele de literatură care sugerează că la un pH acid eliberarea substanțelor active este mai lentă.

In cazul quercitinei (fig 5) se constată o eliberare superioară a pemetrexedului astfel la 72 h se eliberează 26,50 %, respectiv 34,32% în cazul probei MWCNT-Q și de 34,80% respectiv de 52,51% în cazul probei MWCNT-PM-Q, eliberarea mai lentă în fiecare caz obținându-se la pH acid.

Atât pentru pemetrexed cât și pentru quercitina cel mai bun coeficient de corelație s-a obținut în cazul modelului Peppas–Korsmeyer, iar coeficientul de eliberare n mai mic de 0.45 indică existența unui mecanism de difuzie Fickian în cazul eliberării celor doi compuși [1].

ompus	Proba	Ordinul 0		Ordinul 1		Higuchi		Peppas-Korsmeyer			Hixson_Crowell	
		$\%R = k_0 t$		$\ln(100 - \%R) = k_1 t$		$\%R = k_2 \sqrt{t}$		$\%R = k_3 \sqrt[3]{t}$			$\sqrt[3]{100 - \%R} = k_4 t$	
		R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	k_2	R^2	k_3	n	R^2	k_4
Pm	MWCNT-Pm-pH=5.5	0,9881	1,0465	0,9857	0,0109	0,9418	3,9826	0,9981	0,5464	0.4049	0,9853	0,0013
	MWCNT-Pm-pH=7.4	0,9886	1,3155	0,9856	0,0139	0,9428	5,0076	0,9988	0,3856	0.3936	0,9852	0,0017
	MWCNT-Pm-Q-pH=5.5	0,9909	1,527	0,9874	0,0163	0,9494	5,8262	0,9993	0,1196	0.4045	0,9869	0,0019
	MWCNT-Pm-Q-pH=7.4	0,9817	1,5044	0,9771	0,0160	0,9428	5,0076	0,9969	0,2253	0.4011	0,9763	0,0019
Q	MWCNT-Q-pH=5.5	0,9088	1,0076	0,9015	0,0105	0,8352	3,7653	0,9688	0,4782	0,4419	0,9004	0,0013
	MWCNT-Q-pH=7.4	0,8098	1,0868	0,8052	0,0114	0,7765	4,1483	0,9138	0,4128	0.4145	0,8045	0,0014
	MWCNT-Pm-Q-pH=5.5	0,9866	1,3063	0,986	0,0139	0,9726	5,0554	0,9942	0,3875	0.5242	0,9859	0,0017
	MWCNT-Pm-Q-pH=7.4	0,9325	2,5997	0,9175	0,0289	0,8555	9,7063	0,9748	0,1124	0.38804	0,9151	0,0035

Bibliografie

- [1] A.Amat, C. Clementi, F. De Angelis, A. Sgamellotti and S. Fantacci, The Journal of Physical Chemistry A, 2009, 113, 15118-15126.
- [2] Z. Jurasekova, C. Domingo, J.V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy, Physical Chemistry Chemical Physics, accept

JF

Partea a II-a: Activitatea antitumorală

Materiale și metode

1. Cultivarea și tratamentul celulelor

Pentru testarea efectelor anti-tumorale ale nanotuburilor complexate cu Pemetrexet și quercitină au fost alese 3 linii de celule epiteliale canceroase umane: linia MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) de celule de adenocarcinom mamar metastatic, linia MCF7 (ATCC HTB-22) de celule de adenocarcinom mamar neinvaziv și linia PANC-1 (ATCC CRL-1469) de celule de carcinom pancreatic. Toate cele trei linii au fost cultivate în mediu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ATCC 30-2002) pH 7.4 suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% soluție amestec de antibiotice. Culturile de celule au fost menținute în incubator în condiții de umiditate 95%, 5% CO₂ și 37°C.

Expunerea celulelor la nanotuburile de carbon complexate cu Pemetrexet și quercitină, precum și la componentele individuale s-a realizat pe o perioadă de 24 de ore la diferite doze cuprinse între 3.125 – 50 μg·mL⁻¹ MWCNTs, 2.5 – 40 μg·mL⁻¹ Pem și 0.25 – 4 μg·mL⁻¹ QR.

2. Testul MTT

Pentru evaluarea viabilității celulare, s-a utilizat compusul MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) ce este redus sub acțiunea dehidrogenazelor mitocondriale la cristale de formazan, în celulele viabile. Astfel, celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate de 5 × 10⁴ celule/mL și lăsate să adere timp de 24 de ore. Celulele au fost apoi expuse la diferite doze de tratament timp de 24 de ore prin adaugarea în mediul de cultură a materialelor de testat. După acest timp mediul a fost îndepărtat și s-a adăugat peste celule o soluție de (MTT) de concentrație 1 mg/mL. După o incubare de 2 h la 37°C, cristalele de formazan formate au fost solubilizate în izopropanol și absorbanta fiecărui godeu a fost citită la spectrofotometru la 595 nm.

3. Marcarea fluorescentă a lizozomilor cu *Lysotracker Green*

Pentru punerea în evidență a lizozomilor s-a folosit compusul fluorescent *Lysotracker green DND-26* care colorează compartimentele acide din celulele vii fiind reținut la nivelul membranei lizozomilor pentru mai mult timp. Celule au fost însămânțate în plăci cu 12 godeuri la o densitate de 5 × 10⁴ celule/mL și lăsate să adere 24 de ore. După expunerea la tratament, celulele au fost incubate în mediu de cultură cu o soluție *Lysotracker Green* 300 nM timp de 45 min la 37°C. Celulele au fost apoi spălate cu PBS și vizualizate la microscop (Olympus XI73) în fluorescență, cu filtru verde, obiectiv 20X. Pentru colorația nucleilor celulele au fost incubate timp de 15 min cu 2 μg/mL compus DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), cu fluorescență albastră.

JF

4. Cuantificarea cantității de nanotuburi preluată de celule prin metoda absorbției optice

Metoda de cuantificare a absorbției nanotuburilor la nivel celular a fost descrisă de Zhang și colab. (2018). Pentru aceasta, celulele au fost însemănțate în flask-uri de cultură cu suprafața de 25 cm² la o densitate de 5×10^5 celule/flask și incubate 24 de ore. După expunerea la tratamentul cu nanotuburi, celulele au fost spălate cu tampon fosfat salin (PBS) pentru a îndepărta nanotuburile care nu au fost preluate de celule. Pentru desprinderea celulelor de pe flask, s-a utilizat tripsină 0.25% cu EDTA 0.53 mM. După centrifugare, peletul celular a fost resuspendat într-un volum de PBS iar celulele au fost numărate cu ajutorul unei camere de numărare Burker-Turk. Suspensia celulară a fost apoi sonicată timp de 30 sec de 3x pe gheață cu un ultrasonicator UP50H (Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Germany) la 1 ciclu, 80% amplitudine pentru a obține lizatul celular. Densitatea optică a lizatului obținut a fost citită în placă cu 96 godeuri la spectrofotometru (FlexStation 3, Molecular Devices) la 750 nm. Concentrația de nanotuburi de carbon din lizatul celular a fost estimată pe baza unei curbe de calibrare. Pentru curba de calibrare s-a utilizat o suspensie de nanotuburi de carbon (500 μg/mL) ce a fost diluată în apă MilliQ la concentrații cuprinse între 0 – 50 μg/mL. Cantitatea de nanotub preluată de celule a fost calculată astfel: cantitatea absorbției celulare (mg/celulă) = concentrația de nanotuburi (mg/mL) × volumul (mL)/ numărul de celule.

5. Măsurarea producției de specii reactive de oxigen

Pentru determinarea capacității de generare a speciilor reactive de oxigen (SRO) în celulele tratate s-a folosit metoda descrisă de Cathcart și colab. (1983), ce utilizează compusul 2',7' dicloro-dihidro-fluorescein diacetat (H₂DCFDA). Acest compus pătrunde în celulă unde prin oxidarea sa de către SRO este convertit la 2',7' dicloro-dihidro-fluorescein (DCF) - un compus puternic fluorescent. Pentru măsurarea nivelului de SRO, celulele au fost însemănțate la o densitate de 10^4 celule/godeu în plăci negre cu 96 de godeuri și incubate în condiții de creștere timp de 24 ore. După tratament, celulele au fost incubate 45 min la 37°C cu 10 μM H₂DCFDA. Mediul în care a fost pus compusul a fost apoi îndepărtat și celulele au fost spălate de 2 ori cu PBS. Intensitatea fluorescenței a fost citită la 485 nm excitație și 520 nm emisie.

6. Analiza statistică

Analizele biologice au fost realizate în triplicat în 3 experimente diferite iar pentru control s-au utilizat celule netratate. Valorile au fost reprezentate ca medie ± deviația standard. Pentru analiza semnificației statistice s-a utilizat testul t-student. Pentru o valoare a p < 0.05 rezultatul a fost considerat semnificativ

Rezultate și discuții

Eficiența anti-tumorală a nanotuburilor conjugate cu Pemetrexet și quercitină a fost testată *in vitro* pe mai multe linii celulare canceroase umane: 2 linii de celule de cancer de sân (MDA-MB-231 și MCF-7) și o linie de celule de cancer de pancreas (PANC-1). Astfel, celulele au fost expuse la diferite doze de tratament optimizate în funcție de cantitatea de nanotub și de compus (Pemetrexet și quercitină) absorbit. *In vitro* au fost testate atât combinațiile de nanotuburi de carbon cu Pemetrexet și quercitină, precum și componentele individuale.

Viabilitate celulară a fost estimată prin testul MTT (Figura 6). Rezultatele au arătat efecte diferite ale nanotuburilor testate pe cele trei linii celulare. Cea mai mare scădere a viabilității celulelor tratate cu nanotuburi de carbon conjugate cu Pemetrexet și quercitină a fost înregistrată în cazul celulelor tumorale pancreatice PANC-1, unde nivelul viabilității a scăzut semnificativ ($p < 0.01^{**}$) cu 40% față de control la o doză de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs + $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem + $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR. Comparativ, în cazul celulelor MDA-MB-231 și MCF7, viabilitatea celulară a scăzut cu doar 14% și respectiv 29% pentru aceeași doză de tratament. De asemenea, s-a observat că toxicitatea sistemelor de nanotuburi conjugate separat cu Pemetrexet și quercitină cât și a componentelor individuale a fost semnificativ mai redusă față de cea a nanotuburilor complexate atât cu Pemetrexet și cu quercitină, viabilitatea celulară menținându-se în general peste 80%. Rezultatele sugerează astfel că răspunsul celular este dependent atât de tipul de celulă canceroasă cât și de combinația de nanotub și compuși. Prin acest studiu s-a dovedit eficiența superioară a combinației de nanotuburi de carbon cu Pemetrexet și quercitină față de conjugarea lor separată în celulele PANC-1.

Eficiența compușilor studiați este cunoscută în literatură. Pemetrexetul este un agent citotoxic cu efecte cunoscute la nivelul celulelor de cancer pulmonar și bine tolerat în comparație cu alte chimioterapeutice (Adjei, 2004). Pe de altă parte quercitina, pe lângă efecte anti-oxidante și anti-inflamatorii s-a arătat că are efecte inhibitorii asupra mai multor tipuri de celule canceroase (Nam și colab., 2016). Activitatea anti-tumorală a quercitinei a fost atribuită capacității de inducere a apoptozei prin interacția directă cu ADN, inhibiției enzimelor ce declanșează carcinogeneza, alterării căilor de semnalizare și inhibării căilor de supraviețuire celulară precum și interacției cu receptorii și proteinele (Srivastava și colab., 2016).

Pentru validarea rezultatului obținut, morfologia celulelor a fost investigată la un microscop optic în contrast de fază (Figura 7). Celulele au fost expuse timp de 24 de ore la două doze de tratament: o doză mică de $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR și o doză mai mare de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR. În urma investigațiilor s-au observat modificări semnificative ale morfologiei celulelor expuse la nanotuburile

conjugate cu Pemetrexet și quercitină la ambele doze cu precădere în celulele PANC-1. Modificările au fost evidențiate prin formarea de prelungiri ale membranei plasmatică, contur neregulat al celulelor, îngustarea volumului celular și apariția de vacuole mari la nivelul citoplasmei celulare. De asemenea în urma expunerii la tratament s-a observat pierderea aderenței celulare și resuspendarea lor în mediul de cultură. Alterări ale morfologiei celulare au fost puse în evidență și în celulele MDA-MB-231 în cazul expunerii la doză mare de tratament.

Localizarea lizozomilor în interiorul celulelor a fost analizată prin microscopie de fluorescență. Imagini aleatorii cu câmpuri de celule au fost fotografiate după expunerea la nanotuburi iar prin analiza lor s-a observat o creștere a numărului de lizozomi proporțională cu doza de tratament (Figura 8A). O intensificare a numărului de lizozomi a fost evidențiată în special în celulele MDA-MB-231 și PANC-1 tratate cu nanotuburi de carbon neconjugate.

Mecanismul de preluare celulară a nanotuburilor de carbon a fost anterior studiat (Caoduro și colab., 2017). Diferite studii au arătat că nanotuburile de carbon sunt internalizate în celule în funcție de diametrul și lungimea lor, mărimea și concentrația lor în mediu (Maruyama și colab., 2015) precum și în funcție de funcționalizarea lor cu diverși compuși (Ursini și colab., 2016). Se crede astfel că preluarea nanotuburilor la nivelul celulelor este bazată pe un mix al mecanismelor de internalizare spontană prin membrană, endocitoză sau fagocitoză. De asemenea s-a arătat că nanotuburile de carbon sunt capabile să penetreze membrana celulară fără să cauzeze distrugerea ei și să transporte cu succes în interiorul celulelor molecule mici (Luna și colab., 2016).

Nanotuburile internalizate prin endocitoză ajung în final încapsulate în lizozomi unde mediul este acid cu $\text{pH} = 4.5 - 5$ și permite astfel eliberarea compușilor conjugăți în citoplasmă.

Studiul preluării nanotuburilor la nivel celular a fost completat de analize de spectroforometrie a conținutului de nanotuburi din lizatul celular (Figura 8B). În concordanță cu imaginile de microscopie în fluorescență, cantitatea de nanotuburi măsurată la 750 nm din lizatul celular a fost direct proporțională cu doza testată. O acumulare de 2.4 ng/celulă a fost observată în celulele MDA-MB-231 expuse la doza mare de nanotuburi de carbon neconjugate în timp ce în celulele PANC-1 s-au înregistrat 3.31 ± 0.34 ng/celulă pentru aceleași condiții de tratament. O cantitate similară de nanotuburi a fost detectată și în cazul expunerii celulelor PANC-1 la nanotuburile de carbon conjugate cu Pemetrexet și quercitină de 3.27 ± 0.24 ng/celulă. Per total, s-a observat că eficiența de internalizare a nanotuburilor de carbon a fost mai mare în celulele PANC-1 comparativ cu celulele MDA-MB-231. Capacitatea de acumulare a nanotuburilor a fost scăzută în cazul conjugării separate a nanotuburilor de carbon cu Pemetrexet sau quercitină.

Analizele efectuate au arătat că numărul de lizozomi din citoplasmă a crescut proporțional cu cantitatea de nanotuburi preluată la nivel celular dovedind astfel acumularea lor intracelulară.

Nivelul de SRO a fost estimat în celulele canceroase după 24 de ore de expunere la tratamentul cu nanotuburi ca dovadă a inducerii stresului oxidativ (Figura 9). Rezultatele obținute au arătat o creștere semnificativă a producției de SRO în probele care au conținut nanotuburi de carbon proporțională cu doza de tratament. Un nivel mai crescut al SRO a fost înregistrat în cazul celulelelor PANC-1 comparativ cu cel observat în celulele MDA-MB-231 sugerând astfel rezistența celulelor canceroase de sân la tratamentul cu nanotuburi dar și eficiența sa crescută asupra celulelor caneroase pancreatice. Comparativ, nanotuburile conjugate cu Pemetrexet și quercitină au indus cea mai mare creștere a nivelului de SRO în celulele PANC-1 (de 10 mai mare ori față de control) tratate cu o doză de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR.

Capacitatea anti-tumorală a nanosistemului nanotub-Pemetrexet-quercitină poate fi datorată unui efect sinergic ale celor trei componente la nivelul celulelor canceroase de pancreas. Activitatea sinergică a quercitinei a fost observată și în alte studii. De exemplu, administrarea împreună cu cisplatinul, a dus la creșterea toxicității medicamentului la nivelul celulelor canceroase pulmonare, colorectale și ovariene (Nessa și colab., 2011; Demiroglu-Zergeroglu și colab., 2016).

Aceste date confirmă rezultatele obținute privind preluarea nanotuburilor de carbon la nivelul celulelor fapt ce dovedește capacitatea de acumulare și inducere a stresului oxidativ în celulele canceroase.

Concluzii

Studiul *in vitro* a demonstrat eficiența anti-tumorală superioară a sistemului format din nanotuburi-Pemetrexet-quercitină în celulele pancreatice comparativ cu celulele canceroase de sân, prin scăderea viabilității celulare sub 60% concomitent cu acumularea în citoplasmă și generarea semnificativă de SRO la doze crescute peste $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR.

Referințe:

1. Adjei, A.A. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. Clin. Lung Cancer 2004, 5, S51–S55.
2. C. Caoduro, E. Hervouet, C. Girard-Thernier et al., “Carbon nanotubes as gene carriers: focus on internalization pathways related to functionalization and properties,” Acta Biomaterialia, vol. 49, pp. 36–44, 2017.

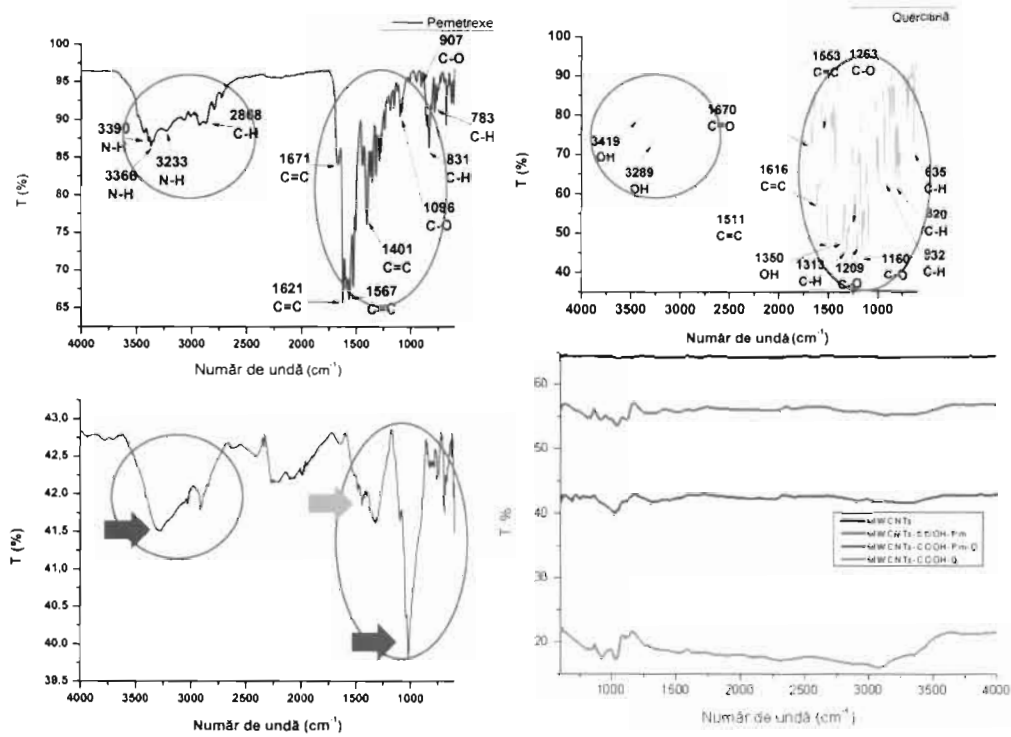
3. C. L. Ursini, R. Maiello, A. Ciervo et al., "Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and -OH and -COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 36, no. 3, pp. 394–403, 2016.
4. Cathcart R., Schwiers E., Ames B. (1983), Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem.*, 134, 111-116.
5. Demiroglu-Zergeroglu, A.; Ergene, E.; Ayvali, N.; Kuete, V.; Sivas, H. Quercetin and cisplatin combined treatment altered cell cycle and mitogen activated protein kinase expressions in malignant mesothelioma cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, 16, 1–6.
6. K. Maruyama, H. Haniu, N. Saito et al., "Endocytosis of multiwalled carbon nanotubes in bronchial epithelial and mesothelial cells," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 793186, 9 pages, 2015.
7. Nam, J.S.; Sharma, A.R.; Nguyen, L.T.; Chakraborty, C.; Sharma, G.; Lee, S.S. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. *Molecules* 2016, 21, 108.
8. Nessa, M.U.; Beale, P.; Chan, C.; Yu, J.Q.; Huq, F. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. *Anticancer Res.* 2011, 31, 3789–3797.
9. Srivastava, S.; Somasagara, R.R.; Hegde, M.; Nishana, M.; Tadi, S.K.; Srivastava, M.; Choudhary, B.; Raghavan, S.C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–13.
10. Verónica Pérez Luna, Mildred Quintana Ruiz, Said Eduardo Aranda Espinoza, Carlos Alejandro, Moreno Aguilar, José Luis, Arauz Lara. Internalization of Carbon Nanotubes in Biological Membranes. *Biophysical Journal*. 110(3), 244A, 2016. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.1345>.
11. Zhang M.; Yang M.; Morimoto T.; Tajima N.; Ichiraku K.; Fujita K.; Iijima S.; Yudasaka M.; Okazaki T. Size-dependent cell uptake of carbon nanotubes by macrophages: A comparative and quantitative study. *Carbon* 2018, 127, 93-101, doi:10.1016/j.carbon.2017.10.085.

REVENDICARI

1. Procedeu de obținere a unor compoziții pe baza de nanotuburi de carbon (MWCNTs) și două medicamente –*Pemetrexed*(Pm) și *Quercitină* (Q), caracterizat prin aceea că, cuprinde: o etapă de contactare timp de 24 h a nanotuburilor de carbon (MWCNTs) cu soluții etanolice de Pm/Q/Pm-Q urmată de centrifugare la 8000 rpm, timp de 30 minute și filtrare.
2. Procedeu conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că, sistemele sunt alcătuite într-un raport de greutate de: 1:1 MWCNTs-Pm; 1:0.1 MWCNTs-Q și 1:1:0.1 MWCNTs-Pm-Q;
3. Sistemele obținute conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că prezintă valori ale potențialului electrocinetic ce variază între -16,3 ÷ -23,9 mV comparativ cu MWCNTs de -8,27 mV și dimensiuni cuprinse 369 -463 nm comparativ cu 696 nm cu MWCNTs;
4. Sistemul MWCNTs-Pm-Q obținut conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că a prezentat cea mai mare scădere a viabilității celulelor tumorale pancreatice PANC-1, nivelul viabilității a scăzut semnificativ cu 40% față de control, ($p < 0.01^{**}$), la o doză de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs + $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pm + $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Q

50

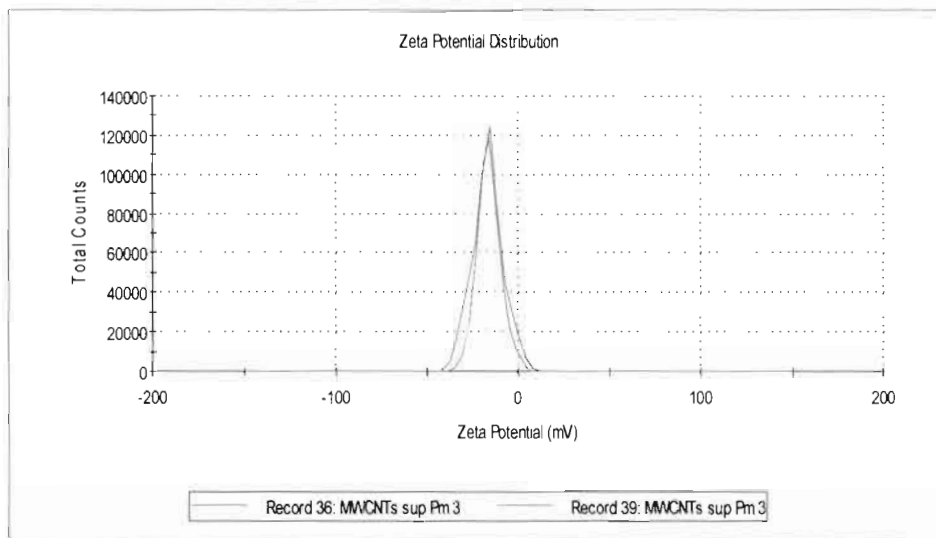
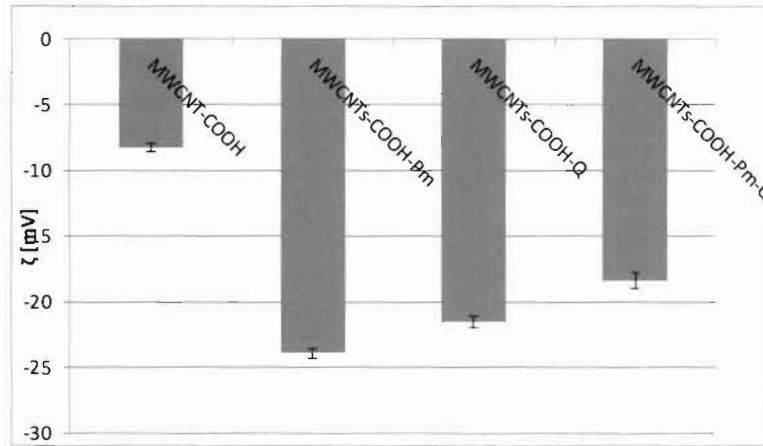
Fig. 1 Spectrele ATR-IR



Handwritten signature or mark.

69

Fig. 2. Stabilitatea fizică a probelor



[Handwritten signature]

Fig3 Reprezentare selectiva a distributiei dimensiunii particulelor (analiza DLS)

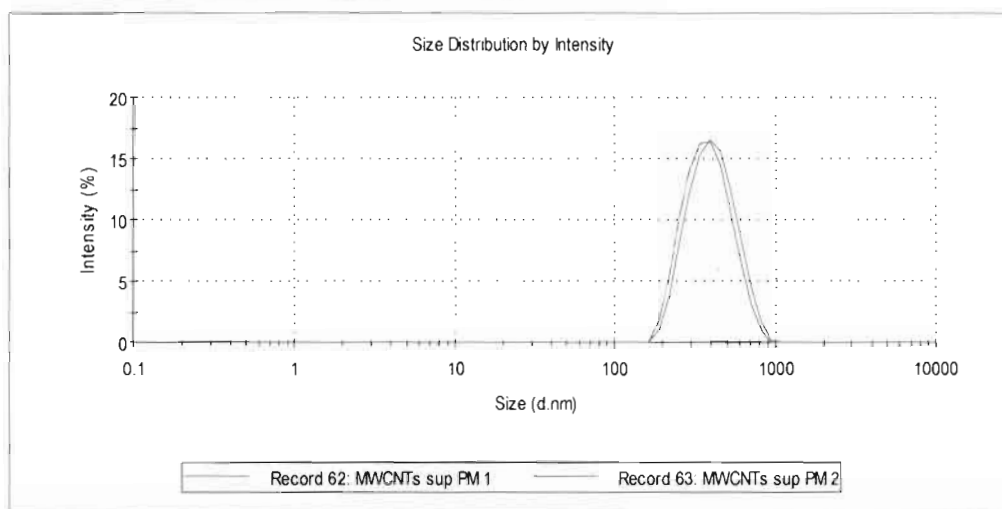
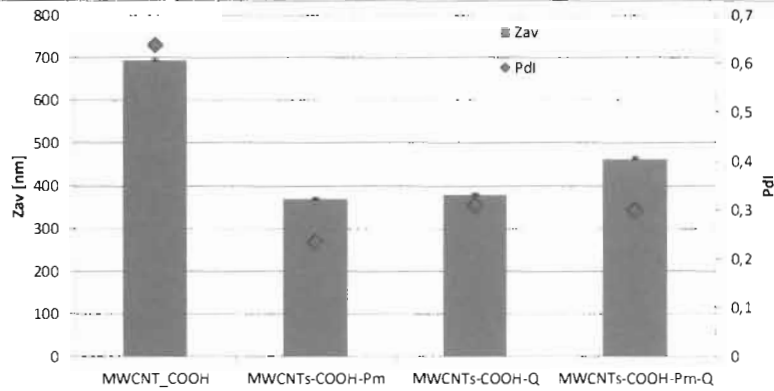
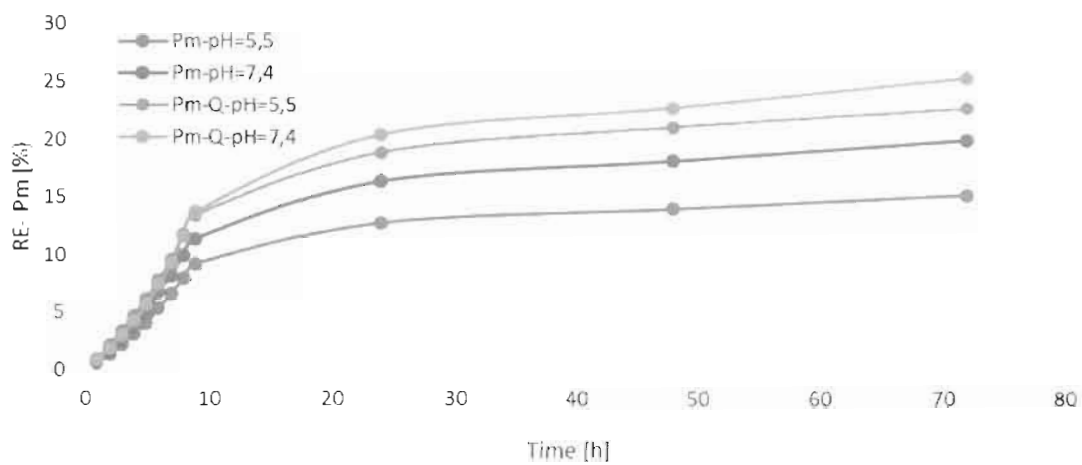


Fig.4 Profilul eliberării pemetrexedului în sistemele MWCNTs-Pm și MWCNTs-Pm-Q în funcție de pH



67

Fig.5 Profilul eliberării pemetrexedului în sistemele MWCNTs-Q si MWCNTs-Pm-Q în funcție de pH

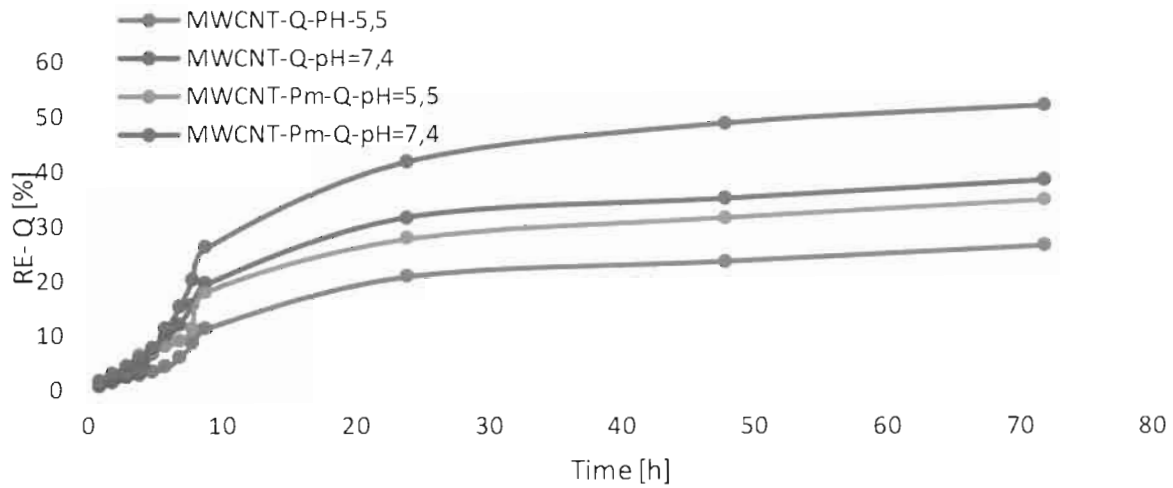
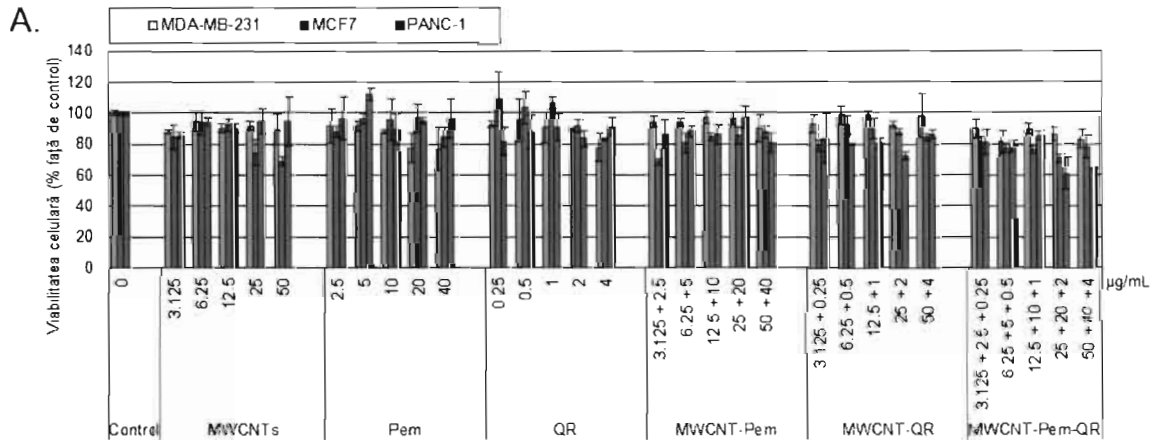


Figura 6. Efectul nanotuburilor, Pemetrexedului și a quercitinei asupra viabilității celulelor MDA-MB-231, MCF7 și PANC1 după o perioadă de 24 de ore de expunere. A. Reprezentarea grafică a nivelului viabilității celulare după tratament. Controlul este reprezentat de celule netratate și considerat ca având o viabilitate de 100%. B. Semnificația statistică corespunzătoare fiecărei probe față de control *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Notațiile d1-d5 reprezintă dozele de tratament. Pem = Pemetrexet, QR = quercitină.



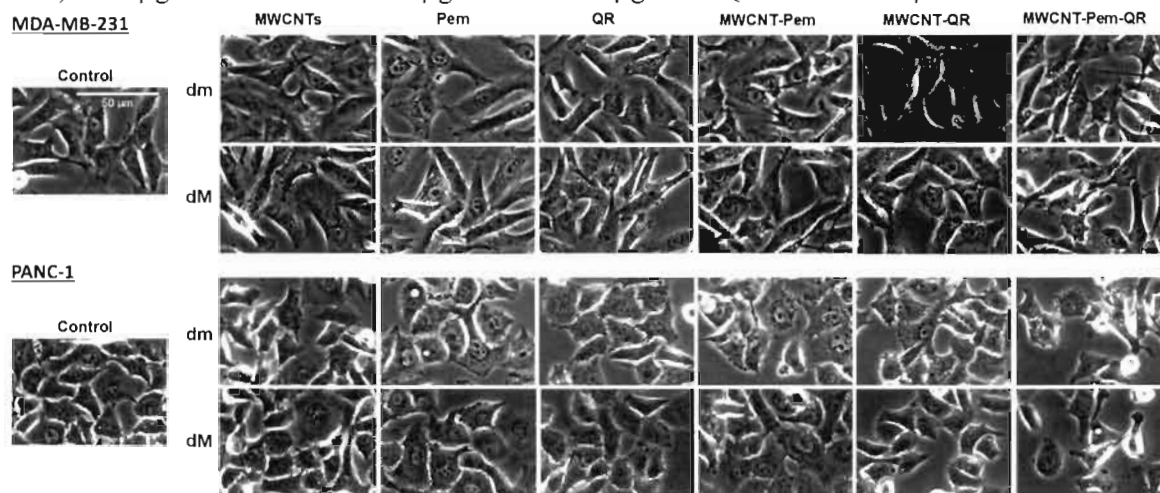
B.

doza	MDA-MB-231					MCF7					PANC-1				
	d1	d2	d3	d4	d5	d1	d2	d3	d4	d5	d1	d2	d3	d4	d5
MWCNTs	***	-	*	-	-	-	-	-	*	***	***	*	*	-	-
Pem	-	*	-	-	-	**	-	-	-	*	-	-	-	-	-
QR	**	-	-	-	*	-	-	-	*	***	-	-	-	*	-
MWCNT-Pem	-	*	-	-	-	***	*	***	*	*	-	*	*	-	*
MWCNT-QR	-	-	-	-	-	**	-	-	**	**	-	***	**	***	**
MWCNT-Pem-QR	-	-	-	**	-	**	**	***	***	*	*	**	**	**	***

Signature

66

Figura 7. Imagini în contrast de fază cu câmpuri de celule MDA-MB-231 și PANC-1 după 24 de ore de expunere la nanotuburi de carbon (MWCNTs), Pemetrexet (Pem) și quercitină (QR) în 2 doze. dm (doza mică) = $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR; dM (doza mare) = $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR. Scala = $50 \mu\text{m}$.



66

65

Figura 8. Preluarea nanotuburilor simple și conjugate cu Pemetrexet și quercitină la nivelul celulelor MDA-MB-231 și PANC-1. A. Marcarea lizozomilor cu LysoTracker Green (fluorescența verde) și a nucleilor cu DAPI (fluorescență albastră); B. Cuantificarea conținutului de nanotuburi din lizatul celular. dm (doza mică) = $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR; dM (doza mare) = $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR. Scala = $50 \mu\text{m}$.

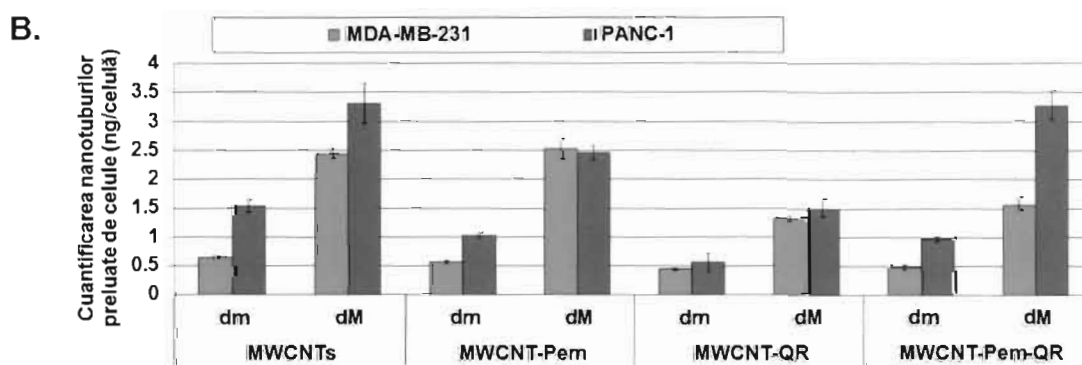
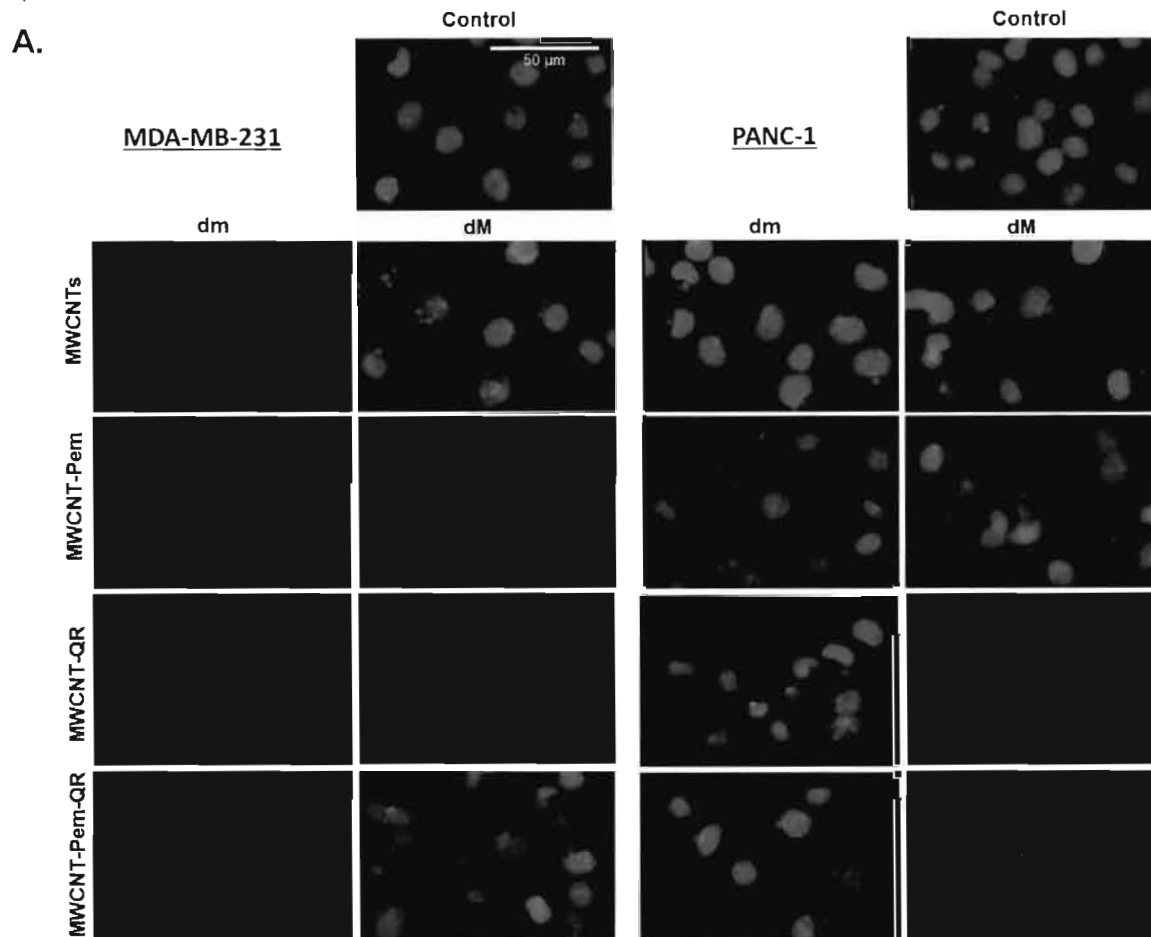


Figura 9. Nivelul de SRO generate în prezența nanotuburilor, Pemetrexetului și a quercitinei după 24 ore de expunere în celulele MDA-MB-231 și PANC-1. dm (doza mică) = $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR; dM (doza mare) = $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs/ $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pem/ $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QR. Rezultatele au fost semnificative pentru * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

