REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Nanodispozitive pentru transport la țintă și senzori pentru detecția unor biomarkeri

Doctorand **Alexandra Pusta**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Cecilia Cristea**

CUPRINS

INTRODUCERE ... **4**
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ... **4**
CONTRIBUȚII PERSONALE ... **5**
1. Scopul și obiectivele lucrării ... **5**
2. Metodologie generală ... **6**
3. Studiul 1. Dezvoltarea unui dispozitiv pentru detectarea electrochimică a carboplatinei din nanozomi ... **6**
3.1. Introducere ... 6
3.2. Obiective ... 6
3.3. Materiale și metode ... 7
3.4. Rezultate și discuții ... 7
3.5. Concluzii ... 8
4. **Studiul 2. Dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru detectarea directă a doxorubicinei din forme farmaceutice și probe biologice** ... **8**
4.1. Introducere ... 8
4.2. Obiective ... 8
4.3. Materiale și metode ... 8
4.4. Rezultate și discuții ... 8
4.5. Concluzii ... 9
5. **Studiul 3. Dezvoltarea unor sisteme de transport la țintă bazate pe nanoparticule de aur pentru tratamentul carcinomului hepatocelular** ... **9**
5.1. Introducere ... 9
5.2. Obiective ... 9
5.3. Materiale și metode ... 10
5.4. Rezultate și discuții ... 10
5.5. Concluzii ... 10
6. **Studiul 4. Dezvoltarea unor sisteme de transport la țintă bazate pe nanoparticule magnetice pentru transportul activ al sorafenibului** ... **10**
6.1. Introducere ... 10
6.2. Obiective ... 10
6.3. Materiale și metode ... 11
6.4. Rezultate și discuții ... 11
6.5. Concluzii ... 11
7. **Studiul 5. Dezvoltarea unei metode pentru detectarea electrochimică directă a sorafenibului** ... **12**
7.1. Introducere ... 12
7.2. Obiective ... 12
7.3. Materiale și metode ... 12

7.4. Rezultate și discuții 12
7.5. Concluzii 12
8. **Studiul 6. Dezvoltarea unui aptasenzor impedimetric pentru detectarea celulelor tumorale circulante HepG2 .... 13**
8.1. Introducere 13
8.2. Obiective 13
8.3. Materiale și metode 13
8.4. Rezultate și discuții 13
8.5. Concluzii 13
9. Concluzii generale 14
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei 14
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 14

CUVINTE CHEIE: sisteme de transport la țintă ; biomarkeri ; aptasenzori electrochimici ; caracterizare electrochimică.

INTRODUCERE

Cancerul este o patologie cu incidență și mortalitate crescută, iar dezvoltarea de noi metode de diagnostic și tratament pentru această patologie reprezintă un interes major al comunității științifice. La ora actuală, tratamentul cancerului se poate realiza cu ajutorul diverselor tehnici chirurgicale, radioterapeutice sau farmacologice. Tratementul chimioterapeutic prezintă o serie de limitări, cum ar fi toxicitatea nespecifică crescută, iar terapiile moleculare țintite, deși superioare ca profil de siguranță, sunt limitate de apariția rezistenței la terapie.

În ultimii ani, au fost dezvoltate o serie de sisteme pentru transportul la țintă al chimioterapicelor și al substanțelor utilizate pentru terapia moleculară țintită, pentru a reduce efectele adverse și a crește eficiența acestora. În cercetarea preclinică a acestor formulări, este important să se cuantifice cu exactitate cantitatea de substanță medicamentoasă încărcată și eliberată din acestea, pentru a asigura performanțe optime *in vivo*. Pentru acest scop, există numeroase tehnici aplicate în mod curent în analiza farmaceutică, toate prezentând avantaje și dezavantaje specifice. Metodele electrochimice au fost utilizate în ultimii ani pentru detectarea numeroaselor chimioterapice, acestea reprezentând o potențială metodă alternativă la metodele clasice.

Utilizarea biomarkerilor pentru detectarea timpurie a cancerelor reprezintă de asemenea un domeniu de interes în domeniul biomedical. Și în acest caz, utilizarea metodelor electrochimice pentru cuantificarea acestor biomarkeri poate reprezenta o metodă de interes.

Scopul acestei lucrări a fost dezvoltarea unor sisteme de transport la țintă pentru taratmentul cancerelor și caracterizarea acestora cu ajutorul unor metode electrochimice rapide, simple și performante. De asemenea, s-a avut în vedere dezvoltarea și optimizarea unor metode electrochimice pentru detectarea unor biomarkeri din probe biologice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul reprezintă o problemă majoră de sănătate publică la nivel global. Doar în anul 2022 au fost raportate aproximativ 19,9 milioane de cazuri noi la nivel mondial și 9,7 milioane de decese [1]. Atât incidența cât și mortalitatea cauzate de cancer sunt în creștere, estimându-se că în anul 2045 [1] se vor raporta aproximativ 32,6 milionae de cazuri noi și 16,9 milioane de decese.

Principalele metode de tratament utilizate în afecțiunile oncologice sunt: intervențiile chirurgicale, radioterapia și terapia sistemică. Terapia sistemică include chimioterapia, terapia țintită, imunoterapia și terapia hormonală [2]. Chimioterapia prezintă o serie de reacții adverse nespecifice, cum ar fi mielosupresia, grețurile, vărsăturile, alopecia, mucozita, diareea și reacțiile de hipersensibilitate. Terapia moleculară țintită a cancerului a apărut ca alternativă la chimioterapie, în încercarea de a reduce reacțiile adverse ale acesteia. În ciuda profilului de siguranță superior chimioterapicelor, eficacitatea moleculelor mici utilizate în terapia cancerului este limitată de apariția rezistenței la tratament [3,4,].

În ultimii ani, au fost dezvoltate diverse strategii pentru terapia cancerului, printre care un rol important îl au sistemele de livrare țintită a medicamentelor (DDS). Utilizarea acestora are ca scop reducerea reacțiilor adverse sistemice și evitarea apariției rezistenței, prin livrarea acestora direct la nivelul tumorii. Există numeroase tipuri de nanostructuri sau nanoparticule (NP) care se utilizează ca bază pentru dezvoltarea DDS, cum ar fi structurile lipidice (lipozomii [5-8], micele) dendrimerii [9-11], NP metalice [12-13] sau structurile pe bază de carbon [14], precum și diverse structuri polimerice. DDS bazate pe nanostructurile menționate anterior pot fi livrate la țintă utilizând diferite strategii: (i) *transportul pasiv*, (ii) *transportul activ* sau (iii) transportul bazat pe *nanoroboți*. În dezvoltarea DDS, este important să se cuantifice cu exactitate cantitatea de substanță medicamentoasă încărcată și eliberată din acestea. Acest lucru se realizează prin calcularea parametrilor specifici încărcării, EE% și LC%, precum și prin evaluarea profilurilor de cedare cumulativă.

Un alt aspect important în ceea ce privește management-ul afecțiunilor oncologice este reprezentat de diagnosticul timpuriu. Acesta se poate stabili utilizând o varietate de metode, printre care detectarea unor biomarkeri. Detectarea acestora din fluide biologice se poate realiza printr-o serie de metode analitice imunologice, cromatografice sau genetice.

Meotdele electrochimice reprezintă metode de interes atât pentru caracterizarea DDS, cât și pentru evaluarea unor biomarkeri din probe biologice. Senzorii electrochimici prezintă o serie de avantaje cum ar fi: posibilitatea de analiză descentralizată, portabilitatea, selectivitatea și sensibilitatea crescute, costurile reduse, precum și posibilitatea ca, odată optimizați, să fie utilizați de personal cu o pregătire minimă.

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Scopul și obiectivele lucrării

Lucrarea de față a avut în vedere două direcții de cercetare complementare și a avut ca scop dezvoltarea unor DDS pentru chimioterapice utilizate în tratamentul cancerelor, precum și dezvoltarea unor senzori pentru detectarea timpurie a unor biomarkeri pentru cancer. De asemenea, un obiectiv important a fost optimizarea unor metode electrochimice pentru detectarea chimioterapicelor încărcate în DDS, pentru a facilita analiza acestora prin tehnici rapide, sensibile și accesibile.

2. Metodologie generală

În cadrul *Studiilor 1* și *2* au fost utilizați electrozi imprimați serigrafic (C-SPE) fabricați în laborator prin imprimare manuală cu ajutorul unor cerneluri electro-conducătoare de grafit și argint.

Detectarea electrochimică a chimioterapicelor de interes a vizat studierea comportamentului lor electrochimic cu ajutorul voltametriei ciclice (CV) sau a voltametriei puls-diferențiale (DPV), urmate de optimizarea metodei și, în final, de determinarea parametrilor analitici (limită de detecție, limită de cuantificare, domeniu de liniaritate, sensibilitate), a selectivității și a aplicabilității metodei pe probe reale.

Chimioterapicele de interes au fost încărcate și eliberate în/din DDS de tip nanozomi sau nanoparticule metalice. Determinarea cantității de chimioterapic încărcată/eliberată s-a realizat în fiecare caz atât cu ajutorul metodelor electrochimice dezvoltate, cât și cu ajutorul unei metode spectrofotometrice UV-Vis de control, iar rezultatele obținute au fost comparate și evaluate statistic.

Sistemele de transport la țintă dezvoltate în cadrul *Studiilor 3* și *4* au fost funcționalizate cu aptamerul TLS11a, specific pentru celulele tumorale hepatice HepG2, pentru a asigura selectivitate față de țesutul tumoral hepatic. Citotoxicitatea DDS dezvoltate a fost evaluată în culturi de celule HepG2 și celule sănătoase.

Apatmerul TLS11a a fost utilizat de asemenea și pentru dezvoltarea unui aptasenzor pentru detectarea celulelor tumorale circulante HepG2.

3. Studiul 1. Dezvoltarea unui dispozitiv pentru detectarea electrochimică a carboplatinei din nanozomi

3.1. Introducere

Carboplatina (CBP) este un chimioterapic pe bază de platină utilizat în tratamentul cancerului ovarian avansat [15], carcinomului pulmonar cu celule mici [16] și al cancerelor de cap și gât [17]. CBP este cunoscută pentru efectele sale secundare sistemice, cum ar fi mielosupresia, nefrotoxicitatea, ototoxicitatea, cardiotoxicitatea și neurotoxicitatea periferică [18]. Apariția acestor efecte secundare ar putea fi amânată sau eliminată prin încapsularea CBP în DDS.

3.2. Obiective

Scopul studiului a fost dezvoltarea unui dispozitiv pentru detectarea electrochimică directă a CBP și aplicarea acestuia pentru analiza CBP încărcate și eliberate în/din DDS de tip nanozomi. Obiectivele urmărite în acest sens au fost caracterizarea electrozilor obținuți în laborator, determinarea comportamentului electrochimic al CBP și determinarea parametrilor analitici, precum și încărcarea/ eliberarea CBP în/din nanozomi și caracterizarea acestora utilizând metoda electrochimică dezvoltată .

3.3. Materiale și metode

Performanțele C-SPE obținuți în laborator au fost evaluate și comparate cu cele ale unor electrozi comericali similari cu ajutorul CV și spectroscopiei de impedanță electrochimice (EIS) într-o soluție de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ de concentrație 10 mM.

A fost evaluată influența pH-ului și a vitezei de baleiaj asupra comportamentului electrochimic al CBP cu ajutorul CV. S-a dezvoltat o metodă de detectare electrochimică directă a CBP bazată pe DPV.

Nanozomii comerciali au fost încărcați cu CBP și ulterior s-a evaluat eliberarea acesteia în soluții de tampon fosfat (PBS) cu pH 5, 6 și 7,4. Metoda DPV dezvoltată a fost aplicată pentru caracterizarea nanozomilor, precum și pentru detectarea CBP din probe biologice simulate.

3.4. Rezultate și discuții

Electrozii obținuți manual în laborator au demonstrat performanțe superioare față de cei comericali, după aplicarea unui protocol de pre-tratement electrochimic prin amperometrie la un potențial constant de + 1,2 V într-o soluție de Na_2CO_3 de concentrație 1 M. Electrozii pre-tratați astfel au fost utilizați în continuare pentru realizarea *Studiilor 1* și *2*.

Oxidarea CBP la nivelul C-SPE obținuți în laborator a fost un proces ireversibil, influențat de pH. Semnalul maxim de oxidare a fost înregistrat la pH 4.

Rezultatele privind influența vitezei de baleiaj au indicat că, per ansamblu, procesul de electro-oxidare este controlat atât de procese de difuzie, cât și de adsorbție. Acest fenomen poate fi datorat naturii suprafeței electrodului imprimat în laborator, care poate prezenta rugozități și neregularități.

CBP a putut fi detectată cu ajutorul metodei DPV optimizate pe un domeniu liniar cuprins între 5 și 500 µg/mL, cu o limită de detecție estimată de 1,6 µg/mL și o sensibilitate de 0,145 µA mL/µg.

Metoda a fost aplicată pentru evaluarea CBP încărcate în nanozomi și rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin metoda UV-Vis. S-au obținut valori ale variabilității între metode de ±2,38% pentru EE%, respectiv ±1,76% pentru LC%. Variabilitatea redusă între cele două metode indică faptul că metoda DPV poate fi utilizată cu succes pentru studiile de încărcare. Eliberarea CBP din nanozomi a fost evaluată la pH 5, 6 și 7,4, iar eliberarea maximă s-a obținut în cazul soluției cu pH 5. Eliberarea la pH 5 a fost evaluată prin metoda DPV și UV-Vis și analizată statistic utilizând testul ANOVA, iar diferența între metodele evaluate nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic, demonstrând un coeficient de regresie acceptabil de 0,984 ($p < 0,001$) și o pantă de 0,837.

Metoda DPV a fost aplicată și pe probe reale de ser sangvin, salivă și lacrimi artificiale, diluate cu soluție tampon în raport 1:10. S-au obținut grade de recuperare cuprinse între 92% și 106%.

3.5. Concluzii

În cadrul studiului a fost dezvoltată o metodă electrochimică pentru detectarea CBP, bazată pe oxidarea ireversibilă a acesteia la nivelul C-SPE imprimați manual în laborator. Metoda a fost utilizată cu succes pentru evaluarea CBP încărcate și eliberate din DDS de tip nanozomi, demonstrând posibilitatea aplicării metodelor electrochimice în controlul calității formelor farmaceutice [19].

4. Studiul 2. Dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru detectarea directă a doxorubicinei din forme farmaceutice și probe biologice

4.1. Introducere

Doxorubicina (DOX) este un agent chimioterapic din clasa antraciclinelor, utilizată singură sau în combinație în tratamentul unor cancere cum ar fi cele de sân, vezică urinară, ovar, precum și în diverse forme de leucemii și limfoame [20,21]. În ciuda eficacității sale ridicate, utilizarea DOX este asociată cu numeroase efecte secundare, cum ar fi greața, vărsăturile, alopecia, scăderea imunității și cardiotoxicitatea. Apariția acestor efecte secundare ar putea fi amânată sau eliminată prin încapsularea CBP în DDS.

4.2. Obiective

Scopul principal al studiului a fost dezvoltarea unui senzor electrochimic bazat pe C-SPE obținuți în laborator, funcționalizați cu nanoparticule de aur (AuNP) pentru detectarea directă a DOX și aplicarea acestuia pentru cuantificarea DOX încărcate și eliberate din DDS de tip nanozomi și din probe biologice.

4.3. Materiale și metode

Suprafața C-SPE a fost funcționalizată prin depunerea electrochimică a AuNP dintr-o soluție de $HAuCl_4$.. Funcționalizarea cu AuNP a fost confirmată imagistic și electrochimic.

A fost studiată influența electrolitului suport, a pH-ului și a vitezei de baleiaj asupra comportamentului electrochimic al DOX cu ajutorul CV și DPV. Metoda optimizată pentru detectarea DOX s-a bazat pe DPV.

Nanozomii comerciali au fost încărcați cu DOX și ulterior s-a evaluat eliberarea acesteia în soluții de PBS cu pH 5, 6 și 7,4. Metoda DPV dezvoltată a fost aplicată pentru caracterizarea nanozomilor, precum și pentru detectarea DOX din probe biologice simulate.

4.4. Rezultate și discuții

Metoda optimizată pentru depunerea AuNP a constat în CV prin baleierea potențialului între – 0,2 și +1,4 V cu o viteză de baleiaj de 100 mV/s, timp de 25 cicluri, dintr-o soluție de $HAuCl_4$ de concentrație 5 mM. Analizele SEM și EDX au confirmat prezența AuNP pe suprafața electrozilor de lucru.

Electro-oxidarea reversibilă a DOX a fost dependentă de pH, iar valoarea maximă a semnalului de oxidare a fost înregistrată la pH 7. Procesul de electro-oxidare a fost preponderent controlat de adsorbție.

DOX a putut fi detectată cu ajutorul metodei DPV optimizate pe un domeniu liniar cuprins între 1 și 500 μg/mL, cu o limită de detecție estimată de 0,33 μg/mL și o sensibilitate de 7,82 μA mL/μg.

Metoda a fost aplicată pentru evaluarea DOX încărcate în nanozomi și rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin metoda UV-Vis. S-au obținut valori ale reduse variabilității între metode. Eliberarea DOX din nanozomi a fost evaluată la pH 5, 6 și 7,4, iar eliberarea maximă s-a obținut în cazul soluției cu pH 6. Au fost comparate profilurile de eliberare cumulativă obținute la pH 6 prin metodele DPV și UV-Vis și s-a determinat o corelație medie de 94,32%, având în vedere un timp de eliberare de 72 de ore.

Metoda DPV a fost aplicată și pe probe reale de ser sanguin, diluate cu soluție tampon în raport 1:50. S-au obținut grade de recuperare cuprinse între 97,52% și 113,21%.

4.5. Concluzii

A fost dezvoltată o metodă electrochimică pentru detectarea DOX, bazată pe oxidarea reversibilă a acesteia la nivelul C-SPE imprimați manual în laborator și modificați cu AuNP. Metoda a fost utilizată cu succes pentru evaluarea DOX încărcate și eliberate din DDS de tip nanozomi, precum și din probe diluate de ser [22].

5. Studiul 3. Dezvoltarea unor sisteme de transport la țintă bazate pe nanoparticule de aur pentru tratamentul carcinomului hepatocelular

5.1. Introducere

Carcinomul hepatocelular (HCC) reprezintă una dintre cele mai frecvente și letale forme de cancer hepatic, având o incidență în continuă creștere la nivel mondial [23]. Sorafenibul (SOR), un inhibitor multi-kinazic, este unul dintre medicamentele utilizate ca opțiune de primă linie în tratamentul sistemic al HCC avansat [24]. Deși s-a demonstrat că acesta crește rata de supraviețuire a pacienților, SOR prezintă dezavantaje precum solubilitatea scăzută în apă [25], biodisponibilitatea redusă, efectele secundare sistemice și eficiența scăzută în cazul anumitor pacienți [24].

5.2. Obiective

Scopul principal al studiului a fost dezvoltarea unor AuNP modificate cu aptamerul TLS11a și cu SOR pentru tratamentul HCC. S-au determinat condițiile optime de fabricare și s-a realizat caracterizarea NP modificate după fiecare etapă de funcționalizare, prin diverse tehnici spectroscopice. S-au evaluat parametrii caracteristici pentru încărcarea cu SOR și eliberarea acestuia, precum și citotoxicitatea *in vitro* pe două linii celulare: celulele canceroase HepG2 și fibroblaști sănătoși.

5.3. Materiale și metode

Au fost utilizate AuNP comerciale modificate cu polietilenglicol și grupări carboxil. Grupările carboxil au fost activate cu ajutorul amestecului NHS/EDC iar aptamerul a fost imobilizat la nivelul acestora prin formarea unei legături amidice. Ulterior, a avut loc încărcarea cu SOR prin incubarea AuNP modificate într-o soluție concentrată de SOR timp de 72 ore. Eliberarea SOR a fost evaluată în PBS cu pH 5,5, pentru a simula condițiile din mediul tumoral. Citotoxicitatea AuNP obținute a fost studiată pe celule HepG2 și fibroblaști cu ajutorul testului Alamar Blue.

5.4. Rezultate și discuții

Au fost optimizați următorii parametri ai procesului de fabricație: timpul de incubare cu aptamer, temperatura de incubare cu aptamer, concentrația aptamerului, timpul de încărcare cu SOR și solventul utilizat pentru prepararea soluției de SOR. În ciuda optimizărilor, valoarea obținută pentru EE% a fost de 16,33%, valoare care a fost considerată insuficientă. Eliberarea SOR a fost evaluată în PBS la pH 5,5 și s-a obținut o eliberare a doar 26,5% din cantitatea totală de SOR încărcată după 24 ore. DDS rezultate nu au demonstrat citotoxicitate semnificativă față de celulele HepG2, ci doar față de celulele sănătoase, ceea ce a fost în detrimentul scopului studiului.

5.5. Concluzii

S-a încercat dezvoltarea unor AuNP funcționalizate cu PEG și aptameri și încărcate cu SOR pentru tratamentul HCC. În ciuda optimizărilor realizate, funcționalizarea cu aptamer, încărcarea și eliberarea SOR, precum și efectele citotoxice *in vitro* nu au fost corespunzătoare.

6. Studiul 4. Dezvoltarea unor sisteme de transport la țintă bazate pe nanoparticule magnetice pentru transportul activ al sorafenibului

6.1. Introducere

Nanoparticulele magnetice (MNP) reprezintă candidați promițători pentru livrarea țintită a medicamentelor datorită capacității lor mari de încărcare, superparamagnetismului, costurilor reduse de producție și ușurinței funcționalizării lor cu diferite grupări funcționale [26,27]. Aceastea permit modificarea suplimentară cu structuri care pot îmbunătăți proprietățile de țintire, cum ar fi anticorpii, peptidele sau aptamerii [28].

6.2. Obiective

Scopul principal al acestui studiu a fost dezvoltarea unor MNP funcționalizate cu aptamerul TLS11a și încărcate cu SOR pentru tratamentul HCC. Principalele obiective au fost realizarea și confirmarea funcționalizării cu aptamer, optimizarea încărcării și eliberării SOR, precum și evaluarea citotoxicității și internalizării celulare în celule HepG2 și în fibroblaști.

6.3. Materiale și metode

MNP au fost obținute prin descompunere termică, iar suprafața lor a fost funcționalizată cu acid azelaic. Ulterior, grupările carboxil din structura acidului azelaic au fost activate cu amestec NHS/EDC și s-a realizat imobilizarea aptamerului prin legături amidice. A avut loc încărcarea cu SOR prin incubarea MNP modificate într-o soluție concentrată de SOR timp de 72 ore. Funcționalizarea cu aptamer și cu SOR a fost confirmată prin tehnici imagistice, spectrale și electrochimice. Eliberarea SOR a fost evaluată în PBS cu pH 5,5 și 7,4 pentru a simula condițiile din mediul tumoral și din țesuturile sănătoase. Citotoxicitatea și internalizarea celulară a MNP obținute a fost studiată pe celule HepG2 și fibroblaști.

6.4. Rezultate și discuții

Au fost optimizați următorii parametri: timpul de incubare cu aptamer, temperatura de incubare cu aptamer, concentrația soluției de încărcare și timpul de încărcare.

Valorile obținute pentru parametrii EE% și LC% au fost de 44,3% și respectiv 3,48%. Valoarea EE% obținută este apropiată de valoarea maximă raportată în alt studiu din literatura de specialitate [29].

Aproape întreaga cantitate de SOR încărcată (97%) a fost eliberată în 24 ore la pH 5,5, în timp ce la pH 7,4 s-a eliberat doar 16,7% din cantitatea de SOR încărcată. Eliberarea favorizată de un pH mai acid reprezintă un avantaj în domeniul dezvoltării terapiilor anticanceroase, deoarece pH-ul tumoral este mai acid decât cel al țesuturilor sănătoase [26]. A fost utilizată analiza XPS pentru a valida funcționalizarea MNP cu aptamer și încărcarea acestora cu SOR.

Testele pe culturi de celule au demonstrat că funcționalizarea cu aptamer a avut un impact major asupra internalizării celulare în celulele HepG2, ducând la dublarea internalizării la toate dozele de expunere testate. În plus, internalizarea în celulele sănătoase nu a fost influențată, demonstrând selectivitatea aptamerului pentru celulele HepG2. Nanoparticulele încărcate cu SOR au demonstrat citotoxicitate față de celulele HepG2 doar la concentrații mari, însă biocompatibilitatea lor crescută față de fibroblaști reprezintă un rezultat promițător.

6.5. Concluzii

Au fost dezvoltate cu succes MNP funcționalizate cu aptameri și SOR. MNP au fost obținute prin descompunere termică, iar funcționalizarea cu aptamer și SOR au fost demonstrate prin multiple tehnici analitice. Parametrii caracteristici încărcării și eliberării SOR au fost comparabili cu cei identificați în literatură. Internalizarea celulară în celulele HepG2 a fost semnificativ influențată de prezența aptamerului, iar toixcitatea față de fibroblaști a fost neglijabilă.

7. Studiul 5. Dezvoltarea unei metode pentru detectarea electrochimică directă a sorafenibului

7.1. Introducere

Datorită importanței sale terapeutice, monitorizarea precisă și sensibilă a concentrațiilor de SOR în fluide biologice și forme farmaceutice este crucială pentru optimizarea dozelor administrate, pentru evaluarea eficacității tratamentului, dar și pentru controlul calității unor forme farmaceutice nou-dezvoltate.

7.2. Obiective

Scopul studiului a fost dezvoltarea unei metode de detectare directă a SOR folosind SPE comerciali. Metoda a fost dezvoltată cu scopul aplicării ei pentru analiza sistemelor de transport la țintă de tip MNP, precum și pentru analiza SOR din alte forme farmaceutice sau probe biologice.

7.3. Materiale și metode

A fost evaluată influența materialului electrodic, a pH-ului și a vitezei de baleiaj asupra comportamentului electrochimic al SOR cu ajutorul CV. S-a dezvoltat o metodă de detectare electrochimică directă a SOR bazată pe acumularea acestuia pe suprafața electrodică, urmată de CV într-o soluție de acid sulfuric. Metoda a fost aplicată pentru caracterizarea MNP dezvoltate în studiul precedent, precum și pentru dozarea SOR din probe biologice.

7.4. Rezultate și discuții

Suprafața electrodică optimă a fost cea de carbon mezoporos ordonat. Electro-oxidarea reversibilă a SOR a fost dependentă de pH, iar valoarea maximă a semnalului de oxidare a fost înregistrată la pH 6. Procesul de electro-oxidare a fost preponderent controlat de difuzie.

SOR a putut fi detectat cu ajutorul metodei CV optimizate pe un domeniu larg de concentrație. S-au identificat două domenii de liniaritate, 0,1 – 50 µg/mL și, respectiv 50 și 500 µg/mL, cu o limită de detecție estimată de 33 ng/mL și o sensibilitate de 3,35 µA mL/µg, respectiv de 1,06 µA mL/µg pe al doilea domeniu de liniaritate.

Metoda CV optimizată a fost aplicată pentru evaluarea procesului de încărcare a SOR în MNP, însă s-a obținut o variabilitate de aproximativ 50% față de metoda spectrofotometrică UV-Vis, motiv pentru care metoda electrochimică nu a putut fi aplicată pentru acest scop. În schimb, detectarea SOR din probe de ser diluat în raport de 1:100 a condus la grade acceptabile de recuperare a semnalului analitic.

7.5. Concluzii

A fost dezvoltat un senzor electrochimic pentru detectarea directă a SOR pe baza semnalului său de oxidare. Metoda optimizată a constat în acumularea SOR urmată de CV într-o soluție de acid sulfuric. Metoda optimizată a fost aplicată pentru evaluarea SOR din probe biologice diluate.

8. Studiul 6. Dezvoltarea unui aptasenzor impedimetric pentru detectarea celulelor tumorale circulante HepG2

8.1. Introducere

Celulele tumorale circulante (CTC) sunt celule canceroase care se desprind din tumora primară și intră în fluxul sanguin, migrând către organele secundare și generând metastaze [30]. CTC sunt prezente în sângele periferic în concentrații reduse, variind de la 1 la 3000 celule/mL [31]. Celulele HepG2 sunt CTC care pot fi prezente în sângele pacienților care suferă de HCC. Detectarea CTC prin metode minim invazive ar putea favoriza diagnosticarea precoce și o gestionare mai bună a HCC.

8.2. Obiective

Scopul studiului a fost dezvoltarea unei platforme electrochimice pentru detectarea rapidă și selectivă a celulelor tumorale circulante HepG2, utilizate ca potențiali biomarkeri pentru HCC. În acest sens, suprafața unor C-SPE comericali a fost modificată cu un material compozit, iar ulterior s-a realizat funcționalizarea cu aptamerul TLS11a și incubarea cu celule HepG2 în vederea detectării lor impedimetrice.

8.3. Materiale și metode

Suprafața C-SPE a fost modificată cu o suspensie formată din chitosan (Chi), oxid de grafen (GO) și nanoparticule de polianilină (PolyNP). Grupările carboxil din structura GO au fost activate și ulterior s-a imobilizat aptamerul printr-o procedură asistată de amperometria multipuls. Pentru prevenirea adsorbției nespecifice, situsurile nefuncționalizate cu aptamer au fost blocate utilizând o soluție de BSA 0,5%, iar în final a avut loc incubarea cu celule și detectarea lor prin EIS. Fiecare etapă a fost caracterizată cu ajutorul EIS și a tehnicilor microscopice.

8.4. Rezultate și discuții

Depunerea suspensiei a condus la creșterea electro-conductivității suprafeței electrodice. Imobilizarea aptamerului prin amperometrie multipuls a fost mai eficientă față de imobilizarea simplă și a condus la scăderea duratei etapei de imobilizare la doar 3 minute. Celulele HepG2 au putut fi detectate prin EIS pe un interval larg de concentrație, cuprins între 10 și 200000 celule/mL, cu o limită de detecție de 10 celule/mL. Incubarea altor tipuri de celule pe suprafața electrozilor modificați nu a condus la modificarea semnalelor electrochimice, demonstrând selectivitatea metodei. Metoda a fost aplicată pe probe de ser comerical nediluate, iar gradele de recuperare obținute au fost cuprinse între 93,5% și 115%.

8.5. Concluzii

A fost dezvoltat cu succes un aptasenzor electrochimic impedimetric bazat pe aptamerul TLS11a pentru detectarea celulelor HepG2. Platforma nanostructurată s-a bazat pe electrozi funcționalizați cu oxid de grafen, chitosan și nanoparticule de polianilină. Aptasenzorul a demonstrat selectivitate și stabilitate crescute, fiind adecvat pentru analiza probelor de ser uman nediluat îmbogățit cu celule HepG2 [32].

9. Concluzii generale

În această lucrare s-au dezvoltat sisteme de transport la țintă pasiv pentru doxorubicină și carboplatină și două sisteme de transport activ pentru sorafenib, bazate pe nanoparticule de aur, respectiv nanoparticule magnetice. Au fost dezvoltate de asemenea metode electrochimice pentru detectarea celor trei substanțe active. De asemenea, s-a dezvoltat un aptasenzor electrochimic pentru detectarea celulelor tumorale circulante HepG2, utilizate ca biomarkeri pentru carcinomul hepatocelular. Astfel, au fost atinse obiectivele propuse pentru toate direcțiile de cercetare vizate.

10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei constă în dezvoltarea unor noi sisteme de transport la țintă precum și a unor metode electrochimice rapide și facile pentru cuantificarea substanțelor medicamentoase încărcate și eliberate din acestea. De asemenea, teza propune dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic pentru detectarea celulelor HepG2, utilizate ca biomarkeri pentru carcinomul hepatocelular.

Aspectele inovative propuse vizează utilizarea unor electrozi imprimați obținuți manual în laborator, care prezintă performanțe superioare celor comerciali. De asemenea, metodele dezvoltate pentru detectarea DOX și CBP au demonstrat rezultate comparabile cu cele obținute utilizând metodele spectrofotomerice, fiind în același timp ușor de utilizat, rapide și economice.

Teza propune, pentru prima dată, utilizarea combinată a nanoparticulelor magnetice și a aptamerilor pentru transportul la țintă al sorafenibului.

De asemenea, un alt aspect inovativ al acestei lucrări este utilizarea amperometriei multipuls pentru imobilizarea aptamerilor cu grupare amino terminală pe suprafața electrodului modificat. Procedura a permis scurtarea semnificativă a timpului de imobilizare, de la câteva ore la câteva minute, simplificând modul de fabricare a aptasenzorului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;(February):229–63.
2. M. Cordes L, Cuellar S. Cancer: The Disease and Treatment. In: DiPiro JT., Talbert RL., Yee GC., Matzke GR., Wells BG., editors. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 11th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
3. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):201.

4. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):87.
5. Kawano K, Furuya A, Matsuda Y, Kimura C, Yamaguchi K, Wakabayashi S, et al. Preparation of liposomes co-encapsulating doxorubicin and mifepristone for treating multidrug-resistant cancer. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;85:104605.
6. Uma Maheswari RT, Ajithkumar V, Varalakshmi P, Rajan M. CD44 tagged hyaluronic acid - chitosan liposome carrier for the delivery of berberine and doxorubicin into lung cancer cells. Int J Biol Macromol. 2023;253:126599.
7. Sun M, Wu J, Lian B, Cui J, Xu N, Xu Z, et al. Hyaluronic acid-modified liposomes Co-encapsulating curcumin and mifepristone to enhance anti-breast cancer efficacy. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104956.
8. Tran NP, Tran P, Yoo SY, Tangchang W, Lee S, Lee JY, et al. Sialic acid-decorated liposomes enhance the anti-cancer efficacy of docetaxel in tumor-associated macrophages. Biomater Adv. 2023;154:213606.
9. Kumar Jangid A, Solanki R, Ghosh M, Jadav M, Patel S, Pooja D, et al. Phenylboronic acid conjugated PAMAM G4 dendrimers augmented usnic acid delivery to gastric cancer cells. Eur Polym J. 2023;192:112073.
10. Michlewska S, Garaiova Z, Šubjakova V, Hołota M, Kubczak M, Grodzicka M, et al. Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anti-cancer drug delivery: Introducing protocols. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2023;227:113371.
11. Sheikh A, Abourehab MAS, Tulbah AS, Kesharwani P. Aptamer-grafted, cell membrane-coated dendrimer loaded with doxorubicin as a targeted nanosystem against epithelial cellular adhesion molecule (EpCAM) for triple negative breast cancer therapy. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;86:104745.
12. Khorshid M, Varshosaz J, Rostami M, Haghiralsadat F, Akbari V, Khorshid P. Anti HER-2 aptamer functionalized gold nanoparticles of dasatinib for targeted chemo-radiotherapy in breast cancer cells. Biomater Adv. 2023;154:213591.
13. Bansal K, Devi N, Aqdas M, Kumar M, Agrewala JN, Katare OP, et al. Inorganic gold nanoparticles-TAT hybrid for the effective delivery of doxorubicin into cancer cells. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104959.
14. Mohammadi S, Akbari-Birgani S, Nikfarjam N, Rasekhian M. Polyethyleneimine-decorated graphene oxide quantum dot as a carrier for suicide gene delivery to the breast cancer three-dimensional model. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104849.
15. Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, Isonishi S, Jobo T, Aoki D, et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2009 Oct;374(9698):1331–8.
16. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV, et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: The COCIS meta-analysis of individual patient data. J Clin Oncol. 2012;30(14):1692–8.
17. Cohen MH, Chen H, Shord S, Fuchs C, He K, Zhao H, et al. Approval summary: Cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil for the first-line treatment of patients

with recurrent locoregional or metastatic squamous cell head and neck cancer. Oncologist. 2013;18(4):460—466.
18. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. Dalton Trans. 2018 May;47(19):6645–53.
19. Pusta A, Tertis M, Ardusadan C, Mirel S, Cristea C. Electrochemical Sensing Device for Carboplatin Monitoring in Proof-of-Concept Drug Delivery Nanosystems. Vol. 14, Nanomaterials. 2024.
20. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. Life Sci. 2021;278(September 2020):119527.
21. Johnson-Arbor, Kelly ; Dubey R. Doxorubicin. Stat Pearls. StatPearls Publishing.
22. Pusta A, Tertis M, Bura I, Bogdan D, Suciu M, Mirel S, et al. Electrochemical Sensor for the Evaluation of Doxorubicin from Novel Pharmaceutical Formulations and Serum. Vol. 12, Chemosensors. 2024.
23. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. Vol. 7, Nature Reviews Disease Primers. Nature Research; 2021. p. 1–28.
24. Singal AG, Kanwal F, Llovet JM. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2023;20(12):864–84.
25. Aman A, Ali S, Mahalapbutr P, Krusong K, Wolschann P, Rungrotmongkol T. Enhancing solubility and stability of sorafenib through cyclodextrin-based inclusion complexation: in silico and in vitro studies. RSC Adv. 2023 Sep;13(39):27244–54.
26. Pusta A, Tertis M, Crăciunescu I, Turcu R, Mirel S, Cristea C. Recent Advances in the Development of Drug Delivery Applications of Magnetic Nanomaterials. Pharmaceutics. 2023;15(7).
27. Aslam H, Shukrullah S, Naz MY, Fatima H, Hussain H, Ullah S, et al. Current and future perspectives of multifunctional magnetic nanoparticles based controlled drug delivery systems. J Drug Deliv Sci Technol. 2022;67:102946.
28. kianfar E. Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery: a Review. J Supercond Nov Magn. 2021;34(7):1709–35.
29. Depalo N, Iacobazzi RM, Valente G, Arduino I, Villa S, Canepa F, et al. Sorafenib delivery nanoplatform based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles magnetically targets hepatocellular carcinoma. Nano Res. 2017;10(7):2431–48.
30. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1).
31. Chen D, Sun D, Wang Z, Qin W, Chen L, Zhou L, et al. A DNA nanostructured aptasensor for the sensitive electrochemical detection of HepG2 cells based on multibranched hybridization chain reaction amplification strategy. Biosens Bioelectron. 2018;117(April):416–21.
32. Pusta A, Tertis M, Kezan D, Bogdan D, Suciu M, Pană O, et al. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Microchim Acta. 2024;191(7):413.

DOCTORAL THESIS SUMMARY

Nanodevices for targeted drug delivery and sensors for biomarker detection

PhD candidate **Alexandra Pusta**

PhD supervisor Prof.dr. **Cecilia Cristea**

UMF
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE IULIU HAŢIEGANU CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION **4**
STATE OF THE ART **4**
PERSONAL CONTRIBUTIONS **5**
1. Aims and objectives of the thesis **5**
2. General methodology **5**
3. Study 1. Development of an electrochemical device for the detection of carboplatin from nanosomes **6**
3.1. Introduction 6
3.2. Objectives 6
3.3. Materials and methods 6
3.4. Results and discussions 7
3.5. Conclusions 7
4. **Study 2. Development of an electrochemical sensor for the direct detection of doxorubicin form pharmaceutical formulations and biological samples** **8**
4.1. Introduction 8
4.2. Objectives 8
4.3. Materials and methods 8
4.4. Results and discussions 8
4.5. Conclusions 9
5. Study 3. Development of drug delivery systems based on gold nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma **9**
5.1. Introduction 9
5.2. Objectives 9
5.3. Materials and methods 9
5.4. Results and discussions 9
5.5. Conclusions 10
6. Study 4. Development of drug delivery systems based on magnetic nanoparticles for the active delivery of sorafenib **10**
6.1. Introduction 10
6.2. Objectives 10
6.3. Materials and methods 10
6.4. Results and discussions 10
6.5. Conclusions 11
7. **Study 5. Development of a method for the direct electrochemical detection of sorafenib** **11**
7.1. Introduction 11
7.2. Objectives 11

7.3. Materials and methods 11
7.4. Results and discussions 12
7.5. Conclusions 12
8. **Study 6. Development of an impedimetric aptasensor for the detection of HepG2 circulating tumor cells** **12**
8.1. Introduction 12
8.2. Objectives 12
8.3. Materials and methods 12
8.4. Results and discussions 13
9. General conclusions 13
10. Thesis originality and innovative contributions 13
SELECTED REFERENCES 14

KEYWORDS: drug delivery systems ; biomarkers ; electrochemical aptasensors ; electrochemical characterization.

INTRODUCTION

Cancer is a pathology with high incidence and mortality, and the development of new diagnostic and treatment methods for this condition is a major interest of the scientific community. Currently, cancer treatment can be carried out using various surgical, radiotherapeutic, or pharmacological techniques. Chemotherapeutic treatment has several limitations, such as increased nonspecific toxicity, while targeted molecular therapies, although superior in terms of safety profiles, are limited by the emergence of resistance to therapy.

In recent years, a series of systems have been developed for the targeted delivery of chemotherapeutic agents and substances used in targeted molecular therapy to reduce side effects and increase their efficiency. In the preclinical research of these formulations, it is important to accurately quantify the amount of active substance loaded and released from them to ensure optimal *in vivo* performance. For this purpose, numerous techniques are currently applied in pharmaceutical analysis, each with specific advantages and disadvantages. Electrochemical methods have been used in recent years for the detection of various chemotherapeutic agents, representing a potential alternative to classical methods.

The use of biomarkers for the early detection of cancers also represents a field of interest in the biomedical domain. In this case as well, the use of electrochemical methods for quantifying these biomarkers may represent a promising approach.

The aim of this study was to develop targeted drug delivery systems for cancer treatment and to characterize them using rapid, simple, and efficient electrochemical methods. Additionally, the study focused on the development and optimization of electrochemical methods for detecting biomarkers in biological samples.

STATE OF THE ART

Cancer represents a major public health issue globally. In 2022 alone, approximately 19.9 million new cases were reported worldwide, along with 9.7 million deaths [1]. Both the incidence and mortality rates caused by cancer are rising, with estimates projecting approximately 32.6 million new cases and 16.9 million deaths by the year 2045 [1].

The main treatment methods used in cancer therapy are: surgical interventions, radiotherapy and systemic therapy. Systemic therapy includes chemotherapy, targeted therapy, immunotherapy, and hormonal therapy [2]. Chemotherapy presents a wide range of nonspecific adverse reactions, such as myelosuppression, nausea, vomiting, alopecia, mucositis, diarrhea and hypersensitivity reactions. Targeted molecular therapy has emerged as an alternative to chemotherapy, aiming to reduce adverse effects. Despite the superior safety profiles of targeted therapies compared to chemotherapy, the efficiency of small molecules used in cancer therapy is limited by the development of treatment resistance [3,4].

In recent years, various strategies for cancer therapy have been developed, with targeted drug delivery systems (DDS) playing a significant role. The aim of these systems is to reduce systemic adverse reactions and avoid the development of resistance by delivering drugs directly to the tumor site. There are numerous types of nanostructures or nanoparticles (NPs) used as the basis for developing DDS, including lipid-based structures (liposomes [5-8], micelles) dendrimers [9-11], metallic NPs [12,12], carbon-based nano-structures [14], or polymeric structures. DDSs based on the previously mentioned nanostructures can be targeted using various strategies: (i) passive delivery, (ii) active delivery, or (iii) nanorobot-based delivery.

In the development of DDS, it is crucial to accurately quantify the amount of drug loaded and released from these systems. This is achieved by calculating specific parameters such as encapsulation efficiency (EE%) and loading capacity (LC%), as well as by evaluating cumulative release profiles.

Another important aspect of cancer management is early diagnosis. This can be achieved using a variety of methods, including the detection of biomarkers. Detection of these biomarkers in biological fluids can be carried out through a range of analytical methods, such as immunological, chromatographic, or genetic techniques.

Electrochemical methods are of interest for both the characterization of DDS and the evaluation of biomarkers from biological samples. Electrochemical sensors offer several advantages such as decentralized analysis, portability, increased selectivity and sensitivity, reduced costs, and the possibility to be used by staff with minimum training.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. Aims and objectives of the thesis

The present work focused on two complementary research directions, aiming to develop DDS for chemotherapeutic agents used in cancer treatment, as well as to develop sensors for the early detection of cancer biomarkers. Additionally, an important objective was to optimize electrochemical methods for the detection of chemotherapeutic agents loaded in DDSs, in order to facilitate their analysis through rapid, sensitive, and accessible techniques.

2. General methodology

In *Studies 1 and 2*, in-lab screen-printed electrodes (C-SPE) were used. The C-SPEs were obtained through manual printing using electro-conductive gaphite and silver inks.

The electrochemical detection of the chemotherapeutic agents of interest focused on studying their electrochemical behavior using cyclic voltammetry (CV) or differential pulse voltammetry (DPV), followed by method optimization, and finally the determination of analytical parameters (limit of detection, limit of quantification, linear range, sensitivity), selectivity, and the applicability of the method on real samples.

The chemotherapeutic agents of interest were loaded into and released from DDS such as nanosomes or metallic nanoparticles. The quantification of the loaded/released chemotherapeutic agents was carried out in each case using both the developed electrochemical methods and a UV-Vis spectrophotometric control method. The obtained results were then compared and statistically evaluated.

The DDS developed in *Studies 3* and *4* were functionalized with the TLS11a aptamer, specific to HepG2 liver tumor cells, to ensure selectivity for hepatic tumor tissue. The cytotoxicity of the developed DDS was evaluated in HepG2 cell cultures and healthy cells.

The TLS11a aptamer was also used for the development of an aptasensor for the detection of circulating HepG2 tumor cells..

3. Study 1. Development of an electrochemical device for the detection of carboplatin from nanosomes

3.1. Introduction

Carboplatin (CBP) is a platinum-based chemotherapeutic agent used in the treatment of advanced ovarian cancer [15], small-cell lung carcinoma [16] and head and neck cancers [17] CBP is known for its systemic side effects, such as myelosuppression, nephrotoxicity, ototoxicity, cardiotoxicity, and peripheral neurotoxicity [18]. The onset of these side effects could be delayed or eliminated by encapsulating CBP in DDS.

3.2. Objectives

The aim of the study was to develop a device for the direct electrochemical detection of CBP and to apply it for the analysis of CBP loaded into and released from nanosomes. For this aim, the in-lab printed electrodes and the electrochemical behaviour of CBP were investigated, followed by the determination of the method's analytical parameters. Lastly, the loading/release of CBP into/from nanosomes were monitored using the optimised electrochemical method.

3.3. Materials and methods

The performance of the in-lab screen-printed electrodes was evaluated and compared with that of similar commercial electrodes using CV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in a 10 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution.

The influence of pH and scan rate on the electrochemical behavior of CBP was evaluated using CV. A direct electrochemical detection method for CBP based on (DPV) was developed.

Commercially available nanosomes were loaded with CBP, and its release was subsequently evaluated in phosphate buffer solutions (PBS) with pH values of 5, 6, and 7.4. The developed DPV method was applied for the characterization of the nanosomes as well as for the detection of CBP in simulated biological samples.

3.4. Results and discussions

The manually printed C-SPEs demonstrated superior performance compared to commercial electrodes after the application of an electrochemical pre-treatment protocol via amperometry at a constant potential of +1.2 V in a 1 M Na_2CO_3 solution. These pre-treated electrodes were then used for conducting *Studies 1* and *2*.

The oxidation of CBP at the laboratory-prepared C-SPEs was an irreversible process, influenced by pH. The maximum oxidation signal was recorded at pH 4. The results regarding the influence of the scan rate indicated that, overall, the electro-oxidation process is controlled by both diffusion and adsorption processes. This phenomenon may be attributed to the nature of the laboratory-printed electrode surface, which may exhibit roughness and irregularities.

CBP could be detected using the optimized DPV method over a linear range from 5 to 500 μg/mL, with an estimated detection limit of 1.6 μg/mL and a sensitivity of 0.145 μA mL/μg.

The method was applied to evaluate CBP loaded into nanosomes, and the results were compared with those obtained using UV-Vis spectroscopy. The variability between the methods was ±2.38% for EE% and ±1.76% for LC%. The low variability between the two methods indicates that the DPV method can be successfully used for loading studies. CBP release from nanosomes was assessed at pH 5, 6, and 7.4, with the maximum release observed at pH 5. Release at pH 5 was evaluated using both DPV and UV-Vis, and the results were statistically analyzed using ANOVA. The difference between the evaluated methods was not statistically significant, demonstrating an acceptable regression coefficient of 0.984 ($p < 0.001$) and a slope of 0.837.

The DPV method was also applied to real samples of blood serum, saliva, and artificial tears, diluted with buffer solution in a 1:10 ratio. Recovery rates ranged from 92% to 106%.

3.5. Conclusions

In the study, an electrochemical method was developed for the detection of CBP, based on its irreversible oxidation on manually printed C-SPEs. The method was successfully used to evaluate CBP loaded into and released from nanosome-type DDSs, demonstrating the feasibility of applying electrochemical methods for the quality control of pharmaceutical formulations [19].

4. Study 2. Development of an electrochemical sensor for the direct detection of doxorubicin form pharmaceutical formulations and biological samples

4.1. Introduction

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapeutic agent from the anthracycline class, used alone or in combination for the treatment of cancers such as breast, bladder, ovary, as well as various forms of leukemia and lymphoma [20,21]. Despite its high efficacy, the use of DOX is associated with numerous side effects, such as nausea, vomiting, alopecia, immune suppression, and cardiotoxicity. The onset of these side effects could be delayed or eliminated by encapsulating CBP in DDS.

4.2. Objectives

The aim of the study was to develop an electrochemical sensor based on in-lab printed C-SPEs functionalized with gold nanoparticles (AuNP) for the direct detection of DOX and to apply this sensor for the quantification of DOX loaded into and released from nanosome-type DDSs and from biological samples..

4.3. Materials and methods

The surface of the C-SPE was functionalized with AuNPs using electrochemical deposition from a $HAuCl_4$ solution. The functionalization with AuNPs was confirmed both using both microscopic and electrochemical methods.

The influence of the supporting electrolyte, pH, and scan rate on the electrochemical behavior of DOX was studied using CV and DPV. The optimized method for DOX detection was based on DPV.

Commercially-available nanosomes were loaded with DOX, and its release was subsequently evaluated in PBS solutions with pH 5, 6, and 7.4. The developed DPV method was applied for the characterization of the nanosomes as well as for the detection of DOX in simulated biological samples.

4.4. Results and discussions

The optimized AuNP deposition method involved CV with a potential sweep between –0.2 and +1.4 V at a scan rate of 100 mV/s for 25 cycles from a 5 mM $HAuCl_4$ solution. SEM and EDX analyses confirmed the presence of AuNPs on the surface of the working electrodes.

The reversible electro-oxidation of DOX was pH-dependent, with the maximum oxidation signal recorded at pH 7. The electro-oxidation process was controlled by adsorption.

DOX could be detected using the optimized DPV method over a linear range from 1 to 500 μg/mL, with an estimated detection limit of 0.33 μg/mL and a sensitivity of 7.82 μA mL/μg.

The method was applied to evaluate DOX loading into nanosomes, and the results were compared with those obtained using UV-Vis spectroscopy. The variability between the methods was found to be low. The release of DOX from nanosomes was assessed at pH 5, 6, and 7.4, with maximum release observed at pH 6. The cumulative release profiles obtained at pH 6 using DPV and UV-Vis methods were compared, revealing an average correlation of 94.32% over a release period of 72 hours. The DPV method was also applied to spiked serum samples, diluted with buffer solution at a 1:50 ratio. Recovery rates ranged from 97.52% to 113.21%.

4.5. Conclusions

An electrochemical method was developed for the detection of DOX, based on its reversible oxidation on in-lab printed C-SPEs modified with AuNPs. The method was successfully used to evaluate DOX loaded into and released from nanosomes, as well as from diluted serum samples [22].

5. Study 3. Development of drug delivery systems based on gold nanoparticles for the treatment of hepatocellular carcinoma

5.1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and lethal forms of liver cancer, with a continually increasing incidence worldwide [23]. Sorafenib (SOR), a multi-kinase inhibitor, is one of the drugs used as a first-line option in the systemic treatment of advanced HCC [24]. Although it has been shown to increase patient survival rates, SOR has drawbacks such as low water solubility [25], low bioavailability, systemic side effects, and reduced efficacy in certain patients [24].

5.2. Objectives

The aim of the study was to develop AuNPs modified with the TLS11a aptamer and with SOR for the treatment of HCC. The fabrication parameters were optimised and the modified AuNPs were characterized after each functionalization step using various spectroscopic techniques. The study evaluated SOR loading and release, as well as the *in vitro* cytotoxicity of the developed DDS on two cell lines: HepG2 cancer cells and healthy fibroblasts.

5.3. Materials and methods

Commercially available AuNPs modified with polyethylene glycol and carboxyl groups were used for the development of the DDS. The carboxyl groups were activated with an NHS/EDC mixture, and the aptamer was immobilized onto them by forming an amide bond. Subsequently, SOR loading was achieved by incubating the modified AuNPs in a concentrated SOR solution for 72 hours. SOR release was evaluated in PBS with pH 5.5 to simulate tumor microenvironment conditions. The cytotoxicity of the obtained AuNPs was studied on HepG2 cells and fibroblasts using the Alamar Blue assay.

5.4. Results and discussions

The following parameters of the manufacturing process were optimized: aptamer incubation time, aptamer incubation temperature, aptamer concentration, SOR loading time, and the solvent used for preparing the SOR solution. Despite these optimizations, the obtained EE% value was only 16.33%, which was considered insufficient. SOR release was evaluated in PBS at pH 5.5, resulting in only 26.5% of the total loaded SOR being released after 24 hours. The resulting DDS did not demonstrate significant cytotoxicity towards HepG2 cells but did affect healthy cells, which was detrimental to the study's objective.

5.5. Conclusions

In this study, the development of AuNPs functionalized with PEG, aptamers and SOR for the treatment of HCC was attempted. Despite the optimizations performed, the aptamer functionalization, SOR loading and release, as well as the *in vitro* cytotoxic effects were not satisfactory.

6. Study 4. Development of drug delivery systems based on magnetic nanoparticles for the active delivery of sorafenib

6.1. Introduction

Magnetic nanoparticles (MNPs) are promising candidates for targeted drug delivery due to their high loading capacity, superparamagnetism, low production costs, and ease of functionalization with various functional groups [26,27]. These allow further modification with structures that can enhance targeting properties, such as antibodies, peptides, or aptamers [28].

6.2. Objectives

The aim of this study was to develop MNPs functionalized with the TLS11a aptamer and loaded with SOR for the treatment of HCC. The primary objectives were to achieve and confirm aptamer functionalization, optimize SOR loading and release, and evaluate cytotoxicity and cellular internalization in HepG2 cells and fibroblasts..

6.3. Materials and methods

MNPs were obtained through thermal decomposition, and their surface was functionalized with azelaic acid. Subsequently, the carboxyl groups in the azelaic acid structure were activated with an NHS/EDC mixture, and aptamer immobilization was achieved via amide bonds. SOR loading was performed by incubating the modified MNPs in a concentrated SOR solution for 72 hours. Aptamer and SOR functionalization were confirmed using imaging, spectral, and electrochemical techniques. SOR release was evaluated in PBS at pH 5.5 and 7.4 to simulate tumor microenvironment and healthy tissue conditions. The cytotoxicity and cellular internalization of the obtained MNPs were studied in HepG2 cells and fibroblasts.

6.4. Results and discussions

The following parameters were optimized: aptamer incubation time, incubation temperature with the aptamer, concentration of the loading solution, and loading time.

The obtained values for EE% and LC% were 44.3% and 3.48%, respectively. The EE% value obtained is close to the maximum value reported in other studies in the literature [29].

Almost the entire amount of loaded SOR (97%) was released within 24 hours at pH 5.5, while only 16.7% of the loaded SOR was released at pH 7.4. The pH-sensitive release, favoring a more acidic environment, represents an advantage in the development of anticancer therapies, as tumor pH is more acidic compared to healthy tissue pH [26]. XPS analysis was used to validate the functionalization of MNPs with the aptamer and their loading with SOR.

Cell culture tests demonstrated that aptamer functionalization significantly impacted cellular internalization in HepG2 cells, leading to a doubling of internalization across all tested exposure doses. Furthermore, internalization in healthy cells was not affected, showing the aptamer's selectivity for HepG2 cells. SOR-loaded nanoparticles exhibited cytotoxicity towards HepG2 cells only at high concentrations, but their increased biocompatibility with fibroblasts represents a promising outcome.

6.5. Conclusions

Aptamer and SOR-functionalized MNPs were successfully developed. The MNPs were synthesized through thermal decomposition, and functionalization with the aptamer and SOR was confirmed through various analytical techniques. The SOR loading and release parameters were comparable to those reported in the literature. Cellular internalization in HepG2 cells was significantly influenced by the presence of the aptamer, while toxicity towards fibroblasts was negligible.

7. Study 5. Development of a method for the direct electrochemical detection of sorafenib

7.1. Introduction

Due to its therapeutic importance, precise and sensitive monitoring of SOR concentrations in biological fluids and pharmaceutical formulations is crucial for optimizing administered doses, evaluating treatment efficacy, and ensuring quality control of newly developed pharmaceutical formulations.

7.2. Objectives

The aim of the study was to develop a direct detection method for SOR using commercial SPEs. The method was developed with the intent of applying it for the analysis of MNP-based targeted delivery systems, as well as for the analysis of SOR in other pharmaceutical formulations or biological samples.

7.3. Materials and methods

The influence of the electrode material, pH, and scan rate on the electrochemical behavior of SOR was evaluated using CV. A direct electrochemical detection method for SOR was developed, based on its accumulation on the electrode surface, followed by CV in a sulfuric acid solution. This method was applied to characterize the MNPs developed in the previous study, as well as for the quantification of SOR in biological samples.

7.4. Results and discussions

The optimal electrode surface was ordered mesoporous carbon. The reversible electro-oxidation of SOR was pH-dependent, with the maximum oxidation signal recorded at pH 6. The electro-oxidation process was predominantly diffusion-controlled.

SOR was successfully detected using the optimized CV method over a wide concentration range. Two linearity ranges were identified: 0.1–50 µg/mL and 50–500 µg/mL, with an estimated detection limit of 33 ng/mL and a sensitivity of 3.35 µA mL/µg in the first range, and 1.06 µA mL/µg in the second range.

The optimized CV method was applied to evaluate the SOR loading process in MNPs, but a variability of approximately 50% compared to the UV-Vis spectrophotometric method was observed, making the electrochemical method unsuitable for this purpose. However, the detection of SOR in serum samples diluted at a 1:100 ratio yielded acceptable recovery rates for the analytical signal.

7.5. Conclusions

An electrochemical sensor was developed for the direct detection of SOR based on its oxidation signal. The optimized method involved the accumulation of SOR followed by CV in a sulfuric acid solution. This optimized method was successfully applied for the evaluation of SOR in diluted spiked biological samples.

8. Study 6. Development of an impedimetric aptasensor for the detection of HepG2 circulating tumor cells

8.1. Introduction

Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells that can detach from the primary tumor and enter the bloodstream, migrating to secondary organs and generating metastases [30]. CTCs are present in peripheral blood at low concentrations, ranging from 1 to 3000 cells/mL [31]. HepG2 cells are CTCs that may be present in the blood of patients with HCC. Detecting CTCs through minimally invasive methods could facilitate early diagnosis and better management of HCC.

8.2. Objectives

The aim of the study was to develop an electrochemical platform for the rapid and selective detection of circulating HepG2 tumor cells, which are considered potential biomarkers for HCC. To achieve this, the surface of commercial C-SPEs was modified with a composite material. Subsequently, the electrodes were functionalized with the TLS11a aptamer and incubated with HepG2 cells for their impedimetric detection..

8.3. Materials and methods

The surface of the C-SPE was modified with a suspension containing chitosan (Chi), graphene oxide (GO), and polyaniline nanoparticles (PolyNP). Carboxyl groups in the GO structure were activated, and the aptamer was immobilized through a multi-pulse amperometry assisted procedure. To prevent nonspecific adsorption, nonaptamer-functionalized sites were blocked using a 0.5% BSA solution. Finally, the electrodes were incubated with HepG2 cells and their detection was performed using EIS. Each stage of the process was characterized using EIS and microscopic techniques.

8.4. Results and discussions

The deposition of the suspension led to an increase in the electroconductivity of the electrode surface. Aptamer immobilization via multi-pulse amperometry proved to be more effective compared to simple immobilization and reduced the immobilization time to just 3 minutes. HepG2 cells could be detected by EIS over a broad concentration range, from 10 to 200,000 cells/mL, with a detection limit of 10 cells/mL. Incubation of other cell types on the modified electrode surfaces did not result in changes in the electrochemical signals, demonstrating the selectivity of the method. The method was applied to undiluted commercial serum samples, with recovery rates ranging from 93.5% to 115%.

8.5. Conclusions

An impedimetric electrochemical aptasensor based on the TLS11a aptamer was successfully developed for the detection of HepG2 cells. The nanostructured platform utilized electrodes functionalized with graphene oxide, chitosan, and polyaniline nanoparticles. The aptasensor demonstrated high selectivity and stability, making it suitable for analyzing undiluted human serum samples enriched with HepG2 cells [32].

9. General conclusions

In this work, systems for the passive transport of doxorubicin and carboplatin were developed, along with two active targeting systems for sorafenib based on gold nanoparticles and magnetic nanoparticles, respectively. Electrochemical methods for the detection of the three active substances were also developed. Additionally, an electrochemical aptasensor for the detection of circulating HepG2 tumor cells, used as biomarkers for hepatocellular carcinoma, was created. Thus, the objectives for all the targeted research areas were successfully achieved.

10. Thesis originality and innovative contributions

The originality of the thesis lies in the development of novel drug delivery systems as well as rapid and facile electrochemical methods for quantifying drugs loaded into and released from these systems. Additionally, the thesis proposes the development of an electrochemical aptasensor for the detection of HepG2 cells, used as biomarkers for hepatocellular carcinoma.

The innovative aspects proposed focus on the use of manually printed electrodes, which exhibit superior performances compared to commercial ones. Additionally, the methods developed for detecting DOX and CBP have demonstrated results comparable to those obtained using spectrophotometric methods, while also being user-friendly, rapid, and cost-effective.

The thesis proposes, for the first time, the combined use of magnetic nanoparticles and aptamers for the targeted delivery of sorafenib.

Another innovative aspect of this work is the use of multipulse amperometry for the immobilization of aptamers with terminal amino groups onto the surface of the modified electrode. This procedure significantly shortened the immobilization time from several hours to just a few minutes, simplifying the manufacturing process of the aptasensor.

SELECTED REFERENCES

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;(February):229–63.
2. M. Cordes L, Cuellar S. Cancer: The Disease and Treatment. In: DiPiro JT., Talbert RL., Yee GC., Matzke GR., Wells BG., editors. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 11th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020.
3. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):201.
4. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):87.
5. Kawano K, Furuya A, Matsuda Y, Kimura C, Yamaguchi K, Wakabayashi S, et al. Preparation of liposomes co-encapsulating doxorubicin and mifepristone for treating multidrug-resistant cancer. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;85:104605.
6. Uma Maheswari RT, Ajithkumar V, Varalakshmi P, Rajan M. CD44 tagged hyaluronic acid - chitosan liposome carrier for the delivery of berberine and doxorubicin into lung cancer cells. Int J Biol Macromol. 2023;253:126599.
7. Sun M, Wu J, Lian B, Cui J, Xu N, Xu Z, et al. Hyaluronic acid-modified liposomes Co-encapsulating curcumin and mifepristone to enhance anti-breast cancer efficacy. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104956.
8. Tran NP, Tran P, Yoo SY, Tangchang W, Lee S, Lee JY, et al. Sialic acid-decorated liposomes enhance the anti-cancer efficacy of docetaxel in tumor-associated macrophages. Biomater Adv. 2023;154:213606.
9. Kumar Jangid A, Solanki R, Ghosh M, Jadav M, Patel S, Pooja D, et al. Phenylboronic acid conjugated PAMAM G4 dendrimers augmented usnic acid delivery to gastric cancer cells. Eur Polym J. 2023;192:112073.
10. Michlewska S, Garaiova Z, Šubjakova V, Hołota M, Kubczak M, Grodzicka M, et al. Lipid-coated ruthenium dendrimer conjugated with doxorubicin in anti-cancer drug delivery: Introducing protocols. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2023;227:113371.
11. Sheikh A, Abourehab MAS, Tulbah AS, Kesharwani P. Aptamer-grafted, cell membrane-coated dendrimer loaded with doxorubicin as a targeted nanosystem against epithelial cellular adhesion

molecule (EpCAM) for triple negative breast cancer therapy. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;86:104745.
12. Khorshid M, Varshosaz J, Rostami M, Haghiralsadat F, Akbari V, Khorshid P. Anti HER-2 aptamer functionalized gold nanoparticles of dasatinib for targeted chemo-radiotherapy in breast cancer cells. Biomater Adv. 2023;154:213591.
13. Bansal K, Devi N, Aqdas M, Kumar M, Agrewala JN, Katare OP, et al. Inorganic gold nanoparticles-TAT hybrid for the effective delivery of doxorubicin into cancer cells. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104959.
14. Mohammadi S, Akbari-Birgani S, Nikfarjam N, Rasekhian M. Polyethyleneimine-decorated graphene oxide quantum dot as a carrier for suicide gene delivery to the breast cancer three-dimensional model. J Drug Deliv Sci Technol. 2023;88:104849.
15. Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, Isonishi S, Jobo T, Aoki D, et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2009 Oct;374(9698):1331–8.
16. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV, et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: The COCIS meta-analysis of individual patient data. J Clin Oncol. 2012;30(14):1692–8.
17. Cohen MH, Chen H, Shord S, Fuchs C, He K, Zhao H, et al. Approval summary: Cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil for the first-line treatment of patients with recurrent locoregional or metastatic squamous cell head and neck cancer. Oncologist. 2013;18(4):460—466.
18. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. Dalton Trans. 2018 May;47(19):6645–53.
19. Pusta A, Tertis M, Ardusadan C, Mirel S, Cristea C. Electrochemical Sensing Device for Carboplatin Monitoring in Proof-of-Concept Drug Delivery Nanosystems. Vol. 14, Nanomaterials. 2024.
20. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. Life Sci. 2021;278(September 2020):119527.
21. Johnson-Arbor, Kelly ; Dubey R. Doxorubicin. Stat Pearls. StatPearls Publishing.
22. Pusta A, Tertis M, Bura I, Bogdan D, Suciu M, Mirel S, et al. Electrochemical Sensor for the Evaluation of Doxorubicin from Novel Pharmaceutical Formulations and Serum. Vol. 12, Chemosensors. 2024.
23. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. Vol. 7, Nature Reviews Disease Primers. Nature Research; 2021. p. 1–28.
24. Singal AG, Kanwal F, Llovet JM. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2023;20(12):864–84.
25. Aman A, Ali S, Mahalapbutr P, Krusong K, Wolschann P, Rungrotmongkol T. Enhancing solubility and stability of sorafenib through cyclodextrin-based inclusion complexation: in silico and in vitro studies. RSC Adv. 2023 Sep;13(39):27244–54.
26. Pusta A, Tertis M, Crăciunescu I, Turcu R, Mirel S, Cristea C. Recent Advances in the Development of Drug Delivery Applications of Magnetic Nanomaterials. Pharmaceutics. 2023;15(7).

27. Aslam H, Shukrullah S, Naz MY, Fatima H, Hussain H, Ullah S, et al. Current and future perspectives of multifunctional magnetic nanoparticles based controlled drug delivery systems. J Drug Deliv Sci Technol. 2022;67:102946.
28. kianfar E. Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery: a Review. J Supercond Nov Magn. 2021;34(7):1709–35.
29. Depalo N, Iacobazzi RM, Valente G, Arduino I, Villa S, Canepa F, et al. Sorafenib delivery nanoplatform based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles magnetically targets hepatocellular carcinoma. Nano Res. 2017;10(7):2431–48.
30. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1).
31. Chen D, Sun D, Wang Z, Qin W, Chen L, Zhou L, et al. A DNA nanostructured aptasensor for the sensitive electrochemical detection of HepG2 cells based on multibranched hybridization chain reaction amplification strategy. Biosens Bioelectron. 2018;117(April):416–21.
32. Pusta A, Tertis M, Kezan D, Bogdan D, Suciu M, Pană O, et al. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Microchim Acta. 2024;191(7):413.