

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

# Tratamentul nanomediat al carcinomului hepatocelular

---

Doctorand: **Meda-Cristina MANOLEA (căs. COSMA)**

---

Conducător de doctorat: **Şef Lucrări Dr. Lucian MOCAN**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

<b>INTRODUCERE</b> .....	1
<b>STADIUL ACTUAL AL</b>	
<b>CUNOAȘTERII</b> .....	3
1. Progrese și perspective actuale ale nanomedicinii în lupta contra cancerelor hepatice ..5	
1.1. Introducere.....	5
1.2. Tipuri de nanoparticule utilizate în terapia țintită a carcinomului hepatocelular .....	7
1.3. Strategii de orientare a nanoparticulelor către celulele țintă.....	11
2. Progrese în utilizarea nanoparticulelor de aur pentru tratamentul direcționat al carcinomului hepatocelular .....	15
3. Progrese și direcții emergente în terapia fototermică .....	21
<b>CONTRIBUȚIA</b>	
<b>PERSONALĂ</b> .....	25
4. Scop și obiective .....	27
5. Studiul 1. Sinteza, biofuncționalizarea și caracterizarea nanoparticulelor de aur .....	29
5.1. Introducere.....	29
5.2. Obiective.....	30
5.3. Material și metodă .....	30
5.3.1. Sinteza și biofuncționalizarea nanoparticulelor de aur .....	30
5.3.2. Caracterizarea nanoparticulelor de aur biofuncționalizate.....	32
5.4. Rezultate .....	35
5.5. Discuții .....	40
5.6. Concluzii.....	42
6. Studiul 2. Dezvoltarea unui model animal de HCC uman. ....	45
6.1. Introducere.....	45
6.2. Obiective.....	46
6.3. Material și metodă .....	46
6.4. Rezultate .....	49
6.5. Discuții .....	60
6.6. Concluzii.....	63
7. Studiul 3. Terapia fototermală în infraroșu apropiat <i>in vivo</i> , mediată de nanoparticule de aur .....	65
7.1. Introducere.....	65
7.2. Obiective.....	66
7.3. Material și metodă .....	66
7.4. Rezultate .....	68
7.5. Discuții .....	76

7.6. Concluzii .....	79
8. Discuții generale .....	81
9. Concluzii generale .....	85
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale .....	87
<b>REFERINȚE</b> .....	89

**Cuvinte cheie:** Carcinom hepatocelular, nanoparticule de aur biofuncționalizate, terapie fototermală, model murin

## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Cosma, M.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Mocan, L. A Narrative Review on Functionalized Nanoparticles for the Treatment and Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Appl. Sci.* 2025, 15, 7649. <https://doi.org/10.3390/app15147649>; Factor de impact (ISI): 2,9 (*studiu cuprins în capitolele 1,3.*).
2. Cosma, M.; Mocan, T.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Pop, R.; Tabaran, F.; Mocan, L. Targeted Photothermal Therapy of Hepatocellular Carcinoma using Gold Nanoparticles Functionalized with Anti-Cadherin and Folic Acid in a Validated Murine Model; DOI: 10.15386/mpr-2905 (*studiu cuprins în capitolele 3,5,6,7,8,9.*).
3. Cosma M, Mocan T, Delcea C, Pop T, Mosteanu O, Mocan L. Gold nanoparticles as targeted drug delivery systems for liver cancer: a systematic review of tumor targeting efficiency and toxicity profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(16):7917. doi: 10.3390/ijms26167917. Factor de impact (ISI): 4,9. (*studiu cuprins în capitolele 2, 5.5.*)

## INTRODUCERE

Carcinomul hepatocelular (HCC) reprezintă una dintre cele mai letale forme de cancer la nivel global. Limitările tratamentelor convenționale, precum și eficiența scăzută a chimioterapiei și toxicitatea sistemică semnificativă, impun necesitatea identificării unor soluții terapeutice inovatoare. În acest context, utilizarea nanoparticulelor de aur ca vectori de livrare țintită a medicamentelor și ca agenți în terapia fototermală oferă o alternativă promițătoare pentru creșterea eficienței terapeutice și reducerea efectelor adverse.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Carcinomul hepatocelular este una dintre cele mai agresive forme de cancer, cu o rată de supraviețuire la 5 ani sub 5% și o incidență în creștere globală. Limitările tratamentelor actuale, au determinat comunitatea științifică să își îndrepte atenția către soluții inovatoare, care să depășească aceste constrângeri. În acest context, nanomedicina oferă soluții promițătoare prin direcționarea precisă a terapiei, reducerea efectelor adverse și îmbunătățirea absorbției la nivel tumoral. Diverse tipuri de nanoparticule sunt utilizate pentru livrarea țintită a medicamentelor în HCC, fiecare având avantaje și limitări legate de toxicitate, stabilitate și specificitate. Având în vedere dificultatea de a livra eficient medicamentele în microambientul hepatic tumoral, cercetarea actuală se concentrează pe direcționarea activă, prin funcționalizarea nanoparticulelor cu liganzi biologici care recunosc receptori exprimați în HCC, crescând astfel specificitatea, absorbția celulară și eficiența tratamentului. În acest context, nanoparticulele de aur (AuNPs) s-au remarcat prin stabilitatea lor chimică, biocompatibilitate și capacitatea de a fi funcționalizate ușor, devenind platforme eficiente pentru livrarea selectivă a agenților antitumorali și reducerea toxicității sistemice. Mai mult, proprietățile optice unice ale AuNPs le fac ideale pentru terapia fototermică (PTT), o metodă inovatoare care utilizează lumina în spectrul infraroșu apropiat pentru a genera căldură localizată și a distruge selectiv celulele tumorale.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### **Studiul 1. Sinteza, biofuncționalizarea și caracterizarea nanoparticulelor de aur**

#### **Obiective**

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea și caracterizarea unui sistem bionanostructurat țintit, bazat pe nanoparticule de aur funcționalizate cu acid folic și anticorpi anti-Caderină-1, conceput pentru livrarea selectivă a nanoparticulelor în microambientul tumoral, reducând impactul asupra celulelor hepatice sănătoase.

#### **Material și metodă**

#### **Sinteza și biofuncționalizarea nanoparticulelor de aur**

Primul pas în dezvoltarea sistemului nanoterapeutic a fost sinteza nanoparticulelor de aur, utilizând o metodă Turkevich modificată, cu acid L-ascorbic ca agent reducător și PVP ca stabilizator. Funcționalizarea s-a realizat secvențial: mai întâi, nanoparticulele de aur au fost acoperite cu polietilenimină (AuNP-PEI), conferindu-le sarcină cationică. Acidul folic a fost activat, apoi anticorpii Cad-1, încărcăți negativ au fost acoperiți cu acidul folic activat și adăugați la AuNP-PEI prin interacție electrostatică, generând complexe stabile anionice AuNP-PEI-FA-Cad-1.

## Caracterizarea nanoparticulelor de aur biofuncționalizate

Nanoparticulele funcționalizate (AuNP-PEI-FA-Cad-1) au fost caracterizate prin tehnici complementare pentru a confirma funcționalizarea, stabilitatea coloidală și proprietățile fizico-chimice relevante pentru livrarea țintită a anticorpilor. Spectroscopia UV-Vis (200–800 nm) a fost utilizată pentru caracterizarea optică a nanoparticulelor de aur, evidențiind poziția maximului de absorbție plasmonică, corelată cu dimensiunea, starea de agregare și funcționalizarea acestora. Determinarea dimensiunii medii hidrodinamice, distribuției dimensiunilor particulelor (PSD), indicelui de polidispersitate (PDI) și potențialului zeta a fost realizată prin tehnica de împrăștiere dinamică a luminii (DLS). Această metodă a permis evaluarea uniformității și stabilității coloidale a suspensiilor de AuNP. AFM au fost folosit pentru determinarea precisă a dimensiunii și distribuției înălțimii nanoparticulelor funcționalizate. Pentru confirmarea prezenței anticorpilor pe suprafața nanoparticulelor și a interacțiunilor cu liganzii funcționali, a fost utilizată spectroscopia ATR-FTIR.

## Rezultate

Nanoparticulele de aur au fost proiectate și optimizate ca vehicule de livrare pentru anticorpii anti-Cad-1 *in vivo*. Eforturile de optimizare s-au concentrat asupra complexității suprafeței nanoparticulelor și a dimensiunii acestora, parametri esențiali pentru îmbunătățirea eficienței de livrare și reducerea potențialei citotoxicități. Spectrul UV-Vis al soluției coloidale de aur a prezentat o bandă distinctă de absorbție, cu un maxim la 522 nm și o lățime la jumătatea înălțimii maxime de aproximativ 50 nm. Este de remarcat faptul că profilul UV-Vis a fost reproductibil chiar și la câteva săptămâni post-sinteză, confirmând stabilitatea coloidală a nanoparticulelor sintetizate. În ceea ce privește monitorizarea modificărilor optice asociate funcționalizării suprafeței, spectrele obținute au evidențiat o deplasare spre roșu a vârfurilor de SPR după funcționalizare indică succesul ancorării anticorpilor. Măsurătorile DLS au evidențiat creșteri progresive ale dimensiunii: AuNP (12,82 nm), AuNP-PEI (18,97 nm), AuNP-PEI-Cad-1 (39,59 nm) și AuNP-PEI-FA-Cad-1 (47,25 nm), confirmând etapele de acoperire cu PEI, anticorpi și acid folic. Măsurătorile potențialului zeta au confirmat sarcina de suprafață a fiecărei nanostructuri analizate: AuNP (-33,8 mV), AuNP-PEI (+44,7 mV), AuNP-PEI-FA-Cad-1 (-36,7 mV) și AuNP-PEI-FA-Cad-1 după ajustarea concentrației de PEI (+52,4 mV). Aceste rezultate au demonstrat sinteza cu succes și optimizarea complexelor nanostructurate AuNP-PEI-FA-Cad-1. Prin caracterizarea AFM a bionanostructurilor AuNP-PEI-FA-Cad-1 sintetizate, observăm că au prezentat o morfologie sferică, cu un diametru mediu măsurat de aproximativ 40,4 nm. Diferențele între valorile DLS și AFM se explică prin natura metodelor — DLS măsoară particulele în soluție, AFM în stare uscată. Spectroscopia ATR-FTIR a confirmat prezența anticorpilor prin benzile amide I ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) și II ( $1534\text{ cm}^{-1}$ ), precum și eliminarea ionilor de citrat, validând funcționalizarea cu succes a nanoparticulelor. Aceste rezultate confirmă stabilitatea, integritatea structurală și potențialul terapeutic al complexului AuNP-PEI-FA-Cad-1.

## Concluzii

Prin această lucrare, am demonstrat fezabilitatea dezvoltării unui sistem nanoterapeutic funcțional, bazat pe nanoparticule de aur biofuncționalizate pentru livrarea țintită a anticorpilor anti-Caderină-1, cu aplicație în terapia carcinomului hepatocelular. Rezultatele au arătat că fiecare etapă de funcționalizare influențează predictibil proprietățile fizico-chimice ale particulelor, confirmând integrarea eficientă a stratului de polietilenimină, a acidului folic și a anticorpilor Cad-1, fără a compromite stabilitatea coloidală sau integritatea biomoleculilor. Caracterizările realizate au evidențiat stabilitatea în timp, morfologia și dimensiunile adecvate, precum și prezența eficientă a anticorpilor pe suprafață — factori esențiali pentru eficiența terapeutică.

## Studiul 2. Dezvoltarea unui model animal de HCC uman.

### Obiective

Scopul acestui studiu este dezvoltarea unui model animal reproductibil de carcinom hepatocelular chimic-indus pe șoareci *Mus musculus*, care să reflecte caracteristicile patologice și moleculare ale HCC uman.

### Material și metodă

Pentru acest studiu s-au utilizat șoareci *Mus musculus*, proveniți de la Biobaza UMF Cluj-Napoca. Experimentele au fost desfășurate în cadrul Biobazei Institutului Regional de Gastroenterologie-Hepatologie „Prof. Dr. O. Fodor”, unitate acreditată (nr. 894/07.12.2020) și autorizată de DSV (aviz nr. 268/12.07.2021). Animalele au fost menținute în condiții standard de vivariu, în conformitate cu legislația UE și națională privind bunăstarea animalelor. Criteriile de includere: șoareci sănătoși clinic, atât femele cât și masculi, care aveau vârsta de două săptămâni, greutate în limite fiziologice pentru vârstă, fără semne de boală intercurentă sau traumatisme. Criteriile de excludere: mortalitatea independentă de inducerea modelului experimental sau evenimente severe independente de protocol, devierea >20% de la greutatea corporală de referință; orice situație care impune eutanasiere umanitară conform ghidurilor etice. Pentru inducerea carcinomului hepatocelular (n=8), s-a administrat intraperitoneal dietilnitrozamină (DEN, 100 mg/kg), urmată de tetraclorură de carbon (CCl<sub>4</sub>, 0,5 mL/kg), de două ori pe săptămână, timp de 8 săptămâni. Pe parcursul studiului, animalele au fost monitorizate atent neexistând situații care să impună oprirea experimentului, iar la final au fost eutanasiate în anestezie profundă (ketamină/xilazină), prin supradozaj. După eutanasiere, animalele au fost fixate pe placa de disecție, iar ficatul a fost examinat macroscopic și histologic pentru confirmarea dezvoltării tumorilor. Țesuturi și probe de sânge au fost colectate pentru analize ulterioare.

## Rezultate

Pentru caracterizarea modelului de HCC chimic-indus, s-a realizat disecția post-eutanasiere a șoarecilor tratați, observându-se leziunile macroscopice ale tumorilor după deschiderea cavității abdominal, înalt sugestive pentru dezvoltarea unor mase tumorale hepatice cu semnificație neoplazică. Examinarea microscopică a arătat caracteristici maligne clare: celule mari, nuclee multipli și morfologii atipice, progresiv accentuate în funcție de durata inducției. Analiza histopatologica a evidențiat zone de tranziție între țesutul sănătos și tumoral, cu pierderea arhitecturii hepatice normale și proliferări celulare atipice. În contrast, țesutul hepatic din grupul martor și-a păstrat arhitectura normală. Studiile anterioare au arătat că celulele HCC (carcinom hepatocelular) cu o rată ridicată de proliferare prezintă pierderea E-caderinei de la nivelul membranei celulare. Totuși, E-caderina poate fi, de asemenea, detașată de la nivelul membranei și procesată ca VE-caderină, prin endocitoză și procesare lizozomală sau proteazomală. E-caderina a fost asociată anumitor zone tumorale, cu distribuție heterogenă fiind confirmată prin analiza imunohistochimică, subliniind potențialul acesteia ca marker țintă pentru terapiile fototermice.

## Concluzii

În acest studiu a fost caracterizat un model de HCC chimic-indus la șoareci *Mus musculus*, utilizând dietilnitrozamină și tetraclorură de carbon. Modelul a generat formațiuni tumorale hepatice cu trăsături macroscopice și histopatologice similare HCC uman. Asocierea E-caderinei în zone de țesut tumoral susține utilizarea acesteia ca marker de țintire pentru terapiile fototermale nanostructurate. Principala limitare a fost reprezentată de dimensiunea redusă a eșantionului experimental (n= 8), ceea ce conferă acestei etape caracter exploratoriu, fără a permite considerarea modelului ca validat definitiv. Totuși, datele obținute au oferit fundamentul necesar pentru extinderea protocolului pe cohorte suplimentare, continuând astfel studiul nostru.

## Studiul 3. Terapia fototermală în infraroșu apropiat *in vivo*, mediată de nanoparticule de aur.

### Obiective

Scopul acestui studiu este evaluarea eficienței și siguranței terapiei fototermale cu lumină NIR, mediată de nanoparticule de aur funcționalizate, pentru distrugerea selectivă a tumorilor hepatice la șoareci *Mus musculus* cu carcinom hepatocelular indus chimic, menținând integritatea parenchimului hepatic sănătos.

### Material și metodă

Modelul de HCC a fost generat prin același protocol DEN + CCl<sub>4</sub> descris în studiul anterior, aplicat pe o cohortă extinsă de 16 animale. La momentul dezvoltării tumorale optime, caracterizat macro și microscopic, animalele au fost împărțite aleatoriu în patru grupuri experimentale, (n=4/grup), primele 3 grupuri au primit doze

intravenoase diferite de nanoconstruct (12,5, 25 sau 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), urmate după 24 h de iradiere laser (808 nm, 3 min, 5X). Grupul 4 nu a primit tratament și a servit ca martor HCC netratat. Echipamentele au fost calibrate pentru iradiere uniformă. Toate procedurile invazive au fost efectuate sub anestezie intraperitoneală pentru a asigura bunăstarea animalelor. Înainte de eutanasiere, s-au recoltat probe de sânge pentru evaluarea funcției hepatice (AST, ALT, GGT, ALP). La final, animalele au fost eutanasiate uman prin supradoză de ketamină/xilazină. Probele hepatice au fost fixate în formalină 10% și analizate histologic pentru a evalua necroza tumorală și efectele tratamentului. Studiul a fost aprobat de ANSVSA (nr. 268/12.07.2021) și s-a desfășurat cu respectarea normelor etice privind utilizarea animalelor în cercetare.

## Rezultate

Tratamentul fototermal a fost aplicat după calibrarea echipamentului laser și inducerea anesteziei, urmată de fixarea animalelor pentru iradiere NIR standardizată. Efectele histologice ale tratamentului fototermal au fost evidente în lotul experimental care a primit concentrația maximă de nanoconstruct. Au fost evidențiate leziuni de necroză de coagulare, caracterizate prin pierderea structurii normale hepatocitare, cu păstrarea conturilor celulare, dar fără o reacție inflamatorie intensă în jurul acestora. Acest tip de necroză este tipic pentru acțiunea locală a unui stimul termic intens, precum cel indus de radiația laser asupra nanoparticulelor de aur acumulate selectiv în țesutul tumoral. De asemenea, s-a remarcat prezența necrozei hepatocitare individuale în anumite regiuni, indicată prin săgeți, fără apariția unui răspuns histologic notabil în țesutul înconjurător – ceea ce sugerează o acțiune localizată, fără afectarea extensivă a parenchimului hepatic adiacent. Evaluarea funcției hepatice a arătat o scădere semnificativă a aspartat aminotransferaza în grupul tratat cu 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $133,7 \pm 11,4$  U/L) față de HCC netratat ( $165,7 \pm 4,04$  U/L). Valorile alanin amino-transferaza au urmat un trend descendent dependent de doză, fără semnificație statistică, dar indicând reducerea citolizei hepatice. Fosfataza alcalină a prezentat variații ne semnificative între grupuri, iar gama glutamil transferaza a scăzut semnificativ în grupurile tratate cu 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $54,9 \pm 13,3$  U/mL) și 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nanoconstruct ( $53,1 \pm 5,6$  U/mL) comparativ cu HCC netratat ( $87,8 \pm 3,4$  U/mL).

## Concluzii

Rezultatele obținute în acest studiu sugerează că terapia fototermală în infraroșu apropiat, mediată de AuNPs funcționalizate, poate reprezenta o metodă promițătoare pentru inducerea distrugerii termice selective a țesutului tumoral în carcinomul hepatocelular indus experimental, cu posibilitatea menținerii structurii și funcției parenchimului hepatic sănătos. Aplicarea radiației laser în infraroșu apropiat, cu parametri standardizați, în prezența nanoparticulelor de aur, a fost asociată cu apariția necrozei de coagulare localizate în zonele tumorale, indicând posibila eficiență a ablației termice în condițiile testate, fără afectarea extinsă a țesutului hepatic adiacent. O limitare relevantă constă în caracterul predominant descriptiv al evaluării histopatologice, fără cuantificarea obiectivă a extinderii leziunilor. Integrarea unor

metode de analiză cantitativă ar putea consolida robustețea rezultatelor și reprezintă o direcție utilă pentru cercetările viitoare.

## CONCLUZII GENERALE

Nanoparticulele de aur funcționalizate cu polietilenimină, acid folic și anticorpi anti-Caderină-1 s-au evidențiat drept o platformă promițătoare pentru terapia moleculară direcționată în carcinomul hepatocelular. Prin utilizarea acestui sistem, a fost observată posibilitatea eliminării selective a celulelor tumorale, cu protejarea parenchimului hepatic sănătos, aspect susținut atât prin analize histologice, cât și prin îmbunătățirea markerilor serici de funcție hepatică. Sistemul a prezentat stabilitate coloidală și dimensiuni optime pentru a facilita acumularea preferențială la nivel tumoral, iar funcționalizarea eficientă a indicat potențialul de livrare țintită a terapiei direct în microambientul tumoral. Modelul de carcinom hepatocelular indus chimic cu dietilnitrozamină și tetraclorură de carbon oferă un cadru biologic relevant pentru testarea unor abordări terapeutice noi. Terapia fototermală, activată prin radiație în infraroșu apropiat și mediată de nanoparticulele de aur, a sugerat un nivel ridicat de specificitate și eficacitate în acest model de carcinom hepatocelular. În concluzie, rezultatele obținute sugerează utilitatea modelului animal folosit și evidențiază potențialul acestei strategii nanostructurate ca opțiune terapeutică inovatoare. Studiul susține importanța integrării cercetării fundamentale privind biologia tumorală cu tehnologiile avansate bazate pe nanomateriale pentru posibila dezvoltare de protocoale terapeutice moderne în tratamentul carcinomului hepatocelular, cu potențială perspectivă de extindere spre alte tipuri de cancer rezistente la tratamentele convenționale

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Cercetarea din această teză propune o abordare complexă și inovatoare a terapiei personalizate în carcinomul hepatocelular, utilizând nanoparticule de aur biofuncționalizate în asociere cu terapia fototermală în infraroșu apropiat, testată într-un model animal de HCC chimic-indus. Lucrearea aduce elemente de noutate prin dezvoltarea unui sistem nanoterapeutic multifuncțional, construit pas cu pas prin funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu polietilenimină, acid folic și anticorpi anti-Caderină-1. Calitatea și stabilitatea nanosistemului au fost confirmate prin metode moderne de caracterizare (UV-Vis, DLS, AFM, ATR-FTIR). Un alt aspect important este caracterizarea unui model animal chimic-indus de HCC, comparabil cu forma umană. Testarea in vivo a terapiei fototermale în acest model a evidențiat o distrugere eficientă a tumorilor, asociată cu scăderea unor enzime hepatice (ASAT, GGT), ceea ce sugerează și o modalitate de monitorizare funcțională a tratamentului. Prin aceste rezultate, lucrarea se aliniază tendințelor actuale din oncologia de precizie, oferind un model de cercetare preclinică valoros pentru dezvoltarea de terapii personalizate.



---

PHD THESIS SUMMARY

# Nanomediated treatment of hepatocellular carcinoma

---

PhD Student: **Meda-Cristina MANOLEA (COSMA)**

---

PhD Supervisor: **Lecturer Dr. Lucian MOCAN**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## DOCTORAL THESIS TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b> .....	3
1. Advances and Current Perspectives in Nanomedicine for Combating Liver Cancers .....	5
1.1. Introduction.....	5
1.2. Types of Nanoparticles Used in Targeted Therapy of Hepatocellular Carcinoma .....	7
1.3. Strategies for Targeting Nanoparticles to Cancer Cells.....	11
2. Advances in the Use of Gold Nanoparticles for the Targeted Treatment of Hepatocellular Carcinoma.....	15
3. Advances and Emerging Directions in Photothermal Therapy.....	21
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b> .....	25
4. Purpose and Objectives .....	27
5. Study 1. Synthesis, Biofunctionalization, and Characterization of Gold Nanoparticles .....	29
5.1. Introduction.....	29
5.2. Objectives.....	30
5.3. Materials and Methods.....	30
5.3.1. Synthesis and Biofunctionalization of Gold Nanoparticles .....	30
5.3.2. Characterization of Biofunctionalized Gold Nanoparticles .....	32
5.4. Results .....	35
5.5. Discussion .....	40
5.6. Conclusions .....	42
6. Study 2. Development of a Human HCC Animal Model. ....	45
6.1. Introduction.....	45
6.2. Objectives.....	46
6.3. Materials and Methods.....	46
6.4. Results.....	49
6.5. Discussion .....	60
6.6. Conclusions .....	63
7. Study 3. In Vivo Near-Infrared Photothermal Therapy Mediated by Gold Nanoparticles .....	65
7.1. Introduction.....	65
7.2. Objectives.....	66
7.3. Materials and Methods.....	66
7.4. Results .....	68

7.5. Discussion .....	76
7.6. Conclusions.....	79
8. General Discussion .....	81
9. General Conclusions .....	85
10. Originality and Innovative Contributions of the Doctoral Research .....	87
<b>REFERENCES.....</b>	<b>89</b>

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, biofunctionalized gold nanoparticles, photothermal therapy, murine model

## LIST OF PUBLICATIONS

### Full-length articles published as a result of the doctoral research

1. Cosma, M.; Mocan, T.; Sabau, L.I.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Mocan, L. A Narrative Review on Functionalized Nanoparticles for the Treatment and Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Appl. Sci.* 2025, 15, 7649. <https://doi.org/10.3390/app15147649>; Impact factor (ISI): 2,9 (study included in chapters 1., 3.).
2. Cosma, M.; Mocan, T.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Pop, R.; Tabaran, F.; Mocan, L. Targeted Photothermal Therapy of Hepatocellular Carcinoma using Gold Nanoparticles Functionalized with Anti-Cadherin and Folic Acid in a Validated Murine Model; DOI: 10.15386/mpr-2905 (study included in chapters 3., 5., 6., 7., 8., 9).
3. Cosma M, Mocan T, Delcea C, Pop T, Mosteanu O, Mocan L. Gold nanoparticles as targeted drug delivery systems for liver cancer: a systematic review of tumor targeting efficiency and toxicity profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(16):7917. doi: 10.3390/ijms26167917. Impact factor (ISI): 4,9. (study included in chapters 2., 5.5.)

## INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal forms of cancer worldwide. The limitations of conventional treatments, as well as the low efficacy of chemotherapy and significant systemic toxicity, highlight the need to identify innovative therapeutic solutions. In this context, the use of gold nanoparticles as targeted drug delivery vectors and as agents in photothermal therapy offers a promising alternative for increasing therapeutic efficacy and reducing adverse effects.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Hepatocellular carcinoma is one of the most aggressive forms of cancer, with a 5-year survival rate below 5% and a globally increasing incidence. The limitations of current treatments have led the scientific community to focus on innovative solutions that can overcome these constraints. In this context, nanomedicine offers promising approaches through precise therapy targeting, reduction of adverse effects, and improved drug uptake at the tumor level. Various types of nanoparticles – including carbon nanotubes, liposomes, dendrimers, micelles, solid lipid nanocarriers, and iron oxide nanoparticles – are used for targeted drug delivery in HCC, each having advantages and limitations related to toxicity, stability, and specificity. Considering the challenge of efficiently delivering drugs into the hepatic tumor microenvironment, current research focuses on active targeting, by functionalizing nanoparticles with biological ligands (folic acid, hyaluronic acid, antibodies, aptamers) that recognize receptors overexpressed in HCC, thereby increasing specificity, cellular uptake, and treatment efficacy. In this context, gold nanoparticles (AuNPs) have stood out due to their chemical stability, biocompatibility, and ease of functionalization, becoming efficient platforms for the selective delivery of antitumor agents and the reduction of systemic toxicity. Moreover, the unique optical properties of AuNPs make them ideal for photothermal therapy (PTT), an innovative method that uses near-infrared light to generate localized heat and selectively destroy tumor cells.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Study 1. Synthesis, Biofunctionalization, and Characterization of Gold Nanoparticles**

#### **Objectives**

The aim of this study was the development and characterization of a targeted bionanostructured system, based on gold nanoparticles functionalized with folic acid and anti-Cadherin-1 antibodies, designed for the selective delivery of nanoparticles into the tumor microenvironment while reducing the impact on healthy hepatic cells.

#### **Materials and Methods**

##### **Synthesis and biofunctionalization of Gold Nanoparticles**

The first step in the development of the nanotherapeutic system was the synthesis of gold nanoparticles using a modified Turkevich method, with L-ascorbic acid as the reducing agent and PVP as the stabilizer. Functionalization was carried out sequentially: first, the gold nanoparticles were coated with polyethyleneimine (AuNP-PEI), giving them a cationic charge. Folic acid was activated, and then Cad-1 antibodies,

negatively charged, were coated with the activated folic acid and added to AuNP-PEI through electrostatic interaction, generating stable anionic complexes AuNP-PEI-FA-Cad-1.

## Characterization of Biofunctionalized Gold Nanoparticles

The functionalized nanoparticles (AuNP-PEI-FA-Cad-1) were characterized using complementary techniques to confirm functionalization, colloidal stability, and physicochemical properties relevant for targeted antibody delivery. UV-Vis spectroscopy (200–800 nm) was employed for the optical characterization of gold nanoparticles, highlighting the position of the plasmonic absorption maximum, correlated with their size, aggregation state, and functionalization. The determination of the mean hydrodynamic size, particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), and zeta potential was performed using the dynamic light scattering (DLS) technique. This method allowed the evaluation of the uniformity and colloidal stability of the AuNP suspensions. AFM was used to precisely determine the size and height distribution of the functionalized nanoparticles. To confirm the presence of antibodies on the nanoparticle surface and their interactions with functional ligands, ATR-FTIR spectroscopy was applied.

## Results

Gold nanoparticles were designed and optimized as delivery vehicles for anti-Cad-1 antibodies *in vivo*. The optimization efforts focused on the complexity of the nanoparticle surface and their size, essential parameters for improving delivery efficiency and reducing potential cytotoxicity. The UV-Vis spectrum of the colloidal gold solution showed a distinct absorption band, with a maximum at 522 nm and a full width at half maximum of approximately 50 nm. Notably, the UV-Vis profile was reproducible even several weeks post-synthesis, confirming the colloidal stability of the synthesized nanoparticles. Regarding the monitoring of optical changes associated with surface functionalization, the obtained spectra showed a red shift of the SPR peaks after functionalization, indicating the successful anchoring of antibodies. DLS measurements revealed progressive increases in size: AuNP (12.82 nm), AuNP-PEI (18.97 nm), AuNP-PEI-Cad-1 (39.59 nm), and AuNP-PEI-FA-Cad-1 (47.25 nm), confirming the sequential coating steps with PEI, antibodies, and folic acid. Zeta potential measurements confirmed the surface charge of each analyzed nanostructure: AuNP (−33.8 mV), AuNP-PEI (+44.7 mV), AuNP-PEI-FA-Cad-1 (−36.7 mV), and AuNP-PEI-FA-Cad-1 after PEI concentration adjustment (+52.4 mV). These results demonstrated the successful synthesis and optimization of the AuNP-PEI-FA-Cad-1 nanostructured complexes. AFM characterization of the synthesized AuNP-PEI-FA-Cad-1 bionanostructures showed a spherical morphology, with a mean diameter of approximately 40.4 nm. The differences between DLS and AFM values are explained by

the nature of the methods — DLS measures particles in solution, while AFM measures them in a dry state. ATR-FTIR spectroscopy confirmed the presence of antibodies through the amide I ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) and II ( $1534\text{ cm}^{-1}$ ) bands, as well as the elimination of citrate ions, validating the successful functionalization of the nanoparticles. These results confirm the stability, structural integrity, and therapeutic potential of the AuNP-PEI-FA-Cad-1 complex.

## Conclusions

Through this work, we demonstrated the feasibility of developing a functional nanotherapeutic system based on biofunctionalized gold nanoparticles for the targeted delivery of anti-Cadherin-1 antibodies, with application in the therapy of hepatocellular carcinoma. The results showed that each functionalization step predictably influenced the physicochemical properties of the particles, confirming the efficient integration of the polyethyleneimine layer, folic acid, and Cad-1 antibodies, without compromising colloidal stability or the integrity of the biomolecules. The performed characterizations highlighted temporal stability, appropriate morphology and dimensions, as well as the effective presence of antibodies on the surface — essential factors for therapeutic efficacy.

## Study 2. Development of a Human HCC Animal Model

### Objectives

The aim of this study is the development of a reproducible chemically induced hepatocellular carcinoma animal model in *Mus musculus* mice, designed to reflect the pathological and molecular characteristics of human HCC.

### Materials and Methods

For this study, *Mus musculus* mice obtained from the Biobase of UMF Cluj-Napoca were used. The experiments were conducted within the Biobase of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology “Prof. Dr. O. Fodor,” an accredited unit (no. 894/07.12.2020) and authorized by the Veterinary Sanitary Authority (approval no. 268/12.07.2021). The animals were maintained under standard vivarium conditions, in accordance with EU and national legislation on animal welfare. Inclusion criteria: clinically healthy mice, both female and male, two weeks old, with body weight within the physiological range for their age, without signs of intercurrent disease or trauma. Exclusion criteria: mortality unrelated to induction of the experimental model or severe events independent of the protocol; deviation  $>20\%$  from reference body weight; any situation requiring humane euthanasia in accordance with ethical guidelines. For the induction of hepatocellular carcinoma ( $n = 8$ ), diethylnitrosamine (DEN,  $100\text{ mg/kg}$ ) was administered intraperitoneally, followed by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ,  $0.5\text{ mL/kg}$ ), twice a week for 8 weeks. Throughout the study, the animals were closely monitored, with no events requiring termination of the

experiment. At the end, they were euthanized under deep anesthesia (ketamine/xylazine) by overdose. After euthanasia, the animals were fixed on the dissection board, and the liver was examined macroscopically and histologically to confirm tumor development. Tissue and blood samples were collected for further analyses.

## Results

For the characterization of the chemically induced HCC model, post-euthanasia dissection of the treated mice was performed, revealing macroscopic lesions of the tumors after opening the abdominal cavity, highly suggestive of the development of hepatic tumor masses with neoplastic significance. Microscopic examination showed clear malignant features: large cells, multiple nuclei, and atypical morphologies, progressively accentuated depending on the duration of induction. Histopathological analysis revealed transition zones between healthy and tumor tissue, with loss of normal hepatic architecture and atypical cellular proliferations. In contrast, the hepatic tissue from the control group preserved its normal architecture. Previous studies have shown that HCC (hepatocellular carcinoma) cells with a high proliferation rate present loss of E-cadherin from the cell membrane. However, E-cadherin can also be detached from the membrane and processed as VE-cadherin, through endocytosis and lysosomal or proteasomal processing. E-cadherin was associated with certain tumor areas, with heterogeneous distribution, being confirmed by immunohistochemical analysis, highlighting its potential as a target marker for photothermal therapies.

## Conclusions

In this study, a chemically induced HCC model was characterized in *Mus musculus* mice, using diethylnitrosamine and carbon tetrachloride. The model generated hepatic tumor formations with macroscopic and histopathological features similar to human HCC. The association of E-cadherin in tumor tissue areas supports its use as a targeting marker for nanostructured photothermal therapies. The main limitation was the small experimental sample size ( $n = 8$ ), which gives this stage an exploratory character, without allowing the model to be considered definitively validated. Nevertheless, the data obtained provided the necessary foundation for extending the protocol to additional cohorts, thus continuing our study.

## Study 3. *In Vivo* Near-Infrared Photothermal Therapy Mediated by Gold Nanoparticles

### Objectives

The aim of this study is to evaluate the efficacy and safety of near-infrared (NIR) light-mediated photothermal therapy using functionalized gold nanoparticles for the selective destruction of hepatic tumors in *Mus musculus* mice with chemically induced hepatocellular carcinoma, while preserving the integrity of healthy hepatic parenchyma.

## Materials and Methods

The HCC model was generated using the same DEN + CCl<sub>4</sub> protocol described in the previous study, applied to an extended cohort of 16 animals. At the point of optimal tumor development, characterized both macroscopically and microscopically, the animals were randomly divided into four experimental groups (n = 4/group). The first three groups received different intravenous doses of the nanoconstruct (12.5, 25, or 50 µg/mL), followed after 24 h by laser irradiation (808 nm, 3 min, 5X). Group 4 did not receive treatment and served as the untreated HCC control. The equipment was calibrated to ensure uniform irradiation. All invasive procedures were carried out under intraperitoneal anesthesia to ensure animal welfare. Before euthanasia, blood samples were collected for the evaluation of liver function (AST, ALT, GGT, ALP). At the end, the animals were humanely euthanized by ketamine/xylazine overdose. Liver samples were fixed in 10% formalin and analyzed histologically to assess tumor necrosis and treatment effects. The study was approved by ANSVSA (no. 268/12.07.2021) and was conducted in accordance with ethical guidelines on the use of animals in research.

## Results

Photothermal treatment was applied after laser equipment calibration and induction of anesthesia, followed by fixation of the animals for standardized NIR irradiation. The histological effects of photothermal treatment were evident in the experimental group that received the maximum nanoconstruct concentration. Coagulative necrosis lesions were observed, characterized by the loss of normal hepatocyte structure while maintaining cellular outlines, but without an intense inflammatory reaction in their vicinity. This type of necrosis is typical of the local action of an intense thermal stimulus, such as that induced by laser radiation on gold nanoparticles selectively accumulated in tumor tissue. Additionally, individual hepatocyte necrosis was noted in certain regions (indicated by arrows), without a notable histological response in the surrounding tissue — suggesting a localized action without extensive damage to the adjacent hepatic parenchyma. Liver function assessment showed a significant decrease in aspartate aminotransferase in the group treated with 50 µg/mL ( $133.7 \pm 11.4$  U/L) compared to untreated HCC ( $165.7 \pm 4.04$  U/L). Alanine aminotransferase values followed a dose-dependent downward trend, without statistical significance, but indicating reduced hepatocellular cytolysis. Alkaline phosphatase showed no significant variations between groups, while gamma-glutamyl transferase decreased significantly in the groups treated with 25 µg/mL ( $54.9 \pm 13.3$  U/L) and 50 µg/mL nanoconstruct ( $53.1 \pm 5.6$  U/L) compared to untreated HCC ( $87.8 \pm 3.4$  U/L).

## Conclusions

The results obtained in this study suggest that near-infrared photothermal therapy mediated by functionalized AuNPs may represent a promising method for inducing selective thermal destruction of tumor tissue in experimentally induced hepatocellular carcinoma, while preserving the structure and function of healthy

hepatic parenchyma. The application of standardized-parameter near-infrared laser irradiation in the presence of gold nanoparticles was associated with the occurrence of localized coagulative necrosis in tumor areas, indicating the potential efficacy of thermal ablation under the tested conditions, without extensive damage to adjacent hepatic tissue. A relevant limitation lies in the predominantly descriptive nature of the histopathological evaluation, lacking objective quantification of lesion extent. The integration of quantitative analytical methods could strengthen the robustness of the results and represents a useful direction for future research.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

Gold nanoparticles functionalized with polyethyleneimine, folic acid, and anti-Cadherin-1 antibodies have emerged as a promising platform for targeted molecular therapy in hepatocellular carcinoma. Using this system, selective elimination of tumor cells was observed while preserving healthy hepatic parenchyma, an effect supported both by histological analyses and by the improvement of serum liver function markers. The system exhibited colloidal stability and optimal dimensions to facilitate preferential accumulation at the tumor site, while efficient functionalization indicated the potential for targeted delivery of therapy directly into the tumor microenvironment. The chemically induced hepatocellular carcinoma model using diethylnitrosamine and carbon tetrachloride provides a biologically relevant framework for testing new therapeutic approaches. Photothermal therapy, activated by near-infrared radiation and mediated by gold nanoparticles, suggested a high level of specificity and efficacy in this hepatocellular carcinoma model. In conclusion, the results obtained suggest the usefulness of the animal model employed and highlight the potential of this nanostructured strategy as an innovative therapeutic option. The study supports the importance of integrating fundamental research on tumor biology with advanced nanomaterial-based technologies for the possible development of modern therapeutic protocols in the treatment of hepatocellular carcinoma, with potential applicability to other types of cancer resistant to conventional treatments.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH**

The research presented in this thesis proposes a complex and innovative approach to personalized therapy in hepatocellular carcinoma, using biofunctionalized gold nanoparticles in combination with near-infrared photothermal therapy, tested in a chemically induced HCC animal model. The work introduces novel elements through the stepwise development of a multifunctional nanotherapeutic system, achieved by functionalizing gold nanoparticles with polyethyleneimine, folic acid, and anti-Cadherin-1 antibodies. The quality and stability of the nanosystem were confirmed by modern characterization methods (UV-Vis, DLS, AFM, ATR-FTIR). Another important aspect is the characterization of a chemically induced HCC animal model, comparable to the human form. In vivo testing of photothermal therapy in this model

demonstrated efficient tumor destruction, associated with decreased hepatic enzyme levels (AST, GGT), which also suggests a functional means of monitoring treatment. Through these results, the thesis aligns with current trends in precision oncology, providing a valuable preclinical research model for the development of personalized therapies.