
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Aplicații ale electroanalizei în cercetarea și dezvoltarea unor formulări farmaceutice conținând substanțe antitumorale

Doctorand **Iulia-Alexandra Rus**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Robert Săndulescu**



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Afecțiunile oncologice și medicamentele antitumorale	19
1.1. Afecțiunile oncologice în prezent	19
1.2. Principii generale ale farmacoterapiei oncologice	21
2. Sistemele de transport la țintă în tratamentul afecțiunilor oncologice	25
3. Analiza sistemelor de transport la țintă al medicamentului	31
3.1. Tehnici analitice moderne. Metode electrochimice de analiză	31
3.2. Tehnici analitice utilizate în caracterizarea sistemelor de transport la țintă	34
3.2.1. Analiza morfologică a sistemelor de transport al medicamentului	34
3.2.2. Caracterizarea structurală și funcțională a sistemelor de transport al medicamentului	35
3.2.3. Evaluarea procesului de încapsulare și a profilului de eliberare ale medicamentului	37
3.2.4. Evaluarea toxicității	39
4. Metode electrochimice în cercetarea, diagnosticul și monitorizarea afecțiunilor neoplazice	41
4.1. Detecția electrochimică a medicamentelor antitumorale	41
4.2. Detecția electrochimică a unor biomarkeri tumorali	43
4.3. Analiza electrochimică a interacțiunii medicament-ADN	45
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	47
1. Detecția electrochimică directă a gemcitabinei din formulări farmaceutice utilizând un electrod de diamant dopat cu bor	49
1.1. Introducere	49
1.2. Ipoteza de lucru	50
1.3. Materiale și metode	51
1.3.1. Materiale utilizate	51
1.3.2. Aparatură utilizată	52
1.3.3. Prepararea soluțiilor tampon	52
1.3.4. Curățarea suprafeței electrozilor de lucru	52
1.3.5. Detecția voltametrică a gemcitabinei	53
1.3.6. Detecția amperometrică a gemcitabinei	53
1.3.7. Detecția spectrofotometrică UV-Vis a gemcitabinei	54
1.3.8. Detecția gemcitabinei cu ajutorul HPLC-UV	54

1.3.9. Analiza probelor reale	54
1.3.10. Robuștețea metodelor electrochimice în analiza probelor reale	54
1.3.11. Compararea rezultatelor obținute prin tehnici analitice diferite	55
1.4. Rezultate și discuții	55
1.4.1. Caracterizarea electrochimică a gemcitabinei	55
1.4.2. Detecția DPV a gemcitabinei	58
1.4.3. Detecția amperometrică a gemcitabinei	58
1.4.4. Analiza probelor reale	60
1.4.5. Robuștețea metodelor electrochimice în analiza probelor reale	62
1.4.6. Compararea rezultatelor obținute prin tehnici analitice diferite	62
1.5. Concluzii	64
2. O nouă strategie electrochimică pentru detecția simultană a doxorubicinei și simvastatinei	67
2.1. Introducere	67
2.2. Ipoteza de lucru	68
2.3. Materiale și metode	69
2.3.1. Materiale utilizate	69
2.3.2. Detecția electrochimică a doxorubicinei și simvastatinei	69
2.3.3. Studiul selectivității metodelor optimizate și analiza de probe reale	70
2.4. Rezultate și discuții	71
2.4.1. Caracterizarea electrochimică a doxorubicinei și simvastatinei	71
2.4.2. Optimizarea detecției simultane a doxorubicinei și simvastatinei	77
2.4.3. Studiul selectivității metodelor optimizate și analiza de probe reale	82
2.5. Concluzii	84
3. Metodă analitică simplă și rapidă pentru evaluarea încapsulării și eliberării doxorubicinei din sisteme de transport la țintă	85
3.1. Introducere	85
3.2. Ipoteza de lucru	86
3.3. Materiale și metode	87
3.3.1. Materiale utilizate	87
3.3.2. Determinarea electrochimică și spectrofotometrică a doxorubicinei	87
3.3.3. Caracterizarea imagistică a microcapsulelor cu și fără doxorubicină	88
3.3.4. Procesul de încapsulare	89
3.3.5. Condițiile de eliberare a doxorubicinei	89
3.3.6. Evaluarea toxicității <i>in vitro</i> a microcapsulelor	90
3.4. Rezultate și discuții	91

3.4.1. Caracterizarea electrochimică a doxorubicinei	91
3.4.2. Parametrii analitici pentru detecția electrochimică a doxorubicinei	93
3.4.3. Parametrii analitici pentru detecția spectrofotometrică a doxorubicinei	95
3.4.4. Evaluarea procesului de încapsulare	95
3.4.5. Caracterizarea profilului de eliberare al doxorubicinei	99
3.4.6. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i> a microcapsulelor cu și fără doxorubicină	101
3.5. Concluzii	103
4. Aptasenzor electrochimic pentru detecția celulelor OFA/iLRP pozitive cu aplicații în evaluarea sistemelor de transport la țintă	105
4.1. Introducere	105
4.2. Ipoteza de lucru	106
4.3. Materiale și metode	108
4.3.1. Materiale utilizate	108
4.3.2. Echipamente utilizate	109
4.3.3. Elaborarea aptasenzorului AB3	110
4.3.4. Funcționalizarea PNS-LN-COOH cu AB3	111
4.3.5. Investigații microscopice	111
4.3.6. Detecția celulelor OFA/iLRP-pozitive	112
4.3.7. Analiza probelor reale	112
4.4. Rezultate și discuții	113
4.4.1. Elaborarea aptasenzorului AB3	113
4.4.2. Funcționalizarea PNS-LN-COOH cu AB3	117
4.4.3. Investigații microscopice	119
4.4.4. Detecția celulelor OFA/iLRP-pozitive	122
4.4.5. Analiza probelor reale	124
4.5. Concluzii	125
5. Concluzii generale	127
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	129
REFERINȚE	131

CUVINTE CHEIE: afecțiuni oncologice, antitumorale, sisteme de transport la țintă, metode electrochimice, detecție celulară

INTRODUCERE

Cancerul reprezintă una din afecțiunile care a marcat secolul al XXI-lea, tratamentul acestuia implicând frecvent utilizarea medicamentelor antitumorale, care prezintă reacții adverse severe. Diferite strategii de reducere a toxicității și creștere a eficacității tratamentului antineoplazic au fost cercetate de-a lungul timpului, dintre acestea cele mai importante fiind administrarea unor asocieri medicamentoase și dezvoltarea sistemelor de transport la țintă a medicamentului.

Scopul cercetării realizate în cadrul tezei a fost elaborarea și optimizarea unor metode electrochimice de analiză a formelor farmaceutice moderne, aflate în curs de dezvoltare, în special a sistemelor de transport la țintă a medicamentelor, în vederea eficientizării procesului de evaluare al acestora în studiile preclinice. Astfel, dezvoltarea unor metode rapide, simple și directe de detecție a unor substanțe active antitumorale, și anume a gemcitabinei și doxorubicinei, a constituit unul din obiectivele urmărite de cercetările de laborator.

Un alt obiectiv l-a constituit elaborarea unor metode de detecție simultană a doxorubicinei și simvastatinei, asociere medicamentoasă cu beneficii importante în tratamentul unor tumori maligne, și aplicarea acestor metode în analiza unor formulări farmaceutice. Al treilea obiectiv al tezei a fost evaluarea capacității de încărcare cu doxorubicină a unor sisteme de transport la țintă, de tipul microcapsulelor, precum și a eliberării agentului antitumoral în diverse condiții.

Nu în ultimul rând, s-a urmărit dezvoltarea unui aptasenzor cu dublă aplicație în detecția celulelor tumorale circulante din afecțiunile hematologice maligne și în evaluarea indirectă a funcționalizării sistemelor de transport cu secvența aptamerică corespunzătoare.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Una din cele mai frecvente tipuri de intervenții în tratamentul cancerului este reprezentată administrarea chimioterapicelor, scopul chimioterapiei fiind de a elimina complet țesutul malign cu un impact minor asupra celulelor sănătoase, reacții adverse reduse, precum și prevenirea apariției rezistenței la substanțele antitumorale ¹.

Diferite strategii au fost abordate de-a lungul timpului pentru personalizarea și, consecutiv, îmbunătățirea terapiei antitumorale, una dintre acestea fiind dezvoltarea de noi formulări farmaceutice de tipul sistemelor de transport la țintă. Există o variabilitate mare în ceea ce privește materialele utilizate pentru formularea sistemelor de transport al medicamentului, forma și dimensiunea acestora, sau modul de încorporare a substanței medicamentoase. Dintre materialele utilizate pentru producerea sistemelor de transport pot fi amintite: fosfolipidele, materialele pe bază de carbon, metalele sau oxizii metalici și materialele polimerice ^{2 3}.

În etapa de cercetare preclinică, pe lângă parametri de obținere și optimizare a sistemelor de transport la țintă, este important să se determine caracteristicile fizice și chimice ale acestora, parametrii farmacocinetici și aspectele toxicologice. În ceea ce privește analiza morfologică a sistemelor de transport al medicamentului, dimensiunea acestora poate fi determinată prin difracție de lumină laser (LLD), potențialul zeta al acestora prin dispersie dinamică a luminii (DLS), porozitatea cu ajutorul unui porozimetru cu mercur, iar forma prin tehnici microscopice precum microscopia de transmisie electronică (TEM) și microscopia electronică cu baleiaj (SEM). Rezonanța magnetică nucleară protonică ($^1\text{H-NMR}$), spectroscopia IR cu Transformantă Fourier (FT-IR) și difracția de raxe X (XRD) sunt tehnici utilizate pentru determinarea compoziției sistemelor de transport, dovedind încărcarea acestora cu substanța medicamentoasă, precum și eliberarea acesteia din sistemul de transport. Încărcarea și eliberarea substanței medicamentoase poate fi evaluată și prin analiza cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) sau spectrofotometriei, determinându-se în final capacitatea de încărcare, eficiența încapsulării medicamentului și eliberarea cumulativă a acestuia ².

Deoarece tehnicile electrochimice de analiză aduc avantaje precum simplitate și costuri reduse, având sensibilitate și specificitate comparabile cu tehnicile analitice separative, în literatura de specialitate sunt descrise un număr mare de studii ce descriu aplicații ale analizei electrochimice în domeniul oncologic. O serie de studii electrochimice au fost orientate spre dezvoltarea unor senzori pentru detecția medicamentelor antitumorale ⁴, precum și spre detecția unor biomarkeri tumorali, utilă în diagnosticul cancerului și monitorizarea recidivelor canceroase ^{5,6}. Interacțiunea dintre medicamentele antitumorale și secvențe de ADN a fost, de asemenea, studiată electrochimic, în vederea explicării mecanismului de acțiune al acestora ⁷. Printre tehnicile electrochimice utilizate cu acest scop se regăsesc: voltametria cu baleiaj liniar (LSV), voltametria ciclică (CV), voltametria puls diferențială (DPV), cronoamperometria (CA) și spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Detecția electrochimică directă a gemcitabinei din formulări farmaceutice utilizând un electrod de diamant dopat cu bor

1.1. Introducere

Diferite strategii pentru detecția gemcitabinei (GMB), inclusiv electrochimice ^{8,9} au fost raportate în literatură de-a lungul timpului. Majoritatea metodelor electrochimice de detecție a GMB raportate propun strategii indirecte de detecție. În ciuda limitelor de detecție (LOD) reduse care pot fi atinse folosind aceste metode ⁹, modificările suprafeței electrodului necesită procese complexe, iar suprafețele astfel modificate pot deveni instabile în timp. Dezvoltarea unei metode directe de detecție

electrochimică a GMB a fost urmărită în acest studiu, folosit un electrod de diamant dopat cu bor (BDDE) ¹⁰.

1.2. Materiale și metode

Analiza electrochimică a GMB a fost centrată pe utilizarea a două tehnici electrochimice: DPV și amperometria. Influența pH-ului soluției și a vitezei de baleiaj asupra semnalului analitic au fost investigate folosind voltametria pentru a evalua comportamentul electrochimic al GMB. Ambele strategii de detecție optimizate au fost aplicate în analiza unor preparate farmaceutice, rezultatele obținute pentru analiza GMB folosind metodele electrochimice elaborate fiind comparate cu cele obținute prin spectrofotometrie UV-Vis și HPLC-UV, utilizate ca metode de control.

1.3. Rezultate și discuții

Comportamentul electrochimic al GMB a fost investigat folosind CV și DPV, cu ajutorul diferitelor materiale electrodoice și în diferite condiții experimentale. Un pic de oxidare anodic a fost observat pentru această substanță, la aproximativ 2,2 V, procesul de oxidare fiind ireversibil.

Metoda DPV optimizată a demonstrat precizie și acuratețe ridicate la concentrații cuprinse între 2,5 și 50 μg/mL. Pe baza acestor rezultate a fost, de asemenea, optimizată și o metodă amperometrică, obținându-se o sensibilitate crescută și liniaritate superioară pe domeniul de concentrație 0,5-65 μg/mL. Ambele metode au fost aplicate pentru analiza unor formulări farmaceutice utilizate în practica medicală, cu obținerea unor regăsiri corespunzătoare și fără interferențe semnificative ale excipienților.

Rezultatele obținute folosind DPV și amperometria au fost comparate cu cele obținute prin spectrofotometrie UV-Vis și HPLC-UV, utilizate ca metode de control, iar analiza statistică a demonstrat o bună concordanță între rezultatele obținute cu aceste metode, precum și o precizie și robustețe ridicate.

1.4. Concluzii

Două strategii electrochimice de detecție a GMB din soluții cu pH fiziologic au fost optimizate și aplicate pentru analiza unor formulări farmaceutice, rezultatele corelându-se cu cele obținute prin tehnici analitice convenționale. Metodele de detecție amperometrică și voltametrică prezintă mai multe avantaje, printre care simplitatea lor, timpul scurt de analiză (30 s folosind DPV și 300 s folosind amperometria) și costul redus, devenind mai accesibile decât un echipament de analiză HPLC-UV.

2. O nouă strategie electrochimică pentru detecția simultană a doxorubicinei și simvastatinei

2.1. Introducere

De-a lungul timpului au fost descrise și cercetate diferite strategii de creștere a eficacității și reducere a toxicității chimioterapiei prin asocierea antitumoralelor cu molecule din diferite clase terapeutice. O astfel de asociere studiată este asocierea doxorubicinei (DOX) cu simvastatina (SMV), substanță care datorită efectelor sale pleiotrope, contribuie la creșterea eficacității tratamentului și la îmbunătățirea

profilului de siguranță al DOX ¹¹. Astfel, dezvoltarea unor sisteme de transport capabile să livreze atât DOX, cât și SMV la locul de acțiune în raportul dorit reprezintă un subiect de interes ¹².

În acest sens, elaborarea unei metode, simple, rapide și care să utilizeze volume mici de probă necesare cuantificării simultane a DOX și SMV, este de o deosebită importanță științifică și practică. În cadrul acestui studiu este descrisă pentru prima dată detecția simultană a DOX și SMV folosind tehnici electrochimice și electrozi serigrafiați (SPE) ¹³.

2.2. Materiale și metode

Influența materialului electrodic, a pH-ului soluției de electrolit și a vitezei de baleiaj asupra detecției celor două molecule a fost studiată cu ajutorul CV, mecanismul de oxidare al substanțelor fiind analizat pe baza rezultatelor obținute. Pentru electroanaliza probelor de DOX și SMV au fost utilizate două tehnici analitice: LSV și CA, curbe de calibrare ale DOX și SMV fiind construite prin fiecare din cele două metode. Strategiile optimizate au fost utilizate cu succes pentru analiza unor formulări farmaceutice.

2.3. Rezultate și discuții

Oxidarea celor două substanțe a fost înregistrată în LSV, utilizând SPE din grafit, la un potențial de aproximativ 0,5 V pentru DOX și 1 V pentru SMV. S-a propus mecanismul de oxidare a DOX ca fiind un proces reversibil cu implicarea a doi protoni și doi electroni, în timp ce oxidarea SMV s-a identificat a fi un proces ireversibil, care implică, cel mai probabil, tot un schimb de doi protoni și doi electroni.

Domeniul de liniaritate obținut pentru DOX în prezența SMV a fost de 0,001 – 0,01 mg/mL în LSV și 0,002 – 0,065 mg/mL în CA, în timp ce domeniul de liniaritate obținut pentru SMV în prezența DOX a fost de 0,02 – 0,1 mg/mL în LSV și 0,002 – 0,45 mg/mL în CA. Dintre cele două metode electrochimice optimizate, metoda amperometrică s-a dovedit a fi mai sensibilă (valori mai mici ale LOD pentru SMV).

În urma analizei preparatelor farmaceutice ale celor două substanțe, s-au obținut regăsiri ale DOX în prezența SMV între 92,0-98,8%, și ale SMV în prezența DOX între 97,7-104,11%.

2.4. Concluzii

Au fost elaborate noi strategii analitice pentru detecția simultană a DOX și SMV, a căror asociere aduce beneficii importante în terapia oncologică. Tehnicile electroanalitice optimizate au demonstrat rezultate promițătoare pentru aplicații în domeniul biofarmaceutic, putând fi utilizate cu succes pentru evaluarea concentrațiilor celor două medicamente în studiile preclinice ale dezvoltării unor formulări farmaceutice conținând ambele substanțe.

3. Metodă analitică simplă și rapidă pentru evaluarea încapsulării și eliberării doxorubicinei din sisteme de transport la țintă

3.1. Introducere

DOX reprezintă unul dintre cele mai utilizate medicamente antitumorale din clasa antraciclinelor, un număr impresionant de sisteme de transport al medicamentelor care încapsulează acest antitumoral fiind raportate în literatura de specialitate. În majoritatea cazurilor, performanța acestor sisteme, din punctul de vedere al eficienței încapsulării și al ratei de eliberare, este evaluată prin spectrofotometrie UV-Vis, HPLC-UV sau HPLC-MS.

În vederea simplificării și reducerii perioadei de studiu preclinic al dezvoltării unor sisteme de transport conținând DOX, este de interes dezvoltarea unei metode electrochimice simple și rapide pentru evaluarea încapsulării și eliberării acestui antitumoral din formulările farmaceutice aflate în curs de cercetare.

3.2. Materiale și metode

Caracterizarea electrochimică a DOX a fost realizată studiind influența materialului electrodic, a soluției de electrolit, a pH-ului acesteia și a vitezei de baleiaj asupra oxidării electrochimice a moleculei. O metodă DPV de detecție a DOX folosind electrozi din mină de grafit (PGE, pencil graphite electrode) a fost optimizată pe baza rezultatelor obținute.

Microcapsule (MCPs) de tip “core-shell” cu un nucleu de albumină serică bovină, la suprafața căruia au fost depuse straturi succesive de acid hialuronic și chitosan ¹⁴, au fost supuse unui proces de încărcare cu DOX, MCPs încărcate fiind supuse ulterior unul proces de eliberare în diferite condiții de pH (**Fig. 1**). Probele prelevate în timpul procesului de eliberare au fost analizate prin metoda electrochimică optimizată, precum și prin spectrofotometrie UV-Vis, ca metodă de control. Suplimentar, încărcarea și eliberare DOX din MCPs a fost evaluată folosind SEM și microscopia confocală de scanare laser (CLSM). În final citotoxicitatea MCPs și a MCPs încărcate cu DOX a fost evaluată.

The figure illustrates the process of DOX loading and release from core-shell microcapsules (MCPs) and the corresponding DPV monitoring. The process is shown in three stages: 1. Loading: A dialysis membrane (Membrană de dializă) is used to load DOX (red dots) into the MCPs (core-shell structure). 2. Release: The loaded MCPs (MCPs-DOX) are placed in a dialysis membrane, and DOX is released into the surrounding solution. 3. Monitoring: The released DOX is monitored using DPV (Differential Pulse Voltammetry) on a Ag/AgCl(3M KCl) electrode. The DPV plot shows the current response (I / μA) versus the potential (E / Ag/AgCl(3M KCl) / V) for different concentrations of DOX, with a peak around 0.5 V. The legend identifies the components: Microcapsule de tip core-shell (MCPs), MCPs încărcate cu Dox (MCPs-DOX), Doxorubicin (DOX), and Membrană de dializă.

Fig. 1. Scopul studiului și etapele de realizare ¹⁵

3.3. Rezultate și discuții

O intensitate crescută a semnalului de oxidare a DOX a fost obținută prin utilizarea PGE, în soluții cu valori ale pH-ului mai acide (≤ 5). Curbe de calibrare ale DOX în diferite soluții tampon au fost construite pe două domenii diferite de concentrație: 1-25 $\mu\text{g/mL}$ și 0,05-0,75 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁵.

S-a observat o mai bună încărcare a MCPs cu DOX din soluții preparate în dimetilsulfoxid (DMSO), comparativ cu soluțiile apoase cu diferite valori ale pH-ului, iar cel mai bun profil de eliberare al DOX a fost observat la pH 5. Mai multe tehnici precum FT-IR, CLSM și SEM au fost aplicate cu succes pentru a evidenția prezența DOX în MCPs-DOX. Studiile de citotoxicitate au sugerat lipsa toxicității MCPs înainte de încărcarea antitumoralului și selectivitatea acestora față de celulele tumorale.

3.4. Concluzii

O metodă electrochimică directă, rapidă, sensibilă și cu costuri reduse a fost dezvoltată pentru detecția DOX, utilizând DPV și PGE. Această metodă a permis cuantificarea medicamentului antitumoral din medii de eliberare frecvent utilizate în cercetarea preclinică de dezvoltare a sistemelor de transport.

În urma analizei electrochimice a performanțelor MCPs, a fost realizată optimizarea procesului de încapsulare și evaluarea procesului de eliberare, rezultatele arătând faptul că aceste sisteme de transport la țintă pot aduce beneficii semnificative față de formulările farmaceutice deja existente pe piață, beneficii confirmate ulterior și prin testele de citotoxicitate.

4. Aptasenzor electrochimic pentru detecția celulelor OFA/iLRP pozitive cu aplicații în evaluarea sistemelor de transport la țintă

4.1. Introducere

Afecțiunile hematologice maligne reprezintă o categorie vastă de afecțiuni oncologice, unele dintre acestea, precum leucemia acută mieloidă, fiind forme agresive, cu o rată de supraviețuire scăzută. Astfel, un diagnostic precoce este util în tratamentul bolii și duce la creșterea speranței de viață.

Antigenul oncofetal, numit și proteina imatură a receptorului lamininei (OFA/iLRP) reprezintă o proteină imunogenică, identificată în special în membrana celulelor fetale tinere, precum și în membrana unor celule tumorale, incluzând celulele tumorale din leucemia acută mieloidă, leucemia acută limfoblastică cu celule T, leucemia limfocitară cronică și limfomul limfoblastic cu celule B ¹⁶.

Ținând cont de prezența OFA/iLRP exclusiv la nivelul suprafeței celulelor tumorale, s-a urmărit dezvoltarea unui aptasenzor cu aplicații în diagnosticarea afecțiunilor oncologice hematologice, folosind aptamerul AB3, singurul aptamer raportat în literatură până în prezent care interacționează specific cu proteina OFA/iLRP ¹⁷.

4.2. Materiale și metode

Imobilizarea aptamerului la suprafața electrodului, s-a realizat prin legături amidice între gruparea NH_2 a secvenței aptamerice modificate și grupările COOH ale

unor electrozi serigrafiați modificați cu oxizi de grafenă (GO/SPE). Etapele obținerii aptasenzorului au fost evaluate folosind CV și EIS, precum și prin SEM, microscopie de forță atomică (AFM) și microscopie de fluorescență (FM).

Aptasenzorul optimizat a fost testat pentru detecția celulelor OFA/iLRP- pozitive (Jurkat), observându-se o liniaritate între semnalul analitic oferit de acesta și concentrația suspensiilor celulare analizate. Selectivitatea aptasenzorului a fost evaluată prin incubarea acestuia cu o suspensie de celule sănătoase (BJ) și prin analiza unor probe de ser diluate conținând celule Jurkat.

S-a urmărit funcționalizarea cu aptamerul AB3 a unor lipozomi comerciali modificați cu grupări carboxilice, în vederea evaluării electrochimice a succesului funcționalizării, prin utilizarea platformei de bază a aptasenzorului. Spectrofotometria UV-Vis a fost utilizată ca metodă de control în acest caz.

4.3. Rezultate și discuții

Tehnica EIS s-a dovedit a fi mai potrivită decât CV atât pentru caracterizarea aptasenzorului, cât și pentru detecția celulară. Variației semnalului electrochimic a fost direct corelată cu numărul de celule imobilizate pe suprafața electrodului, domeniul de liniaritate obținut fiind între $10\text{-}300 \times 10^3$ celule/mL. Tehnicile microscopice SEM, FM și AFM au confirmat atât imobilizarea aptamerului la suprafața electrodului, cât și a celulelor la suprafața aptasenzorului.

Funcționalizarea lipozomilor cu aptamerul AB3 nu a fost confirmată prin analiza spectrofotometrică, evaluarea electrochimică a succesului funcționalizării rămânând obiectivul unui studiu viitor.

4.4. Concluzii

Un nou aptasenzor a fost elaborat și folosit cu succes pentru detecția celulelor OFA-iLRP- pozitive, aptamerul folosit, dovedindu-și specificitatea față de aceste celule în comparație cu fibroblastele sănătoase.

Simplitatea metodei de detecție selectate și optimizate, precum și durata scurtă a protocolului experimental, sunt cele mai importante avantaje ale acestui aptasenzor, care poate avea aplicații în diagnosticul cancerelor de sânge, dar și în studiul interacțiunii aptamer-receptor celular (OFA/iLRP), această interacțiune fiind utilă în dezvoltarea sistemelor de transport la țintă a medicamentelor bazate pe aptameri.

CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

În cadrul acestei teze au fost optimizate și descrise metode electrochimice care se remarcă prin simplitatea și rapiditatea lor, ceea ce permite utilizarea acestora pentru analiza unui număr mare de probe, având o aplicabilitate crescută în domeniul biomedical.

În vederea optimizării unei metode de detecția a gemcitabinei, s-a utilizat pentru prima dată un electrod BDDE, avantajul principal al acestei metode de detecție

constând în simplitatea și rapiditatea analizei, comparativ cu detecția bazată pe utilizarea biosenzorilor descriși în literatură.

Detecția electrochimică simultană a doxorubicinei și simvastatinei a fost pentru prima dată descrisă în cadrul acestei lucrări, în contextul unui interes crescut față de formularea unor lipozomi care să încapsuleze ambele substanțe medicamentoase, a căror asociere aduce beneficii de eficacitate și siguranță.

Deși în literatură există numeroase metode electrochimice pentru analiza DOX, a fost elaborată prima metodă electroanalitică aplicată pentru evaluarea eliberării *in vitro* a DOX din sisteme de transport la țintă.

Un alt element de noutate este reprezentat de dubla utilizare a aptamerului AB3, în optimizarea unui aptasensor pentru detecția celulelor tumorale OFA/iLRP- pozitive, și în funcționalizarea sistemelor de transport, ceea ce ar asigura transportul țintit al antitumoralelor la nivelul celulelor neoplazice. Un avantaj important al aptasenzorului dezvoltat îl reprezintă timpul scurt de obținere al acestuia (45 min) și de analiză a probelor (10 min), intervale semnificativ reduse comparativ cu alți aptasenzori descriși în literatură.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Hecht KA. Oncology Overview and Supportive Care. In: Sutton SS, editor. McGraw-Hill's NAPLEX® Review Guide [Internet]. 3e ed. McGraw Hill; 2019 [cited 2023 Apr 7]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2512§ionid=201032533>
2. Rus I, Tertis M, Cristea C, Sandulescu R. Modern Analytical Techniques for Drug Delivery Systems Characterization. *Curr Anal Chem*. 2020 Jun 13;17(8):1064–73.
3. Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IMI, et al. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem*. 2020 May 19;8:341.
4. Porfireva A V., Goida AI, Rogov AM, Evtugyn GA. Impedimetric DNA Sensor Based on Poly(proflavine) for Determination of Anthracycline Drugs. *Electroanalysis* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2023 Apr 9];32(4):827–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elan.201900653>
5. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Sandulescu R, Cristea C. Mucin 4 detection with a label-free electrochemical immunosensor. *Electrochem commun*. 2017 Jul 1;80:39–43.
6. Taleat Z, Cristea C, Marrazza G, Sandulescu R. Electrochemical Sandwich Immunoassay for the Ultrasensitive Detection of Human MUC1 Cancer Biomarker. *Int J Electrochem*. 2013;2013:1–6.
7. Bruzaca EES, Lopes IC, Silva EHC, Carvalho PA V., Tanaka AA. Electrochemical oxidation of the antitumor antibiotic mitomycin C and in situ evaluation of its interaction with DNA using a DNA-electrochemical biosensor. *Microchem J*. 2017 Jul 1;133:81–9.
8. Shoja Y, Kermanpur A, Karimzadeh F, Ghodsi J, Rafati AA, Adhami S. Electrochemical molecularly bioimprinted siloxane biosensor on the basis of core/shell silver nanoparticles/EGFR exon 21 L858R point mutant gene/siloxane film for ultra-sensing of Gemcitabine as a lung cancer chemotherapy medication. *Biosens Bioelectron*. 2019 Dec;145:111611.

9. Florea A, Guo Z, Cristea C, Bessueille F, Vocanson F, Goutaland F, et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. *Talanta*. 2015 Jun;138:71–6.
10. Rus I, Pusta A, Tertiş M, Barbălată C, Tomuță I, Săndulescu R, et al. Gemcitabine direct electrochemical detection from pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Pharmaceutics*. 2021;14(9).
11. Henslee AB, Steele TA. Combination statin and chemotherapy inhibits proliferation and cytotoxicity of an aggressive natural killer cell leukemia. *Biomark Res* [Internet]. 2018 Aug 9 [cited 2023 May 15];6(1):1–11. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-018-0140-0>
12. Barbălată CI, Porfire AS, Sesarman A, Rauca VF, Banciu M, Muntean D, et al. A screening study for the development of simvastatin-doxorubicin liposomes, a co-formulation with future perspectives in colon cancer therapy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 May 15];13(10):1526. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1526/htm>
13. Rus I, Tertiş M, Barbălată C, Porfire A, Tomuță I, Săndulescu R, et al. An Electrochemical Strategy for the Simultaneous Detection of Doxorubicin and Simvastatin for Their Potential Use in the Treatment of Cancer. *Biosensors*. 2021;11(1).
14. Pașcalău V, Tertis M, Pall E, Suci M, Marinca T, Pustan M, et al. Bovine serum albumin gel/polyelectrolyte complex of hyaluronic acid and chitosan based microcarriers for Sorafenib targeted delivery. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2020 Oct 12];137(34):49002. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.49002>
15. Rus I, Tertiş M, Pașcalău V, Pavel C, Melean B, Suci M, et al. Simple and fast analytical method for the evaluation of the encapsulation and release profile of doxorubicin from drug delivery systems. *Farmacia*. 2021;69(4):670–81.
16. Siegel S, Wagner A, Friedrichs B, Wendeler A, Wendel L, Kabelitz D, et al. Identification of HLA-A*0201-Presented T Cell Epitopes Derived from the Oncofetal Antigen-Immature Laminin Receptor Protein in Patients with Hematological Malignancies. *J Immunol*. 2006;176(11):6935–44.
17. An Y, Hu Y, Li X, Li Z, Duan J, Yang X Da. Selection of a novel DNA aptamer against OFA/iLRP for targeted delivery of doxorubicin to AML cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–11.

PhD THESIS SUMMARY

Applications of electroanalysis in the research and development of antitumor pharmaceutical formulations

PhD Student **Iulia-Alexandra Rus**

PhD Supervisor **Prof. dr. Robert Săndulescu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	17
1. Oncological diseases and antitumor drugs	19
1.1. Oncological diseases at present	19
1.2. General principles of oncological pharmacotherapy	21
2. Drug delivery systems in the treatment of oncological diseases	25
3. Drug delivery systems analysis	31
3.1. Modern analytical techniques. Electrochemical analysis methods	31
3.2. Analytical techniques for drug delivery systems evaluation	34
3.2.1. Morphological analysis of drug delivery systems	34
3.2.2. Structural and functional characterization of drug delivery systems	35
3.2.3. Evaluation of the encapsulation and release profile of the drug	37
3.2.4. Toxicity evaluation	39
4. Electroanalytical methods in the research, diagnosis and monitoring of oncological diseases	41
4.1. Electrochemical detection of antitumor drugs	41
4.2. Electrochemical detection of tumoral biomarkers	43
4.3. Electrochemical analysis of drug-DNA interaction	45
PERSONAL CONTRIBUTION	47
1. Direct electrochemical detection of gemcitabine from pharmaceutical formulations using a boron doped diamond electrode	49
1.1. Introduction	49
1.2. Working hypothesis	50
1.3. Materials and methods	51
1.3.1. Materials	51
1.3.2. Equipment	52
1.3.3. Preparation of buffer solutions	52
1.3.4. Cleaning of the electrode surface	52
1.3.5. Voltammetric detection of gemcitabine	53
1.3.6. Amperometric detection of gemcitabine	53
1.3.7. UV-Vis spectrophotometric detection of gemcitabine	54
1.3.8. HPLC-UV detection of gemcitabine	54

1.3.9. Real samples analysis	54
1.3.10. Robustness of the electrochemical methods for pharmaceutical sample analysis	54
1.3.11. Correlation and Comparison of the Methods	55
1.4. Results and discussions	55
1.4.1. Electrochemical characterization of gemcitabine	55
1.4.2. DPV detection of gemcitabine	58
1.4.3. Amperometric detection of gemcitabine	58
1.4.4. Real samples analysis	60
1.4.5. Robustness of the electrochemical methods for pharmaceutical sample analysis	62
1.4.6. Correlation and Comparison of the Methods	62
1.5. Conclusions	64
2. A new electrochemical strategy for the simultaneous detection of doxorubicin and simvastatin	67
2.1. Introduction	67
2.2. Working hypothesis	68
2.3. Materials and methods	69
2.3.1. Materials	69
2.3.2. Electrochemical detection of doxorubicin and simvastatin	69
2.3.3. Selectivity study of the optimized methods and real samples analysis	70
2.4. Results and discussion	71
2.4.1. Electrochemical characterization of doxorubicin and simvastatin	71
2.4.2. Optimization of the simultaneous detection of doxorubicin and simvastatin	77
2.4.3. Selectivity study of the optimized methods and real samples analysis	82
2.5. Conclusions	84
3. Simple and fast analytical method for the evaluation of the encapsulation and release of doxorubicin from drug delivery systems	85
3.1. Introduction	85
3.2. Working hypothesis	86
3.3. Materials and methods	87
3.3.1. Materials	87
3.3.2. Electrochemical and spectrophotometric detection of doxorubicin	87
3.3.3. Microscopic characterization of the microcapsules before and after doxorubicin encapsulation	88
3.3.4. Encapsulation process	89
3.3.5. Release conditions of doxorubicin	89
3.3.6. Evaluation of the <i>in vitro</i> toxicity of microcapsules	90

3.4. Results and discussions	91
3.4.1. Electrochemical characterization of doxorubicin	91
3.4.2. Analytical parameters for the electrochemical detection of doxorubicin	93
3.4.3. Analytical parameters for the spectrophotometric detection of doxorubicin	95
3.4.4. Evaluation of the encapsulation process	95
3.4.5. Characterization of the release profile of doxorubicin	99
3.4.6. <i>In vitro</i> cytotoxicity evaluation of the microcapsules before and after doxorubicin encapsulation	101
3.5. Conclusions	103
4. Electrochemical aptasensor for OFA/iLRP positive cells detection with applications in the evaluation of drug delivery systems	105
4.1. Introduction	105
4.2. Working hypothesis	106
4.3. Materials and methods	108
4.3.1. Materials	108
4.3.2. Equipment	109
4.3.3. Design of the AB3 aptasensor	110
4.3.4. PNS-LN-COOH functionalization with AB3 aptamer	111
4.3.5. Microscopic investigations	111
4.3.6. OFA/iLRP positive cells detection	112
4.3.7. Real samples analysis	112
4.4. Results and discussions	113
4.4.1. Design of the AB3 aptasensor	113
4.4.2. PNS-LN-COOH functionalization with AB3 aptamer	117
4.4.3. Microscopic investigations	119
4.4.4. OFA/iLRP positive cells detection	122
4.4.5. Real samples analysis	124
4.5. Conclusions	125
5. General conclusions	127
6. The originality and the innovations of the thesis	129
REFERENCES	131

KEY WORDS: oncologic diseases, antitumor drugs, drug delivery systems, electrochemical methods, cellular detection

INTRODUCTION

Cancer is one of the diseases that marked the XXIst century, its treatment frequently involving the use of antitumor drugs, which can have severe side effects. Different strategies to reduce toxicity and increase the effectiveness of antineoplastic treatment have been studied over time, some of the most important being the administration of drug associations and the development of drug delivery systems.

The aim of the research carried out within this thesis was the development and optimization of new electrochemical methods which could be used in the development of modern pharmaceutical formulations, such as targeted drug delivery systems, in order to make their evaluation process more efficient in preclinical studies. Thus, the development of fast, simple, and direct methods for the detection of some antitumor drugs was one of the objectives in the laboratory research.

Another objective was the development of electrochemical methods for the simultaneous detection of doxorubicin and simvastatin, a drug combination with important benefits in the treatment of malignant tumors, and the application of these methods in the analysis of pharmaceutical formulations. The third objective of the thesis was to evaluate the doxorubicin loading capacity of microcapsules drug delivery systems and the release of the antitumor agent under various conditions.

Finally, the development of an aptasensor with dual application in the detection of circulating tumor cells from malignant hematological diseases and in the indirect assessment of the functionalization of drug delivery systems with the corresponding aptameric sequence was pursued.

STATE OF THE ART

One of the most common types of interventions in the treatment of cancer is the administration of chemotherapy drugs, the aim of chemotherapy being to eliminate the malignant tissue with a minor impact on healthy cells and reduced side effects, as well as to prevent the emergence of resistance to antitumor substances ¹.

Different strategies have been approached over time to improve antitumor therapy, one of these strategies being the development of new pharmaceutical formulations such as targeted drug delivery systems. Various materials can be used to formulate drug delivery systems of different shapes, sizes, and ways to incorporate the active substance. The materials used to produce drug delivery systems include: phospholipids, carbon-based materials, metals or metal oxides and polymeric materials ^{2 3}.

In the preclinical research stage, in addition to the determination of the optimal parameters for the obtaining of targeted drug delivery systems, it is important to determine their physical and chemical characteristics, pharmacokinetic parameters and toxicological aspects. Regarding the morphological analysis of drug delivery

systems, their size can be determined by laser light diffraction (LLD), their zeta potential by dynamic light scattering (DLS), porosity by mercury porosimeter, and shape by microscopic techniques such as transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD) are techniques used to determine the composition of transport systems, proving their loading with the active substance, as well as its release from the delivery system. The loading and release of the drug can also be evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) or spectrophotometric analysis, finally determining the loading capacity, the encapsulation efficiency of the drug as well as its cumulative release ².

Since electrochemical analysis techniques bring advantages such as simplicity and low costs, presenting comparable sensitivity and specificity to other analytical techniques, a large number of studies describing applications of electrochemical analysis in cancer research are described in the literature. A series of electrochemical studies aimed the development of sensors for the detection of antitumor drugs ⁴, as well as the detection of tumor biomarkers, useful in cancer diagnosis and monitoring of cancer recurrences ^{5,6}. The interaction between antitumor drugs and DNA sequences has also been analyzed using electrochemistry, in order to study the mechanism of action of some antitumor drugs ⁷. Among the electrochemical techniques used for this purpose are: linear sweep voltammetry (LSV), cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), chronoamperometry (CA) and spectroscopia electrochimică de impedanță (EIS).

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Direct electrochemical detection of gemcitabine from pharmaceutical formulations using a boron doped diamond electrode

1.1. Introduction

Different strategies for the detection of gemcitabine (GMB), including electrochemical methods ^{8,9} were reported in the literature over time. Most of the reported electrochemical methods for the detection of GMB propose indirect strategies for its detection. Despite the low limit of detection (LOD) that can be achieved using these methods ⁹, the electrode surface modifications require complex processes, and surfaces modified in this way can become unstable over time.

The development of a direct electrochemical detection method for GMB was pursued in this study, using a boron doped diamond electrode (BDDE) ¹⁰.

1.2. Materials and methods

The electrochemical analysis of GMB was centered on the use of two electrochemical techniques: DPV and amperometry. The influence of solution pH and

scan rate on the intensity of the analytical signal was investigated using voltammetry to assess the electrochemical behavior of GMB. Both optimized detection strategies were applied in the analysis of pharmaceutical formulations containing GMB, the results obtained using the developed electrochemical methods being compared with those obtained by HPLC-UV and UV-Vis spectrophotometry, used as control methods.

1.3. Results and discussions

The electrochemical behavior of GMB was investigated using CV and DPV, with the help of different electrode materials and under different experimental conditions. An anodic oxidation peak was observed for this substance at about 2.2 V, the oxidation process being irreversible.

The optimized DPV method demonstrated high precision and accuracy at concentrations ranging between 2.5-50 $\mu\text{g/mL}$. Based on these results, an amperometric method was also optimized, achieving increased sensitivity and superior linearity over the concentration range 0.5-65 $\mu\text{g/mL}$. Both methods were applied to the analysis of pharmaceutical formulations used in medical practice, good recoveries and without significant interference of excipients.

The results obtained using DPV and amperometry were compared with those obtained by HPLC-UV and UV-Vis spectrophotometry and statistical analysis demonstrated a good agreement between the results obtained with these methods, as well as high precision and robustness.

1.4. Conclusions

Two electrochemical strategies for the detection of GMB from solutions of physiological pH were optimized and applied for the analysis of some pharmaceutical formulations; the results obtained having a good correlation with those obtained by conventional analytical techniques. Amperometric and voltammetric detection methods have several advantages, including their simplicity, short analysis time (30 s using DPV and 300 s using amperometry) and low costs, making them more affordable than HPLC-UV analysis equipment.

2. A new electrochemical strategy for the simultaneous detection of doxorubicin and simvastatin

2.1. Introduction

Different strategies have been studied and described over time to increase the efficacy and reduce the toxicity of chemotherapy by combining antitumor drugs with molecules from different therapeutic classes. One of the studied associations is the combination of doxorubicin (DOX) with simvastatin (SMV), a molecule that, due to its pleiotropic effects, increases the effectiveness of the treatment and improves the safety profile of DOX¹¹. Thus, the development of drug delivery systems capable of delivering both DOX and SMV to the tumor in the desired ratio is of great interest¹².

In this context, the development of a detection method for the simultaneous quantification of DOX and SMV, which is simple, fast and that uses small volume of samples, is of scientific and practical importance. In this study, the simultaneous

detection of DOX and SMV using electrochemical techniques and screen-printed electrodes (SPE) 173 is described for the first time¹³.

2.2. Materials and methods

The influence of the electrode material, of the pH of the electrolyte solution and of the scan on the detection of DOX and SMV was studied using CV, the oxidation mechanism of the substances being analyzed based on the results obtained. Two analytical techniques were used for the electroanalysis of DOX and SMV samples: LSV and CA, calibration curves of both substances being built by using each method. The optimized strategies were used for the analysis of some pharmaceutical formulations.

2.3. Results and discussions

The oxidation of the two substances was recorded in LSV using graphite SPE at a potential of approximately 0.5 V for DOX and 1 V for SMV. The mechanism of DOX oxidation was proposed to be a reversible process involving two protons and two electrons, while the oxidation of SMV was identified to be an irreversible process, most likely also involving an exchange of two protons and two electrons.

The linearity range obtained for DOX in the presence of SMV was 0.001 – 0.01 mg/mL in LSV and 0.002 – 0.065 mg/mL in CA, while the linearity range obtained for SMV in the presence of DOX was 0.02 – 0.1 mg/mL in LSV and 0.002 – 0.45 mg/mL in CA. Of the two optimized electrochemical methods, the amperometric method was found to be more sensitive (lower limit of detection (LOD) values for SMV).

Following the analysis of pharmaceutical formulations of the two substances, recoveries of DOX in the presence of SMV between 92.0-98.8% and of SMV in the presence of DOX between 97.7-104.11% were obtained.

2.4. Conclusions

New analytical strategies were developed for the simultaneous detection of DOX and SMV, combination which brings important benefits in antitumor treatment. The optimized electroanalytical techniques have shown promising results for applications in the biopharmaceutical field, and can be successfully used to evaluate the concentrations of the two drugs in the preclinical phase of the development of pharmaceutical formulations containing both substances.

3. Simple and fast analytical method for the evaluation of the encapsulation and release of doxorubicin from drug delivery systems

3.1. Introduction

DOX is one of the widely used antitumor drugs from the anthracycline class, an impressive number of drug delivery systems encapsulating this antitumor being reported in the literature. In most cases, the performance of these systems, in terms of encapsulation efficiency and release rate, is evaluated by HPLC-UV, HPLC-MS or UV-Vis spectrophotometry.

To simplify and reduce the preclinical study phase of the development of drug delivery systems containing DOX, it is important to develop a simple and fast

electrochemical method for evaluating the encapsulation and release of this antitumor from pharmaceutical formulations.

3.2. Materials and methods

The electrochemical characterization of DOX was performed by studying the influence of the electrode material, the electrolyte solution, its pH and the scan rate on the electrochemical oxidation of the molecule. A DPV method for DOX detection using pencil graphite electrodes (PGE) was optimized based on the obtained results.

Core-shell microcapsules (MCPs) with a bovine serum albumin core and successive layers of hyaluronic acid and chitosan ¹⁴, were subjected to a DOX loading process, the loaded MCPs being subsequently subjected to a release process under different pH conditions (**Fig. 1**). The samples collected during the release process were analyzed by the optimized electrochemical method, as well as by UV-Vis spectrophotometry as control method. Additionally, DOX loading and release from MCPs was evaluated using SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Finally, the cytotoxicity of MCPs and MCPs loaded with DOX was evaluated.

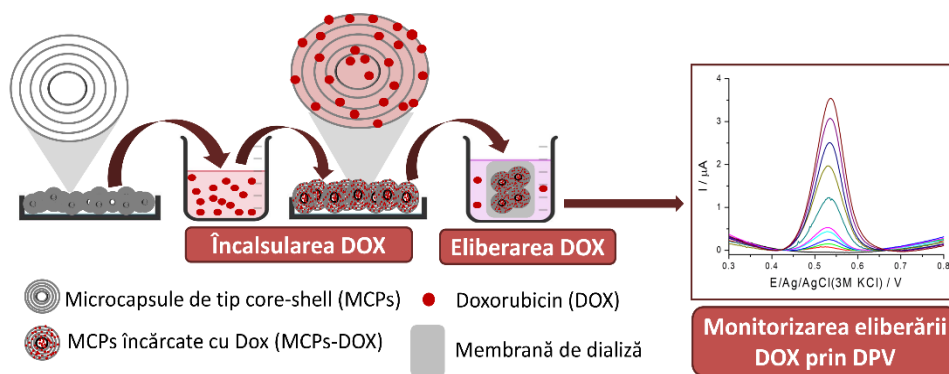


Fig. 1. A schematic representation of DOX encapsulation and release processes ¹⁵

3.3. Results and discussions

An increased intensity of DOX oxidation peak was obtained by using PGE, in solutions with pH values ≤ 5 . Calibration curves of DOX in different buffer solutions, on two different linearity domains (1–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.05–0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), were obtained ¹⁵.

A better loading of MCPs with DOX was observed from solutions prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) compared to buffer solutions of different values of pH, and the best release profile of DOX was registered at pH 5. Several techniques such as FT-IR, CLSM and SEM were successfully applied to highlight the presence of DOX in MCPs-DOX. Cytotoxicity studies suggested the lack of toxicity of MCPs before antitumor encapsulation and a selectivity of the particles towards tumor cells.

3.4. Conclusions

A direct, rapid, sensitive, and low-cost electrochemical method was developed for DOX detection using DPV and PGE. This method allowed the quantification of the antitumor drug from release media frequently used in the preclinical research of new drug delivery systems.

Following the electrochemical analysis of MCPs' performances, an optimization of the encapsulation process and the evaluation of the release profile were carried out, the results showing that these drug delivery systems can bring significant benefits compared to traditional pharmaceutical formulations, benefits confirmed by cytotoxicity tests.

4. Electrochemical aptasensor for OFA/iLRP positive cells detection with applications in the evaluation of drug delivery systems

4.1. Introduction

Hematologic malignancies represent a vast category of oncological diseases, which include aggressive forms, such as acute myeloid leukemia, with a low survival rate. Therefore, an early diagnosis is important in the treatment of the disease and leads to increased life expectancy.

Oncofetal antigen, also called immature laminin receptor protein (OFA/iLRP) is an immunogenic protein, identified especially in the membrane of young fetal cells, as well as in the membrane of some tumor cells, including tumor cells from acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia T, chronic lymphocytic leukemia and B-cell lymphoblastic lymphoma ¹⁶.

Considering the presence of OFA/iLRP exclusively at the surface of tumor cells, the aim of this study was to develop an aptasensor, using the AB3 aptamer, the only aptamer reported in the literature for specifically binding OFA/iLRP protein, with applications in the diagnosis of hematologic malignancies but also in the evaluation of targeted drug delivery systems functionalized with this aptamer ¹⁷.

4.2. Materials and methods

The immobilization of the aptamer on the electrode surface was achieved by amide bonds between the amino group of the modified aptamer sequence and the carboxyl groups from the surface of SPE modified with graphene oxides (GO/SPE). The aptasensor's development steps were evaluated using CV and EIS, as well as SEM, atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy (FM).

The optimized aptasensor was tested for the detection of OFA/iLRP-positive cells (Jurkat cells), observing a linearity between the analytical signal provided by EIS and the concentrations of the analyzed cell suspensions. The selectivity of the aptasensor was evaluated by incubating the aptasensor with a suspension of healthy cells and analyzing diluted serum samples containing Jurkat cells.

The functionalization of commercial liposomes modified with carboxylic groups with the AB3 aptamer was followed, in order to electrochemically evaluate the success of the functionalization, by using the basic platform of the aptasensor. UV-Vis spectrophotometry was used as a control method in this case.

4.3. Results and discussions

The EIS technique proved to be better than CV for the characterization of the aptasensor, as well as for the cellular detection. The variation of the electrochemical signal was directly correlated with the number of immobilized cells at the electrode surface, the linearity domain being between $10\text{-}300 \times 10^3$ cells/mL. SEM, FM, and AFM microscopic techniques confirmed both aptamer immobilization at the electrode's surface and cells immobilization at the aptasensor's surface.

The functionalization of liposomes with the AB3 aptamer was not confirmed by spectrophotometric analysis, and the electrochemical evaluation of the functionalization remained the objective of a future study.

4.4. Conclusions

A new aptasensor was developed and successfully used for the detection of OFA-iLRP-positive cells, the aptamer used, proving its specificity towards these cells compared to healthy fibroblasts.

The simplicity of the selected and optimized detection method, as well as the short duration of the experimental protocol, are the most important advantages of this aptasensor, which may have applications in the diagnosis of blood cancers, but also in the study of aptamer-cell receptor interaction (OFA/iLRP), this interaction being useful in the development of aptamer-based drug delivery systems.

THE ORIGINALITY AND THE INNOVATIONS OF THE THESIS

The electrochemical methods optimized and described within this thesis, stand out for their simplicity and efficiency, which allows their use for the analysis of a large number of samples, having an increased applicability in the biomedical field.

In order to optimize a gemcitabine detection method, a BDDE electrode was used for the first time, the main advantage of this detection method being the simplicity and rapidity of the analysis, compared to the detection based on the use of biosensors.

The simultaneous electrochemical detection of doxorubicin and simvastatin was described for the first time in this paper, in the context of increased interest in the formulation of liposomes that encapsulate both drug substances, association which brings efficacy and safety benefits in cancer therapy.

Although there are numerous electrochemical methods for the analysis of DOX described in the literature, the first electroanalytical method applied to the evaluation of the *in vitro* release of DOX from targeted drug delivery systems was developed within this thesis.

Another novelty element is represented by the double use of the AB3 aptamer, in the optimization of an aptasensor for the detection of OFA/iLRP-positive tumor cells, and in the functionalization of transport systems, which would ensure the targeted transport of antitumor drugs to tumor cells. An important advantage of the

developed aptasensor is the short time of its obtaining (45 min) and sample analysis (10 min), significantly reduced intervals compared to other aptasensors described in the literature.

SELECTED REFERENCES

1. Hecht KA. Oncology Overview and Supportive Care. In: Sutton SS, editor. McGraw-Hill's NAPLEX® Review Guide [Internet]. 3e ed. McGraw Hill; 2019 [cited 2023 Apr 7]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2512§ionid=201032533>
2. Rus I, Tertis M, Cristea C, Sandulescu R. Modern Analytical Techniques for Drug Delivery Systems Characterization. *Curr Anal Chem*. 2020 Jun 13;17(8):1064–73.
3. Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IMI, et al. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem*. 2020 May 19;8:341.
4. Porfireva A V., Goida AI, Rogov AM, Evtugyn GA. Impedimetric DNA Sensor Based on Poly(proflavine) for Determination of Anthracycline Drugs. *Electroanalysis* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2023 Apr 9];32(4):827–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elan.201900653>
5. Hosu O, Tertis M, Melinte G, Feier B, Săndulescu R, Cristea C. Mucin 4 detection with a label-free electrochemical immunosensor. *Electrochem Commun*. 2017 Jul 1;80:39–43.
6. Taleat Z, Cristea C, Marrazza G, Săndulescu R. Electrochemical Sandwich Immunoassay for the Ultrasensitive Detection of Human MUC1 Cancer Biomarker. *Int J Electrochem*. 2013;2013:1–6.
7. Bruzaca EES, Lopes IC, Silva EHC, Carvalho PA V., Tanaka AA. Electrochemical oxidation of the antitumor antibiotic mitomycin C and in situ evaluation of its interaction with DNA using a DNA-electrochemical biosensor. *Microchem J*. 2017 Jul 1;133:81–9.
8. Shoja Y, Kermanpur A, Karimzadeh F, Ghodsi J, Rafati AA, Adhami S. Electrochemical molecularly bioimprinted siloxane biosensor on the basis of core/shell silver nanoparticles/EGFR exon 21 L858R point mutant gene/siloxane film for ultra-sensing of Gemcitabine as a lung cancer chemotherapy medication. *Biosens Bioelectron*. 2019 Dec;145:111611.
9. Florea A, Guo Z, Cristea C, Bessueille F, Vocanson F, Goutaland F, et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. *Talanta*. 2015 Jun;138:71–6.
10. Rus I, Pusta A, Tertis M, Barbălată C, Tomuță I, Săndulescu R, et al. Gemcitabine direct electrochemical detection from pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Pharmaceuticals*. 2021;14(9).
11. Henslee AB, Steele TA. Combination statin and chemotherapy inhibits proliferation and cytotoxicity of an aggressive natural killer cell leukemia. *Biomark Res* [Internet]. 2018 Aug 9 [cited 2023 May 15];6(1):1–11. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-018-0140-0>
12. Barbălată CI, Porfire AS, Sesarman A, Rauca VF, Banciu M, Muntean D, et al. A screening study for the development of simvastatin-doxorubicin liposomes, a co-formulation with future perspectives in colon cancer therapy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 May 15];13(10):1526. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1526/htm>
13. Rus I, Tertis M, Barbălată C, Porfire A, Tomuță I, Săndulescu R, et al. An Electrochemical

- Strategy for the Simultaneous Detection of Doxorubicin and Simvastatin for Their Potential Use in the Treatment of Cancer. *Biosensors*. 2021;11(1).
14. Paşcalău V, Tertis M, Pall E, Suci M, Marinca T, Pustan M, et al. Bovine serum albumin gel/polyelectrolyte complex of hyaluronic acid and chitosan based microcarriers for Sorafenib targeted delivery. *J Appl Polym Sci [Internet]*. 2020 Sep 10 [cited 2020 Oct 12];137(34):49002. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.49002>
 15. Rus I, Tertiş M, Paşcalău V, Pavel C, Melean B, Suci M, et al. Simple and fast analytical method for the evaluation of the encapsulation and release profile of doxorubicin from drug delivery systems. *Farmacia*. 2021;69(4):670–81.
 16. Siegel S, Wagner A, Friedrichs B, Wendeler A, Wendel L, Kabelitz D, et al. Identification of HLA-A*0201-Presented T Cell Epitopes Derived from the Oncofetal Antigen-Immature Laminin Receptor Protein in Patients with Hematological Malignancies. *J Immunol*. 2006;176(11):6935–44.
 17. An Y, Hu Y, Li X, Li Z, Duan J, Yang X Da. Selection of a novel DNA aptamer against OFA/iLRP for targeted delivery of doxorubicin to AML cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–11.