

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство
Българска академия на науките
Секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства”
ул. Акад. Г. Бончев, бл.21, София 1113, България

Северина Йорданова Семкова

ТЕМА

Комбиниран подход за *in vitro* и *in vivo* визуализиране
на проникването и локализирането на флуоресцентни наночастици
в тумори след електропорация

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

представена за присъждане на образователната и научна степен ”доктор”

Професионално направление: Биологични науки, шифър 4.3 (стар шифър –
Биофизика – 01.06.08)

Научни ръководители:

проф. д-р Румяна Бакалова-Желева, д.б.н.

Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

доц. д-р Биляна Николова

ИБФБМИ - БАН, Секция “Електроиндуцирани и адхезивни свойства”

София
2017 г.

Дисертационният труд е обсъждан на разширен научен семинар на секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“ на ИБФБМИ на 06.01.2017 г.

По време на обучението ми в Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН – гр. София имах възможността да работя с голям брой специалисти, които ми даваха постоянни съвети и напътствия в разработването на настоящия дисертационен труд. На първо място изказвам най-искрени благодарности на научните си ръководители – проф. д-р Румяна Бакалова-Желева, д.б.н. и доц. д-р Биляна Николова за дадената ми възможност да усвоя и прилагам едни от най-съвременните подходи и методи в биомедицинските изследвания, както и за цялостната им подкрепа и съдействие при разработването и подготовката на настоящата дисертация.

Също така изказвам най-сърдечна признателност на всички колеги от Секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“ – ИБФБМИ, БАН и от Медицински факултет към СУ „Св. Климент Охридски“ за безценните им съвети и съдействие при разработването на дисертацията; на Министерството на науката и образованието на Р. България за предоставената ми възможност за специализация в Япония, в рамките на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ BG051PO001-3.3.05-0001 – “Наука и Бизнес“, както и за участието ми в проект BG051PO001-3.3.06.-0040; на „Програма за подпомагане на младите учени – БАН“ и фирма ФОТ ООД – за осигурената финансова подкрепа по време на изработването на дисертацията.

Благодарна съм за огромната подкрепа на моето семейство и приятели, особено на съпруга си, който беше една от основните движещи сили за изработването на настоящия труд.

Сърдечно благодаря!

Публичната защита ще се състои на 2017 г., от часа в залата на ИФРГ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, гр. София.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на ИБФБМИ-БАН (<http://biomed.bas.bg/bg/procedures/>) и са на разположение на интересуващите се в канцеларията на института – ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 105, стая 5, София.

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство
Българска академия на науките
Секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства”
ул. Акад. Г. Бончев, бл.21, София 1113, България

Северина Йорданова Семкова

ТЕМА

Комбиниран подход за *in vitro* и *in vivo* визуализиране
на проникването и локализирането на флуоресцентни наночастици
в тумори след електропорация

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

представена за присъждане на образователната и научна степен ”доктор”

Професионално направление: Биологични науки, шифър 4.3 (стар шифър –
Биофизика – 01.06.08)

Научни ръководители:

проф. д-р Румяна Бакалова-Желева, д.б.н.

Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

доц. д-р Биляна Николова

ИБФБМИ - БАН, Секция “Електроиндуцирани и адхезивни свойства”

София
2017 г.

Най-често използвани съкращения и термини

Имиджинг анализ (от англ.) – визуализиране на различни обекти (клетки, тъкани, органи) в живи организми с различни методи от образната диагностика.

Target (от англ.) – цел, локус – биологична структура (молекула, клетка, тъкан, орган), която се визуализира и анализира по отношение структура, локализация и функция.

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

siRNA – малки интерфериращи РНК-и

QD/QDs – квантови точки

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

OI – оптичен имиджинг

MRI – магнитно-резонансна томография

СТ – компютърна томография

PET – позитрон-емисионна томография

EPR – ефект на задържане (enhanced permeability and retention effect)

NIR – близка инфрачервена област от спектъра на светлината

PEG – полиетиленгликол

DLS – динамично разсейване на светлината

AFM – атомно-силова микроскопия

PBS – буфериран физиологичен разтвор

MTS – метил-тетразолиева сол

ROI – област на интерес

Въведение

Една от водещите причини за смъртност в световен мащаб са раковите заболявания. Поради тази причина, основните усилия на биомедицинските науки са насочени към повишаване ефективността на противораковите терапии. Обещаващи в това направление са две активно проучвани научни области – съвременната химиотерапия и насоченото доставяне на лекарства чрез наночастици. Едва в последните десет години се обособи и разви идеята за комбинирането им в рамките на мултифункционален наноматериал, съчетаващ възможности за диагностика и терапия (“тераностични наночастици”) и показващ обнадеждаващи резултати.

Разработването на флуоресцентни наночастици, способни да бъдат доставени и в последствие да освободят лекарствени средства в таргетните тъкани, са съвременни стратегии в диагностицирането и терапията на раковите заболявания. Прилагането на трагет-специфични наносистеми позволяват да бъде достигната многократно по-висока локална концентрация (лекарства и/или контрастни агенти) в регионите на интерес, което силно повлиява диагностичния потенциал, както и терапевтичния ефект. През последните години все повече автори докладват за разработването и успешното прилагане на тераностични наночастици. При *in vivo* третиране се постига повишена системна циркулация, избягване на защитните механизми на организма и целево доставяне на лекарствени субстанции и контрастни агенти, с цел повлияване на раковите заболявания на клетъчно и молекулно ниво.

Методите за лечение на тумори, базирани на електропорация, са обект на активно проучване, като интересите са насочени основно в следните направления: локално доставяне на антитуморни агенти, оптимизация на електричните параметри и изясняване на точните механизми на молекулярно ниво. Интерес представляват различните техники за насочване и увеличено задържане на наночастици в солидни тумори. Електроопосредстваното интернализиране е един обещаващ подход в тази насока. Електротретирането подпомага проникването, локализацията и задържането на наночастици в тумори. Подобряването на съществуващите и разработването на нови комбинации от електрохимиотерапия и дългоживущи нано-размерни системи за доставяне на лекарства, притежава потенциал за бъдеща терапевтична стратегия при персонализираното лечение на солидни тумори. Именно в това научно направление бе разработена настоящата дисертация.

Цели и основни задачи на дисертацията

Цел на дисертацията

Да се разработи комбиниран подход за оценка на тераностичния потенциал на мономодални и мултимодални наночастици и възможностите им за визуализиране на проникването, локализацията и фармакокинетиката *in vitro* и *in vivo* – пасивно или след електропорирване.

Основни задачи на дисертацията

1. Характеризиране на мономодални и мултимодални наночастици – полимерзоми и нанохидрогели, подходящи за диагностика и терапия на ракови заболявания.
2. Оценка на възможностите за задържане на контрастни субстанции в наночастиците.
3. Изследване на ефекта на електропорацията върху задържането на контрастни субстанции в наночастиците или освобождаването им от тях.
4. Изследване степента на проникване на наночастици в живи клетки – пасивно или след електропорация, чрез маркирането им с квантови точки и визуализиране чрез флуоресцентна конфокална микроскопия.
5. Изследване локализацията и степента на проникване на мултимодални наночастици в животински туморни модели – пасивно или след електропорация, чрез използване на флуоресцентен имиджинг анализ и магнитно-резонансна томография.

Материали и методи

За експерименталната работа са използвани реактиви и химикали с висока степен на чистота (“HPLC-grade”), консумативи за еднократна употреба (епруветки, връхчета за пипети, пипети, матраци, микроплаки и др.), както и реактиви (клетъчни среди, буфери, дестилирана вода и др.), които са автоклавираны. Всички използвани материали са доставени от следните компании: *Invitrogen*, *Wako Pure Chemical Industries*, *Sigma-Aldrich*, *Nacalai Tesque Inc.*, *Abbott*, *Greiner Bio-One GmbH*, *Promega* и др.

Изследването е проведено с два типа наночастици, базирани на квантови точки – гелни и хитозанови наночастици. За *in vitro* тестовете като модел на колоректален карцином е използвана клетъчна линия *Colon 26 (CLS, Германия)*, а *in vivo* експериментите са проведени върху експериментални модели на колоректален карцином - мишки от линията *Balb/c nude* в съответствие с указанията на Дружеството по Физиология на Япония и са одобрени от Комитета за работа с животни на Националния институт за радиологични изследвания, Чиба, Япония. Всички експерименти с електротретиране са извършени с апарат *Chemipulse IV*.

Препаративни методи

1. Култивиране на ракови клетки от линия *Colon 26*.
2. Електропориране на клетки
3. Електропориране на животински модели

Аналитични методи

1. Тест за клетъчна преживяемост, респ. цитотоксичност – *MTS тест*.

2. *Флуоресцентна конфокална микроскопия in vitro* - чрез лазер-сканиращ конфокален микроскоп (*Leica DM 2500, Leica Microsystems, Германия*).
3. *Флуоресцентен имиджинг анализ in vivo* – чрез *Maestro EX Imaging System* като получените резултати се анализират чрез *Living Image In Vivo Imaging* софтуер (*Maestro version 2.10.0*).
4. *Магнитно-резонансна томография* - MRI измерванията са проведени със 7.0 Tesla магнитно-резонансен томограф с хоризонтално магнитно поле (*Kobelco and Jastec, Япония*), свързан с Bruker Avance I конзола (*Bruker BioSpin, Германия*) и контролиран с ParaVision 4.0.1 (*Bruker BioSpin*).
5. *Спин-ултрафилтрация* - За анализиране на степента на задържане на контрастните субстанции в наночастиците, използвахме *Vivaspin-6 (Sartorius)* ултрафилтрационни центробежни епруветки за концентриране и пречистване на проби. Супернатантата и филтратът се подлагат на спектрофлуориметричен или на MRI анализ при съответните спектрални параметри, съобразени с конкретното тествано контрастно вещество. Данните се обработват и представят в графичен вид.
6. *Статистически анализ* - Всички статистически изчисления са извършени на *Microsoft Excel*, обработени със съответни стандартни отклонения и анализирани чрез *Student's t-тест*, където това е подходящо. Проверка за статистическа достоверност е при зададена стойност на $p < 0.05$.

Експериментални резултати и дискусия

Разработването на флуоресцентни наночастици, способни да бъдат доставени и в следствие да освободят лекарствени средства в таргетни тъкани, е в основата на съвременните стратегии в диагностицирането и терапията на раковите заболявания. Прилагането на таргет-специфични наносистеми позволява да бъде достигната многократно по-висока локална концентрация (лекарства и/или контрастни вещества) в областите на интерес, което силно повлиява както диагностичния потенциал, така и терапевтичния ефект (*Janib et al., 2010; Bakalova et al., 2007*).

От голямо значение за локализирането на наноносителите е размерът им, което се определя от използваните материали (самоорганизиращи се полимери, хидрогели, квантови точки и др.) (*Janib et al., 2010; Bakalova et al., 2007; Kokuryo et al., 2015; Baeza et al., 2015; Christian et al., 2009; Levine et al., 2008; Murayama et al., 2012; Murayama et al., 2012*). Счита се, че оптималният размер на наночастиците, обезпечаващ най-добро пасивно проникване в солидни тумори е 100-150 nm (*Janib et al., 2010; Bakalova et al., 2007; Kokuryo et al., 2015; Baeza et al., 2015; Murayama et al., 2012*).

За проследяване на фармакодинамиката и натрупването в тъкани и/или органи, наночастиците се маркират с контрастни средства. Отчитането става чрез използване на техники за визуализиране: оптичен имиджинг, MRI, PET и др. В този контекст, квантовите точки са едни от най-подходящите контрастни субстанции за проследяване локализацията и фармакокинетиката на полимерни наночастици, както *in vitro*, така и *in vivo*.

Основната идея на настоящата дисертация е свързана с изследване на

тераностичния потенциал на няколко вида наночастици – „полимерзоми” и „нанохидрогели”, наричани още „нанозоми”. Охарактеризирана е структурата и възможностите за натоварване на нанозомите с контрастни субстанции с различна молекулна маса. Проследени са локализацията и проникването на наночастиците в туморни клетки от рак на дебелото черво (*Colon 26*), както и в миши модели на солидни тумори (колоректален карцином) – пасивно или чрез електропорация.

1. Полимерзоми, маркирани с флуорофори

1.1. Структура, физико-химични характеристики и тестове за задържане на флуоресцентния маркер в полимерната матрица

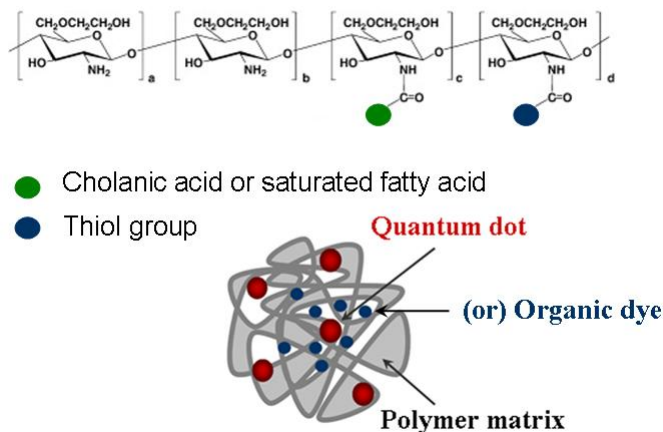
Едно от предимствата при употребата на наночастици като системи за пренос на лекарства е възможността за маркирането им с различни контрастни средства и визуализиране на тяхната локализация в биологични обекти. С цел определяне на най-подходящ флуорофор за маркиране на използваните в дисертацията нанозоми, проведохме серия експерименти, в които изследвахме възможностите за задържане на различни багрила в структурата на полимерния носител. С помощта на спин-ултрафилтрация и спектрофлуориметрия, по описаната в глава „**Материали и методи**“ в Дисертацията процедура, бяха тествани полимерзоми, натоварени с 4 различни флуоресцентни багрила (*FITC*, *Oregon Green*, *Rhodamine 6G* и квантови точки).

Органичните флуорофори са малки по размер и лесно напускат наночастиците. В литературата се срещат два варианта за задържането им в полимерзоми (*Chen et al.*, 2014; *Wolfbeis*, 2015; *Sperling and Parak*, 2010):

А) *Конюгиране на флуорофора с полимера*. Предимството на този подход е в здравата ковалентна връзка между флуорофора и полимера, която трудно се разрушава и позволява да се визуализира точно локализацията на наночастиците в биологични обекти (клетки и живи организми). Основни недостатъци на подхода са: (а) промяната в повърхностния заряд на полимерозмите, което често води до намалена проникваща способност в клетките и тъканите; (б) невъзможността да се оцени скоростта и степента на излизане на флуорофора от полимерзомите, което би дало възможност да се прогнозира евентуалната скорост и степен на излизане на лекарствени средства с подобна молекулна маса, включени във вътрешния им обем.

Б) *Конюгиране на флуорофора с декстран (с различна молекулна маса) и последващо включване на декстран-флуорофора в полимерзомите* (*Chen et al.*, 2014; *Wolfbeis*, 2015; *Sperling and Parak*, 2010). Този подход позволява да се оцени скоростта и степента на излизане на флуорофора от полимерзомите, респ. да се прогнозира скоростта и степента на освобождаване на лекарствени средства от наночастиците, в зависимост от молекулната им маса и структурата на носещата матрица. Недостатък на подхода е, че изтичането на флуорофора от наночастиците не позволява да се оцени прецизно проникването им в живите биологични обекти и тяхната точна локализация.

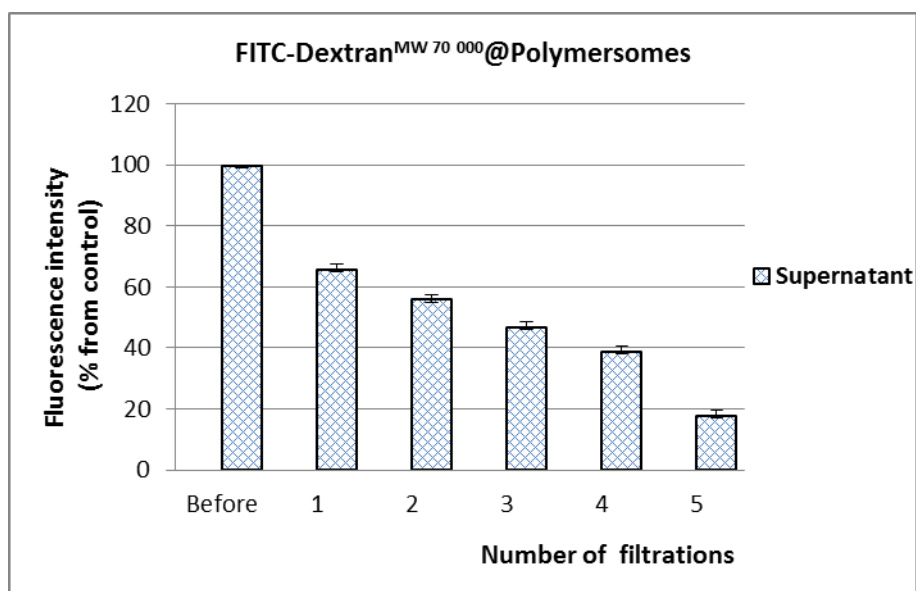
Структурата на полимерзомите, използвани в дисертацията, е представена на **Фигура 1**. Флуорофорите се задържат във вътрешния обем на полимерната глобула на базата на електростатични и хидрофилно-хидрофобни взаимодействия, без конюгиране с полимера. Повърхността на наночастиците е хидрофилна и положително заредена (ζ -потенциалът е в диапазона +12-19 mV, в зависимост от вида на включения флуорофор). Полимерзомите са стабилни в серум – агрегация не се наблюдава дори след 24-часова инкубация при 37°C.



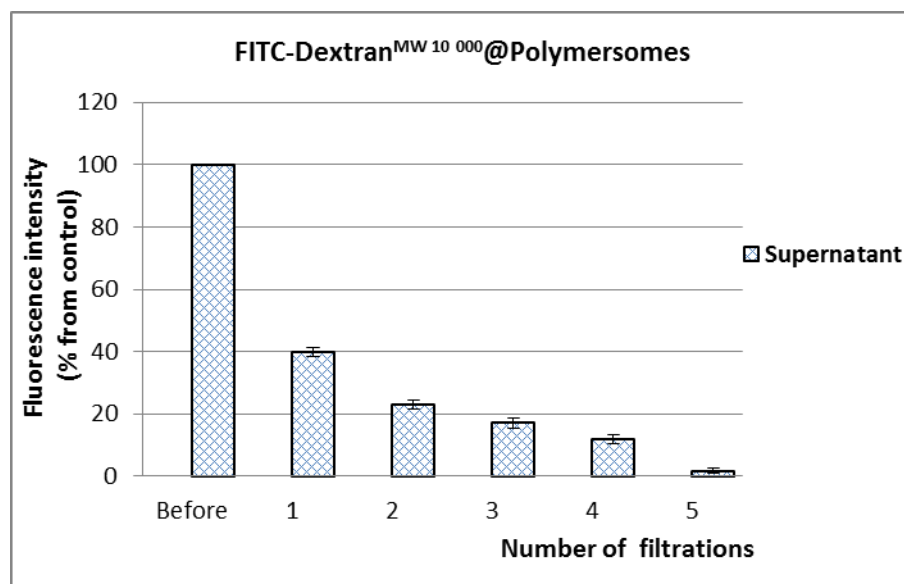
Фигура 1. Структура на полимерзомите, маркирани с флуорофор.

Фигури 2 и 3 показват възможностите за задържане на конвенционалното багрило *FITC* след спин-ултрафилтруване на полимерзومي с включен конюгат *FITC*-декстран, с различна молекулна маса. За целта са използвани полимерзومي от химично модифициран хитозан (171). Връзката между багрилото и декстрана е ковалентна, а самите конюгати се включват в полимерзомите посредством по-слаби и по-лесно нарушими електростатични и хидрофилно-хидрофобни взаимодействия. Използван е декстран с две различни молекулни тегла – M_w 70 000 Da (*FITC-Dextran*^{*Mw*70 000}@*polymersomes* – **Фигура 2**) и M_w 10 000 Da (*FITC-Dextran*^{*Mw*10 000}@*polymersomes* – **Фигура 3**). Размерът на наночастиците е измерен по метода на диференциалното светоразсейване. Установено е, че той е ~108 nm ($\pm$ 17 nm) за полимерзомите, натоварени с по-високомолекулни декстранови конюгати, и ~100 nm ($\pm$ 15 nm) за втория вид. От **Фигура 2** се вижда, че интензитетът на флуоресценция, отчетен в супернатантата, след петкратно филтруване е спаднал с повече от 80% от началното ниво, което показва изтичане на *FITC-Dextran*^{*Mw*70 000} конюгатите от полимерзомите във филтрата. При процедурата нанозомите се задържат от полиетилен сулфоновата мембрана в супернатантата. За измерения флуоресцентен сигнал в утайката се наблюдава пропорционално увеличение след всяко филтруване. Изчислената задържаща способност за *FITC-Dextran*^{*Mw*70 000} в полимерзомите е ~18%. Сходен резултат, но с по-голямо намаление на флуоресцентния сигнал в супернатантата се отчита при наночастиците, натоварени с *FITC-Dextran*^{*Mw*10 000} – задържаща способност 1.7%. Следователно, конюгатите *FITC-Dextran*^{*Mw*10 000} излизат много по-бързо от полимерзомите, отколкото *FITC-Dextran*^{*Mw*70 000}. Спектрофлуориметричните измервания са проведени при следните спектрални параметри: λ_{ex} =492 nm; λ_{em} =518 nm, отговарящи съответно на дължина на вълната на възбуждане и емисия на флуоресцентния маркер.

Този експериментален резултат показва, че колкото по-високомолекулен е декстрана, използван за конюгиране с *FITC*, толкова по-голямо количество от флуорофора се задържа в наночастиците. Доказано беше също, че и при двата описани варианта на полимерзومي, натоварени с *FITC-Dextran*, не се наблюдава достатъчно ефективно и дълготрайно задържане на багрилото, за да може успешно да се използват като флуоресцентни проби за приложения *in vivo* на експериментални животни.

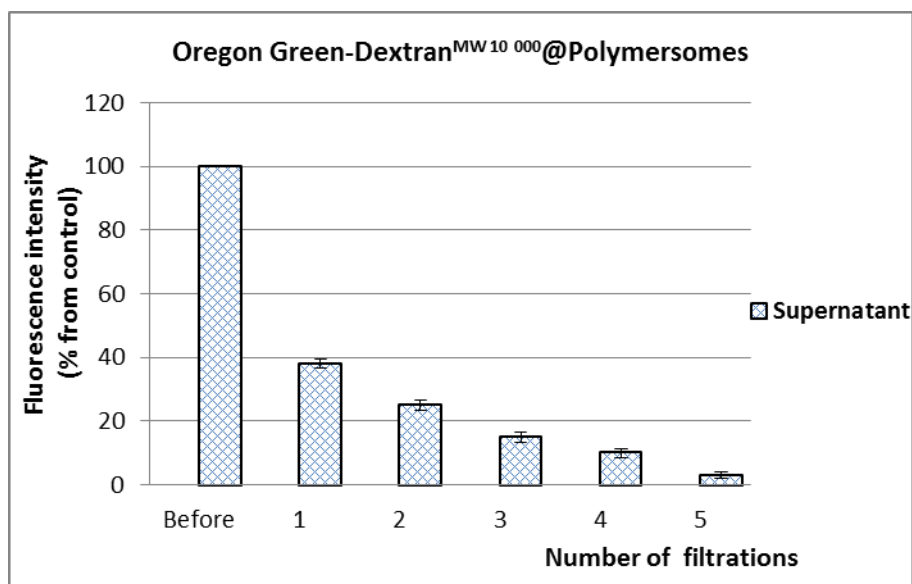


Фигура 2. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с FITC-Dextran (Mw 70 000). Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 100 000.



Фигура 3. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с FITC-Dextran (Mw 10 000). Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 30 000.

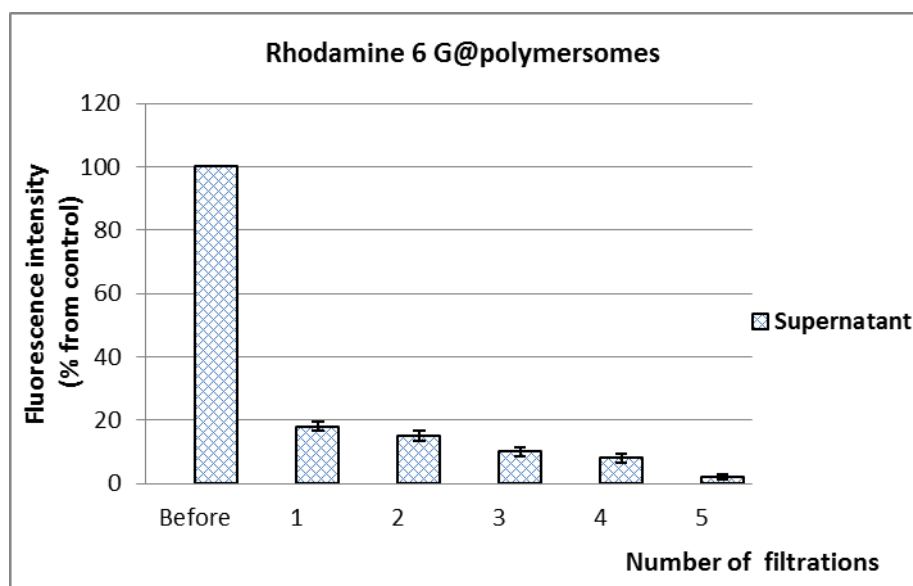
Аналогичен експеримент беше проведен с флуоресцентното багрило Oregon Green, отново конюгирано с декстран Mw 10 000 (Oregon Green-Dextran^{Mw10 000}@polymersomes – **Фигура 4**). Размерът на натоварените с Oregon Green-Dextran^{Mw10 000} полимерзони е ~140 nm ($\pm$ 10 nm). Спектрофлуориметричните измервания са проведени при спектрални показатели за Oregon Green: λ_{ex} =488 nm; λ_{em} =520 nm. От получения резултат след ултрафилтруването се установява спад на интензитета на флуоресценция, измерен в супернатантата. Изчислената задържащата способност е около 3%, което налага аналогичен извод – неефективно и недълготрайно задържане на конюгатите Oregon Green-Dextran^{Mw10 000} в структурата на полимерзомите.



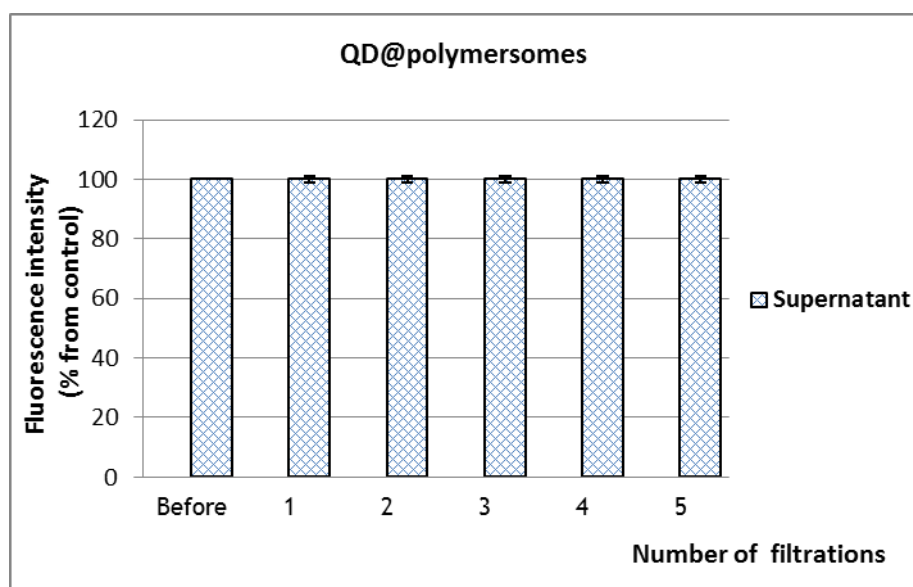
Фигура 4. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с Oregon Green-Dextran (10 000 Mw). Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 30 000.

Спин-ултрафилтруване беше проведено и за директно натоварени с флуоресцентен маркер наночастици – Rhodamine 6G@polymersomes (Фигура 5) с размер ~ 110 nm (± 12 nm). Спектрофлуориметричните измервания са извършени при: $\lambda_{\text{ex}}=528$ nm и $\lambda_{\text{em}}=551$ nm. Резултатите показват голям спад на флуоресцентния сигнал в супернатантата още след първото филтруване, което говори за бързо изтичане на почти цялото количество Rhodamine 6G от наночастиците. Изчислената задържаща способност е $\sim 20\%$ след първото филтруване и $\sim 2\%$ след петото филтруване.

С цел да проверим възможностите за използване на квантови точки (QDs) като флуоресцентен маркер в структурата на полимерзони (QD@polymersomes), изследвахме и възможностите за тяхното задържане след спин-ултрафилтрация. Крайната концентрация на QDs в суспензията от нанозони е $0.133 \mu\text{M}$, а размерът им около 115 nm (± 9 nm). Спектрите на възбуждане и емисия за конкретните квантови точки са: $\lambda_{\text{ex}}=365$ nm и $\lambda_{\text{em}}=655$ nm. От получените данни (Фигура 6) може да се заключи, че дори след 5 филтрувания е наличен силен флуоресцентен сигнал от QDs в супернатантата. От друга страна, в утайката не се отчита флуоресцентен сигнал, респективно не се регистрира излизане на квантови точки от полимерзомите (100% задържаща способност). За целта на този експеримент е използван филтър Vivaspin-6 Mw 100 000, като самите квантови точки преминават изцяло през филтъра. Следователно, от всички тествани флуоресцентни маркери, квантовите точки се оказват най-подходящият избор за натоварване на полимерзони, поради качествено им и продължително задържане в структурата на наночастиците.

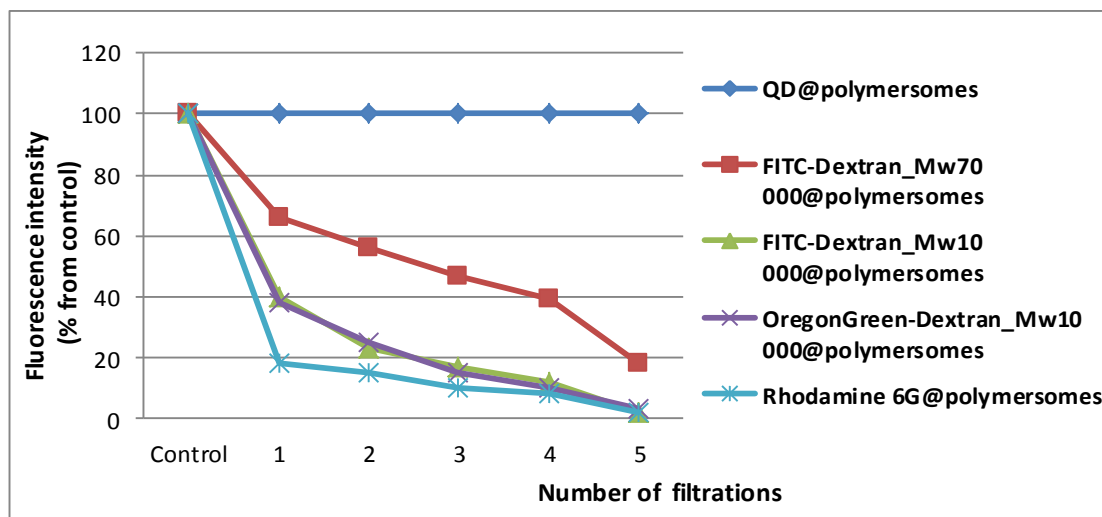


Фигура 5. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с Rhodamine 6G. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 30 000.



Фигура 6. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с квантови точки. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 100 000.

Фигура 7 представя сравнителен анализ на промяната на флуоресцентната емисия в супернатантата след ултрафилтруване, при употребата на всеки от тестваните и коментирани до момента флуорофори за маркиране на полимерзони. Така обобщени, данните потвърждават, че единствено при натоварването с квантови точки, се наблюдава 100% задържане на флуорофора в полимерзомите достатъчно дълго време след процедурата. Именно този резултат наложи да продължим нашите експерименти с полимерзони, белязани с QDs.



Фигура 7. Интензитет на флуоресценцията, отчетен в супернатанта и получен след неколнократно спин-ултрафилтруване на полимерзони, натоварени с различни флуоресцентни маркери. Данните са средни от три независими експеримента.

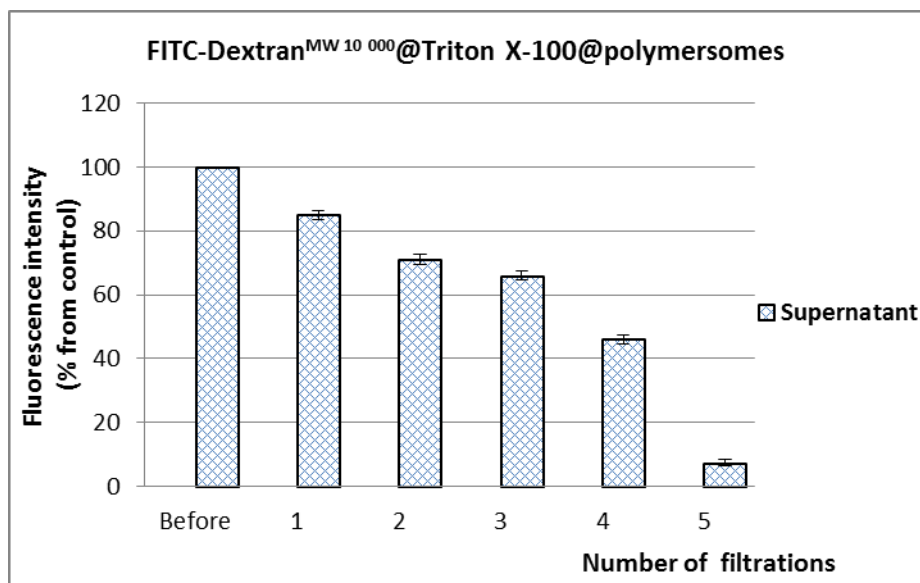
Базирайки се на получените данни, приехме, че *QD@polymersomes* биха били проложими флуоресцентни проби за осъществяване на качествен мониторинг на фармакодинамиката им при последващи *in vitro* и *in vivo* анализи. Полученият резултат подкрепя идеята ни, че при въвеждането на нанозони, маркирани с квантови точки, в ракови клетки или солидни тумори, произходът на отчетения флуоресцентен сигнал ще се дължи изцяло на QDs, влизащи в състава на полимерзомите, а не на свободни квантови точки. При разработването на *QD@polymersomes* бяха използвани квантови точки, за които е показано, че не проникват пасивно в живи клетки и тъкани (*Bakalova et al., 2008*).

Проследихме и възможностите за повишаване степента на задържане на органичните флуоресцентни багрила чрез добавяне на различни детергенти, на базата на мицелообразуване. Тествани са два различни детергента, характеризиращи се с висока степен на компактизиране – Triton X-100 и BRIJ-35. Съотношението багрило:детергент е определено на базата на множество предварителни експерименти.

Детергентът Triton X-100 се използва за силно омрежване до плътни мицели най-често в съотношение 1:32 (флуорофор:Triton X-100, mol:mol). Чрез спин-ултрафилтрация е проследено как детергентът влияе върху задържането на *FITC-Dextran^{Mw10 000}* и *Rhodamine 6G* в полимерзомите. Спектралните характеристики за възбуждане и емисия на двете багрила са аналогични на посочените по-горе.

На **Фигура 8** са показани резултатите за *FITC-Dextran^{Mw 10 000}@Triton X-100@polymersomes*. Наблюдава се намаляване на флуоресцентния сигнал в супернатантата, в хода на титруването, като това става значително по-бавно, отколкото в отсъствие на детергент. След петото филтруване, обаче, флуоресцентният сигнал в супернатантата е доста нисък – задържащата способност е едва 7.4%, което най-вероятно се дължи на изтичане на детергента от полимерзомите и нарушаване на мицеларните структури. Подобна тенденция се наблюдава и при *Rhodamine 6G@Triton X-100@polymersomes*, като изчислената задържаща способност е незначителна – едва ~2% (**Фигура 9**).

От получените резултати може да се заключи, че при употребата на детергент Triton X-100 органичните флуорофори и конюгатите флуорофор-декстран излизат сравнително бързо от полимерзомите и следователно, този повърхностно-активен агент не е подходящ избор за компактизиране.

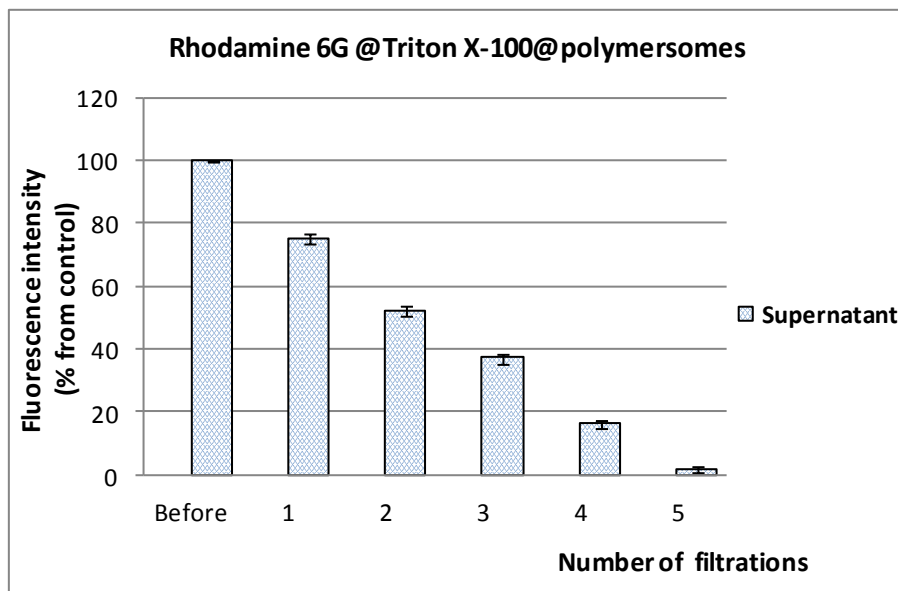


Фигура 8. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзоми, натоварени с FITC-Dextran (10 000 Mw) и детергент Triton X-100. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 30 000.

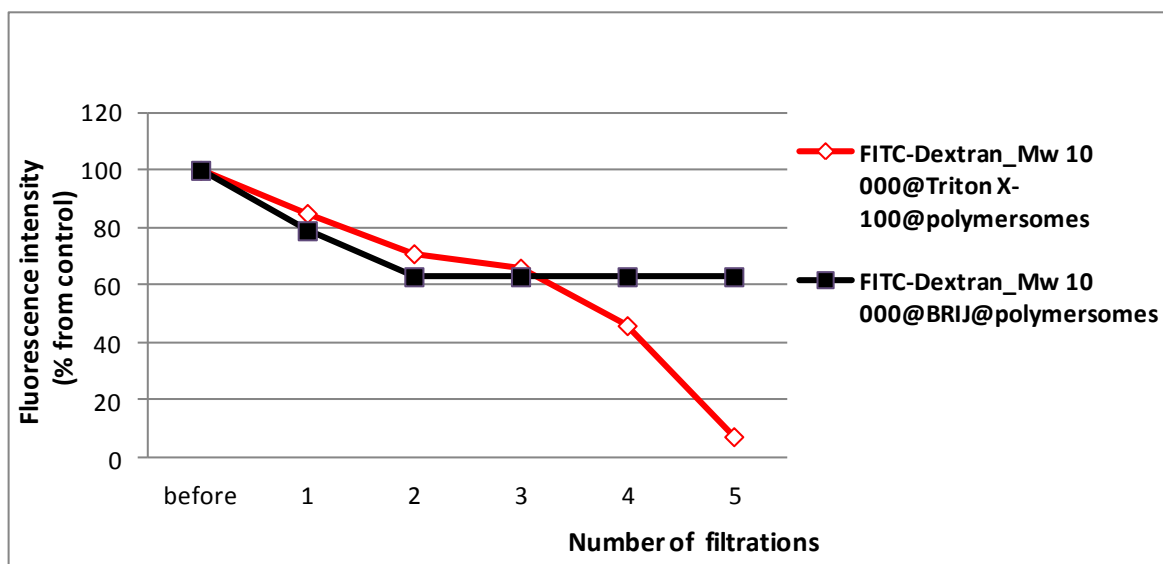
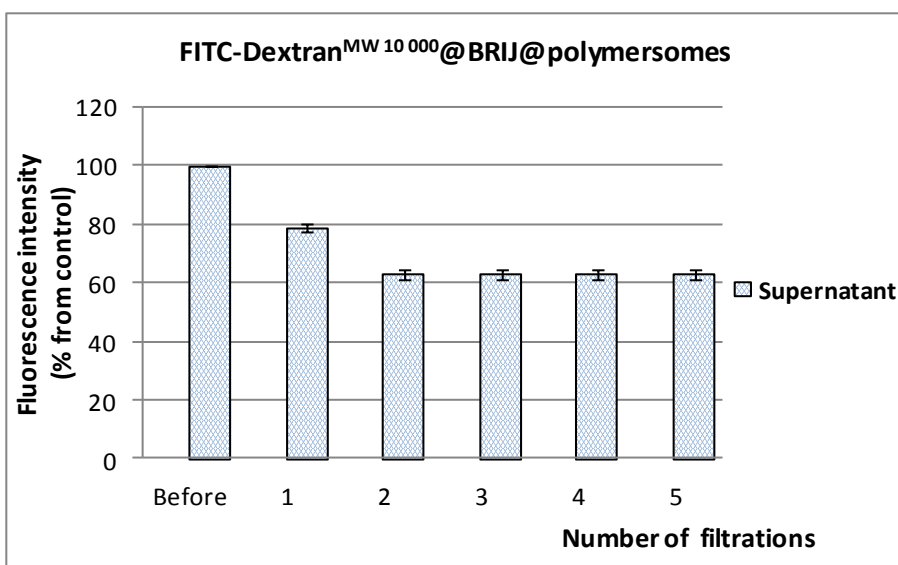
Вторият тестван детергент – BRIJ-35, се използва в съотношение флуорофор:детергент – 1:128 (mol:mol). Характерно за него е силната му компактизираща способност, което води до понижаване размера на полимерзомите. Проведохме спин-ултрафилтрация на натоварени с FITC-Dextran^{Mw10 000} и компактизирани с BRIJ-35 полимерзоми (**Фигура 10**). Размерът им е измерен с DLS и е определен на ~50 nm, което е около два пъти по-малко, в сравнение със структурно аналогичните полимерзоми, но получени без употреба на детергент. Резултатите от флуоресцентния анализ показват, че конюгатите FITC-Dextran^{Mw10 000} излизат частично (~40%) от полимерзомите след второто филтруване, но останалата част се запазва в наночастиците до края на 5-то филтруване.

На **Фигура 11** са обобщени резултатите за интензитета на флуоресценция в супернатантата след спин-ултрафилтруване на FITC-Dextran^{Mw10 000}@Triton X-100@polymersomes и FITC-Dextran^{Mw10 000}@BRIJ@polymersomes. Графиката демонстрира по-добрата задържаща способност на полимерзомите за конюгатите FITC-Dextran след употреба на BRIJ-35 за компактизиране на наночастиците.

Фигура 9. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзоми, натоварени с Rhodamine 6G и детергент Triton X-100. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspın-6 Mw 30 000.



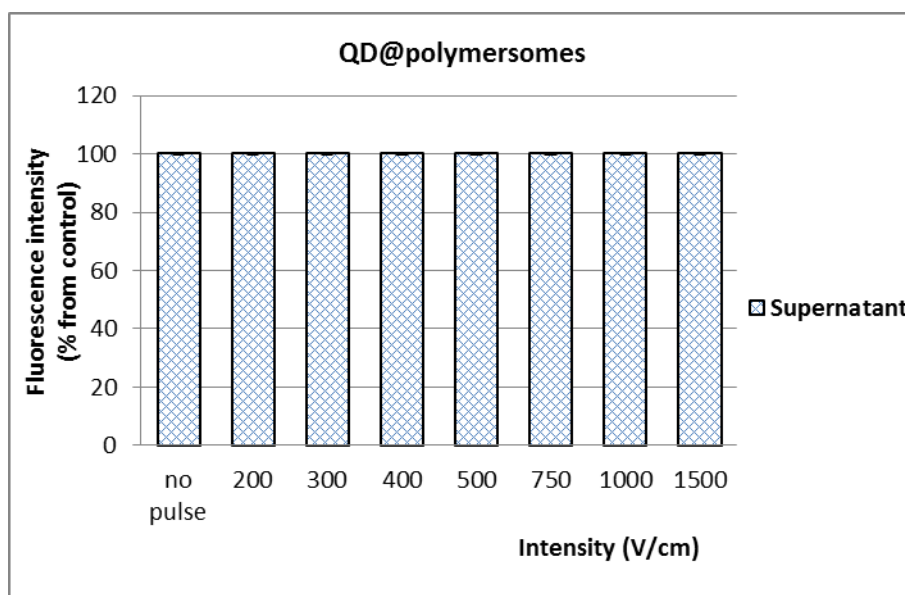
Фигура 10. Интензитет на флуоресценцията, получен от супернатантата след спин-ултрафилтруване на полимерзоми, натоварени с FITC-Dextran (10 000 Mw) и детергент BRIJ. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspın-6 Mw 30 000.



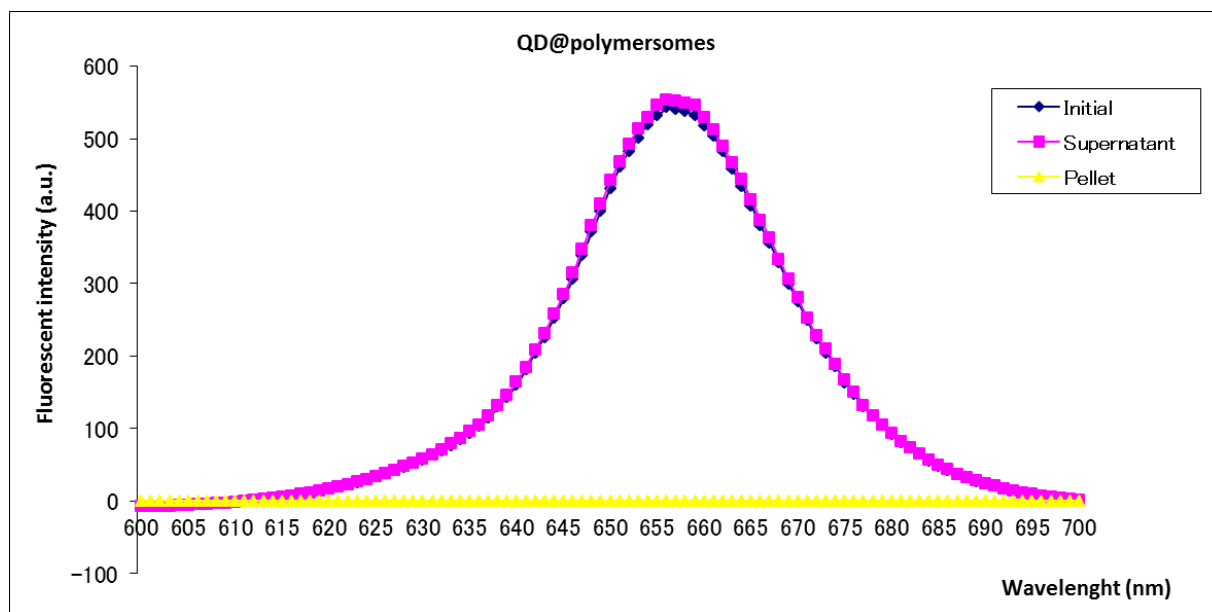
Фигура 11. Сравнителен анализ на ефективността на задържане на FITC-Dextran (Mw 10 000) в полимерзоми, компактизирани с използване на два различни детергента – Triton X-100 (червената линия) и BRIJ (черната линия). Данните са средни от три независими експеримента. Филтруването се извършва на Vivaspın-6 Mw 30 000.

1.2 Тестове за освобождаване на флуоресцентния маркер от полимерната матрица чрез електропорация

Една от основните задачи на дисертацията е да се определи дали физичният феномен „електропорация” би могъл да ускори *in vitro/in vivo* интернализирането и натрупването на нанозоми в живи биологични обекти, както и освобождаването на лекарствени средства от наночастиците в таргетния участък. До започване на работата по настоящата дисертация, в литературата съществуваша оскъдни данни в тази област (Slotkin *et al.*, 2007; Pack *et al.*, 2012; Delehanty *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Това наложи провеждане на предварителна серия експерименти, които целяха да се провери дали прилагането на електрични импулси само по себе си повлиява способността на полимерзомите да задържат или освобождават флуоресцентен маркер, както и ефекта на електропорацията върху размера на наночастиците. За целта чрез описаната процедура за спин-ултрафилтрация и спектрофлуориметрично отчитане беше определен интензитетът на флуоресцентния сигнал, получен от супернатантата след филтруване на натоварени с квантови точки (QD⁶⁵⁵) хитозанови полимерзоми след електротретиране с различен интензитет – от 200 до 1500 V/cm. Електропорирането се извършваше в 12-ямкови плаки. Данните, представени на **Фигура 12**, показват, че с увеличаване на интензитета на прилаганите импулси, флуоресцентният сигнал в супернатантата се запазва постоянен. След всяко филтруване, в подложената на спектрофлуориметрично измерване утайка, не се отчита флуоресцентен сигнал. Този резултат потвърждава, че при електротретиране не се повлиява задържащата способност на полимерзомите, натоварени с квантови точки – квантовите точки не излизат от наночастиците. В следствие на това заключение може да очакваме, че при употребата на нанозоми, натоварени с QDs в комбинация с електропорация, импулсите с интензитет до 1500 V/cm не повлияват целостта на частиците. За сравнение, използването на импулси с интензитет 2000 V/cm води до регистриране на QD флуоресценция във филтратата, което е индикация за разрушаване целостта на нанозомите при тези параметри на електропориране.



Фигура 12. Интензитет на флуоресценция в супернатантата след електропориране и спин-ултрафилтруване на QD@polymersomes. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 Mw 100 000.



Фигура 13. Представителен спектър на флуоресцентен сигнал след електропориране с интензитет 1000 V/cm и спин-ултрафилтруване на хитозанови полимерзони, натоварени с квантови точки. Спектрите са регистрирани при $\lambda_{ex}=420$ nm.

На **Фигура 13** е показан представителен спектър, получен след спин-ултрафилтруване на електропорирани QD@polymersomes. Спектрите на флуоресценция в супернатантата преди и след електротретиране се припокриват и съответстват на спектъра на флуоресценция на използваните квантови точки – с максимум на 655 nm. Флуоресцентният сигнал, отчитан в утайката, не се отличава от базовата линия. Този резултат отново налага заключението, че липсва изтичане на QDs от полимерзомите. Квантовите точки се задържат в наночастиците за дълго време след прилагане на импулси.

Таблица 1 съдържа определените чрез DLS размери на наночастиците след електропориране с различен волтаж. Размерът на QD@polymersomes почти не се променя с увеличаване интензитета на електричното поле, което показва, че прилаганите импулси не повлияват съществено структурата на наночастиците. Единствено при използване на импулси с интензитет 1500 V/cm се отчитат два пика в DLS-хистограмата, които отговарят на размери по-малки (88 nm) и по-големи (313 nm) от измерваните до момента.

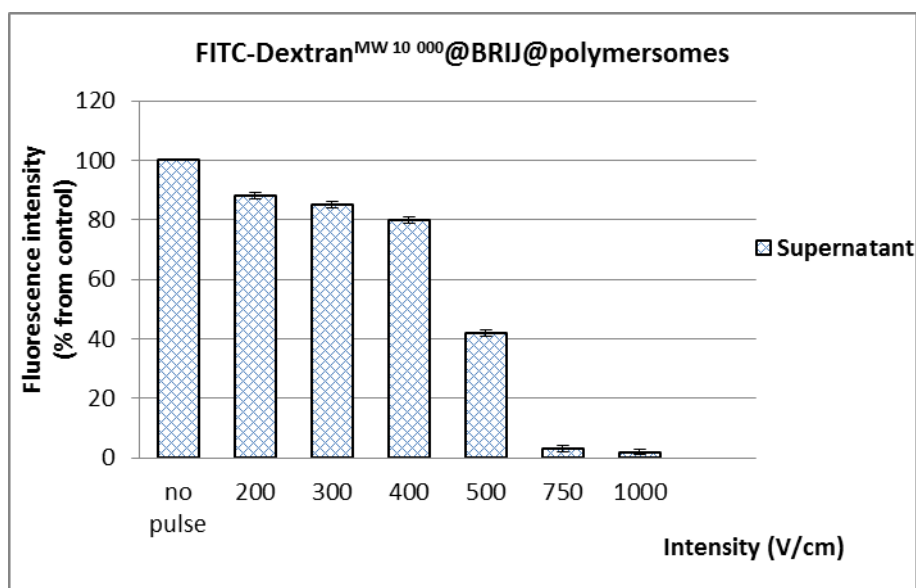
Таблица 1. Размер на полимерзони, натоварени с квантови точки, след електропориране с различен интензитет и спин-ултрафилтруване. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Определянето на размера се извършва чрез DLS.

Intensity (V/cm)	0	200	300	400	500	750	1000	1500
Size (nm)	115 nm +/- 9 nm	115 nm +/- 10 nm	114 nm +/- 12 nm	115 nm +/- 13 nm	114 nm +/- 7 nm	112 nm +/- 8 nm	112 nm +/- 11 nm	88 nm +/- 25nm & 313 nm +/- 43nm

Наличието на две фракции от различни по големина полимерзони, след прилагане

на 1500 V/cm, според нас се обяснява с възможно образуване на агрегати от наночастиците, както и с фрагментирането им.

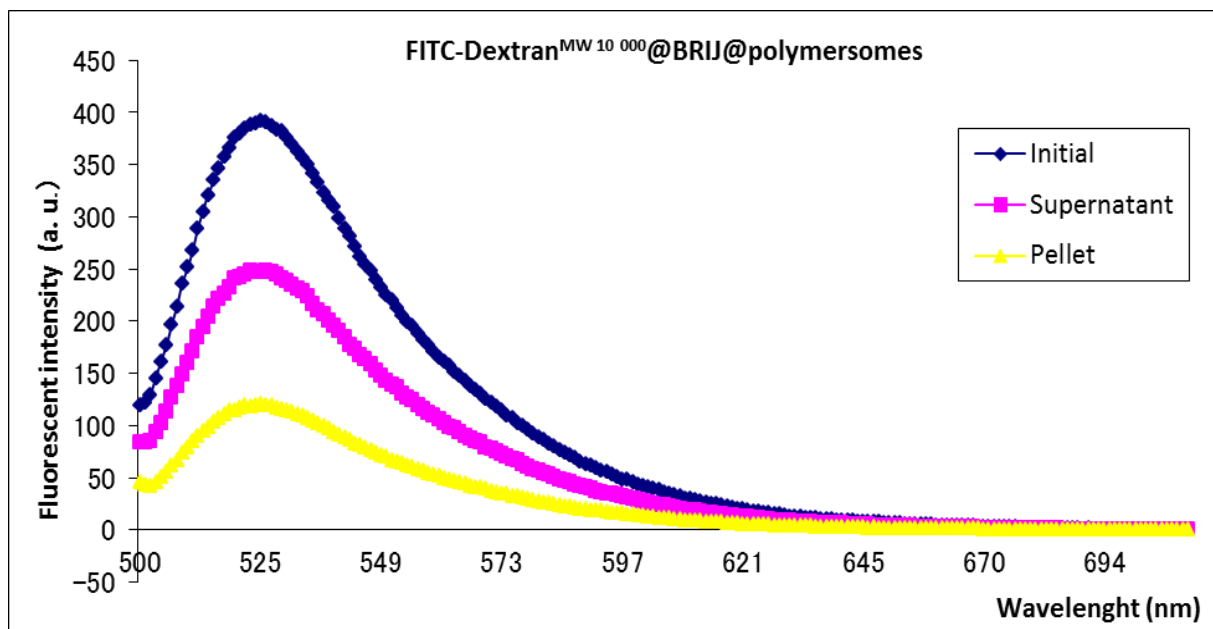
За да проверим дали полученият резултат е частен случай или електротретирането не повлиява ефективността на задържане на други белязани наночастици, проведохме и аналогичен експеримент, но с хитозанови полимерзоми, натоварени с конюгати *FITC-Dextran* и омрежени с детергент BRIJ-35 (Фигура 14).



Фигура 14. Флуоресцентен интензитет, получен от супернатантата след електропориране с различен интензитет и спин-ултрафилтруване на хитозанови полимерзоми, натоварени с *FITC-Dextran* (10 000 Mw). Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение ($Mean \pm SD$). Филтруването се извършва на *Vivaspin-6* Mw 30 000.

Получените данни се различават значително – с увеличаване интензитета на прилаганите импулси след спин-ултрафилтрация се отчита понижаване на флуоресценцията в супернатантата и повишаване в утайката. Следователно, при тези наночастици електропорирането ускорява изтичането на флуорофора от полимерната матрица. Този резултат потвърди избора на флуоресцентен маркер при прилагането на наночастици *in vivo*.

Фигура 15 показва представителен спектър, получен след спин-ултрафилтруване на електропорирани *FITC-Dextran*^{Mw10 000}@BRIJ@polymersomes. Спектрите на флуоресценция преди и след електротретиране се различават. Отчетеният в супернатантата сигнал се отличава от измерения в утайката, като последният е по-слаб. Показаните спектри на флуоресценция съответстват на спектъра на флуоресценция на *FITC* – с максимум на 525 nm. Тези данни доказват изтичането на *FITC-Dextran* от нанозомите след електропорация.



Фигура 15. Представителен спектър на флуоресцентен сигнал след електропориране с интензитет 500 V/cm и спин-ултрафилтруване на хитозанови полимерзони, натоварени с FITC-Dextran (10 000 Mw). Спектрите са регистрирани при $\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$.

Чрез DLS е измерен и размерът на FITC-Dextran^{Mw10 000}@BRIJ-35@polymersomes след прилагане на електрични импулси (таблица 2).

Таблица 2. Размер на полимерзони, натоварени с FITC-декстран (10 000 Mw), след електропориране с различен интензитет и спин-ултрафилтруване. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Определянето на размера се извършва чрез DLS.

Intensity (V/cm)	0	200	300	400	500	750	1000	1500
Size (nm)	108 nm +/- 12 nm	104 nm +/- 14 nm	105 nm +/- 12 nm	105 nm +/- 15 nm	97 nm +/- 12 nm	98 nm +/- 12 nm	78 nm +/- 17 nm	45 nm +/- 23 nm

Данните показват различна зависимост – размерът на полимерзомите намалява с увеличаване интензитета на електричното поле, най-вероятно в резултат на изтичане на FITC-Dextran и промяна на структурата на наночастиците.

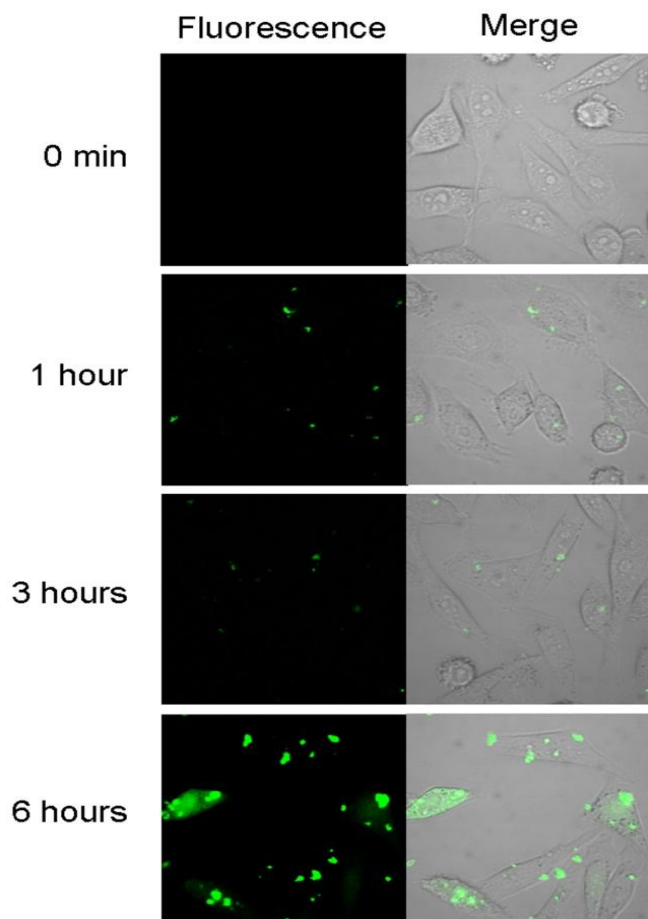
При последващите експерименти на живи биологични обекти (клетки и експериментални животни) са използвани квантови точки като флуоресцентен маркер на два вида полимерни наночастици – полимерзони (на базата на химично модифициран хитозан) и хидрогелни наночастици (на базата на химично модифициран PEG), като последните са бимодални – маркирани и с парамагнитна субстанция (манганови йони).

2. Проникване на $QD^{525}@polymersomes$ в ракови клетки и солидни тумори – пасивно и чрез електропорация

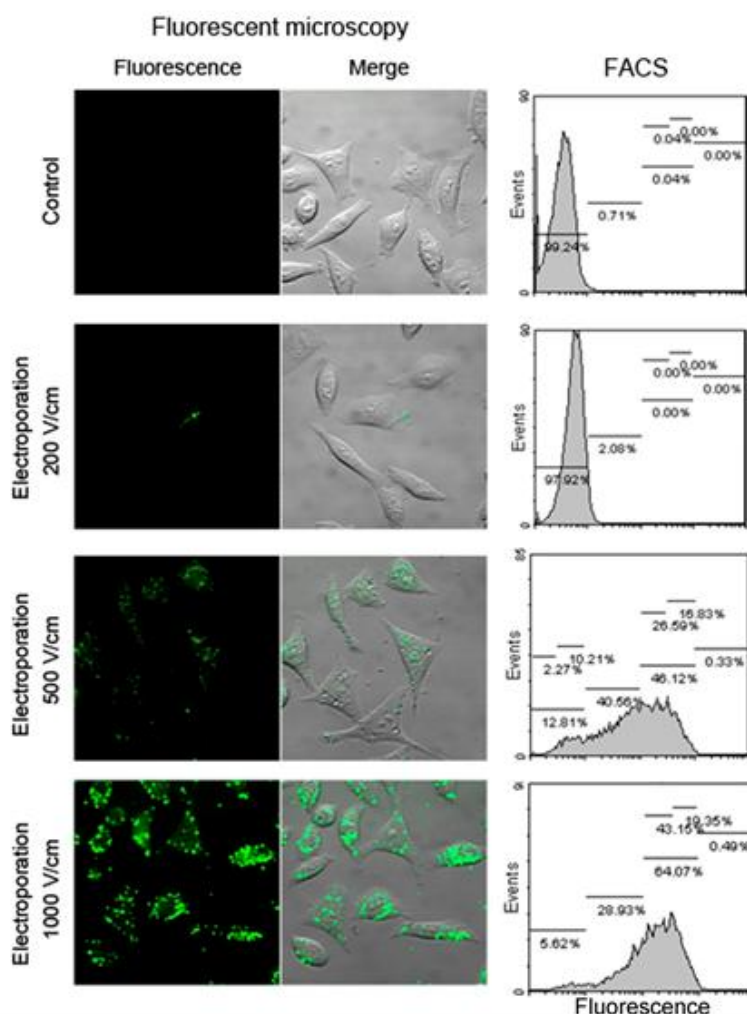
2.1. Пасивно и електроиндуцирано проникване на $QD^{525}@polymersomes$ в ракови клетки

В серия експерименти е изследвана възможността за пасивно проникване на $QD^{525}@polymersomes$ в култивирани ракови клетки, изолирани от рак на дебелото черво (Colon 26). Тестът за цитотоксичност показва, че $QD@polymersomes$ (в концентрации до 120 nM QDs) не повлияват виталността на клетките при 24-часова инкубация. Локализирането на наночастиците в клетките е регистрирано чрез флуоресцентна конфокална микроскопия. $QD@polymersomes$ проникват сравнително бавно през клетъчната мембрана – флуоресцентният маркер се регистрира в раковите клетки след 6-часова инкубация на 37°C (**Фигура 16**). Подобни резултати бяха получени и при използване на $QD^{605}@polymersomes$, $QD^{655}@polymersomes$ и $QD^{705}@polymersomes$. Всички квантови точки, използвани за експериментите на клетки и животни са “non-tagged”. Интернализацията най-вероятно е на базата на ендоцитоза, тъй като се регистрират точковидни флуоресцентни петна, предимно в цитоплазмата, които наподобяват ендоцитозни вакуоли. За контрола бяха използвани същите квантови точки, които не са опаковани в полимерзоми. Установено е, че те не проникват в раковите клетки дори при 24-часова инкубация на 37°C.

Изследвана е възможността за електроиндуцирано доставяне на $QD^{525}@polymersomes$ в раковите клетки чрез електропорация. За целта са използвани импулси с три различни интензитета 200 V/cm, 500 V/cm и 1000 V/cm. Тестът за цитотоксичност показва, че електропорирането на $QD@polymersomes$ (в концентрация 80 nM QDs) с интензитет 200 V/cm и 500 V/cm не повлиява виталността на клетките при последваща 24-часова инкубация, но се наблюдава слабо понижаване на виталността (~10%) при използване на интензитет 1000 V/cm. Проникването на наночастиците в раковите клетки е регистрирано 1 час след третирането чрез флуоресцентна конфокална микроскопия и флуо-цитометрия. Както се вижда от **Фигура 17**, степента на проникване на наночастиците в клетките е най-голяма при прилагане на интензитет от 1000 V/cm. Броят на флуоресцентно маркираните клетки се увеличава пропорционално с увеличаването на приложените напрежения и достига до 67% от общия брой, при максимално приложено поле. За сравнение, при пасивното проникване на $QD@polymersomes$ (**Фигура 16**), за които беше отчетен флуоресцентен сигнал в клетките едва след 6-часова инкубация, при електроопосредстваното доставяне на $QD@polymersomes$ се наблюдава интернализацията им още на първия час след комбинираното третиране.



Фигура 16. Пасивно проникване на $QD^{525}@polymersomes$ (в концентрация, съответстваща на 80 nM QDs) в ракови клетки Colon 26, оценено чрез конфокална микроскопия.



Фигура 17. Проникване на $QD^{525}@polymersomes$ (в концентрация, съответстваща на 80 nM QDs) в Colon 26 ракови клетки след електропорация. Образите са получени 1 час след третирането, като за целта са използвани конфокална микроскопия и FACS анализ: Контрола – Colon 26 клетки; Colon 26 клетки + $QD^{525}@polymersomes$ + 200 V/cm; Colon 26 клетки + $QD^{525}@polymersomes$ + 500 V/cm; Colon 26 клетки + $QD^{525}@polymersomes$ + 1000 V/cm. (мащаб 100 μm) ляв панел и съответните стойности от FACS анализа (A); 200 V/cm (B); 500 V/cm (C); 1000 V/cm (D) (десен панел).

2.2. Пасивно проникване и локализация на $QD^{705}@polymersomes$ в солидни тумори на експериментални животни

Развитието на наноразмерни системи за доставка на лекарствени средства (папо-DDS) предоставя широки възможности за разбирането и изучаването на физиологията и патофизиологията на туморните заболявания. В последните години основните усилия са насочени към разработването на селективни системи, способни да доставят локално високи концентрации на избраните субстанции в таргетни тъкани (Janib et al., 2010; Srinivasan et al., 2015; Muhtu et al., 2014).

Както вече беше отбелязано, флуоресцентните методи имат потенциал и предлагат възможности за функционална диагностика, поради успешното съчетаване на висока чувствителност и висока резолюция. За постигане на качествено визуализиране на проникването и локализирането на наночастици дълбоко в тъканите (*in vivo* приложения) все още са налични проблеми (основно – ниската проникваемост на тъканите за видимата светлина и недостигът на флуорофори с подходящи спектрални параметри за визуализиране в области от спектъра, където тъканите се характеризират с относителна прозрачност – дълговълновата на видимата и близката инфрачервена).

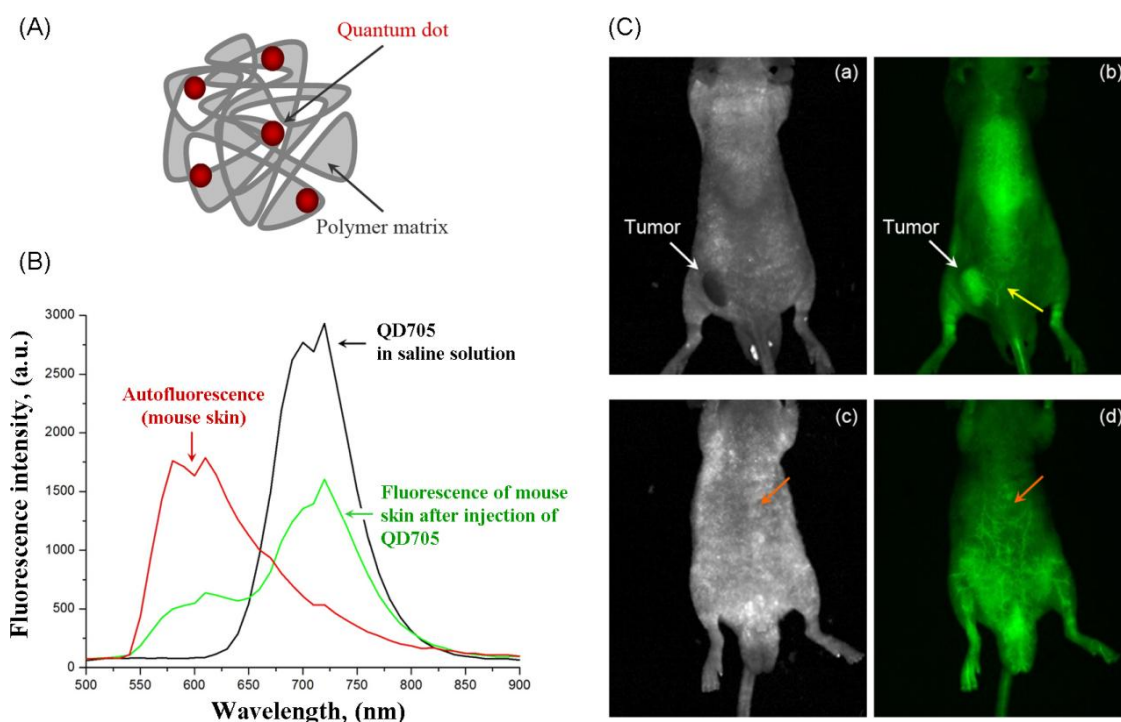
Уникалните оптични свойства на квантовите точки (Sapsford et al., 2006; Resch-Genger et al., 2008; Gao et al., 2005; Qian and Nie, 2008; Sweeney et al., 2008) позволяват оптимизиране на съотношението сигнал/фон и подобряване чувствителността на флуоресцентния анализ при употребата им като контрастни нанопробы. Голямото Стоксово отместване между възбуждащата и излъчената от QDs светлина, свежда до минимум автофлуоресценцията на живите обекти, чийто максимум е непосредствено след дължината на вълната на възбуждане (Gao et al., 2004). Стабилността на фотообезцветяване на квантовите точки обуславя възможност за продължително скениране, получаване на последователни образи във фокалната равнина и структурирането им в 3D-проекция с висока резолюция. Дългото им време на полуживот на квантовите точки във възбудено състояние е предпоставка за осъществяване на отместена във времето флуоресцентна детекция. По този начин се елиминират краткоживущите фоновы сигнали от автофлуоресценцията на живите биологични обекти и апаратурата (Sapsford et al., 2006; Resch-Genger et al., 2008). Описаните характеристики на квантовите точки ги определят като подходящи флуоресцентни маркери за *in vivo* приложения.

Следващата серия експерименти цели да се оптимизира концентрацията на използваните квантови точки за *in vivo* експериментите, която да дава достатъчно висок флуоресцентен сигнал спрямо фоновия, като в същото време се избегне насищането на сигнала. Това би дало възможност да се регистрират евентуални концентрационни промени в организма, респ. реалната фармакодинамика на наночастиците.

Преди да се пристъпи към експерименти с животински модели, са проведени експерименти с разтвори с различни концентрации на QD^{705} , приложени на фантоми и на здрави мишки (инжектирани подкожно или интравенозно в различни обеми), като анализът е осъществен чрез *Maestro In Vivo Imaging* система. Тези изследвания са проведени от колеги в Института по радиологични изследвания на Япония, като данните ни бяха любезно предоставени при планиране на *in vivo* експериментите от дисертационния труд. На тази база бяха подбрани квантовите точки (и тяхната концентрация), включени в състава на полимерзомите – флуоресциращи в далечната

червена и близката инфрачервена област на спектъра (QD^{655} , QD^{705}), така че да бъде сведена до минимум фоновата автофлуоресценция от кожата на животното.

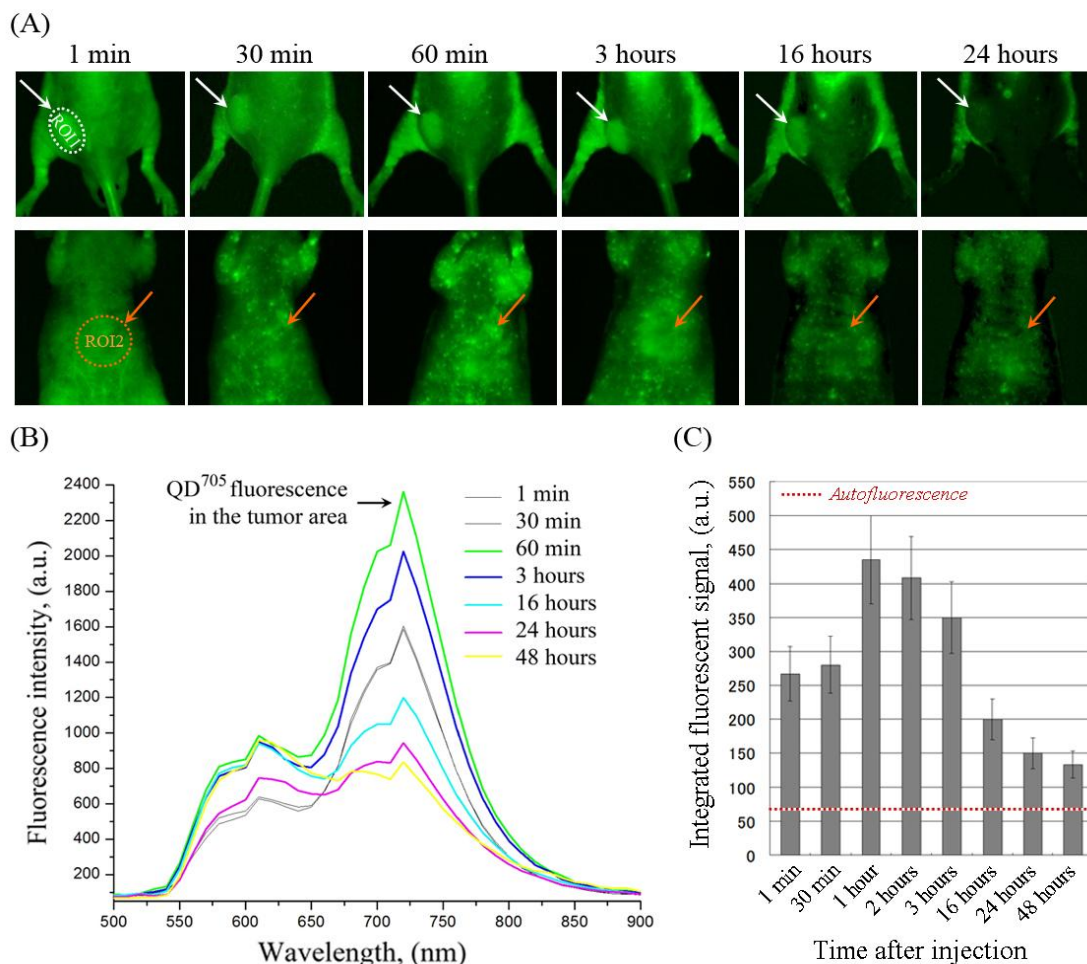
На **Фигура 18В** са представени флуоресцентните спектри на QD^{705} във физиологичен разтвор (черната линия), автофлуоресцентният спектър на тялото на мишката (червената линия), и припокриването им след инжектиране на QD^{705} в мишката през опашната вена (*i.v.*) (зелената линия). Спектрите са заснети в произволно избран участък от тялото, непосредствено след инжектирането на квантовите точки. Данните показват, че QD^{705} дават възможност да се сведе до минимум припокриването на двата флуоресцентни спектъра, този на квантовите точки и този на автофлуоресценцията, получен от кожата на мишката.



Фигура 18. (А) Схема на белязана с квантови точки полимерзома; (В) флуоресцентен спектър на QD^{705} (80 nmol) в солеви разтвор (на фантом), флуоресцентен спектър (автофлуоресценция) от тялото на мишката, отчетена преди инжектирането на QD^{705} и флуоресцентен спектър, отчетен/извлечен от тялото на мишката след *i.v.* въвеждането на QD^{705} ; (С) Изображения на миши модел на колоректален карцином, заснети 2 мин. след *i.v.* инжектиране с QD^{705} @polymersomes: (а) и (с) трансмисия, (b) и (d) флуоресценция. Бележка: жълтата стрелка посочва ангиогенезата около тумора, оранжевата стрелка – дълбочинно заснети кръвоносни съдове.

На **Фигура 18С** са представени изображения на миши туморен модел на колоректален карцином (Colon 26 ксенографт), получени 2 минути след еднократно интравенозно инжектиране на QD^{705} @polymersomes в опашната вена (в единична доза, съответстваща на 80 nmol QDs). Визуализирането на тумора в този кратък интервал от време се дължи на ангиогенезата, като е установено, че количеството на QDs е достатъчно дори да се визуализират дълбоко-тъканните кръвоносни съдове (**Фигура 18С (c,d)**).

Фигура 19 представя динамиката на интензитета на флуоресценция, получена от областите на тумора (ROI-1) и черния дроб (ROI-2), след интравенозно инжектиране на QD^{705} @polymersomes.



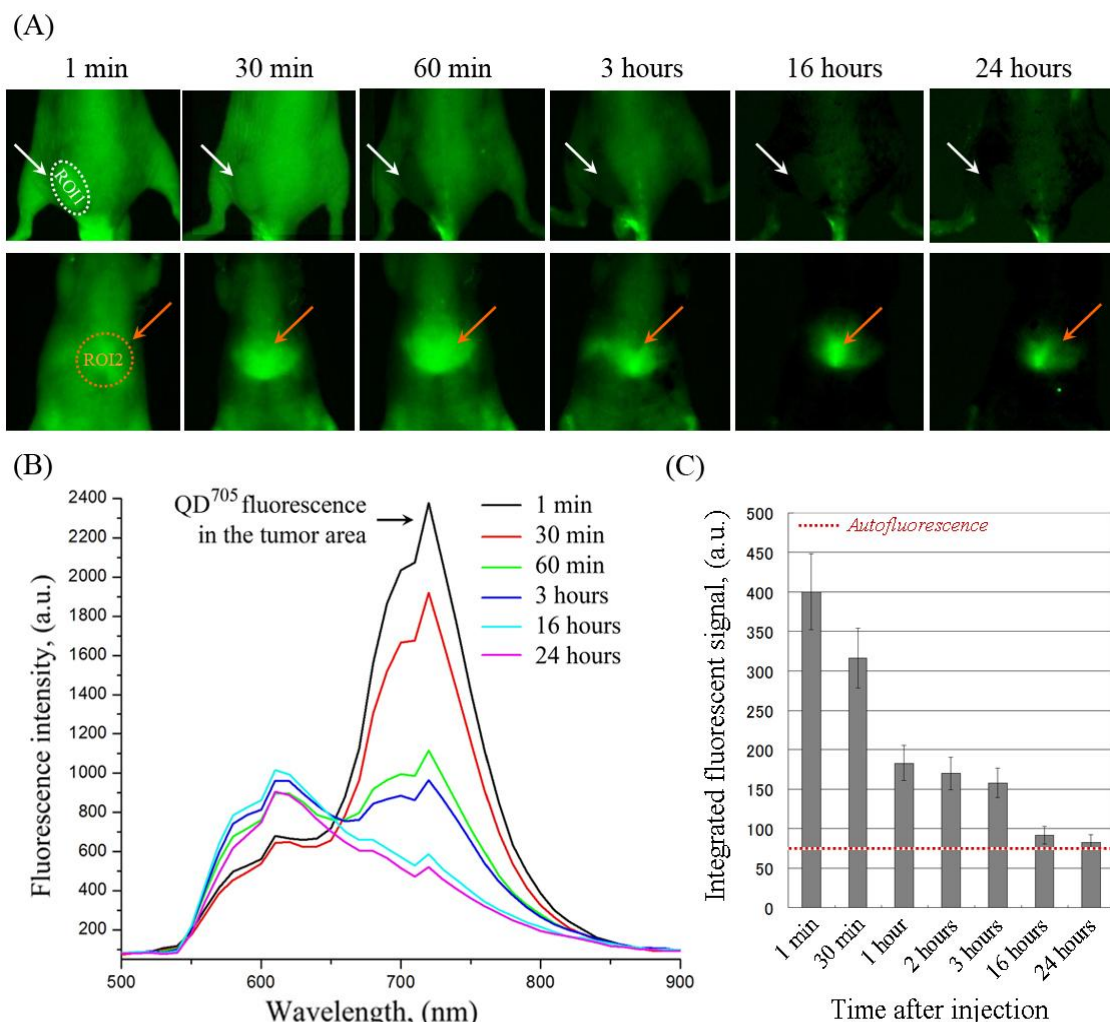
Фигура 19. (А) Флуоресцентни изображения на миши модел на колоректален карцином, получени на различни времеви интервали (в рамките на 24 часа) след i.v. инжектиране на QD⁷⁰⁵@polymersomes (80 nmol). Региони на интерес (ROI): ROI-1 – тумор; ROI-2 – черен дроб. (Б) Спектри на флуоресценция в областта на тумора (ROI-1), отчитани в рамките на 48 часа след инжектирането на QD⁷⁰⁵@polymersomes. Флуоресцентните спектри са извлечени от изображенията на панел (А). (С) Динамика на флуоресцентния сигнал на QD⁷⁰⁵@polymersomes в ROI-1, в рамките на 48 часа след въвеждане на наночастиците. Изследванията са извършени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm. Резултатите в панел (С) са от 4 независими експеримента на 4 различни животни и са представени като средни стойности $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD).

Представените снимки са от различни времеви интервали (от 1 min до 24 h) след третирането на животните. Флуоресцентните спектри са съответно от ROI-1 – тумор; ROI-2 – черен дроб. Сигналят от ROI-1 нараства с времето от 1 до 3 часа след инжектиране, като максимум се достига на първия час, след което флуоресценцията намалява, но не достига до базовата линия на автофлуоресценцията дори и след 24 часа (**Фигура 19С**). Много слаб флуоресцентен сигнал се отчита в ROI-2 – черен дроб. Флуоресценция на QD се отчита в цялото тяло на животното по време на 48-часовото изследване, което означава, че използваните полимерзони са дългоживущи. Те циркулират сравнително дълго в кръвния ток и се натрупват в тумора, най-вероятно поради повишена пропускливост на кръвоносните съдове и ефект на задържане (т.нар. EPR-ефект: enhanced permeability and retention effect of nanoparticles in tumors) (Kokuryo et al., 2014; Chen et al., 2014; Matsumura and Maeda, 1986). Изображенията на **Фигура 19А** показват, че незначителни количества от полимерзомите се локализируют в областта

на черния дроб. Това говори за биоинертност на наночастиците и ги прави обещаващи за последващо приложение като носители на лекарствени средства.

Установено е също така, че описаните полимерзоми се локализират и в лимфните възли на експерименталните животни, което ги прави много подходящи за носители на лекарствени средства за лечение на туморни метастази (Bakalova et al., 2015).

За да се сравни времето на циркулация на полимерзомите и свободните квантови точки, са проведени аналогични експерименти. Резултатите са представени на **Фигура 20**.



Фигура 20. (A) Флуоресцентни изображения на миши модел на колоректален карцином, получени на различни времеви интервали (в рамките на 24 часа) след i.v. инжектиране на QD⁷⁰⁵ (80 nmol). Региони на интерес (ROI): ROI-1 – тумор; ROI-2 – черен дроб. (B) Спектри на флуоресценция в областта на тумора (ROI-1), отчитани в рамките на 24 часа след инжектирането на QD⁷⁰⁵. Флуоресцентните спектри са извлечени от изображенията на панел (A). (C) Динамика на флуоресцентния сигнал на QD⁷⁰⁵ в ROI-1, в рамките на 24 часа след въвеждане на наночастиците. Изследванията са извършени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm. Резултатите в панел (C) са от 4 независими експеримента на 4 различни животни и са представени като средни стойности $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD).

Показано е, че свободните квантови точки се натрупват в областта на черния дроб, но не и в туморната област. Интензитетът на флуоресценция в ROI-1 нараства скоро след инжектирането и също така бързо намалява, достигайки базовата линия на автофлуоресценция. При прилагане на нативни квантови точки туморът остава

маркиран в рамките на ~30 min, което най-вероятно се дължи на ангиогенната мрежа, но не и на проникване на квантовите точки през стените на кръвоносните съдове в туморните клетки, какъвто е случаят с полимерзомите.

Няколко работни групи докладват *in vivo* приложения на полимерзони с контролиран размер, съставени от различни блокови кополимери, за доставяне на лекарства в тумори на експериментални животни (Levine *et al.*, 2008; Muthiah *et al.*, 2013; Pourtau *et al.*, 2013). Levine *et al.* (2008) описват разработването на NIR-излъчващи полимерзони, състоящи се от поли(етилеи оксид)-блок-поли(капролактон) с включен доксорубицин и тяхното приложение за оптичен имиджинг при терапия на рак. Авторите са маркирали наночастиците с цинк-базирани флуорофори, излъчващи в близката инфрачервена област, за да проследят фармакодинамиката и локализирането им в тъканите. Muthiah *et al.* (2013) докладват за магнитни полисукцинимидни полимерзони, натоварени с лекарствен агент (паклитаксел) и успешното им проследяване чрез MRI при лечение на тумори. Те използват три типа – положително, отрицателно и неутрално заредени наночастици от т.нар. тип SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles), при които се използват суперпарамагнитни железни йони като контраст за MRI визуализиране. Авторите доказват най-ефективно натрупване и последващо освобождаване на лекарството в таргетните туморни тъкани на отрицателно заредените SPIONs. Pourtau *et al.* (2013) изследват трети тип функционализиране на полимерзони – те успешно конюгират антитела към магнитни наночастици. Посредством така структурираните SPIONs и чрез MRI те проследяват костни метастази *in vivo*.

Групата на Kataoka разработва и изследва възможностите на едни от най-съвременните и актуални наночастици – т.нар. пикзони (PICsomes) (Kokuryo *et al.*, 2014; Anraku *et al.*, 2016; Palivan *et al.*, 2016). PIC-зомите представляват полимерни везикули с полийон-комплексни мембрани, изградени от противоположно заредени блокови кополимери (биопоносим полиетиленгликол и поли-амино киселини) (Kokuryo *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014; Anraku *et al.*, 2016, Palivan *et al.*, 2016; Chuanoi *et al.*, 2014; Anraku *et al.*, 2013; Anraku *et al.*, 2010; Koide *et al.*, 2006). Характерни за PIC-зомите са сферичната им форма и наличие на кухина с вътрешна водна фаза, в която могат да се въвеждат контрастни и/или противотуморни субстанции. Дори в присъствие на серумни протеини и при висока температура, те запазват значителна физиологична стабилност, което предполага успешното им прилагане в биомедицинските изследвания като носители на ензимни молекули (ензимни нанореактори) (Anraku *et al.*, 2016; Chuanoi *et al.*, 2014; Koide *et al.*, 2006) и фотосенсибилизатори (Chen *et al.*, 2014). За *in vivo* проследяване на PIC-зони най-използвани са MRI (с употребата на суперпарамагнитни железни йони като контраст) и флуоресцентен имиджинг (с употребата на цианини) (Kokuryo *et al.*, 2014; Anraku *et al.*, 2010).

2.3. Електроиндуцирано проникване и локализация на QD^{705} @polymersomes в солидни тумори на експериментални животни

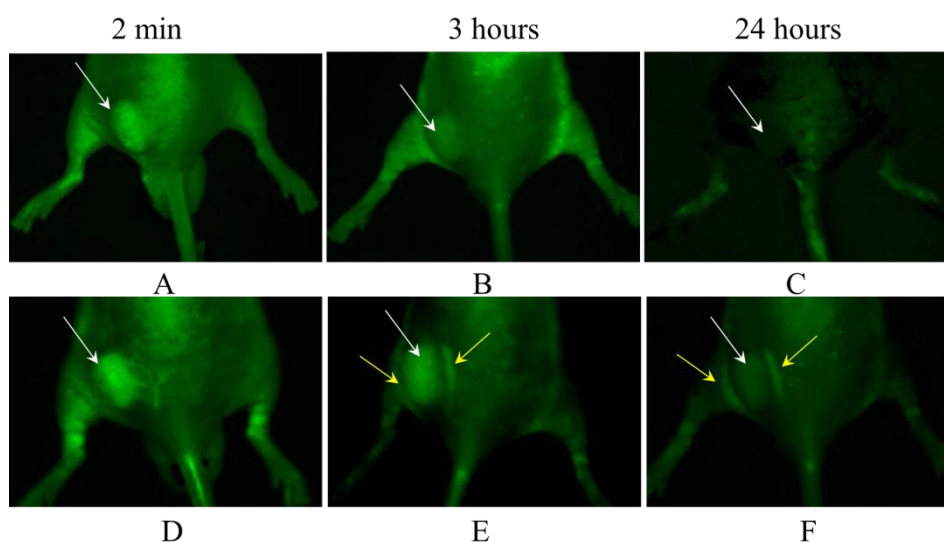
2.3.1 Видове електроди

Електропорацията е биофизичен метод, който е свързан с прилагането на външни електрични импулси върху клетъчната мембрана с цел да се повиши естествената ѝ пропускливост, без да се нарушава целостта ѝ (Neumann *et al.*, 1996; Nikolova *et al.*,

2014; Ramires et al., 1994; Saulis and Saule, 2012). Някои лекарства (например, блеомицин, цисплатин), използвани в класическата химиотерапия, както и наночастици, имат слаба проникваща способност в туморните клетки и тъкани и електропорацията предлага възможност за повишаване на локалната им концентрация (Mir, 2006). Проучванията показват многократно повишена ефективност на противораковите лекарства след прилагане на кратки, високоволтови електрични импулси на повърхностни лезии (Sersa et al., 2008). Процесът е известен като електрохимиотерапия (Dotsinsky et al., 2012; Nikolova et al., 2014).

Развитието на идеята за употреба на разработените полимерзоми за тераностични приложения беше допълнена с изследване възможностите за ускоряване процеса на въвеждане и времето им на задържане в туморната тъкан посредством електропорация. За целта беше проведена серия експерименти с животински модели на тумори, при които използвахме електротретиране след *i.v.* въвеждане на хитозанови полимерзоми, натоварени с квантови точки (QD⁷⁰⁵).

На **Фигура 21** са представени серии изображения, получени в различни времеви интервали (в рамките на 24 часа) след третиране с полимерзомите, доставяни в миши модели на колоректален карцином пасивно (A-C) или чрез електропорация (D-F).



Фигура 21. Флуоресцентни изображения на миши модел на колоректален карцином, заснети 2 min, 3 h и 24 h след *i.v.* въвеждане на QD⁷⁰⁵@polymersomes (100 μ l, съдържащи 80 nmol QD): контрола – без електропорация (A-C), и след електропорация (1000 V/cm) (D-F). С бели стрелки е посочена туморната област, а с жълти стрелки – артефакти, получени след електротретиране на тумора. Изследванията са извършени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm.

Две минути след *i.v.* инжектиране на наночастиците, както и непосредствено след електропорацията, туморът се визуализира ясно на базата на ангиогенезата (**Фигура 21A-D**). На третия час от третирането флуоресцентният интензитет е сравнително висок в електротретираната област (**Фигура 21E**), докато в отсъствие на електропорация флуоресцентният сигнал в областта на тумора е по-слаб (**Фигура 21B**). Този резултат се обяснява с по-ефективното проникване на наночастиците в раковата тъкан и задържането им в областта на тумора след електропорация. Предполага се, че част от QD-белязаните полимерзоми се задържат извън туморната тъкан – в кожата, покриваща имплантирания тумор. По този начин част от количеството наночастици се „губи“. На

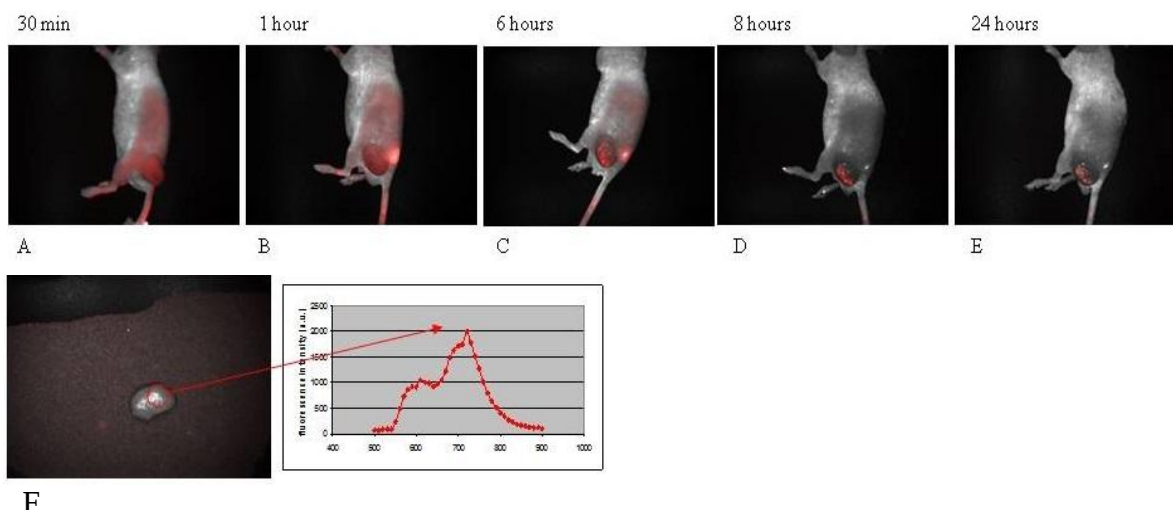
Фигура 21C,F са показани изображенията 24 часа след i.v. инжектиране на полимерзоми, съответно без или с електропорация (електропорацията е осъществена със стандартни стоманени електроди). Отчетена е слаба флуоресценция в туморната област, но с ясно видими следи от електроди **Фигура 21F**, както и пълна липса на флуоресценция при пасивно доставените полимерзоми (**Фигура 21C**).

Наличието на описаните артефакти в изображенията наложи модифициране на използваните от нас електроди. За да избегнем страничните ефекти при електротретирането, както и с цел локално повишаване на концентрацията на наночастици в зоната на тумора, решихме долният край на електродите да бъде изолиран с епоксидна смола (електрически изолатор) (**Фигура 22**).

Фигура 22. Типове електроди, използвани в експерименталната част от дисертацията: (A) стандартни стоманени електроди; (B) нови електроди с изолатор в долната част.



След направената модификация на електродите проведохме аналогичен на гореописания експеримент за отчитане на флуоресцентния интензитет, но за електропорация използвахме изолираните в долния край електроди (**Фигура 23**). Получените изображения са доказателство за липса на следи от електродите в близост до тумора, а интензитетът на флуоресценцията е сравнително високо дори до 24-я час след електротретирането (**Фигура 23E**).



Фигура 23. Флуоресцентни изображения на миши модел на колоректален карцином, заснети 30 min (A), 1 h (B), 6 h (C), 8 h (D) и 24 h (E) след i.v. въвеждане на полимерзоми (100 μ l, съдържащи 80 μ mol QD) и електропорирани с нови, изолирани електроди (1000 V/cm); (F) ex vivo заснето изображение и флуоресцентен спектър от

туморната област. Изследванията са извършени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm.

В литературата се откриват проучвания за зависимостта на интензитета на тока и пространственото разпределение на електричното поле (Miklavcic et al., 1998) от геометрията и позицията на използваните електроди (Miklavcic et al., 1998; Sersa et al., 1996). Влиянието на материала, от който се правят електродите също е дискуссионен въпрос (Tomov and Tsoneva, 2000). Описаните експерименти показват, че разпределението на $QD^{705}@polymersomes$ в областта на тумора след електропорация зависи от вида на използвания електрод. В конкретния случай, иновативното ни решение да изолираме електродите в долната им страна, подобри доставянето на наночастиците в тумора, без "загуба на материал" в околните тъкани, а времето им на задържане беше увеличено до 24 часа.

Както беше посочено по-горе, електропорацията намира клинично приложение в електрохимиотерапията (Miklavcic et al., 2000; Sersa et al., 2008; Nikolova et al., 2011; Dotsinsky et al., 2012). Подобни „странични ефекти“ след електрохимиотерапия със стандартни стоманени електроди са представени на **Фигура 24**.

За съжаление, модифицираните от нас електроди не могат да намерят широко приложение при третирането на кожните лезии на пациенти, поради факта, че повечето подобни туморни образувания са геометрично плоски (2D), а описаните електроди са подходящи за третиране само на три-дименсионални (3D) тумори.

Фигура 24. Странични ефекти при електротретиране със стандартни стоманени електроди на човешки базоцелуларни тумори – стрелките сочат следите от електродите (съгласно Nikolova et al., 2015).



3. Мултимодални хидрогелни наночастици, маркирани с квантови точки и манган – $QD@Mn@Nanogels$

Техниките за визуализиране на биологични обекти предоставят различни възможности, поради разлики в принципа на заснемане, специфичната чувствителност и пространствената и времева резолюция, с които се характеризират. Чрез комбинирането на две и повече структурни и функционални имиджинг техники (мултимодален имиджинг) се преодоляват ограниченията на всяка от тях, като се получават по-качествени и контрастни изображения, с подходяща резолюция. Получените мултимодални образи осигуряват по-добро изясняване на физиологичните механизми на молекулярно и клетъчно ниво. Развитието на мултимодалните техники (напр., PET/MRI, CT/MRI, PET/CT, OI/PET, OI/MRI...) и апаратурата за осъществяването им през последните 15 години доведе до подобряване на потенциала за диагностика и терапевтично планиране на различни заболявания (Pichler et al., 2008; Marti-Bonmati et al., 2010).

Следващият етап от дисертационния труд е фокусиран върху мултимодалните наночастици и в частност, върху визуализиране на проникването им в живи ракови

клетки *in vitro* и солидни тумори *in vivo* – пасивно и чрез електропорация. За целта е използван нанохидрогел като матрица.

Murayama et al. (2012) съобщават за разработване на хидрогелни наночастици със среден диаметър от ~120 nm и „мрежеста“ структура, получени от полиетиленгликолни (PEG) производни. Хидрогелите са обещаващ клас наночастици, които комбинират следните предимства:

(а) способни са да капсулират (физически или химически) хидрофобни и/или хидрофилни молекули (лекарства и/или контрастни агенти);

(б) полимерната им повърхност може да служи като бариера за протеини, пептиди, ДНК или РНК фрагменти, като по този начин предпазва капсулираните субстанции и контролира освобождаването им (*Murayama et al.**, 2012);

(в) приготвят се във водоразтворима форма и се характеризират с висока биопоносимост, благодарение на което могат да бъдат прилагани парентерално с цел доставяне на лекарства с минимални странични ефекти (*Murayama et al.*, 2013).

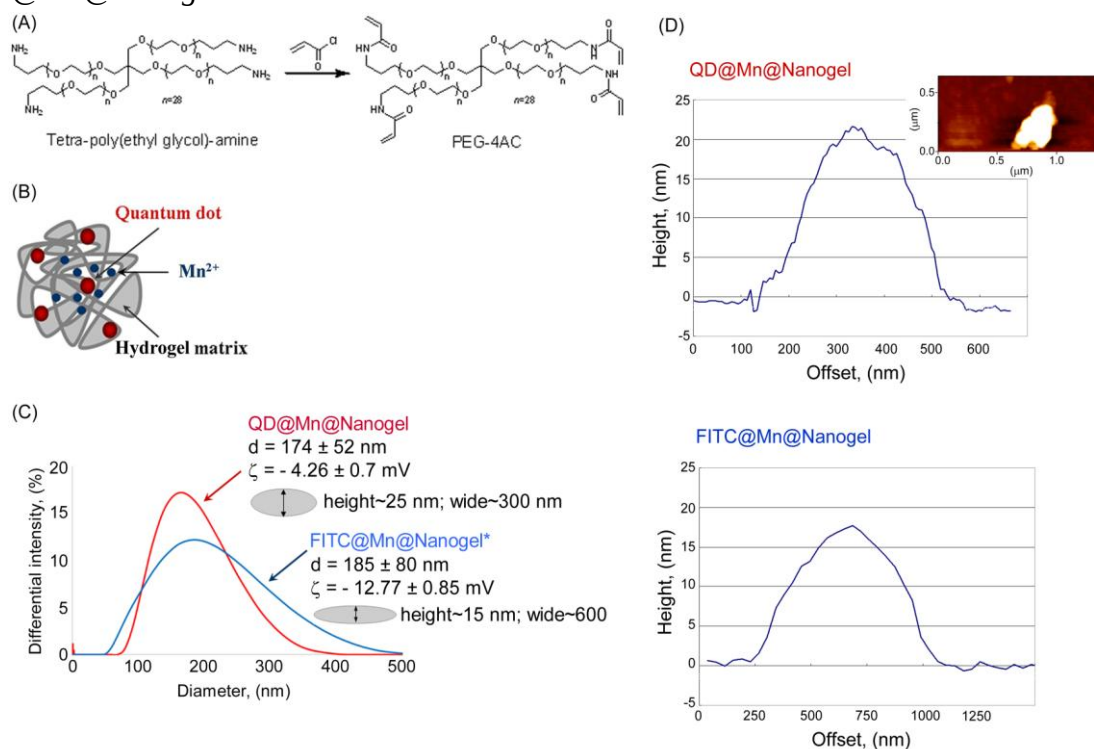
3.1. Физико-химични характеристики на *QD@Mn@Nanogel*

Резултатите на **Фигура 25** представят физико-химичните характеристики на хидрогелни наночастици, натоварени с квантови точки и манган като контрастни субстанции. Мангановите йони са хелатирани от *DTPA-Dextran* (Mw 40 000) и декстрановите хелати са включени в нанохидрогелната мрежа. Квантовите точки също са включени в хидрогелните наночастици на базата на хидрофилно-хидрофобни и електростатични взаимодействия. В предварителни експерименти, аналогични на описаните в предходния раздел, беше установено, че квантовите точки се задържат здраво в полимерната глобула и не изтичат от наночастиците при многократно ултрафилтруване – със и без електропорация. Средният размер на използваните *QD⁷⁰⁵@Mn@Nanogel* е ~174 nm. Те са почти електронеутрални с ζ -потенциал около -4.26 (± 1.21) mV. Повърхностната им структура е хидрофилна и те остават стабилни в серум – агрегация не се наблюдава дори след 24-часова инкубация при 37°C. Наночастиците преминават изцяло през филтър *Vivaspin-6* Mw 300 000, което отговаря на пори с размер ~30-40 nm, но остават при филтруване с филтър Mw 100 000 (пори с размер ~15-20 nm). Наночастиците имат по-скоро продълговата, отколкото кръгла форма. Това е установено след изследване с AFM – широчина на *QD⁷⁰⁵@Mn@Nanogel* ~25 nm и дължина ~300 nm (**Фигура 25d**).

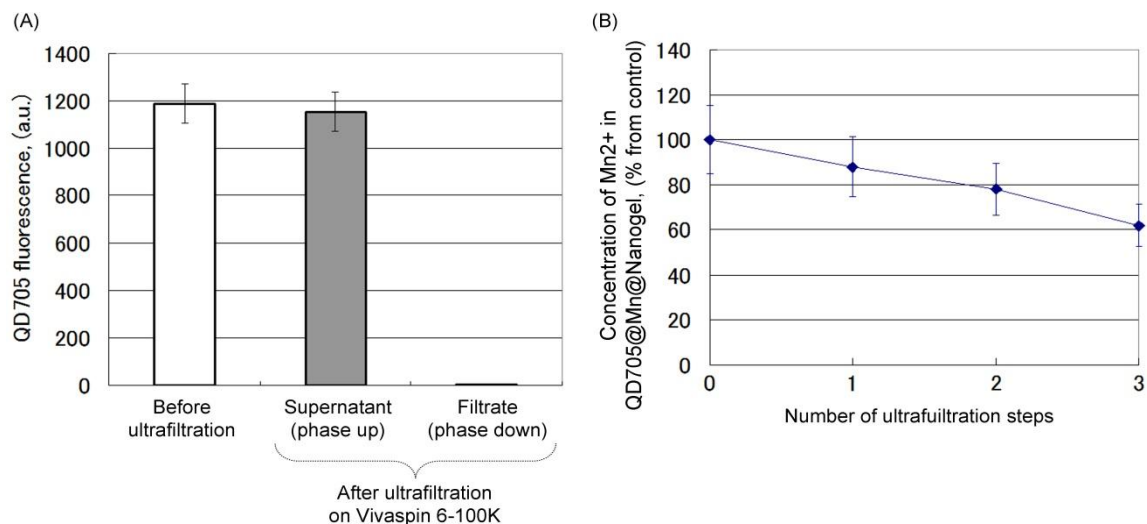
Подобни данни за различия в размерите на използваните нанохидрогели са установени и при изследване на *FITC@Mn@Nanogel* от *Murayama et al.* (2013). Описаните наночастици са продълговати с размери ~150-300 nm, установени по метода на дифракционното разсейване на светлината, но при по-детайлно триизмерно отчитане на размера с помощта на AFM се установяват стойности от ~600 nm дължина и ~15 nm широчина – нишковидна структура (**Фигура 25D**).

От предходни експерименти, при които са използвани различни моларни съотношения между QDs и нанохидрогел е установено, че намаляването на концентарцията на квантовите точки под използваната в това изследване не води до промяна в размера на *QD⁷⁰⁵@Mn@Nanogel*, докато повишаването ѝ води до значително увеличаване на размера на *QD⁷⁰⁵@Mn@Nanogel*, както и до голяма хетерогенност по размер.

На **Фигура 26А** са показани данни след спин-ултрафилтрация на $QD^{705}@Mn@Nanogel$.



Фигура 25. Структура на хидрогелния матрикс (A), схематично представен $QD^{705}@Mn@Nanogel$ (B), физико-химични характеристики, получени при DLS анализ, ζ -потенциал анализ и AFM (C), и представителна извадка от предишно изследване (Murayama et al., 2013) – топографски профил, получен от AFM изображение на $FITC@Mn@Nanogel$ (D), използван за сравнение.



Фигура 26. (A) Интензитет на QD^{705} флуоресценция в супернатантата и утайка преди и след ултрафилтруване на $QD^{705}@Mn@Nanogel$. Данните са средни от три независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD). Филтруването се извършва на Vivaspin-6 (M_w 100 000), а QD^{705} флуоресценцията се отчита спектрофлуориметрично ($\lambda_{ex}=460$ nm и $\lambda_{em}=705$ nm). (B) Концентрация на манган в $QD^{705}@Mn@Nanogel$ преди и след трикратна ултрафилтрация на Vivaspin-6 (M_w 100 000). Мангановите йони в супернатантата се отчитат чрез $T_1\rho$ MRI (спин ехо секвенция), а концентрацията им е изчислена чрез калибрационна крива на $MnCl_2$. Началната концентрация на Mn^{2+} преди ултрафилтруването е приета за 100%.

Данните са средни от два независими експеримента $\pm$ стандартно отклонение (Mean $\pm$ SD).

Резултатите са аналогични на получените за $QD^{705}@polymersomes$ и доказват, че и тук употребата на квантови точки като флуоресцентен маркер е резонна. Отново нивото на флуоресцентния сигнал се запазва 100% в супернатантата и няма излизане на QDs от хидрогелните частици.

На **Фигура 26B** е показан резултат от MRI-анализ на концентрацията на манганови йони, след трикратно спин-ултрафилтруване на $QD^{705}@Mn@Nanogel$. Данните показват 60% задържаща способност на наночастиците относно мангановите йони.

3.2. Проникване на $QD^{705}@Mn@Nanogel$ в ракови клетки – пасивно и чрез електропорация

Проникването на QD^{705} и $QD^{705}@Nanogel$ в ракови клетки от линията Colon-26 е проследено и документирано чрез конфокална микроскопия – в отсъствие на електропорация и след електропориране.

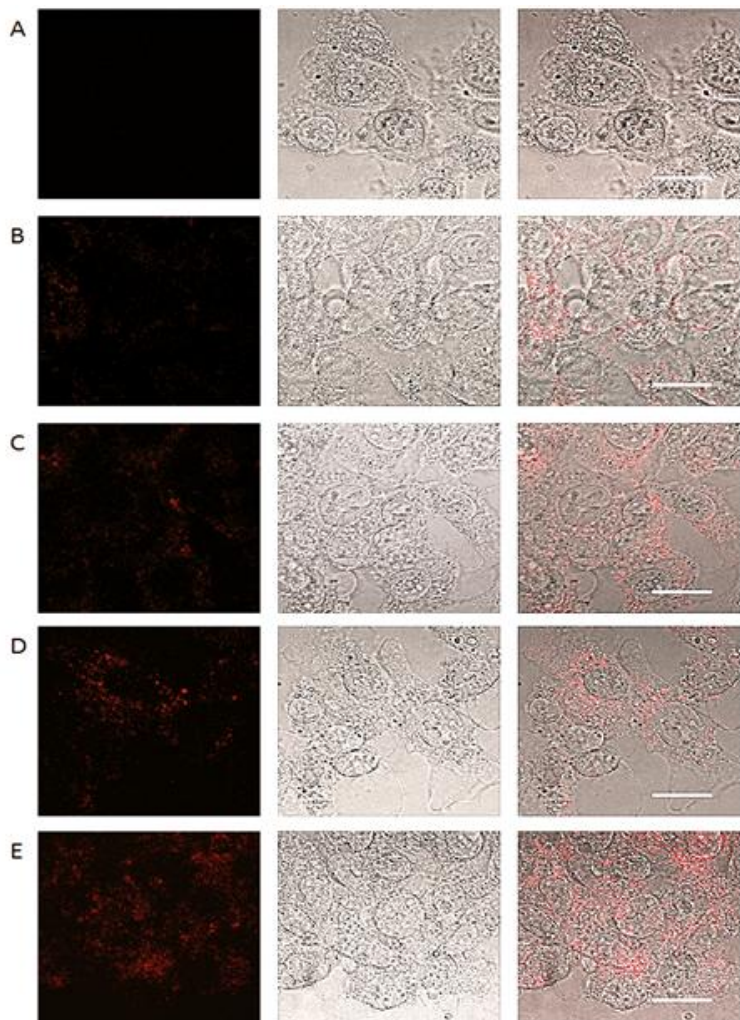
Данните за неопакваните квантови точки са представени на **Фигура 27**. Инкубацията на QD^{705} с клетките в продължение на 24 часа практически не води до поява на флуоресцентен сигнал в цитоплазмата и вътреклетъчните органели (**Фигура 27B**). Интензитетът на отчетената в клетките флуоресценция, обаче, нараства значително след прилагане на електрични импулси, като достига максимум при третиране с интензитет от 1000 V/cm (**Фигура 27C-E**).

Възможността за пасивно проникване на $QD^{705}@Nanogel$ в клетките е илюстрирана на **Фигура 28**. Условиата на третиране са аналогични на тези от предходния експеримент. В отсъствие на електропорация не се наблюдава поява на флуоресцентен сигнал в клетките при инкубация с наночастиците в продължение на 24 часа (**Фигура 28B**).

Това показва, че пасивното проникване на $QD^{705}@Nanogel$ в клетките е много бавно и слабо. Флуоресцентният сигнал в клетките нараства съществено след прилагане на електрично поле в диапазона 200-1000 V/cm (**Фигура 28C-E**).

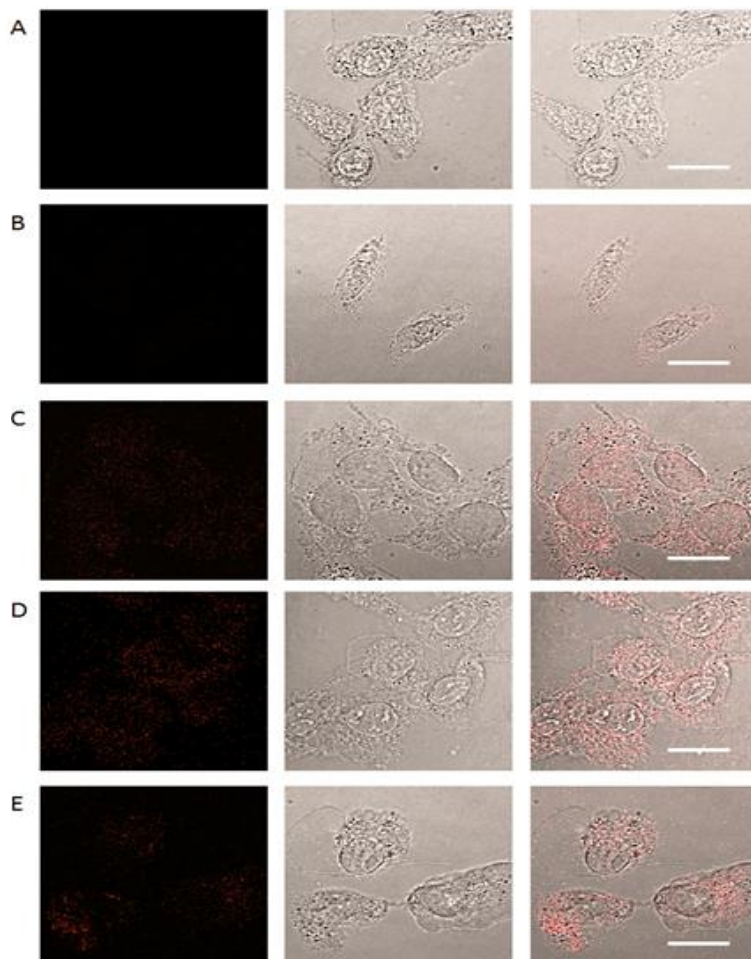
Един от възможните механизми за пасивно навлизане в таргетните клетки на наночастици е ендоцитозата. В този случай повърхностният заряд и дзета-потенциалът на частиците са от съществено значение (*Murayama et al., 2012; Rosaza et al., 2016; Chen et al., 2014*). Хидрогелните наночастици, използвани в настоящето изследване, са продълговати и почти електронеутрални. Този факт би следвало да допринася за полесното им преминаване през плазматичната мембрана. Наличието на специфични клетъчни рецептори, медиращи процеса на навлизане, както и присъствието на повърхностни групи, заряд, функционализиращ слой и др. при наночастиците, също имат значение за интернализирането им. От друга страна, клетъчният тип, клетъчната среда за инкубиране и температурата също могат да повлияват проникването на наночастици в клетки (*Gomes et al., 2011*).

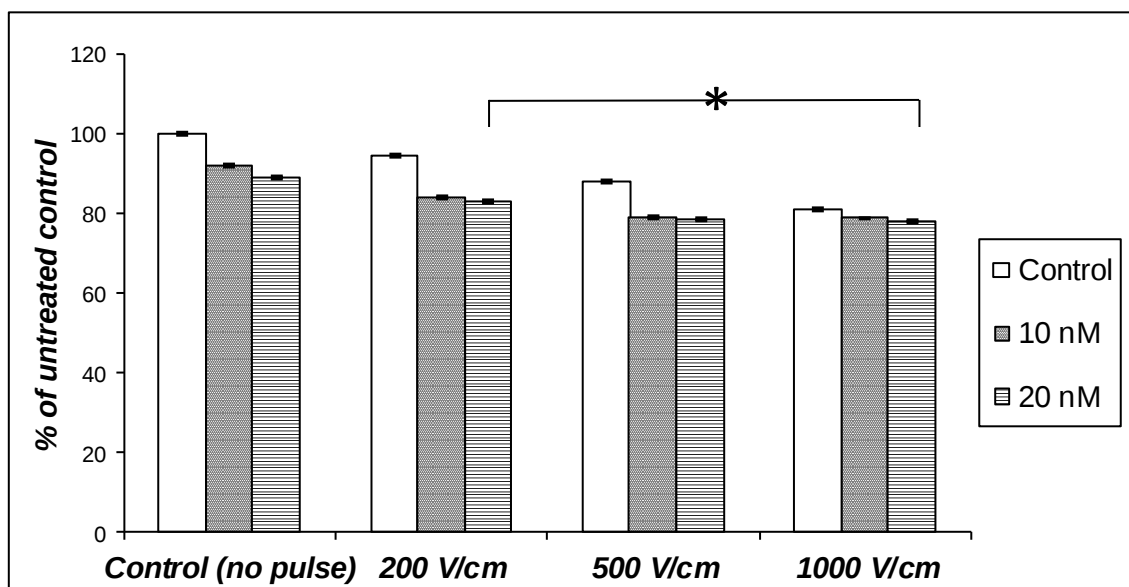
За да анализираме цитотоксичия ефект на $QD^{705}@Nanogel$ след пасивно или електроиндуцирано въвеждане в клетките, изследвахме клетъчната преживяемост след 24-часова инкубация. Резултатите са представени на **Фигура 34**.



Фигура 27. Проникване на QD^{705} (10 nmol/ml) в ракови клетки (Colon-26), визуализирано чрез конфокална микроскопия с или без електропориране. (A) Контрола – клетки; (B) клетки + QD^{705} ; (C) клетки + QD^{705} + 200 V/cm; (D) клетки + QD^{705} + 500 V/cm; (E) клетки + QD^{705} + 1000 V/cm (мащаб 100 μ m). Всички контроли и проби са инкубирани 24 часа във влажна атмосфера, наситена с CO_2 , на 37°C.

Фигура 28. Проникване на $QD^{705}@Nanogel$ (10 nmol/ml) в ракови клетки (Colon-26), визуализирано чрез конфокална микроскопия с или без електропориране. (A) Контрола – клетки; (B) клетки + $QD^{705}@Nanogel$; (C) клетки + $QD^{705}@Nanogel$ + 200 V/cm; (D) клетки + $QD^{705}@Nanogel$ + 500 V/cm; (E) клетки + $QD^{705}@Nanogel$ + 1000 V/cm. (мащаб 100 μ m). Всички контроли и проби са инкубирани 24 часа във влажна атмосфера, наситена с CO_2 , на 37°C.





Фигура 29. Клетъчна преживяемост на Colon 26 клетки 24 часа след третиране с две различни концентрации на QD^{705} @нанозоми (10 nmol/ml и 20 nmol/ml) – със и без прилагане на електрични импулси с различен интензитет: 200, 500, 1000 V/cm. Статистически достоверен резултат ($p < 0.05$), обработен чрез Student's t-тест.

От показаните данни става ясно, че самостоятелното прилагане на електрични импулси с различни интензитети (в диапазона 200-1000 V/cm) води до намаляване на клетъчната преживяемост с около 20% при максималните стойности на третиране (1000 V/cm). От друга страна, самостоятелното третиране с QD^{705} @Nanogel в две различни концентрации (10 nM и 20 nM), без прилагане на електрично поле, води до допълнителен спад от около 10%.

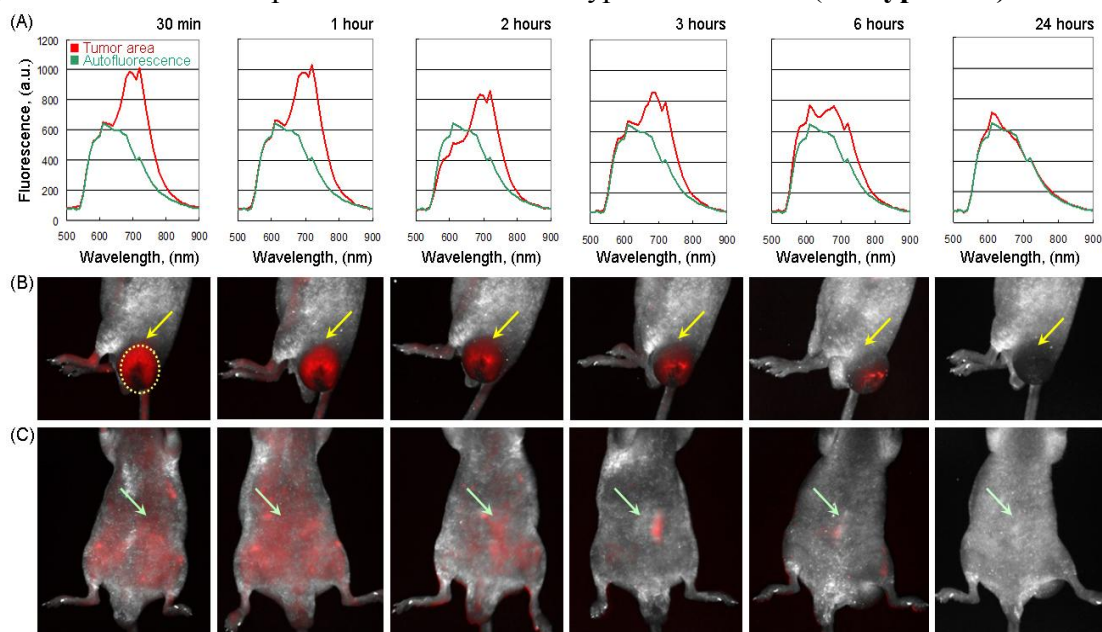
Цитотоксичността на квантовите точки се свързва с техния състав и физико-химични характеристики, и преди всичко със съдържането на йони на тежки метали (Gomes et al., 2011; Hardman, 2006). Токсичността на квантовите точки се обяснява основно с повишаване производството на реактивни кислородни видове, които в повечето случаи причиняват клетъчни промени, водещи до увреждания на биомакромолекулите (Gomes et al., 2011). Показано е, че омрежването на QDs в полимери предпазва от агрегирането им в цитозола, намалява токсичността им и увеличава проникващата и способност (Wegner and Hildebrandt, 2015). Използваните от нас “non-tagged” QD^{705} , произведени от Invitrogen, притежават сравнително ниска цитотоксичност, което се отдава на биоорганичната им обвивка (Tian, 2015). Това обяснява защо понижаването на клетъчната преживяемост след третиране с QD^{705} @Nanogel е сравнимо с това, получено след електротретиране. Самите хидрогелни наночастици, в използваните от нас концентрации, не оказват цитотоксичен ефект върху клетки от линията Colon-26. Следователно, вграждането на тези квантови точки в хидрогелни наночастици и последващото им въвеждане в клетки би могло да се използва като маркер за интернализиране на последните, без значително повлияване върху клетъчната преживяемост.

3.2.1. Пасивно и електроиндуцирано проникване на $QD^{705}@Nanogel$ и $QD^{705}@Mn@Nanogel$ в солидни тумори на експериментални животни

3.2.1.1. Оптичен имиджинг

След получените резултати за успешното комбинирано прилагане на хитозанови наночастици и електропорация, проведохме аналогични експерименти и с основния вид нанозоми, разработени в хода на дисертацията, а именно – хидрогелните наночастици, маркирани с квантови точки. В работата използвахме само изолирани в основата електроди, след като беше доказана по-голямата им ефективност.

Чрез оптичен имиджинг е проследено изменението на флуоресценцията в областта на тумора при две различни позиции (латерална и вентрална) на тялото на мишката, за различни времеви интервали след пасивно доставени $QD^{705}@Nanogel$ (Фигура 30). Избрани са два региона на интерес (ROIs): (а) – туморната област, и (б) – коремната област – черен дроб, бъбреци и пикочен мехур. Резултатите показват, че наночастиците се локализируют предимно в туморната тъкан, където интензитетът на флуоресценция е сравнително висок дори 6 h след въвеждането им (Фигура 30B). Флуоресцентните спектри, отчетени от областта на тумора и от автофлуоресценцията на тялото на мишката, показват, че сигналът в тумора съответства на емисията от QD^{705} (Фигура 30A). В коремната област се отчита много слаб флуоресцентен сигнал – само в черния дроб, а в областта на бъбреците и пикочния мехур липсва такъв (Фигура 30C).

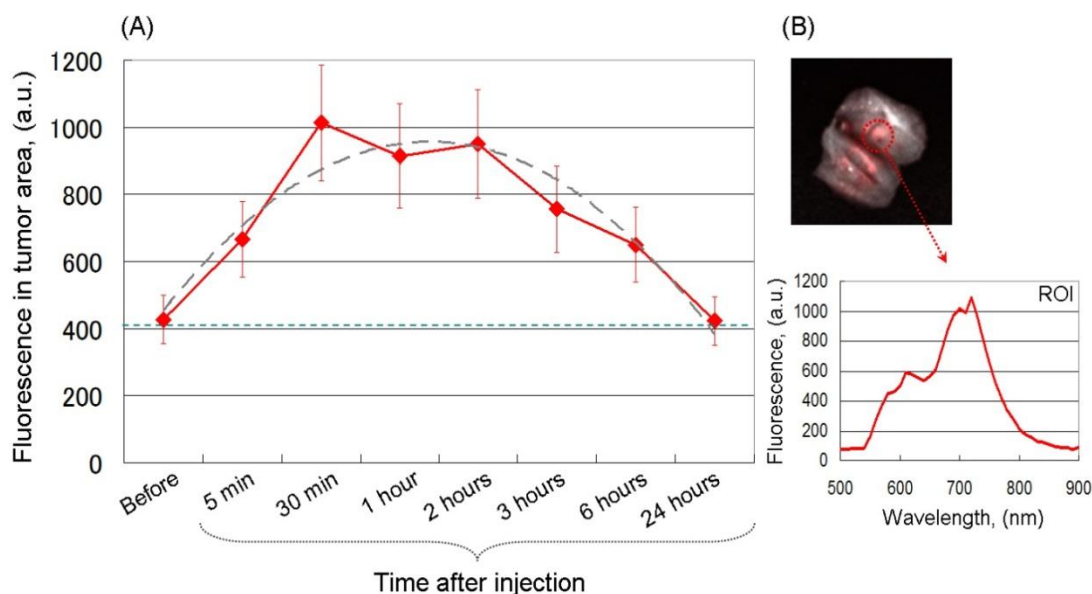


Фигура 30. Флуоресцентни изображения – латерално (B) и вентрално (C), заснети на миши модели на колоректален карцином, получени при различни времеви интервали след интравенозно инжектиране на $QD^{705}@Nanogel$ (100 μ l, съдържащи 80 nmol, нормирани по QD). Жълтата стрелка показва туморната област, а зелената стрелка – областта на черния дроб. (A) Флуоресцентни спектри, получени в областта на тумора (в червено) и в областта на кожата (в зелено) на съответните изображения. Резултатите са представителни за три независими експеримента с различни животни и отчетени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm.

Проследена е *in vivo* динамиката на флуоресценцията в областта на тумора – резултатът е показан на Фигура 31A. Наблюдава се постепенно увеличаване на флуоресцентния сигнал през първите 30 минути след *i.v.* въвеждане на наночастиците, между 30-та минута и втория час се достига плато, след което интензитетът започва да спада до базовата линия в рамките на 24 часа. Максимално отчетеният флуоресцентен

интензитет е 2.5 пъти по-силен от фоновата флуоресценция (на 30-та минута).

За да докажем, че $QD^{705}@Nanogel$ са проникнали в тумора, едно животно е жертвано 6 часа след инжектирането, туморът е изолиран и промит с PBS, след което е подложен на оптичен имиджинг *ex vivo* (Фигура 31В). В туморната тъкан се наблюдават ярки флуоресцентни петна. Спектърът на флуоресценция, извлечен от тези петна, съответства на спектъра на QD^{705} .



Фигура 31. (А) Динамика на интензитета на флуоресценция в туморната област на миши модели на колоректален карцином, след *i.v.* въвеждане на $QD^{705}@Nanogel$ (100 μ l, съдържащи 80 ptoI, нормирани по QD). Представените резултати са средни от три независими експеримента с различни животни и отчетени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm. Зелената пунктирна линия показва фоновата флуоресценция. (В) *Ex vivo* флуоресцентно заснет тумор, изолиран 6 часа след *i.v.* въвеждане на $QD^{705}@Nanogel$. На графиката – флуоресцентен спектър, отчетен от ROI, отбелязан с червената пунктирна линия на изображението.

Пасивното насочване на наночастици в клетки и тумори е слабо изследван аспект в контекста на съвременните проучвания за разработване на селективни системи за пренос на лекарства. Както беше дискутирано в предния подраздел, *in vitro* интернализацията на $QD@Nanogel$ е слабо ефективен и бавен процес. Според нас основните причини за този резултат се свързват с механизма на навлизане на наночастиците (ендоцитоза) (Chen et al., 2014; Osaki et al., 2004; Jaiswal et al., 2003; Murayama et al., 2012); вида и особеностите на използваната клетъчна линия (Gomes et al., 2011), както и с физикохимичните характеристики на наночастиците - размер, форма, заряд, хидрофобност и повърхностната им обвивка (Sweeney et al., 2008; Chen et al., 2014; Chitrani et al., 2006; He et al., 2010; Ferrari et al., 2014; Li et al., 2015; Moyano et al., 2014).

Още в последните години на миналия век (Matsumura and Maeda, 1986) е установено, че някои макромолекули се акумулират преференциално в туморни тъкани. Получените от нас резултати за навлизането на $QD@Nanogel$ в солидни тумори потвърждават тази концепция. Причината за получените данни се свързва от една страна с физикохимичните параметри на наногелите, които повлияват кинетиката в кръвообращението, процесите на екстравазация и вътретуморна дифузия. Ключов

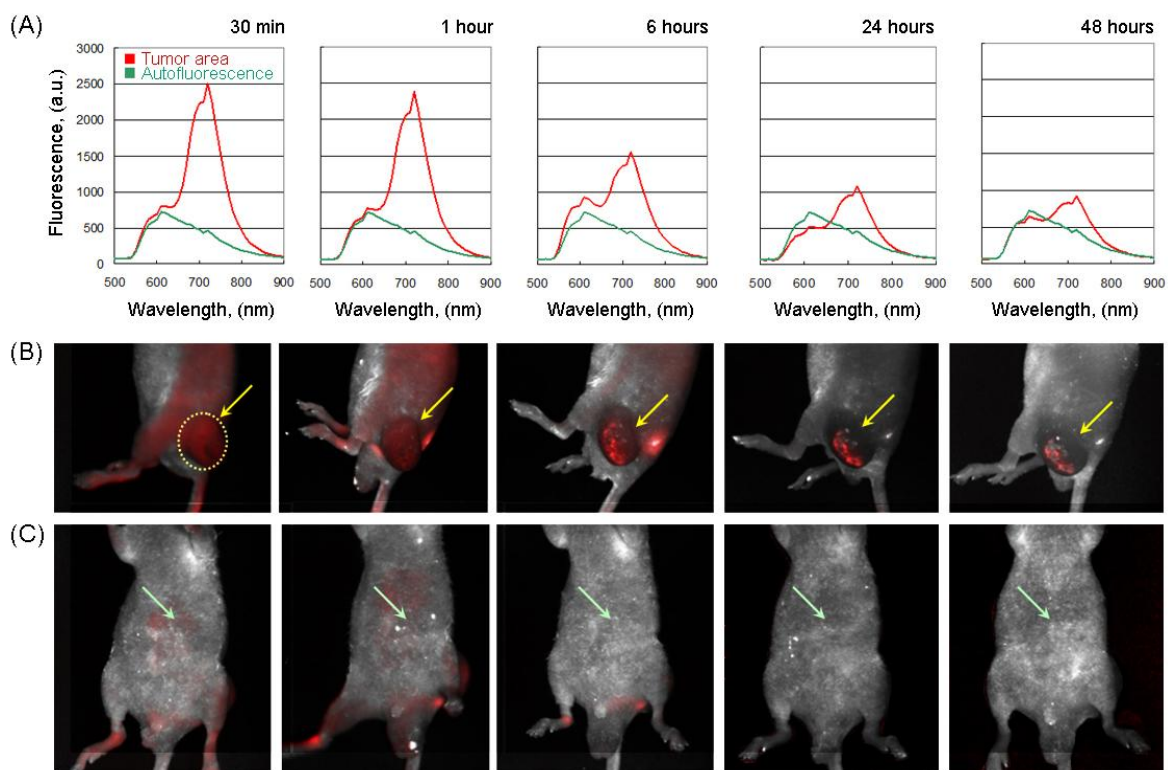
момент за въвеждането на наночастици в тумори е постигане на продължителна циркулация в кръвния ток на експерименталните животни, осигурена в нашия случай чрез пегилиране на частиците. Размерът на наночастиците е определящ за кинетиката и акумулирането им в тумора (*Bertrand et al., 2014*), наличието на заряд се отразява върху възможностите за опсонизация (имунен отговор), разпознаване от туморните клетки и циркулационният им профил (*Bertrand et al., 2014*), а формата им е от значение за времето на задържане в кръвообращението чрез модулиране на фагоцитозата (*Bertrand et al., 2014*). От друга страна биологичните особености на туморите (кръвоносната система и екстраваскуларното обкръжение) също са фактори за процеса на интернализиране (*Bertrand et al., 2014*).

С цел да се оценят ефектите на електротретирането за улеснено доставяне и увеличаване времето на задържане на $QD^{705}@Nanogel$ в туморната тъкан, заснехме изображения, получени при две различни позиции на тялото на мишката за време от 5 минути до 48 часа след комбинирано третиране с наночастиците и електропорация (**Фигура 32**). Анализират се същите два региона на интерес. Получените данни показват наличие на силен флуоресцентен сигнал в туморната тъкан непосредствено след комбинираното третиране, който се запазва дори до 48 часа след електропорацията (**Фигура 32В**). В коремната област се отчита слаб флуоресцентен сигнал само до първите 6 часа след третирането (**Фигура 32С**). Дискретният флуоресцентен спектър, отчетен от туморната област, съответства на спектъра на емисия на QD^{705} (**Фигура 32А**). Видима е разликата между флуоресценцията на QD^{705} (червен спектър) и фоновата флуоресценция от тялото на мишката (зелен спектър) дори на 24-я и 48-я час след комбинираното третиране. Резултатите доказват по-ефективното навлизане на наночастиците в тумора поради ангиогенезата и увеличената пропускливост на кръвоносните съдове в електропориранията област. След електропорирането не се наблюдават нарушени кръвоносни съдове и на изображенията липсват артефакти (в резултат на кървене).

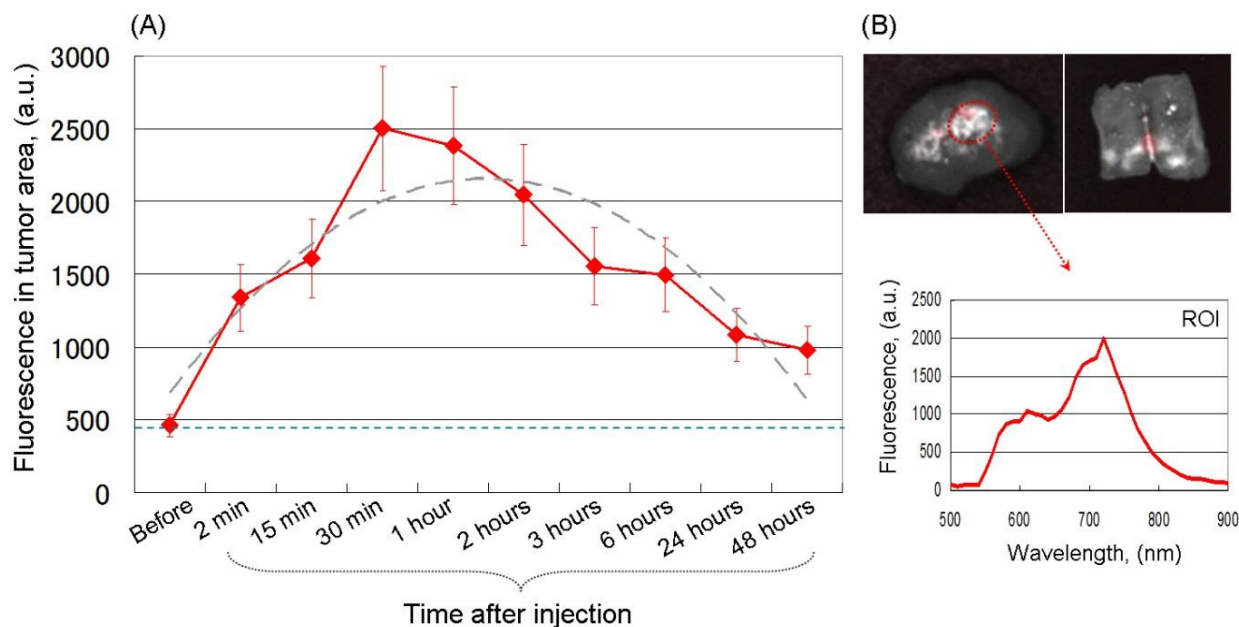
Средните данни за динамиката на интензитета на флуоресценция в областта на тумора (след инжектирането на $QD^{705}@Nanogel$ и електропорация) са показани на **Фигура 33А**. Интензитетът на флуоресценцията се увеличава постепенно в рамките на 30 минути след третирането, достига плато между 30-та минута и 1-я час, след което намалява постепенно в рамките на 48 часа без достигане на базовата линия. Максимален интензитет на флуоресценция в областта на тумора е отчетен на 30-та минута след инжектирането на $QD^{705}@Nanogel$ и последващо електропориране – стойностите са около 5 пъти по-високи от фоновата флуоресценция.

Чрез оптичен ииджинг *ex vivo* доказахме, че ярки флуоресцентни петна се откриват в туморната тъкан до 5 дни след комбинираното третиране (**Фигура 33В**). Спектърът на флуоресценция, отчетен от тези места съответства на спектъра на QD^{705} .

Отдавна е доказано, че кратките високоволтови електрични импулси предизвикват временно и обратимо намаляване на притока на кръв в електропориранията област, както и възстановяването на кръвния поток в неракови тъкани е много по-бързо, отколкото в туморни тъкани (*Peyscheva et al., 2007; Sersa et al., 2002; Gehl et al., 2002*). Ангиогенезата и намаленият приток на кръв в тумора може да доведат до ”улавяне” на наночастиците в туморната тъкан за дълго време. Това явление се използва в електрехимиотерапията на повърхностни лезии в клиничната практика.



Фигура 32. Флуоресцентни изображения – латерално (B) и вентрално (C), заснети на миши модели на колоректален карцином, получени при различни времеви интервали след интравенозно инжектиране на $QD^{705}@Nanogel$ (100 μ l, съдържащи 80 μ mol, нормирани по QD) и последващо електропориране (1000 V/cm). Жълтата стрелка показва туморната област, а зелената стрелка – областта на черния дроб. (A) Флуоресцентни спектри, получени в областта на тумора (в червено) и в областта на кожата (в зелено) на съответните изображения. Резултатите са представителни за три независими експеримента с различни животни и са отчетени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm.



Фигура 33. (A) Динамика на интензитета на флуоресценция в туморната област на миши модели на колоректален карцином, след i.v. въвеждане на $QD^{705}@Nanogel$ (100 μ l, съдържащи 80 μ mol, нормирани по QD) и електропориране (1000 V/cm). Представените резултати са средни от три независими експеримента с различни

животни и отчетени при филтър на възбуждане 435-480 nm и филтър на емисия 700 nm. Зелената пунктирна линия показва фоновата флуоресценция. (B) Ex vivo флуоресцентно заснети тумори, изолирани 5 дни след i.v. въвеждане на QD⁷⁰⁵@Nanogel и последващо електропорирване. На графиката – флуоресцентен спектър, отчетен от ROI, отбелязан с червената пунктирна линия на изображението.

По този начин се осигурява по-дълго време на задържане и действие на лекарства, както и тяхното освобождаване от наночастици.

Насоченото доставяне на биосъвместими квантови точки все още е в процес на проучване. Както беше споменато по-горе, има разработени няколко подхода с голям потенциал за приложение, един от които е свързан с използване на дълго циркулиращи полимерзоми (Bakalova et al., 2015). През последните 5 години, няколко *in vitro* проучвания описват доставянето на наночастици в изолирани култивирани клетки посредством електротретиране (Boukany et al., 2014; Huang et al., 2014; Zu et al., 2014; Hobo et al., 2013).

Huang et al. (2014) и Zu et al. (2014) използват електропорация и златни наночастици с цел проследяване и подобряване ефективността на доставянето на полиплекси, натоварени с ДНК или siRNA. При този хибриден подход се постига пренос на генетични проби, защитени чрез кондензирани катийонни полимери. С помощта на този подход авторите предлагат бърз и директен метод за доставяне на ДНК и siRNA в цитозола на клетки от линиите K562 и NIH/3T3, като отчитат и въздействието върху преживяемостта на клетките.

Boukany et al. (2014) докладват иновативен наноканален електропориращ подход (НЕП), който се използва за улесняване на доставянето и освобождаването на ДНК и siRNA от липоплексни наночастици. Авторите демонстрират, че чрез НЕП устройство липоплексите могат да се инжектират директно в клетъчната цитоплазма в рамките на няколко секунди. Установето е, че липоплекси, съдържащи анти-MCL1 siRNA, доставяни чрез НЕП, по-ефективно регулират експресията на MCL-1 mRNA в ракови клетки A549, отколкото при конвенционална трансфекция (без електропорация). Авторите отбелязват също, че липоплекси, доставяни чрез този подход, може директно да освобождават siRNA в цитоплазмата, без да преминават през ендцитозен път, което увеличава ефективността на РНК интерференцията. Друго постижение на групата е успешното доставяне на големи плазмиди в хамстерови овариални клетки от линия СНО след комбиниране на НЕП с липоплексни наночастици.

Hobo et al. (2013) постигат успех чрез прилагане на електропорация за подобряване на имуногенността на дендритни клетки чрез сигнални PD-1 лиганди, използвайки siRNA-липидни наночастици, комбинирани с антиген mRNA електропорация в култивирани клетки.

Очевидно е, че комбинирането на физична и химична концепция за насочено доставяне на молекули е обещаващ подход и би могло да стимулира проучванията върху въвеждането на различни терапевтични наноматериали не само *in vitro*, но и *in vivo*.

Въз основа на направената литературна справка, проучванията на Yoo et al. (2010) и West et al. (2014) са единствените, които описват *in vivo* доставяне на наночастици чрез електропорация в тумори на експериментални животни, визуализирани чрез оптичен имиджинг. Yoo et al. докладват за доставяне на имитиращи в близката инфрачервена област на спектъра (NIR) квантови точки (CdTeSe) в култивирани клетки

и експериментални модели на животни чрез електропорация (Yoo *et al.*, 2010).

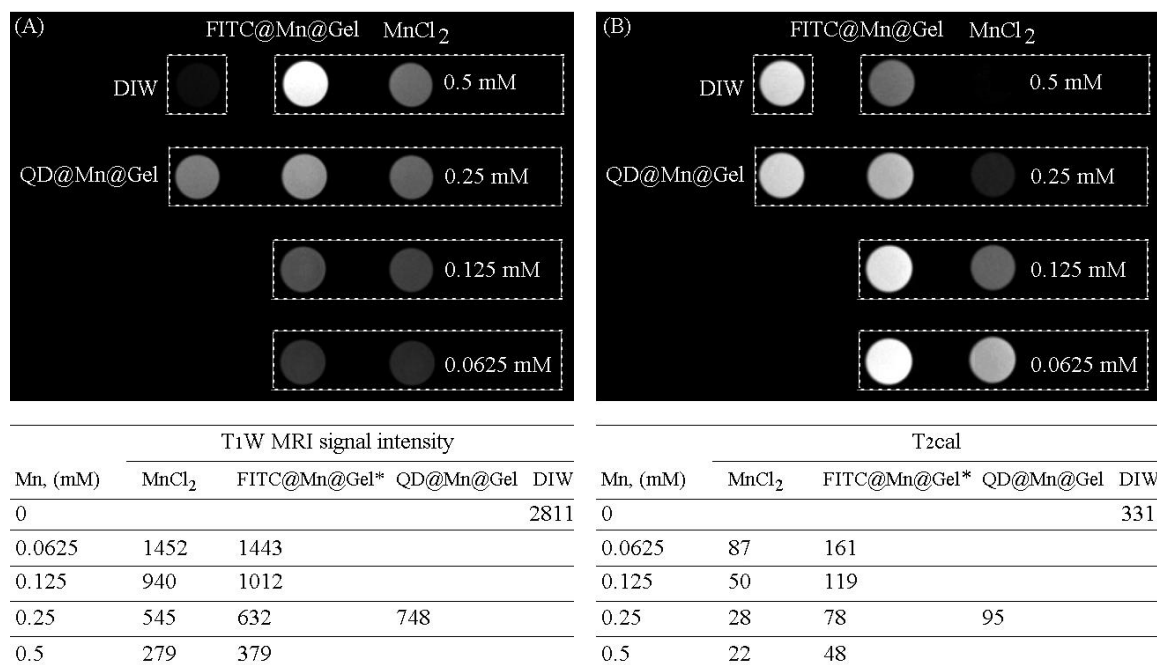
Това е първата демонстрация, че електропорирани NIR квантови точки могат да остават стабилни в туморна тъкан в продължение на месец, без да е налично значително намаляване на флуоресцентния интензитет. Колективът на West *et al.* (2014) докладва оценка за *in vitro* и *in vivo* въвеждането на желязни наночастици, натоварени с доксорубицин като функция от волтажа на електропориране и времето на прилагане върху панкреатични аденокарциномни клетки (PANC-1) и панкреатичен дуктален аденокарцином (PDAC) на експериментални животни. Въпреки това, авторите са използвали образни техники *ex vivo* (на тъкани образци) за визуализиране натрупването на наночастиците в туморната тъкан. Те предполагат, че комбинацията от двете стратегии (тераностични наночастици и електропорация) може да преодолее хеморезистентността при аденокарцином на панкреаса. Групата основава идеята си на по-рано публикувано изследване, в което е показано, че електропорацията усилва терапевтичната ефикасност на противоракови лекарства (например, доксорубицин) в панкреатични туморни модели (Nanda *et al.*, 1998).

3.2.1.2. Магнитно-резонансен имиджинг

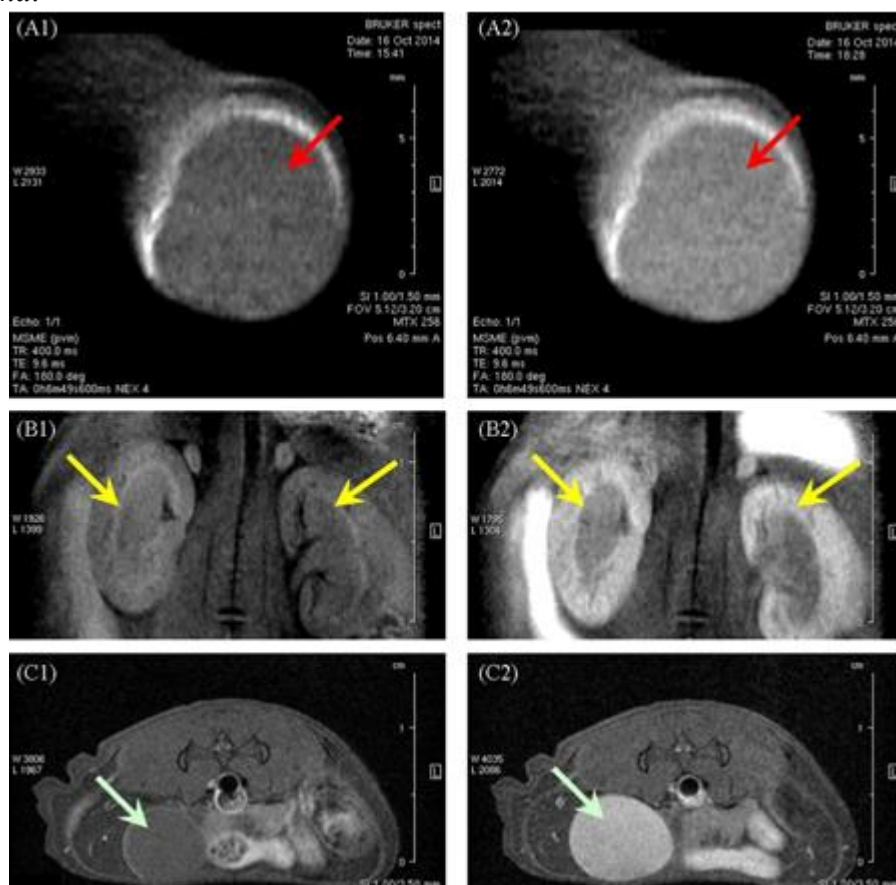
Последната част от експериментите по дисертацията включва визуализиране на фармакодинамиката на $QD^{705}@Mn@Nanogel$ чрез MRI. Манганът, в ниски концентрации, се счита за нетоксичен при *in vivo* проучвания (Bennet *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2013). Поради този факт решихме да използваме манган (вместо конвенционалния гадолиний) като контрастно средство за *in vivo* MRI изобразяване на фармакодинамиката на $QD@Nanogel$.

На **Фигура 34** са показани MRI сигналите на $MnCl_2$ (като стандарт), $FITC@Mn@Nanogel$ [използван в изследване на Murayama *et al.* (2013)] и охарактеризираният от нас $QD^{705}@Mn@Nanogel$. Интензитетът на сигнала от $QD^{705}@Mn@Nanogel$ съответства на около 0.5 mM манганови йони, задържани вътре в наночастиците. Следователно $QD^{705}@Mn@Nanogel$ могат да служат ефективно като MRI контрастни средства за *in vivo* приложения.

С цел да проверим възможностите на $QD^{705}@Mn@Nanogel$ да се използват като контраст за MRI, проведохме експеримент върху животински миши модел на колоректален карцином. Наночастиците бяха инжектирани през опашната вена на мишките в хода на MRI скенирането, като първите пет скенирания се използват за изчисляване на базовата линия, към която се нормализират резултатите, получени след инжектирането на наночастиците. Подбрани са няколко области на интерес – тумор, бъбреци и пикочен мехур (**Фигура 35**). В областта на тумора се наблюдава усилване на MRI контраста след 2-я час от въвеждането на наночастиците (**Фигура 35-A2**). Силен контраст се открива също в бъбреците (**Фигура 35-B2**) и пикочния мехур (**Фигура 35-C2**). Най-вероятно повишаването на контраста в бъбреците и пикочния мехур се дължи на манганови йони, които излизат от $QD^{705}@Mn@Nanogel$ и не е резултат от натрупване на наночастиците в тези два органа. Животните бяха подложени паралелно и на оптичен имиджинг, но не беше регистриран флуоресцентен сигнал в бъбреците и пикочния мехур *in vivo*. След MRI измерванията, от мишките беше взета урина от пикочния мехур за анализ на $QD^{705}@Mn@Nanogel$ чрез флуоресцентна спектроскопия. QD^{705} сигнал не се регистрира и в урината.



Фигура 34. MRI изображения на фантоми с $MnCl_2$ и $QD@Mn@Nanogel$: (A) T1W MRI (спин-ехо секвенция); (B) T2 MRI (спин-ехо секвенция) (изчислено) – (T2cal). За сравнение е използван FITC@Mn@Nanogel, разработен от Murayama et al. (2013). Параметрите на измерванията са описани в раздел "Материали и методи" на дисертацията.



Фигура 35. Изображения от MRI, получени преди (ляв панел) и след (десен панел) *in vivo* въвеждане на $QD^{705}@Mn@Nanogel$ в миши модел на колоректален карцином (отговарящ на 100 μL обем с 0.5 mM Mn^{2+} – единична доза): (A) тумор, (B) бъбреци, (C) пикочен мехур. Изображения A2, B2 и C2 са заснети 2 часа и 40 мин след въвеждане в следният ред на скениране : тумор→бъбреци→ пикочен мехур.

Проведен беше и *in vitro* анализ на освобождаването на Mn^{2+} от $QD^{705}@Mn@Nanogel$, за да се определи естеството на MRI сигнала в бъбреците и пикочния мехур. Пречистен $QD^{705}@Mn@Nanogel$ се диспергира в серум и се съхранява при 37°C за 3 часа. След това диспергираният разтвор се филтрува няколко пъти с *Vivaspin-6* (Mw 300 000), като всяка супернатанта се ресуспендира в буфер и подлага на ново филтруване. Супернатантите и филтратите се анализират чрез магнитно-резонансна томография за освобождаване на Mn^{2+} от наногела. Интензитетът на MRI сигнала във филтратите е относително висок след всяко измиване, което показва освобождаване на манган от гела. Тези данни показват, че е необходимо да се подобри процедурата на натоварване и задържане на манган във вътрешността на нанохидрогела, което ще бъде следващата стъпка на нашите изследвания.

* * *

В заключение, данните, получени в настоящата дисертация допринасят за развитието на нов тераностичен подход за третиране на солидни тумори. Използвана е комбинация от охарактеризирани и доказано ефективни мултимодални наночастици и електропорация, за постигане на целево локализиране, интернализиране и задържане в туморната област. Направените изследвания биха спомогнали за въвеждането на използваните от нас наночастици като нано-платформи за пренос на противоракови лекарства, което е следваща стъпка за бъдеща дейност в областта на тераностичната персонализирана медицина.

Изводи

1. Характеризирани са два вида полимерни наночастици (нанозоми), натоварени с различни флуорофори. Доказано е, че квантовите точки (QD) се задържат изцяло в полимерната матрица, докато изследваните органични флуорофори „изтичат“ постепенно от матрицата. Това прави квантовите точки по-подходяща контрастна субстанция за визуализиране на проникването и локализирането на нанозомите в биологични обекти.
2. Доказано е, че електропорирането не повлиява степента на задържане на контрастните субстанции в полимерзомите.
3. Установена е ниска степен на цитотоксичност за използваните наночастици при *in vitro* прилагане на изолирани клетъчни линии (Colon26).
4. Изследвана е степента на проникване на QD-натоварени нанозоми в клетки – пасивно или след въздействие с електрични импулси. Установена е слаба пасивна проникваща способност за нанозомите. При електроопосредствано доставяне, с повишаване на приложениия интензитет се повишава значително скоростта и степента на интернализация в клетките.
5. Изследвана е локализацията и степента на проникване на QD-натоварени мултимодални нанозоми в животински туморни модели – пасивно или след въздействие с електрични импулси. Установено е пасивно интернализиране и

задържане на нанозомите в туморната тъкан до 24-я час от инжектирането. По отношение на комбинираното третиране с електрични импулси е доказано, че след прилагане на интензитет 1000 V/cm, нанозомите навлизат в тумора и се задържат в туморната тъкан до 48-я час от третирането.

6. Проведената магнитно-резонансна томография потвърждава извода, че хидрогелните нанозоми се локализируют пасивно в туморната област.

Приноси

1. Представени са наночастици, подходящи за тераностика – с потенциал за инкорпориране в тях на повече от едно вещество – както терапевтични, така и контрастни субстанции за образна диагностика, което предполага бъдещи клинични приложения.

2. За първи път е доказано електроопосредствано доставяне и задържане (в продължение на 48 часа) на наночастици в животински туморни модели. Всички данни, получени в хода на изследването, показват една обещаваща терапевтична стратегия за лечение на солидни тумори, базирана на комбинираното приложение на дългоциркулиращи флуоресцентни наночастици и електропорация.

3. Разработен е нов, модифициран тип електрод за електрохимиотерапия с изолация на долната повърхност, с цел по-равномерно разпределение и повишаване концентрацията на наночастиците в областта на тумора, както и елиминиране на артефактите в изображенията.

Научни активи по темата на дисертацията

Списък на публикации

1. Atanasova, S., Nikolova, B., Murayama, Sh., Stoyanova, E., Tsoneva, I., Zhelev, Zh., Aoki, I., Bakalova, R., (2016), “Electroinduced delivery of hydrogel nanoparticles in Colon 26 cells, visualized by confocal fluorescence system”, *Anticancer Res.*, 36(9), 4601-4606, **IF 1. 895**.

2. Bakalova, R., Nikolova, B., Murayama, Sh., Atanasova, S., Zhelev, Zh., Aoki, I., Kato, M., Tsoneva, I., Saga, T., (2016), “Passive and electro-assisted delivery of hydrogel nanoparticles in solid tumors, visualized by optical and magnetic resonance imaging in vivo”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 905–914, **IF 3.125**

3. Nikolova, B., Atanasova, S., Mudrov, Tz., Tsoneva, I., Zhelev, Zh., Bakalova, R., Aoki, I., (2015), “Image guided Electro-assisted Drug Delivery: Comparison between Two Types of Electrodes”, *Int. J. Bioautomation*, 19(2), 259-266, **SJR 0. 228**.

4. Atanasova, S., Lazarova, D., Nikolova, B., Zhelev, Z., Tsoneva, I., Aoki, I., Bakalova, R., (2014), "In vivo visualization of electro-assisted delivery of nanoparticles using optical imaging", *Anticancer Res.*, 34, 5761-6258, **IF 1. 826**.

Списък на открити цитати

Bakalova, R., Nikolova, B., Murayama, Sh., Atanasova, S., Zhelev, Zh., Aoki, I., Kato, M., Tsoneva, I., Saga, T. (2016), "Passive and electro-assisted delivery of hydrogel nanoparticles in solid tumors, visualized by optical and magnetic resonance imaging in vivo", *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 905–914.

1. Dall'Ara, E., Boudiffaa M., Taylor C., Schug D., Fiegle E., Kennerley A.J., Damianou C., Tozer G.M., Kiessling F., Müller R., (2016), "Longitudinal imaging of the ageing mouse", *Mechanisms of Ageing and Development*, 160, 93-116.

2. Zhou, H-J., Ye, Zh-W., Yu, Zh-F., Su, M-Sh., Du, J-H., (2016), "Application of Low-Field Nuclear Magnetic Resonance and Proton Magnetic Resonance Imaging in Evaluation of 'Jinxiu' Yellow Peach's Storage Suitability", *Emir. J. Food Agric.*; 28(9): 633-643.

3. Lai, W-F., He, Zh-D, (2016), "Design and fabrication of hydrogel-based nanoparticulate systems for in vivo drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 243, 269–282.

Списък на устните и постерни доклади, представени на конгреси

1. Atanasova, S., Lazarova, D., Nikolova, B., Zhelev, Zh. Tsoneva, I., Spasov, L., Bakalova, R., "Electro-assisted drug delivery in cancer using size-controlled long-circulating polymer nanoparticles", 5-6 June 2014, 24th International Conference of the Society of Bulgarian Scientists-Stara Zagora, Stara Zagora, Bulgaria.

2. Атанасова С., Николова Б., Цонева Я., Лазарова Д., Бакалова Р., "Влияние на електропорацията върху цитотоксичността и редокс-модулиращия ефект на конвенционални химиотерапевтици, приложени на изолирани ракови клетъчни линии", Научна сесия за докторанти и млади учени „Биомедицина и качество на живота“, организирана по повод 145-годишнината на БАН, 2.10.2014 г. (първа награда).

3. Atanasova, S., Lazarova, D., Nikolova, B., Zhelev, Zh., Tsoneva, I., Aoki, I., Bakalova, R. "In vivo visualization of electro-assisted delivery of nanoparticles using optical imaging", 9th International Conference Anticancer Research, 6-10 October, 2014, Porto Carras, Sithonia, Greece.

4. Атанасова, С., Николова, Б., Цонева, Я. Мураяма, Ш., Аоки, И., Желев, Ж., Бакалова, Р., "Визуализиране на проникването и локализирането на флуоресцентни наночастици в тумори след електропорация: експериментални модели in vivo", 5-6 май 2015, FOCOS 2015 Светлината в науката, МУ София.

5. Nikolova, B., Atanasova, S., Aoki, I., Tsoneva, I., Zhelev, Zh., Bakalova R., "Tumor targeting in vivo, by using quantum dot-labeled polymersomes", XI national conference on medical biology 15-17 May, 2015, Plovdiv, Bulgaria.

6. Nikolova, B., Atanasova, S., Mudrov, T., Tsoneva, I., Zhelev, Z., Bakalova, R., Aoki, I., “In vivo Image-guided Electro-assisted Drug Delivery in Colon 26 grafted mice: Comparison Between Two Types of Electrodes”, V юбилейна научна конференция на тема: Комплексно поведение при туморите в малкия таз, 19-21 юни 2015, Правец, България.

7. Atanasova, S., Nikolova, B., Popov, P., Murayama, S., Zhelev, Z., Aoki, I., Tsoneva, I., Bakalova, R., “Perspectives for image-guided electro-assisted drug delivery in Colon 26 grafted mice”, International Biomedical Congress “Progress through molecular vision”, Sofia, Bulgaria, February 25-28, 2016.

8. Pehlivanova, V., Atanasova, S., Iocheva, D., Popov, P., Tsoneva, I., Nikolova B., “Possibilities to overcome multidrug resistance through high-voltage electrical pulses with different polarities”, International Congress of Medical Sciences (ICMS) 2016, 12-15 May, Sofia, Bulgaria. (poster award III place).

9. Atanasova, S., Nikolova, B., Murayama, S., Stoyanova, E., Tsoneva, I., Zhelev, Zh., Aoki, I., Bakalova, R., “Electro-assisted delivery and theranostic potential of multimodal nanoparticles in cancer cells”, 2-4 June, 2016, 26th International Scientific Conference, Stara Zagora, Bulgaria.

10. Николова, Б., Атанасова, С., Пехливанова, В., Желев, Ж., Бакалова, Р., Цонева, Я., “Електропорацията-физически метод за пренос на лекарства in vitro и in vivo”, III Национален конгрес по физически науки, 29.09. - 02.10.2016, Интер Експо Център, София, България.

11. S. Semkova, B. Nikolova, S. Murayama, E. Stoyanova, I. Tsoneva, Zh. Zhelev, I. Aoki, R. Bakalova, “Visualization of passive and electro-assisted delivery of quantum dot-labeled nanoparticles in vitro and in vivo using fluorescent and magnetic resonance imaging”, XII-national medical physics and biomedical engineering conference – NMPEC – 2016, 03-05.11.2016, Inter Expo Center, Sofia, Bulgaria.

12. Б. Николова, С. Семкова, Е. Стоянова, Ж. Желев, Ш. Мураяма, Ич. Аоки, Я. Цонева, Р. Бакалова, „Нано-размерни системи за доставка на лекарства: ин витро и ин виво приложения“, Национална научна конференция: MedicRON Rheumatology & Oncology & Neurology, 9-11.12.2016г., Пловдив, България.

Проектна дейност

1. 2014 г. – Заглавие: “Изследване действието на йонизиращо лъчение върху процеса на изпускане на желязо от Феритин”, № 057/08.05.2014, Финансиран от Националния фонд за научни изследвания на СУ "Св. за Климент Охридски".

2. 2014 г. – Заглавие: BG051PO001-3.3.05-0001 – “Наука и Бизнес”, с тема: „Усвояване на методи за “Image-guided drug delivery” на мултимодални наночастици в солидни тумори с помощта на електрични импулси / “Image-guided drug delivery” – контролирана доставка на лекарствени средства в таргетната тъкан с помощта на методи за образна диагностика“, финансиран от ЕСФ и Министерство на Образованието и Науката, България.

3. 2014 г. – 2015 г. – Заглавие: BG051PO001-3.3.06.-0040 – *“Изграждане на интердисциплинарни екипи от млади изследователи в областта на фундаменталните и приложни научни изследвания от значение за медицинската практика”*, с бенефициент Медицински Факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, финансиран по ОП “Развитие на човешките ресурси”, съфинансиран от ЕСФ на ЕС.

4. 2014 г. – до сега: COST EP4Bio2Med - *European network for development of electroporation-based technologies and treatments* - COST Action TD1104.

5. 2015 г. – до сега: *“In vitro и in vivo проследяване на таргет-специфични полимерзоми белязани с QD⁷⁰⁵”* – ИБФБМИ-БАН.

6. 2016 г. – Заглавие: *“Прилагане на нови мултимодални контрастни субстанции (нитроксидни производни) за визуализиране и анализ на митохондриална дисфункция в клетки с ЕПР спектроскопия”*, № 122/04.2014, Финансиран от Националния фонд за научни изследвания на СУ "Св. за Климент Охридски".

7. 2016 г. – до сега: ръководител проект по “Програма за подпомагане на младите учени в БАН” на тема: *“Тераностика при третиране на клетки от рак на дебелото черво с използване на мултимодални наночастици, цитостатици и електропорация”*

Проведени специализации

1. Август 2014 г. - Едномесечна специализация в гр. Чиба, Япония с цел обучение и съвместни научни изследвания в Националния институт за радиологични изследвания на Япония, Център за молекулярен имиджинг.

2. Юни 2015 г. - Участие в международна школа на тема „Електропорация за Медицина“, COST (Action TD1104), Университет по медицина и фармация „Carol Davila“, Букурещ, Румъния.