

Rezumat

Importanța metodei optice de observare interacțiilor la nivel biomolecular bazată pe fenomenul rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) a cunoscut în ultimele două decenii un trend continuu ascendent.

Prezenta lucrare este structurată pe două direcții de cercetare ale autorului: pe de o parte punerea la punct a unui **construct SPR goniometric** iar pe de altă parte dezvoltarea a trei aplicații noi menite să extindă domeniul utilizării SPR ca metodă de investigare. Teza se referă la următoarele trei aplicații:

Biosenzor SPR destinat terapiei genice sau mai precis analizei felului în care are loc transportul dirijat al acizilor nucleici scopul terapiei tumorilor. În acest context s-a studiat felul în care are loc legarea specifică a receptorului Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) de un complex nanomolecular reunind anticorpus cetuximab specific receptorului cuplat printr-o moleculă spacer (polietilenglicol (PEG)) cu polietilenimin (PEI), de care se pot lega în continuare acizi nucleici. Nanoparticulele astfel formate pătrund prin endocitoză în interiorul celulei, unde interacția cu complexul RISC (RNA-induced silencing complex) determină reducerea ratei de divizare a celulelor tumorale, încetinind dezvoltarea acestora. Astfel s-a evidențiat, facilitarea SPR pentru controlul endocitozei, rezultatele cercetării apărând în 11.2013 în **Analytical Chemistry (IF 5.7)**.

Biosenzor SPR pentru stomatologie. Această aplicație a rezultat în urma unui studiu cu mijloace SPR al procesului formării peliculei de salivă pe o suprafață de hidroxiapatită (HAP) produsă artificial. HAP reproduce fidel materialul dintelui natural, așa că a fost posibilă urmărirea procesului formării peliculei dentare de salivă, reușindu-se chiar și determinări cinetice ale procesului legării proteinelor salivare de HAP. Au fost de asemenea testate interacția cu bacteria cea mai frecvent întâlnită în cavitatea bucală precum și comportamentul la variația valorii pH-ului, rezultatele obținute fiind în acord cu studiile de caz din medicina dentară. Cercetările se desfășoară în continuare intenționându-se publicarea rezultatelor după efectuarea unor experimente de control.

Senzor SPR pentru evaluarea biocompatibilității. Este prezentat în premieră un sistem de testare *in vitro* a interacției materialului component al implantatului (Ti, Au) cu țesutul celular uman, în particular celulele osteoblaste. S-a investigat aderența celulelor osteoblaste direct la suprafețele metalice precum și la suprafețe funcționalizate cu fibronectin, collagen sau peptide. În continuare s-a demonstrat pe alt tip de celule (endoteliale) că adeziunea depinde de tipul celulelor care aderă. Rezultatele obținute au fost reproductibile dar și confirmate de imagini de microscopie electronică. În acest fel s-a obținut validarea metodei SPR pentru cercetarea adeziunii celulelor ca și testarea biocompatibilității. Metoda de măsură validată a fost protejată prin **patentele DE102007005147A1 și US20100028903A1** înregistrate din anul 2008.

Abstract

The undeniable need of the biotechnology for rapid and sensitive methods to observe different types of nanolevel interactions raised the profile of Surface Plasmon Resonance (SPR) to become fundamental in development works. The present work presents the author's extensive experience investigating two directions: **development of an angle scanning SPR-buildup**, and validation of three different applications as follows:

SPR based biosensor for gene therapy deals with the delivery of nucleic acids for tumor-specific gene therapy. The specific binding of cetuximab-modified PEG-PEI (polyethylene glycol-polyethyleneimine) complexes, which can be loaded with nucleic acids, to the epidermal growth factor receptor (EGFR) is described by SPR. Furthermore, the formed nanoparticles mediating the cellular uptake allow PEI/nucleic acid (small interfering RNA - siRNA) complexes to interact with RISC (RNA-induced silencing complex), which enables gene knock-out or gene silencing via RNA interference (RNAi). This specific binding could be successfully proven by SPR. It was demonstrated that SPR is a suitable tool for studying nanoparticle interactions with cell surface structures. The work has been published in Nov. 2013 in *Analytical Chemistry (IF 5.7)*.

SPR based biosensor for dental medicine is a study proposing to ascertain the way the natural protective dental pellicle forms on an artificial HAP surface by using of a SPR based platform. This surface closely mimics the natural material of real teeth, so that it was possible to observe how the dental pellicle forms whereby kinetic parameters of the protein binding processes on HAP have been calculated. By comparing the proposed model with real life situations regarding changes in pH or interaction with common bacteria present in the oral cavity, it was possible to simulate the effect of destructive agents on the enamel structure. The model simulates the oral environment very closely and reacts to the changes in pH very close to the natural tooth. The work is still in progress and after supplementary control experiments will be published.

SPR based biosensor for the evaluation of biocompatibility shows how an *in vitro* test system of interaction between the materials used in the manufacture of implants and human cell tissue, in particular osteoblasts is working. Primarily could be observed how osteoblasts on untreated metallic surfaces (Gold, Titanium), respectively treated with Fibronectin, Collagen, or RGD Peptides adhere. Furthermore, it was tested how the adhesion depends on the cell type, whereby experiments already performed on osteoblasts have been repeated on epithelium cells. It was proven that the adhesion depends on the type of cells. The results were reproducible and confirmed by electron microscopy evaluations, so that SPR became valid for cell adhesion events. This use of SPR leads 2008 to registered patents DE102007005147A1 as well as US20100028903A1.