



UE Fiscodi

Registration number,
“Petru Poni” Institute
of Macromolecular Chemistry

SCIENTIFIC STAGE REPORT
PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050 Project. Contract no. 4/2018.
-- 2020 Stage --

Mimicking Living Matter Mechanisms by Five-dimensional Chemistry Approaches

*Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare,
în cinci dimensiuni*

Acronym: 5D-nanoP

Coordinating Institute,
“Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry
Legal representative,
Dr. Valeria Harabagiu

Project Director,
Professor Aatto Laaksonen, PhD.

This document is the property of the organizations involved in the project, and may not be reproduced, distributed, or used by, and/or to third parties, without the prior consent of the authors.

Contents

	Page
I. Generic approaches within the 2020 stage of the project	1
II. The research results of 2020 stage	3
A.3.1. – The refining of nanoplatform constituents synthesis and characterization techniques	3
A.3.2. – Study of feasible variants for the assembling of the constituents of nanoplatforms	32
A.3.4. – Evaluation of functionality of the constituents of assembled nanoplatforms	37
A.3.3. – Study of feasible variants for obtaining (bio)macromolecular matrices for <i>ex vivo</i> testing of nanoplatforms	53
A.3.5. – Preliminary study of the functionality of nanoplatforms	69
III. Quantifiable results of the project, obtained during the 2020 stage	75
IV. Topics and prognoses for Stage 2021	80
References	81

NOTE: ACHIEVEMENTS RELATED TO THE THIRD ACTIVITY IN THE IMPLEMENTATION PLAN OF STAGE 2020 OF 5D-NANO P PROJECT ARE PLACED AFTER THOSE RELATED TO THE FOURTH ACTIVITY, FOR REASONS OF WRITTEN REPORT CONSISTENCY!

I. Generic approaches within the 2020 stage of the project

The 2020 stage of **5D-nanoP** project was devoted to the refining and diversification of the design, synthesis and characterization of the components applicable for nanoplatforms generation. Three classes of compounds were investigated both from theoretical (*in silico*), and experimental point of view: (i) supramolecular self-assembling competent, (ii) synthetic (macro)molecules, and (iii) gelling systems based on single-walled carbon nanotubes dispersions.

According the general implementation plan of the project, the main goals of the current stage consist in:

- the design, synthesis, characterization, and cross-investigation of the building blocks of the functional nanoplatforms;
- the elaboration of particular protocols for the synthesis and characterization of the (macro)molecular components which will be further used to produce nanoplatforms having biochemical stability and biocompatibility;
- the production and preliminary testing of some substrata on which nanoplatforms are designed to be tested and to function.

The details of the implementation work of Stage 2020 are summarized in the Synopsis 1 (inserted on next page).

Synopsis 1. Implementation plan and results of 5D-nanoP – Stage 2020.

Year	Stage	Main objective of Stage 2020	Particular / adapted activities and sub-activities carried out	Stage results and deliverables
2020	The single one	<p style="text-align: center;">Obtaining of nanoplatform variants and the assessment of their functionality in (bio)macromolecular matrices</p>	<p>A.3.1. The refining of nanoplatform constituents synthesis and characterization techniques.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Research report (Stage 2020). 2. Particular protocols for synthesis and testing. 3. Particular protocols for <i>in silico</i> studies. 4. 16 published ISI scientific papers directly associated with the project 5. 20 published ISI scientific papers connected with the project 6. Two submitted and accepted scientific papers. 7. 2 book chapters 8. 10 participations to conferences and symposia, with communications and poster works. 9. 2 PhD thesis with acknowledgments to 5D-nanoP project
			<p>A.3.2. Study of feasible variants for the assembling of the constituents of nanoplatforms.</p>	
			<p>A.3.3. Study of feasible variants for obtaining (bio)macromolecular matrices for ex vivo testing of nanoplatforms.</p>	
			<p>A.3.4. Evaluation of functionality of the constituents of assembled nanoplatforms.</p>	
			<p>A.3.5. Preliminary study of the functionality of nanoplatforms.</p>	

II. The research results of 2020 stage

A.3.1. The refining of nanoplatform constituents synthesis and characterization techniques

Within **5D-nanoP** project, we chosen to investigate three distinctive types of nanoplatforms, each of them based on particular (macro)molecular constituents: (i) *low-molecular self-assembling competent unimers*, (ii) *synthetic polymers having precisely defined structure and reactivity* as a consequence of their synthesis pathway, and (iii) *hydrogel forming (bio)macomolecules having tailored reactivity* as a consequence of chemical functionalization. These types are able to cover all the potential applications of nanoplatforms as vectoring systems, regardless the carried molecular cargoes.

(i) First type is functioning based on the principles of constitutional dynamic chemistry, and involves the use of chemical libraries of pre synthesized particular unimers. It is able to furnish the most versatile spatial conformations, well adapted to the cargo peculiarities. As a drawback, it requires the availability of a large number of quasi-similar compounds, pre synthesized and extremely well purified (for example, in order to precisely separate enantiomers).

The second one makes use of accurately designed macromolecules able to self-organize simply based on their specific physical-chemical reactivity, as a function on the composition and thermodynamic parameters of the chemical environments which include them. Reproducibility of the generated supramolecular architectures it is good enough for this type of nanoplatforms to be useful for the vectorization of large biomacromolecules. Their deficiency consists in the difficult “management” of their fate in biological environments, after their service as nanoentity.

The third type, is less organized in terms of macromolecular architecture, but is highly responsive against the biological milieu parameters. This in why hydrogel-type nanoplatforms are only used at the interface with tissues, and only for low-molecules transfer, or for localized (bio)chemical interactions (the case of immobilized enzymes).

A.3.1.1. Nanoplatforms based on low-molecular self-assembling competent unimers

Non-viral gene vectors were produced and tested starting from library unimers able to act as nanoentities in constitutional dynamic chemistry approaches. The distinctive reactivity which was considered was the unimers ability to interconnect by means of reversible covalent imine bonds.

(A) Libraries based on the molecular components from Figure 1 were constructed.

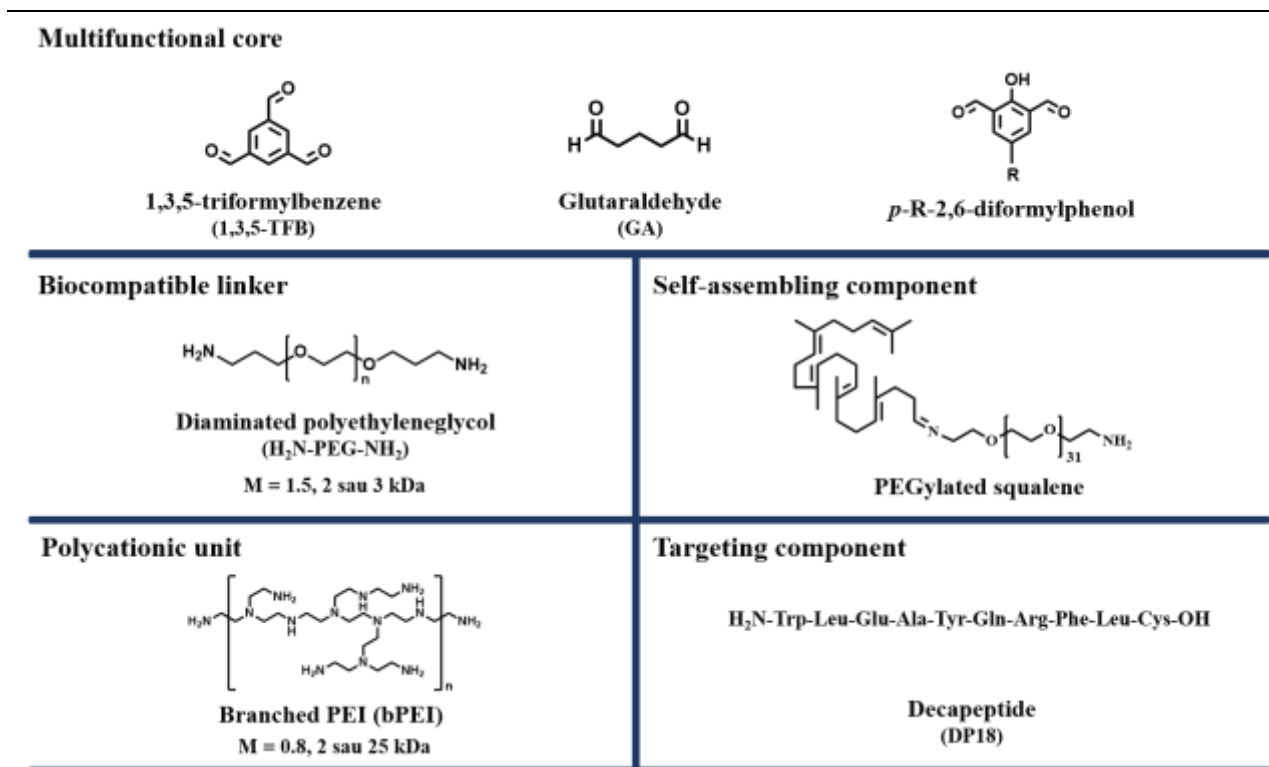


Figure 1. The generic members of the unimers library used to build dynamic carriers of DNA.

(A.1.) A first library was organized around the connecting linker 1,3,5-triformylbenzene (TFB), and included PEGylated squalene (SQ-PEG-NH₂), PEG having molecular weights of 1.5, 2.0 and 3.0 kDa, and branched polyethylenimine (bPEI) of 0.8 kDa¹.

The reason of including PEGylated squalene was its ability to self-assemble in aqueous solution to generate spherical clusters of about 10 nm in diameter. PEGylation increases the squalene solubility, but also reduces its immunogenicity. The role of branched polyethylenimine was considered in relation with the cargo molecules to be vectorized, nucleic acids (especially DNA), with which establishes electrostatic interactions. Table 1 summarizes the mixtures of unimers used to prepare the dynamic assembling non-viral vectors able to bind, transport and transfect DNA.

The mixtures of library members prepared according Table 1 recipes were further tested as dynamic vectoring systems for plasmid DNA (pCS2+, which encodes a fluorescent protein). Figure 2 describes the results of pDNA loading tests at various ratios between the dynamically generated vectors and the pCS2+, performed by using the technique of electrophoretic migration through agarose gel. The molar ratio of N/P was determined for each individual vectors when was complexed with plasmid CS2+, where N represents the nitrogen content in non-viral vector, and P represents the content of phosphorous in plasmid.

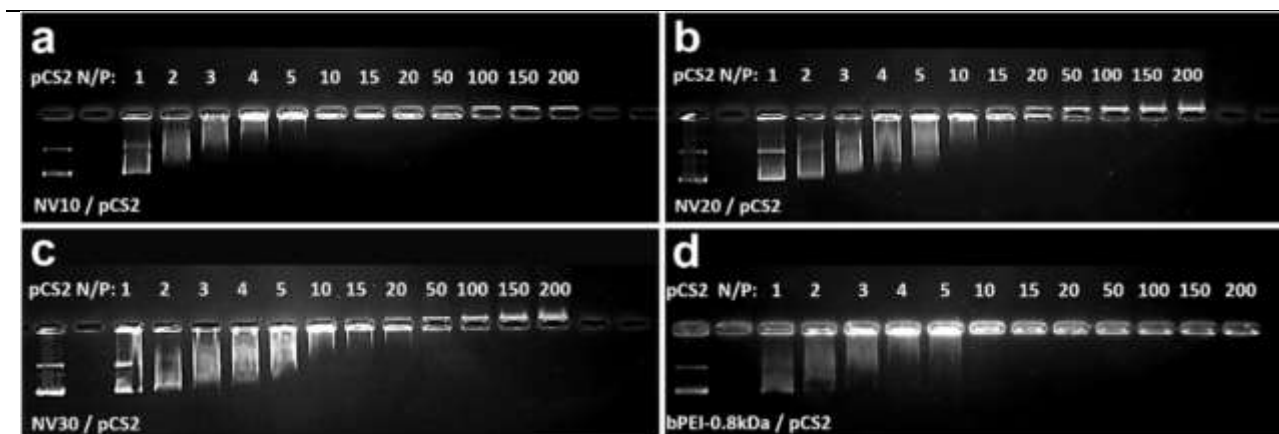


Figure 2. Electrophoretic mobility of pCS2 in presence or absence of the dynamic non-viral vectors, at different N/P molar ratios.

Figure 2 shows that vectors with a 1.5 kDa PEG in their composition pack the plasmid at a N/P ratio of 10, while vectors NV10 completely pack the plasmid at N/P ratio of 20, and vectors with a PEG of 3 kDa at a N/P ratio of 50. These results confirm the assumptions that as the PEG chain increases, the number of amine groups capable of complexing the phosphate groups in DNA decreases. The AFM images in Figure 3 show that the size of the prepared dynamic cargocomplexes depends on the size of the PEG chain. It also demonstrates that 1.5 kDa PEG-based vectors form spherical structures with dimensions smaller than 200 nm, recommending them for applications in gene therapy. *In vitro* transfection efficiency on the HeLa cell line and the cytotoxicity of the dynamic cargocomplexes are presented in Figure 4. It is evident that the cytotoxicity is acceptable and decreases once the length of PEG is decreasing^{2,3}, but the value is still acceptable for the application of the dynamic vectors in gene therapy.

Table 1. The components of the molecular mixtures used to prepare the cargocomplexes.

The code of the library member	Components used to build the dynamic DNA carriers. Their molecular characteristics, and their ratios of mixing.											The final volume of the mixture (μL)
	SQ-PEG-NH ₂ -1,3,5-TFB				H ₂ N-PEG-NH ₂				0.8kDa bPEI			
	Mw (kDa)	Molar ratio	m (mg)	n (nmol)	Mw (kDa)	Molar ratio	m (mg)	n (nmol)	Molar ratio	m (mg)	n (nmol)	
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
NV01	2	1	12.5	6.20	1.5	0.1	0.93	0.62	1.5	7.44	9.3	3000
NV02						0.2	1.86	1.24				
NV03						0.3	2.79	1.86				
NV04						0.4	3.72	2.48				
NV05						0.5	4.65	3.10				
NV06						0.6	5.58	3.72				
NV07						0.7	6.51	4.34				
NV08						0.8	7.44	4.96				
NV09						0.9	8.37	5.58				
NV10						1	9.20	6.20				
NV11	2	1	12.5	6.20	2	0.1	1.23	0.62	1.5	7.44	9.3	2247
NV12						0.2	2.47	1.24				
NV13						0.3	3.70	1.86				
NV14						0.4	4.93	2.48				
NV15						0.5	6.17	3.10				
NV16						0.6	7.40	3.72				
NV17						0.7	8.63	4.34				
NV18						0.8	9.87	4.96				
NV19						0.9	11.10	5.58				
NV20						1	12.34	6.20				
NV21	2	1	12.5	6.20	3	0.1	1.85	0.62	1.5	7.44	9.3	2247
NV22						0.2	3.70	1.24				
NV23						0.3	5.55	1.86				
NV24						0.4	7.40	2.48				
NV25						0.5	9.25	3.10				
NV26						0.6	11.10	3.72				
NV27						0.7	12.95	4.34				
NV28						0.8	14.80	4.96				
NV29						0.9	16.65	5.58				
NV30						1	18.50	6.20				

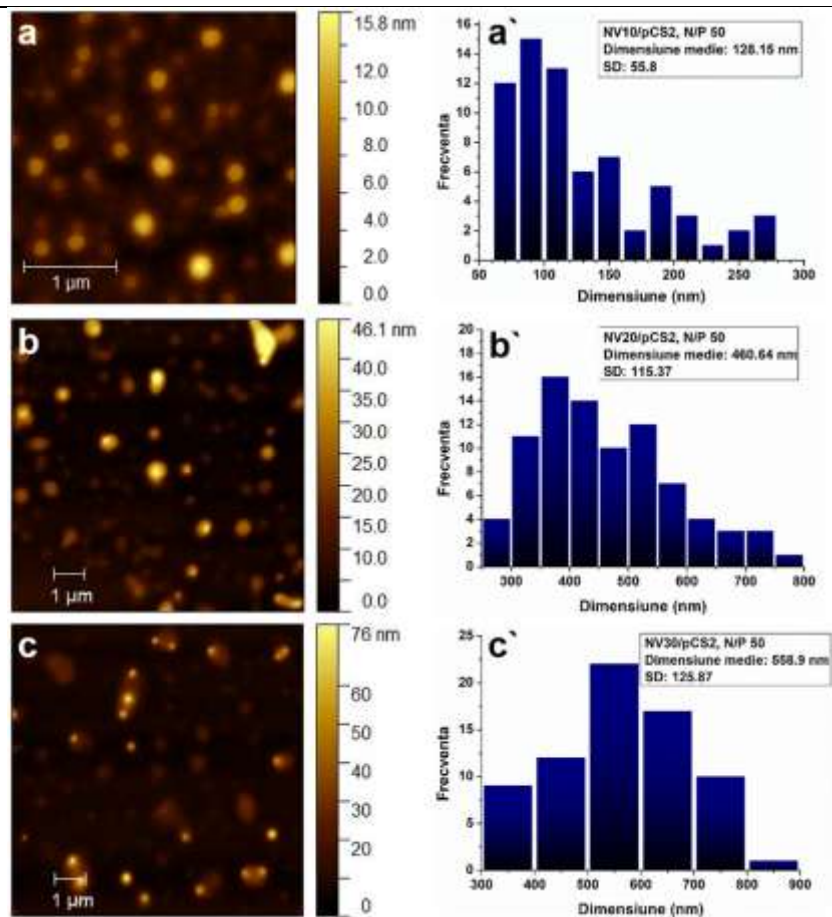


Figure 3. AFM images and the distributions of the cargo complexes non-viral vector/pCS2+.

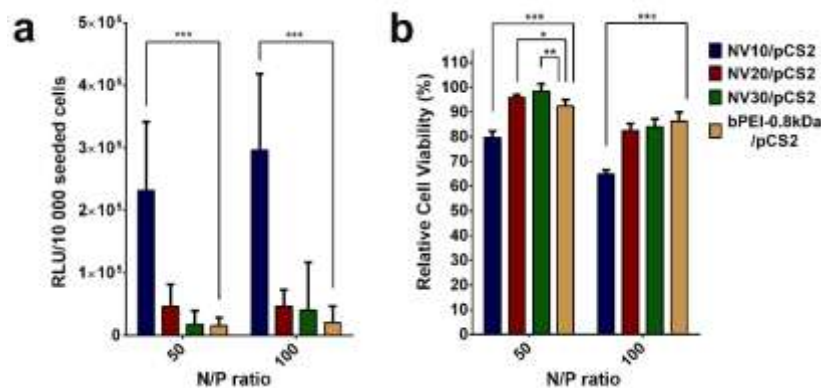


Figure 4.

(a) Transfection ability of dynamic cargo complexes (NV10/pCS2, NV20/pCS2 and NV30/pCS2) at N/P ratios of 50 and 100, on HeLa cells.

(b) Cytotoxicity of dynamic NV10/pCS2, NV20/pCS2 and NV30/pCS2 cargo complexes, at N/P ratios of 50 and 100, on HeLa cells.

The results are presented as a mean value \pm the standard deviation; $n = 6-8$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, by Student's *t*-test.

The transfection efficiency decreases in the series NV10/pCS2 \gg NV20/pCS2 > NV30/pCS2, proving that when the molar weight of PEG is of 0.8 kDa the transfection efficiency is much higher than when the non-viral vectors contain PEG of 2 or 3 kDa.

(A.2.) The second developed library is based on glutaraldehyde as a linker, PEGylated squalene, and branched PEI (bPEI) of 25 kDa, in different molar ratios (Table 2).

Table 2. Composition of the dynamic pDNA vectors, based on glutaraldehyde as a linker.

Vector	SQ-PEG-NH ₂		GA		bPEI-25kDa	
	n (nmol)	Molar ratio SQ-PEG-NH ₂ /GA (echiv.)	n (nmol)	Molar ratio SQ-PEG-NH ₂ /GA (echiv.)	n (nmol)	Molar ratio bPEI-25kDa / SQ-PEG-GA (echiv.)
BF1	19.98	1	19.98	1	1.11	0.06
BF2	19.98	1	19.98	1	3.33	0.17
BF3	19.98	1	19.98	1	5.55	0.28
BF4	19.98	1	19.98	1	8.88	0.44
BF5	19.98	1	19.98	1	11.10	0.56

TEM studies (Figure 5) have shown that the dynamic vectors form core-shell nanoparticles of about 500 nm in diameter. By agarose gel electrophoresis (not shown here), it was determined that at a ratio N/P of 5 the cargocomplexes with pCS2+ are well formed. Cytotoxicity and transfection efficiency on HeLa cells (Figure 6) showed that at N/P ratios of 5 and 7, cell viability in BF/pCS2 polyplexes is similar to that of bPEI-25kDa/pCS2, and at a N/P ratio of 10, but for N/P of 10 a higher cytotoxicity than the control was obtained, which was explained by the increase in the concentration in units of glutaraldehyde used to construct the dynamic vector.

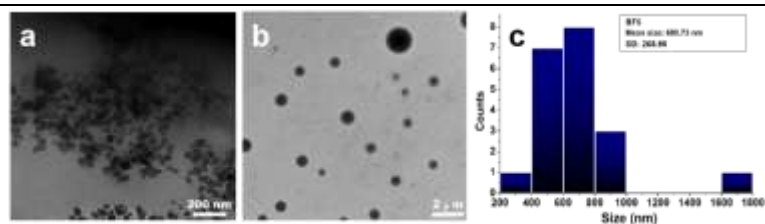


Figure 5. TEM images and dimensions distribution of: (a) SQ-PEG-NH₂, and (b) BF5 vector; (c) dimensions distribution of BF5 non-viral vector/20 particles.

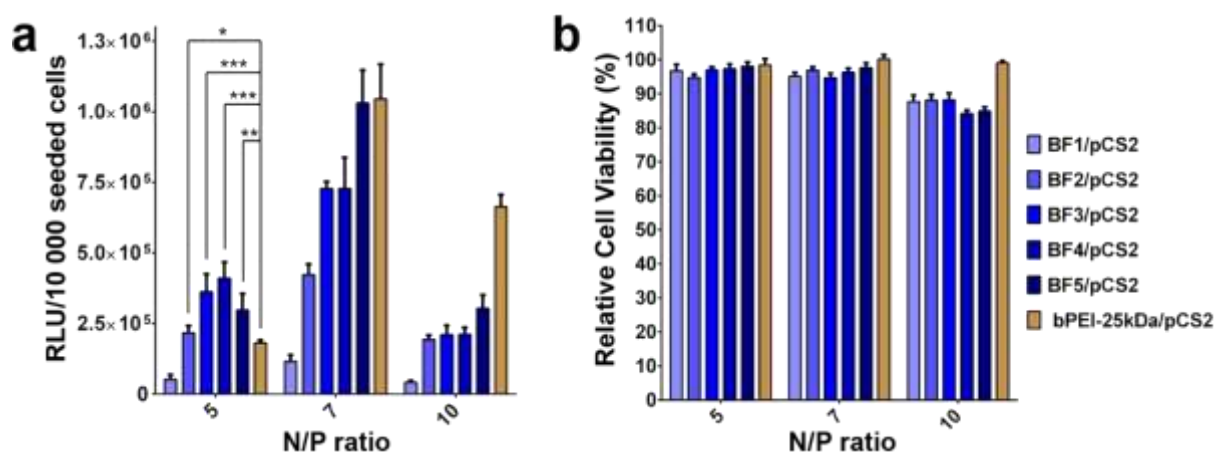


Figure 6. BF1-BF5/pCS2 polyplexes in vitro on the HeLa cell line: (a) Transfection efficiency; (b) cytotoxicity. The results for transfection efficiency are expressed as Relative Light Units (RLU) on 10000 seeded cells. In vitro cytotoxicity assay was achieved using the MTS test on HeLa cells. The results are presented as mean values \pm standard deviation; $n = 6$.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by Student's t -test.

The overall conclusion of this study is that systems based on PEGylated squalene, and 25kDa bPEI, connected via glutaraldehyde can be successfully used in the formation of cargocomplexes with pCS2+ at the N/P ratio of 5, that have the composition of the BF4 vector, and at the N/P ratio of 7, in similitude with the vector BF5. Thus, bPEI-25kDa can be successfully integrated into dynamic constitutional systems to be used as non-viral vectors for nucleic acid transport and transfection⁴, as also supported by Figure 7.

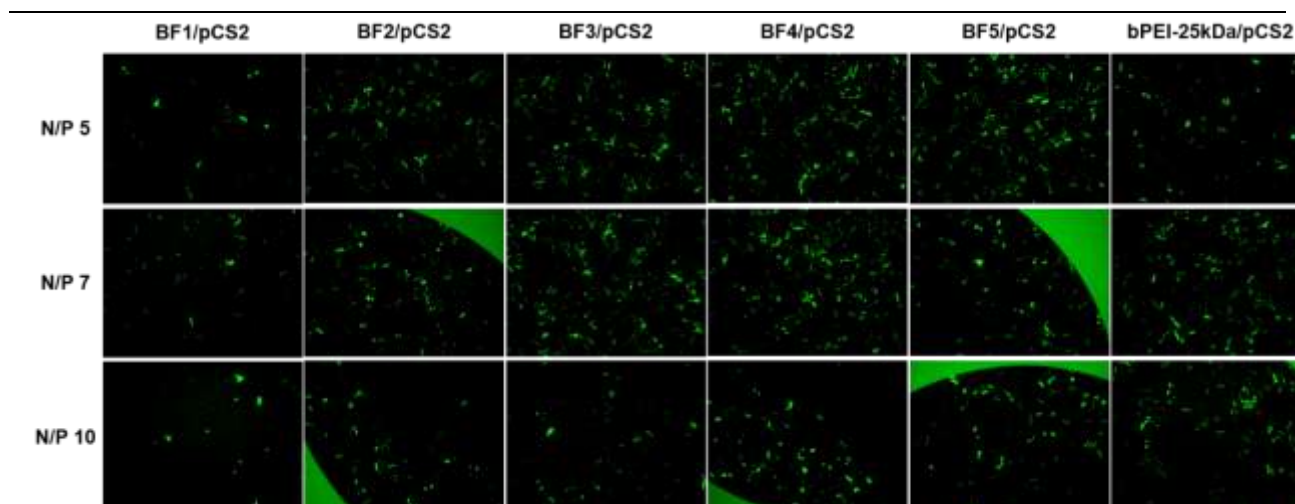


Figure 7. Transfection efficiency on HeLa cells of BF/pCS2 and bPEI-25kDa/pCS2 polyplexes at different N/P molar ratios.

(B) In order to investigate a potential application of the developed dynamic vectors described in Table 1, NV10 vector was modified to also include the DP18 synthetic D-peptide (WXEAAYQRFL) that plays an important role in triple negative breast cancer⁵. The formed polyplex after complexation with pCS2+ was tested *in vitro* on the specific cell line MCF7 (breast cancer) and a nonspecific HeLa cell line. The DP18 D-peptide was attached to the NV10 vector via the functionalized PEG biocompatible linker with NHS (N-hydroxysuccinimide) ester functions, which reacts with the primary amino groups at physiological pH. The resulting P18-PEG4-NV10 cargocomplexes with pCS2+ plasmid are well formed at N/P ratio higher than 50, while those with NV10 vector are completely stable at ratios larger than 10 (Figure 8). These results demonstrate a decrease in the complexation capacity of the DP18-PEG4-NV10 vector compared with unmodified one NV10. The specificity of DP18-PEG4-NV10 is observed with respect to the MCF7 cell line (breast cancer) as compared to the non-specific HeLa line, while the NV10 vector shows the same specificity on both cell lines (Figure 9). In this context, further studies will focus on improving the steps of synthesis and isolation of the conjugate of interest, as well as the possibility of using different ratios between vector and peptide.

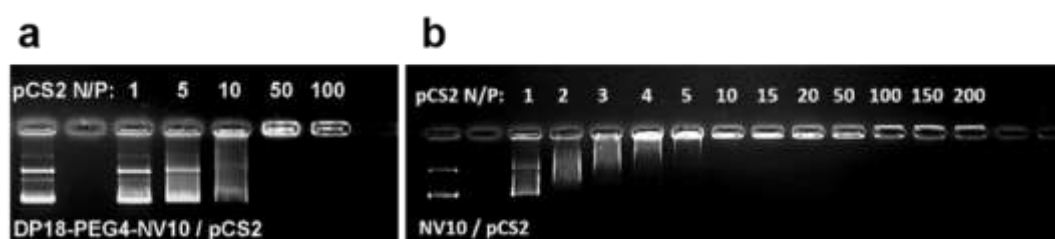


Figure 8. Electrophoretic mobility of pCS2 in the presence of (a) DP18-PEG₄-NV10, and (b) NV10 alone.

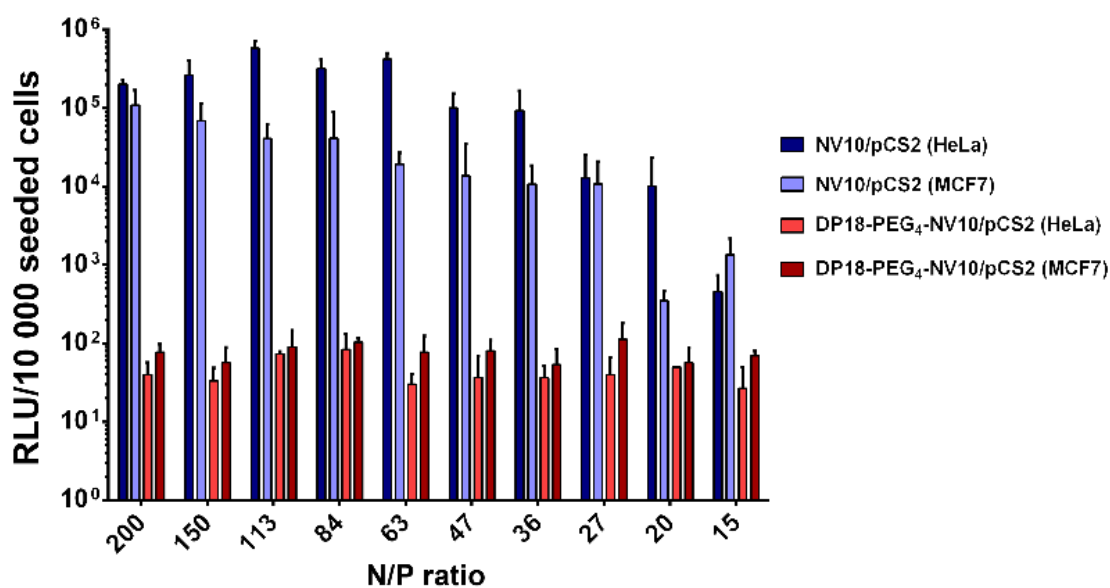
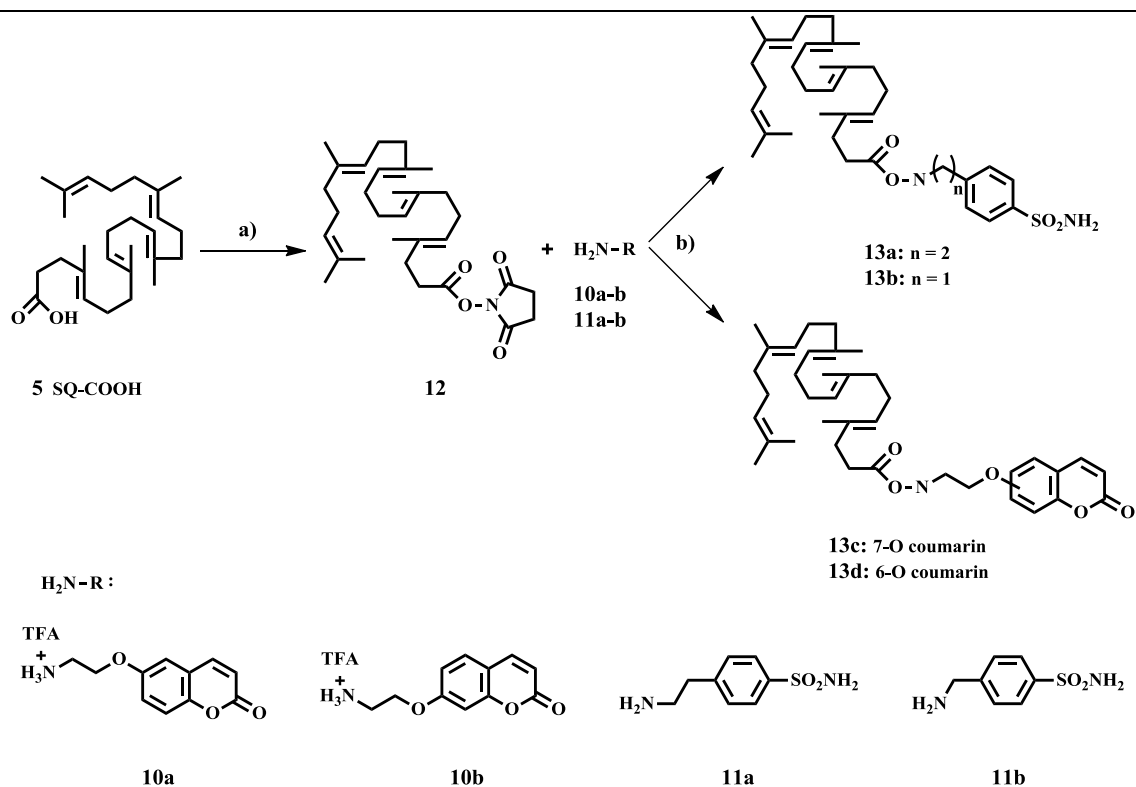


Figure 9. Transfection ability of DP18-PEG₄-NV10/pCS2 and NV10/pCS2 cargo complexes on HeLa and on MCF7 cell lines.

(C) Further improvement of the squalene-based unimers were investigated in order to produce inhibitors of carbonic anhydrases. Squalene derivatives were obtained by coupling reactions of squalene bearing carboxylic group with coumarin and benzenesulfonamide derivatives (see Figure 10)^{4,6,7}. The characterization of the compounds was performed by NMR, MS, and elemental analysis, confirming the obtaining of the proposed compounds. The self-assembly capacity of the squalene-derivative was also proved in aqueous media, at physiological pH.



In vitro evaluation to determine the inhibition profile of human carbonic anhydrases (hCA) isoforms I, II, IX and XII was performed by the stopped flow technique, in the presence of synthesized derivatives. Table 3 resumes the results. Hybrids containing the benzenesulfonamide function showed a high selectivity and an excellent inhibition profile against the hCA II isoform, compared to the other tumor isoforms hCA IX and hCA XII. They also showed much better K_i values than the starting compounds. The excellent inhibitory action of these compounds against hCA II isoform recommends them as potential candidates in preclinical studies for glaucoma or related applications in which hCA II is involved.

Table 3. The inhibitory activity of the squalene-coumarine derivatives against some of the human carbonic anhydrases isoforms.

	K_i (nM)[*]				Selectivity
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII	(CA II/IX)
13a	3516	62.3	1887	844	0.0330
13b	6842	5.0	3559	>10000	0.0014
13c	>10000	>10000	7215	>10000	>1.386
13d	>10000	>10000	8817	>10000	>1.134
AAZ	250	12.1	25.8	5.7	0.468

[*]The results are expressed as an average of three different determinations using the stopped flow technique, the reported value errors were in the range $\pm 5 - 10\%$.

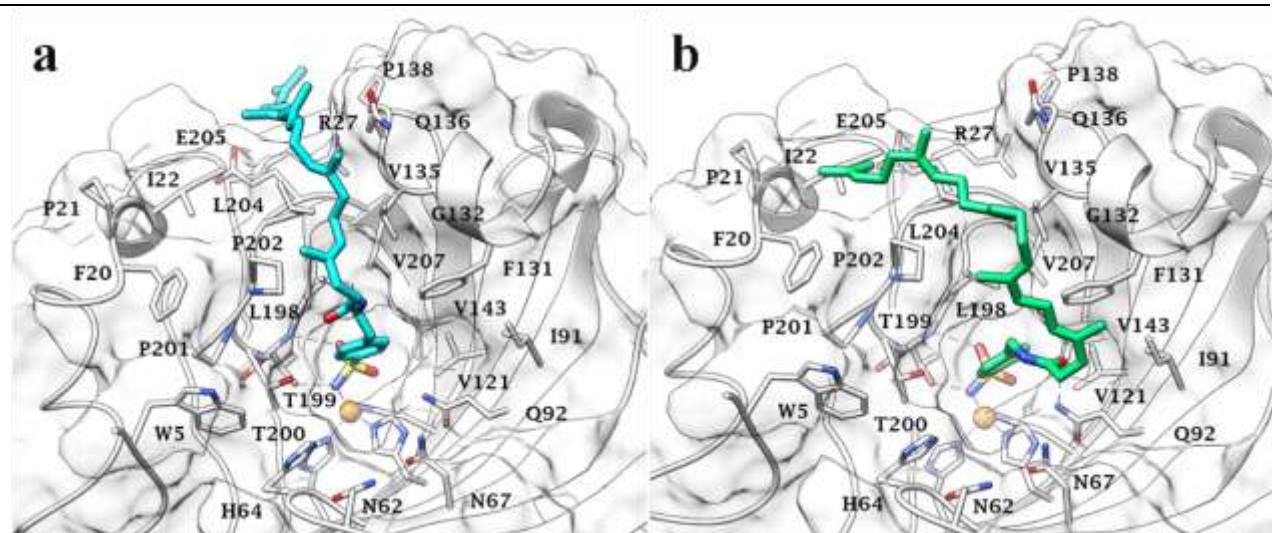


Figure 11. The docking of squalene-sulfonamide derivatives **13a** (a) and **13b** (b) to the active center of CA II, demonstrated by *in silico* molecular modeling. Hydrogen bonds are represented as black dashed lines⁴.

The performed *in silico* molecular modeling studies regarding the docking of squalene derivatives into the CA II isoform are illustrated in Figure 11. To correlate chemical structures with the inhibition profile of compounds **13a** and **13b**, docking and optimization studies were performed with the active centers of CA II (PDB 5LJT). In all solutions used for docking, benzenesulfonamide derivatives were positioned deep in the region of active centers, coordinating the zinc atom with the negatively charged nitrogen atom from the group (SO₂NH⁻). Hydrogen bonds were also observed between –NH and –S=O in the sulfonamide groups with the –OH and –NH groups at position T199 in CA II, and the phenyl ring was positioned in the area defined by V121, V143 and L198 of CA II. The aliphatic chains of compounds **13a** and **13b** are dispersed in the enzyme mass where they form Van der Waals-type stabilizing interactions with the residues in the lipophilic half of the active centers I22, F131, V135, P202 and L204 of CA II. In the case of compound **13a**, the squalene chain reaches the area that is exposed to the solvent and interacts with the surface residues R27, P138 and E205 of CA II, while compound **13b** has the ability to interact very pronouncedly with the hydrophobic area of hCA II, which is defined by residues F20, P21, I91 and G132 of CA II. Furthermore, the length of the single methylene unit connector between the squalene-linked amide group and the sulfonamide-linked phenyl group (**13b**) leads to the formation of spaced hydrogen bonds between the –C=O amide of compound **13a** and the –NH₂ groups in the Q92 side chain of CA II. It is possible that the shorter length of the connector together with the extended network of hydrophobic contacts explains a better inhibition profile of the derivative **13b** compared to **13a**, where the connector consists of two methylene units.

(D) Another studied extension / improvement / refinement regarding the functionality of the applicable unimers was dedicated to polyethylene glycol moiety⁸. Two derivatives were synthesized, characterized and tested from the point of view of their cytotoxicity: (i) *N*-(methoxy poly(ethylene glycol))-2-(10*H*-phenothiazin-10-yl) acetamide (PPN), and (ii) methoxy poly(ethylene glycol) 2-(10*H*-phenothiazin-10-yl) acetate (PPO). Figure 12 show the synthesis pathways.

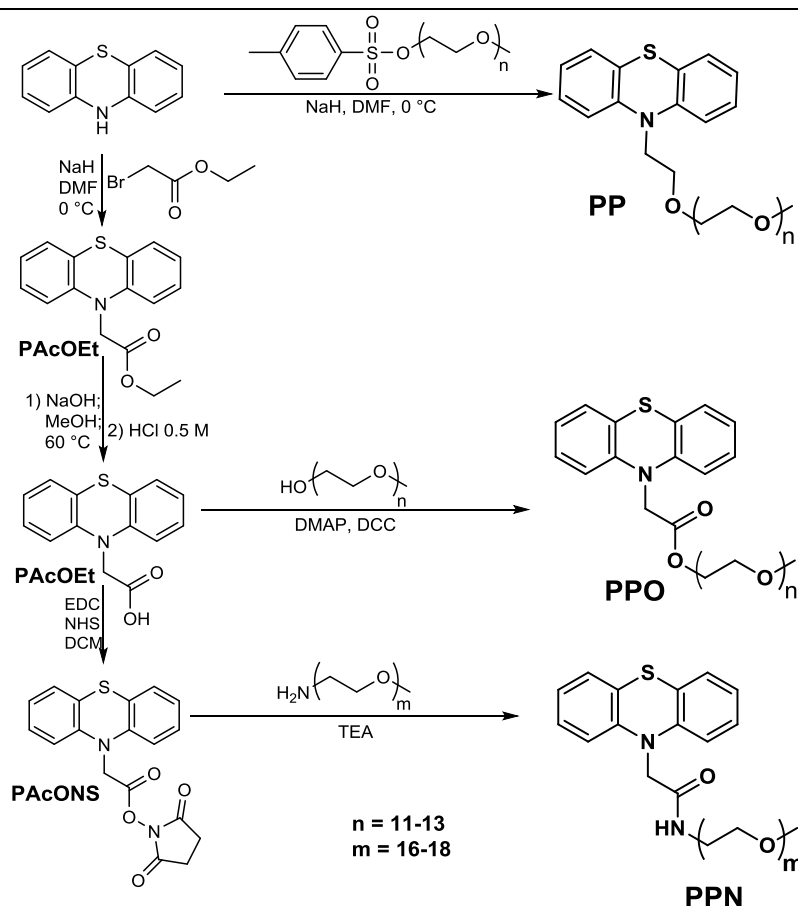


Figure 12.
 The synthesis scheme of PEG-phenothiazine derivatives with antitumor properties.

First, *10*-(methoxy poly(ethylene glycol))-*10H*-phenothiazine (**PP**) is synthesized as follows. In a round bottom three necked flask immersed into an ice bath, 0.065 g NaH (2.2 eq) was dissolved in 7 mL DMF, under nitrogen atmosphere and allowed to reach 0°C (20 minutes). Then, a solution of 0.2565 g phenothiazine (1 eq) in 3 mL DMF was added through a septum. After 20 minutes, when the mixture got an intense orange colour, a solution of 0.95 g Ts-PEG (1 eq) in 3 mL DMF was slowly dropwise during 30 minutes. After that, the reaction mixture was allowed to reach room temperature and kept under vigorous magnetic stirring for 24 hours. The reaction progress was monitored by TLC. When the reaction was finished, the mixture was washed with brine and filtered to remove precipitated impurities. The organic phase was extracted 3 times with DCM, dried with MgSO_4 , filtered, and then concentrated by rotary evaporation. The crude product was purified by column chromatography (DCM:methanol 10:1, v/v) to give a deep red viscous liquid, $\eta=37\%$.

PPN derivative was prepared by the amidation reaction of the activated ester of PP. In a 30 mL flask, 0.5 g of activated ester (1eq) was dissolved in 10 mL acetonitrile under magnetic stirring, at room temperature. Then, 1.06 g methoxy poly (ethylene glycol) amine (PEG-NH₂) (1 eq) and 0.2 mL triethylamine (TEA) (2.2 eq) was added. The reaction mixture was magnetically stirred for 24 hours, at the room temperature. The reaction progress has been monitored by TLC. When the reaction was over, the mixture was dried under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (eluent: DCM/methanol in 10/1, v/v) to give a slightly orange viscous liquid which transformed into a wax when stored into freezer, $\eta=51$.

PPO derivative was obtained by an esterification reaction, applying the following procedure. In a 10 mL flask cooled at 0°C , were sequentially introduced, under stirring, 0.1 g of activated ester (1 eq), 3 mL DCM, 0.012 g DMAP (0.25 eq) and 0.428 g methoxy poly(ethylene

glycol) (2 eq). After 15 minutes, 0.1 g of N, N'- Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1.25 eq) was added, and the reaction mixture was maintained for 20 minutes at 0 °C, and then for 24 hours at room temperature. The reaction progress has been monitored by TLC. When the reaction was over, the mixture was filtered, dried under vacuum, re-dissolved in DCM, filtered, and then washed with 100 mL HCl 0.5 M. The organic phase was extracted 3 times with DCM and concentrated by rotary evaporation. The crude product was further purified by column chromatography (DCM/methanol, 10/1, v/v) when an orange viscous liquid was obtained, $\eta=43\%$.

The chemical structures of all the synthesized derivatives (PP, PPN, and PPO) were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and FTIR spectroscopy. In the $^1\text{H-NMR}$ spectra was noted the disappearance of the chemical shift characteristic for the proton linked to the nitrogen atom of phenothiazine, and the presence of the chemical shifts of the aromatic and aliphatic protons in the right ratio of the integrals. In the case of **PPN** derivative, the chemical shift of the amide proton occurred at 8.39-8.26 ppm (Figure 13). Moreover, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra evidenced the chemical shift of all carbon atoms. All these spectral data indubitable confirmed both the right structure of the **PP**, **PPO** and **PPN** compounds, and their high purity.

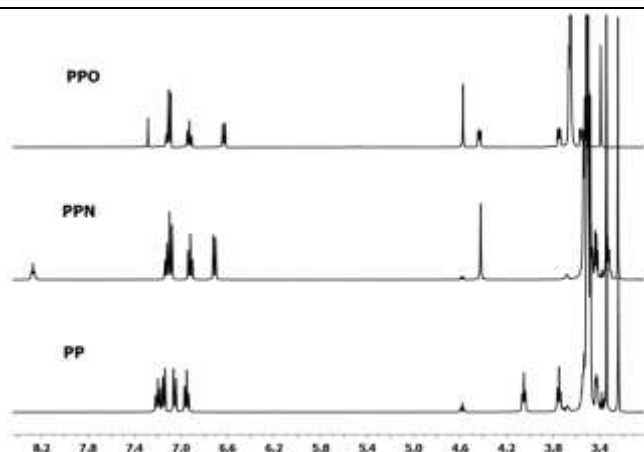


Figure 13. $^1\text{H-NMR}$ spectra of the PEGylated derivatives.

FTIR spectra (Figure 14) displayed characteristic vibrations of the phenothiazine ring and PEG chains for the three compounds, and specific vibrations bands of amide and ester linking groups for **PPN** and **PPO**, respectively. Thus, the amide C=O stretch was noted at 1690 cm^{-1} , while the ester C=O stretch occurred at 1742 cm^{-1} .

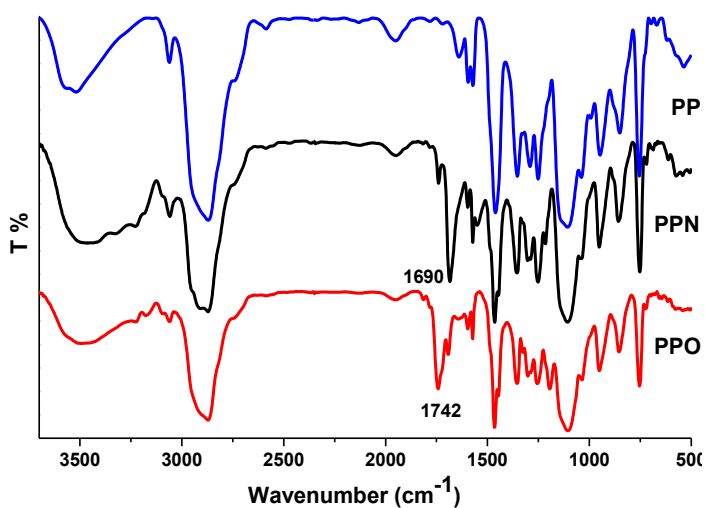


Figure 14. FTIR spectra of the PEGylated phenothiazine derivatives.

In water, the PEGylated phenothiazine derivatives were able to self-assemble into aggregates, as demonstrated by DLS measurements (Figures 15, 16 and 17), which indicated a variation of the hydrodynamic volume of the aggregates as a function of their concentration and chemical structure, from 322 to 63 nm equivalent diameter.

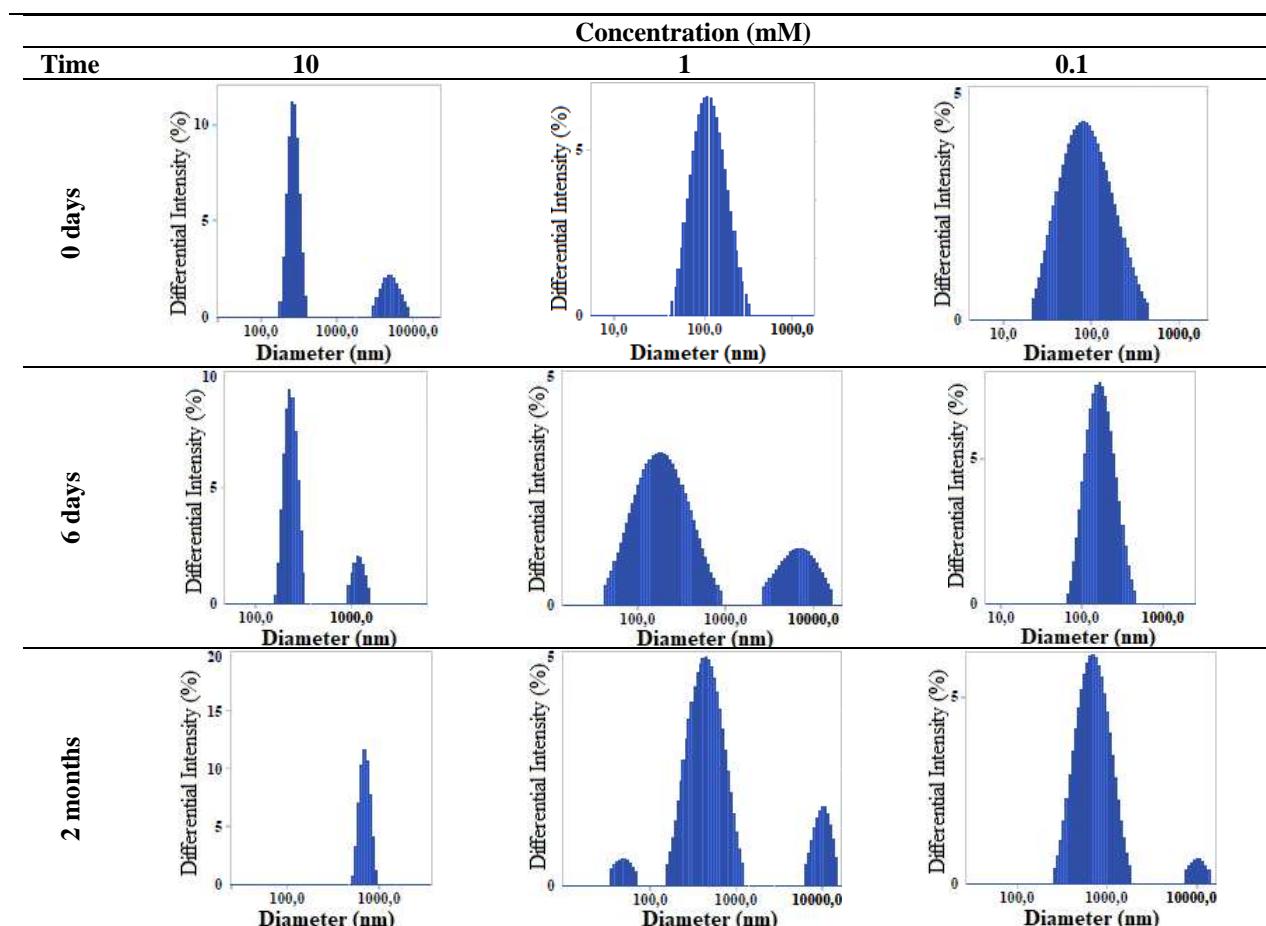


Figure 15. DLS size distribution of the PP compound aggregates, obtained for the water solutions of different concentration, when recorded at different moments.

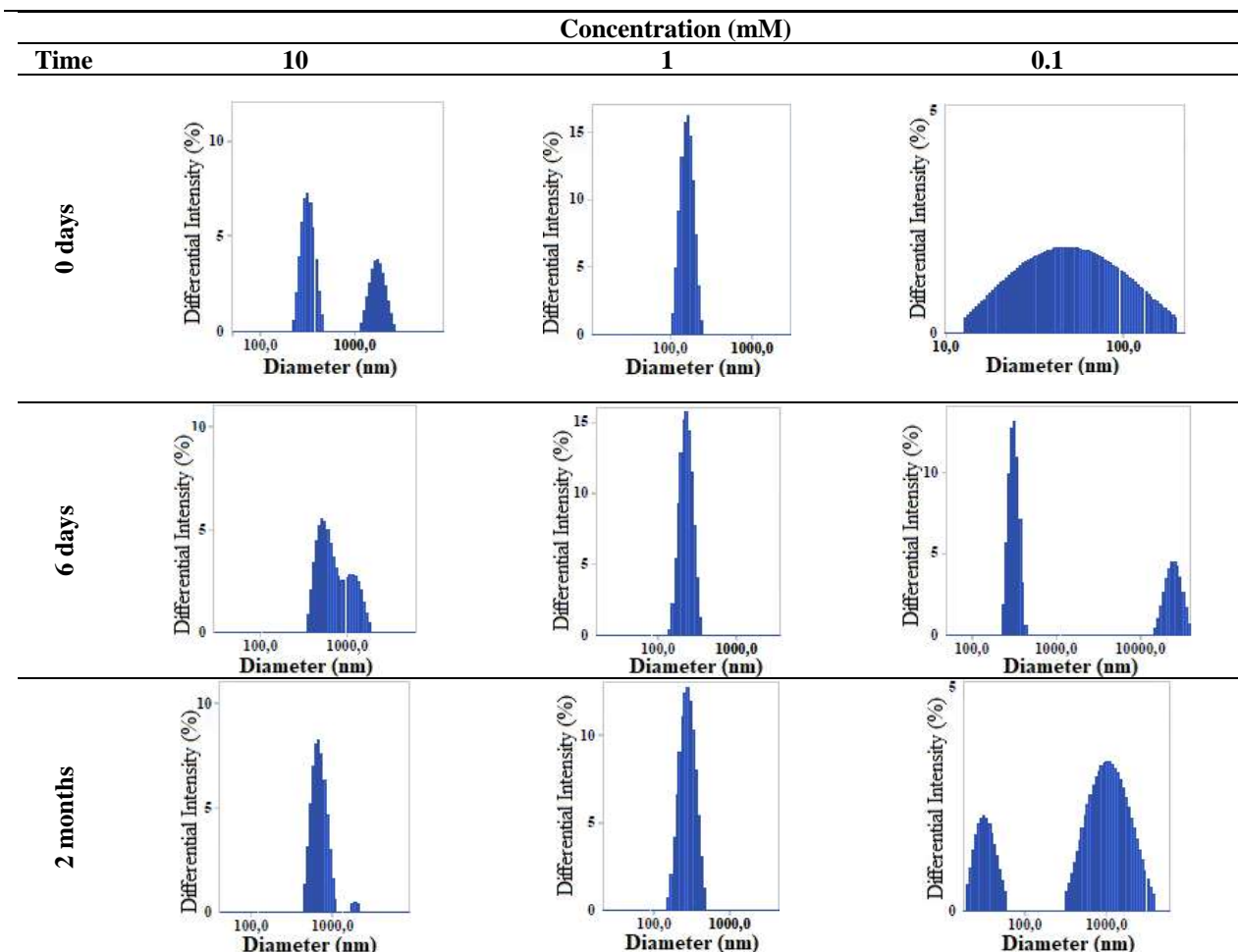
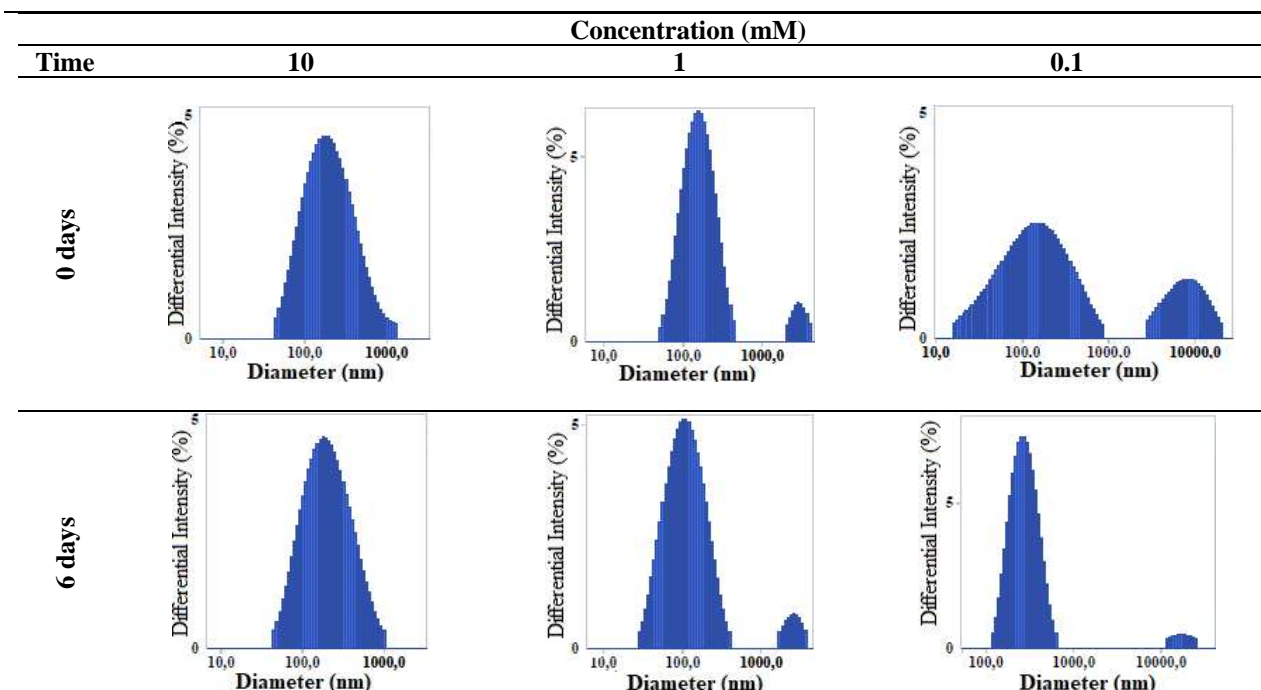


Figure 16. DLS size distribution of the PPO compound aggregates, obtained for the water solutions of different concentration, when recorded at different moments.



(Figure 17 is continued on the next page.)

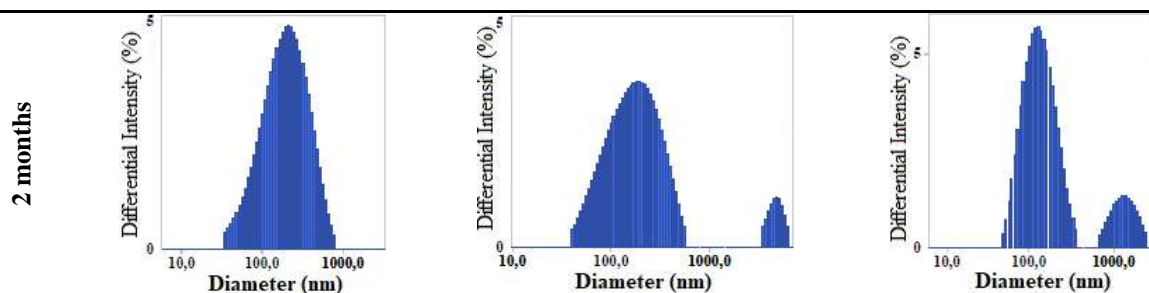


Figure 17. DLS size distribution of the PPN compound aggregates, obtained for the water solutions of different concentration, when recorded at different moments.

Preliminary data of the cytotoxicity tests were conducted on normal fibroblasts (NHDF) and HeLa cells. As can be seen in Figure 18, the PEGylated compounds showed a concentration dependent cytotoxicity against the HeLa cells for concentration at which the normal fibroblasts have an excellent biocompatibility.

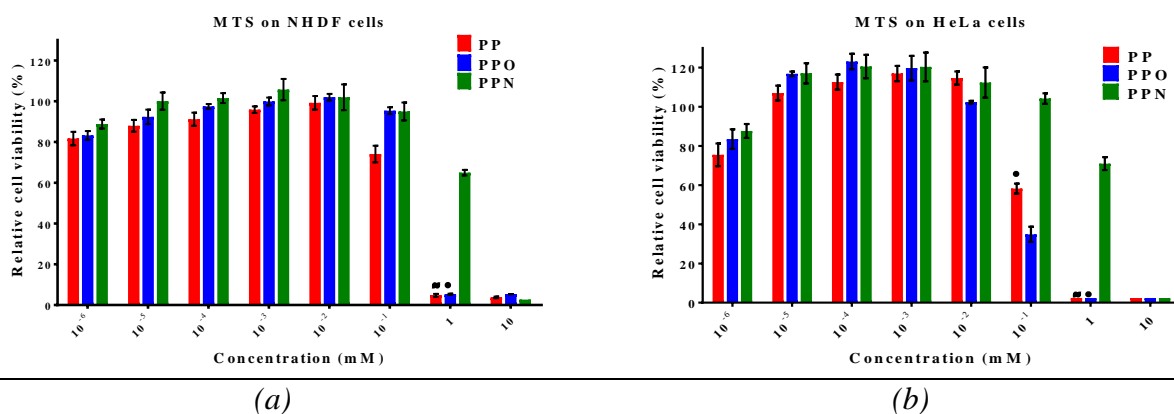


Figure 18. Cell viability on (a) normal human dermal fibroblasts (NHDF), and (b) human cervical cancer cells (HeLa). Values are expressed as mean cell viability \pm SEM, $n=5$. Reduction of cell viability by more than 30 % is considered a cytotoxic effect. • $P<0.05$ for PPO vs PPN, $\approx P<0.05$ for PP vs PPN by 2way ANOVA using Tukey's multiple comparisons test.

A.3.1.2. Nanoplatfoms based on precisely synthesized polymers

Two classes of synthetic polymers were investigated, which differ from each other by the degree of rigor of their chemical structure: (i) conjugated conducting polymers produced starting from rigorously purified macromonomers (which have a good to very good structural and conformational rigor), and (ii) mesoporous silica functionalized with thiol groups (-SH) (which can be functionalized with a controlled density on the surface of the nanoparticles). The first mentioned class is also able to improve cell viability, as we demonstrated.

A.3.1.2.1. Electroresponsive hybrid poly(3,4-ethylenedioxythiophene) derivatives

In this study, a conjugated graft copolymer is used as a molecular composite to coat previously functionalized and electroactivated isotactic polypropylene (i-PP, a synthetic polymer that is typically used for fabrication of implants) intended for biomedical applications. Our idea was to optimize the properties of a new material used at the abiotic/biotic interface and, by addressing the chemical design toward side chain functionalization of a CP with PCL polar side chains (biocompatible, with high ionic conductivity, ion-solvating capability and a broad electrochemical stability window), we succeeded in significantly improving the ion transport and

ion-to-electron transduction with an ion-rich, living, water laden, dynamic biological environment.

Synthesis and characterization of the EDOT-PCL macromonomer as the key element of the hybrid nanoplatform

Poly- ϵ -caprolactones (PCLs) belong to the first generation of synthetic aliphatic polyesters, the biodegradability of which motivated their extensive exploration, particularly as resorbable materials⁹. In spite that PCL fell out of fashion for a while¹⁰, there has been a noticeable renewed interest in ϵ -caprolactone derived components for copolymer systems with advanced functions in the last decade¹¹, the innovative uses of ϵ -caprolactone-based segments in sophisticated polymer architectures such as multiblock copolymer networks, and micellar systems being whorthnoticed.

Particularly, the use of oligo- ϵ -caprolactone (OCL) with a molecular weight of less than 3000 Da, (which undergoes phagocytosis by phagosomes of macrophage and giant cells, followed by intracellular degradation by esterases), in various combinations can give useful biomaterials that solve the slow degradation problems of PCL¹². Starting from this assumptions and based on our previous experience regarding electroactive macromonomers we engineered a new structure in the form of "hydrophobic amphiphile"¹³ based on 3,4 - ethylenedioxythiophene (EDOT)¹⁴. EDOT-PCL macromonomer, one of the few reported to date, was obtained by ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone (ϵ -CL) using hydroxymethyl EDOT (HMeEDOT) as an initiator and stannous octanoate, Sn(Oct)₂, as a catalyst (see Figure 19).

Figure 20 shows the NMR spectra of the new synthesized macromonomer EDOT-PCL, both of them confirming the expected structure. In the mentioned figures are also given the macromonomer structural formula and the peaks assignments, respectively. It is worth of nothing that the protons as well as the carbon atoms in the thiophene ring are clearly discernible at 6.37 ppm in ¹H-NMR spectrum and at 99.99 ppm and 141 ppm in ¹³C-NMR spectrum, respectively. For PCL oligomer structural units, the protons associated to the four carbon atoms placed in the proximity of carbonyl group (**f**, **g**, **h** and **i**), appeared in the range 1.36-2.42 ppm while the peak assignable to the two protons of aliphatic CH₂ nearest to the oxygen atom (type **j**) appeared, as expected, at 4.05-4.1 ppm. It is also worthy to mention that the peaks assignable to both the protons of CH₂ group in the vicinity of the hydroxyl chain end (protons **k** at 3.66-3.69 ppm) as well as the carbon atoms of the PCL final structural unit (**i**, **j**, **k**, **p** in the range 24 ppm-34 ppm and **r** at 66.3-66.6 ppm) appeared separately from those of the other structural units. For h carbon atom of carbonyl group in ester functionality of PCL, a peak centred at 173.46 ppm is discernible, as well. The information given by the 1H-NMR spectrum in Figure 20 allowed to evaluate the polymerization degree of the PCL as well as to calculate the EDOT-PCL macromonomer molecular weight. So, by comparing the integrals value of protons of type **c**, **d** and **e** (originating from HMeEDOT initiator) (or that of protons of type **k** belonging to the final structural unit of the new formed PCL chain) with the value of integral for the (2n-2) protons of type **j** from the other (n-1) structural units of PCL, the polymerization degree of n=16.5 was obtained and a value of EDOT-PCL. According ¹H-NMR method, the number average molecular weight, M_n, of EDOT-PCL is of 2055 Da.

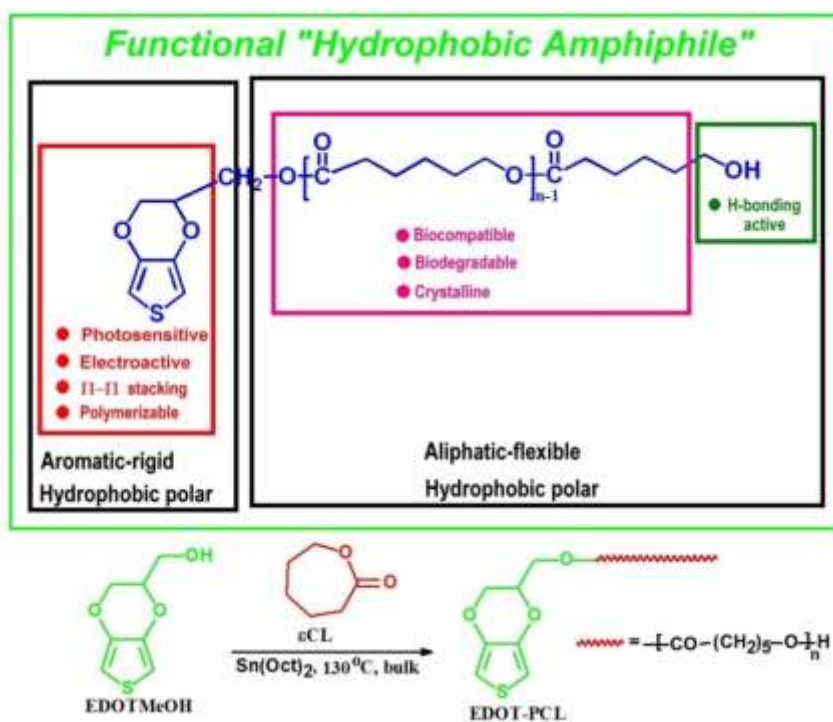


Figure 19. The functional characteristics of EDOT-PCL macromonomer and the pathway for its synthesis.

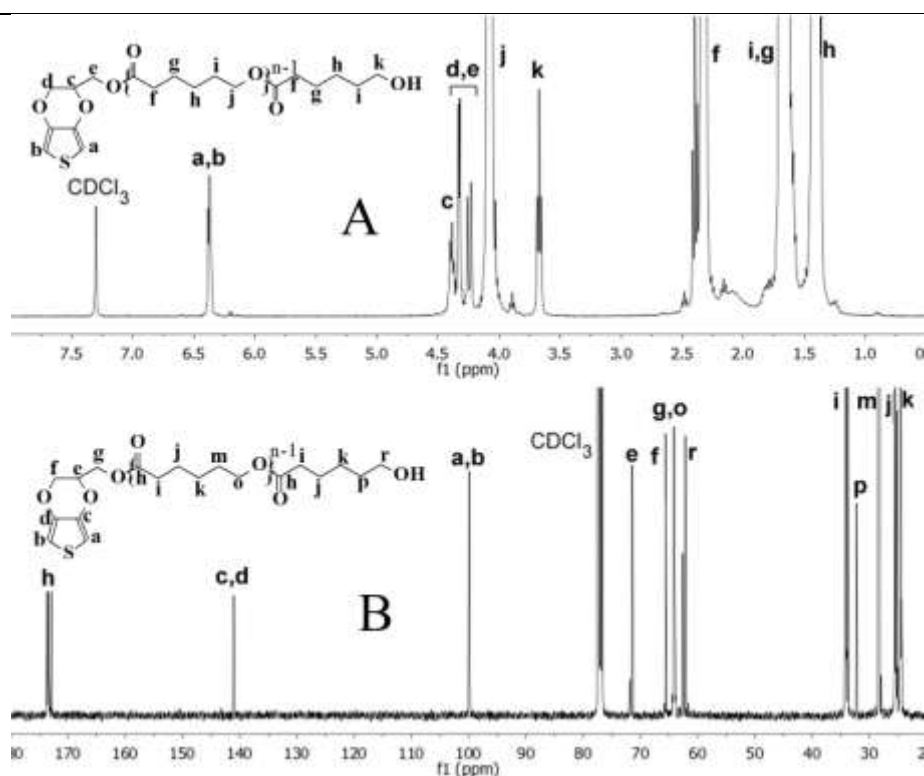


Figure 20. The ^1H -NMR spectrum (A) and ^{13}C -NMR spectrum of EDOT-PCL in deuterated chloroform.

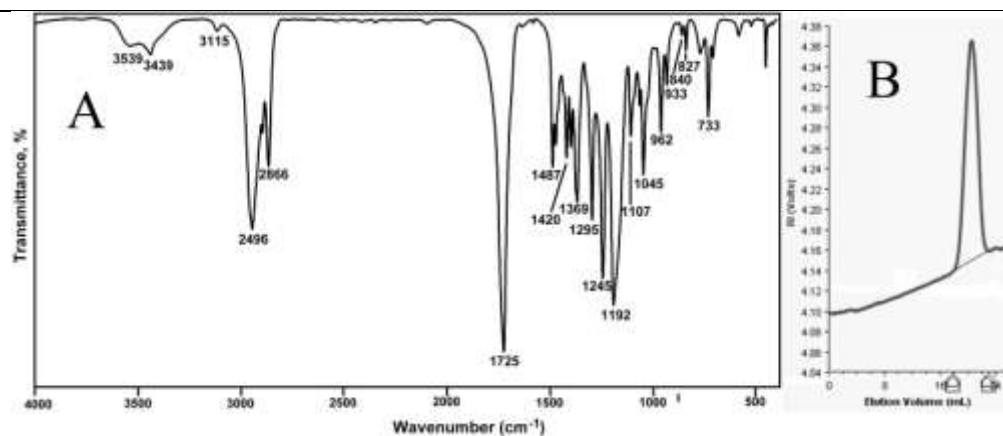


Figure 21. The FT-IR spectrum (a), and GPC trace of EDOT-PCL

The apparent molecular weight of the EDOT-PCL macromonomer was also evaluated by GPC measurements (Figure 21.B), using chloroform as eluent. Measurements led to M_n values of 3598 Da and polydispersity index of 1.49. The discrepancy between the values obtained by the two methods can be attributed to the significant difference between the hydrodynamic volume of linear PS standard used for the GPC columns calibration and those of PCL-ended by an aromatic moiety. The FTIR spectrum of EDOT-PCL is included in Figure 21.A. In this spectrum, characteristic bands associated with constitutive elements of the macromonomer, namely thiophene ring (Th) and ethylenedioxy ring in EDOT moiety, as well as bands and crystallization-sensitive bands of PCL oligomeric chains are all present. The thermal behaviour of EDOT-PCL, was investigated by DSC measurements, before its initial degradation temperature, in the range $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. In the first heating scan, the solution-crystallized compound is cycled, while in the second one the melt-crystallized macromonomer. In comparison with other PCL-containing electroactive macromonomers reported before, EDOT-PCL is characterized by nonsymmetrical endothermic peaks in both heating cycles performed at $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, in addition to the main endothermic peak also a shoulder being appeared. When comparing the peaks position, in the second scan they appeared at slightly lower temperature than that of the first scan, most probable because the cooling cycle at $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was fast for the polymer chains to move and align during melt crystallization. The conclusion that EDOT moiety, with its particular geometry, influence the PCL crystallization, can be a rational conclusion as long as the endothermic peaks are similar in shape for both the melting of the solution- and of the melt-crystallized compound, respectively; so, morphological changes are not dependent neither of the crystallization method nor the thermal history. In other cases, the presence of the double-melting behaviour was interpreted as a consequence of melting of two crystals populations differing in both size and thickness. The melting peaks at higher temperature were attributed to thicker, less imperfect crystals, while that at lower temperature belongs to thinner, more imperfect crystals. The only difference that can be noticed in the calorimetric plot in Figure 45.a is that in case of solution-crystallized EDOT-PCL the sharp, more pronounced peak is that at the higher temperature, while in the second scan, for melt-crystallized EDOT-PCL, the highest peak is that at the lower temperature. That means that during solution-crystallization, due to the PCL chains higher movement freedom, the formed crystals are thicker compared to the thinnest ones formed from melt where the PCL chains have reduced mobility.

A.3.1.2.2. Silica-functionalized derivatives

Five silica materials have been synthesized in this step: a mesoporous silica with ca. 20% CH₃ groups (MD1, A_{BET} = 943.8 m²/g), a silica with ca. 10% mercaptopropyl groups (Sil2, A_{BET} = 589.6 m²/g), a mesoporous silica derived from this one (MSil2, A_{BET} = 1319 m²/g) – according to literature¹⁵, and two silicas carrying glucoside-modified functional groups, one of them without mesopores (Sil84) and a mesoporous one (MSil84). The chemical structures of the silicas are presented in Figure 22.

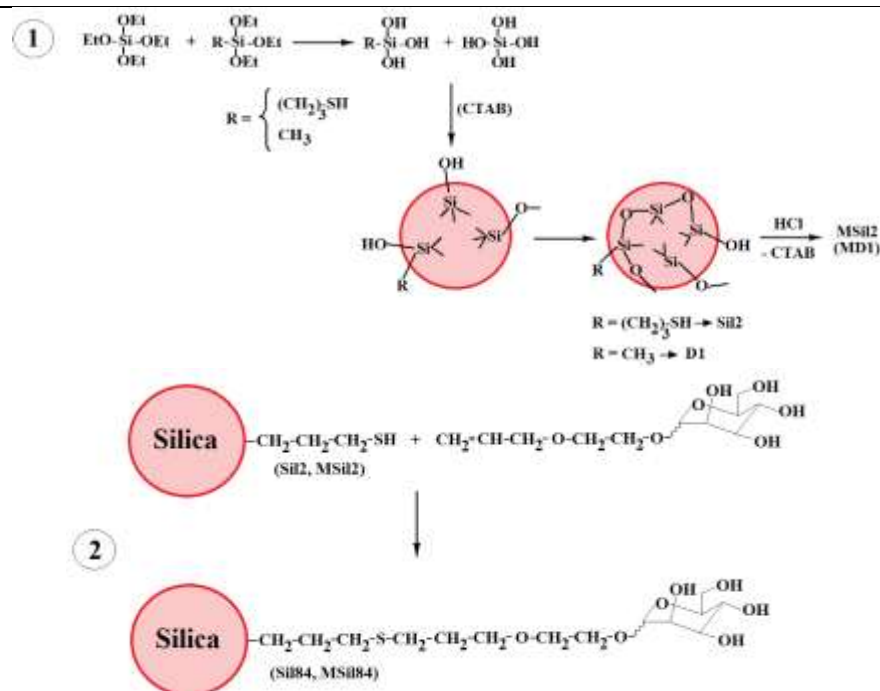


Figure 22. Synthesis of the silica materials.

The chemical modification of SH groups with allyloxyethylene-glucopyranoside has been performed by thiol-ene addition, combined with ultrasound treatment, in water, in the presence of 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone as photoinitiator. The modified silica was separated and repeatedly washed with water to remove the un-reacted glucose derivative. It is known that post-synthesis grafting methods result in inhomogeneous coverage of the surface, because the organic molecules congregate near the entries to the mesoporous channels and on the exterior surfaces. However, even incomplete chemical transformation in this case would modify the hydrophilicity of the silica, while the glucose moieties might have an important role in biological environment, possibly easing the docking of the doxorubicin conjugate to the cancer cells, based on their increased affinity for glucose¹⁶, or contributing to pH modification in solid tumors¹⁷.

In the FT-IR spectrum of the initial silica, the absorption bands characteristic to SH groups which appear at 2600-2540 cm⁻¹ were very weak and could not be used as reference for the chemical modification. The wide band at 688 cm⁻¹ assigned to C-S stretching vibrations in mercaptans diminished in the spectrum of glucose-modified silica (Figure 23), and new bands appeared at 661 cm⁻¹ and 715 cm⁻¹ assigned to C-S-C stretching vibrations. Other bands –besides those of OH and C-O stretching, which overlap with major silica bands- are characteristic for the glucose derivative (870, 760, 1724, 1692 cm⁻¹) and confirmed the presence of the functional groups.

The Raman spectra were registered at different wavelengths for the silicas with mercaptopropyl or glucose functional groups (633 nm and 785 nm, respectively). In the Raman spectra of MSil2 and MSil84, the SH band was visible at 2576 cm^{-1} and disappeared in MSil84 and MSil84 (Figure 24). A strong band at 507 cm^{-1} was noticed in MSil2 spectrum, which could be due to labile disulfide S-S bridges¹⁸. The newly formed thioether bonds were evidenced by the apparition of some bands in the range ~ 600 -700 cm^{-1} (C-S in aliphatic sulfides) and at 1213 cm^{-1} (CH_2 -S wag). The strong band at ~ 1000 cm^{-1} is due to the C-O bonds in the glucoside moiety.

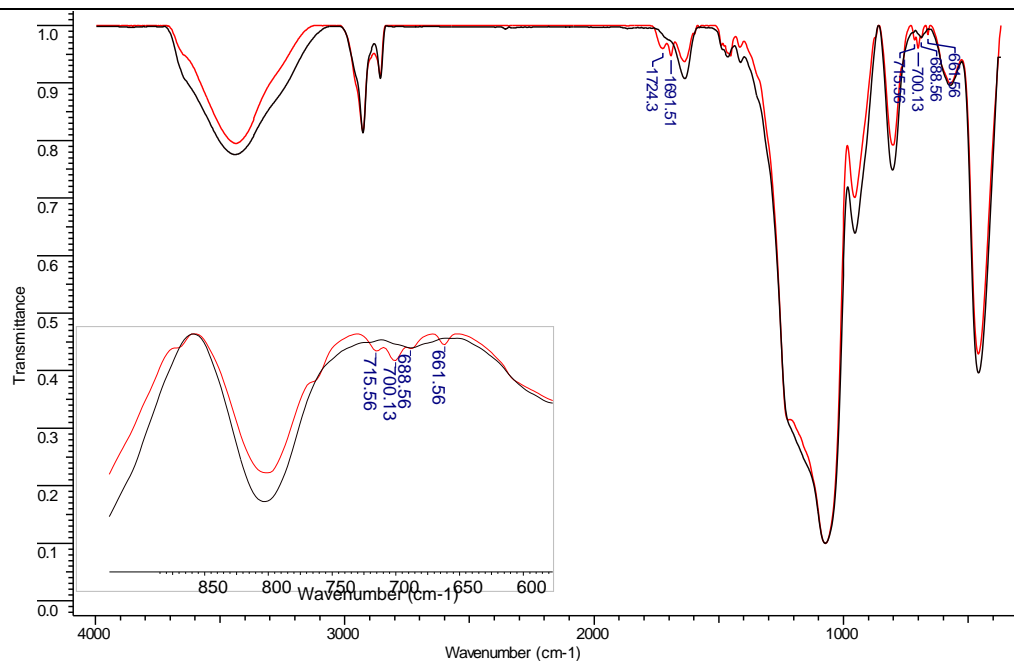


Figure 23. The FT-IR spectra of mesoporous silica MSil2 (black line) and the glucose-modified silica MSil84 (red line): the new bands due to glucose derivative and thioether are marked.

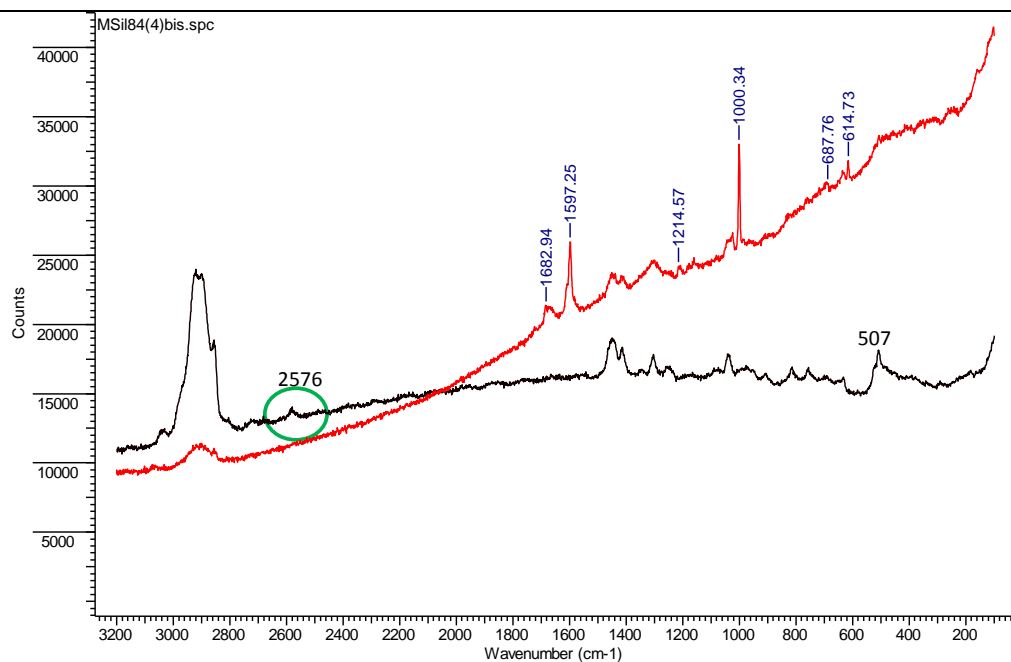


Figure 24. Raman spectra of the mesoporous silica bearing SH groups (MSil2, black line) and the one reacted with allyl-glucoside (MSil84, red line).

After chemical modification with the glucose derivative, the silicas became more hydrophilic, as expected. In Figure 25, a significant difference of the wetting behavior can be noticed between the two chemical types just after immersion in doxorubicin solution. A better wetting is also observed for the mesoporous silicas, compared with their non-mesoporous counterparts, in both series.



Figure 25. Aspect of the SH and glucose-modified silica powders at contact with an aqueous solution of doxorubicin hydrochloride.

A.3.1.3. Nanoplatfoms based on gelling systems

We have investigated the single-walled carbon nanotubes – G-quadruplex hydrogel nanocomposite matrices dedicated to two different applications: (i) as a gelling system able to sustain nanoscale processes, and (ii) for cell support applications. According our protocol, single-walled carbon nanotubes (SWNTs) are brought into stable aqueous dispersion which permits its successful introduction into the guanosine diboronic hydrogels (GDH). The preparation of the GDH/SWNT nanocomposites is depicted in Figure 26. The SWNTs strong impact on the overall GDH properties, including water retention ability and cytotoxicity compared to the original GDH hydrogel were investigated and described. Moreover, the introduction of SWNTs, which is useful for the formation and stabilization of 3D supramolecular hybrid hydrogels, led to the possibility of using GDH/SWNT nanocomposites as an improved cell growing support.

GDH-SWNT composite hydrogels were prepared utilizing the following synthetic protocol¹⁹. In a vial, an amount of 0.2 g (1 eq) of guanosine was mixed with 0.0584 g (0.5 eq) of 1,4-benzene diboronic acid. Distilled water (7.6 mL) and 400 μ L containing 0.0296 g LiOH, (1 eq, stock solution: 0.148 g in 2 mL distilled water) were added and the mixture was sonicated for several minutes until all components were fully dispersed. The suspension was then heated to 120 °C until the solution becomes transparent. After cooling to room temperature, 4 mg of SWNTs were added and the resulted solution was further sonicated to homogenously disperse the carbon nanotubes, yielding a stable black suspension. This suspension was preserved and used as SWNT stock solution (SWNT-Li stock) in further experiments. Separately, in a glass vial, 0.05 g, 0.2 mmol (1 eq) of guanosine was mixed with 0.0146 g, 0.1 mmol (0.5 eq) of benzene-1,4-diboronic acid. Distilled water (1.9 mL) was added, and the mixture was sonicated for a few minutes until all the components were dispersed. The suspension was then heated to 120 °C until the solution becomes transparent. Next, 100 μ L, 0.01 g, KOH (1 eq, stock solution of KOH: 0.66 g in 6.6 mL distilled water) was added and the mixture heated and stirred for a few more minutes, followed by the addition of the SWNT-Li stock solution (200 μ L, 600 μ L, 1000

μL , 1400 μL , 2000 μL , containing correspondingly 0.1 mg, 0.3 mg, 0.5 mg, 0.7 mg or 1 mg SWNT). The obtained composites were cooled down to room temperature and sonicated for 30 min to give light brown to dark black hydrogel nanocomposites.

The successful incorporation of SWNTs inside the hydrogel matrix was investigated by SEM, powder XRD (Figure 27.a), and Raman techniques (Figure 27.b), while the hydrogels mechanical properties were in detail investigated and compared by rheological studies (Figure 28). For each of the obtained GDH-SWNT sample, a water retention experiment was performed. Each sample was brought to the maximum water retention by the consecutive addition of water to the initial sample volume (2 mL), followed by vigorous mixing, incubation at room temperature (2 h) and check for self-sustainability by inverting the sample vial. Figure 29 presents the results of water retention experiments.

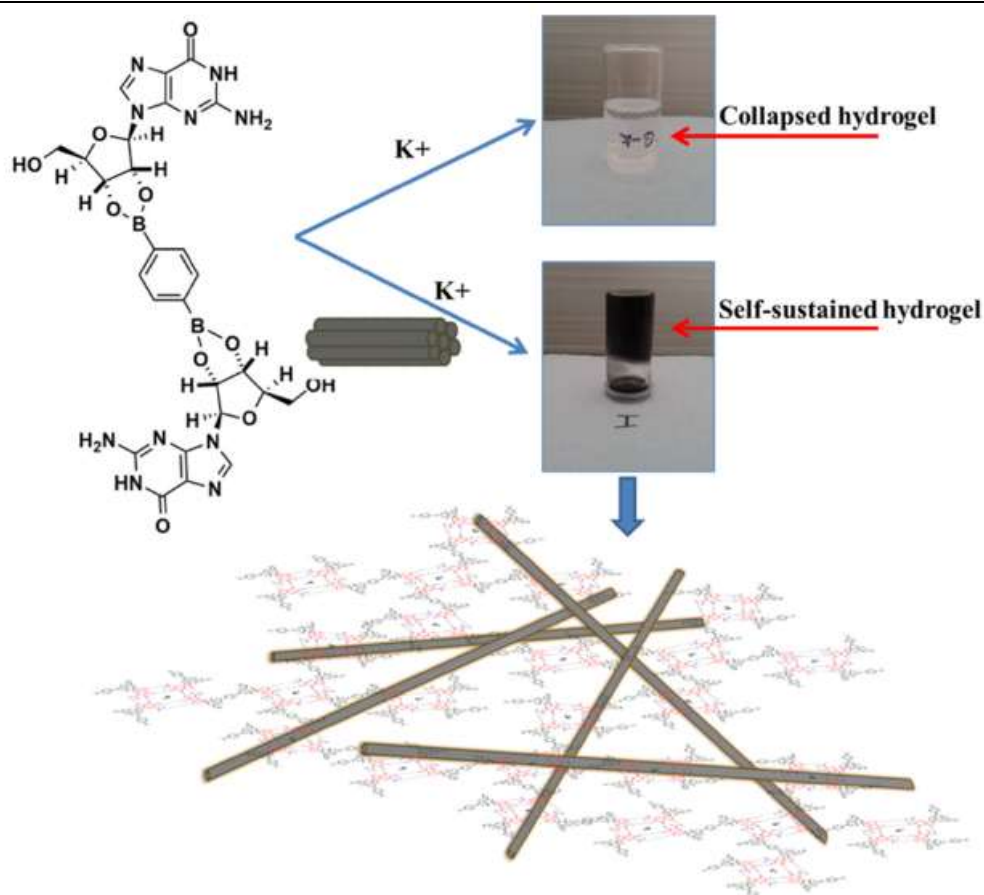


Figure 26. Schematic representation of SWNTs dispersion by hydrogel matrix leading to new composite hydrogels with increased water retention ability.

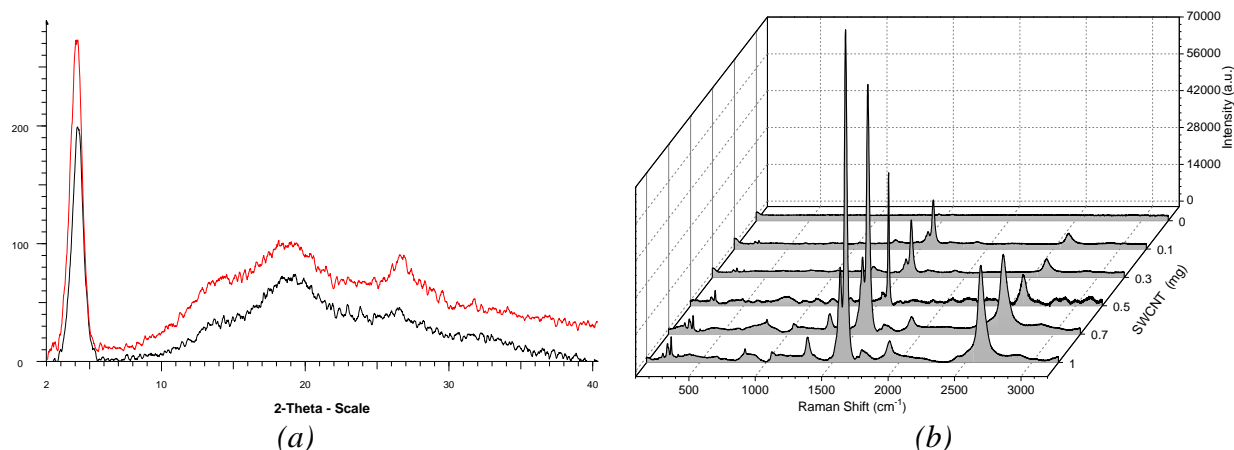


Figure 27. (a) X-ray diffraction patterns of freeze-dried hydrogel (black) and hydrogel-SWNT composite (red) with 1 mg content of SWNTs. (b) Raman spectra of hydrogel and hydrogel-SWNTs containing 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 mg SWNTs.

The favorable cytotoxicity results for all the investigated nanocomposites and the characterization results showing an increase in the pore size after the addition of SWNTs to the GDH, made them ideal materials for cell support applications. NHDF cells have been effectively seeded and then imaged by means of two separate techniques (commercial live-dead assay and the indoliziny-pyridinium salt/ β -cyclodextrin inclusion complex assay developed in our group), showing successful attachment and cell viability in time confirmed by both utilized assays (Figure 30).

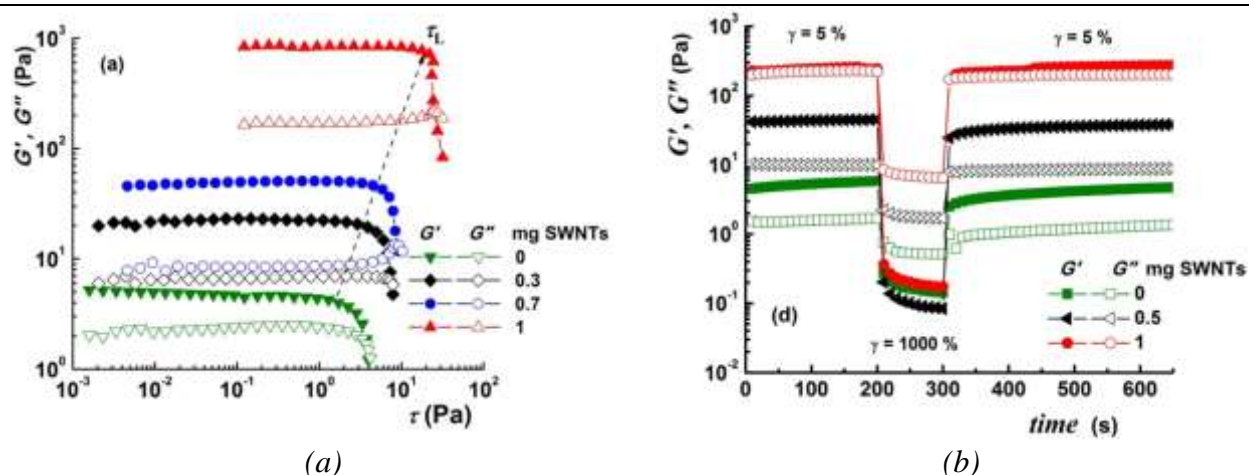


Figure 28. Results of rheological investigation performed on the GDH-SWNTs composites. (a) variation of G' as a function of shear stress at 10 rad/s. (b) G' and G'' values in continuous step strain (5% - 1000% - 5%) measurements at 5 rad/s .

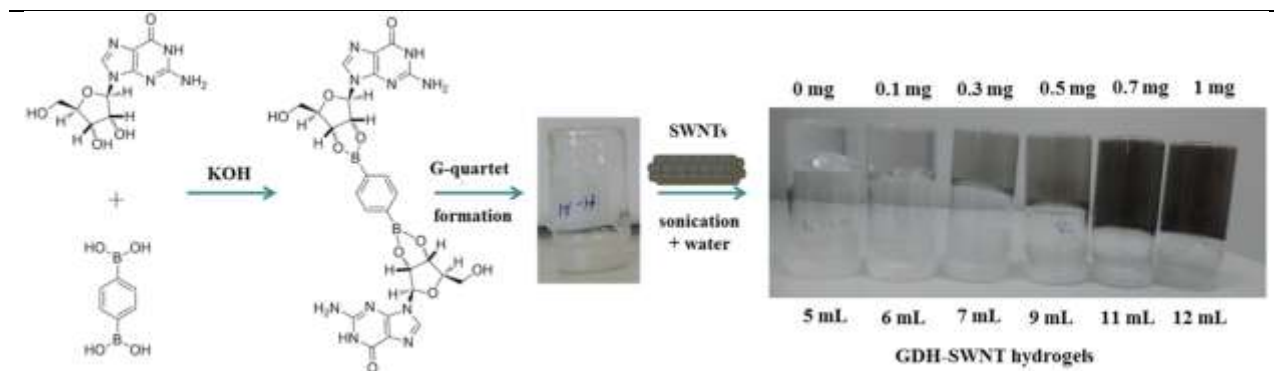


Figure 29. Water retention ability of GDH and GDH-SWNT hydrogels.

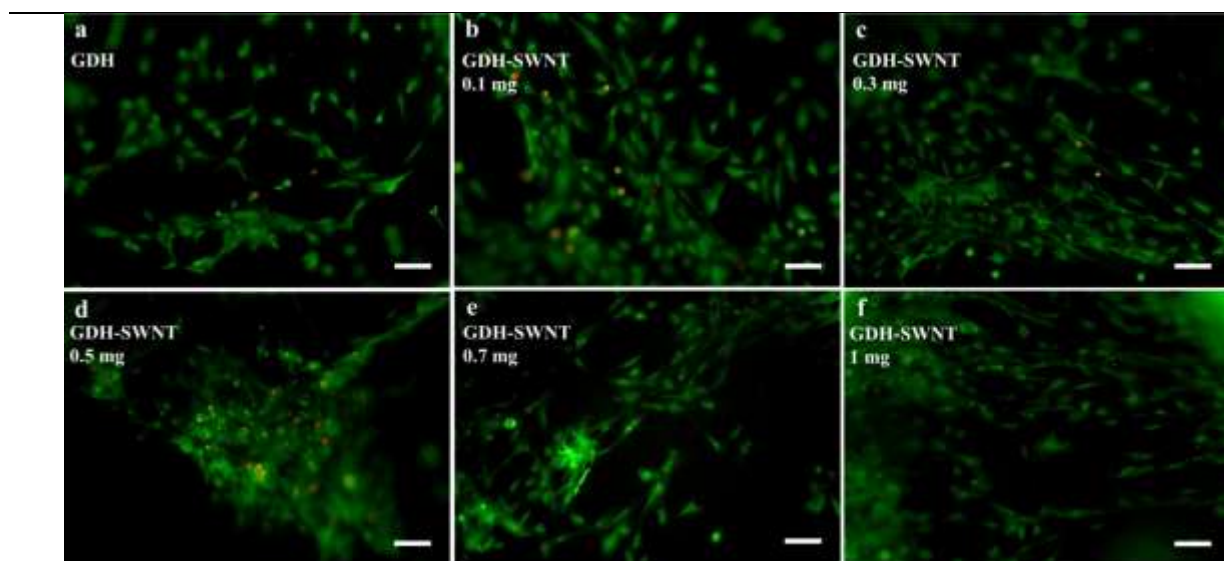


Figure 30. Fluorescence microscopy images of NHDF cells incubated for 24 hours and stained using live/dead assay on (a) hydrogel, (b-f) hydrogel-SWNTs at different SWNTs amounts at maximum water retention capacity; scale bar – 100 μm .

A.3.1.4. *In silico* approaches for designing and refining techniques for obtaining nanoplatform components

Computational chemistry strongly supports the design, characterization, and functionality validation of all types of (macro)molecular compounds. This is why, 5D-nanoP project makes massive use of computational chemistry techniques, both for guiding the experiments and for nuanced interpretation of experimental results.

As a Project Director, Professor Aatto Laaksonen has initiated meticulous investigations on interfacing the experiments needs with the power of chemical modeling, in order to save time during the design stages of (bio)(macro)molecular entities as parts of nanoplatforms having special functionalities. He also conducted mutual training meetings (including with didactical value) between the experimenters and the team of computational chemistry, aiming to rapid advance through the critical topics of nanoplatforms functionality ensuring and assesment.

A.3.1.4.1. Refinements of PEG derivatives applicable for nanoplatforms building

Several experimental studies have shown that the length of the macromolecular PEG chain in the structure of a non-viral vector influences the packaging efficiency of DNA or RNA. However, no systematic studies are known on the influence of PEG molecular weight in the structure of the non-viral vector on the packaging efficiency of genetic material on the one hand and on the other hand on the efficiency of the polyplex formed in transfection. These studies are missing because obtaining structural data by experimental methods is very difficult. Thus, the use of computational chemistry methods to simulate *in silico* self-assembled polyplex systems is an ideal strategy to obtain the molecular information necessary to understand the self-assembly mechanisms.

Our study describes a parallel procedure (i) for modeling and simulation, and (ii) for experimental synthesis and instrumental investigation, able to prove the effect of the molecular characteristics and the local amount of the stealth agent (in this case PEG) used for protecting the polycationic segment of vectors from their DNA binding and transport efficiency. The main goal was to identify *in silico* the mechanism by which the length of the PEG chain interacts with the branched PEI chains, preventing the formation of the polyplex, in the context of the best possible simulation of the experimental conditions.

A library of 3 compounds (vector 500, vector 1500 and vector 3000) was synthesized. In the first step (Figure 31), the aldehyde group of the α -carbonyl-squalene derivative was reacted with an amine group of α , ω -bis (2-aminoethyl) polyethylene glycol (PEG) of different molecular masses (500, 1500, 3000 Da), resulting in squalene-PEG reaction intermediates with different molecular weights of PEG and functionalized with terminal primary amine groups (Sq-PEG-NH₂). In the next reaction step, coupling of the Sq-PEG-NH₂ derivative with bPEI-0.8kDa was performed via 2,6-diformyl-4-methylphenol (FDA2) coupling agent. FDA2 is a difunctionalized reactive compound with aldehyde groups, which react quickly and mildly in reaction with the primary amino groups, resulting in dynamic imine bonds ($-\text{CH} = \text{N}-$) (Figure 31).

A.3.1.4.2. *In silico* simulation for obtaining mycelial structures of Sq-PEG-PEI vectors and their interaction with dsDNA

The structures of the non-viral vectors (Sq-PEG-PEI) shown in Figure 31 were simulated and coded according to the molecular mass of the PEG, as follows: VECTOR 500 (Sq-PEG-PEI where PEG is 500 Da), VECTOR 1500 (Sq-PEG-PEI where the molecular mass of PEG is 1500 Da) and VECTOR 3000 (Sq-PEG-PEI where the molecular mass of PEG is 3000 Da), and the corresponding number of repeated PEG units (n) is 11, 31, respectively 62. The starting structures and vector configurations were constructed using Avogadro software. Based on pK_a values, at pH = 7.4 the degree of protonation of PEI is 50% (10 amine groups out of a total of 20 are protonated), providing a net charge of +10. The simulated dsDNA fragment comprises 25 base pairs with the sequence 5-CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3 and was created using Ambertools software¹⁸. The total charge of the dsDNA molecule is -48 (number of phosphate groups). The parameterization of the vector was performed by applying the GAFF2 force field methodology. The partial atomic loads of the vector were calculated using the RESP methodology. The Amber FF14SB DNA.bsc1 force field was used in the parameterization of dsDNA, and the ionsjc_tip3p parameters were used to describe the ion.

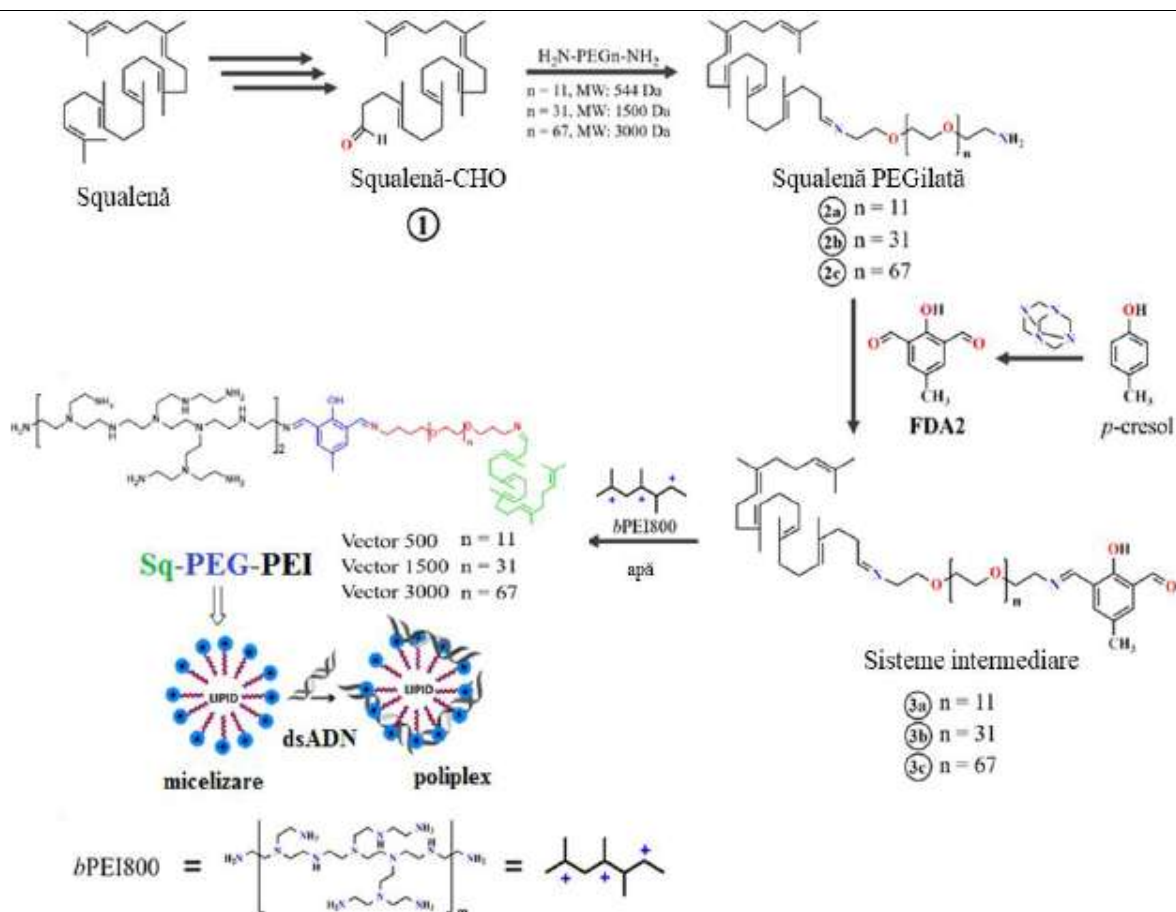


Figure 31. Process for obtaining the Sq-PEG-PEI conjugate. Squalene is displayed in green, while PEG with $n = 11, 31$ and 61 repeated units, are displayed in red. Dialdehyde was described in blue, while $0.8k$ Da branched PEI in black.

In order to better simulate the "real" conditions of vector complexation with dsDNA, a two-stage simulation protocol was implemented: "aggregation" followed by "complexation". vectors and DNA. The process of aggregation (mycelium) of the vectors in aqueous solution was followed (Figure 32).

The simulation results show that PEG chains interact with the protonated N atoms of PEI chains, forming hydrogen bonds. These interactions are so strong that, once formed, the collapsed structure remains stable throughout the simulation, and the number of hydrogen bonds is inversely proportional to the number of N-free atoms.

The results of the computational methods are consistent with the experimental data thus, the measured values of the Zeta potential of the vectors in solution (Table 4) indicate that the electrostatic charge of the surface decreases with increasing length of the PEG chain. This phenomenon is in good correlation with the observations obtained based on MD simulations and which show that in the case of VECTOR 1500 and VECTOR 3000 systems the PEG chain covers the PEI chains, protecting the nitrogen atoms in the PEI structure, while the VECTOR 500 system has the highest part of the PEI chains not protected by PEG and which are oriented towards the surface of the aggregate.

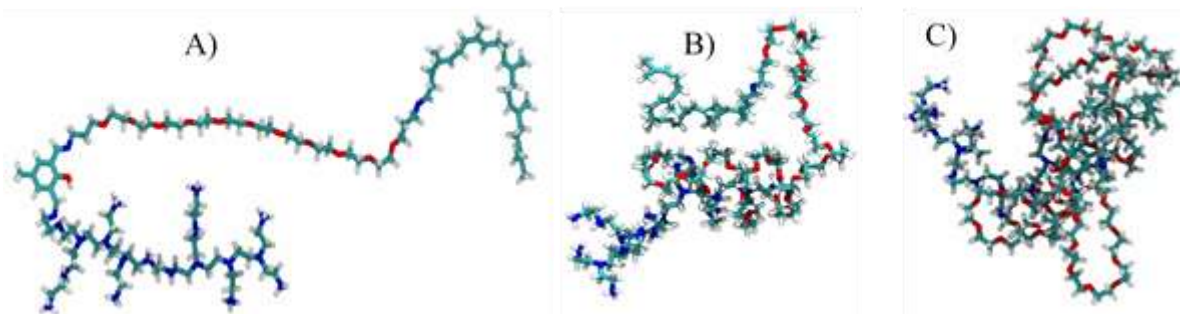


Figure 32. The starting conformations of the three vectors used for the aggregation simulations. (A) the extended conformation of VECTOR 500. (B) and (C) the pre-collapsed conformations of VECTOR 1500, respectively VECTOR 3000. The color coding of the polymer atoms is as follows: azure for C; red for O; blue for N; white for H.

Table 4. Experimental values of zeta-potential for each tested vector.

Vector coding	Measured zeta-potential (mV)	Average value (mV)	Standard deviation
Vector 500	14.49	14.07	± 0.3007
	13.82		
	13.89		
Vector 1500	6.1	6.67	± 0.5436
	6.5		
	7.4		
Vector 3000	4.32	5.17	± 0.611
	5.73		
	5.46		

To mimic the experiment, MD simulation involved generating balanced vector solutions to mycelium. This is of crucial importance for the next step, when the interaction of Sq-PEG-PEI vectors (with different molecular masses of PEG) with dsDNA takes place, to form polyplex-type supramolecular structures. MD simulations were performed on time scales of sufficient length to allow the identification of key mechanisms by which PEG chains interact with those of branched PEI and also to explain why the length of the PEG chain affects the self-assembly process between non-viral vector and dsDNA. It should be emphasized that the large size of the systems and the simulations carried out over long periods of time were of fundamental importance in explaining the mechanism of polyplex formation. Figures 33, 34, and 35 show representative snapshots of the initial and final configurations of each vector system and DNA, together with inserts detailing the interactions between PEI and DNA. In the experimental model as well as in the *in silico* one, short dsDNA was used, with 25 base-pairs with the 5'-CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3' sequence and the complementary 5'-TACGTTGAAGTTCGTTAAGGGCTTG-3' antisense sequence.

Based on the visual analysis of the VECTOR 500 trajectory (Figure 33), it is obvious that the branched PEI strongly interacts with the dsDNA. The micelles "stick" to the DNA, when the PEI strands interact with both the major and minor grooves of DNA. In the case of VECTOR 1500, we observe almost the same interactions as in the case of VECTOR 500 (Figure 34).

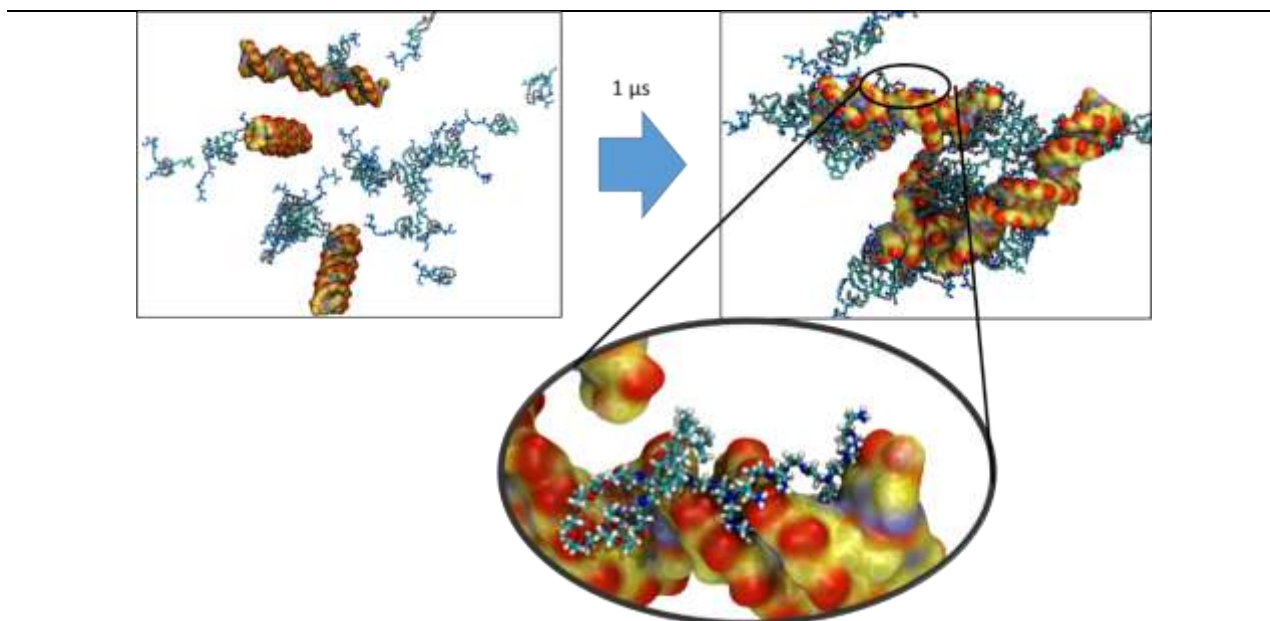


Figure 33. Interaction of VECTOR 500 with 25 bp dsDNA. The carbon atoms are colored in azure in the case of the vector, and in yellow for the DNA molecule. For all molecules, the nitrogen atoms are blue, the oxygen atoms are red, and the hydrogen atoms are white.

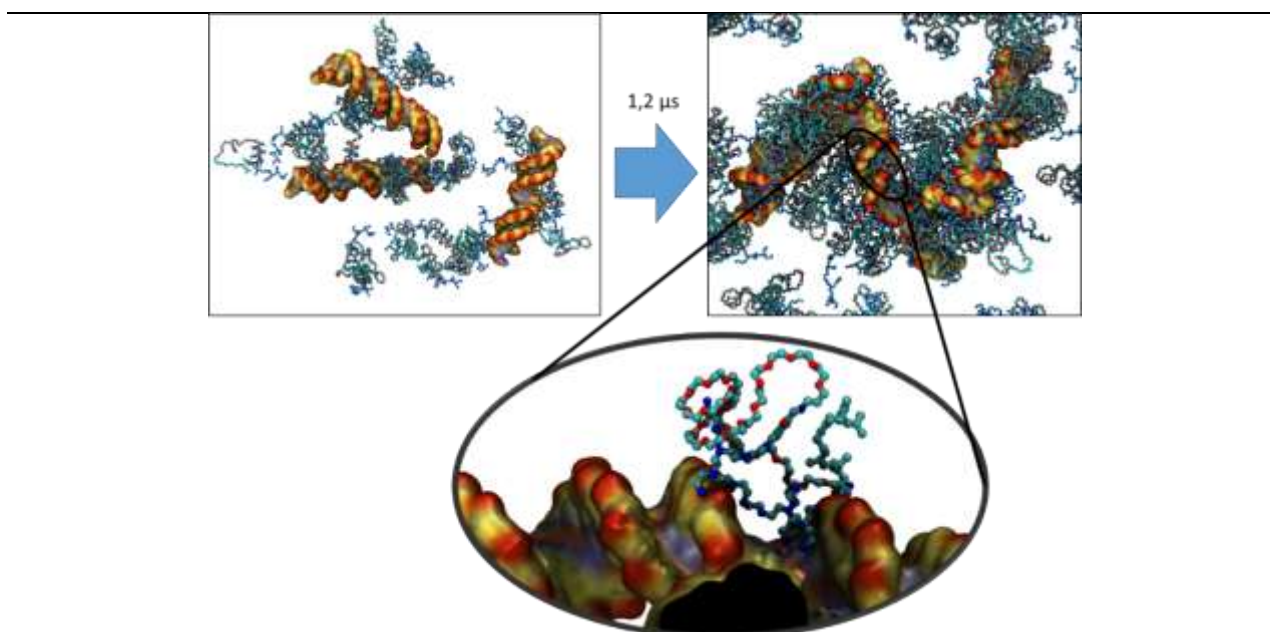


Figure 34. Interaction of VECTOR 15000 with dsDNA. (The same color coding was used.)

In contrast, the visual analysis for the VECTOR 3000 system (Figure 35) shows that the number of interactions between PEI and dsDNA strands is lower compared to other vectors, which is argued by the fact that the length of the PEG chain being large led to a drastic decrease in the amount of PEG. PEI free and capable of interacting with dsDNA chains. It should be noted that the preformed micelles of all three vectors are able to interact with the three dsDNA molecules initially added to the simulation cell, and the complexation process is mediated by the number of free nitrogen atoms uncomplicated by PEG chains.

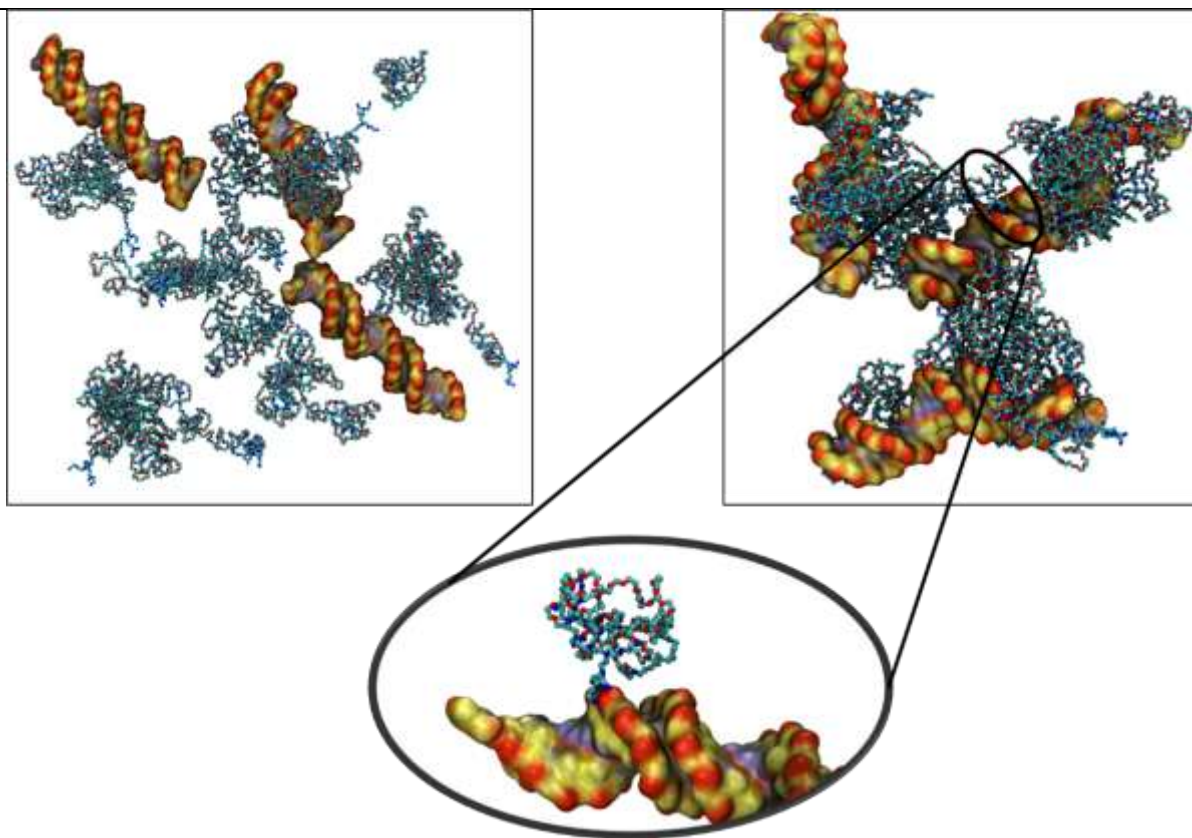


Figure 35. VECTOR 3000 that interacts with DNA. (The same color coding was used.)

Experimentally, the interaction of synthesized vectors with dsDNA was investigated by agarose gel electrophoresis. This method highlighted the self-assembly properties between Sq-PEG-PEI and dsDNA vectors as a function of PEG chain length, which was observed simultaneously in the simulations performed. The electrophoretic trend observed in Figure 36 indicates that as the molecular mass of the PEG chain in the vector structure increases, it leads to an increase in the N/P ratio required to bind completely the same amount of dsDNA. This observation is consistent with zeta-potential measurements as well as MD simulations, and also confirms that as the number of unprotected positive charges on the surface of the vector aggregate increases it leads to the formation of polyplexes in the presence of dsDNA at N / P ratios. lower (1.5 for PEG 500; 2.5 for PEG 1500; 3.0 for PEG 3000).

The results of the simulations we performed are confirmed and validated by the excellent agreement with the results of the laboratory experiments. The atomistic details and interactions we observed in MD explain very well the differences in the behavior of vectors. Indeed, the higher surface area charge VECTOR 500 compared to VECTORS 1500 and 3000, as revealed by the zeta-potential data in Table 4, can be explained by locating the PEG chain in aggregates, observed in MD simulations. In the case of VECTOR 500, the PEG forms an intermediate layer between the squalene core and the PEI, placed on the outside of the assembly. For the other two vectors, the larger PEG chain is able to wrap around a larger portion of PEI, thus generating a mixed outer layer, which includes both PEG and PEI, virtually reducing the load on the aggregate surface. Such an effect is predominant in the case of VECTOR 3000.

The simulation of the studied polyplexes allows us to explain the results of agarose gel electrophoresis analyzes, which indicate that the length of the PEG fragment plays a crucial role in the ability of systems to bind dsDNA. In fact, experiments show that when a shorter PEG

segment is involved, dsDNA binding occurs at very low N/P ratios. According to our simulations, VECTOR 500 is able to interact more strongly with DNA compared to larger vectors, mainly due to the presence of PEI in the outer layer in larger quantities. This allows it to form more hydrogen bonds with dsDNA and therefore bind it at a very low N/P ratio. For larger vectors, full binding occurs at a higher N/P ratio, which is well explained by simulations and indicates how PEG protects loads on the PEI chain, also acting as a physical distance barrier between PEI and DNA.

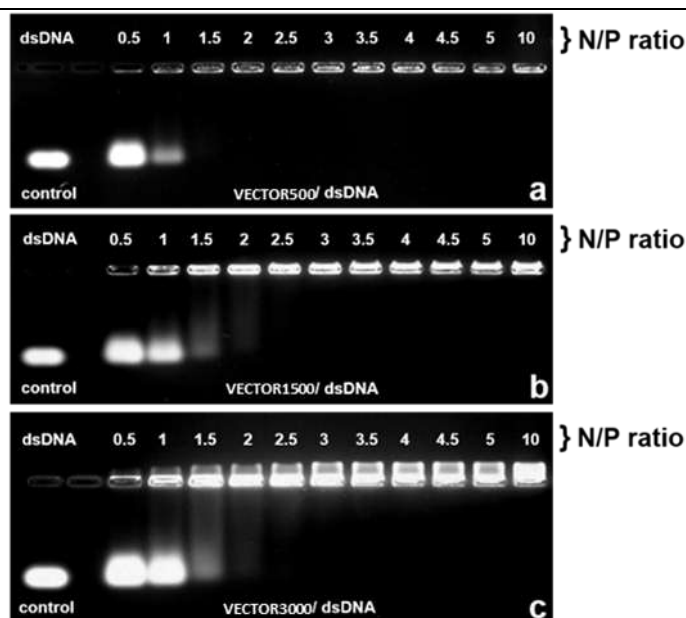


Figure 36. Electrophoretic mobility of polyplexes formed by complexing dsDNA with VECTOR 500, 1500 and 3000, at different N/P ratios.

Understanding the shielding phenomenon is important for the rational design of vector systems for the packaging and transport of nucleic acids, which requires an adequate balance between the reasonable N/P ratio and water solubility. Indeed, a longer PEG chain improves water solubility, but also leads to an increase in N/P ratio, which in turn leads to increased vector toxicity.

Our study highlights that in the case of complex vectors, which include multiple and chemically distinct component blocks, the process of polypeptide formation cannot be studied by separately modeling the interactions between components due to the inherent interactions between all component blocks, ultimately determining the particular binding mechanism.

A.3.1.4.3. Molecular docking for assessing the interaction between PEI and AO7 anionic dye

The removal of ionic species from waters by ultrafiltration can be enhanced by the addition of water-soluble binding polymers. This process is known in literature as the polymer assisted ultrafiltration (PAUF). One of the main steps of this process is the complexation between ionic species (ions or dissolved organic molecules) and the binding polymer. In this respect, herein we studied the interaction between AO7 tautomers (ligands – ionic species) and PEI (receptor – binding polymer) by computer-aided molecular docking. The ligands (AO7 tautomers) were considered in their anionic form, each one carrying a charge of -1. The structure of PEI macromolecule (oligomer) was built and optimized at the level of molecular mechanics using the YASARA force-field. Note that, we modeled a branched-PEI oligomer containing

eight amine groups in the backbone and four amine groups in the attached segments. As such, the modeled branched PEI comprised five primary amine groups ($-NH_2$), three secondary amine groups ($=NH$) and four tertiary amine groups ($=N-$). This PEI oligomer carried a total charge of +12 in the fully protonated state.

Hence, the binding modes of AO7 tautomers to PEI oligomer were computed by molecular docking simulations. To this end, the receptor (PEI) was held as a rigid body. In turn, the geometries of ligands were treated as flexible structures. The number of docking trials was set to 100 poses that were next subjected to clustering analysis. Ultimately, the ligand-receptor complex with the lowest dissociation constant (K_d) was selected as the most probable binding mode for each ligand (AO7 tautomer). Note that, the smaller is the dissociation constant (K_d), the better is the ligand-receptor interaction. Computational results of docking are illustrated in Fig.1. As one can see, the docked complexes (PEI@AO7) are stabilized by hydrophobic interactions (Figure 37). In case of AO7-hydrazone tautomer, the computations disclosed the formation of a hydrogen bond (H-bond) between an oxygen atom from the sulfonate group of AO7 and a secondary amine of PEI (Figure 37a). According to K_d values, it might be stated that AO7-hydrazone tautomer interacts quite stronger with PEI oligomer ($K_d=8.01$ mM, Figure 37a), if compared to AO7-azo form ($K_d=13.58$ mM, Figure 37b). The results regarding this topic were published in²⁰.

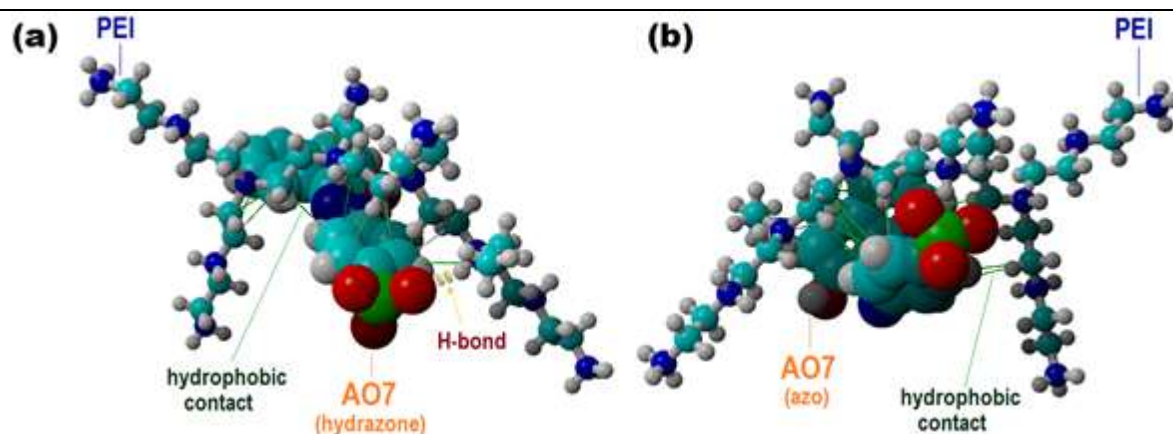


Figure 37. Molecular docking results showing the interaction between AO7 dye and branched PEI oligomer: (a) the best docked-pose with AO7 in hydrazone-form ($K_d = 8.01$ mM); (b) the best docked-pose with AO7 in azo-form ($K_d = 13.58$ mM).

A.3.1.4.4. Molecular docking to assess the interaction between oligosilane and pyrazoline-derivative

We have also studied the interaction between pyrazoline-derivative molecule (ligand - noted hereafter as L1) and a polysilane oligomer (receptor – noted hereafter as PS). The latter (receptor) represented a substituted polysilane with six silicon atoms on the chain, i.e. poly(methylhydrodiphenyl)silane. To perform molecular docking simulations, we employed the AutoDock Vina method integrated in the YASARA Structure software package.

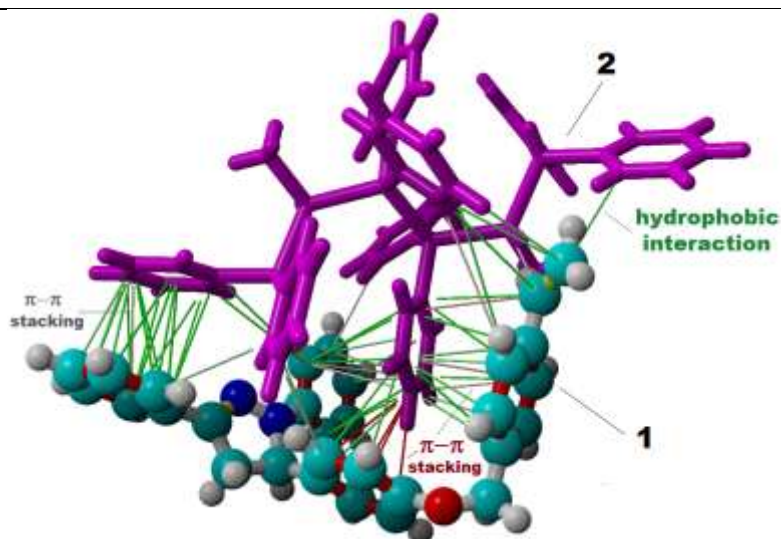


Figure 38. Best pose of docked complex showing the interaction between pyrazoline-derivative molecule (1) and polysilane oligomer (2); rendering solid green lines denote hydrophobic interactions, whereas gray and red lines denote the π - π stacking interactions; binding energy $E_b = -6.79$ kcal/mol; dissociation constant of the formed supramolecular complex $K_d = 10.558$ μ M.

The force field parameters of the polysilane were generated in YASARA by considering the polysilane chain in the frozen state, i.e. at the level of the previously developed DFT model (using the fixed atoms option, as suggested by YASARA developers). In fact, the empirical parameters for Si atom were taken over from carbon (which is isoelectronic with Si atom). In the course of molecular docking simulations, the receptor (polysilane) was treated as a rigid structure, whereas the ligand (L1) was treated as a flexible molecule. The calculations (by AutoDock VINA algorithm) were performed using a number of 25 docking runs. Each docked complex (PS@L1), resulted from simulation, was evaluated in terms of the binding energy (E_b , kcal/mol) and dissociation constant (K_d , μ M). Consequently, the best docked pose was selected based on the lowest values of E_b and K_d . Figure 38 shows the best pose of the docked supramolecular complex PS@L1; for this particular case, we found $E_b = -6.79$ kcal/mol and $K_d = 10.558$ μ M. Simulation outcomes revealed that the formed supra-molecular complex (PS@L1) was stabilized by the hydrophobic contacts and π - π stacking interactions (see Figure 38). The computational outcomes for this system were published in²¹.

A.3.1.4.5. Molecular modelling and simulation of sensing and actuating nano-scale systems

A novel compound was synthesized by linking two pyrene moieties to diaminodibenzo-18-crown-6-ether through $-\text{HC}=\text{N}-$ bonds, resulting in DPyDB-CH=N-18C6 product. The synthesis of novel compound was confirmed by FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, TGA, and DSC techniques. The quantitative $^{13}\text{C-NMR}$ analysis revealed the presence of the two position isomers. WAXD technique and MD simulations were used to evaluate the possibility of the supramolecular arrangement of DPyDB-CH=N-18C6. Both experimental and theoretical methods showed that the compound forms an aggregate with weak π - π interactions. The MD computational results indicated the existence of some structures as a slipped-parallel aggregate with non-covalent interaction distance between 3.28 and 3.45. QM results showed that these two isomers were almost energetically by energetic point of view. Through the QM calculations, it was observed that $-\text{C}-\text{HC}=\text{N}-\text{C}-$ dihedral angle, which links the pyrene units to the phenyl rings of the crown ether, was twisted around 40° . This situation explains the inability to align both pyrenes ring from the same DPyDB-CH=N-18C6 molecule with the pyrenes from another molecule, as observed from the MD simulation results. This incapacity is also governed by the presence of a C-H bonds and lone pairs of nitrogen from the $-\text{HC}=\text{N}-$ bond, inducing a

hindrance repulsion between individual molecules. Moreover, the DPyDB-C=N-18C6 compound was investigated from the point of view of its photophysical properties. In order to understand the electronic structure, the UV-vis and fluorescence experiments together with the theoretical studies (QM calculations) were performed in solvents with different polarities (n-hexane, toluene, 1,2-dichloroethane, and ethanol). From these data, we observed the presence of $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions, among which the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition due to π -extended conjugation is predominant. By contrast, through fluorescence analysis, a weak emission was observed and could be explained by photoinduced electron transfer (PET) and aggregation caused by quenching (ACQ) effects. The frontier molecular orbitals into the ground state demonstrated that the electronic density of DPyDB-C=N-18C6 was localized only on one pyrene-CH=N-phenyl sequence of the crown ether, leading to a perturbation of a well-ordered intermolecular π - π stacking.

Envisioning a chemo-sensor application for our novel compound, we performed a molecular dynamic simulation of ten DPyDB-C=N-18C6 molecules in a mixed ion solution to test the ion selectivity. The molecules were distributed randomly in an 8 x 8 x 8 nm box. Then, 10 of each Na^+ , K^+ and Ca^{2+} ions and 40 Cl^- ions were added, and the entire system was solvated with water. Two simulations of 40 ns each were performed, starting from two different randomly dispersed structures in order to investigate what ions interact with the DPyDB-C=N-18C6 and to eliminate any bias that may have been induced by the initial position of the simulated molecules. The MD simulation indicate that the DPyDB-C=N-18C6 molecules interacted only with K^+ ions, forming stable complexes. These simulations point towards a successful usage of the DPyDB-C=N-18C6 molecules as a selective chemo-sensor selective for K^+ ions. A representative graphical abstract of the present work was depicted in Figure 39²².

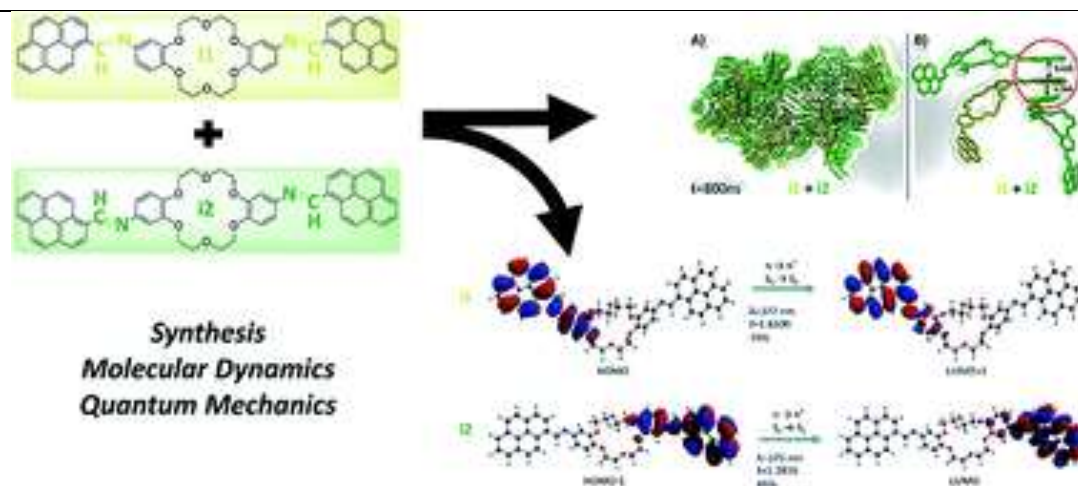


Figure 39. Graphical abstract of the simulation of the nano-scale assemblage of DPyDB-C=N-18C6 molecules.

A.3.1.4.6. Molecular modelling and simulation of a potential actuator component of nanoplatforms

The pyrene derivatives have interesting optical properties depicted by a strong absorption in UV-Vis range. The absorption and the fluorescence spectra are sensitive to solvent polarity, this fact suggests the use of this class of compounds as a test to determine environment behavior. Survey of literature indicates that the pyrene moiety presented a strong electron donor effect

which can be combined in several materials in order to design the electron donor-acceptor systems which can be used in energy conversion and light harvesting applications.

The presence of a double bond ($-\text{HC}=\text{N}-$) in the structure of the pyrene derivatives determines the formation both their trans and cis conformations. In this context, the main goal of the present study was to investigate, by DFT and TD-DFT studies, the conformational effect in the ground and excited states to predict the theoretical electronic absorption spectra and $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ transitions of di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether compound. Also, these studies help us in the identification of the intramolecular interactions, such as charge transfer, π -extended conjugation effect. Our results obtained by theoretical simulations are in line with the experimental determinations (Table 5).

Table 5. Theoretical values of the oscillator strength (f), calculated at the TD-DFT/6-311++G(d,p) level of theory, and the experimental absorption wavelengths (λ_{abs} , nm) for the di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether (trans isomers).

Solvent	TD-CAMB3LYP		TD-PBE0		Exp.
	λ_{abs}	f	λ_{abs}	f	λ_{abs}
toluene	388	1.6324	437	1.7386	396
	382	0.8391	433	0.2384	377
	330	0.0601	389	0.0001	345
ethanol	385	1.7130	433	1.7582	390
	380	0.6972	429	0.2082	380
	316	0.1111	367	0.0284	289

Another direction was to investigate the conformational effect of target compounds. Computational results (base on DFT-PBE0/6311+G(d,p)) indicate that the conformation trans-cis isomer was the most stable by energetically point of view (Figure 40). The electronic representations in ground state as well as into excited state were localize on pyrene and benzene units. As effect of excitation, the electron density was delocalized from $-\text{CH}=\text{N}$ -benzene to pyrene sequence due to the charge transfer. In all three conformations trans-trans, trans-cis and cis-cis the charge transfer effect was observed. Also, the theoretical results used CAM-B3LYP/indicated the presence of $\pi \rightarrow \pi$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions due to π -extended conjugation. All theoretical results are agreement with the experimental determinations. This study is still matter of debate.

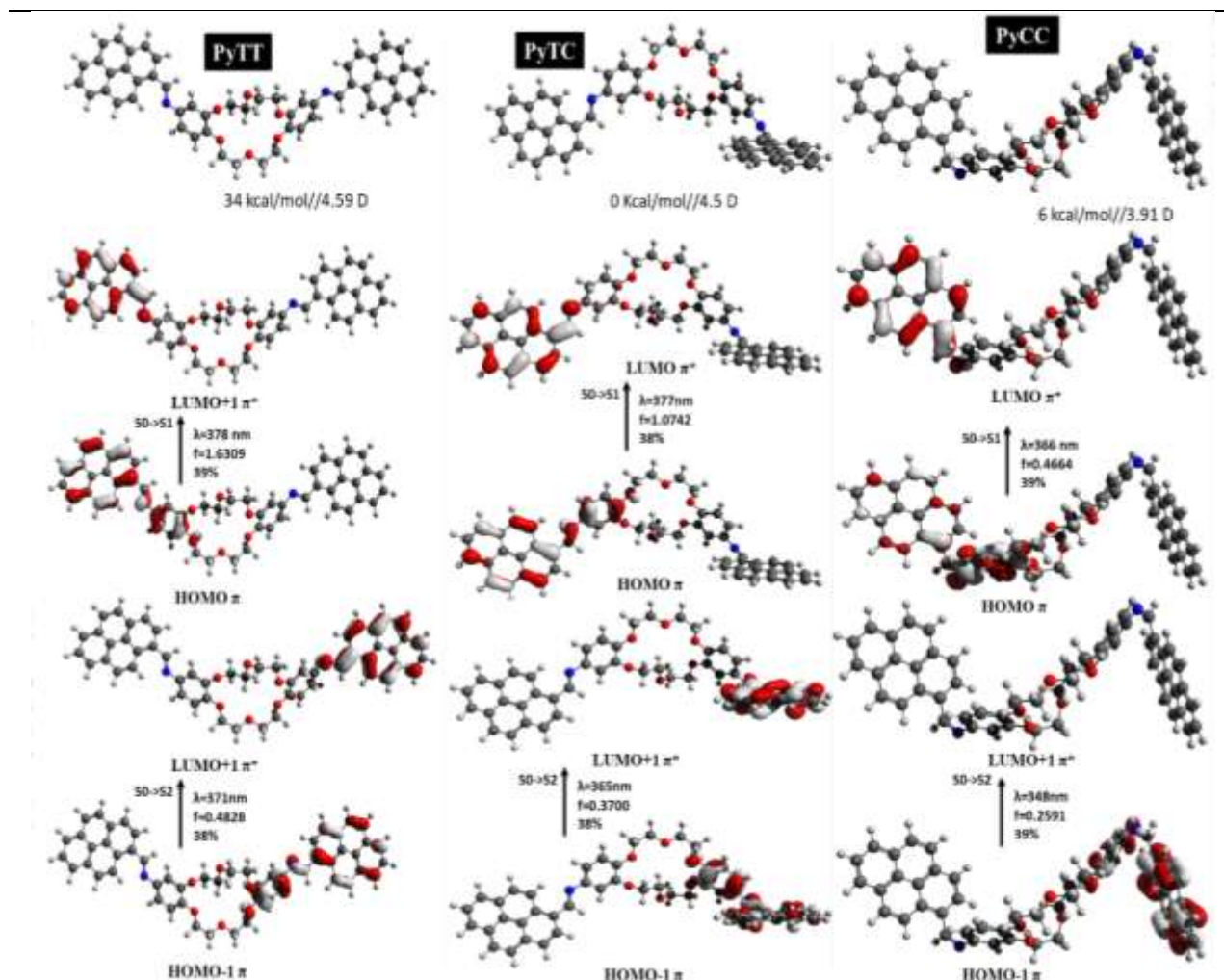


Figure 40. Electronic structure of DPyDB-C=N-18C6 taking into consideration trans-trans, trans-cis, and cis-cis conformations²².

A.3.2. Study of feasible variants for the assembling of the constituents of nanoplateforms

A.3.2.1. Bioactive platforms construction based on electroresponsive nanoentities

The bioactive platform was prepared using a three-step process (Figure 41.a). Firstly, the surface of i-PP films (10x10 cm²) commonly used for biomedical applications (e.g. surgical sutures and meshes), which were kindly supplied by Braun Surgical S.A. (Rubi, Barcelona, Spain), was functionalized with oxygen plasma (0.30 mbar) for 180 seconds and using a power discharge of 250 W. Secondly, the functionalized i-PP (i-PPf) films were cut into 0.5x1.5 cm² samples, which were coated with PHMeEDOT NPs by immersing each one in 5 mL of 0.2 M HCl with 50 mM MHeEDOT monomer for 30 min and under agitation (250 rpm). The oxidative chemical polymerization of the monomer was conducted by slowly dropping 1 mL of 0.2 M HCl solution containing 60 mM of ammonium persulfate (APS). The reaction was kept at 37°C and 80 rpm for 24 h. After this period, the functionalized and electroactivated material, hereafter named i-PPf/NP, was washed with a 0.2 M NaOH solution to balance the charge, and then dried. These two construction steps provided the unique opportunity to engineer the bioplateform surface at the molecular level. Thus, the first formed PHMeEDOT polymer chains, due to the free hydroxyl functional groups, could be oriented and strongly anchored to the i-PPf surface via hydrogen bonding with existing polar groups (e.g. C=O and C-O) formed during the plasma

discharge. This orientation of the first polymer chains will drive the organization of all other grown polymer chains inside of NPs governed also by other types of physical intermolecular interactions (hydrophobic and π - π stacking). In the last step, the EDOT-PCL macromonomer and the EDOT monomer were electrocopolymerized on the i-PPf/NP films. For this purpose, each i-PPf/NP film was introduced in a three electrode cell filled with 20 mL of an acetonitrile solution containing 0.1 M LiClO₄ as a supporting electrolyte and both EDOT and EDOT-PCL in a millimolar ratio of 7/3. Electrocopolymerization was conducted at a constant potential of 1.40 V and adjusting the polymerization charge to 1.0C. It should be noted that in this process the PHMeEDOT NPs acted as polymerization nuclei for the growth of PEDOT-g-PCL chains. For the sake of comparison, bioplatfroms without PCL side groups were also prepared using only the EDOT monomer (10 mM) in the electropolymerization step, which was conducted using identical experimental conditions. It is worth noting that the used electro(co)polymerization technique enables precise control of the coating thickness (see below) through the polymerization charge, as was proved in early kinetic studies on PEDOT and other ICPS²³. Though electrochemically silent (*vide infra*), the PHMeEDOT NPs layer seems to not block the charge transport through the interface. This layer, offering surface-confined electrochemical reaction sites in the form of radical cations, allows for covalent connection of the new growing copolymeric/polymeric chains to the support surface.

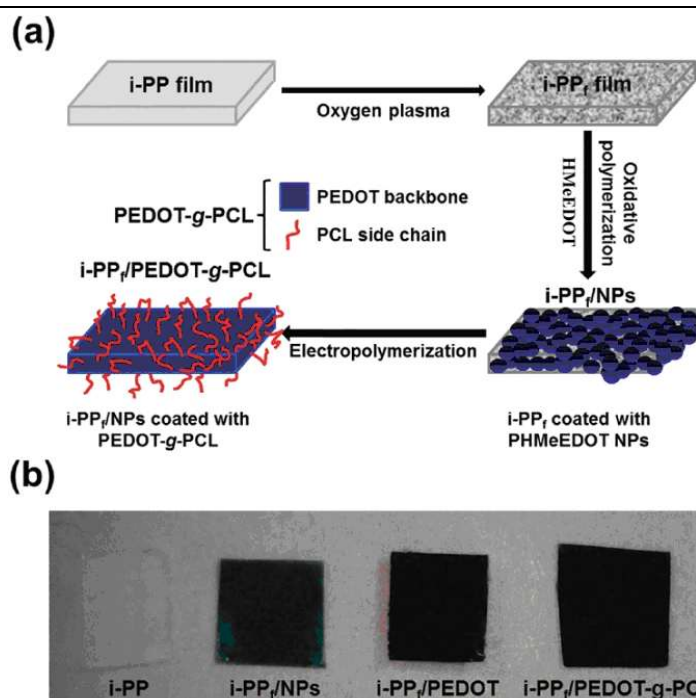


Figure 41. (a) The three steps used to prepare the i-PPf/PEDOT-g-PCL bioplatfroms. (b) Photographs of pristine i-PP, i-PPf/NP, i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL films.

Thus, subsequent PEDOT-g-PCL copolymer or PEDOT homopolymer formation continues due to nucleation from existing PHMeEDOT²⁴, in the form of surface tethered chains. However, the existence of physically adsorbed PEDOT-g-PCL copolymer or PEDOT chains, as a noncovalent coating on the PHMeEDOT NPs film surface, especially formed in the latest phase of the electropolymerization, can't be excluded. These chains could form strong π - π stacks with the NPs surface in a similar manner to the previously reported PCL-decorated poly-p phenylene formed with a carbon nanotube surface²⁵. Hereafter, the flexible and free-standing bioplatfroms formed from i-PPf/NP and coated with a PEDOT-g-PCL or PEDOT (control) layer are denoted i-PPf/PEDOT-g-PCL or i-PPf/PEDOT, respectively. Figure 41.b shows photographs

of i-PP, i-PPf/NP, i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL. The translucent i-PP film becomes opaque and blueish after the incorporation of PHMeEDOT NPs, which in turn converts to dark blue when PEDOT or PEDOT-g-PCL layers are deposited by electro(co)polymerization. These visual transformations suggest that both the oxidative polymerization and the electro(co)polymerization occurred successfully.

A.3.2.2. Bioactive platforms construction based on surface functionalized nanoentities

The synthesized silica materials have been used as carriers for doxorubicin hydrochloride (Dox). The encapsulation of Dox in different conditions is summarized in Table 6, where “pH_i” is the pH of the initial Dox solution (either distilled water or PBS). Based on spectrophotometric analysis of the supernatant after 24h of contact between the silica and Dox solution, the following measures have been calculated: encapsulation efficiency (EE), equation (1), and silica loading efficiency (LE) or loading degree, equation (2).

$$EE = 100 \times (\text{Initial amount of Dox} - \text{Amount of Dox in supernatant}) / \text{Initial amount of Dox} \quad (1)$$

$$LE = (\text{Initial amount of Dox} - \text{Amount of Dox in supernatant}) / \text{Initial amount of silica} \quad (2)$$

Table 6. Encapsulation efficiency, EE (%) and loading efficiency LE (µg/mg, in parentheses). Conditions: 10 mg of silica in 5 mL Dox solution, room temperature, weak shaking.

Sample	Initial Dox concentration 0.1 g/L		Initial Dox concentration 0.2 g/L; pH _i =7.4		
	pH _i = 7.4 (PBS buffer)	pH _i = 5.5 (distilled water)	16h	24h	x 2*
MD1	84.69 (72.3)	-	86.49 (112.4)	90.05 (117)	-
Sil2	89.59 (76.4)	33.43 (21.4)	13.48 (17.5)	22.75 (29.6)	-
Sil84	89.70 (76.5)	7.8 (5)	20.39 (26.5)	30.4 (39.5)	-
MSil2	98.50 (84)	91.81 (58.9)	97.36 (126.5)	96.86 (125.8)	+76.2(224.9)
MSil84	96.97 (82.7)	56.65 (36.3)	76.12 (98.9)	89.83 (116.7)	+57.6(173.8)

*Repeated encapsulation on the same silica batch.

It can be observed that the encapsulation was much more efficient at pH 7.4 than in distilled water. The loading degree depends on the porosity (the mesoporous silicas are more effective in both pairs tested), and the nature of the functional groups of the silica. Attaching the glucose derivative brought a decrease in encapsulation efficiency from water, while it had practically no effect for the encapsulation in PBS pH 7.4. Dox was loaded in very high percent from diluted solutions (85-99% EE), which means loading efficiencies of around 80 µg/mg of silica in the tested conditions. Doubling the initial concentration, the loading efficiency increased by a factor of ca. 1.5 for the mesoporous silica samples, while for the others (Sil2 and Sil84), both EE and LE decreased compared with the case of diluted Dox solution. Looking at the evolution of EE for MSil2, it was observed a slight decrease from 16 to 24h, which indicated the beginning of desorption and the fact that a maximum was reached in less than 16h. So, this silica, as well as MSil84 (for comparison) have been used in a second loading cycle, when maximum LE values of 225 µg/mg for MSil2 and 174 µg/mg for MSil84 have been reached after another 24h interval. It is supposed that MD1 could also receive a higher amount of drug in longer time and larger volume of concentrated solution.

The silica loading efficiency from diluted solution is in the range reported in the literature for silica nanotubes²⁶, while from concentrated solution it is much higher. The key elements are the physical bonds that can form between the silica materials and Dox in solution, i.e. hydrogen bonding, electrostatic interactions and hydrophobic interactions. It is obvious that in weak acidic medium, their level is lower, especially in the case of glucose-modified silicas. Based on the acidity constants of the main components of the system (Table 7), one can estimate the nature of these interactions. The amine groups from Dox are protonated in both pH conditions, the Si-OH groups are mostly protonated at pH 5.5 and mostly ionized at pH 7.4²⁷, while the OH groups in glucose and SH groups in mercaptopropyl are protonated in both cases. It follows that in pH 5.5 the main interactions are hydrogen bonds and hydrophobic interactions, while the level of electrostatic interactions is the lowest, which explains the weaker linking of Dox. At pH=7.4, Dox is bound especially through electrostatic interactions with Si-O⁻ groups in all cases, which are completed by hydrogen bonds and hydrophobic interactions between Dox and the hydrocarbon “tail” of the organic derivative. Based on these hypotheses, it would be expected that Dox release to follow the same trend. Indeed, as will be shown in the next paragraph, it is clear from Table 6 that the percent of Dox released from the formulations loaded in water was much higher compared with the case of loading in PBS pH 7.4, thus confirming the lower level of physical interactions in the former case (and especially for sample MSil84).

Table 7. *pKa values of the system components, according to literature.*

Functional group	pK _a	References
Si-OH	4.5; 8.5	28
(CH ₂) ₃ SH	10.2	29
Glucose	15.8*	30
doxorubicin	7.34 (pheno); 8.46 (amine); 9.46 (estimated)	31

*OH from 4 and 6 positions, since OH in position 1 (the most acidic) is already reacted in our compound.

The self-assembling behavior of the components in our mixtures has been preliminary studied by two molecular dynamics simulations, using YASARA software, in order to test how the functional groups attached to silica (Figure 42) influence the binding of Doxorubicin. To simplify the system, only parts of the molecules depicted in Figure 42.a have been simulated.

The simulation protocol implied placing a Doxorubicin molecule in the center of the simulation box and then inserting 6 molecules of compound A for the first simulation and 4 molecules of compound B for the second simulations. Then water and ions to neutralize the system were added (simulated pH 7.4). The initial configurations are presented in Figure 42.b. The dynamics of the two systems was simulated for 120ns.

By visual analyzing the first simulation we observed that there were almost no interactions between compound A and the doxorubicin, apart from some hydrophobic - hydrophobic interactions for a short period of time (Figure 43). Although compound B seems to interact better with doxorubicin, a clear mechanism of interaction could not be discerned as we didn't notice any hydrogen bonds forming between them. A more detailed study is needed in order to determine the driving force of the interaction between compound B and doxorubicin.

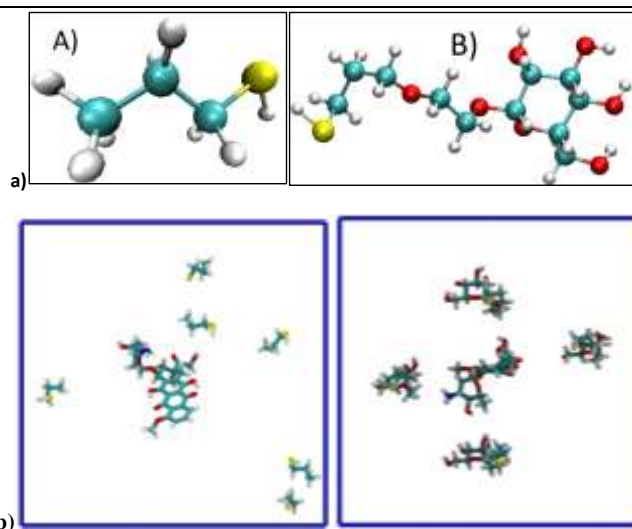


Figure 42. Structures of the organic fragments of interest in the used silica materials (a), and the starting configuration of the two simulations (b).

Water and ions were omitted for clarity.

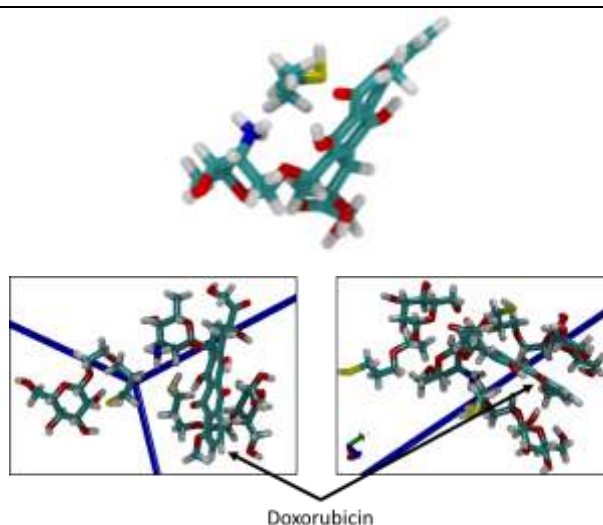


Figure 43. Examples of interactions between Dox and compound A and B (in Figure 40), respectively.

Water and ions were omitted for clarity.

A.3.4. Evaluation of functionality of the constituents of assembled nanoplateforms

A.3.4.1. Characterization of the functionality of electroresponsive hybrid platform

(A) Chemical characterization and wettability

The FTIR and Raman spectra of i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL are compared in Figures 44.a and 44.b. On the other hand, the spectra of biomedical i-PP and i-PPf were reported in different works³², while FTIR and Raman spectra, respectively, of i-PPf/NP with the corresponding discussion very recently. The FTIR spectra of both bioplateforms are dominated by the absorption bands of the i-PP substrate and PEDOT backbone. The characteristic absorption peaks of i-PP correspond to the deformation vibration of the CH₂ group at 1461 cm⁻¹, the methyl group vibrations at 1385 cm⁻¹, and the characteristic vibrations of CH₂ groups at 998 and 1164 cm⁻¹. Besides, the intense broad signals appearing at around 1600 cm⁻¹ are attributed to the C=O stretching of the functional groups created by the oxygen plasma treatment. The PEDOT bands revealed in the spectra are the C–S and C–S–C vibrations in the thiophene ring at around 869, 757 and 628 cm⁻¹. Unfortunately, the distinctive peak of the PCL side chains, which corresponds to the C=O stretching at aprox. 1723 cm⁻¹ overlaps with the broad peak of i-PPf.

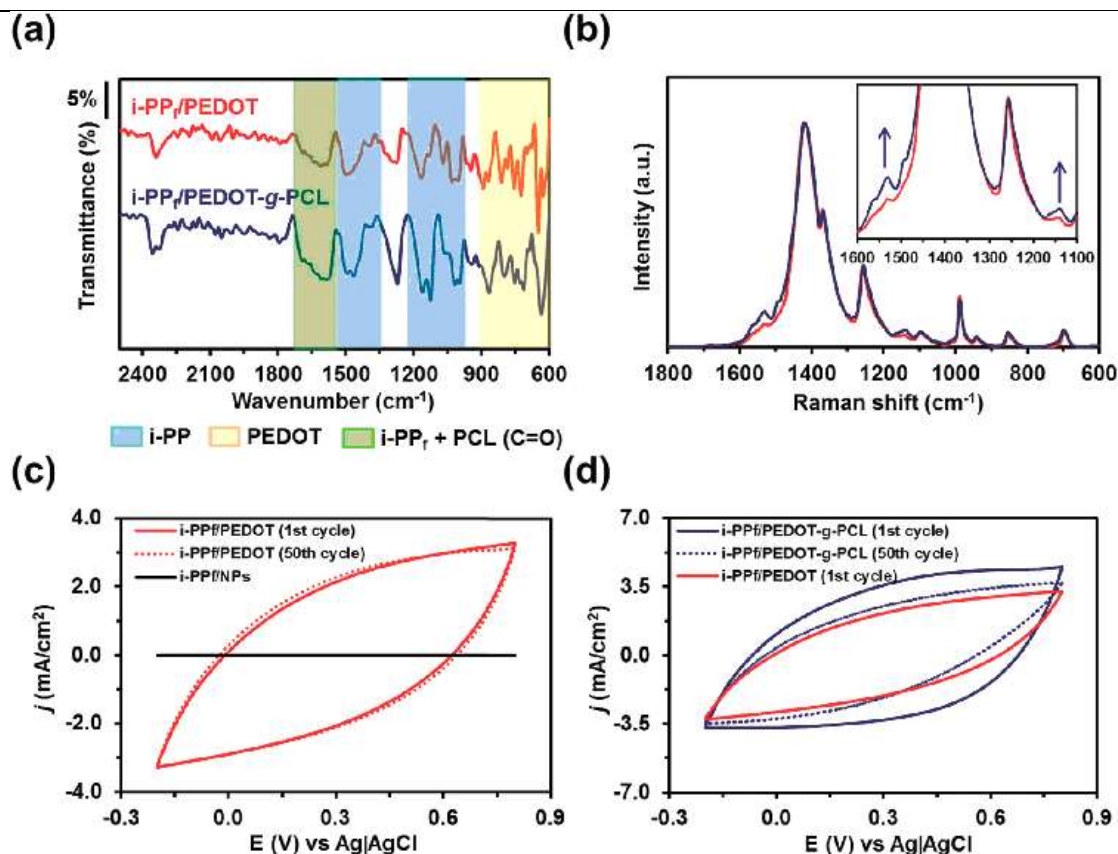


Figure 44. (a) FTIR and (b) Raman spectra recorded for the *i*-PPf/PEDOT and *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL bioplatfroms. (c) Comparison of the cyclic voltammograms recorded in PBS 0.1 M for *i*-PPf/NP and *i*-PPf/PEDOT. (d) Comparison of the cyclic voltammograms recorded in PBS 0.1M for *i*-PPf/PEDOT and *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL. Voltammograms recorded for *i*-PPf/PEDOT and *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL after 50 consecutive redox cycles (dotted lines) are included in (c and d), respectively. CV assays were conducted using the following parameters: scan rate, 50 mV s⁻¹; initial and final potential, -0.20 V; reversal potential, +0.80.

Although the detection by FTIR spectroscopy of PCL side chains is almost hindered by their short length and low grafting density, as compared to PEDOT chains, as well as by the interferences with *i*-PPf signals, their identification was achieved by high resolution Raman spectroscopy. Although the characteristics peaks of the PEDOT backbone predominate in the 785 nm laser Raman spectra recorded for the two coated bioplatfroms (Figure 44.b), some clear differences allowed us to identify the presence of PCL side chains in *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL. More specifically, the following peaks were collected in the spectra of the two systems: the vibration mode of the thiophene C-S bond at 988 cm⁻¹; the stretching of the ethylenedioxy group at 1085 cm⁻¹; the C-C inter-ring stretching at 1258 cm⁻¹; the C-C stretching at 1365 cm⁻¹; and the C-C stretching at 1420 cm⁻¹. The C=O and C-C stretching peaks (1575 and 1137 cm⁻¹, respectively), which can be attributed to both *i*-PPf and PCL, are consistently more intense for *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL than for *i*-PPf/PEDOT.

Evidence of successful EDOT-PCL macromolecular incorporation in the *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL bioplatfrom is also provided by the surface wettability. The contact angle (CA) for Milli-Q water was CA = 102° ± 3°, 78° ± 5°, 82° ± 3°, <20° and 84° ± 5° for the *i*-PP, *i*-PPf, *i*-PPf/NP, *i*-PPf/PEDOT and *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL films (Figure 45), respectively. After plasma treatment, hydrophobic *i*-PP transforms into slightly hydrophilic *i*-PPf due not only to the apparition of polar groups (e.g. C=O and C-O, as proved by FTIR but also by the creation of superficial nano-

patterning, as observed by SEM (see below). However, the functionalization in the next step with PHMeEDOT NPs, surprisingly, does not increase the wettability. This phenomenon has been attributed to the combined action of two different factors (discussed in the next sub-sections): (1) PHMeEDOT NPs do not completely cover the i-PPf surface; and (2) the topographic changes experienced by i-PPf/NP occurred at the submicrometric length-scale-rather than at the nanometric one. On the other hand, the hydrophilicity of PEDOT should be attributed to the large amount of dopant counterions³³.

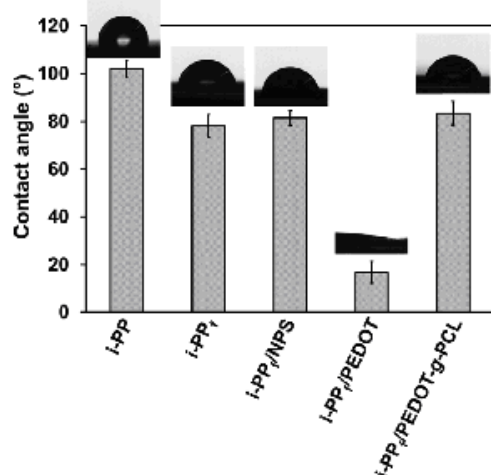


Figure 45. Contact angle values of the examined materials. Photos of the contact angles are also provided.

This could be the explanation for why, after the coating with a homogenous PEDOT layer, in the third step of the control bioplatfrom construction, the resulting surface becomes very hydrophilic. Instead, i-PPf/PEDOT-g-PCL is poorly hydrophilic due to effect of the PCL side chains. However, the copolymerization of EDOT–PCL with EDOT monomers prevents i-PPf/PEDOT-g-CPL from behaving as a pure hydrophobic system (i.e. PCL typically exhibits a water CA of aprox. 120°, which is expected to be beneficial for tissue engineering applications.

(B) Flexibility, electrochemical and thermal characterization

Figure 46 illustrates the robustness and flexibility of the i-PPf/ PEDOT-g-CPL platform. As is shown, PEDOT-g-CPL remains intact after significant bending deformation, no sign of damage being detected at the surface. This reflects the excellent adhesion between the i-PPf substrate and the copolymer layer and, moreover, it was demonstrated the strength of the interlayer forces upon stress-strain since the only damage was at the position in which the clamps held the platforms when applying the tension³⁴. Electrochemical characterization was performed using cyclic voltammetry. Figure 44.c-d compares the cyclic voltammograms recorded for i-PPf/NP and i-PPf/PEDOT in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) solution. As shown, the electrochemical activity of i-PPf is practically inexistent, even after functionalization with PHMeEDOT NPs. This reflects that the latter only nucleate the growth of PEDOT or PEDOT-g-PCL chains during the electrochemical polymerization and, therefore, no other active role can be attributed to the PHMeEDOT NPs.

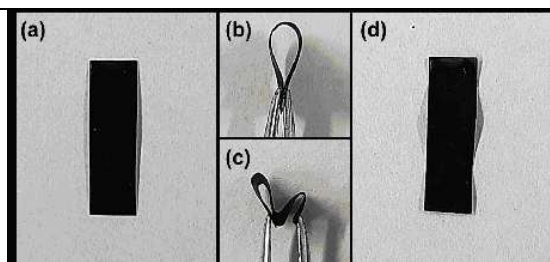


Figure 46. *i-PPf/PEDOT-g-PCL* ($0.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$) (a) before, (b and c) during, and (d) after deformation.

Instead, the electro-chemical activity increases considerably after polymerization of the PEDOT layer, as evidenced by the area of the voltammogram. After 50 consecutive oxidation - reduction cycles, the area of the voltammograms recorded for the *i-PPf/PEDOT* samples decreases very slightly (Figure 44c), indicating that this is an electrochemically stable bioplatfrom. More specifically, the loss of electroactivity (LEA) after 50 cycles was of only $6\% \pm 1$. The electroactivity of *i-PPf/PEDOT-g-PCL* is significantly higher than that of *i-PPf/PEDOT*, as deduced from the comparison of the areas of the voltammograms (Figure 44.d). Considering the fact that the thicknesses of the two electroactive layers are very similar (9.0 ± 2.5 and 8.2 ± 2.4 mm for PEDOT-*g-PCL* and PEDOT, respectively, as determined by profilometry), that observation suggests that the PEDOT-*g-PCL* morphological and structural features could be responsible for this behavior. Thus, the more porous morphology as evidenced by SEM observations (see the next sub-section) will allow access and escape of dopant ions during the oxidation and reduction process, respectively, much more easily for the graft copolymer than for the homopolymer. On the other hand, the presence of PCL polar steric side chains in PEDOT-*g-PCL*³⁵, due to their high ionic conductivity³⁶, to their high ion-solvating capability³⁷, and to the presence of hydroxyl end groups³⁸, can facilitate and enhance the ionic transport in the bulk of the mixed electronic-ionic PEDOT conjugated main chain during the redox process in an aqueous electrolyte. However, the loss of electrochemical activity is much faster for *i-PPf/PEDOT-g-PCL*, which experiences a LEA of $29\% \pm 5\%$ after 50 redox cycles (Figure 44.d), than for *i-PPf/PEDOT*. This behavior has been attributed to the electrochemical degradation of PCL side chains, which are probably damaged by the successive potential scanning processes, it being known that the ester groups in PCL are redox active close to the lithium stripping and plating potential, forming degradation products³⁹. The progressive degradation affects the molecular structure of the graft copolymer, reflected in the reduced film porosity, thus making the access and release of dopant ions more difficult when oxidation and reduction potentials are applied, respectively.

The thermal characterization and stability of the resulting bioactive platforms were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA), respectively^{34,40-43}. Prior to the evaluation of *i-PPf/PEDOT* and *i-PPf/PEDOT-g-PCL*, the thermal properties of the EDOT-PCL macromonomer, *i-PP*, *i-PPf* and *i-PPf/NP* were examined. The DSC traces of both heating runs for the EDOT-PCL macromonomer (Figure 47.a) revealed a double-melting. In addition to the main endothermic peak, a second shoulder is also present. Such a phenomenon was reported previously in the case of PCL blends, or for hyperbranched structures. This behavior of the EDOT-PCL macromonomer can be associated with a morphological effect which implies the presence of two populations of crystals which differ in size and thickness. Being noticed for the first time in the case of a PCL-containing electroactive macromonomer, this phenomenon could also be explained by the peculiar geometry and

character of the bicyclic EDOT moiety, which seems to interfere with PCL crystallization both from solution and the melt state in a particular fashion.

The experimental values of the melting and crystallization peaks for the EDOT-PCL macromonomer were found around 50 °C and 27 °C, respectively (Figure 47.a), indicating that a crystalline phase was developed. These values are in full agreement with those reported for PCL. The degree of crystallinity, measured in the first and second heating runs, was high, close to 78% and 58%, respectively. On the other hand, thermogravimetric experiments of the EDOT-PCL macromonomer (Figure 47.b) showed a continuous mass loss from 250 to 350 °C characterized by a single DTGA peak (i.e. the highest thermal degradation temperature) at 332 °C with 3.4% char yield. This behavior is expectable, as long as it was shown that the thermal stability of PCL is dependent on its molecular weight. Thus, the initial degradation temperature (IDT) of a PCL oligomer containing 16 repeat units ($M_n = 1800$) was determined as 230 °C. Moreover, in previous studies related to other electroactive PCL-containing macromonomers, it was experimentally found that the PCL thermal stability depends on and it is increased by the aromatic moiety attached to it. This trend is also confirmed in the present case of EDOT-PCL, for which the polymerization degree of PCL is 16.5 as determined from $^1\text{H-NMR}$ results.

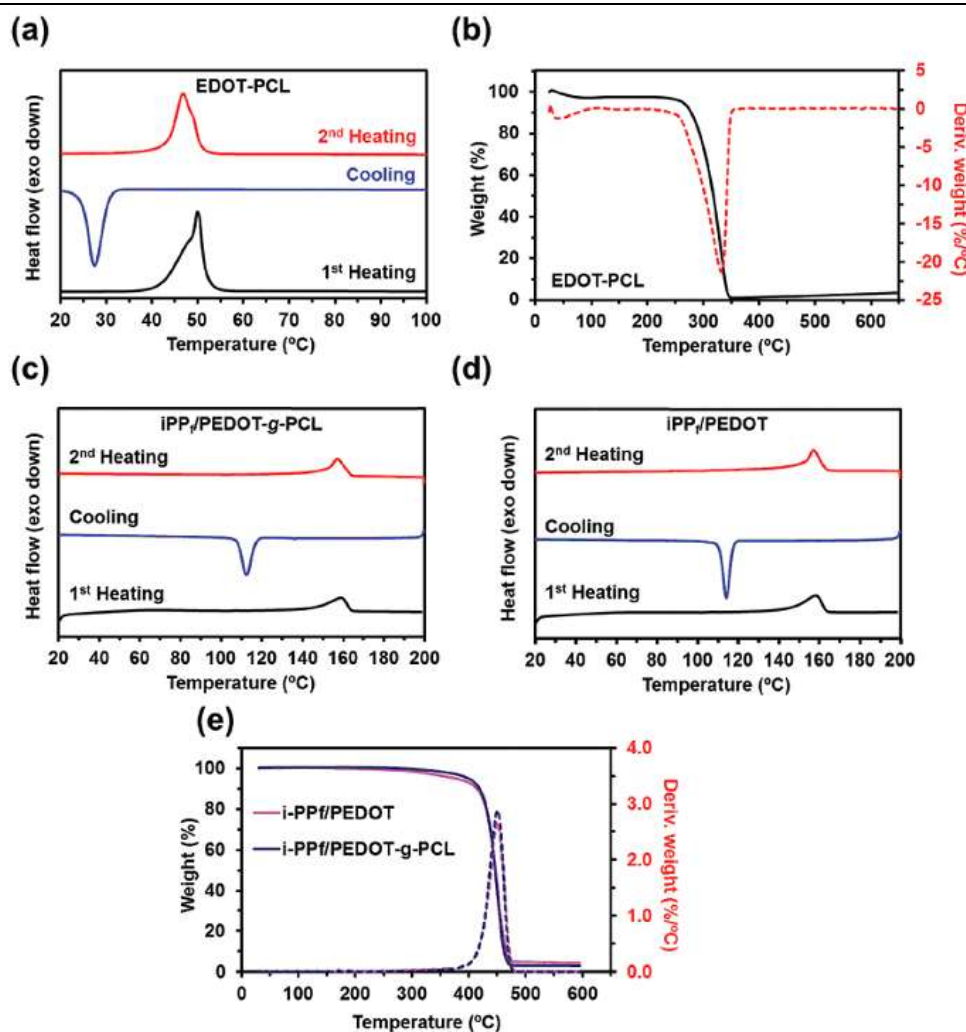


Figure 47. For the (a and b) EDOT-PCL macromonomer, (c and e) i-PPf/PEDOT-g-PCL and (d and e) i-PPf/PEDOT bioplateforms: (a, c and d) DSC thermograms and (b and e) both TGA and DTGA curves.

The EDOT moiety placed at one of the PCL chain ends increased its thermal stability by increasing the IDT by 20 °C (from the reported value of 230 °C to 250 °C). No significant differences were detected in the DCS test among the i-PP, i-PPf and i-PPf/NP formulations. In all cases, a melting point around 158 °C and a crystallization peak at 114 °C were observed in the first and second runs, respectively. These data are consistent with those found in the literature since i-PP grades melt in the range of 100-180 °C, depending on their molecular structure. The melting point observed in the i-PP grade used in this work seems to be related to the β -form of i-PP, since this form is less stable and shows a melting temperature (aprox. 155 °C) lower than the α -form (aprox. 170 °C). The influence of PHMeEDOT NPs on the crystallization of i-PP was not significant, no appreciable variations being observed either in the crystallization temperature or in the crystallinity for i-PPf/NP. Thermogravimetric analyses demonstrated that the thermal stability increased as the functionalization of i-PP increases, reflecting that functionalization with plasma and posterior electroactivation with PHMeEDOT NPs enhanced the thermal stability of the polymer. DSC thermograms of i-PPf/PEDOT-g-PCL and i-PPf/PEDOT presented in Figure 47.c and 47.d revealed a similar thermal behavior, in relation to melting and crystallization and should be noted that polymerization with EDOT or EDOT-PCL had significant effects on the i-PP crystal structure. More specifically, a decrease in the crystallinity is observed (40% and 35% measured in the second heating for i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL, respectively). On the other hand, in all the traces of i-PPf/PEDOT-g-PCL in Figure 47.c, the characteristic peaks for melting or crystallization of the PCL side chains are missing. This phenomenon was noticed before for both linear and ramified conjugated rod-coil systems. It was explained either based on the value of the PCL polymerization degree (in the case of the linear structure) or based on the value of the molar fraction of the incorporated PCL-macromonomer in the final copolymer (in the case of the graft copolymer). Based on our experience for i-PPf/PEDOT-g-PCL we assume that, the well-recognized PCL lower crystallization rate and PEDOT-g-PCL copolymer architecture, which drive the inter-chains interactions that could take place in the molten state (high π - π stacking between conjugated main chains and/or main chains and side chains interactions); delays, hinder and prevent the crystallization of PCL side chains. The thermal stability of the two bioactive platforms (Figure 47.e) is higher than that shown for i-PP and i-PPf, though slightly lower than i-PPf/NP. Both platforms showed similar TGA and DTGA curves (Figure 47.e) with the same T_{max} , 450 °C, which is the same value observed for i-PPf/NP. Also, both platforms reached the final degradation at the same temperature, 475 °C, and left char of 3% and 5% for i-PPf/ PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL, respectively, which is related to the proportion of EDOT and EDOT-PCL in the final samples. However, there is a slight difference in the onset temperature, as i-PPf/PEDOT-g-PCL started to degrade 23 °C later than i-PPf/PEDOT, supporting the improvement in performance of the bioactive platform when PCL side groups are grafted.

(C) Morphological and topographical characterization of platform surface

The surface of biomedical i-PP substrate is homogeneous, smooth and relatively flat, exhibiting a root-mean-square roughness (R_q) of 30 ± 6 nm only as was shown by scanning electron microscopy (SEM) micrographs and both 2D height and phase contrast atomic force microscopy (AFM) images³⁴. The effects of the functionalization and electroactivation on the morphology and topography of i-PPf and i-PPf/NP are shown in Figure 48. The surface becomes

more complex after functionalization. Thus, the plasma treatment causes the apparition of superficial and homogeneous nanopatterning on the whole surface (Figure 48.a).

This morphological change affects significantly the topography, showing a slight increase of the surface roughness ($R_q = 38 \pm 6$ nm) due to the apparition of small and sharp peaks abundantly and homogeneously distributed. Abundant PHMeEDOT NPs with capricious morphology are clearly detected in the surface of i-PPf/NP (Figure 48.b), which experiences a drastic increment of the roughness ($R_q = 312 \pm 12$ nm) in comparison to i-PPf. Those NPs, which organize in a porous layer of 1.1 ± 0.1 mm in thickness, were randomly distributed on the i-PPf surface, forming a random contact network structure. However, the contact between such NPs was not large enough to ensure percolation and to form conduction paths, which explains the inexistent electrochemical activity of the i-PPf/NP films. Figure 49 shows significant morphological differences between i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL. In the former, the PEDOT homopolymer completely covers the PHMeEDOT NPs, integrating them into a single conducting layer with continuous and well-defined conduction paths. This layer exhibits the typical heterogeneous morphology of electro-polymerized PEDOT films⁴⁴, which consists of the aggregation of dense clusters of packed molecules.

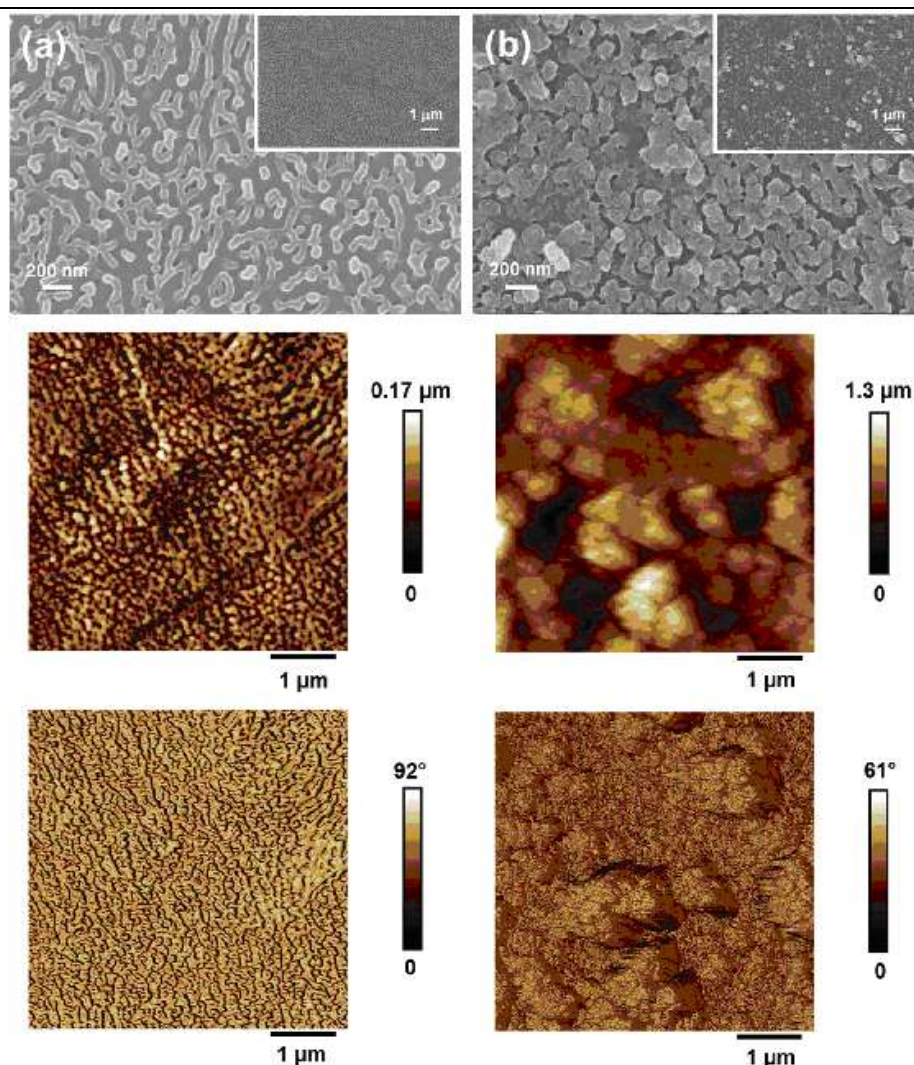


Figure 48. For (a) i-PPf and (b) i-PPf/NP: representative SEM micrographs and 2D AFM height and phase contrast images.

Thus, the linear growth of PEDOT chains, which are exclusively formed by α - α linkages (i.e. the β -positions of the thiophene ring are occupied by the dioxane ring), favors the formation of compact spheroidal clusters that aggregate leaving a large number of submicrometric pores among them. This unique structure favours the access and escape of dopant ions during redox processes, explaining the excellent electrochemical behavior reported for PEDOT⁴⁵.

Moreover, this morphological organization results in a rough surface with $R_q = 611 \pm 57$ nm, as is shown in the AFM images included in Figure 49.a. The microscopic texture of i-PPf/PEDOT-g-PCL is smoother than in i-PPf/PEDOT, which has been attributed to the superficial location of the PCL side chains. This assumption is confirmed by the contrast in the AFM phase image included in Figure 49.b, which allows distinguishing between two phases in i-PPf/PEDOT-g-PCL. Phase imaging is a powerful tool that is sensitive to surface stiffness/softness and adhesion between the tip and surface. The image recorded for i-PPf/PEDOT-g-PCL shows bright and dark domains, which correspond to chemical-dependent phase shifts of up to 174° . The bright areas, which correspond to large phase angles, are associated with the PEDOT phase, whereas the dark areas represent the PCL phase. It is worth noting that the PCL phase occupies the main part of the surface, whereas the PEDOT phase only appears in regions largely dominated by the incorporation of EDOT monomers with respect to the EDOT-PCL macromonomer.

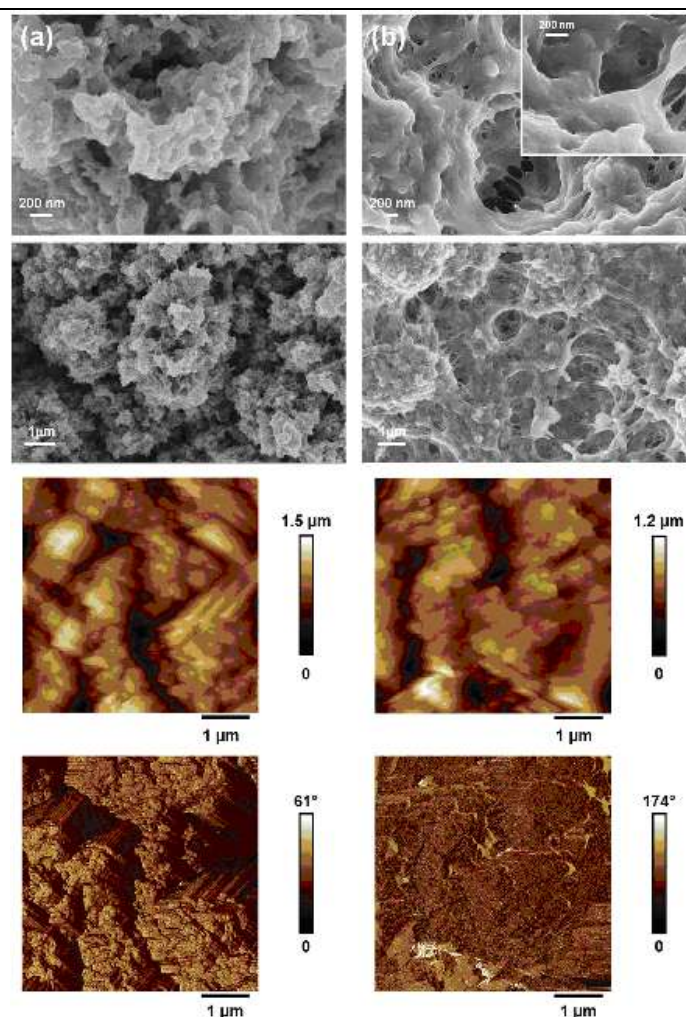


Figure 49. For (a) i-PPf/PEDOT and (b) i-PPf/PCL-g-PCL: high and low magnification SEM micrographs and 2D AFM height and phase contrast images.

These results can be explained if the experimental details are taken into account. For electropolymerization, acetonitrile was used as the reaction medium, which is a marginal solvent for PCL. During the solvent evaporation and film formation, the PCL side chains of PEDOT-g-PCL naturally migrate toward the surface, most probable exposing the richest aliphatic part of them. On the other hand, the roughness of i-PPf/PEDOT-g-PCL ($R_q = 448 \pm 34$ nm) is significantly lower than that of i-PPf/PEDOT, even though the thicknesses of the PEDOT-g-PCL and PEDOT layers are very similar (9.0 ± 2.5 and 8.2 ± 2.4 μm , respectively). Another important difference between i-PPf/PEDOT-g-PCL and i-PPf/PEDOT refers to the structure of the pores. Although both bioplatfroms display a porous surface with a large number of submicrometric pores, i-PPf/PEDOT-g-PCL shows a unique distribution of nanometric pores with sizes falling within aprox. 50 and 100 nm. These additional nanopores, which have been attributed to the self organization of the PCL side chains, are consistent with both the high electrochemical activity and the low electrochemical stability of i-PPf/PEDOT-g-PCL in comparison to i-PPf/PEDOT. When cycled in the range from -0.3 V to 0.9 V, the PCL side chains are expected to be very sensitive to electrochemical degradation, especially due to their low molecular weight. Thus, the nanometric pores probably collapsed after a few consecutive redox cycles, reducing drastically the electrochemical activity of the system when the number of redox cycles increases.

(D) Monitoring the influence of PEDOT-g-PCL conjugated graft copolymer in cellular adhesion and proliferation

The effect of a graft copolymer layer in cell adhesion and proliferation was evaluated by considering two cell lines, HeLa and IMR-90, both extensively used in scientific research because of their fast growth. HeLa is a human immortal carcinogenic cell line with epithelial morphology, while IMR-90 primary cells are human Caucasian fetal lung fibroblasts (non-carcinogenic). Quantitative results for cell adhesion and proliferation assays (24 h and 7 days of cell culture, respectively) on tissue culture polystyrene (TCPS, control), i-PP, i-PPf, i-PPf/NP, i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL are displayed in Figure 50. The results, which correspond to the average of three independent replicas for each system, are expressed in terms of cell viability (cv) relative to the TCPS control material.

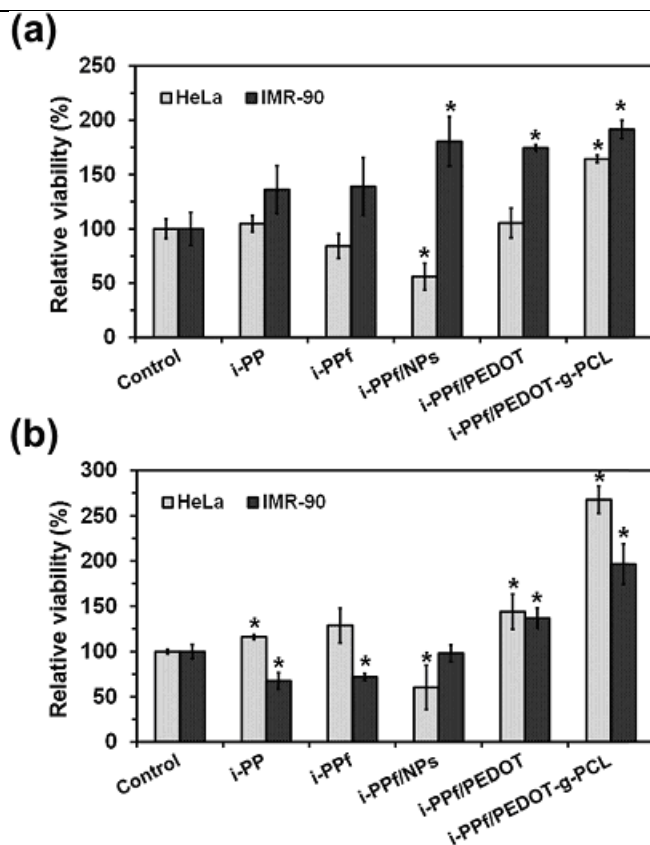


Figure 50. (a) Cellular adhesion and (b) cellular proliferation on the surface of i-PP, i-PPf, i-PPf/NP, i-PPf/PEDOT and i-PPf/PEDOT-g-PCL. TCPS was used as a control substrate. Human HeLa and IMR-90 cells were cultured for (a) 24 h and (b) 7 days.

Asterisk marks (*) represent a significant difference with the control when Student's T-test was applied ($p = 0.05$).

The amount of cells adhered to the surface of biomedical i-PP is similar (HeLa) or slightly higher (IMR-90) than that of the TCPS control, which is a well-known biocompatible material used for metal implants. This behavior is approximately maintained after plasma treatment of i-PPf, indicating that the functionalization does not have a major impact on the interaction and attachment of the cells to the surface. This has been attributed to the fact that, although the plasma treatment causes the apparition of homogeneous nano-patterning, the increment in the surface roughness (from $R_q = 30 \pm 6$ nm for i-PP to $R_q = 38 \pm 6$ nm for i-PPf) is not large enough to affect the adhesion of the cells. Thus, the roughness of both the i-PP and i-PPf surfaces is significantly lower than the diameter of filopodia filaments in cells (ca. 100–200 nm⁴⁶), which are thin, actin-rich structures protruding from the lamellipodial actin network that play a crucial role in cell adhesion⁴⁷. The incorporation of the first CP layer introduces important changes that, in addition, depend on the cell line. More specifically, PHMeEDOT NPs promote IMR-90 cell adhesion by around 80% with respect to the control, while reduces the attachment of HeLa cells by approximately 50%. Considering the sub-micrometric roughness of i-PPf/NP, this variation is consistent with the filopodia recognition capacity of submicrometric topographies, which was found to be dependent on the cell shape and texture. IMR-90 presents the typical fusiform-shape with normal texture while the HeLa line is soft irregularly-shaped cells, as shown in the confocal micrographs displayed in Figure 51, which makes difficult the recognition of the textures. However, the addition of the second CP layer results in a significant increment of cell adhesion with respect to i-PPf/NP, this effect being especially remarkable for IMR-90 cells.

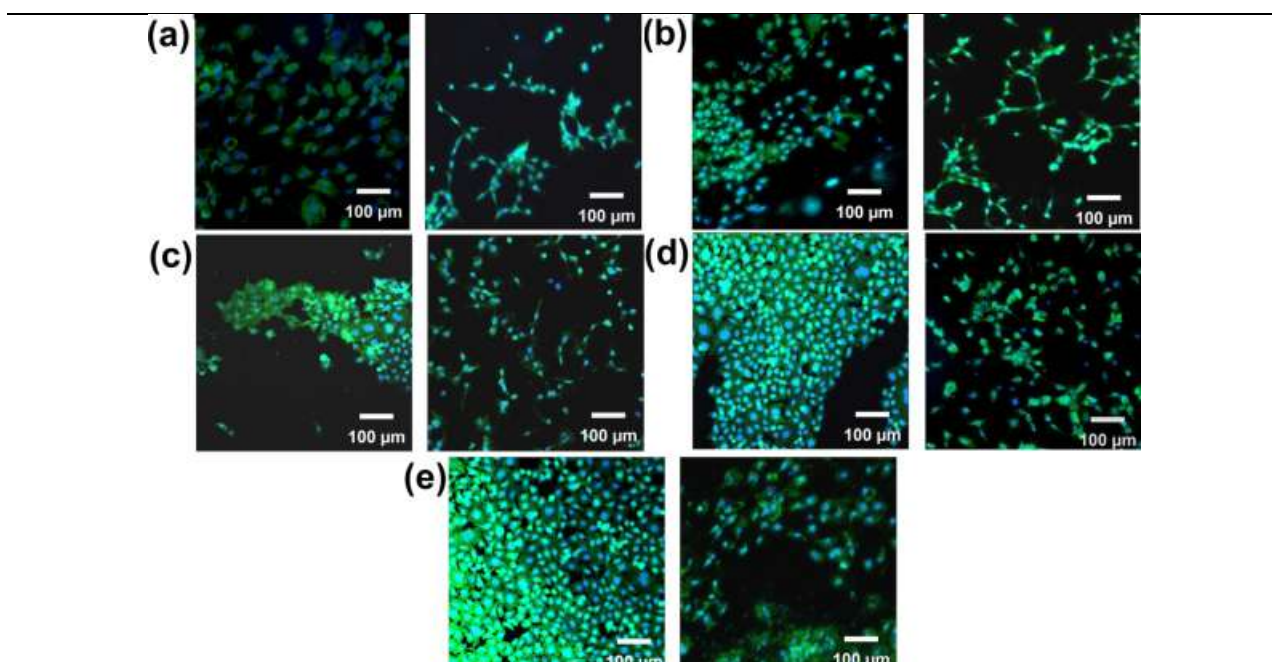


Figure 51. For (a) *i*-PPf/PEDOT and (b) *i*-PPf/PCL-*g*-PCL: high and low magnification SEM micrographs and 2D AFM height and phase contrast images.

Thus, the attachment of fibroblast cells is higher for *i*-PPf/PEDOT and *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL than for *i*-PP by approx. 70% and approx. 90%, respectively, while for HeLa cells the adhesion increment is negligible for *i* PPf/PEDOT and of approx. 60% for *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL. The different response of HeLa and IMR-90 cells towards CPs can be interpreted on the basis of their contrasting fibronectin content. More specifically, PEDOT and CPs in general have a great affinity towards fibronectin, its adsorption being an essential step for promoting cell adhesion⁴⁸. In cell lines derived from non-carcinogenic tissues fibronectin was found to be predominantly in the extracellular matrix, whereas carcinogenic cell lines display very little or no fibronectin. The absence of extracellular fibronectin was specifically demonstrated for tumor HeLa cells, which, instead, contain such a protein in the cell nucleus. This feature explains the significantly lower adhesion of HeLa cells to *i*-PPf/PEDOT-*g*-PCL and especially to *i*-PPf/PEDOT, with respect to that found for IMPR-90 cells. Covalent grafting of biocompatible side chains to CPs is a smart strategy to improve the biocompatibility of structures based on such a class of polymers, the chemical and physical properties of which mimic the features of a natural extracellular matrix (e.g. CP structures enable ion diffusion and ion exchange at the interface). Analysis of cell viability through simple proliferation assays is a useful tool for assessing the impact of scaffolds in cell metabolism and, therefore, determining their potential use for tissue engineering applications. Results from cell proliferation for the examined materials (and the TCPS control) are shown in Figure 50.b, while representative confocal images are displayed in Figure 51.

The proliferation of HeLa cells on *i*-PP and *i*-PPf ($cv = 116\% \pm 2\%$ and $129\% \pm 19\%$, respectively) was slightly better than for the control TCPS, whereas that of *i*-PPf/NP was clearly worse ($cv = 60\% \pm 24\%$). Instead, *i*-PPf/PEDOT ($cv = 144\% \pm 19\%$) shows a significant increase in cell number due to cell division (cytokinesis) with respect to both pristine and plasma functionalized *i*-PP substrates. These results indicate that the doping level of chemically polymerized PHMeEDOT NPs is not high enough to facilitate the exchange of ions with adhered HeLa cells, which in turn is affected by the low cell adhesion due to the lack of fibronectin in the extracellular matrix (as discussed above). In contrast, PEDOT prepared using the experimental

conditions described in this work is known to achieve a very high doping level. It generally occurs for CPs synthesized by electropolymerization with respect to chemical oxidative polymerization, and therefore a very high concentration of counterions is contained inside the polymeric matrix. These unique electronic and chemical structures facilitate the exchange of ions at the PEDOT-cell interface, promoting cell division. Indeed, this behavior is so favorable that it overcomes the limitations associated with the lack of extracellular fibronectin in HeLa cells, improving the response of electrochemically inert surfaces (i.e. TCPS, i-PP, i-PPf and i-PPf/NP). It is worth noting that these results, which are supported by the confocal micrographs displayed in Figure 51, are fully consistent with the cyclic voltammograms displayed in Figure 44.c. i-PPf/PEDOT-g-PCL exhibits an extraordinary, unprecedented high capacity for promoting HeLa cell growth with $cv = 268\% \pm 15\%$ (Figure 51.d). The superior features of this bioplateform have been attributed to the synergy among the electrochemical activity of PEDOT, the high biocompatibility of PCL, which is frequently used for biomedical applications, and the ionic conductivity due to the dopant anions of PEDOT, which, in turn, is enhanced by the ion solvating polymer property of PCL chains. The addition of the graft copolymer layer to biomedical i-PP improves the cell viability by a factor of 2.3. The results are more impressive for IMR-90 cells. In this case the viability for the i-PP and i-PPf surfaces ($cv = 68\% \pm 9\%$ and $72\% \pm 4\%$, respectively) is lower than for the control, which has been attributed to the poor wettability of these substrates (i.e. growth of fibrin-containing cells is promoted on hydrophilic surfaces in comparison to hydrophobic ones). This situation is reversed for i-PPf/NP ($cv = 98\% \pm 9\%$), even though its water contact angle is similar to that of i-PPf. Again, this behavior has been associated with the ability of CPs to exchange ions with cells, as supported by the results obtained when a relatively thick layer of PEDOT is deposited on PHMeEDOT NPs. Thus, the cv of i-PPf/ PEDOT ($cv = 137\% \pm 11\%$) increased by twice when compared to that of the i-PP substrate for biomedical applications. For i-PPf/PEDOT-g-PCL ($cv = 196\% \pm 22\%$), the improvement represents an increase of almost a factor of 3 and 1.5 with respect to i-PP and i-PPf/PEDOT, evidencing the benefits of the PCL grafting. These results prove the synergy between PEDOT and PCL effects at the bioplateform interface. Thus, the graft copolymer approach presented in this study represents a smart strategy to functionalize currently used biomedical plastics, such as i-PP, for matching of flexibility and charge transport between the biointerface material and living tissues, considerably promoting cell adhesion and growth.

Conclusions

The resulting bioplateform is a flexible substrate coated with a graft copolymer that presents, synergistically, the advantages of the PEDOT backbone and those of the PCL side chains. This study shows that i-PP/PEDOT-g-PCL has many favorable properties with respect to i-PP and i-PP/PEDOT for tissue engineering applications. This has been confirmed by cell adhesion and proliferation assays using two human cell lines with very different characteristics (HeLa and IMR-90), i-PP/PEDOT-g-PCL improving the cell viability of i-PP by a factor of almost three. Overall, this study has wide implications in polymeric medical devices currently used as implants, which can be upgraded enhancing their tissue integration performance.

A.3.4.2. Characterization of the functionality of surface reactive platform

Dox release behavior was tested by immersing 7 mg of loaded silica in 2.5 mL of buffer solution, pH 7.4, 5, or 2.6. The tubes were agitated at 37 °C, and at certain time intervals, they were centrifuged. The supernatant was collected for UV-Vis analysis and immediately replaced with a similar amount of buffer solution. We preferred to avoid using a dialysis membrane, due to possible adsorption side effects. The release was tested in physiological pH conditions (7.4), in weakly acidic pH specific to tumor tissue (pH 5), and also in extremely acidic medium (pH 2.6), in order to observe in extremis behavior of the drug-carrier interactions while forcing the release process.

Maximum release values, calculated as % of Dox released / Dox encapsulated are presented in Table 8, while in Figures 52 to 54 the release profiles of the Dox-loaded silica materials are compared. It was observed that both encapsulation efficiency and cumulative release were comparable with literature data for silica nanoparticles containing pH triggered nanovalves²⁷.

Table 8. Maximum release capacity (% from encapsulated Dox) in different conditions, after 72h.

Sample code	Initial concentration 0.1 g/L			Initial concentration 0.2 g/L	
	pH 7.4	pH 2.6	pH 2.6 ^a	pH 5	
MD1	66.49	28.71	-	67.97	79.5 ^d
Sil2	24.94	49.32	83.96 (28.07) ^b	56.89	16.8
Sil84	29.60	61.05	-	76.37	30.2
MSil2	34.03	35.00	91.13 (83.67)	79.80 ^c	179.5
MSil84	75.42	48.26	96.74 (54.61)	58.05 ^c	100.9

^a Encapsulated from distilled water (pH_{initial} 5.5).

^b Reported to the amount of Dox in the loading solution.

^c Reported to the total amount encapsulated from two batches of concentrated solution (Table 2).

^d Amount of Dox released per mass of silica, µg/mg.

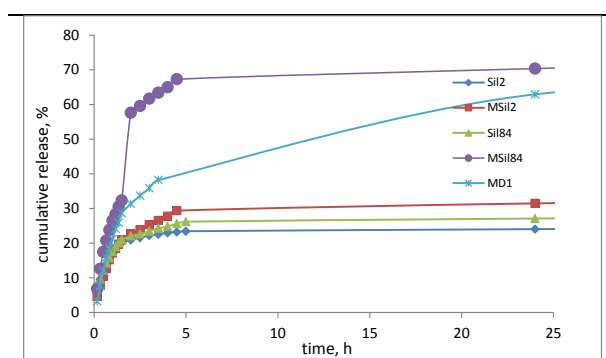


Figure 52. Dox release at pH=7.4 (encapsulated at pH=7.4, from 0.1g/L solution).

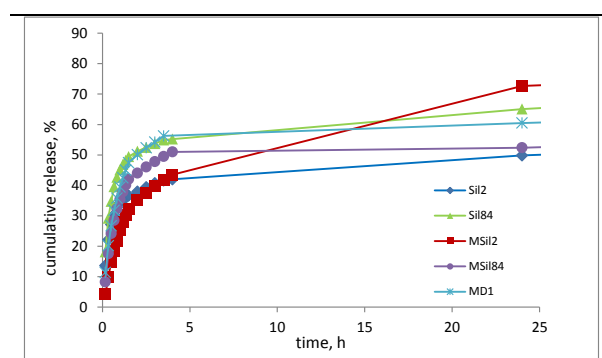


Figure 53. Dox release at pH=5.0 (encapsulated at pH=7.4 from 0.2g/L solution).

The release profile was similar for most silica materials, reaching a plateau after ca. 4-5h, with two notable exceptions: sample MD1 which had a sustained release during 24h in pH 7.4 (Figure 52), and sample MSil2 showing sustained release for 24h at pH 5 (Figure 53). The cumulative release was about 25-75% in pH 7.4, 57-80% in pH 5, while in extreme pH conditions it would reach ca. 29-60% from the encapsulated amount. In terms of Dox amount

released per mass of silica (last column in Table 8), the silica without mesopores having glucose groups (Sil84) was able to release almost twice the amount of Dox released by Sil2, without glucose, in acidic medium. The mesoporous silicas released much more Dox than Sil2 (10-fold more in the case of MSil2), although the percent from the encapsulated amount was not very different. It is interesting to observe the effect of the glucose derivative: when this was attached to the “normal” silica, both the loading capacity and the released amount increased, while in the case of mesoporous silicas the tendency was reversed. The effect is probably due to partial obstruction of the mesopores with the glucose derivative. We have to recall here that, based on the encapsulation dynamics in concentrated solution, the mesoporous silicas MSil2 and MSil84 were submitted to a second charging, to have an idea about the maximum loading capacity, and the release was done from these fully loaded silica materials.

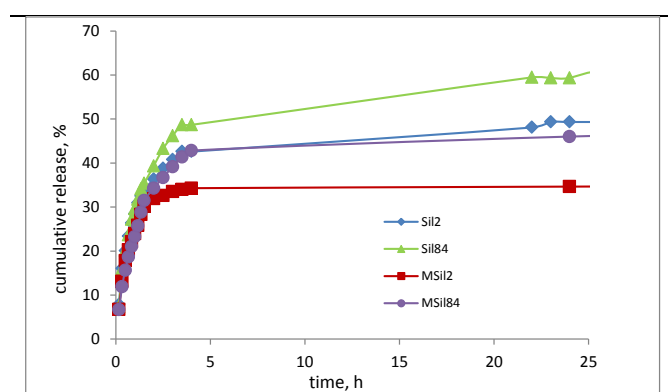


Figure 54. Dox release at pH=2.6 (encapsulation at pH=7.4 from 0.1g/L solution).

Considering the criterion of pH controlled release, which implies prevailing release in acidic medium of the tumor, it was concluded that Sil84 and MSil2 would best fulfill this requirement. In addition, in the particular case of MSil2 which was loaded twice, a continuous release was observed in 24h. Comparing the samples after 5h, the highest percent of drug was released by MD1 and Sil84, but the former had a sustained release in pH 7.4 as well. The benefits of chemical modification with

glucose derivative can be deduced from the release profile in pH 2.6 (Figure 54). In extreme conditions, Sil84 is still the best candidate, with maximum release in pH 2.6 and moderate release in physiological pH which clearly indicates the different nature of the interactions between the drug and the glucose-modified silica in different pH conditions.

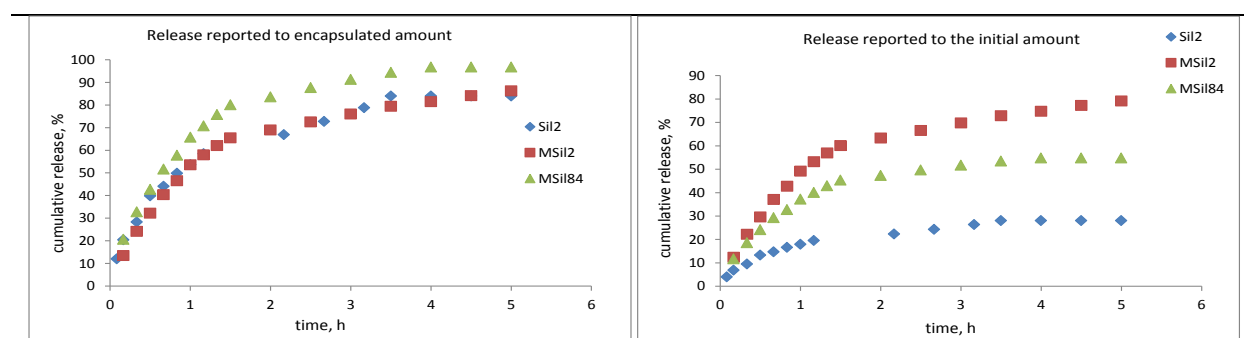


Figure 55. Dox release at pH = 2.6 (encapsulation from water; ph = 5.5).

An interesting aspect is brought into attention in the case of encapsulation from water and release at “extreme” pH (Figure 55). Taking into account the generally lower loading degree in water compared with PBS pH=7.4, in Table 8 it was given in parantheses the amount of Dox released in pH 2.6 reported to the amount of Dox used for encapsulation (initial solution) for a better comparison of the samples. In the case of MSil2, the loading efficiency was the highest and most of the encapsulated Dox was released. MSil84 released practically all Dox encapsulated as well, except its loading efficiency was significantly lower. These behaviors

indicate weaker but more numerous interactions of Dox with the mesoporous silicas in water than in PBS pH 7.4, in other words a different encapsulation mechanism. This confirms the hypothesis discussed above based on acidity constants and allows modulation / control of the release behavior by choice of loading conditions.

Two mathematical models were used to analyze the drug release kinetics: Higuchi (equation 3)⁴⁹ and Korsmeyer–Peppas (equation 4)⁵⁰.

$$M_t = K_H \cdot t^{1/2} \quad (3)$$

$$M_t / M_\infty = K_{KP} \cdot t^n \quad (4)$$

where M_t is the amount of drug release at time t , M_∞ is the initial amount of drug in the sample, K is the rate constant and n is the release exponent, which characterise the drug release mechanism⁵¹. Both models can be applied when $M_t/M_\infty \leq 60\%$, as is the case here. By fitting the data on the increasing regions of the release profile, the coefficients summarized in Tables 8 to 10 were obtained.

In the case of release at pH=7.4, the correlation coefficient for Korsmeyer–Peppas equation (which applies for porous hydrophilic materials) was slightly higher (Table 9). When M_t vs. $t^{1/2}$ graphs were analyzed (Higuchi equation) an inflexion point was observed in all cases at 90 min, which would indicate two successive processes. Taking these data separately, very high correlation coefficients for Higuchi equation were found, showing that the release process can be described by two diffusion steps. In all cases, the release profile was similar, with a maximum cumulative release at around 4.5 h, except for MD1, which showed a sustained release for 24h (Figure 52).

Table 9. Kinetics of Dox Release at pH= 7.4.

Sample code	Higuchi model		Korsmeyer–Peppas model	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	12.67 ^a (31.31; 8.97) ^b	0.8562 (0.9988; 0.9887)	0.581	0.8511
Sil2	9.19 (17.09; 3.54) ^b	0.8628 (0.9937; 0.988)	0.378	0.9134
Sil84	9.89 (17.98; 5.1) ^b	0.9002 (0.9985; 0.9967)	0.383	0.937
MSil2	13.78 (20.46; 9.13) ^b	0.9535 (0.9976; 0.9943)	0.530	0.9539
MSil84	39.53 (31.21; 13.36) ^b	0.9463 (0.996; 0.9951)	0.711	0.975

^a Kinetic data for 24h. ^b Two successive steps, before and after 90 min.

Table 10. Kinetics of Dox Release at pH= 5.0.

Sample code	Higuchi model		Korsmeyer–Peppas model	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	29.71 ^a (44.05; 13.48) ^a	0.9177 (0.9942; 0.9994)	0.503	0.9338
Sil2	14.92 (27.09; 7.27)	0.8209 (0.9265; 0.987)	0.309	0.8717
Sil84	20.02 (36.98; 7.67)	0.8212 (0.9541; 0.9868)	0.313	0.8815
MSil2	14.55 (35.07; 10.69) ^b	0.8781 (0.9995; 0.9942)	0.548	0.8681
MSil84	26.45 (40.67; 11.66)	0.8982 (0.9851; 0.9993)	0.537	0.899

^a Kinetic data for 24h. ^b Two successive steps, before and after 90 min.

Table 11. Kinetics of Dox Release at pH= 2.6.

Sample code	Higuchi model		Korsmeyer–Peppas model	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	9.00 (23.46; 4.19) ^a	0.7755 (0.9726; 0.9685)	0.250	0.8614
Sil2	22.25	0.9407	0.508	0.9311
Sil84	26.93	0.9738	0.569	0.9484
MSil2	18.00 (27.2; 1.67) ^b	0.899 (0.9867; 0.9598)	0.498	0.9137
MSil84	23.98	0.9782	0.586	0.9767

^a Kinetic data for 24h. ^b Two successive steps, before and after 90 min.

In the tumor acidic medium (pH 5) samples Sil2, Sil84 and MSil2 had a sustained release practically on the entire observation period (72h), but Sil2 and Sil84 presented a very low release rate after the first 4h (the sustained release after this time was ignored in the kinetics evaluation) while sample MSil2 showed a continuous release within the first 24h (Figure 53), followed by a very slow release. In Table 10 the release kinetics was calculated for the first 4h for all the samples, except MSil2.

At lower pH (= 2.6), the Higuchi model described best the release from the silicas without mesopores, indicating a diffusion process which obeys Fick's law. For mesoporous silicas, the Korsmeyer–Peppas equation fitted better, with release exponents (generally below 0.5) indicating a preponderant diffusion process (Table 11). An inflexion point in the M_t vs. $t^{1/2}$ representations was observed only for mesoporous silicas. Probably in this case two diffusion steps may be considered, a diffusion from the surface in the first 90 min (or even 50 min in the case of MD1) and a subsequent diffusion from the mesopores within the next 2 or 2.5h, respectively. As a general observation, the release from the pores was faster (the second K_H value was higher) for mesoporous silicas, showing that the drug encapsulated in mesopores is involved in weaker and/or fewer interactions than in „normal” pores.

Preliminary tests on cellular viability in presence of silica materials with or without Dox encapsulated have been made on two cell lines: NDHF (fibroblasts) and MCF 7 (breast cancer cells). The obtained results are presented in Figures 56 and 57. At first sight, the mesoporous silica materials MSil2 and MSil84 were not toxic in small concentrations. A higher viability can

be noticed in cancer cells and a benefic effect in the case of glucose-modified silica (Figure 56). In Figure 57, a decrease of the viability of cancer cells was registered in presence of glucose-modified silica Sil84, compared with the normal cells, on the entire concentration range. The effect on MCF 7 is also noticeable comparatively with the non-modified silica Sil2. In the other cases, the viability of cancer cells was at least equal to that of fibroblasts. However, at this point, the data should be considered with caution, due to different degree of Dox encapsulation.

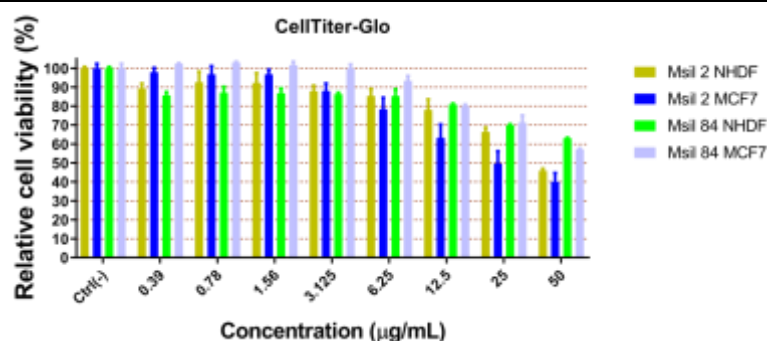


Figure 56. Cell viability in the presence of mesoporous silicas bearing SH or glucose groups.

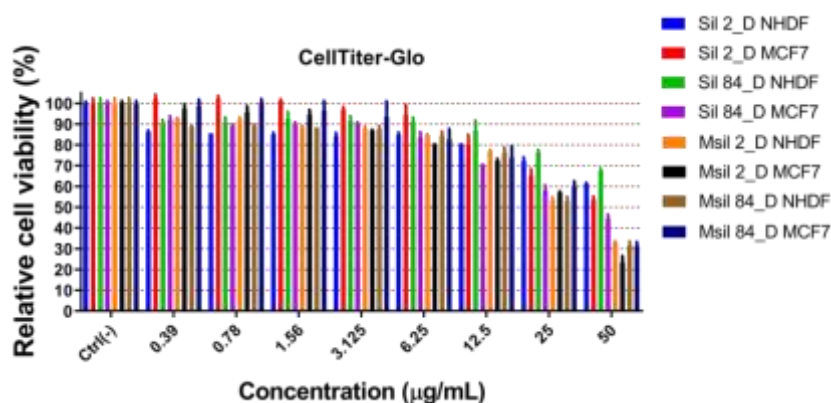


Figure 57. Cell viability in presence of silicas containing encapsulated Dox.

A.3.3. Study of feasible variants for obtaining (bio)macromolecular matrices for *ex vivo* testing of nanoplatfoms

A.3.3.1. Hard tissue surrogate based on collagen/hyaluronan/hydroxyapatite nanoparticles

In an attempt to obtain a material mimicking hard tissue, linear polyethylenimine (LPEI) surface functionalized hydroxyapatite nano-particles (nHApLPEI) were used for the reinforcement of a collagen/hyaluronan based matrix, taking in consideration that polyethylenimine may act as a coupling or dispersing agent. The hybrid matrix containing collagen (Sanimed, Romania), silandiolhyaluronate (Exsimol, Monaco) and nHApLPEI (25 wt% relative to biopolymers) was obtained by cryogelation technique, using glutaraldehyde (PBS solution 0.5%) as a cross-linker. The resulted composite was characterised, in respect to morphological features, swelling and mechanical behaviour, comparative with the neat matrix (containing only biopolymers with a 10:1 w/w ratio collagen:silandiolhyaluronate) and a hybrid sample including commercial HAp (HApc) of similar composition (Aldrich). The used codes were CH10, CH10-HApc25 and CH10-HApLPEI25.

SEM observations correlated with EDAX analysis, evidenced that nano dimensionality and surface functionalization with a dispersion/compatibilizer agent (LPEI) of HAp favoured the uniform distribution of inorganic particles in the polymer matrix (Figure 58), having as a result an improved cohesion and stability.

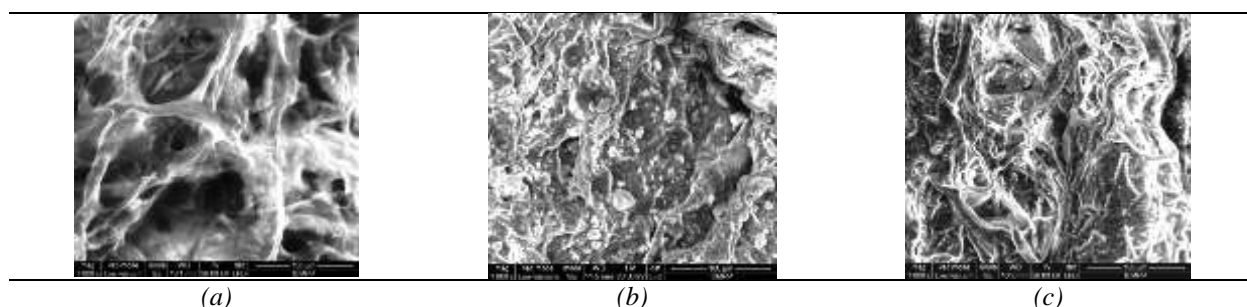


Figure 58. SEM microphotographs of the investigated matrices: (a) without HAp, (b) reinforced with commercial HAp (Sigma – Aldrich), and (c) with LPEI covered nHAp. Scale bar: 100 μm

(A) Characterization of hybrid matrices

The hybrid porous matrices, including biopolymers (collagen, dimethylsilanediol hyaluronate 10 wt% relative to protein - CH10) and nano-hydroxyapatite surface functionalized with polyethylenimine - HAp_{LPEI}, previously prepared, were thoroughly characterized in terms of structural characteristics and mechanical properties, comparative to the biopolymer and biopolymer/commercial nHAp (HAp_c) matrices⁵². All components are biocompatible, osteoconductive and possess bone-bonding ability⁵³. Nano-hydroxyapatite surface functionalized with polyethylenimine was chosen as filler considering the improvement of colloidal stability and of plasmid DNA binding affinity after the nHAP surface modification (Figure 59), as well as the reactive adhesion promoter function of LPEI. The HAp_c or HAp_{LPEI} proportion was fixed to 10% or 25% relative to the total solid content.

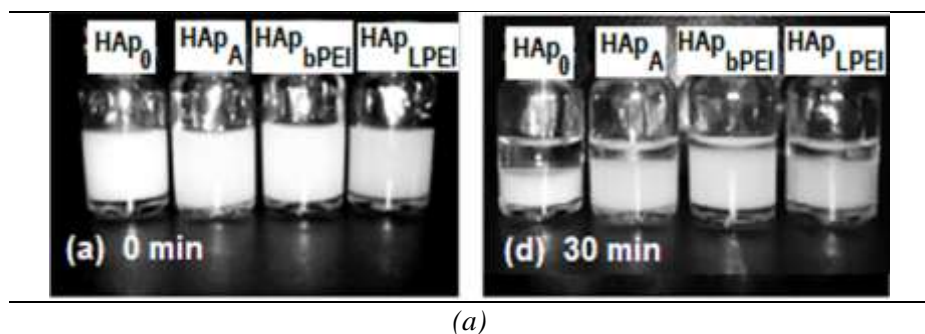
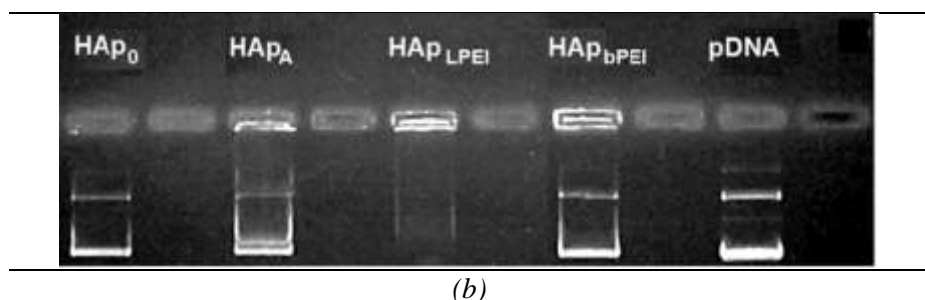


Figure 59. (a) Time-dependent colloidal stability of the surface modified nHAp samples comparative to unmodified nHAp.



(b). Comparative evaluation of the binding affinity of pCS2 + MT-Luc for the functionalized and bare nHAp.

The increased cohesivity induced by LPEI (acting as adhesion promoter) was evidenced by ATR-FTIR data, swelling and mechanical behavior. Thus, AI/AA ratio, related to the cross-

linking degree implying collagen is decreasing in the order CH10 > CH10-HApLPEI10 > CH10-HAp_c10 > CH10-HApLPEI25 > CH10-HAp_c25, while the lowest equilibrium water uptake was obtained for CH10-HApLPEI25 (Figure 60).

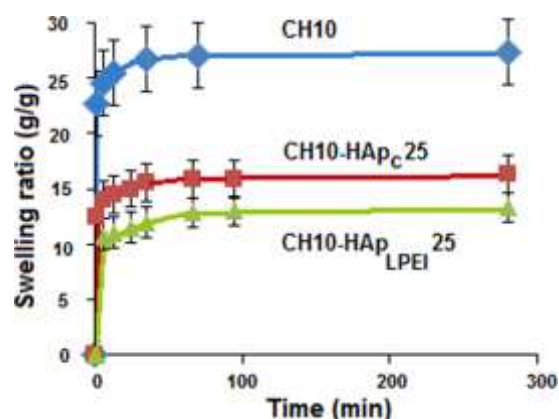


Figure 60. Swelling behavior for the investigated porous matrices: neat sample CH10; the composite with commercial, untreated HAp and the composite with LPEI coated nHAp.

Unconfined compression tests performed on neat and composite samples evidenced that stable, tough and flexible composite hydrogels were obtained, the best performances being registered by adding HApLPEI to ECM biopolymers (collagen and hyaluronic acid derivative). The use of LPEI modified nHAp strongly increased the biocomposites strength comparative to neat biopolymers 3D structures (reinforcing effect) or those including commercial HAp powder (improved nanofiller dispersion and interfacial adhesion between inorganic filler and biopolymer matrix). The filler reinforcing effect was concentration dependent as shown in the Table 12 and Figure 61.

Table 12. Elastic moduli of the equilibrium swollen composite hydrogels.

Sample code	Applied force (N)	Elastic modulus (MPa)	R ²
CH10	100	0.79 ± 0.55	0,998
CH10-HAp _c 10	100	0.90 ± 0.48	0.983
CH10-HAp _{LPEI} 10	100	1.02 ± 0.33	0.997
CH10-HAp _c 25	100	2.70 ± 0.32	0.999
CH10-HAp _{LPEI} 25	100	6.13 ± 0.75	0.997
CH10	450	0.64 ± 0.17	0.998
CH10-HAp _c 10	450	0.87 ± 0.22	0.998
CH10-HAp _{LPEI} 10	450	0.93 ± 0.42	0.999
CH10-HAp _c 25	450	2.31 ± 0.56	0.998
CH10-HAp _{LPEI} 25	450	5.41 ± 1.07	0.999
CH10-HAp _c 25*	450	0.47	0.997
CH10-HAp _{LPEI} 25*	450	2.62	0.998

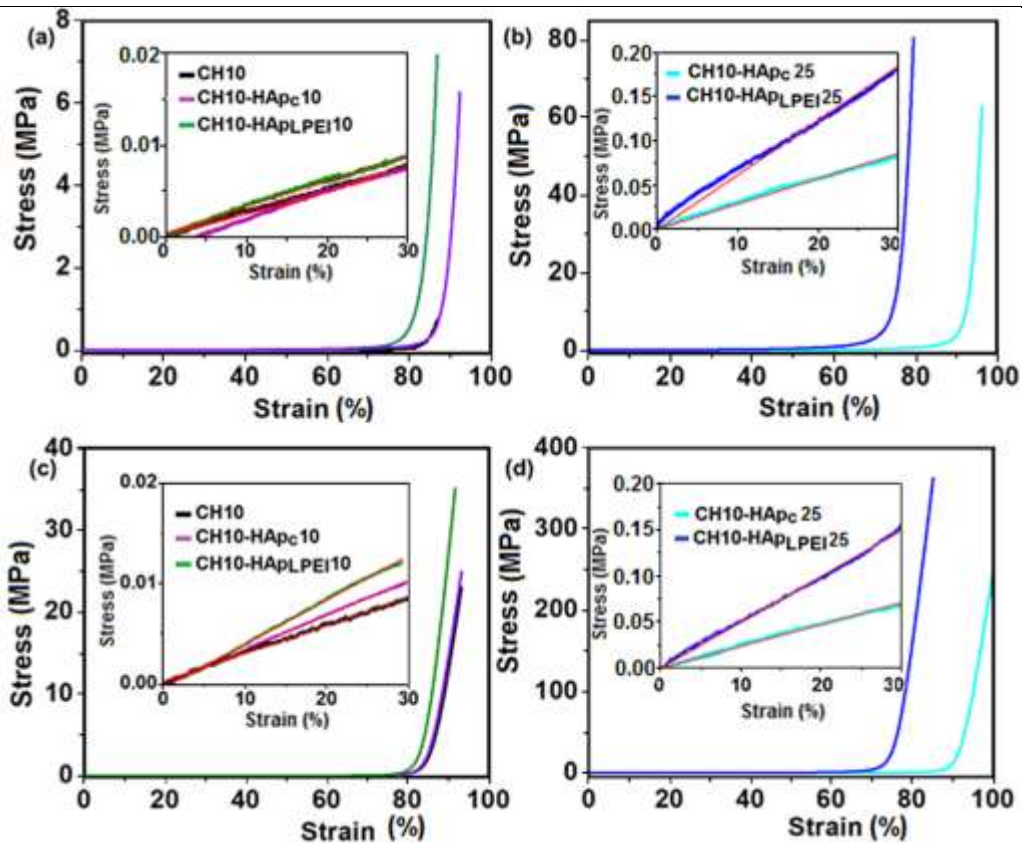


Figure 61. Representative compression stress-strain curves for the studied 3D constructs obtained under uniaxial compression by applying a force of 100 N (a, b) or 450 N (c, d) under a displacement control rate of 1 mm min^{-1} . The insets present the linear dependence of stress-strain curves from which the elastic moduli of all composites were calculated.

The composite sponge HApLPEI-25 revealed high toughness during five consecutive compression tests between 0 and 80% strain without any permanent deformation and cracks, thus proving to be able to provide rapid self-recovery and fatigue resistant behavior (Figure 62).

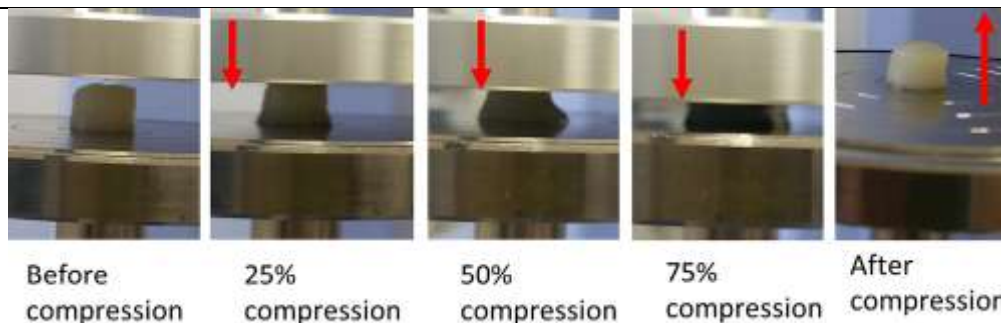


Figure 62. Images of CH10-HAp_LPEI10 behavior during uniaxial compression tests.

Thorough literature studies point on the relation between the increase of compression modulus and the composition (involved polymers), HAp/polymer ratio, the composite preparation method, the cross-linking degree and adopted alternative. The here obtained values are higher (from one to two order of magnitude) than those reported for near enough conditions (HAp amount, protein concentration, porous matrices)^{54,55}.

The results point on the importance of composition, and also of interfacial adhesion. Considering the above mentioned performances, PEI coating of nHAp can be considered one of

the best choices for an interface design solution to generate biocomposites with remarkable mechanical properties. Mechanical strength is critical for materials envisaging the application as scaffolds or models for cartilage/bone repair, tissues under continuous stress, thus such materials are recommended as useful candidates in tissue engineering (i.e for development of scaffolds or mechanically favorable platform for cartilage/ bone tissue engineering studies). The content of hyaluronic derivative, the ECM-like matrix, provides conditions for the study of tumor development / treatment.

(B) Tissue surrogate based on collagen / hyaluronic acid / poly(ϵ -caprolactone)

Aiming the development of 3D collagen-based matrices for laboratory models (drug testing or tissue surrogates) hybrid 3D structures containing natural / synthetic polymers (atelocollagen - hyaluronic acid derivative – poly(ϵ - caprolactone)) were evaluated in respect to swelling (Figure 63) and degradation behavior, water vapor sorption (Figure 64), drug release (Figure 65), comparative to a commercial collagen sponge. Poly(ϵ -caprolactone) derivative was used as a cross-linker and degradation kinetics controller. The hyaluronic acid derivative may induce biological properties and increased hydrophilicity, but also can influence the final material behaviour due to specific interactions with protein and positive charged compounds. The hybrid composition is believed not only to improve some required physico-chemical and biological characteristics of the 3D constructs for such uses, but also may allow a controlled delivery of included drug facilitating the application as biomimetic lab model. The matrices were obtained according to different preparative protocols yielding various morphologies: simple lyophilization (porous); cryogelation (macroporous); vitrigel preparative method – vacuum at room temperature (dense film).

As can be observed from Figures 63 and 64, the water uptake and water vapor sorption rate are decreasing with the PCL cross-linker content, due to the increase of cross-linking density and of hydrophobic/hydrophilic ratio in the matrix. There is an optimum content interval for hyaluronic acid derivative from 2% to 5%. This behavior can be attributed to the competition between the hydrophilicity increase and complexation ability with the collagen, yielding in a supplementary physical cross-linking, with the increase of hyaluronic acid concentration.

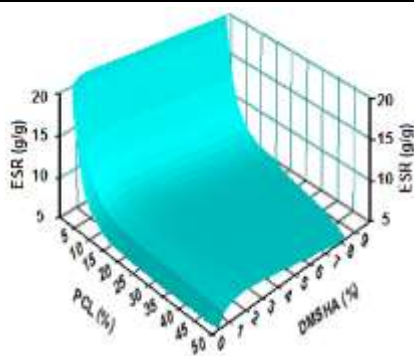


Figure 63. Swelling behaviour of the samples as a function of composition.

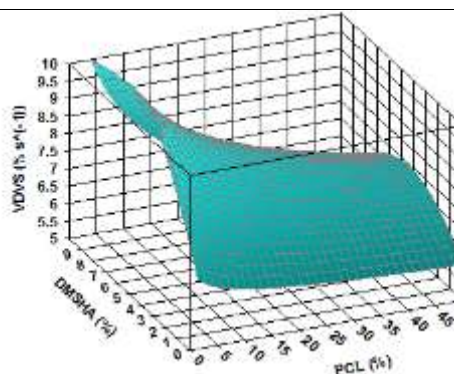
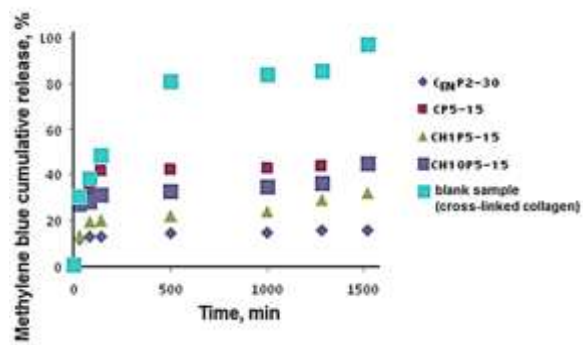
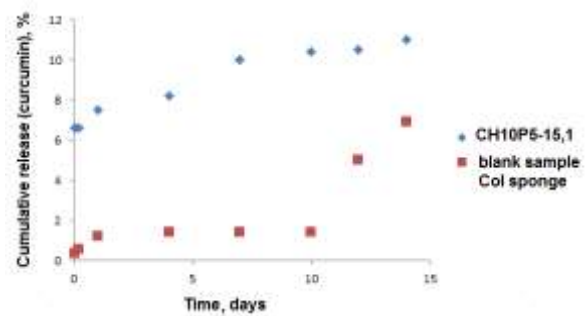


Figure 64. Dynamic water vapor sorption rate dependence on composition.



(a)



(b)

Figure 65. Selected drug models delivery from the hybrid matrices:
(a) Methylene blue; (b) Curcumin.

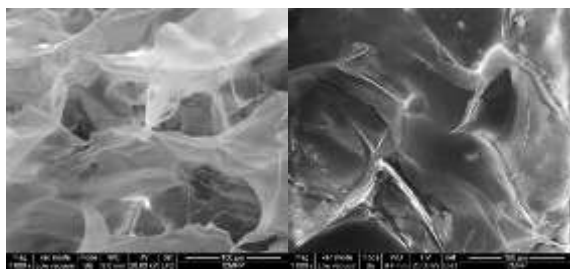


Figure 66. SEM microphotographs of collagen matrix (a) before and (b) after curcumin loading.

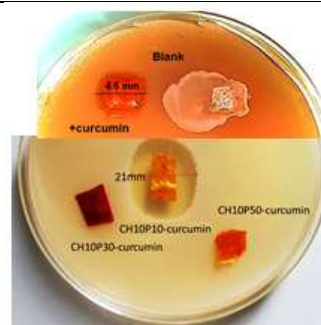


Figure 67. Microbiological tests against *Staphylococcus aureus*.

In respect to the composition, a hydrophilic (methylene blue) and a lipophilic (curcumin) drug model were tested (Figure 65). The hybrid composition can improve the control of drug delivery, and may allow the combination of different drugs for synergic action. Indeed, in the case of methylene blue it assures longer term residence time comparative to the collagen blank sample, the delivery being diffusion controlled, thus dependent on morphology and composition (Figure 65.a). Curcumin is acting as a cross-linker for the collagen matrix embedded in its solution, as can be observed from SEM images for the neat collagen matrix before and after drug loading (Figure 66), where the thickening of the walls of the pores is evident, as well as from the microbiological tests (Figure 67), at macroscopic level. Thus the curcumin loaded materials are releasing the hydrophobic active component mainly by degradation (Figure 65.b). Such matrices may be used to study synergetic effect of curcumin and other drugs. Drug release may be monitorized by composition, cross-linking efficiency (including curcumin loading), morphology (imposed by the preparative protocol).

In conclusion, tissue ingrowth can be maximized by controlling pore size and porosity; thus lyophilized and cryogelated developed materials, with 90-95% porosity, pores of 80-150 μm , containing 2-5% until maximum 10% hyaluronic derivative, and $\leq 10\%$ PCL-DI, are the most recommended for use as scaffolds or lab models for tumor investigation.

(C) Tissue surrogate based on cellulose derivatives

Four types of cellulosic samples, including cotton linters (CL), microcrystalline (CM), never-dried sulfite pulp (CI), and viscose (CV), were tested as potential sources to prepare cellulose-based derivatives, able to be as surrogates for bio-medical testing. In this way, by employing water as a solvent, it can surpass one of the major drawbacks of native cellulose, its recalcitrance towards common solvents. The chosen derivatization procedure implies the chemical oxidation using 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) radical, sodium hypochlorite, and sodium bromide. Following this treatment, each cellulose sample was processed in such a way as to maximize the content of water-soluble fractions. Therefore, for each cellulose type (except viscose), we could isolate three oxidized samples. All of these samples were thoroughly characterized using spectral analyses (FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR), content of negatively charged groups, and degree of polymerization. The morphology of the oxidized products has been evaluated by means of scanning electron microscopy (SEM), and crystallinity was assessed by using X-ray diffraction (XRD). The thermal analyses for the pure and oxidized cellulose samples were also performed. The limit of the solubility in water for the oxidized fractions was checked by using a low-voltage electron microscopy (LVEM).

Due to the longer exposure to the oxidative medium, we expect a large incorporation of the COOH groups into the cellulose, not only on the surface and amorphous regions, but also inside of the crystalline structure. After 24 h, the resulted mixture has been filtered off, and the resulted supernatant was precipitate into a large volume of acetone. The resulted precipitate has been further subjected to purification by dialysis and drying using lyophilization, resulting the first fraction, denoted as fraction I (Figure 68). The remained solid has been dispersed into a large volume of distilled water and left under vigorous stirring for another 24 h. After this time, the clear fraction was decanted and precipitated into acetone, following the same procedure as for the fraction I. In this way, a second fraction (denoted as fraction II) has been isolated. The remained solid fraction collected after decantation, was repeatedly washed with acetone and distilled water, dried under vacuum at 40 °C, resulting in this way, the water insoluble fraction, denoted as fraction III (Figure 68).

The yields of these fractions depend on the cellulose source, varying from about 20% in CL to about 36% in the case of CV sample. The results are in concordance with a previous study, when a nanocellulose sample, extracted from *Cladophora sp.* algae with a crystallinity of 92% was successfully oxidized by TEMPO-NaClO-NaBr system. The yield of the fraction 1 is higher than that of fraction 2 for all cellulose samples, except CM, when fraction 2 is isolated in larger amount, which can be due to the lower DP of the starting material. DO with respect to C6, of the fractions 1, is in all cases 100% which confer them a high solubility in water, fractions 2, are still oxidized in a large proportion at C6 (the DO higher than 80%) also making them water soluble as well, but in a lesser extent. All the fractions 3 are only partially oxidized at C6, the DO being around 20%, which is not enough to ensure their water solubility.

(D) Tissue surrogate based on curdlan

Curdlan and its derivatives are promising candidates for designing medical materials due to their biocompatibility and biodegradability properties. They can be used as solid matrices in different forms, such as hydrogels, beads, micro- or nanoparticles to incorporate drugs or as tissue surrogates.

Hydrogels (HG) with different compositions were obtained by covalent cross-linking of curdlan (C) and phosphorylated curdlan (PC) using 1,4- butandiol diglycidyl ether (BDDE) as a cross-linker, at room temperature for 48h. Studies on the mechanical properties (compression test) and the kinetics and release mechanism of the drug were performed at this stage.

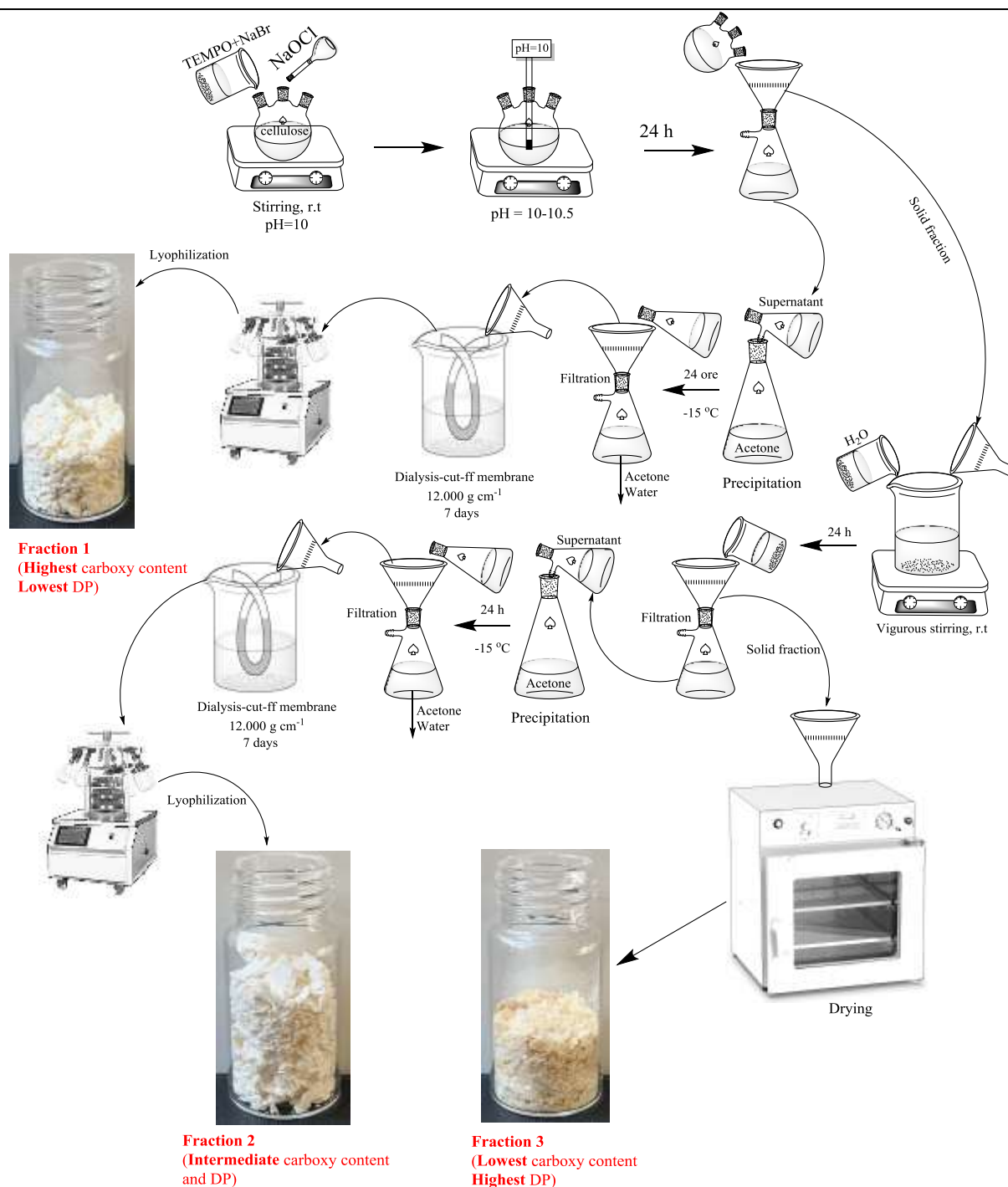


Figure 68. General procedure for the preparation of oxidized cellulose fractions with different water solubility, able to act as surrogates for bio-medical testing.

Mechanical properties (compressive test). The compressive test was performed in order to gain information about the elastic behaviour of the hydrogels by calculation of Young modulus from the slope of almost linear part of the strain – stress curves, between 5 ÷ 15% of compression. The elastic modulus was calculated from stress – strain curves using a Brookfield

Texture PRO CT[®] (Texture Analyser). Immediately after purification, cylindrical hydrogels (about 20 mm in diameter and a height of about 7.5 mm, depending on their swelling capacity) were tested under uniaxial compression till 50% deformation, in unconfined conditions, at room temperature, with a load cell of 4500 g and at 0.05 mm/s speed test. The elastic modulus (E) was calculated using the following equation:

$$E = \sigma/\varepsilon = F/A \cdot l_0/\Delta l$$

where: σ - compressive stress, ε - strain, F - force (N), A - cross-sectional area of the hydrogel (m²), Δl - change in length (m), l_0 - original length (m).

For all samples, non-linear elastic behaviour was observed (Figure 69). By increasing the ionic component in the structure of the hydrogel, the values of the Young modulus decrease from 35.19 kPa to 13.83 kPa (Table 13). After the release of the load, all the samples recovered their original shape even after three cycles at 50% deformation, with one exception: the sample without PC content. In the case of 4C-0PC hydrogel, small fractions appeared even in the first cycle of loading, as seen in Figure 70. This also proved that addition of PC that brings higher porosity also brings elasticity to the hydrogels.

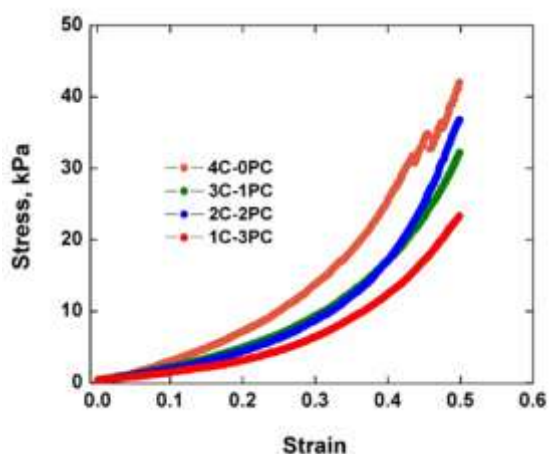


Table 13. Elastic modulus of the hydrogels.

Samples code	Elastic modulus, kPa	R ²
4C-0PC	35.19	0.998
3C-1PC	21.38	0.996
2C-2PC	18.55	0.996
1C-3PC	13.83	0.995

Figure 69. Typical strain-stress curves of C-PC hydrogels.

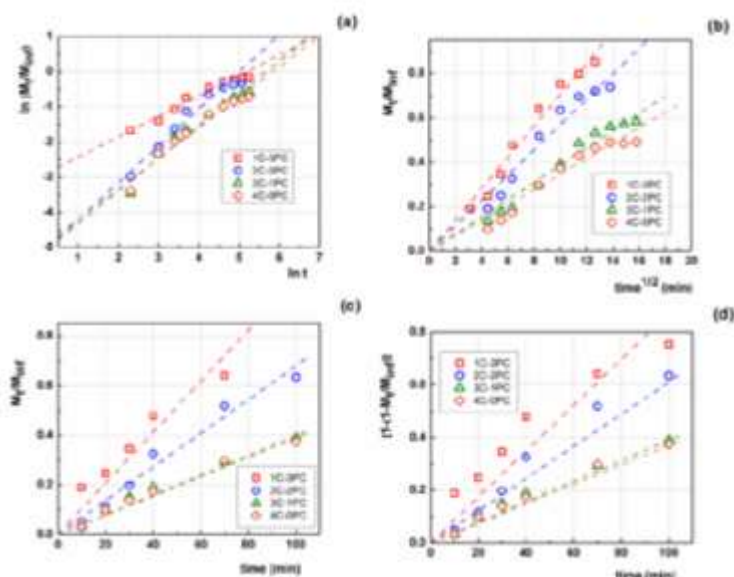


Figure 70. Release dynamics of TCH from loaded C-PC in PB medium (pH 6.8) at 37 °C.

Plots of:

(a) Ritger-Peppas model;

(b) Higuchi model;

(c) zero-order model;

(d) Hopfenberg model.

Table 14. Release parameters corresponding to TCH-loading hydrogels.

Sample code	Ritger-Peppas			Zero-order		Huiguchi - Fickian		Hopfenberg	
	$k_{RP} \cdot 10^2$	n	R^2	k_0	R^2	k_{HF}	R^2	$k_H \times 10^2$	R^2
4C-0PC	0.633	0.809	0.9944	0.0040	0.9826	0.0347	0.9599	0.76	0.9826
3C-1PC	0.530	0.811	0.9946	0.0039	0.9784	0.0387	0.9667	0.88	0.9822
2C-2PC	3.025	0.655	0.9749	0.0068	0.9822	0.0570	0.9535	2.134	0.9784
1C-3PC	4.092	0.640	0.9789	0.0103	0.9164	0.0704	0.9794	4.180	0.9606

Drug transport mechanism. In order to study the TCH transport mechanism from loaded C-PC hydrogels, in this stage, several diffusion models (Ritger-Peppas, zero-order, Higuchi equation and Hopfenberg) were considered to fit the experimental data (Figure 70).

Using the Ritger–Peppas model, the value of the n exponent, significant for the drug transport mechanism, was calculated for all the systems (Table 14). The obtained values between 0.64 and 0.81 are an indication that the drug transport mechanism was anomalous (non-Fickian), meaning that in the polymeric matrix the diffusion process of the drug takes place at the same speed as the relaxation chains process. As was expected, the experimental dates did not fit with the Hopfenberg equation, confirming the results obtained from the hydrolytic stability (stage 2019 of 5D-nanoP project), when no significant degradation of the polymer matrix were observed after 30 days of immersion in PB, pH=6.8.

In conclusion ionic hydrogels loaded with tetracycline hydrochloride were prepared by chemical cross-linking of curdlan and its phosphorylated derivative with BDDE. The drug loading and the drug release is influenced by the amount of ionic polysaccharide in the hydrogels. The mathematical approach indicated that the drug transport mechanism was an anomalous diffusion mechanism, meaning that in the polymeric matrix the diffusion process of the drug takes place at the same speed as the relaxation chains process. Also, the increase of the ionic component in the structure of the hydrogel leads to the decrease of the values of the Young module. These results are useful in further development of ionic hydrogels for local drug delivery systems.

(E) Evaluation of the functionality of extracellular matrices at the level of cultured cells and cell-populated surrogates

In recent years, various biomaterials containing alginate or poly (ethylene glycol) have been proposed for tissue regeneration, in applications such as drug administration and wound healing⁵⁶. It has also been observed that various heat-sensitive injectable hydrogels developed to date have not shown cytotoxic effects on cultured cells and many of these gels have been proposed for various biological applications⁵⁷⁻⁵⁹.

The activity aims to evaluate the functionality of some developed nanoplateforms at the cultured cell level. To fulfill the objective of this activity, in vitro studies on two human cell lines were performed; keratinocytes HaCaT for Alg-SH/PL-DA hydrogel and skin fibroblasts 153BR for CMPox 4.

(E.1) Biological evaluation of Alg-SH/PL-DA hydrogel

Methods

Human keratinocytes (HaCaT cell line) were used for that purpose. HaCaT cells were cultured in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 0.45% glucose supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 units/mL penicillin/streptomycin (complete medium) at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

M.1. Cell viability assay

The lyophilized Alg-SH/PL-DA (code S1) hydrogel was cut into small pieces (2 mm x 2 mm x 1 mm), weighing about 0.98 ± 0.059 mg, placed into a sterile 24-well culture plate, subjected to a washing procedure for 48 hours and sterilized for ten minutes under UV light.

The 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) viability assay was used to determine the HaCaT cell proliferation in the presence of S1 hydrogel during for 4 days of incubation. To evaluate the indirect effect of the Alg-SH/PL-DA hydrogel on cell viability and proliferation, 5×10^4 HaCaT cells were seeded in a 24-well polystyrene culture plate using complete phenol red-free DMEM. The hydrogel pieces were incubated in the wells containing cell culture. As a control, the cells seeded in the absence of hydrogels were used. The HaCaT cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24, 48, 72, and 96 hours, without medium replacement. After each time point of incubation, the culture medium was collected. Then, the cells were exposed to XTT-PMS for 3 hours. The intensity of formazan was detected at 450 nm, using the absorbance-based microplate reader, TECAN Infinite M200Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) and is proportional to the number of viable cells.

M.2. Flow cytometry-based quantification of TNF- α release

1×10^5 cells/mL HaCaT cells were seeded on a 24-well culture plate. After 24 hours attached cells were unstimulated or stimulated with LPS (100 ng/ml LPS) for another 24 hours. After that, cells were exposed for different intervals to a medium containing Alg-SH/PL-DA hydrogel (0.98 ± 0.059 mg) or with corresponding concentrations of Alg-SH (0.238 mg/mL Alg-SH, 12.2% of Alg-SH in hydrogel) and PL-DA (1.720 mg/mL PL-DA, 87.8% of PL-DA in hydrogel). As controls, untreated cells and cells exposed to anti-inflammatory agent

dexamethasone (Dexa, 2.5 μ M) were used. The TNF- α quantification was performed by Flow cytometry (Gallios Flow Cytometer Beckman Coulter).

M.3. Live/dead cell viability assay

Cells subjected to former procedures were stained with calcein AM/ propidium iodide (PI) dyes. The Calcein AM is a fluorescent dye that marks the live cells in green, while propidium iodide (PI) stains the dead cells in red. The fluorescent images were acquired with an Inverted Microscope Olympus IX81.

M.4. Western blotting analysis

The LPS-stimulated HaCaT cells exposed to Alg-SH/ PL-DA hydrogel, Alg-SH, PL-DA, and Dexa were processed for cellular lysis. 50 μ g total protein of cell lysates were loaded on a 5-20% SDS-PAGE gel electrophoresis and then transferred to a 0.45 μ m nitrocellulose membrane and blocked with 1% BSA for 1 hour. The membrane was incubated overnight with the primary antibody: rabbit anti-NF- κ B and rabbit anti-phospho-ERK, mouse anti-total ERK, and β -actin. Immunoblot detection was done using the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG) and the ECL substrate. Western Blotting images were acquired with the G: Box Chemi XX6 System analyzer.

Results

R.1. Cell viability evaluation

The XTT assay revealed that the Alg-SH / PL-DA (S1) hydrogel is non-cytotoxic and the components released by it promote cell proliferation in a time-dependent manner (Figure 71).

R.2. Anti-inflammatory potential of Alg-SH/ PL-DA hydrogel

From calcein AM/ PI staining it was observed that hydrogel and its precursors do not affect the viability of LPS-stimulated keratinocytes (Figure 72). Moreover, it has been observed that the hydrogel has an anti-inflammatory effect manifested by lowering the basal levels of TNF- α , an effect due to the Alg-SH and PL-DA components that are released into the environment gradually over time as a result of hydrolytic and enzymatic degradation (Figure 73).

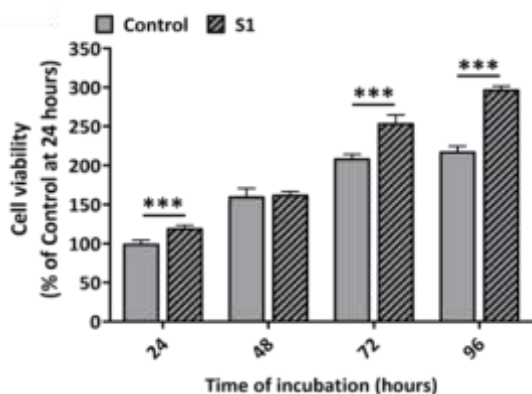


Figure 71. Viability of HaCaT cells incubated in the absence (control) and in the presence of Alg-SH/PL-DA (S1) hydrogel.

The results were expressed as percent (%) of control cells incubated for 24 hours in the absence of the hydrogel.

*** $p < 0.001$, *** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

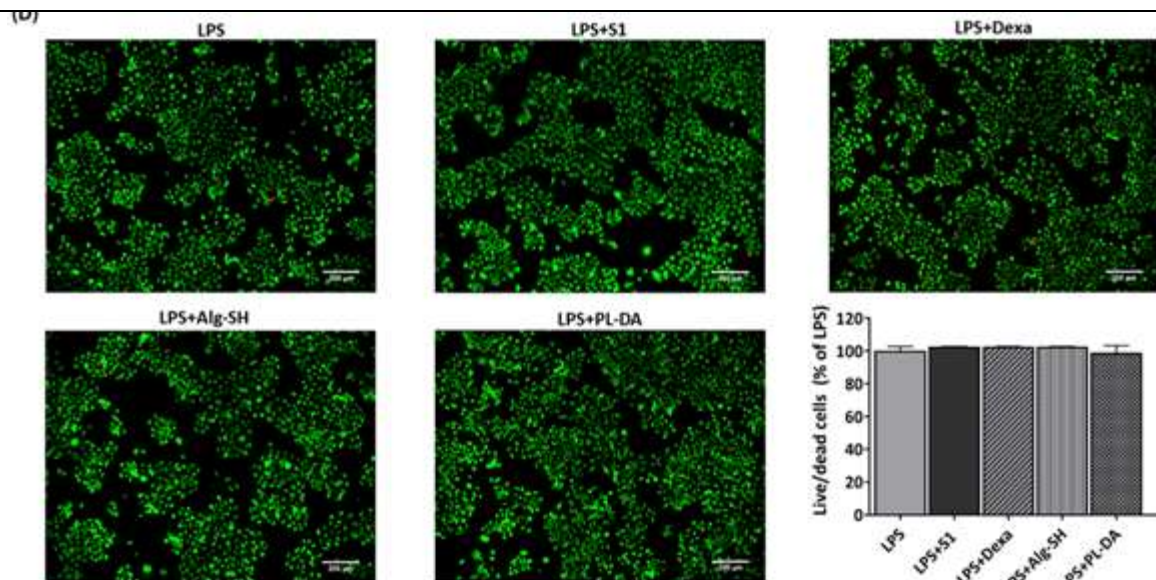


Figure 72. Merged images of calcein-AM (green) and propidium iodide (red) staining and graph showing the cell viability expressed as a percentage of live (green)/dead (red) cells of LPS-stimulated HaCaT cells, measured at 48 hours after treatment with the hydrogel, dexamethasone, Alg-SH, and PL-DA (D). Scale bar: 200 μ m.

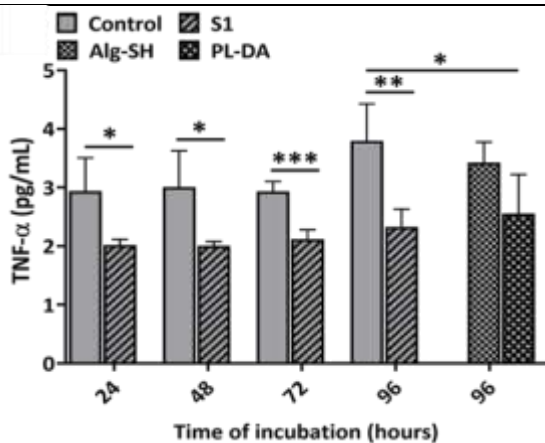


Figure 73. The tumor necrosis factor (TNF)- α levels released by HaCaT cells.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

The hydrogel also reduces the pro-inflammatory effect of LPS by decreasing the released TNF- α levels and the intracellular levels of the phosphorylated form of MAPK ERK and nuclear factor NF- κ B (Figure 74).

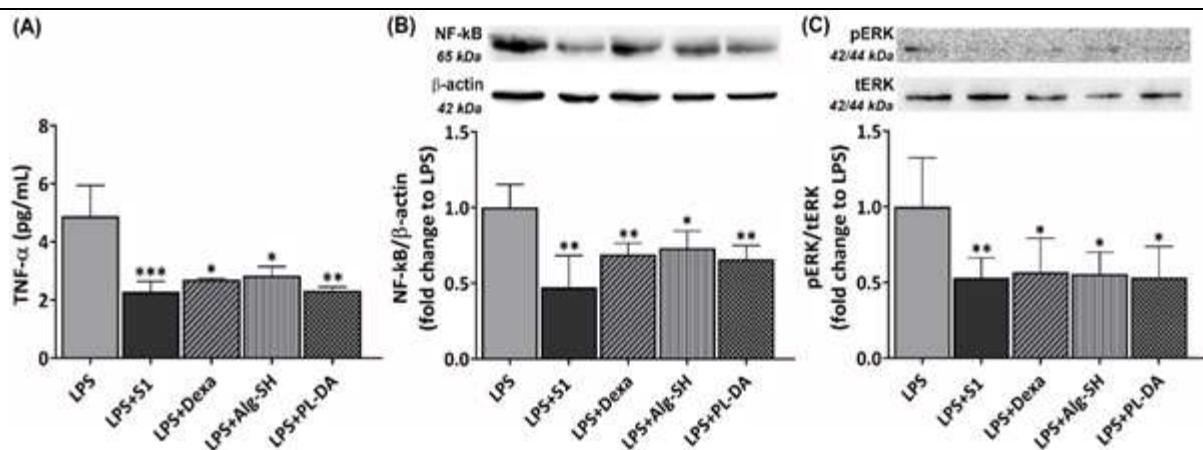


Figure 74. The tumor necrosis factor (TNF)- α levels (A). The nuclear factor (NF)- κ B (B) and the phosphorylated form of extracellular signal-regulated kinases (ERK) (C) protein expression. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ versus LPS.

(E.2) Biological evaluation of Alg-SH/PL-DA hydrogel grafted with poloxamer 407 (CMPox 4)

Methods

M.1. Cell culture

The human skin fibroblasts (153BR cell line from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC 90011808), Sigma-Aldrich Co.) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.45% glucose, 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin and streptomycin (100 U/mL). The cells were plated on standard sterile Petri dishes (TPP® Tissue Culture Plates) and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The confluent 153BR cells were subcultured every 2-3 days by 0.25% trypsin/0.5 mM EDTA treatment.

M.2. Cell viability assay

The effect of poloxamer 407- grafted pullulan on the viability of human skin fibroblasts was determined using the XTT assay, using the adapted protocol previously described. The fibroblasts (5x10⁴ cells/mL) were seeded in a 96-well culture plate and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 24 hours, the cells were treated with different concentrations of pullulan hydrogel, ranging from 0.3125 to 10 mg/mL, and further incubated for 24 and 48 hours. At each experimental time point, untreated cells were used as control. At the end of incubation time, the cells were washed two times with phosphate buffer saline (PBS) and 100 μ L of phenol red-free DMEM containing XTT reagent and phenazine methosulfate (PMS) were added for 2 hours. Then, the absorbance of the soluble formazan derivative was measured at 450 nm using the Tecan Infinite M200 plate reader. The results were expressed as a percentage of the untreated cells (control) at 24 hours, which was considered 100%.

M.3. Cytotoxicity assay

To assess the potential cytotoxicity of poloxamer 407- grafted pullulan on the human skin fibroblasts, the live/dead fluorescence staining assay was performed⁶⁰. The fibroblasts were seeded at a cell density of 5x10⁴ cells/mL in 96 well plates and incubated in the presence of pullulan hydrogel for 24 and 48 hours. Then, the fibroblasts monolayer was washed twice with

PBS and then incubated at 37 °C with calcein-AM and propidium iodide (PI) mixture for 10 minutes. The viable cells will emit a green fluorescence as a result of calcein-AM staining, while dead cells will be stained by propidium iodide (PI) and emit red fluorescence. Microscope images were recorded using the Inverted Microscope Olympus IX81 equipped with fluorescence filters for green and red fluorescence.

M.4. Cell morphology studies

Phase-contrast imaging was performed on the fibroblasts to visualize the cellular morphology of cells treated for 24 and 48 hours with 1.25 mg/mL pullulan hydrogel as compared to untreated cells. After treatment, the cells were twice washed with PBS and microscopically examined using the Inverted Microscope Olympus IX81.

M.5. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard deviation (SD) of three different independent experiments, by using the GraphPad Prism 7 software application. Differences, calculated by unpaired Student's t-test (two-tailed) formula, were considered statistically relevant when $p < 0.05$.

Results

R.1. Cell viability evaluation

The XTT assay was performed for human skin fibroblasts treated with various concentrations of polymer (0.3125–10 mg/mL) for 24 and 48 hours and compared with control, untreated cells (Figure 75).

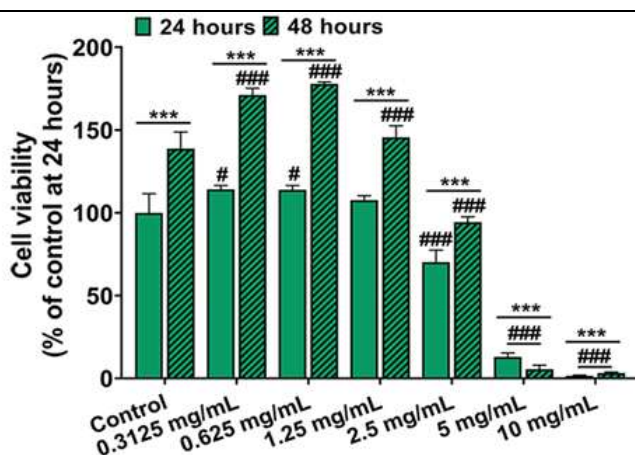


Figure 75. Human skin fibroblasts viability after treatment for 24 and 48 hours with various concentration of polymer. *** $p < 0.001$ for comparisons between 48 and 24 hours; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ for comparison with control cells at 24 hours.

The results show that, at concentrations between 0.3125 and 2.5 mg/mL, the poloxamer 407-grafted pullulan promotes the proliferation of fibroblasts at 48 hours compared to 24 hours (by ~60% for 0.3125 mg/mL, ~ 55% for 0.625 mg/mL, ~ 35% for 1.25 mg/mL, and ~ 25% for 2.5 mg/mL, $p < 0.001$). This trend was also observed in the case of the control cells after 48 hours (~ 40%, $p < 0.001$) compared to control at 24 hours, still, the cell proliferation was lower compared to cells treated with 0.3125 mg/mL and 0.625mg/mL pullulan solutions. At 24 hours, 1.25 mg/ml pullulan solution does not affect the viability of tested cells compared to corresponding control cells, while at 2.5 mg/mL the pullulan hydrogel reduces cell viability by ~ 30% ($p < 0.001$) (Figure 75).

At concentrations of pullulan equal or higher than 5 mg/mL, the cell viability decreased significantly. Thus, the viability was below 20% for 5 mg/mL and below 5% for 10 mg/mL concentrations at both 24 and 48 hours compared to control cells ($p < 0.001$).

The XTT assay data were supported by live/dead cell images (Figure 76.A) and cell morphological assessment (Figure 76.B), showing no cytotoxic effect, for both time points, at polymer concentrations up to 1.25 mg/mL. In good agreement with the viability results, a slight cytotoxicity can be observed when using the 2.5 mg/mL polymer concentration. The exposure of cells to concentrations higher or equal to 5 mg/mL determine an increased cytotoxic effect, with almost no viable cell detected for 10 mg/mL concentration (Figure 76.A).

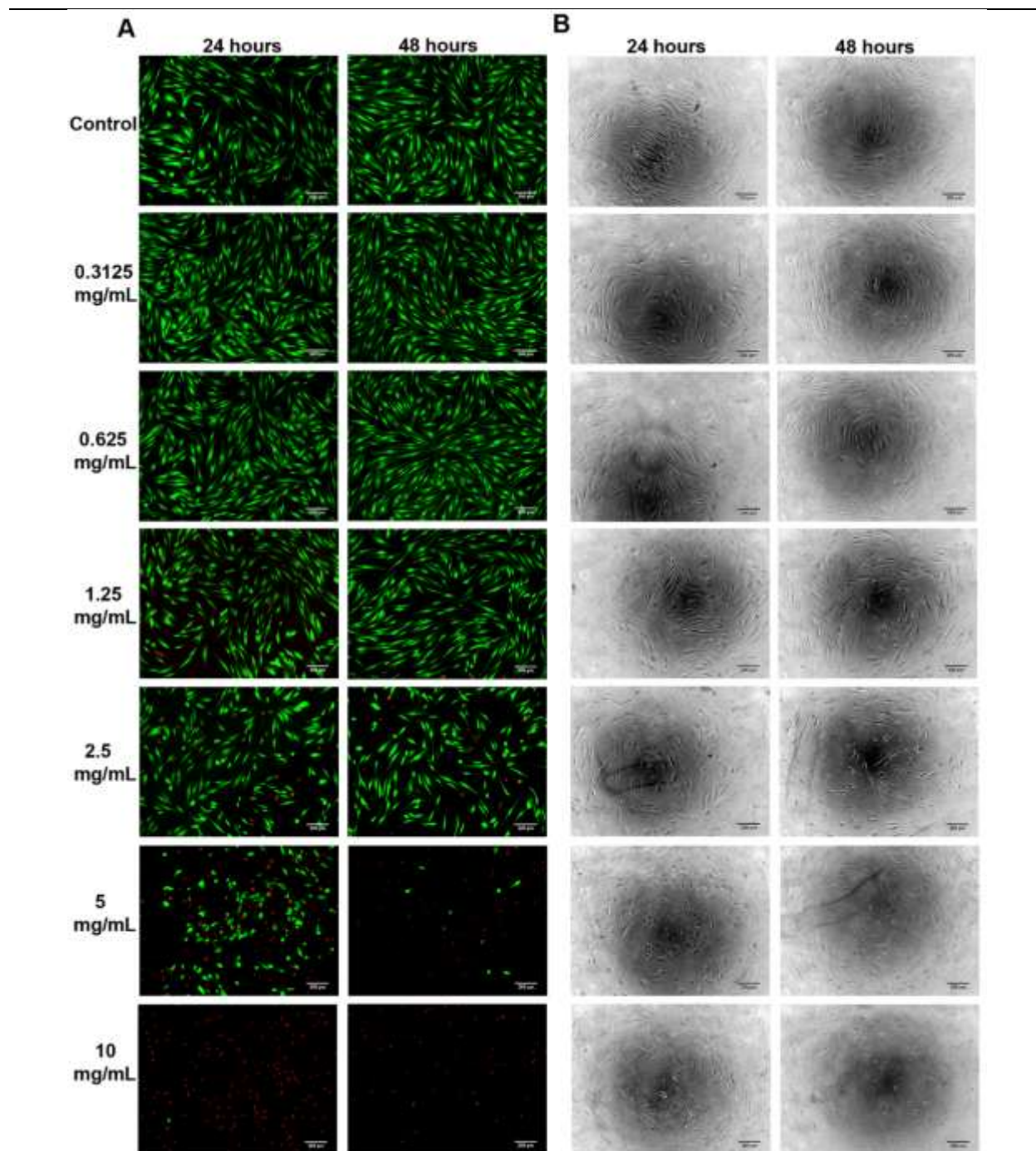


Figure 76. Merged live (green) / dead (red) cell images (A) and cell morphology (B) of fibroblasts exposed to various polymer concentrations. Scale bar: 200 μm .

Conclusions

C.1. The novel alginate/poloxamer hydrogel promotes keratinocyte proliferation in a time-dependent manner and diminishes the levels of the released TNF- α both in the case of the quiescent and LPS-stimulated cells by a mechanism which implies the inhibition of ERK phosphorylation and the reduction of NF- κ B synthesis.

C.2. The poloxamer 407- grafted pullulan has a pro-proliferative effect on human skin fibroblasts at concentrations between 0.3125 \div 1.25 mg/mL during 48 hours of incubation and high cytotoxicity at concentrations above 2.5 mg/mL. The hydrogel does not modify the cellular morphology of fibroblasts at non-cytotoxic concentrations. Thus, the new poloxamer 407-grafted pullulan has a good cytocompatibility and may be used as a good biomaterial per se in cartilage tissue engineering for the treatment of degenerative joint diseases.

A.3.5. Preliminary study of the functionality of nanoplatfoms

The two most commonly used culture systems for testing anti-tumor drugs are conventional two-dimensional (2D) growth medium and three-dimensional (3D) tumor models, which include spheroids, cell multilayers, matrix cultures, bioreactors, and microfluidic devices. Despite inconclusive results on the action of different drugs in various human cancers, 2D cell culture remains the most widely used in the early stages of drug screening and testing. Although the development of 3D systems involves high costs, their complexity has limited the use of 2D media for drug screening and significantly reduced laboratory animal studies^{61,62}.

Moreover, to accomplish this activity, the hyaluronic based-hydrogel namely HA3P50 (provided by the partner P3 team led by Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin), where “3” is the concentration of both polymers (% w/v) in the initial mixture, and “50”, the P(MVE-alt-MA) content (% w/w) was evaluated as a 3D support for hepatocyte carcinoma (HepG2) cells growth to obtain surrogate tumor platforms for further drug-screening studies. The capability of the hydrogel to sustain the adhesion of HepG2 cells was examined by a cell counting method and SEM analysis. Besides, the hydrogel’s cytocompatibility was investigated over 21 days-period by three different methods (i.e. the XTT test, ToxiLight cytotoxicity assay, and live/dead cell assay).

Methods

M.1. Cell culture

Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA).

For 2D cell culture, HepG2 cells were routinely grown in polystyrene cell culture plates using Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) with 0.45 % glucose, supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, and 100 units/ml streptomycin and was maintained at 37 °C in an incubator with a 95 % humidified atmosphere of 5 % carbon dioxide in the air. For sub-culturing, cells were trypsinized using a 0.25 % trypsin solution with 0.5 mM EDTA, according to the ATCC protocols. In experiments, 2D supports consisting of 24-wells cell plates (diameter = 15.6 mm) were seeded with HepG2 cells at a density of 2.5×10^5 cells/well.

The 3D cell culture was performed as follows. The hydrogel chosen for biological assessment was HA3P50, where “3” is the concentration of both polymers (% w/v) in the initial mixture and “50”, the P(MVE-alt-MA) content (% w/w). Pieces (approx. 2 mm × 2 mm × 1 mm) of lyophilized HA3P50 hydrogels were cut under a stereomicroscope and then weighed and sterilized by exposure to UV radiation for 3 minutes on each side. Without any washing procedure, the hydrogels were populated with HepG2 cells at a cell density of 2.5×10^5 cells/3D support by spotting 10 μ L of cell suspension.

M.2. Cell adhesion assay

Cell counting method. The cell adhesion assay was adapted from Deng et al.⁶³ with slight modifications. HepG2 cells were seeded in 2D and 3D supports as described above, and next incubated for 4 and 24 hours at 37 °C. Then, the hydrogels were carefully moved into new wells and washed 3 times with PBS (pH = 7.4) to remove non-adhered cells. Further, the hydrogels containing cells were immersed in a solution containing 0.25 % trypsin and 0.5 mM EDTA and placed in the incubator at 37°C for 10 minutes. The released cells were spin down (5 minutes, 4°C, 1050 rpm), stained with Trypan blue⁶⁴ and the viable cells were counted using the hemocytometer and a light microscope. The cells seeded on 2D supports were also subjected to the PBS washing procedure, trypsinization, Trypan blue exclusion assay and counting. The number of adhered cells was normalized to the 2D and 3D support area. The area (A) of 2D and 3D supports was calculated according to equations 5 and 6:

$$A_{2D} = \pi \cdot r^2 \quad (5)$$

$$A_{Hydrogel} = 2 (L \cdot l + L \cdot h + l \cdot h) \quad (6)$$

where L, l, and h are the length, the width, and the height, respectively, π is 3.141, and r is the radius of the culture well. Two independent cell adhesion experiments were carried out in duplicate.

SEM microscopy. The morphology of HepG2 cells as well as their adhesion and spread into the HA3P50 hydrogel were investigated at D1, D7, D14, and D21 using the ESEM technique (Quanta 200). At the end of each time, cell-populated hydrogels were relocated into new wells, washed twice with PBS, fixed in 4 % PFA for 90 minutes at 4 °C, and preserved in PBS at 4 °C until SEM observations were performed.

M.3. Cytotoxicity evaluation

XTT assay. The viability of HepG2 cells grown in the HA3G50 hydrogel was investigated with the XTT colorimetric assay, following the conversion of 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) into orange formazan by the metabolically-active cells in the presence of the reducing agent phenazine methosulfate (PMS). 2.5×10^5 HepG2 cells were added to HA3P50 hydrogels and 2D supports and incubated at 37 °C, for 1 day (D1, taken as the control), 7 days (D7), 14 days (D14), and 21 days (D21). At 24 hours after seeding (D1), the hydrogels were relocated into new wells and the culture medium was refreshed every 2-3 days. Cell populated hydrogels were examined after medium replacement by light microscopy (ZEISS Microscope). At each time point, cell-populated hydrogels and 2D supports were washed with PBS followed by incubation with a 250 μ l mixture

containing XTT (0.25 mg mL⁻¹) and PMS (0.025 mM) in colorless DMEM, for 3 hours at 37 °C. The intensity of the orange colour of formazan in the medium was quantified spectrophotometrically by measuring the absorbance at 450 nm using a TECAN Infinite M200Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The results were expressed as a percentage of values obtained from cells seeded on 2D supports incubated for 24 hours (D1) and normalized to Ahydrogel and A2D, respectively. Two independent viability experiments were performed in duplicate.

ToxiLight cytotoxicity bioassay. For cell toxicity assay we used a highly sensitive bioluminescent, non-destructive assay kit (ToxiLight™ BioAssay Kit) designed to measure the release of the enzyme, adenylate kinase (AK), from the cell supernatant of damaged cells. The AK levels were measured in the medium collected in the first day (D1) and day 21 (D21) after seeding of cells in HA3P50 hydrogels and on the 24-well plates (2D supports) at a density of 2.5×10⁵ HepG2 cells/hydrogel or 2D support. At each time point, the cells were subjected to radio immune-precipitation assay buffer (RIPA) lysis, sonicated, and centrifuged at 10.000xg, at 4°C, for 10 minutes. The total protein content (mg/mL) was assessed by BCA colorimetric method and was used for normalization.

M.4. Live/Dead viability/cytotoxicity assay

We also used another method to investigate the potential cytotoxicity of HA3P50 hydrogel, i.e. live/dead fluorescence staining assay. The same seeding density of cells (2.5×10⁵ cells) was used for HA3P50 hydrogel (3D) or 2D support. After culturing for 1 day and 21 days, the cells grown in both 3D and 2D were stained with a live/dead cell double staining kit accordingly to the manufacturer's instructions. Thus, viable cells are stained by calcein-AM, emitting a strong green fluorescence, whereas dead cells are stained by propidium iodide (PI) and emit red fluorescence. A Z-stack acquisition image series were recorded using the Inverted Microscope Olympus IX81 equipped with fluorescence filters to detect green and red fluorescence. The 3D reconstruction images were generated using Image J software (developed at the National Institutes of Health (NIH), USA) to give a 3D representation of cell viability and infiltration within the hydrogel.

M.5. Statistical analysis

The results are reported as mean ± standard deviation. Statistical evaluation was carried out by unpaired Student's t-test (two tailed) using the GraphPad Prism 7 software. Differences were considered statistically relevant when $p < 0.05$ and statistically highly relevant when $p < 0.001$.

Results

R.1. In vitro biocompatibility of the HA³P50 hydrogel

To evaluate the biocompatibility of the HA3P50 hydrogel, the HepG2 cells were seeded into the hydrogel; then, cell adhesion and viability were investigated over time. The effect of HA3P50 hydrogel on the HepG2 cells morphology and adhesion was investigated by SEM. The experimental design and the stereomicroscopic image of lyophilized HA3P50 hydrogel using a Zeiss stereomicroscope are depicted in the Figure 77.A.

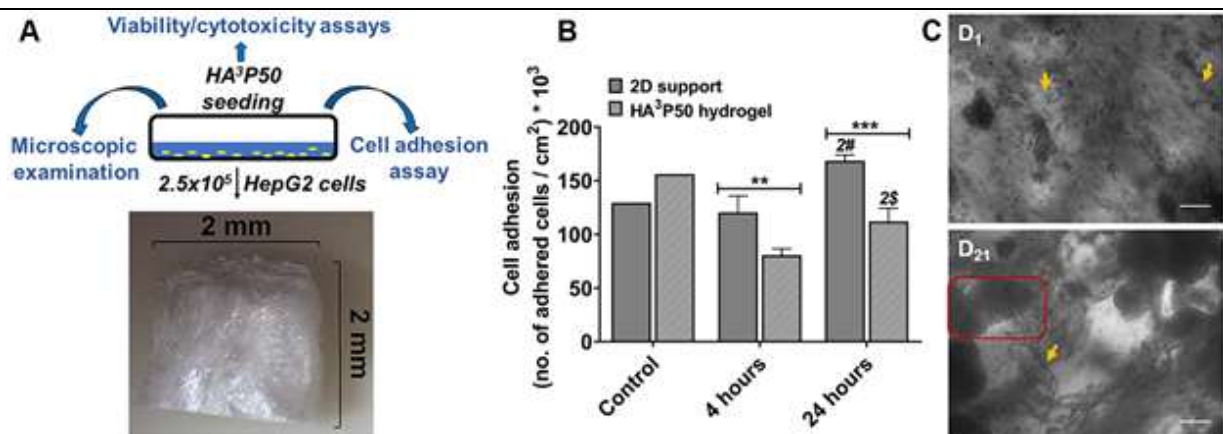


Figure 77. (A) The schematic representation of the experimental procedure. (B) Cell number of HepG2 cells seeded on the 2D support and HA3P50 hydrogel counted at two adhesion times (4 and 24 hours). Data are reported as means \pm SD. „Control” represents the number of seeded cells normalized to the areas of the 2D support and of the 3D hydrogel. ^{2#} $p < 0.01$ when comparing 2D at 24 versus 4 hours, ^{2s} $p < 0.01$ for HA3P50 hydrogel at 24 versus 4 hours, $** p < 0.01$ and $*** p < 0.001$ for the HA3P50 hydrogel versus the 2D support at 4 hours and 24 hours, respectively. (C) The light microscopy images of cell populated hydrogels are taken on day 1 and day 21. Individual cells can be seen as small dots (yellow arrows), whereas at day 21 of cell culturing, large clusters of cells are observed (red square). Scale bar: 200 μ m.

R.2. Cell adhesion assay

HepG2 cells growth on HA3P50 was investigated by a cell counting method at 4 and 24 hours after seeding. Although HepG2 cells adhere to the HA3P50 hydrogel 4 hours after cells seeding, the number of cells adhered to the hydrogel is significantly lower than that of cells grown on the 2D support (ca. 33 %, $p < 0.01$) (Figure 77.B). However, the ratio between the number of cells recovered from hydrogel at 24 and 4 hours is approximately the same ($= 1.4$) for both hydrogel and 2D support (Figure 77.B). Thus, HepG2 cells proliferate rapidly in the 4-24 hours time interval either on 2D support or on HA3P50 hydrogel (Figure 77.B). The light microscopy images of cell populated hydrogels taken on day 1 and day 21 (Figure 77.C) reveal the individual and small groups of cells that adhered to the HA3P50 fibers observed at D1 (pointed by yellow arrows), while after 21 days of culturing, cells proliferate leading to the formation of cell clusters (depicted by the red square). The adhesion of the HepG2 cells to the hydrogel may occur mainly through HA residues. Accordingly, the adhesion of hepatocytes increases to a chitosan matrix by adding HA⁶⁵. These data indicate that HA3P50 is not a non-cytotoxic 3D support for HepG2 cells, ensuring cell interaction and proliferation.

R.3. Cell morphology examination

To investigate the cell attachment to the hydrogel fibers and their spreading into the hydrogel crevices, HepG2 cells were seeded onto the HA³P50 hydrogel and incubated at 37 °C for 1, 7, 14, and 21 days. The SEM analysis revealed the attachment of cells onto the hydrogel fibers 24 hours after seeding (Figure 78, yellow arrows). Subsequently, cell proliferation into the HA³P50 network and the formation of the cell clusters occur over a longer period (Figure 78, red squares). Cells were observed both on the surface and into the inner crevices of the hydrogel. Moreover, cell-clusters in the beads-like arrangements were firmly attached to the hydrogel

fibers, were homogeneously distributed inside the hydrogel, and proliferated into the inner crevices of the HA³P50 hydrogel in a time-dependent manner, indicating the absence of toxic degradation products.

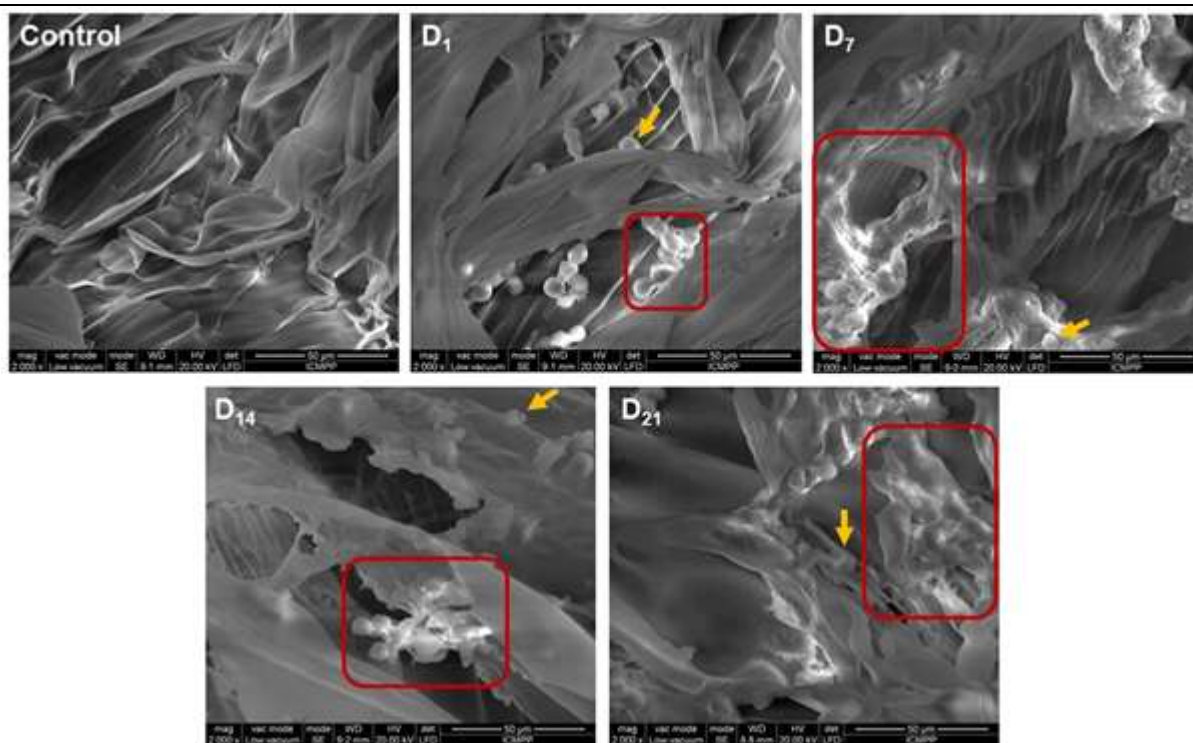


Figure 78. Scanning electron micrographs of HA³P50 hydrogel populated with HepG2 cells at 1 day (D₁), 7 days (D₇), 14 days (D₁₄), and 21 days (D₂₁) after seeding. Yellow arrows indicate cells adhered to the hydrogel fibers while red squares depict the formation of cell clusters. Scale bar: 50 μm.

R.4. Viability/cytotoxicity assays

The effect of the HA³P50 hydrogel on the viability of HepG2 cells was investigated by the XTT assay and confirmed using ToxiLight cytotoxicity bioassay and live/dead cell assay (Figure 79). The culturing of HepG2 cells in HA³P50 hydrogel induces a significant reduction in cellular viability at 24 hours after seeding (44%, $p < 0.001$) as compared to 2D support (Figure 79.A). This result is in agreement with the cell adhesion assay (Figure 77.B) and is further supported by the cytotoxicity test, revealing an increased release of AK from HepG2 cultured on HA³P50 hydrogel (Figure 79.B), and the percentage of live to dead cells (Figure 79.C and 79.D). One possible explanation of the difference in cell viability between 3D and 2D supports could be that, in the first 24 hours, in the HA³P50 hydrogel, the cells adhere first to the hydrogel's fibers, that are located at a certain distance and form the pores, and the number of adherent cells is lower as compared to that of 2D support which has the whole surface available for cell adhering (1.9 cm²).

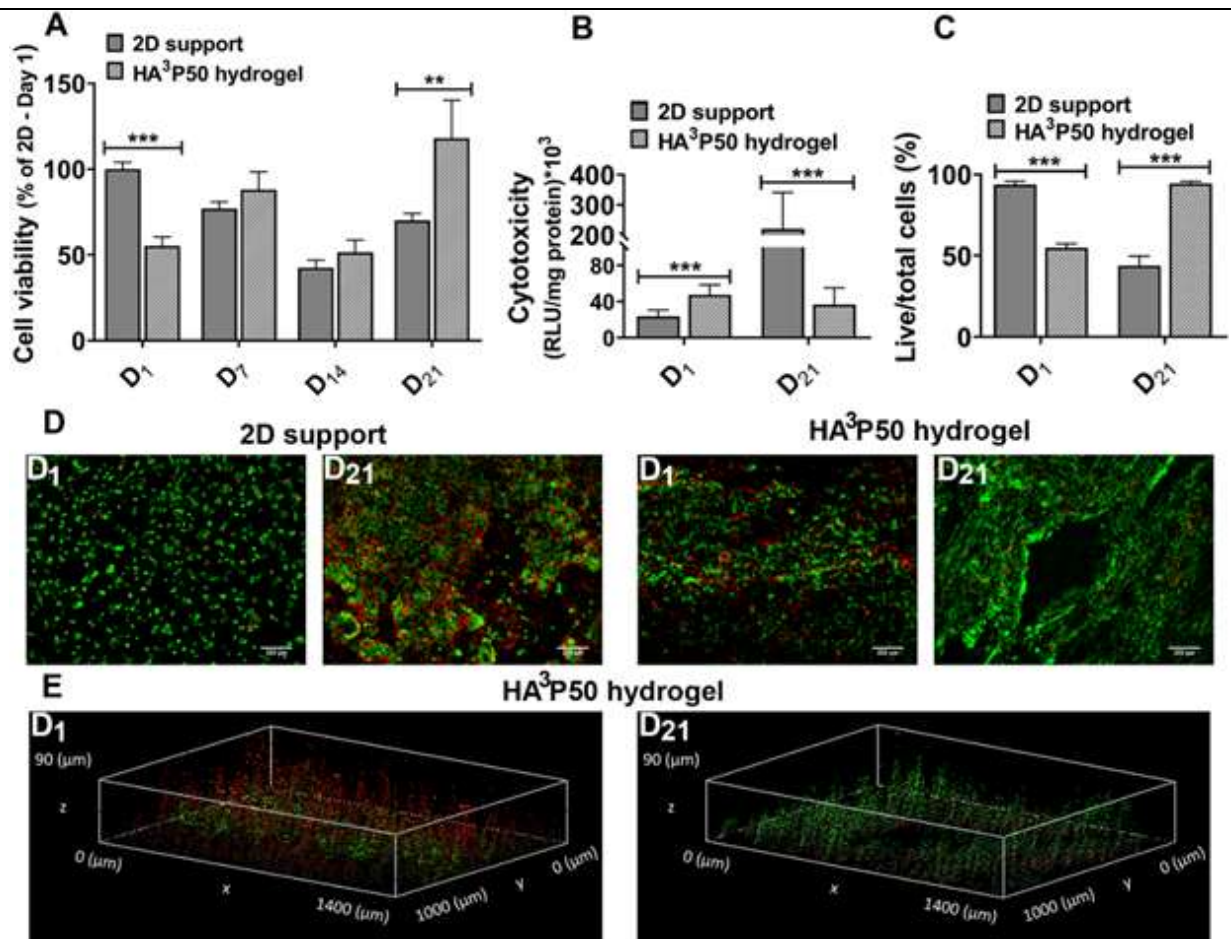


Figure 79. HepG2 cells viability and proliferation over 21 days of culturing on 2D support and HA3P50 hydrogel. (A) Cellular viability assessed by XTT assay; (B) Cell cytotoxicity investigated by the release of the adenylate kinase in the culture medium; (C) The percentage of viable to total cells determined by live/dead cell assay; (D) Merged live/dead cell images of HepG2 cells cultured on the 2D support (left) and the HA3P50 hydrogel (right). Live cells were stained with Calcein AM (green) and dead cells are detected with propidium iodide (red). Scale bar: 200 μm ; (E) 3D reconstruction images of Z-stacking sections from live/dead cell staining images for HepG2 cells cultured in HA3P50 hydrogel. Statistical significance: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for comparisons between HA3P50 hydrogel and 2D support.

Besides, the unpolymerized precursors unwashed before cell seeding may influence the viability of entrapped cells in the first 24 hours after seeding. Nevertheless, we could observe that the cellular proliferation after 7, 14 or 21 days is higher in 3D versus 2D as compared to day 1 (Figure 79.A), pointing out that the cells are forming a network in the hydrogel. Thus, the HA³P50 hydrogel promotes the HepG2 cell proliferation 7 days after seeding (D₇) compared to D₁ (the increase of cell proliferation is ~60 %, $p < 0.001$) (Figure 79.A). As revealed by SEM images, cluster formation increases (Figure 71). On the other hand, the viability of HepG2 cells seeded on the 2D support significantly decreased at D₇ compared to D₁ (~20 %, $p < 0.001$), probably reflecting cell overpopulation on the available surface; cluster formation, and cell detachment, in the absence of cell sub-cultivation, recommended every 3-5 days. At D₁₄, the viability of HepG2 cells was significantly lower for both culturing conditions as compared with D₇, the 2D support, and the hydrogel, a similar percent of reduction (~40 %, $p < 0.001$ versus D₇) being determined (Figure 79.A). This result is expected for 2D cell culture since it was shown that if the cell number is not reduced by performing

periodic passages, the cells lose viability, and their number decreases⁶⁶. Other groups reported similar findings⁶⁷. Somehow unexpectedly, we observed a reduction in cell viability of HepG2 cells cultured in HA³P50 hydrogel at D₁₄ as compared with D₇, followed by an increase at D₂₁ (Figure 79.A). This can reflect the fact that HepG2 cells organize in clusters (as revealed by SEM investigation, Figure 78) that are not firmly interconnected and can lose their contacts with the hydrogel fibers when the culture medium is changed, leading to their removal. Moreover, at D₂₁ the HepG2 cells proliferate into the HA³P50 hydrogel (Figure 79.A) generating cell aggregates attached to hydrogel's fibers that are interconnected (Figure 78). Thus, an increase by ~100 % and by ~130 % ($p < 0.001$) as compared to D₁ and D₁₄, respectively is obtained at D₂₁ (Figure 79.A). It is also worth mentioning that the viability of HepG2 cells grown on the HA³P50 hydrogel is significantly increased at D₂₁ (by ~70 %, $p < 0.01$) when compared to the corresponding 2D support. This fact correlates well with the ToxiLight cytotoxicity assay (Figure 79.B) when the release of the enzyme adenylate kinase, an indicator of cellular damage and increased cell toxicity is reduced by ~ 80% in the case of Hep G2 cells culturing for 21 days in HA³P50 hydrogel as compared with cells growing on 2D support. Moreover, the data are supported by live/dead cell staining assay, when the percentage of live cells to total cells is increased when HepG2 cells are grown for 21 days in HA³P50 hydrogel as compared with cells growing in 2D (~120%, $p < 0.001$) (Figure 79.C and 79.D). For a better understanding of HepG2 cells distribution inside the HA³P50 hydrogel, a 3D reconstruction of Z-stacking sections of live/dead staining images was performed. Thus, it can be observed that both the live (green) and dead (red) cells are spread in the depth of hydrogel at each experimental point examined, still, the number of dead cells at day 1 is greater than that determined at day 21 (Figure 79.E), a result in line with XTT and ToxiLight assays. It can be seen that a high number of viable cells infiltrated inside the hydrogel after 21 days of culturing (Figure 79.D and 79.E).

Conclusion

Altogether, the biological investigations demonstrate that HA³P50 hydrogel is a biocompatible material supporting tumour cell growth that provides a 3D platform to mimic the tumour functionality suitable for anti-tumor drug screening.

III. Quantifiable results of the project, up to the current date

III.1. Published articles directly associated with the project (contain acknowledgments to the project)

1. E. L. Ursu, G. Gavril, S. Morariu, M. Pinteala, M. Barboiu, A. Rotaru. Single-walled carbon nanotubes-G-quadruple hydrogel nanocomposite matrixes for cell support applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *111*, 110800; DOI: 10.1016/j.msec.2020.110800.
2. L. Clima, B. F. Craciun, A. Angeli, A. Petreni, A. Bonardi, A. Nocentini, F. Carta, P. Gratteri, M. Pinteala, C. T. Supuran. Synthesis, computational studies and assessment of *in vitro* inhibitory activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2052; DOI: 10.1002/cmdc.202000500.
3. A. Angeli, M. Pinteala, S.S. Maier, B.C. Simionescu, A. Milaneschi, G. Abbas, S. del Prete, C. Capasso, A. Capperucci, D. Tanini, F. Carta, C.T. Supuran. Evaluation of thio- and seleno-acetamides bearing benzenesulfonamide as inhibitor of carbonic anhydrases from different pathogenic bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 598; DOI: 10.3390/ijms21020598.
4. A. Angeli, M. Ferraroni, M. Pinteala, S.S. Maier, B.C. Simionescu, F. Carta, S. Del Prete,

- C. Capasso, C.T. Supuran. Crystal structure of a tetrameric type II β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Burkholderia pseudomallei*, *Molecules* **2020**, *25*, 2269; DOI: 10.3390/molecules25102269.
5. D. Macocinschi, D. Filip, B.-I. Ciubotaru, R. P. Dumitriu, C. D. Varganici, M.-F. Zaltariov. Blends of sodium deoxycholate-based poly(ester ether)urethane ionomer and hydroxypropyl cellulose with mucosal adhesiveness, *Int J Biol Macromol* **2020**, *162*, 1262-1275; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.191.
 6. S. Shova, A. Vlad, M. Damoc, V. Tiron, M. Dascalu, G. Novitchi, C. Ursu, M. Cazacu. Nanoscale coordination polymer of dimanganese(II) as infinite, flexible nano-sheets with photo-switchable morphology. *Eur J Inorg Chem* **2020**, *8*, 2043-2054; DOI: 10.1002/ejic.202000098.
 7. S. Shova, V. Tiron, A. Vlad, G. Novitchi, D. G. Dumitrescu, M. Damoc, M.-F. Zaltariov, M. Cazacu. Permethylated dinuclear Mn(III) coordination nanostructure with stripe-ordered magnetic domains. *Appl Organomet Chem* **2020**, *34*, e5957; DOI: 10.1002/aoc.5957.
 8. S. P. Gavrish, S. Shova, M. Cazacu, Y. D. Lampeka. Crystal structure of the one-dimensional coordination polymer formed by the macrocyclic $[\text{Ni}(\text{cyclam})]^{2+}$ cation and the dianion of diphenylsilanediylbis(4-benzoic acid). *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun* **2020**, *76*, 929-932, DOI: 10.1107/S2056989020006544.
 9. B. G. Molina, A. D. Bendrea, S. Lanzalaco, L. Franco, L. Cianga, L. J. del Valle, J. Puiggali, P. Turon, E. Armelin, I. Cianga, C. Aleman. Smart design for a flexible, functionalized and electroresponsive hybrid platform based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) derivatives to improve cell viability. *J Mater Chem B* **2020**, *8*, 8864-8877; DOI: 10.1039/d0tb01259a.
 10. S. Cibotaru, A.-I. Sandu, D. Belei, L. Marin. Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for bio-materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *116*, 111216; DOI: 10.1016/j.msec.2020.111216.
 11. S. M. Bucatariu, M. Constantin, C. D. Varganici, D. Rusu, A. Nicolescu, I. Prisacaru, M. Carnuta, M. Anghelache, M. Calin, P. Ascenzi, G. Fundueanu. A new sponge-type hydrogel based on hyaluronic acid and poly(methylvinylether-alt-maleic acid) as a 3D platform for tumor cell growth. *Int J Biol Macromol* **2020**, *165*, 2528-2540; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.095.
 12. D. M. Suflet, I. Popescu, A. I. Prisacaru, I. M. Pelin. Synthesis and characterization of curdlan-phosphorylated curdlan based hydrogels for drug release. *Int J Polym Mat Polym Biomat* **2020**, 1-10; DOI: 10.1080/00914037.2020.1765360.
 13. D. Timpu, L. Sacarescu, T. Vasiliu, M. V. Dinu, G. David. Surface cationic functionalized nano-hydroxyapatite – Preparation, characterization, effect of coverage on properties and related applications. *Eur Polym J* **2020**, *132*, 109759; DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109759.
 14. C. Cojocaru, L. Clima. Polymer assisted ultrafiltration of AO7 anionic dye from aqueous solutions: Experimental design, multivariate optimization, and molecular docking insights. *J Membr Sci* **2020**, *604*, 118054; DOI: 10.1016/j.memsci.2020.118054.
 15. A.L. Chibac-Scutaru, C. Cojocaru, A. Coroaba, Gh. Roman, G. Sacarescu. M. Simionescu, L. Sacarescu, Nano-assembled oligosilane-pyrazoline structures and their optical properties. *J Mol Liq* **2020**, *303*, 112657; DOI: 10.1016/j.molliq.2020.112657.
 16. A. Coroaba, D.-L. Isac, C. Al-Matarneh, T. Vasiliu, S.-A. Ibanescu, R. Zonda, R. Ardeleanu, A. Neamtu, D. Timpu, A. Nicolescu, F. Mocci, S. S. Maier, A. Laaksonen, M. J. M. Abadie, M. Pinteala. Probing the supramolecular features via π - π interaction of a diiminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether compound: experimental and theoretical study. *RSC*

III.2. Published articles connected with the project (contain acknowledgments to the project)

1. O. E. Carp, A. Moraru, M. Pinteala, A. Arvinte. Electrochemical behaviour of piperine. Comparison with control antioxidants. *Food Chem* **2021**, *339*, 128110; DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128110.
2. Y. Sun, A. Laaksonen, X. Lu, X. Ji. How to detect possible pitfalls in ePC-SAFT modelling. 2. Extension to binary mixtures of 96 ionic liquids with CO₂, H₂S, CO, O₂, CH₄, N₂, and H₂. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, in Press; DOI: 10.1021/acs.iecr.0c04485.
3. Q. Gao, Y. Zhang, A. Laaksonen, X. Ji, S. Zhao, Y. Chen, X. Lu. Effect of dimethyl carbonate on the behavior of water confined in carbon nanotube. *Chin J Chem Eng* **2020**, in Press.
4. F. Li, F. Mocci, X. Zhang, X. Ji, A. Laaksonen. Ionic liquids for CO₂ electrochemical reduction. *Chin J Chem Eng* **2020**, in Press; DOI: 10.1016/j.cjche.2020.10.029.
5. Y. A. Dmitriev, A. Laaksonen, N. P. Benetis. H/D isotope effect observed in the isotropic Fermi contact interaction of formyl radical: Experimental and theoretical analysis of the inter- and intra-molecular dynamics. *AIP Adv* **2020**, *10*, 000000; DOI: 10.1063/5.0027835.
6. Y. Dong, F. Huo, A. Laaksonen. Detecting confined fluid behavior by SFA: Past, present, and future. *Green Energy Environ* **2020**, In press. DOI: 10.1016/j.gee.2020.08.002.
7. Y. Dong, X. Ji, A. Laaksonen, W. Cao, H. He, X. Lu. Excellent protein immobilization and stability on heterogeneous C-TiO₂ hybrid nanostructures: A single protein AFM study. *Langmuir* **2020**, *36*, 9323-9332; DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c01942.
8. Q. Gao, Y. Zhang, S. Xu, A. Laaksonen, Y. Zhu, X. Ji, X. Lu. Physicochemical properties and structure of fluid at nano-/ micro-interface: Progress in simulation and experimental study. *Green Energy Environ* **2020**, *5*, 274-285; DOI: 10.1016/j.gee.2020.07.013.
9. Qingwei Gao, Nanhua Wua, Yao Qin, Aatto Laaksonen, Yudan Zhu, Xiaoyan, Xiaohua Lu. Molecular insight into wetting behavior of deep eutectic solvent droplets on ionic substrates: A molecular dynamics study. *J Mol Liq* **2020**, *319*, 114298; DOI: 10.1016/j.molliq.2020.11429.
10. C. Correa Girona, A. Laaksonen, F. L. Barroso da Silva. On the interactions of the receptor-binding domain of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 spike proteins with monoclonal antibodies and the receptor ACE2. *Virus Res* **2020**, *285*, 198021; DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198021.
11. S.-C. Yang, B. Li, Y.-L. Zhu, A. Laaksonen, Y.-L. Wang. The ENUF method - Ewald summation based on non-uniform fast Fourier transform: implementation, parallelization, and application. *J Comput Chem* **2020**, *41*, 2316-2335; DOI: 10.1002/jcc.26395.
12. Y. Sun, Z. Zuo, A. Laaksonen, X. Lu, X. Ji. How to detect possible pitfalls in ePC-SAFT modelling: Extension to ionic liquids. *Fluid Phase Equilib* **2020**, *519*, 112641, DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112641.
13. H. Wang, Y. Liu, A. Laaksonen, A. Krook-Riekkola, Z. Yang, X. Lu, X. Ji. Carbon recycling – an immense resource and key to a smart climate engineering: A survey of technologies, cost and impurity impact. *Renew Sust Energ Rev* **2020**, *131*, 110010; DOI: 10.1016/j.rser.2020.110010.
14. Y.-L. Wang, B. Li, S. Sarman, F. Mocci, Z.-Y. Lu, J. Yuan, A. Laaksonen, M. D. Fayer. Microstructural and Dynamical Heterogeneities in Ionic Liquids. *Chem Rev* **2020**, *120*, 5798-5877; DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00693.

15. H.-W. Pei, B. Li, A. Laaksonen, Y.-L. Wang. How molecular chiralities of bis(mandelato)borate anions affect their binding structures with alkali metal ions and microstructural properties in tetraalkylphosphonium ionic liquids. *Front Chem* **2020**, *8*, 65; DOI: 10.3389/fchem.2020.00065.
16. Y.-L. Wang, B. Li, J. Yuan, A. Laaksonen. The Effect of phenyl substitutions on microstructures and dynamics of tetraalkylphosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquids. *ChemPhysChem* **2020**, *21*, 1202-1214; DOI: 10.1002/cphc.201901206.
17. A. Nicolescu, D. Blanita, C. Boiciuc, V. Hlistun, M. Cristea, D. Rotaru, L. Pinzari, A. Oglinda, A. Stamati, I. Tarcomnicu, A. Tutulan-Cunita, D. Stambouli, S. Gladun, N. Revenco, N. Usurelu, C. Deleanu. Monitoring methylmalonic aciduria by NMR urinomics. *Molecules* **2020**, *25*, 5312; DOI:10.3390/molecules25225312.
18. A. Nicolescu, E. Georgescu, F. Dumitrascu, F. Georgescu, F. Teodorescu, C. Draghici, M.R. Caira, C. Deleanu. Exocyclic enamine of pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines generated by 1,3-dipolar cycloaddition reactions of benzimidazolium ylides to activated alkynes. *Rev Chim* **2020**, *71* (3), 197-209; DOI: 10.37358/RC.20.3.7989.
19. R. Vulturar, A. Chis, M. Baizat, A. Cozma, R. Suharoschi, A. Nicolescu, C. Deleanu. A severe neonatal argininosuccinic aciduria case investigated by ¹H NMR spectroscopy. *Rev Chim* **2020**, *71* (3), 210-218; DOI: 10.37358/RC.20.3.7990.
20. E. Georgescu, F. Georgescu, F. Dumitrascu, C. Draghici, A. Nicolescu, D. Marinescu, C. Deleanu. Microwave-assisted multicomponent synthesis of benzo[*f*]pyrrolo[1,2-*a*]quinoline derivatives. *Rev Roum Chim* **2020**, *65* (1), 97-102; DOI:10.33224/rch.2020.65.1.11

III.3. Articles revised or under review (contain acknowledgments to the project)

1. I. Popescu, M. Carnuta, D.M. Suflet, M.V. Dinu, R.N. Darie-Nita, M. Anghelache, M. Calin, M. Constantin, Thiol-ene photo-click alginate/poloxamer hydrogel for alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes, *Int J Biol Macromol* - under review.

III.4. Submitted manuscripts directly associated with the project (contain acknowledgments to the project)

1. T. Vasiliu, B. F. Craciun, A. Neamtu, L. Clima, D. L. Isac, S. S. Maier, M. Pinteala, F. Mocchi, A. Laaksonen. Combined *in silico* and experimental study of PEI-PEG-dsDNA polyplex formation. The importance of PEG size to vector-nucleic acid binding and biocompatibility – *Submitted*.

III.5. Book chapter directly associated with the project (contain acknowledgments to the project)

1. A. Lyubartsev, A. Laaksonen, **Chapter 8**: Inverse Problems and Hierarchical Multiscale Modelling of Biological Matter in *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications* (Editors: Marc Abadie, Mariana Pinteala, Alexandru Rotaru), Springer Nature Switzerland AG Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland, 2021.
2. L. Engelbrecht, F. Mocchi, S. Perepelytsya, T. Vasiliu, A. Laaksonen, **Chapter 3**: Molecular Perspective on Solutions and Liquid Mixtures: View from Modelling & Experiment in *Soft Matter Systems for Biomedical Applications* (Editors: L. Bulavin, N. Lebovka), Springer Proceedings in Physics, © Springer Nature Switzerland AG, 2021.

III.6. Conferences directly associated with the project (contain acknowledgments to the project)

- 1.** G. Fundueanu, M. Constantin, Polymeric micro- and nano-particles for drug delivery, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania - Invited conference.
- 2.** S. Bucatariu, M. Constantin, G. Fundueanu, M. Calin, A new sponge-type hydrogel as a 3D support for tumoral cell culture, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October **2020**, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 3.** I. Popescu, M. Constantin, Stimuli-sensitive pluronic-alginate hydrogels formed by photoinitiated thiol-ene reaction, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 4.** I. M. Pelin, D. M. Suflet, I. Popescu, Hydrogel as component for buccal patches: synthesis, characterization and antibiotic release, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 5.** D. L. Isac, A. Coroaba, T. Vasiliu, R. Zonda, S.-A. Ibanescu, C. Al Matarneh, A. Airinei, M. Pinteala, Interplay of electronic structure in ground and excited states of new di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether derivative by TD-DFT studies, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October **2020**, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 6.** B.-I. Ciubotaru, M.-F. Zaltariov, M. Cazacu, C. Racles, Functionalized mesoporous silica in drug delivery and biomedical applications, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 7.** B.-I. Ciubotaru, M. Cazacu, Evaluation of silicone-based biomaterials from the bio-and mucoadhesive perspective, *Scientific communications session of young researchers, PPIMC - Open door to the future (MacroYouth '2020)*, 1st Edition, 19th of November **2020**, Iasi, Romania – Oral presentation.
- 8.** A.-D. Bendrea, L. Cianga, G.-L. Ailiesei, I. Cianga, Fluorescent EDOT-functionalized poly- ϵ -caprolactone: Synthesis, photophysical and self-assembling properties in organic solvents and its serendipitously noticed behaviour in protonated media (on-line registration doi:10.3390/CGPM2020-07208), *The First International Conference on „Green” Polymer Materials*, 05-25th of November **2020** – online – Oral presentation
- 9.** A.-D. Bendrea, L. Cianga, I. Cianga, Graft Conjugated Polymers: Toward Smarter and Versatile Materials for Biomedical Applications, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October **2020**, Iasi, Romania – Poster communication.
- 10.** S. Bucatariu, G. Fundueanu, M. Constantin, Design of hyaluronan scaffold via solvent free thermal cross-linking method, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Poster communication.

III.7. PhD thesis with acknowledgments at the 5D-nanoP Project

1. *Conjugates for genes and drugs delivery*, PhD Student – Bogdan Florin Craciun, Scientific Supervisor – Dr. Mariana Pinteala.
2. *Self-assembled dynamic macromolecular systems: Molecular modeling and experimental validation studies*, PhD Student – Tudor Vasiliu, Scientific Supervisor – Dr. Mariana Pinteala.

IV. Topics and prognoses for Stage 2021

Based on the approaches and results of the current year, the following commitments can be formulated for the next stage of the project.

1. *Regarding the molecular entities involved to supramolecular assembling*

- Setting up of compounds libraries.
- Investigation of some particular inhibitors of carbonic anhydrases.
- *In silico* investigation of docking and supramolecular assembling of library unimers.

2. *Regarding the nanoplatfoms synthesis and physical-chemical evaluation*

- Extending the design, synthesis, and characterization of (macro)molecular components of functional nanoplatfoms.
- Preparation of stock and etalon components of functional nanoplatfoms, for accurate and systematic investigation of their functionality in crowded milieus.

3. *Regarding the production of simple constituents of future tissue / tumor surrogates*

- Diversification of the synthesized substrata.

We certify that all the goals of 2020 stage of **5D-nanoP** project have been achieved.

December 2, 2020

**Project Director,
Professor Aatto Laaksonen, PhD.**

References

- (1) Clima, L.; Craciun, B. F.; Gavril, G.; Pinteala, M. Tunable Composition of Dynamic Non-Viral Vectors over the DNA Polyplex Formation and Nucleic Acid Transfection *Polymers* **2019**, *11*, 1313.
- (2) Tripathi, S. K.; Gupta, K. C.; Kumar, P. Polyethyleneglycol crosslinked N-(2-hydroxyethyl)-polyethylenimine nanoparticles as efficient non-viral vectors for DNA and siRNA delivery in vitro and in vivo *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 2322.
- (3) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 615.
- (4) Clima, L.; Craciun, B. F.; Angeli, A.; Petreni, A.; Bonardi, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Gratteri, P.; Pinteala, M.; Supuran, C. T. Synthesis, computational studies and assessment of in vitro inhibitory activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2052.
- (5) Hossein-Nejad-Ariani, H.; Althagafi, E.; Kaur, K. Small Peptide Ligands for Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer Cells *Scientific Reports* **2019**, *9*, 2723.
- (6) Angeli, A.; Pinteala, M.; Maier, S. S.; Simionescu, B. C.; Milaneschi, A.; Abbas, G.; del Prete, S.; Capasso, C.; Capperucci, A.; Tanini, D.; Carta, F.; Supuran, C. T. Evaluation of Thio- and Seleno-Acetamides Bearing Benzenesulfonamide as Inhibitor of Carbonic Anhydrases from Different Pathogenic Bacteria *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 598.
- (7) Angeli, A.; Ferraroni, M.; Pinteala, M.; Maier, S. S.; Simionescu, B. C.; Carta, F.; Del Prete, S.; Capasso, C.; Supuran, C. T. Crystal Structure of a Tetrameric Type II β -Carbonic Anhydrase from the Pathogenic Bacterium *Burkholderia pseudomallei* *Molecules* **2020**, *25*, 2269.
- (8) Cibotaru, S.; Sandu, A.-I.; Belei, D.; Marin, L. Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for bio-materials *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *116*, 111216.
- (9) Sisson, A. L.; Ekinici, D.; Lendlein, A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures *Polymer* **2013**, *54*, 4333.
- (10) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 1217.
- (11) Rainbolt, E. A.; Washington, K. E.; Biewer, M. C.; Stefan, M. C. Recent developments in micellar drug carriers featuring substituted poly(ϵ -caprolactone)s *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 2369.
- (12) Chang, S. H.; Lee, H. J.; Park, S.; Kim, Y.; Jeong, B. Fast Degradable Polycaprolactone for Drug Delivery *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2302.
- (13) Schenning, A. P. H. J.; George, S. J. Phases full of fullerenes *Nature Chemistry* **2014**, *6*, 658.
- (14) Bendrea, A.-D.; Cianga, L.; Ailiesei, G.-L.; Cianga, I. In *The first International Electronic Conference on "Green" Polymer Materials*; MDPI: Online, 2020.
- (15) Huh, S.; Wiench, J. W.; Yoo, J.-C.; Pruski, M.; Lin, V. S. Y. Organic Functionalization and Morphology Control of Mesoporous Silicas via a Co-Condensation Synthesis Method *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 4247.
- (16) Persi, E.; Duran-Frigola, M.; Damaghi, M.; Roush, W. R.; Aloy, P.; Cleveland, J. L.; Gillies, R. J.; Ruppin, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy *Nature Communications* **2018**, *9*, 2997.
- (17) Tannock, I. F.; Rotin, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation *Cancer Research* **1989**, *49*, 4373.
- (18) Larkin, P. J. In *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*; Larkin, P. J., Ed.; Elsevier: 2018, p 85.
- (19) Ursu, E.-L.; Gavril, G.; Morariu, S.; Pinteala, M.; Barboiu, M.; Rotaru, A. Single-walled carbon nanotubes–G-quadruple hydrogel nanocomposite matrixes for cell support applications *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *111*, 110800.

- (20) Cojocaru, C.; Clima, L. Polymer assisted ultrafiltration of AO7 anionic dye from aqueous solutions: Experimental design, multivariate optimization, and molecular docking insights *Journal of Membrane Science* **2020**, *604*, 118054.
- (21) Chibac-Scutaru, A. L.; Cojocaru, C.; Coroabă, A.; Roman, G.; Săcărescu, G.; Simionescu, M.; Săcărescu, L. Nano-assembled oligosilane–pyrazoline structures and their optical properties *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *303*, 112657.
- (22) Coroaba, A.; Isac, D.-L.; Al-Matarneh, C.; Vasiliu, T.; Ibanescu, S.-A.; Zonda, R.; Ardeleanu, R.; Neamtu, A.; Timpu, D.; Nicolescu, A.; Mocci, F.; Maier, S. S.; Laaksonen, A.; Abadie, M. J. M.; Pinteala, M. Probing the supramolecular features via π – π interaction of a di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether compound: experimental and theoretical study *RSC Advances* **2020**, *10*, 38304.
- (23) Ocampo, C.; Oliver, R.; Armelin, E.; Alemán, C.; Estrany, F. Electrochemical Synthesis of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on Steel Electrodes: Properties and Characterization *Journal of Polymer Research* **2006**, *13*, 193.
- (24) Patton, A. J.; Green, R. A.; Poole-Warren, L. A. Mediating conducting polymer growth within hydrogels by controlling nucleation *APL Materials* **2015**, *3*, 014912.
- (25) Ag, D.; Selec, M.; Bongartz, R.; Can, M.; Yurteri, S.; Cianga, I.; Stahl, F.; Timur, S.; Scheper, T.; Yagci, Y. From Invisible Structures of SWCNTs toward Fluorescent and Targeting Architectures for Cell Imaging *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3532.
- (26) Al Tameemi, M.; Dobrinescu, R.; Marton, G.; Ott, C. Doxorubicin loaded silica nanotubes: An investigation of the release behavior *Scientific Bulletin Series B* **2015**, *77*, 185.
- (27) Roik, N. V.; Belyakova, L. A. Mesoporous silica nanoparticles equipped with surface nanovalves for pH-controlled liberation of doxorubicin *Interface Focus* **2016**, *6*, 20160041.
- (28) Ong, S.; Zhao, X.; Eisenthal, K. B. Polarization of water molecules at a charged interface: second harmonic studies of the silica/water interface *Chemical Physics Letters* **1992**, *191*, 327.
- (29) HMDB; HMDB: <https://hmdb.ca/>, 2012; Vol. 2020, p 1.
- (30) Feng, S.; Bagia, C.; Mpourmpakis, G. Determination of Proton Affinities and Acidity Constants of Sugars *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117*, 5211.
- (31) PubChem; PubChem: [PubChem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), 2005; Vol. 2020, p Doxorubicin is an anthracycline antibiotic with antineoplastic activity. Doxorubicin.
- (32) Lanzalaco, S.; Turon, P.; Weis, C.; Alemán, C.; Armelin, E. The mechanism of adhesion and graft polymerization of a PNIPAAm thermoresponsive hydrogel to polypropylene meshes *Soft Matter* **2019**, *15*, 3432.
- (33) Gueye, M. N.; Carella, A.; Faure-Vincent, J.; Demadrille, R.; Simonato, J.-P. Progress in understanding structure and transport properties of PEDOT-based materials: A critical review *Progress in Materials Science* **2020**, *108*, 100616.
- (34) Molina, B. G.; Bendrea, A. D.; Lanzalaco, S.; Franco, L.; Cianga, L.; del Valle, L. J.; Puiggali, J.; Turon, P.; Armelin, E.; Cianga, I.; Aleman, C. Smart design for a flexible, functionalized and electroresponsive hybrid platform based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) derivatives to improve cell viability *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*, 8864.
- (35) Collier, G. S.; Pelse, I.; Reynolds, J. R. Aqueous Electrolyte Compatible Electrochromic Polymers Processed from an Environmentally Sustainable Solvent *ACS Macro Letters* **2018**, *7*, 1208.
- (36) Fresta, E.; Fernández-Luna, V.; Coto, P. B.; Costa, R. D. Merging Biology and Solid-State Lighting: Recent Advances in Light-Emitting Diodes Based on Biological Materials *Advanced Functional Materials* **2018**, *28*, 1707011.
- (37) Jürgensen, N.; Zimmermann, J.; Morfa, A. J.; Hernandez-Sosa, G. Biodegradable Polycaprolactone as Ion Solvating Polymer for Solution-Processed Light-Emitting Electrochemical Cells *Scientific Reports* **2016**, *6*, 36643.

- (38) Pacheco-Moreno, C. M.; Schreck, M.; Scaccabarozzi, A. D.; Bourgun, P.; Wantz, G.; Stevens, M. M.; Dautel, O. J.; Stingelin, N. The Importance of Materials Design to Make Ions Flow: Toward Novel Materials Platforms for Bioelectronics Applications *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1604446.
- (39) Bergfelt, A.; Lacey, M. J.; Hedman, J.; Sångeland, C.; Brandell, D.; Bowden, T. ϵ -Caprolactone-based solid polymer electrolytes for lithium-ion batteries: synthesis, electrochemical characterization and mechanical stabilization by block copolymerization *RSC Advances* **2018**, *8*, 16716.
- (40) Vázquez-Torres, H.; Cruz-Ramos, C. A. Blends of cellulosic esters with poly(caprolactone): Characterization by DSC, DMA, and WAXS *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, *54*, 1141.
- (41) Díaz, A.; Bacaicoa, A.; Casas, M. T.; Franco, L.; Serra, A.; Puiggali, J. Study on the crystallization of multiarm stars with a poly(ethyleneimine) core and poly(ϵ -caprolactone) arms of different length *Thermochimica Acta* **2015**, *607*, 39.
- (42) Nur, Y.; Colak, D. G.; Cianga, I.; Yagci, Y.; Hacıoglu, J. Pyrolysis of poly(phenylene vinylene)s with polycaprolactone side chains *Polymer Degradation and Stability* **2008**, *93*, 904.
- (43) Nur, Y.; Yurteri, S.; Cianga, I.; Yagci, Y.; Hacıoglu, J. Thermal degradation of poly(p-phenylene-graft/[ϵ -caprolactone) copolymer *Polymer Degradation and Stability* **2007**, *92*, 838.
- (44) Aradilla, D.; Azambuja, D.; Estrany, F.; Casas, M. T.; Ferreira, C. A.; Alemán, C. Hybrid polythiophene–clay exfoliated nanocomposites for ultracapacitor devices *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 13110.
- (45) Kayser, L. V.; Lipomi, D. J. Stretchable Conductive Polymers and Composites Based on PEDOT and PEDOT:PSS *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1806133.
- (46) Mattila, P. K.; Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 446.
- (47) Gallop, J. L. Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2020**, *102*, 81.
- (48) Puiggali-Jou, A.; del Valle, L. J.; Armelin, E.; Alemán, C. Fibrin Association at Hybrid Biointerfaces Made of Clot-Binding Peptides and Polythiophene *Macromolecular Bioscience* **2016**, *16*, 1461.
- (49) Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, *52*, 1145.
- (50) Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers *Int J Pharmaceut* **1983**, *15*, 25.
- (51) Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs *J Control Release* **1987**, *5*, 23.
- (52) Timpu, D.; Sacarescu, L.; Vasiliu, T.; Dinu, M. V.; David, G. Surface cationic functionalized nano-hydroxyapatite – Preparation, characterization, effect of coverage on properties and related applications *European Polymer Journal* **2020**, *132*, 109759.
- (53) David, G. In *Biopolymer-Based Formulations*; Pal, K., Banerjee, I., Sarkar, P., Kim, D., Deng, W.-P., Dubey, N. K., Majumder, K., Eds.; Elsevier: 2020, p 881.
- (54) Szustakiewicz, K.; Gazińska, M.; Kryszak, B.; Grzymajło, M.; Piękowski, J.; Wiglusz, R. J.; Okamoto, M. The influence of hydroxyapatite content on properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite porous scaffolds obtained using thermal induced phase separation technique *European Polymer Journal* **2019**, *113*, 313.
- (55) Yin, Y.; Ye, F.; Cui, J.; Zhang, F.; Li, X.; Yao, K. Preparation and characterization of macroporous chitosan–gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, *67A*, 844.

- (56) Fernando, I. P. S.; Jayawardena, T. U.; Sanjeeva, K. K. A.; Wang, L.; Jeon, Y.-J.; Lee, W. W. Anti-inflammatory potential of alginic acid from *Sargassum horneri* against urban aerosol-induced inflammatory responses in keratinocytes and macrophages *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *160*, 24.
- (57) Soni, S. R.; Kumari, N.; Bhunia, B. K.; Sarkar, B.; Mandal, B. B.; Ghosh, A. Synthesis and characterization of a non-cytotoxic and biocompatible acrylamide grafted pullulan – Application in pH responsive controlled drug delivery *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *120*, 753.
- (58) Li, Z.; Shim, H.; Cho, M. O.; Cho, I. S.; Lee, J. H.; Kang, S.-W.; Kwon, B.; Huh, K. M. Thermo-sensitive injectable glycol chitosan-based hydrogel for treatment of degenerative disc disease *Carbohydrate Polymers* **2018**, *184*, 342.
- (59) Stefan, J.; Kus, K.; Wisniewska, A.; Lorkowska-Zawicka, B.; Kaminski, K.; Szczubialka, K.; Nowakowska, M.; Korbut, R. The antiatherogenic effect of new biocompatible cationically modified polysaccharides: chitosan and pullulan-the comparison study *Journal of Physiology and Pharmacology* **2018**, *69*, 995.
- (60) Bucatariu, S.-M.; Constantin, M.; Varganici, C.-D.; Rusu, D.; Nicolescu, A.; Prisacaru, I.; Carnuta, M.; Anghelache, M.; Calin, M.; Ascenzi, P.; Fundueanu, G. A new sponge-type hydrogel based on hyaluronic acid and poly(methylvinylether-alt-maleic acid) as a 3D platform for tumor cell growth *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *165*, 2528.
- (61) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Sacarescu, L.; Daraba, O. M.; Anghelache, M.; Fundueanu, G. Pullulan derivative with cationic and hydrophobic moieties as an appropriate macromolecule in the synthesis of nanoparticles for drug delivery *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *164*, 4487.
- (62) Westhouse, R. A. Safety assessment considerations and strategies for targeted small molecule cancer therapeutics in drug discovery *Toxicologic pathology* **2010**, *38*, 165.
- (63) Deng, X.; Cao, Y.; Yan, H.; Yang, J.; Xiong, G.; Yao, H.; Qi, C. Enhanced liver functions of HepG2 cells in the alginate/xyloglucan scaffold *Biotechnology Letters* **2015**, *37*, 235.
- (64) Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability *Current Protocols in Immunology* **2015**, *111*, A3.B.1.
- (65) Pan, S.; Ragauskas, A. J. Preparation of superabsorbent cellulosic hydrogels *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1410.
- (66) Hoarau-Véchet, J.; Rafii, A.; Touboul, C.; Pasquier, J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 181.
- (67) Luckert, C.; Schulz, C.; Lehmann, N.; Thomas, M.; Hofmann, U.; Hammad, S.; Hengstler, J. G.; Braeuning, A.; Lampen, A.; Hessel, S. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells *Archives of toxicology* **2017**, *91*, 393.



UE Jyväskylä

Număr de înregistrare,
Institutul de Chimie
Macromoleculară "Petru Poni"

RAPORT STIINTIFIC

PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050 Project. Contract no. 4/2018.

-- Etapa: 2020 --

*Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare,
în cinci dimensiuni*
Mimicking Living Matter Mechanisms by Five-dimensional Chemistry Approaches

Acronym: 5D-nanoP

Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni"
Director,
Dr. Valeria Harabagiu

Director Proiect,
Professor Aatto Laaksonen, PhD.

Acest document este proprietatea organizațiilor implicate în proiect și nu poate fi reprodus,
distribuit sau utilizat de către și / sau către terți, fără acordul prealabil al autorilor.

Cuprins

	Pagina
I. Abordări generice în etapa 2020 a proiectului	1
II. Rezultate științifice obținute în etapa 2020	3
A.3.1. – Rafinarea tehnicilor de sinteză și caracterizare a constituenților nanoplatformelor	3
A.3.2. – Studiul variantelor fezabile de asamblare a constituenților nanoplatformelor	38
A.3.4. – Evaluarea funcționalității constituenților nanoplatformelor asamblate	43
A.3.3. – Studiul variantelor fezabile de obținere a matricelor (bio)macromoleculare destinate testării <i>ex vivo</i> a nanoplatformelor	60
A.3.5. – Studiul preliminar al funcționalității nanoplatformelor în ansamblu	77
III. Rezultate cuantificabile la proiectul 5D-nanoP în etapa 2020	84
IV. Prognoza activităților pentru etapa 2021	89
Referințe bibliografice	90

I. Abordări generice în etapa 2020 a proiectului

Etapa 2020 a proiectului 5D-nanoP a fost dedicată rafinării și diversificării proiectării, sintezei și caracterizării componentelor aplicabile pentru generarea nanoplatformelor. Au fost investigate trei clase de compuși atât din punct de vedere teoretic (in silico), cât și din punct de vedere experimental: (i) auto-asamblare supramoleculară competentă, (ii) molecule sintetice (macro)moleculare și (iii) sisteme de gelificare bazate pe dispersii ale nanotuburilor de carbon cu pereți unici.

Conform planului general de implementare al proiectului, principalele obiective ale etapei actuale constau în:

- proiectarea, sinteza, caracterizarea și investigația încrucișată ale elementelor de bază ale nanoplatformelor funcționale;
- elaborarea unor protocoale speciale pentru sinteza și caracterizarea componentelor (macro)moleculare care vor fi utilizate în continuare pentru a produce nanoplatforme cu stabilitate și biocompatibilitate biochimică;
- producerea și testarea preliminară a unor substraturi pe care nanoplatforme sunt proiectate pentru a fi testate și pentru a funcționa.

Detaliile activității de implementare ale etapei 2020 sunt rezumate în sinopsisul 1 (inserat în pagina următoare).

Planul de realizare al proiectului 5D-nanoP/2020

Etapa 2020/Livrabile	Activitățile incluse	Rezultate cuantificabile cu multumiri la proiectul 5D-nanoP
<p>Etapa III (ianuarie 2020 – decembrie 2020) Obținerea unor variante de nanoplatforme și testarea funcționalității acestora în matrice (bio)macromoleculare</p> <p><i>Livrabile: Raport de cercetare. Protocole de sinteză și caracterizare. Șase lucrări științifice. Participări la conferințe și simpozioane. Două workshop-uri (P1, P5). 1 Teza de doctorat cu multumiri la proiect</i></p>	<p>A.3.1. – Rafinarea tehnicilor de sinteză și caracterizare a constituenților nanoplatformelor Co, P1, P2, P4, P6</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lucrari publicate in jurnale cotate ISI ce trateaza tematica punctuala a proiectului: 16</i>
	<p>A.3.2. – Studiul variantelor fezabile de asamblare a constituenților nanoplatformelor P1, P2, P4, P6</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lucrari publicate in jurnale cotate ISI care ajuta la indeplinirea obiectivelor proiectului: 20</i> • <i>Articole cotate ISI in revizie: 1</i> • <i>Articole trimise spre publicare in jurnale ISI: 1</i> • <i>Capitole carte: 2</i> • <i>Participari la conferinte: 10</i>
	<p>A.3.3. – Studiul variantelor fezabile de obținere a matricelor (bio)macromoleculare destinate testării <i>ex vivo</i> a nanoplatformelor P1, P3</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Teze de doctorat cu multumiri la proiect: 2</i>
	<p>A.3.4. – Evaluarea funcționalității constituenților nanoplatformelor asamblate Toți</p>	
	<p>A.3.5. – Studiul preliminar al funcționalității nanoplatformelor în ansamblu P1, P5</p>	

NOTĂ: PENTRU A JUSTIFICA CONSISTENȚA REZULTATELOR, REALIZĂRILE LEGATE DE ACTIVITATEA A.3.3. DIN PLANUL DE REALIZARE AL ETAPEI 2020 SUNT PLASATE DUPĂ REALIZĂRILE CORESPUNZĂTOARE ACTIVITĂȚII A.3.4.

II. Rezultate științifice obținute în etapa 2020

A.3.1. – Rafinarea tehnicilor de sinteză și caracterizare a constituenților nanoplatformelor

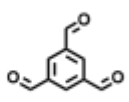
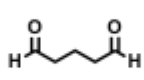
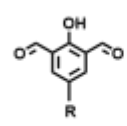
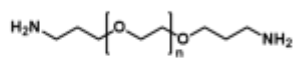
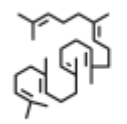
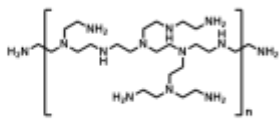
În cadrul proiectului 5D-nanoP, am ales să investigăm trei tipuri distincte de nanoplatforme, fiecare bazându-se pe constituenți (macro)moleculari particulari: (i) unimeri de masă moleculară mică capabili să auto-asambleze, (ii) polimeri sintetici cu reactivitate și structură precis definită ca o consecință a căii de sinteză și (iii) (bio)macromolecule care formează hidrogel având reactivitate adaptată ca o consecință a funcționalizării chimice. Aceste tipuri sunt capabile să acopere toate aplicațiile potențiale ale nanoplatformelor ca sisteme de vectorizare, indiferent de încărcăturile moleculare transportate.

A.3.1.1. Nanoplatforme pe bază de unimeri de masă moleculară mică capabili să auto-asambleze.

(A) Vectorii genici non-virali au fost produși și testați pornind de la unimeri capabili să acționeze ca nanoentități în abordările de chimie dinamică constituțională. Reactivitatea distinctă care a fost luată în considerare a fost capacitatea unimerului de a interconecta prin intermediul legăturilor de imină covalente reversibile. Optimizarea funcționalității unui vector non-viral s-a realizat prin crearea de librării de vectori non-virali care au în compoziție aceleași componente în rapoarte molare diferite pentru pentru transportul și eliberarea de gene. Fiecare vector-viral a fost testat din punct de vedere al capacității de impachetare al aceluiasi plasmid, activității citotoxice și al capacității de transfecție. În urma rezultatelor obținute s-au ales vectorii non-virali cu un balans global al funcționalității pentru scopul aplicativ pentru care au fost proiectați.

S-au proiectat și obținut biblioteci de vectori non-virali pentru transportul și eliberarea de gene pe baza componentelor prezentate in Tabelul 1, după cum urmează:

Tabel 1. Compușii utilizați pentru constituirea de librării de vectori non-virali.

Nucleu multifuncțional		
 1,3,5-triformilbenzen (1,3,5-TFB)	 Aldehidă glutarică (GA)	 p-R-2,6-diformilfenol
Conector biocompatibil  Polietilenglicol diaminat (H ₂ N-PEG-NH ₂) M = 1.5, 2 sau 3 kDa	Componentă auto-aranjabilă  Squalenă (SQ)	
Unitate poli-cationică  PEI ramificată (bPEI) M = 0.8, 2 sau 25 kDa	Componentă de țintire H₂N-Trp-Leu-Glu-Ala-Tyr-Gln-Arg-Phe-Leu-Cys-OH Decapeptidă (DP18)	

(A.1.) Librăria pe bază de scualenă PEG-ilată, bPEI cu masă moleculară de 0.8 kDa și polietilenglicol de masă masă moleculară de 1,5; 2 și 3 kDa. Componentele au fost conectate prin intermediul corului 1,3,5-triformilbenzen în diferite rapoarte molare, conform Tabel 2.

Tabel 2. Compoziția chimică a librăriilor de vectori non-virali

Cod Probă	SQ-PEG-NH ₂ -1,3,5-TFB				H ₂ N-PEG-NH ₂				bPEI-0.8kDa			Vf (μL)
	M (kDa)	Raport molar (echiv)	m (mg)	n (nmol)	M (kDa)	Raport molar (echiv)	m (mg)	n (nmol)	Raport molar (echiv)	m (mg)	n (nmol)	
NV01	2	1	12.5	6.20	1.5	0.1	0.93	0.62	1.5	7.44	9.3	3000
NV02						0.2	1.86	1.24				3000
NV03						0.3	2.79	1.86				3000
NV04						0.4	3.72	2.48				3000
NV05						0.5	4.65	3.10				3000
NV06						0.6	5.58	3.72				3000
NV07						0.7	6.51	4.34				3000
NV08						0.8	7.44	4.96				3000
NV09						0.9	8.37	5.58				3000
NV10						1	9.20	6.20				3000
NV11	2	1	12.5	6.20	2	0.1	1.23	0.62	1.5	7.44	9.3	2247
NV12						0.2	2.47	1.24				2247
NV13						0.3	3.70	1.86				2247
NV14						0.4	4.93	2.48				2247
NV15						0.5	6.17	3.10				2247
NV16						0.6	7.40	3.72				2247
NV17						0.7	8.63	4.34				2247
NV18						0.8	9.87	4.96				2247
NV19						0.9	11.10	5.58				2247
NV20						1	12.34	6.20				2247
NV21	2	1	12.5	6.20	3	0.1	1.85	0.62	1.5	7.44	9.3	2247
NV22						0.2	3.70	1.24				2247
NV23						0.3	5.55	1.86				2247
NV24						0.4	7.40	2.48				2247
NV25						0.5	9.25	3.10				2247
NV26						0.6	11.10	3.72				2247
NV27						0.7	12.95	4.34				2247
NV28						0.8	14.80	4.96				2247
NV29						0.9	16.65	5.58				2247
NV30						1	18.50	6.20				2247

Studiile de fluorescență ale vectorilor non-virali (NV) au demonstrat că aceștia sunt capabili să autoasambleze la valoarea concentrațiilor critice micelare în soluții apoase¹, iar aceste observații au fost confirmate prin studiile TEM (Figura 1) și DLS (Figura 2).

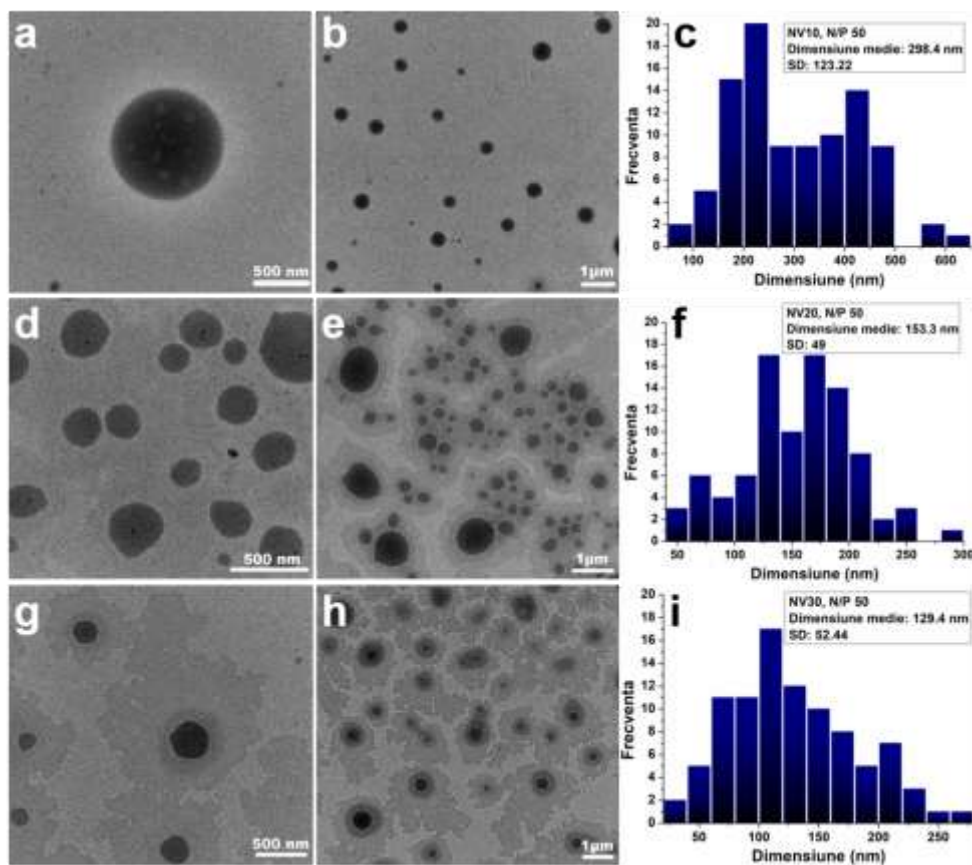


Figura 1. Imaginile TEM pentru vectorii pentru vectorii non-virali corespunzătorii Tabelului 2.

Din analiza imaginilor TEM se poate observa că structurile prezintă morfologie sferică, iar dimensiunea nanoparticulelor este cu atât mai mică cu cât lungimea lanțului de PEG este mai mare. Această observație corespunde cu observațiile din literatură², presupunându-se că numărul de interacțiuni între moleculele de PEG și cele de bPEI cresc odată cu creșterea numărului de unități structurale ale PEG, având ca rezultat o micșorare a dimensiunii particulelor sferice. Valorile potențialelor Zeta în soluții apoase la concentrații diferite (Figura 2) sunt mai mari de 10 mV, iar valorile dimensionale sunt în concordanță cu cele obținute prin tehnica TEM, recomandând aceste sisteme pentru aplicații biomedicale.

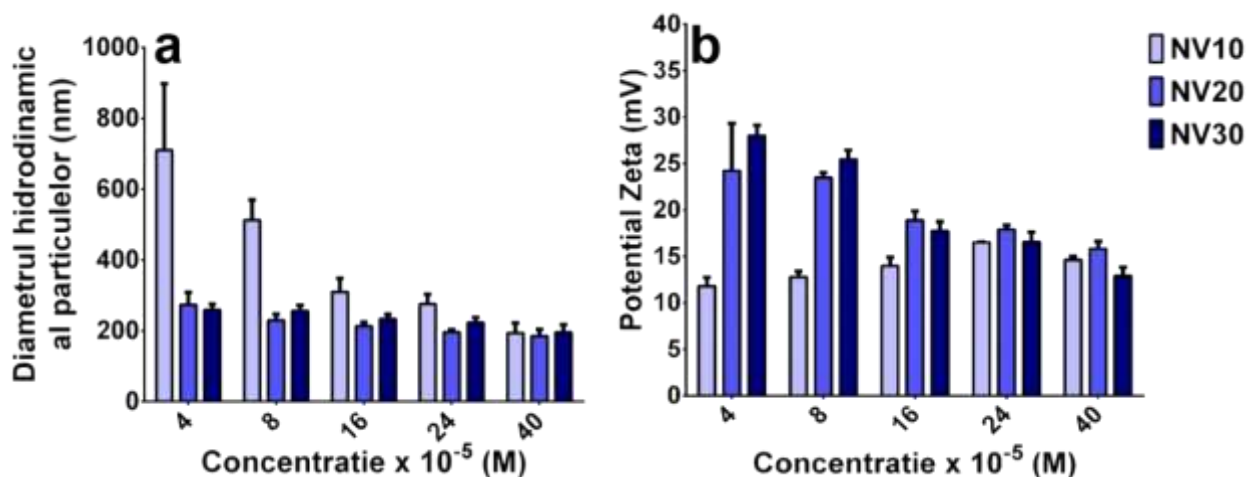


Figura 2. (a) Diametrul hidrodinamic și (b) Valorile potențialului Zeta în soluții apoase cu diferite concentrații ale vectorilor NV (Tabel 2).

Formarea poliplecșilor între vectorii NV și plasmidul CS2 a fost determinată prin studiile de electroforeză pe gel de aragoză (Figura 3), unde N este conținutul de azot din structura vectorului non-viral, iar P este conținutul de fosfor din structura plasmidului.

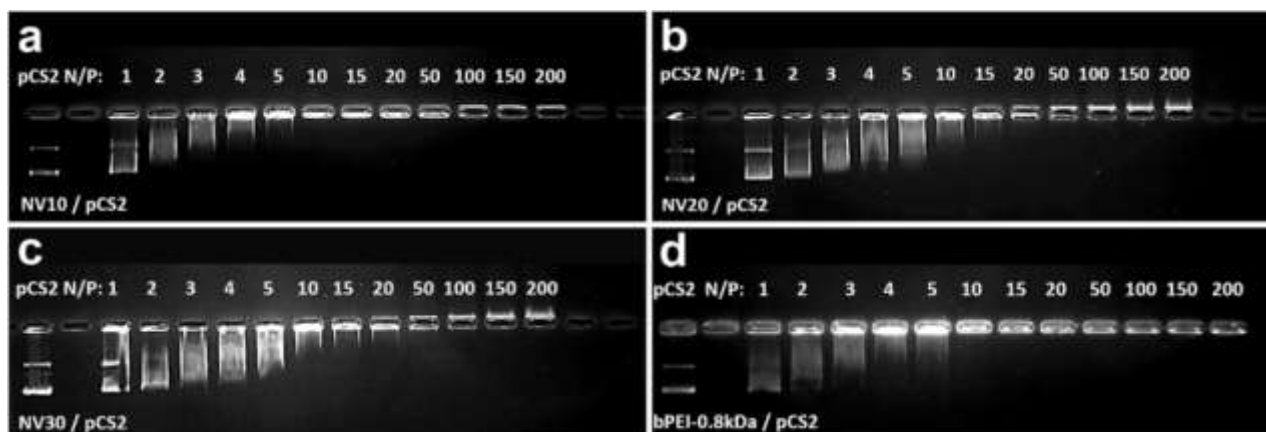


Figura 3. Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența vectorilor non-virali NV la diferite rapoarte N/P.

Din Figura 3 se observă că vectorii ce au în compoziție PEG de 1,5 kDa înmăchetează plasmidul la N/P de 10, în timp ce vectorii NV10 împachetează complet plasmidul la N/P la 20, iar vectorii cu PEG de 3 kDa la N/P de 50. Aceste rezultate confirmă supozițiile că odată cu creșterea lanțului de PEG se produce o scădere a numărului de grupări aminice capabile să complexeze grupările fosfat din ADN. De asemenea, imaginile AFM (Figura 4) au arătat că dimensiunea poliplecșilor este în funcție și de dimensiunea lanțului de PEG, iar vectorii pe bază de PEG 1,5 kDa formează structuri sferice cu dimensiuni mai mici de 200 nm, recomandându-i pentru aplicații în terapia genică³.

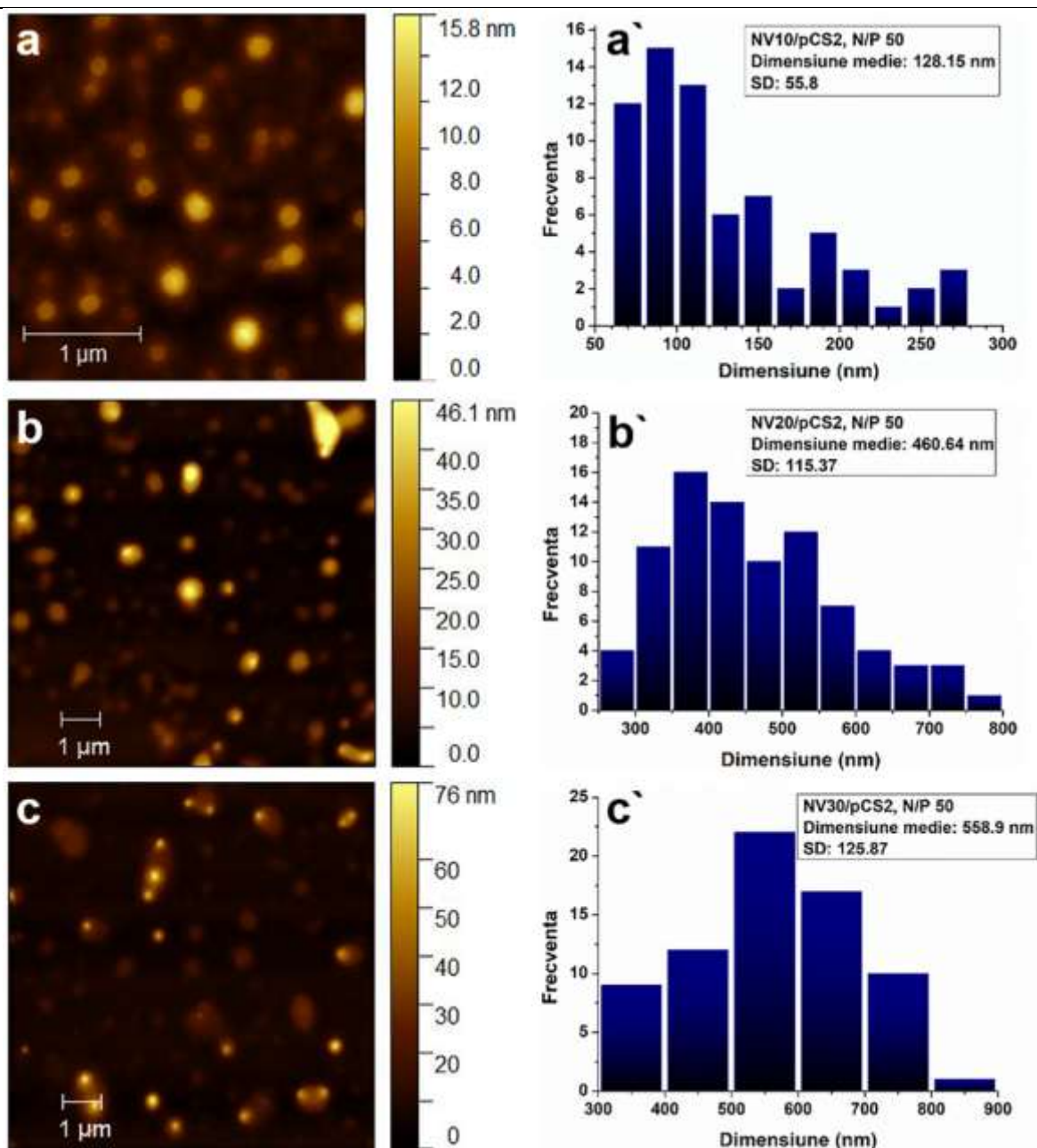


Figura 4. Imaginile AFM și distribuția dimensională corespunzătoare poliplecșilor.

Studiile de viabilitate celulară și abilitate de transfecție *in vitro* pe linia celulară HeLa (Figura 5) au arătat că prin creșterea conținutului de PEG, de la 0.1 echivalenți până la 1 echivalent, a rezultat o îmbunătățire semnificativă a eficienței de transfecție. În general, probele analizate la rapoarte N/P de 100, au prezentat eficiență de transfecție superioară comparativ cu probele cu raportul N/P de 50. Mai mult, masa moleculară a PEG a prezentat o influență semnificativă atât în cazul eficienței de transfecție cât și în cazul viabilității celulare. Astfel, prin utilizarea lanțurilor de PEG cu mase moleculare de 2 kDa și 3 kDa pentru obținerea vectorilor non-virali duce la creșterea biocompatibilității *in vitro* a acestora concomitent cu diminuarea eficienței de transfecție pe linia celulară HeLa.

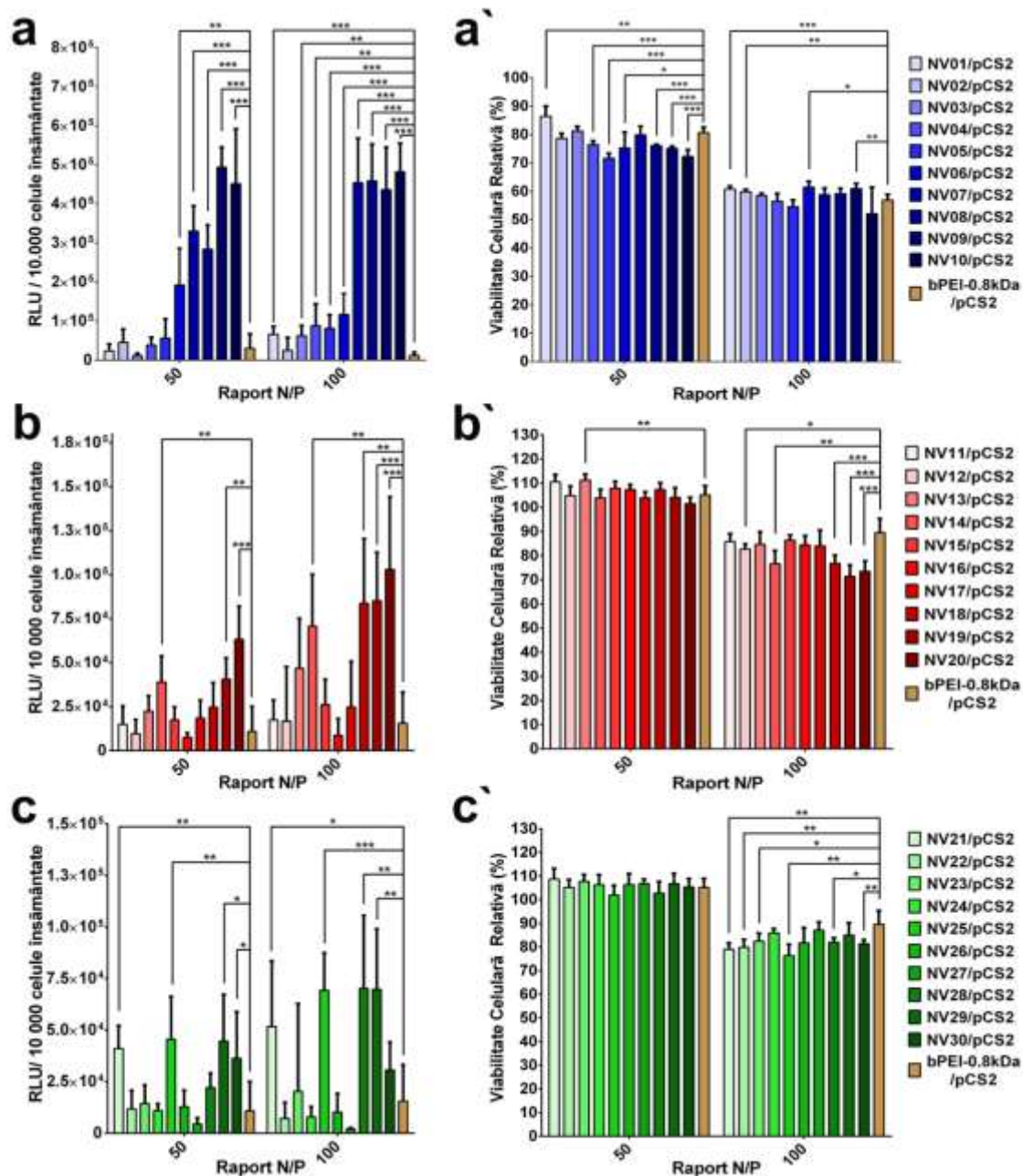


Figura 5. Eficiența de transfecție și viabilitatea celulară *in vitro* pe celule HeLa a polipelecșilor pe bază de vectorii non-virali NV și pCS2, raport N/P de 50 și de 100. Rezultatele pentru exprimarea eficienței de transfecție sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule; Testările *in vitro* de citotoxicitate s-au realizat prin testul MTS; Rezultatele sunt prezentate ca valori medii \pm deviația standard (SD); $n = 6-8$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ și *** $p < 0.001$ prin utilizarea testului t-student¹.

(A2) Librăria de vectori non-virali pe bază de scuolenă PEG-ilată și bPEI cu masă moleculară 25 kDa conectate prin intermediul unui linker difuncțional de aldehidă glutarică și compoziție molară prezentată în Tabelul 3.

Tabel 3. Compoziția chimică a vectorilor non-virali BF.

Vector	SQ-PEG-NH ₂		GA		bPEI-25kDa	
	n (nmol)	Raport molar SQ-PEG- NH ₂ /GA (echiv.)	n (nmol)	Raport molar SQ-PEG- NH ₂ /GA (echiv.)	n (nmol)	Raport molar bPEI-25kDa / SQ- PEG-GA (echiv.)
BF1	19.98	1	19.98	1	1.11	0.06
BF2	19.98	1	19.98	1	3.33	0.17
BF3	19.98	1	19.98	1	5.55	0.28
BF4	19.98	1	19.98	1	8.88	0.44
BF5	19.98	1	19.98	1	11.10	0.56

Studiile TEM (Figura 6) au demonstrat că vectorii formează nanoparticule core-shell cu dimensiuni cuprinse între 269 nm și 1632 nm. Prin electroforeza în gel de agaroză s-a determinat că la raportul N/P = 5 vectorii complexează pCS2. Testările *in vitro* de determinare a citotoxicității (Figura 6) și a eficienței de transfecție pe celule HeLa (Figurile 6 și 7) au arătat că la rapoartele N/P de 5 și de 7 viabilitatea celulară în cazul poliplecșilor BF/pCS2 similară cu cea a matorului bPEI-25kDa/pCS2, iar la raportul N/P de 10 o citotoxicitate mai mare decât în cazul matorului, ceea ce a fost explicată prin mărirea concentrației în unități de aldehidă glutarică care este cunoscută în literatură că induce toxicitate la testările *in vitro* pe celule.

Concluzia generală a acestui studiu este că sistemele pe bază de scuolenă PEG-ilată, bPEI-25kDa și conectate prin intermediul aldehidei glutarice pot fi utilizate cu succes în formarea poliplecșilor cu pCS2 la raportul N/P de 5 și având în compoziție vectorului BF4, iar pentru raportul N/P de 7 având în compoziție vectorul BF5. Astfel, bPEI-25kDa poate fi integrat cu succes în sistemele constituționale dinamice pentru a fi utilizate ca vectori non-virali pentru transportul și transfecția acizilor nucleici.

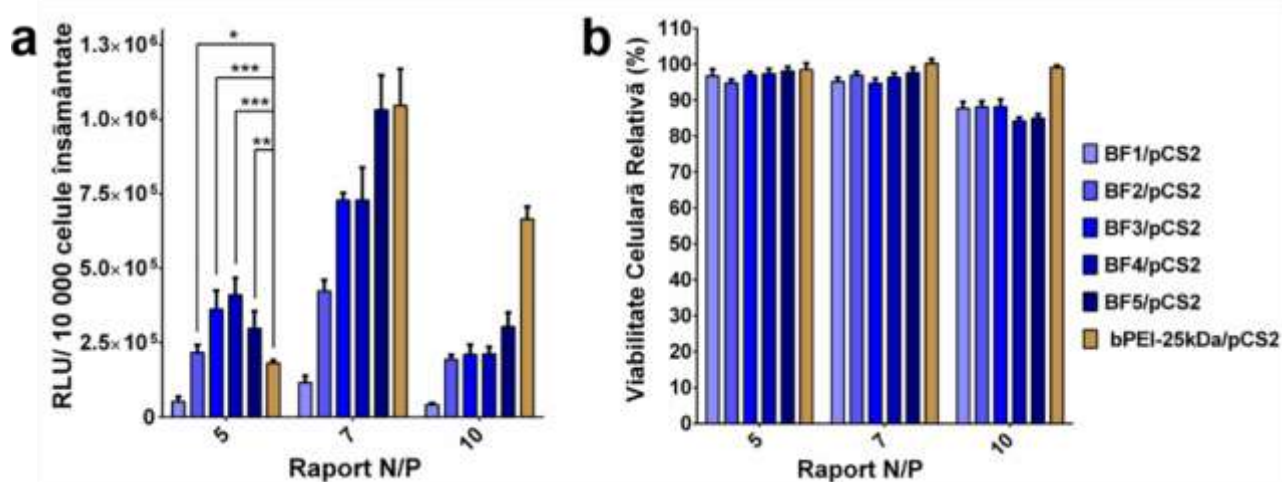


Figura 6. (a) Eficiența de transfecție și (b) citotoxicitatea *in vitro* ale poliplecșilor BF/pCS2 pe celule HeLa. Rezultatele pentru eficiența de transfecție sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate. Testarea citotoxicității *in vitro* a fost realizată prin aplicarea testului MTS pe celule HeLa. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii ± deviația standard (S.D.); n = 6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ și *** $p < 0.001$ prin utilizarea testului t-student.

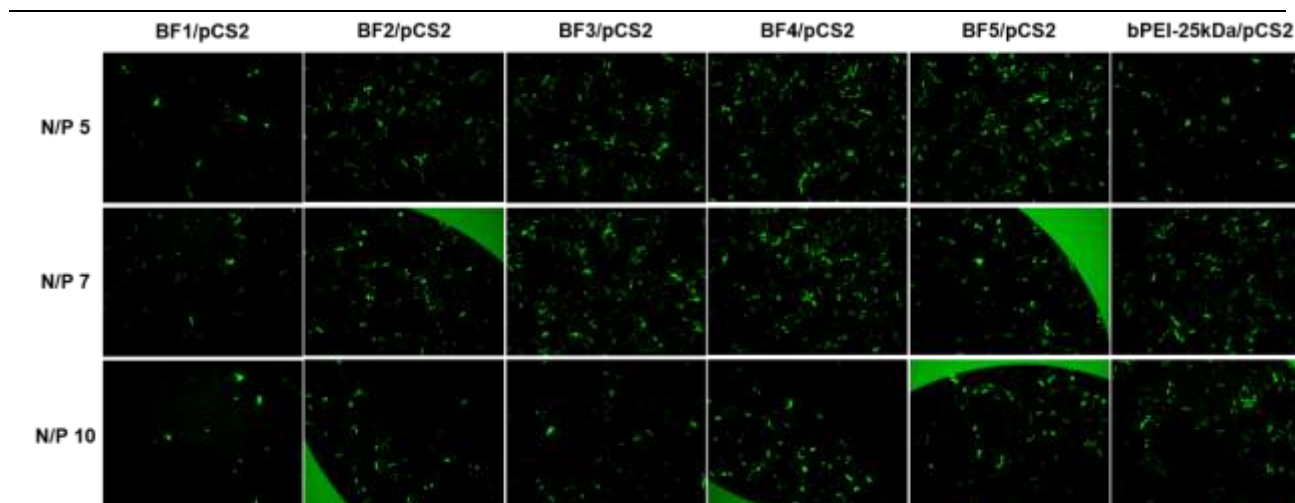


Figura 7. Eficiența de transfecție a poliplexșilor BF/pCS2 și a martorului bPEI-25kDa/pCS2 la diferite rapoarte N/P pe celule HeLa.

(B) Modificarea vectorilor non-virali pentru aplicații țintite: Vectori non-virali pentru terapia genică a cancerului de sân

S-a propus modificarea vectorului NV10 cu peptida DP18 (WXEAAAYQRFL, joacă un rol important în cancerul de sân triplu negativ⁴, iar poliplexul format după complexarea cu pCS2 a fost testat *in vitro* pe linia celulară specifică MCF7 (cancer de sân) și una nespecifică HeLa. DP18 a fost atașată vectorului NV10 prin intermediul **linkerului biocompatibili PEG difuncționalizat cu funcțiuni esterice NHS (N-hidroxisuccinimidică) și care reacționează cu grupările aminice primare la pH fiziologic**. Vectorul rezultat DP18-PEG₄-NV10 complexează plasmidul pCS2 la rapoarte molare N/P mai mari de 50, în timp ce vectorul NV10 la rapoarte mai mari de 10 (Figura 8). Acest rezultat demonstrează o scădere a capacității de complexare a vectorului modificat cu peptida. De asemenea, se poate remarca faptul că în urma conjugării vectorului NV10 cu peptida DP18 se observă o specificitate a acestuia față de linia celulară MCF7 (cancer de sân) în comparație cu linia nespecifică HeLa, în timp ce vectorul NV10 prezintă aceeași specificitate pe ambele linii celulare (Figura 9).

În acest context, studiile ulterioare vor fi axate pe îmbunătățirea etapelor de sinteză și izolare a conjugatului de interes, precum și pe posibilitatea de a utiliza rapoarte diferite între vector și peptidă.

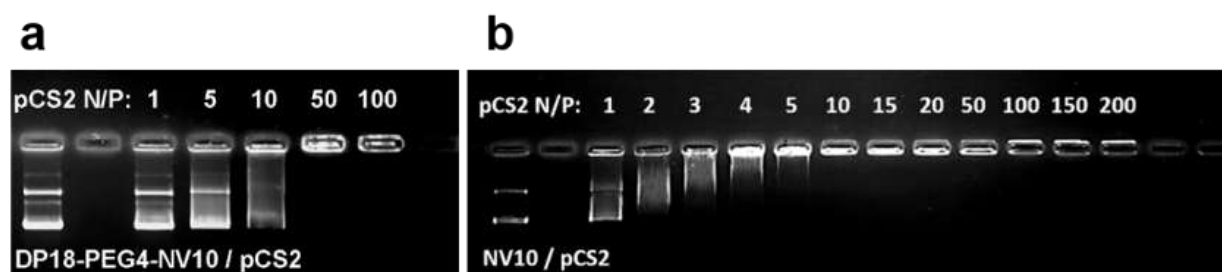


Figura 8. Mobilitatea electroforetică a pCS2 în prezența de (a) DP18-PEG₄-NV10 și (b) NV10.

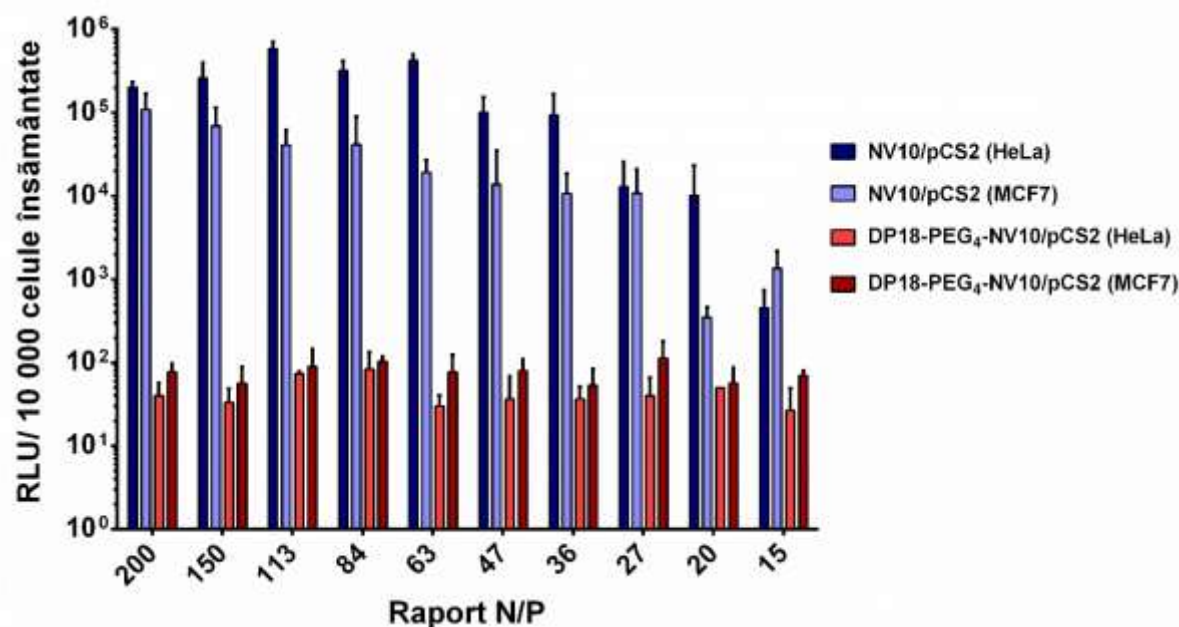
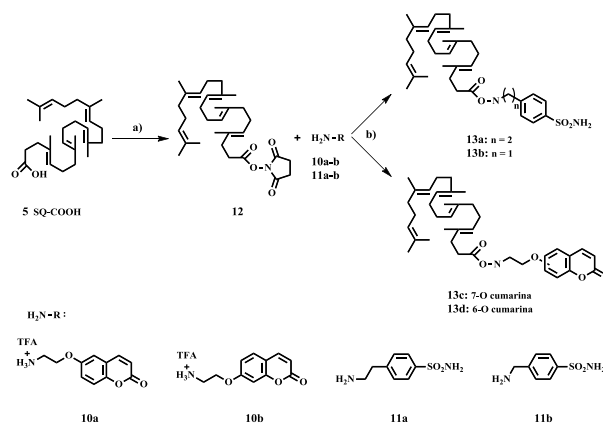


Figura 9. Eficiența de transfecție a poliplexșilor DP18-PEG₄-NV10/pCS2 și NV10/pCS2 pe liniile celulare HeLa și MCF7. Rezultatele sunt exprimate ca unități relative de luminescență (RLU) pe 10000 de celule însămânțate.

(C) Conjugate pe bază de scualenă funcționalizată cu benzulfonamide sau cumarine, ca inhibitori ai anhidrazei carbonice

Derivații de scualenă au fost obținuți prin reacții de cuplare ale acidul scualenic cu diferiți derivați de cumarină și benzulfonamide. Caracterizarea compușilor a fost realizată prin RMN, MS și analiză elementală confirmând obținerea compușilor propuși și au prezentat capacitate de autoasamblare în medii apoase la pH fiziologic. Evaluarea *in vitro* pentru determinarea profilului de inhibare a izoformelor hCA I, II, IX și XII a fost realizată prin tehnica în flux oprit în prezența derivaților sintetizați (Tabel 4). Hibrizii ce conțin restul benzulfonamidă au prezentat o selectivitate ridicată și un profil de inhibare excelent împotriva izoformei hCA II față de celelalte izoforme tumorale hCA IX și hCA XII. De asemenea, aceștia au prezentat valori ale K_i mult mai bune decât ale compușilor de plecare. Acțiunea inhibitorie excelentă a acestor compuși împotriva izoformei citosolice hCA II îi recomandă ca potențiali candidați în studiile preclinice ale glaucomului sau ale afecțiunilor conexe în care hCA II este implicată.

Tabel 4. Activitatea inhibitorie și raportul de selectivitate pentru compușii 13a-d și AAZ pe izoformele hCA I, hCA II, hCA IX și hCA XII, obținute prin utilizarea testului de hidratare a CO₂ folosind tehnica prin flux oprit⁵.



Compus	K_i (nM)[*]				Raport de selectivitate
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII	(CA II/IX)
13a	3516	62.3	1887	844	0.0330
13b	6842	5.0	3559	>10000	0.0014
13c	>10000	>10000	7215	>10000	>1.386
13d	>10000	>10000	8817	>10000	>1.134
AAZ	250	12.1	25.8	5.7	0.468

[*] Rezultatele sunt exprimate ca medie a trei determinări diferite utilizând tehnica prin flux oprit, erorile valorilor raportate au fost situate în intervalul $\pm 5 - 10 \%$.

Studii de modelare moleculară *in silico* (Figura 10): Pentru a corela structurile chimice cu profilul de inhibare ale compușilor 13a și 13b au fost efectuate studii de andocare și optimizări cu centrele active ale CA II (PDB 5LJT). În toate soluțiile utilizate pentru andocare, derivații cu benzensulfonamidă s-au poziționat profund în regiunea centrelor active, coordinând atomul de zinc cu atomul de azot încărcat negativ de la gruparea (SO₂NH⁻) (figura 10.). De asemenea, au fost observate și formarea de legături de hidrogen între NH⁻ și S=O din grupările sulfonamidei cu grupările OH și NH ale poziției T199 din CA II, iar inelul fenil s-a poziționat în zona definită de V121, V143 și L198 ale CA II. Lanțurile alifatice ale compușilor 13a (figura 10a) și 13b (figura 10b) sunt dispersate în masa enzimei unde formează interacțiuni de stabilizare de tip Van der Waals cu reziduurile din jumătatea lipofilă a centrelor active I22, F131, V135, P202 și L204 din CA II. În cazul compusului 13a, lanțul scualenic ajunge în zona care este expusă la solvent și interacționează cu reziduurile de suprafață R27, P138 și E205 ale CA II, în timp ce compusul 13b are capacitatea să interacționeze foarte pronunțat și cu zona hidrofobă a CA II, care este definită de reziduurile F20, P21, I91 și G132 ale CA II. Mai mult, lungimea conectorului cu o singură unitate metilenică între gruparea amidică legată de scualenă și cea fenilică legată de gruparea sulfonamidă (13b) duce la formarea unor legături de hidrogen distanțate între amida C=O din compusul 13a și grupările NH₂ din lanțul lateral al Q92 al CA II. Este posibil ca lungimea mai mică a conectorului împreună cu rețeaua extinsă formată din contacte hidrofobe să

explice un profil mai bun de inhibare a derivatului 13b față de 13a, unde conectorul este format din două unități metilenice.

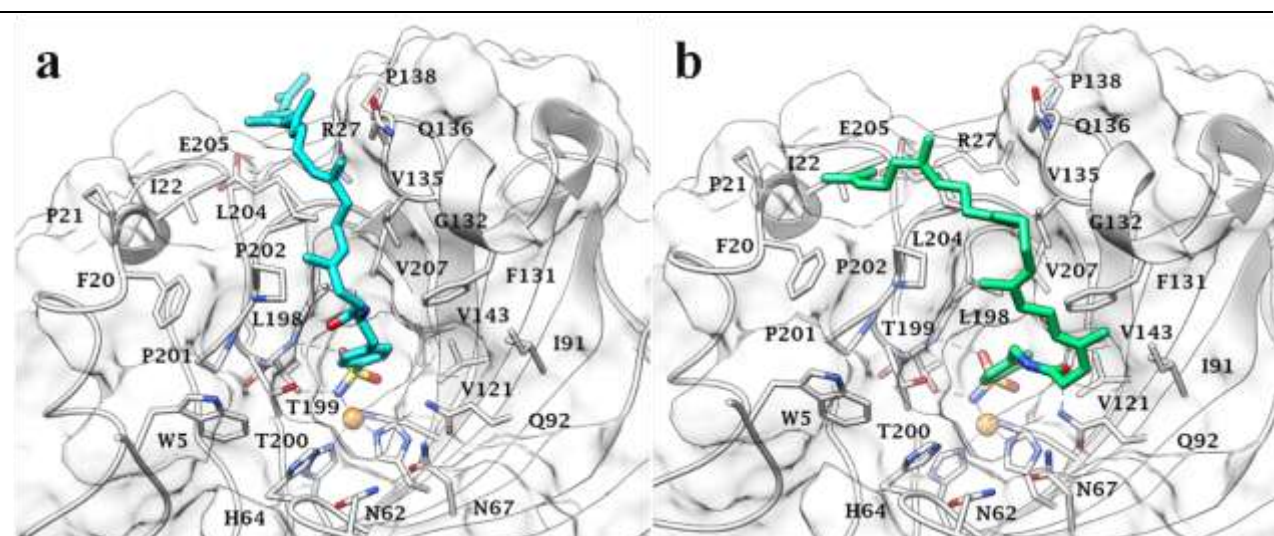
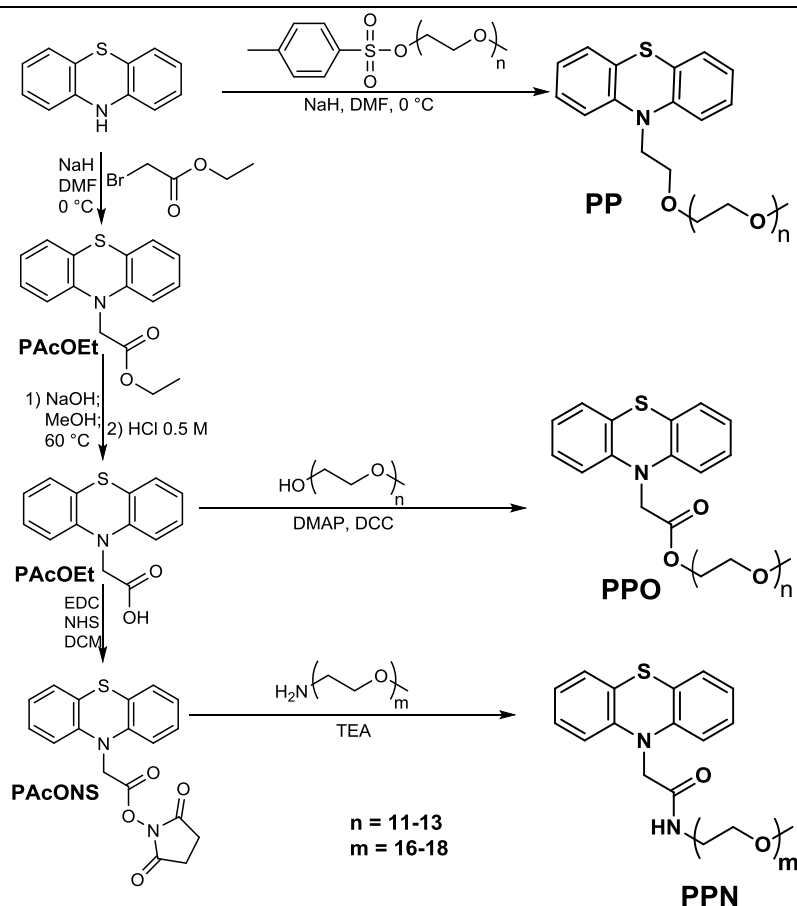


Figura 10. Modul de legare a compușilor 13a (a) și 13b (b) în centrele active ale CA II utilizând modelarea moleculară in silico. Legăturile de hidrogen sunt reprezentate ca linii întrerupte de culoare neagră⁵.

(D) Sinteza unei serii de derivati PEG-ilati de fenotiazina cu activitate antitumorală⁶



Schema 1. Reprezentarea schematica a sintezei derivatilor PEG-ilati

Procedura experimentală:

Sinteza derivatului **PP** prin N-alkilarea fenotiazinei

Intr-un balon rotund cu trei gaturi imersat într-o baie de gheață, a fost dizolvată NaH (0.065 g, 2.2 eq) în 7 ml DMF sub atmosferă inertă de azo și soluția rezultată a fost menținută la 0°C timp de 20 minute, după care peste ea s-a adăugat o soluție de 0.2565 g fenotiazina în 3 ml DMF. După 20 de minute, când amestecul de reacție a devenit de culoare orange intens, s-a picurat lent o soluție de derivat tosilat în DMF (0.95 g Ts-PEG (1 eq) în 3 ml DMF) și amestecul a fost menținut sub agitare magnetică la temperatura camerei timp de 24 de ore, după care a fost spălat cu saramură și filtrat pentru îndepărtarea impurităților solide. Faza organică a fost spălată de 3 ori cu diclormetan, uscată pe MgSO₄, filtrată, concentrată la rotaevaporator, iar produsul obținut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (DCM:metanol 10:1, v/v) când s-a obținut un lichid roșu vâscos, cu un randament de reacție $\eta=37\%$.

Sinteza derivatului **PPN** prin reacția de amidare a esterului activat **PAcONS**.

Intr-un balon de 30 ml s-a introdus 0.5 g ester activat dizolvat în 10 ml acetoneitril sub agitare magnetică la temperatura camerei, după care s-a adăugat 1.06 g de PEG-NH₂ dizolvat în 0.2 l TEA. Amestecul de reacție a fost agitat magnetic la temperatura camerei timp de 24 de ore, după care a fost concentrat la rotaevaporator și purificat prin cromatografie pe coloană (eluent: DCM/metanol în 10/1, v/v) când s-a obținut un lichid vâscos de culoare orange, cu un randament de reacție $\eta=51\%$.

Sinteza derivatului de fenotiazina **PPO** prin reacția de esterificare

Intr-un balon de 10 ml au fost introduse secvențial: 0.1 g ester activat **PAcONS**, 3 mL DCM, 0.012 g DMAP (0.25 eq) și 0.428 g metoxi-polietilenglicol (2 eq). După 15 minute, s-a adăugat 0.1 g de DCC (1.25 eq) și amestecul de reacție a fost menținut timp de 20 minute la 0°C, după care a fost menținut 24 de ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost filtrat, concentrat la rotaevaporator, redizolvat în DCM, filtrat și spălat cu 100 ml HCl 0.5 M. Faza organică a fost extrasă de 3 ori cu DCM, concentrată la rotaevaporator și ulterior purificată pe coloană cromatografică (DCM/metanol, 10/1, v/v) când s-a obținut un lichid vâscos de culoare orange cu un randament $\eta=43\%$.

Caracterizare structurală și morfologică

Succesul sintezei compusilor propuși a fost demonstrat prin spectroscopie ¹H-NMR și FTIR. Spectrele ¹H-NMR au arătat dispariția deplasării chimice pentru protoniul legat de atomul de azot al fenotiazinei, și prezenta deplasărilor chimice caracteristice protonilor aromatici și alifatici în raportul corect al integralelor. În cazul derivatului PPN, deplasarea chimică a protonului amida a fost evidențiat la 8.39-8.26 ppm (Figura 11). În plus, spectrul ¹³C-NMR al celor 3 derivați a evidențiat toți atomii de carbon specifici structurilor propuse.

Toate aceste date spectrale au confirmat obținerea compusilor propuși, dar și gradul lor înalt de puritate.

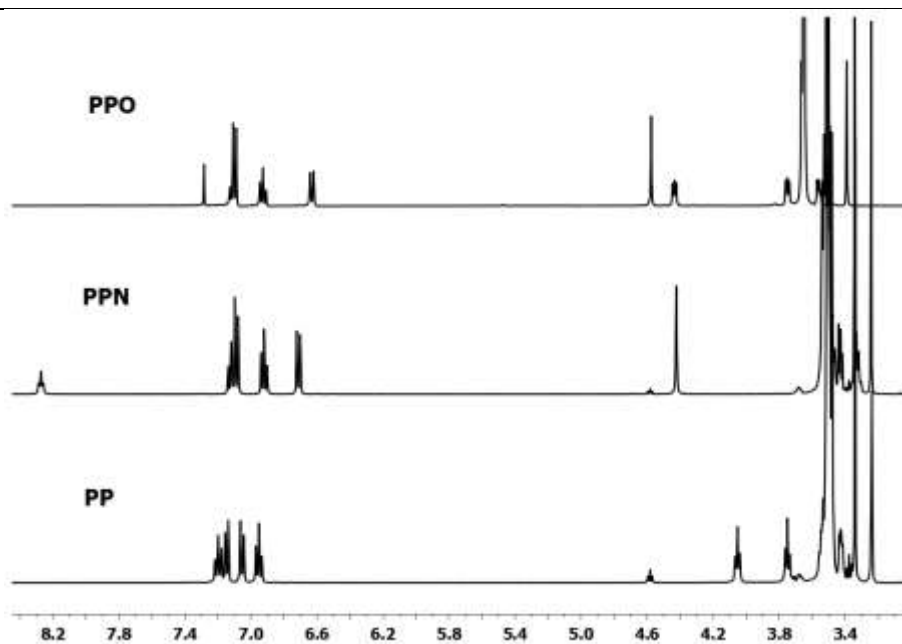


Figura 11. Spectrele $^1\text{H-NMR}$ ale derivatilor PEG-ilati

Spectrele FTIR (Figura 12) au confirmat datele de spectroscopie RMN. Ele au aratat vibratiile caracteristice nucleului de fenotiazina si lantului PEG pentru cei trei compusi, si vibratii specifice pentru gruparea amida (1690 cm^{-1}) si repectiv ester (1742 cm^{-1}).

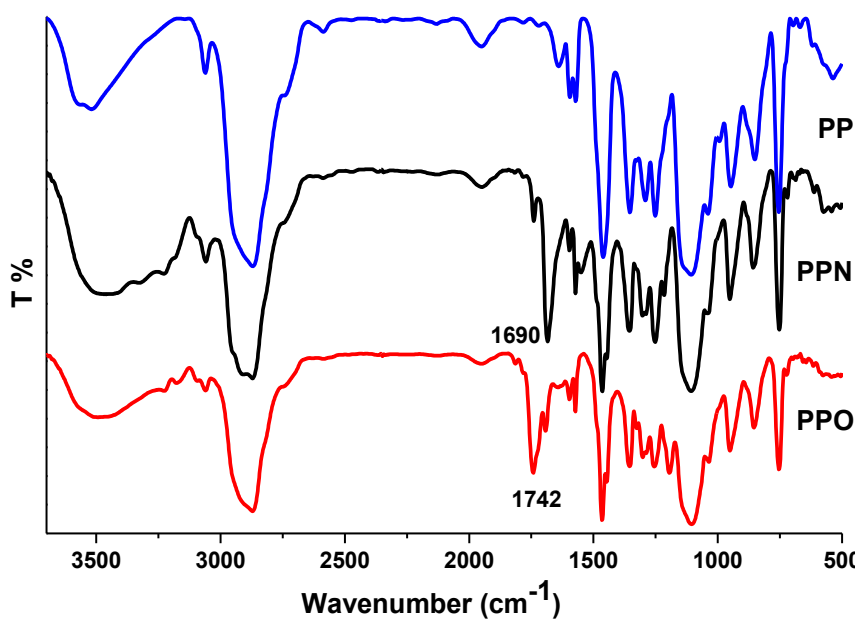
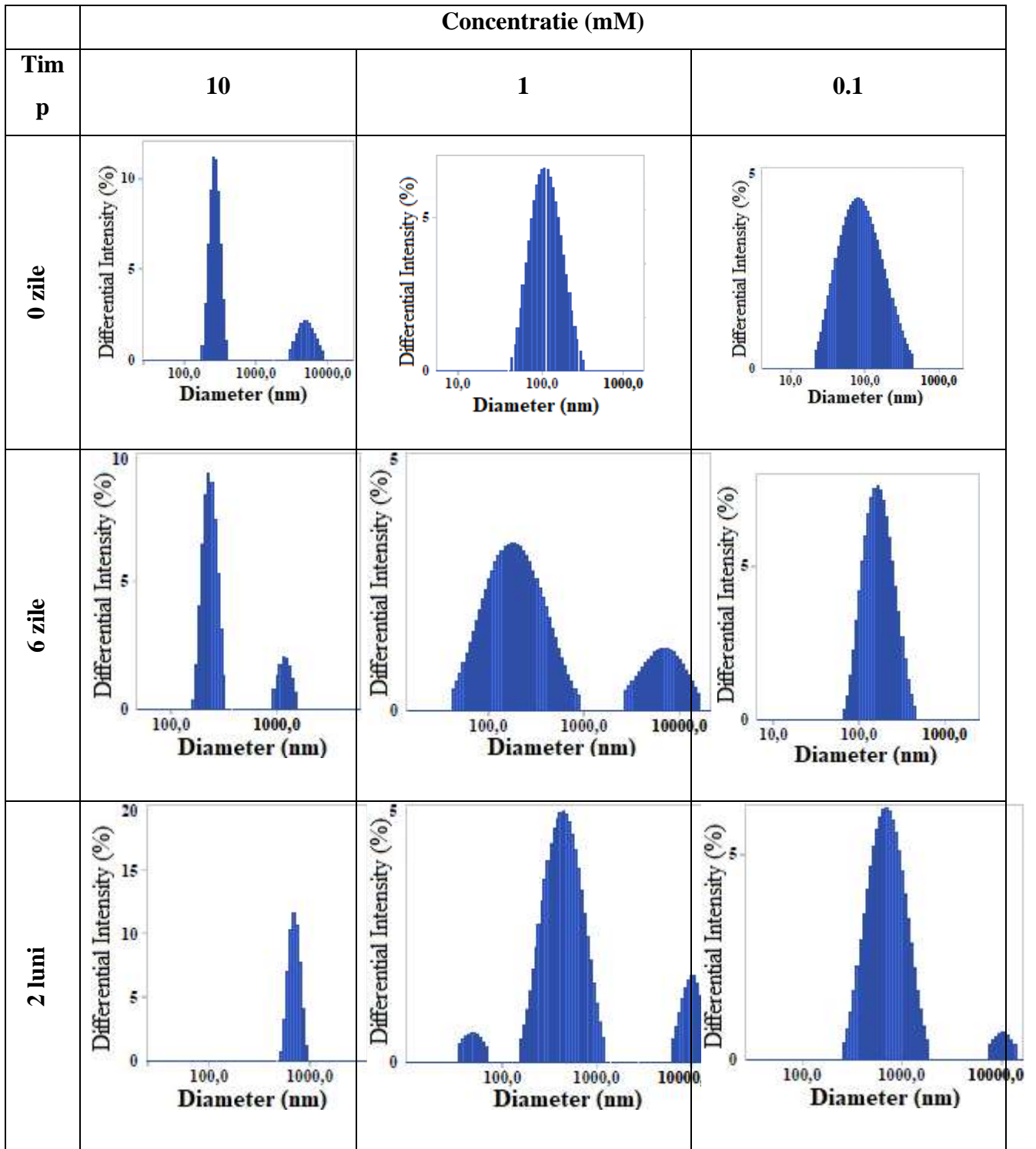


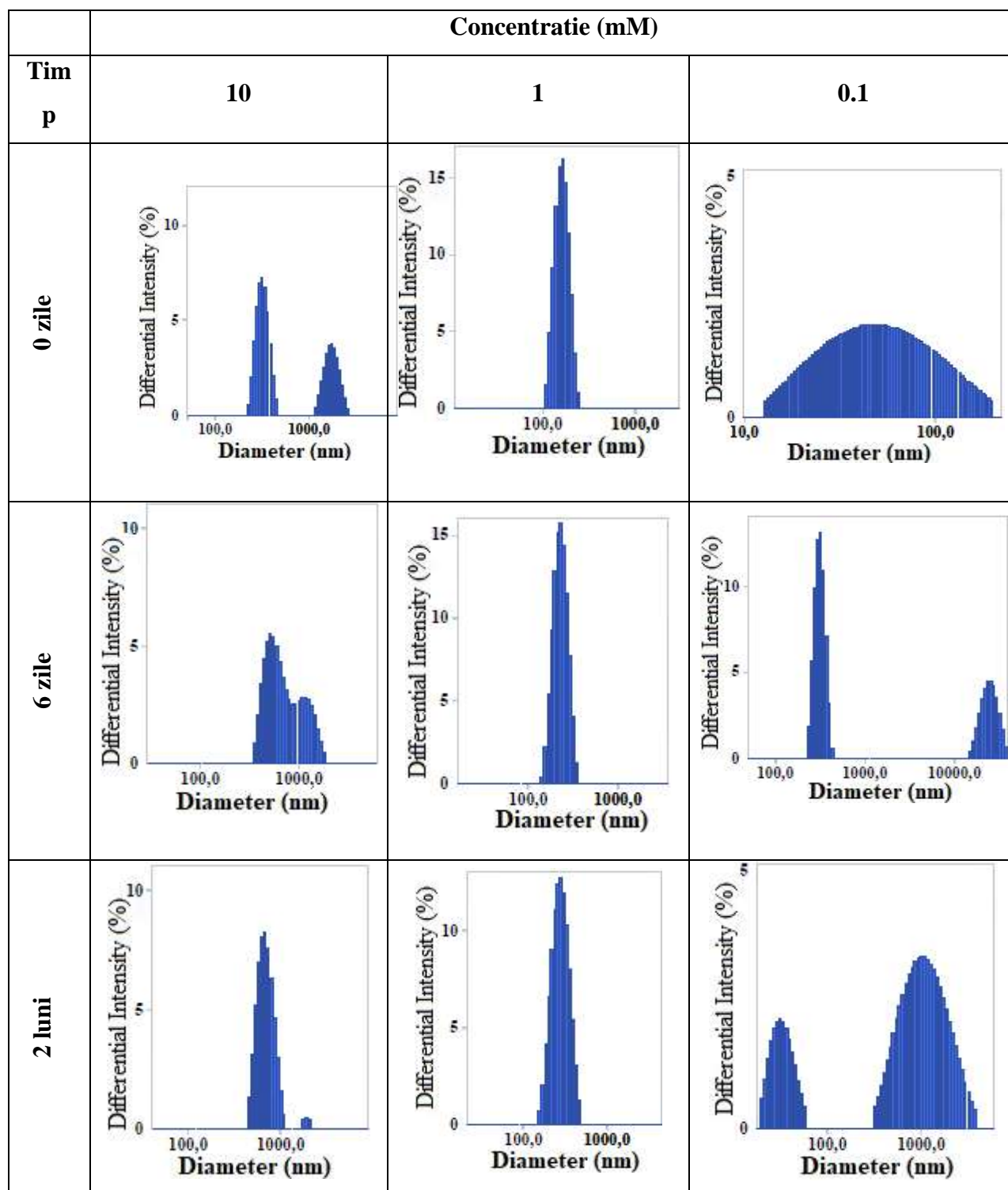
Figura 12. Spectrele FTIR ale derivatilor PEG-ilati de fenotiazina

Cei 3 compusi au demonstrat un comportament de autoansamblare in apa, demonstrat prin metoda DLS, care a indicat o variatie a volumului hidrodinamic a nanoparticulelor, in functie de structura derivatilor si concentratia acestora in apa, de la 322 nm la 63 nm (Figura 13).

a) PP



b) PPO



c) PPN

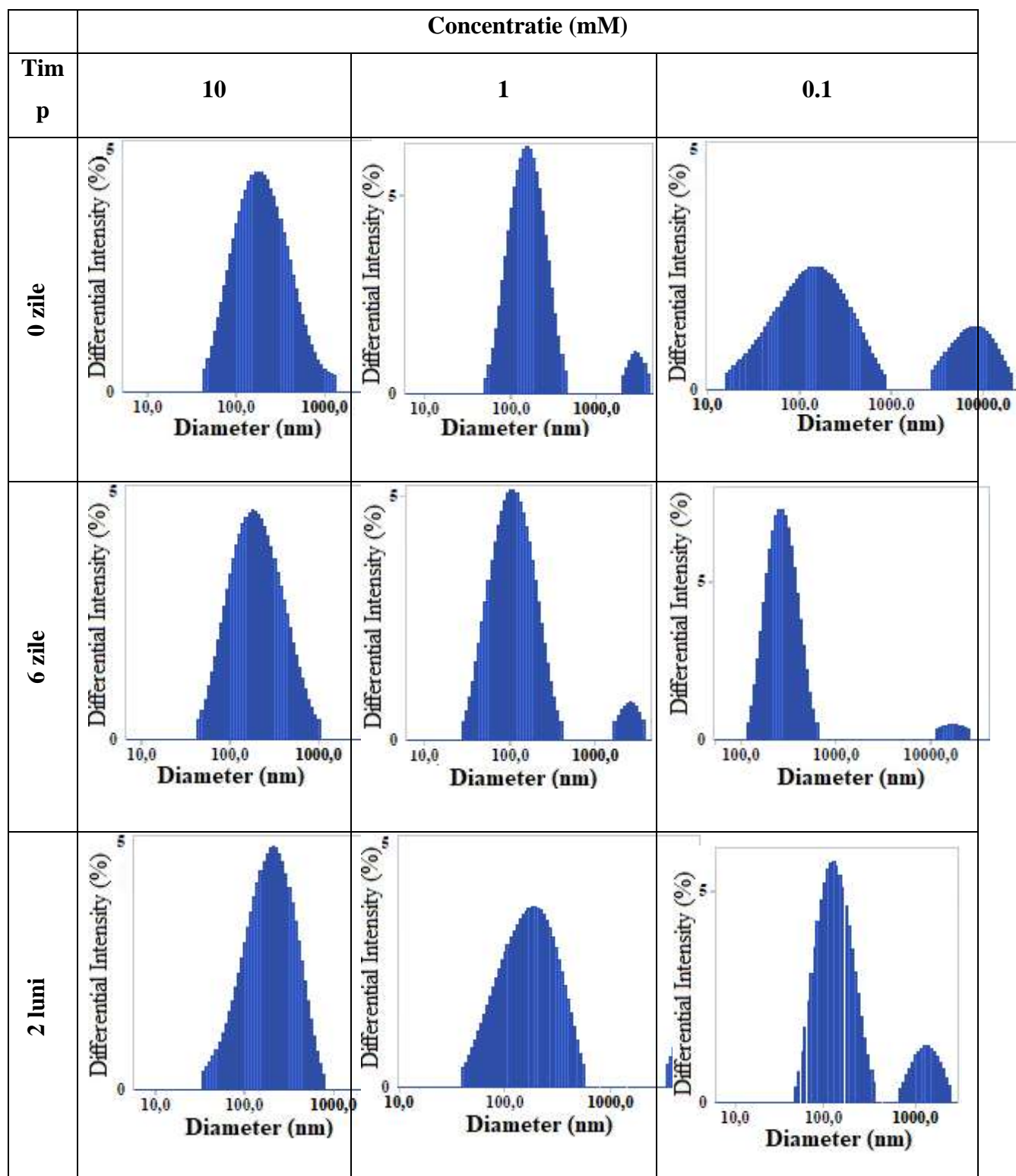


Figura 13. Distributia diametrului agregatelor masurata prin metoda DLS

Citotoxicitate

Datele preliminare ale testelor de citotoxicitate realizate pe celule normale (NHDF) si tumorale (HeLa) au indicat ca 2 din cei 3 compusi au activitate citotoxica dependenta de concentratie pe celule canceroase, in timp ce viabilitatea celulelor normale este foarte putin afectata (Figura 14).

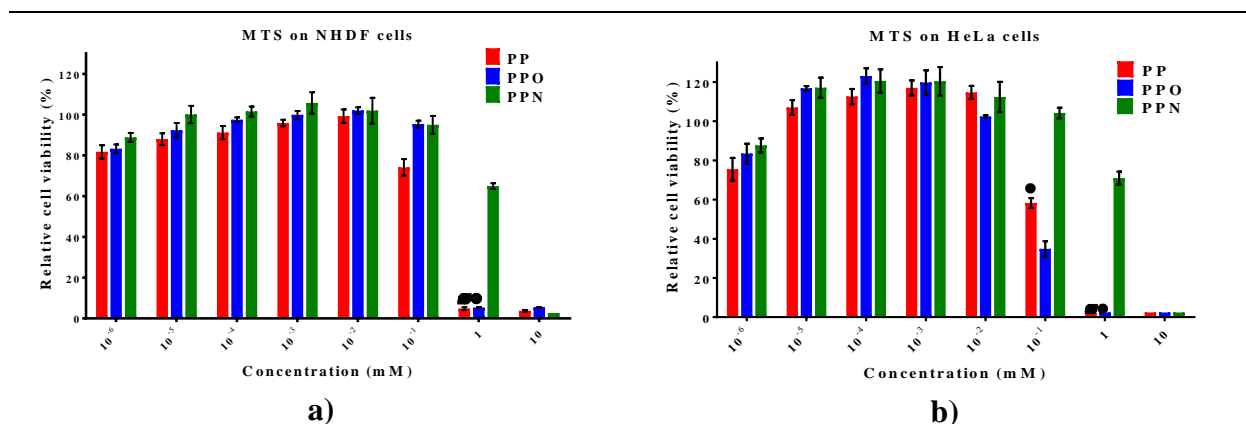


Figura 14. Viabilitatea celulara pe a) fibroblasti NHDF si b) celule canceroase de tip HeLa.

A.3.1.2. Nanoplatforme bazate pe polimeri sintetizati cu precizie

A.3.1.2.1. Proiectarea inteligenta a unei platforme hibride, functionale, electrosensibile si flexibile, pe baza de derivat de poli(3,4-ethylendioxitiofen), ca alternativa pentru o viabilitate celulara crescuta

Polimerii conjugati electroconductori (CPs) au intrat recent in domeniul biomaterialelor pe baza de polimeri sintetici iar aria lor de aplicatii practice a explodat in ultima decada^{7,8}. Mai precis, acest tip de polimeri sunt materiale utile, inteligente si potrivite pentru nou-aparutul domeniu al asa-numitelor "bioelectronicelor organice" in efortul de a conecta interfetele biotic/abiotic. Natura conductoare mixta electronic-ionica a polimerilor conjugati este foarte promitatoare pentru interfata cu tesuturile si celulele sensibile la stimuli electrici (neuronale, cardiace), dar toate tipurile de celule de la cele osoase la dermale se bazeaza printre altele pe mecanismul semnalizarii ionice. Asadar nu este pe deplin surprinzator ca substraturile electroconductoare pot imbunatati interfetele biologice chiar in absenta stimulării electrice exogene⁸. Luand in considerare capacitatea de a modula proprietatile prin design structural, proprietatile mecanice si cele chimice, CPs sunt materiale atractive pentru aplicatii in ingineria tisulara.

In prezentul studiu, un polimer conjugat grefat este folosit ca si compozit molecular pentru acoperirea unui substrat de polipropilene izotactica i-PP (un polimer sintetic folosit in diverse aplicatii medicale (suturi sau mese chirurgicale) cu scopul diversificarii aplicabilitatii sale.

Ideea noastra a fost de a optimiza proprietatile unui nou material folosit la interfata biotica/abiotica si, abordand proiectarea structurii chimice indreptata spre functionalizarea catenelor laterale ale CPs prin folosirea oligo-e-caprolactonei (biocompatibile, cu conductivitate ionica ridicata, cu capacitate de solvatare a ionilor si o larga fereastra de stabilitate electrochimica), am reusit sa imbunatam in mod semnificativ transportu de ioni si trasductia ion-electronica cu un mediu biologic dinamic, viu si extrem de hidrofил.

Sinteza si caracterizarea macromonomerului EDOT-PCL ca element "cheie" in structura platformei hibride

Poli-ε-caprolactonele (PCLs) apartin primei generatii de poliesteri alifatici sintetici, a caror biodegradabilitate au motivat investigarea lor extensiva, in special ca materiale resorbabile⁹.

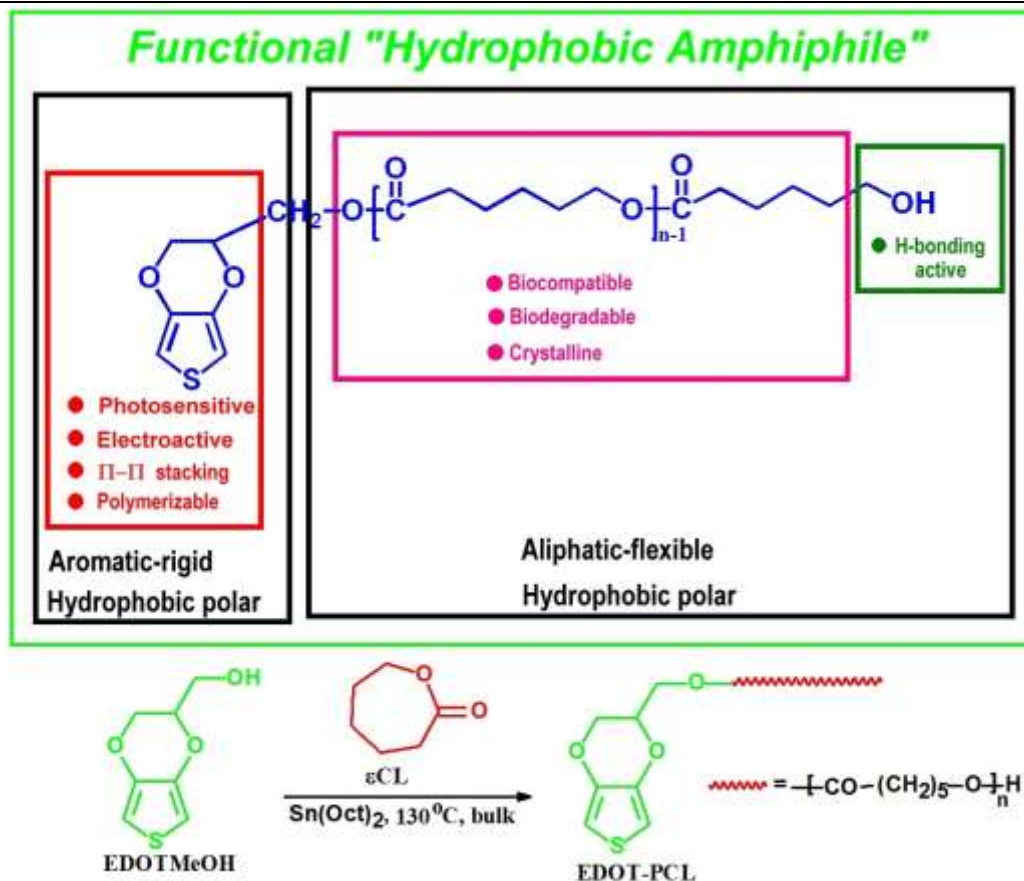


Figura 15. Caracteristicile functionale ale macromonomerului EDOT-PCL si calea de sinteza a acestuia

Desi o perioada PCL nu a mai fost un polimer la moda¹⁰, in ultima decada s-a remarcat un reviriment si un interes renascute¹¹, mai ales pentru sistemele copolimerice continand segmente derivate de ε-caprolactona cu functionalitati avansate, folosirea acestora in arhitecturi polimerice sofisticate ca retele copolimerice multibloc, sisteme micelare.

In particular folosirea oligo-ε-caprolactonei (OCL) cu o masa moleculara mai mica de 3000 Da (care poate suferi fagocitat de macrofagi si celulele gigante urmata de degradarea intracelulara de catre esteraze) in diverse combinatii poate conduce la biomateriale care sa rezolve problemele legate de degradare lenta a PCL¹². Plecand de la aceste premize si pe baza experimtei noastre anterioare cu privire la macromonomerii electroactivi, am proiectat o noua structura sub forma unui "amfil hidrofofic" (Figura 15)¹³, pe baza de 3,4-etilendioxitiofen¹⁴. Macromonomerul EDOT-PCL, unul dintre putinii raportati pana in prezent a fost obtinut prin procedeul polimerii in masa a -ε-caprolactonei, folosind hidroximetil EDOT ca initiator si Sn(Oct)₂ ca si catalizator.

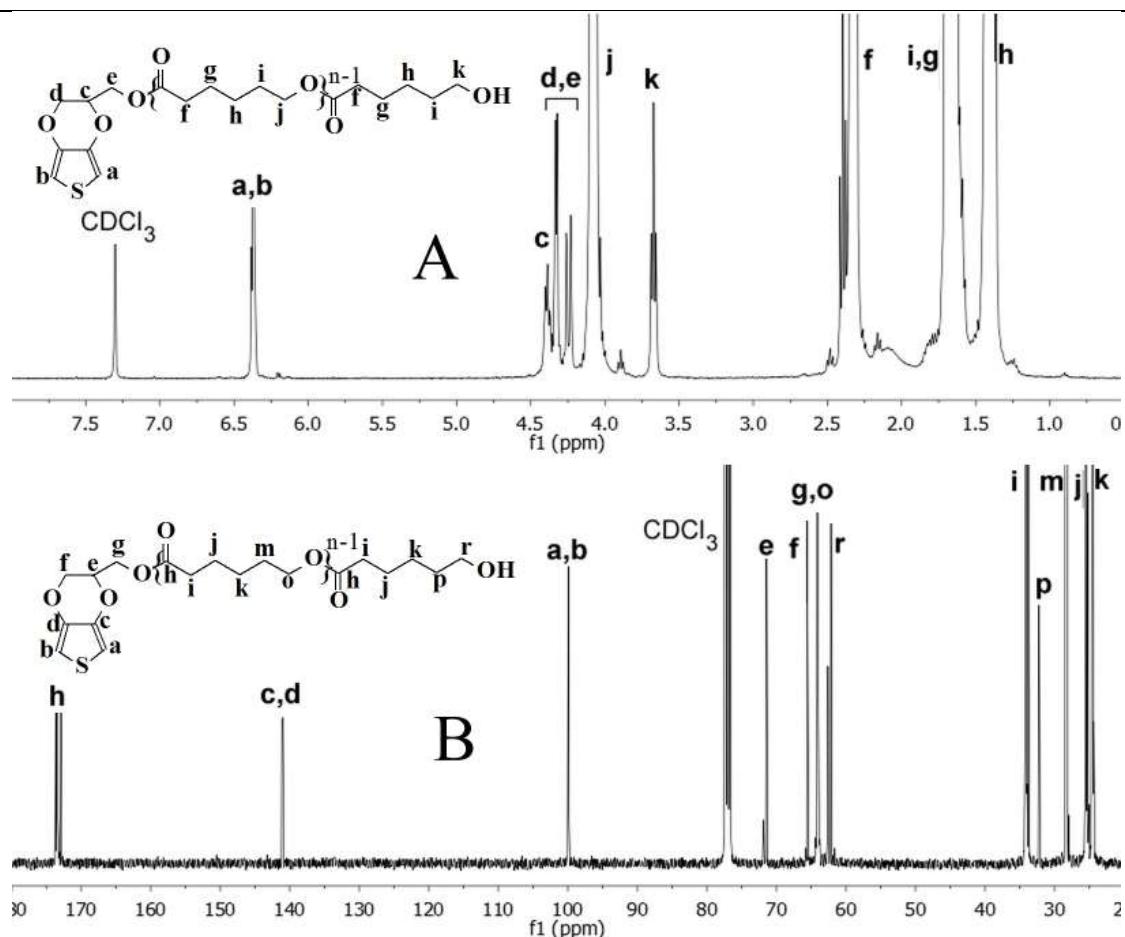


Figura 16. Spectrul ^1H -RMN (A) si ^{13}C -RMN (B) ale macromonomerului EDOT-PCL

Spectrele RMN ale noului compus sunt prezentate in figura 16, si care confirma obtinerea structurii propuse. In figura 16 sunt date de asemenea formula structurala si atribuirea semnalelor. Este de remarcat ca atat protonii cat si atomii de carbon ai ciclului tiofenic sunt clar decelati la 6.37 ppm in spectrul ^1H -RMN si respectiv la 99.99 ppm si 141 ppm in spectrul ^{13}C -RMN. Pentru unitatile structurale de PCL ale oligomerului, protonii asociati celor 4 atomi de carbon plasati in proximitatea gruparii carbonil (f, g, h si i) apar in domeniul 1.36-2.42 ppm, in timp ce picul atribuibil celor doi protoni alifatici CH_2 din vecinatatea atomului de oxigen (de tip j in Figura S1) apar dupa cum era de asteptat la 4.05-4.1 ppm. Merita de asemenea de mentionat ca semnalele atribuibile protonilor grupei CH_2 din vecinatatea gruparii hidroxil de la capatul catenei (protonii k la 3.66-3.69 ppm), cat si atomii de carbon a unitatii structurale finale de PCL (i, j, k, p in domeniul 24-34ppm si r la 66.3-66.6 ppm) apar separat de cele alor celorlalte unitati structurale. Atomii de carbon h ale carbonililor gruparilor esterice din PCL sunt evidentiati de asemenea ca un pic centrat la 173.46ppm.

Informatiile furnizate de spectrul ^1H -RMN au permis evaluarea gradului de polimerizare al PCL, precum si calcularea masei moleculare a macromonomerului EDOT-PCL. Astfel, prin compararea valorii integralelor protonilor de tip c, d si e (originari din initiatorul HMeEDOT) (sau cea a protonilor de tip k apartinand unitatii structurale finale ale catenei de PCL nou formate) cu valoarea integralei pentru $2n-2$ protoni de tip j ale celorlalte $n-1$ unitati structurale de PCL, s-a obtinut un grad de polimerizare de $n=16.5$ si o valoare a masei moleculare a EDOT-PCL $M_{n-1}^1\text{H-NMR} = 2055$.

Masa moleculara aparenta a macromonomerului EDOT-PCL a fost de asemenea evaluata prin masuratori GPC (Figura 17), utilizand cloroform ca eluent. Masuratorile au condus la o valoare a masei moleculare M_n de 3598Da si o valoare a indexului de polidispersitate de 1.49. Discrepanta dintre valorile obtinute prin cele doua metode potate fi atribuita diferentei semnificative dintre volumul hidrodinamic al standardelor de PS utilizate pentru calibrarea coloanelor GPC si cele ale PCL terminate cu o grupare aromatica.

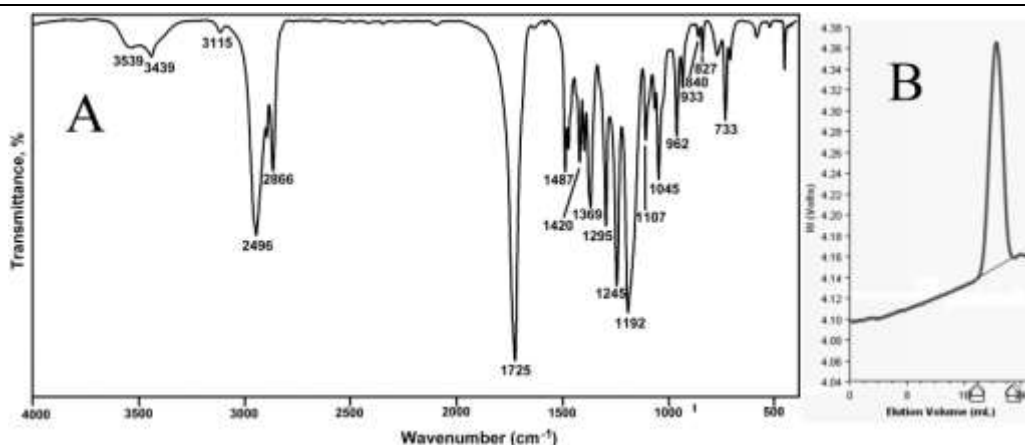


Figura 17. Spectrul FTIR (A) si curba GPC (B) ale macromonomerului EDOT-PCL

Spectrul FTIR al EDOT-PCL este prezentat in Figura 17. In acest spectru sunt prezente benzile caracteristice asociate cu elementele constitutive ale macromonomerului, adica ale inelul tiofenic (Th) si inelului dioxitiofen din gruparea EDOT, ca si benzi caracteristice catenelor oligomerice de PCL, precum si si benzi- senzitive ale cristalizarii acestora. Comportarea termica a EDOT-PCL a fost investigata prin masuratori DSC, inainte de temperatura initiala de degradare, in domeniul -10°C - 130°C (Figura 17a). La primul ciclu de incalzire in domeniul -10°C - 130°C (Figura 17a). Primul ciclu de incalzire a compusului cristalizat din solutie este reversibil in timp ce la a doua este macromonomerul cristalizat din topitura. In comparatie cu alti macromonomeri electroactivi raportati in trecut, EDOT-PCL este caracterizat de picuri endotermice nesimetrice in ambele cicluri de incalzire efectuate cu viteza de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, in plus fata de picul endotermic principal apare de asemenea si un umar.

Comparand pozitiile picurilor, ele apar la a doua incalzire la temperaturi ceva mai scazute decat la prima incalzire, cel mai probabil datorita faptului ca ciclul de racire de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a fost rapid astfel inact catenele polimerice sa se deplaseze si alinieze in timpul cristalizarii din topitura. Concluzia ca gruparea EDOT, cu geometria sa particulara influenteaza cristalizarea PCL, poate fi una rationala avand in vedere ca picurile endotermice sunt similare ca forma atat pentru topirea din solutie si respectiv a compusului cristalizat din topitura; astfel, modificarile morfologice nu sunt dependente nici de metoda de cristalizare, nici de istoricul termic. In alte cazuri, prezenta comportarii cu dubla topire a fost interpretata ca o consecinta a topirii a doua populatii diferite de cristale, atat in ce priveste marimea cat si grosimea. Picurile de topire la temperaturi mai inalte au fost atribuite unor cristale mai voluminoase, mai putin imperfecte, in timp ce cele de la temperaturi mai joase se datoreaza unor cristale mai mici, cu mai multe imperfectiuni. Singura diferenta care poate fi observata in curba calorimetrica in Figura 17a este aceea ca in cazul EDOT-PCL cristalizat din solutie picul mai pronuntat este la temperatura mai inalta, in timp ce la a doua incalzire este la temperatura mai scazuta. Aceasta insemna ca in

timpul cristalizării din soluție, datorită libertății mai mari de mișcare a catenelor de PCL, cristalele formate sunt mai groase, comparativ cu cele mai subțiri formate din topitura, unde catenele de PCL au mobilitate mai redusă.

A.3.1.2.2. Nanoplatforme bazate pe diferite tipuri de silice

În etapa actuală au fost sintetizate 5 tipuri de silice: o silice mezoporoasă cu cca 20% grupe CH_3 (MD1, $A_{\text{BET}} = 943.8 \text{ m}^2/\text{g}$), o silice cu cca. 10% grupe mercaptopropil (Sil2, $A_{\text{BET}} = 589.6 \text{ m}^2/\text{g}$), o silice mezoporoasă derivată din aceasta (MSil2, $A_{\text{BET}} = 1319 \text{ m}^2/\text{g}$) –după rețete din literatură¹⁵, precum și două silice având grupe funcționale glucozidice, una “neporoasă” (Sil84) și una mezoporoasă (MSil84). Structurile silicelor sunt reprezentate în figura 18.

Modificarea grupelor SH cu aliloxietilen-glucopiranozida s-a făcut prin fotoaditiv tiol-ena, combinată cu ultrasonare, reacția desfășurându-se în apă, în prezența de 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona drept inițiator. Silicea modificată a fost separată și spălată de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea derivatului de glucoză nereacționat. Este știut faptul că metodele de grefare post-sinteză a grupelor funcționale duc la acoperirea neomogenă a suprafeței, moleculele organice legându-se în special pe suprafețele exterioare și la capătul mezoporiilor. Totuși, chiar și o transformare chimică incompletă în cazul de față va determina modificarea hidrofiliei siliceii, iar grupările glucoză ar putea avea un rol important în mediul biologic, posibil ajutând la legarea conjugatului de doxorubicină pe celulele canceroase, care au afinitate pentru glucoză¹⁶ sau ajutând la modificarea pH-ului tumorilor solide¹⁷.

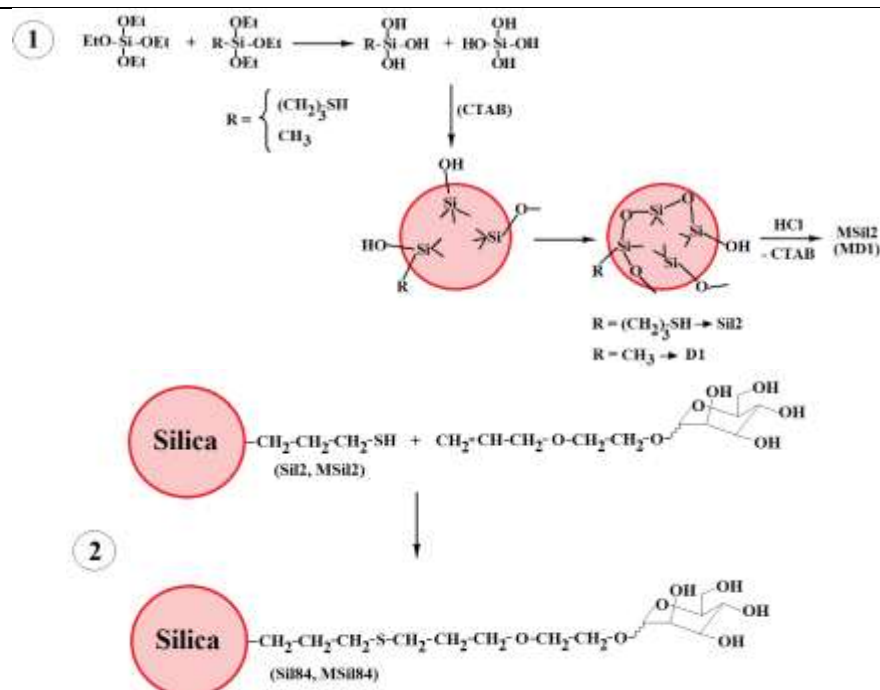


Figura 18. Sinteză silicelor

În spectrul FT-IR al siliceii inițiale, benzile caracteristice legăturilor SH, care apar în domeniul $2600\text{-}2540 \text{ cm}^{-1}$ sunt extrem de slabe și nu pot servi drept referință pentru modificarea chimică. Banda largă de la 688 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de întindere din mercaptani se diminuează în spectrul siliceii cu glucoză (Figura 19), și apar benzi noi la 661 cm^{-1} și 715 cm^{-1} atribuite vibrațiilor de întindere a legăturilor C-S-C. Alte benzi noi - în afara celor datorate grupelor OH și C-O (întindere), care se suprapun cu benzi din silice, majoritare - sunt

caracteristice derivatului de glucoza (870 , 760 , 1724 , 1692 cm^{-1}) si confirma legarea grupei functionale.

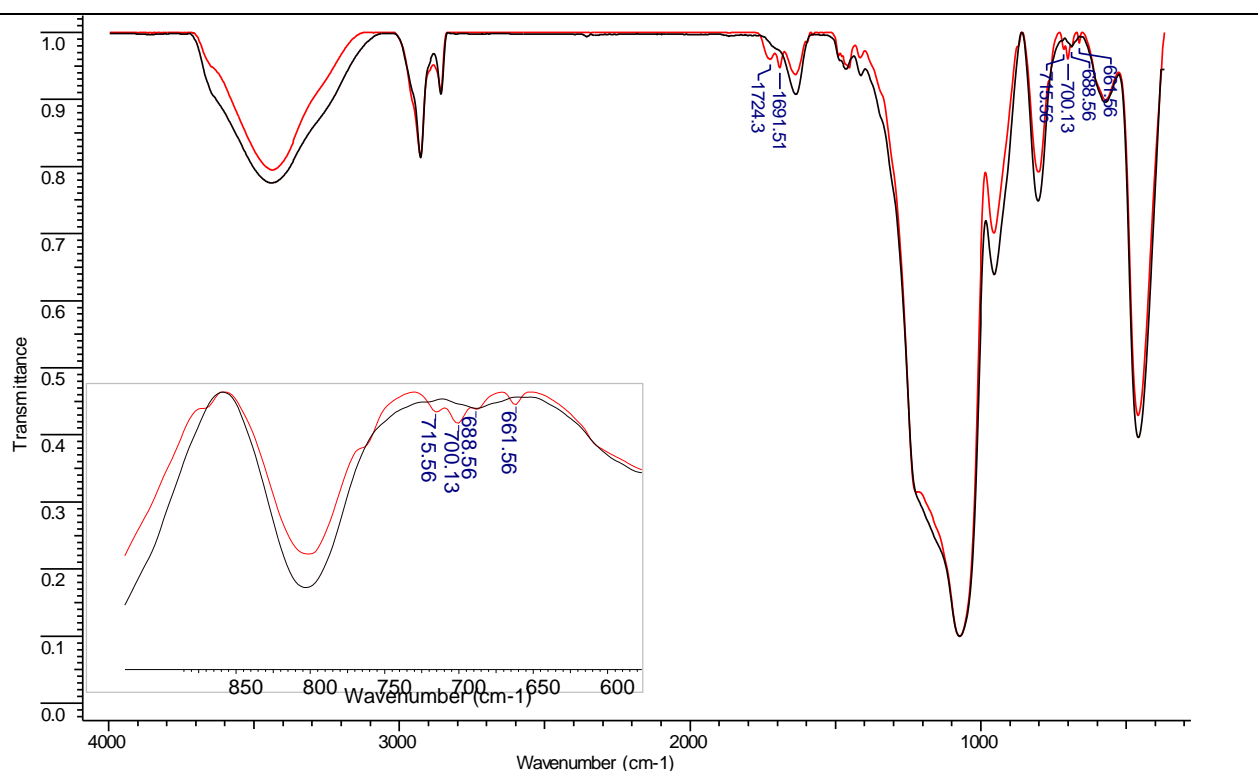


Figura 19. Spectrele FT-IR ale silicei mezoporoase MSil2 (linia neagra) si dupa modificare chimica cu glucoza –MSil84- (linia rosie): sunt marcate benzile noi, datorate glucozidei si puntilor tioeterice

Spectrele Raman au fost inregistrate la lungimi de unda diferite pentru silicele cu grupe mercapto sau glucoza (633 nm, respectiv 785 nm). In spectrele Raman ale silicelor Sil2 si MSil2, banda SH este vizibila la 2576 cm^{-1} si dispare in silicea modificata cu glucoza (Figura 20). Deasemenea, in spectrul MSil2 se remarca prezenta unei benzi puternice la 507 cm^{-1} , care se poate datora puntilor disulfura, legaturi labile¹⁸. Formarea noii legaturi tioeterice se reflecta in aparitia unor benzi in domeniul ~ 600 - 700 cm^{-1} (C-S din sulfuri alifatic) si 1213 cm^{-1} (CH_2 -S wag). Banda puternica de la ~ 1000 cm^{-1} se datoreaza legaturilor C-O din structura glucozidei.

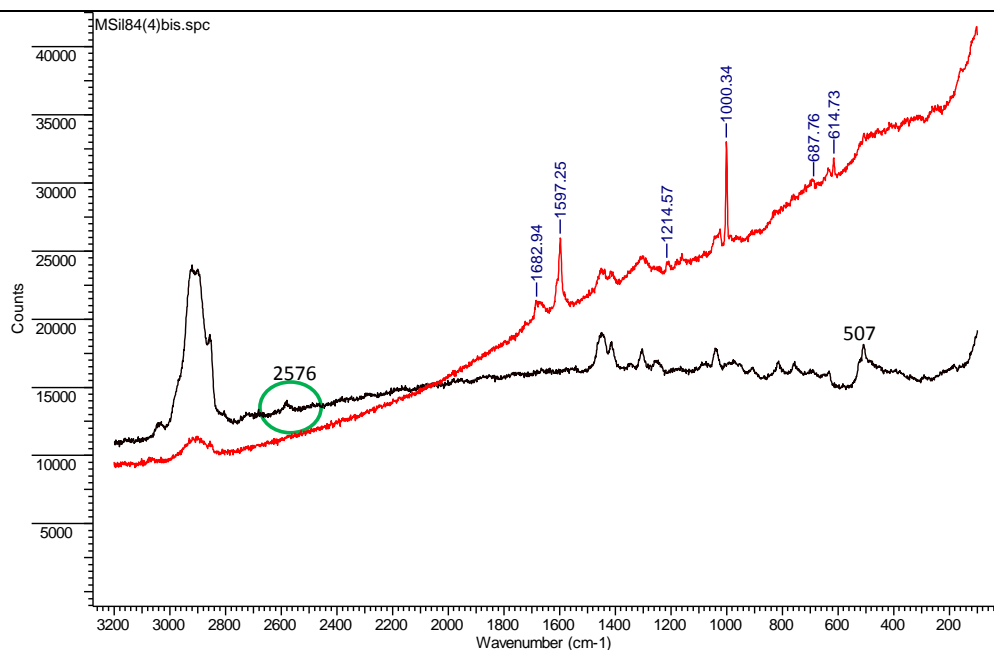


Figura 20. Spectrele Raman ale silicei mezoporoase cu grupe SH (linia neagra) si respectiv reactionate cu alil-glucozida (linia rosie)

Dupa modificare cu derivatul de glucoza, silicele devin mai hidrofile, dupa cum era de asteptat. In Figura 21 se observa diferenta semnificativa a comportarii la udare a silicelor imediat dupa imersarea in solutie de doxorubicina. Se remarca de asemenea o udare mult mai buna a silicelor mezoporoase fata de cele neporoase, in ambele variante de modificare chimica.



Figura 21. Aspectul pulberilor de silice cu grupe SH si respectiv glucoza la contactul cu solutia apoasa de doxorubicina clorhidrat

A.3.1.3. Nanoplatforme bazate pe sisteme de gelificare

Prepararea materialelor compozite ale hidrogelurilor supramoleculare pe baza formării quadruplecsilor de guanozină și dispersia diferitelor cantități de nanotuburi de carbon cu pereți unici (SWNT). Noile material compozite au prezentat proprietăți mecanice și de retenție a apei mult mai bune comparativ cu hidrogelul supramolecular de plecare (Figura 22)¹⁹.

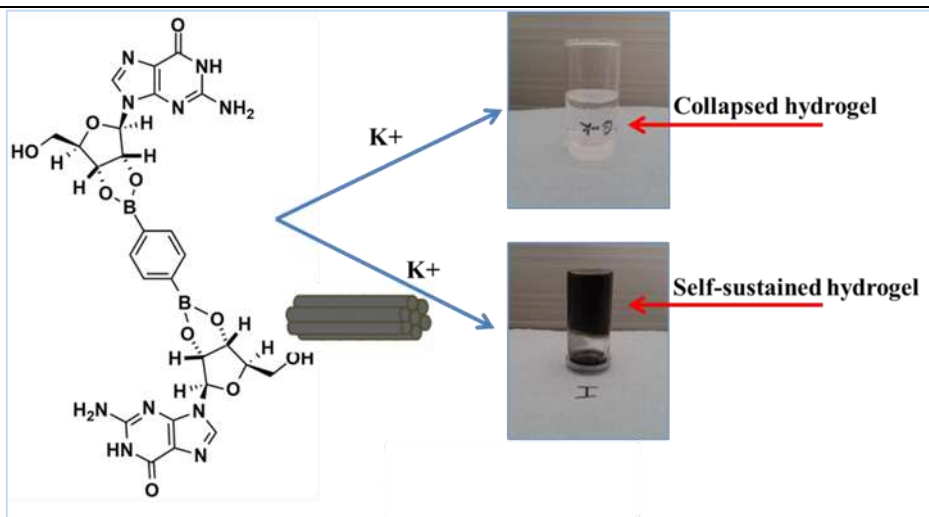


Figura 22. Reprezentarea schematică a dispersiei SWNT-urilor cu ajutorul matriciei de hidrogel care conduce la materiale noi compozite cu capacitate crescută de retenție a apei.

Incorporarea cu succes a SWNT-urilor în matricea hidrogelului a fost investigată prin tehnici SEM, XRD (pulbere) și Raman, în timp ce proprietățile mecanice ale hidrogelurilor au fost cercetate în detaliu și comparate prin studii reologice (Figurile 23, 24, 25).

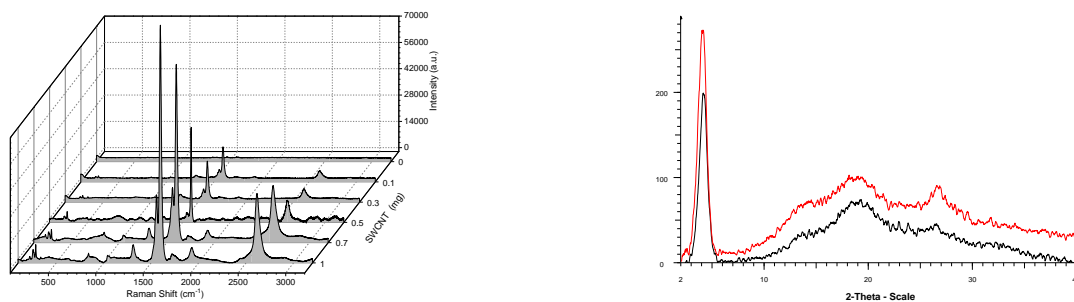


Figura 23. Spectre Raman pentru hidrogel și materiale compozite cu SWNT-uri care conțin 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 și 1 mg SWNT-uri (stânga); difracție cu raze X a hidrogelului liofilizat (negru) și a hidrogelului compozit (roșu) cu conținut de 1 mg de SWNT (dreapta).

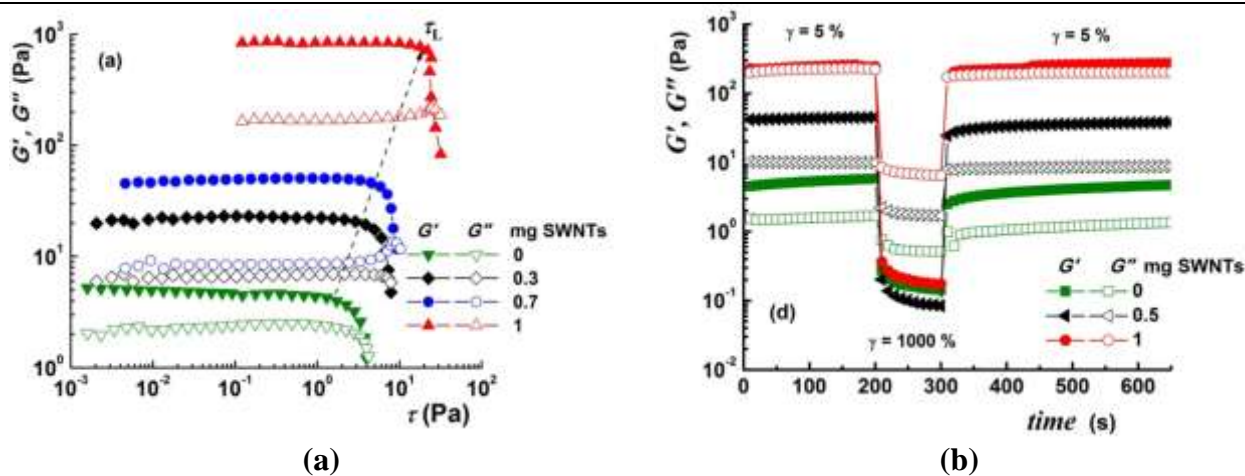


Figure 24. Investigații reologice ale compozitului cu SWNT-uri. (a) variația lui G' în funcție de tensiunea de forfecare la 10 rad / s. (b) Valorile G' și G'' în măsurători de deformare în trepte (5% - 1000% - 5%) la 5 rad / s.

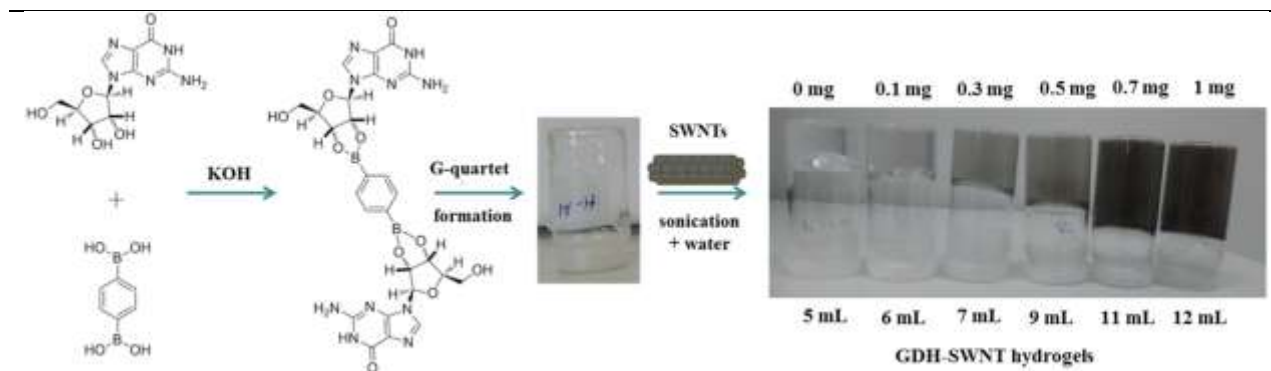


Figure 25. Capacitatea de retentive a hidrogelurilor studiate

Rezultatele citotoxicității excelente (Figura 26) pentru toate nanocompozitele investigate și rezultatele caracterizării care arată o creștere a mărimii porilor după adăugarea SWNTs la matricea hidrogelului, le transformă în materiale ideale pentru aplicații ca și suport celular. Celulele NHDF au fost însămânțate în mod eficient și apoi vizualizate prin intermediul a două tehnici separate (test comercial mort-viu și eseu complex de incluziune indolizinin-piridiniu / β -ciclodextrină dezvoltat în grupul nostru), demonstrând atașarea cu succes și viabilitatea celulară în timp confirmată de ambele teste utilizate (Figura 26).

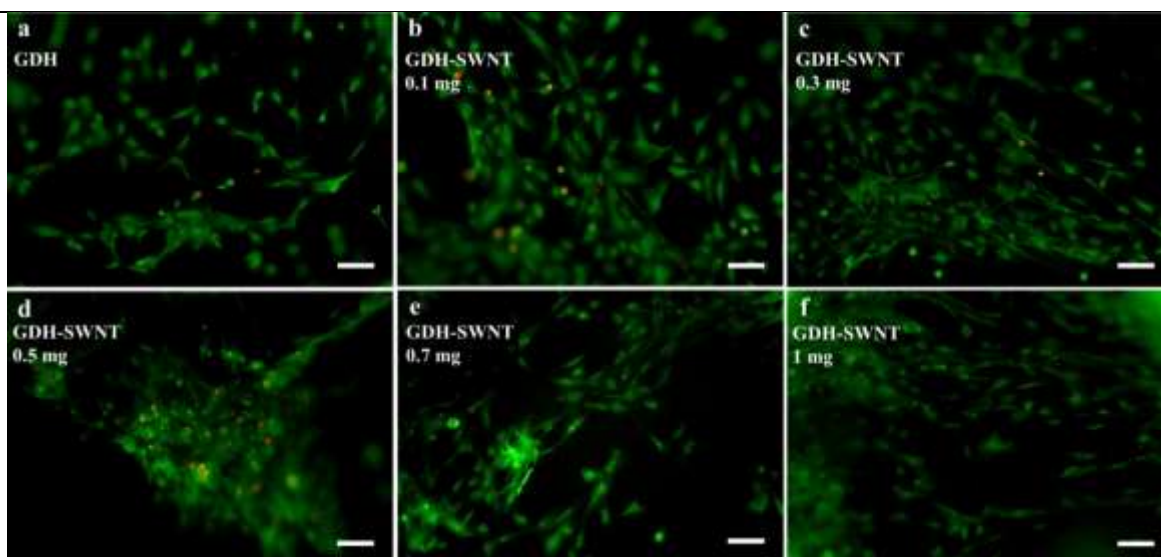


Figure 26. Imagini microscopie de fluorescență ale celulelor NHDF incubate timp de 24 de ore și colorate folosind testul viu / mort pe (a) hidrogel, (b-f) hidrogel-SWNTs la cantități diferite de SWNT la capacitatea maximă de reținere a apei; bară de scară - 100 μ m.

Rezultatele promițătoare obținute în ceea ce privește citotoxicitatea și proprietățile de suport a celulelor, împreună cu proprietățile deosebite ale hidrogelurilor supramoleculare de a răspunde la diferiți stimuli externi, fac din hidrogelurile compozite cu SWNT materiale interesante pentru aplicații biomedicale în domeniul ingineriei tisulare.

A.3.1.4. Abordări *in silico* pentru proiectarea și rafinarea tehnicilor de obținere a componentelor nanoplatformelor

Chimia computațională sprijină puternic proiectarea, caracterizarea și validarea funcționalității tuturor tipurilor de compuși (macro) moleculari. Acesta este motivul pentru care

proiectul 5D-nanoP utilizează masiv tehnicile de chimie computațională, atât pentru îndrumarea experimentelor, cât și pentru interpretarea nuanțată a rezultatelor experimentale.

În calitate de director de proiect, profesorul Aatto Laaksonen a inițiat investigații minuțioase privind interfațarea nevoilor experimentelor cu puterea modelării chimice, pentru a economisi timp în etapele de proiectare ale entităților (bio) (macro) moleculare ca părți ale nanoplatformelor cu funcționalități speciale. De asemenea, el a organizat întâlniri de instruire reciprocă (inclusiv cu valoare didactică) între experientatori și echipa de chimie computațională, cu scopul de a avansa rapid prin subiectele critice ale asigurării și evaluării funcționalității nanoplatformelor.

A.3.1.4.1. Rafinări ale derivatelor PEG aplicabile pentru construirea nanoplatformelor

Mai multe studii experimentale au arătat că lungimea lanțului macromolecular PEG în structura unui vector non-viral influențează eficiența împachetării ADN-ului sau ARN-ului. Cu toate acestea, nu sunt cunoscute studii sistematice asupra influenței greutății moleculare PEG în structura vectorului non-viral asupra eficienței complexării materialului genetic, pe de o parte și, pe de altă parte, pe eficiența poliplexului format în transfecție. Aceste studii lipsesc deoarece obținerea datelor structurale prin metode experimentale este foarte dificilă. Astfel, utilizarea metodelor de chimie computațională pentru a simula sisteme poliplex auto-asamblate *in silico* este o strategie ideală pentru a obține informațiile moleculare necesare pentru a înțelege mecanismele de auto-asamblare.

Studiul nostru descrie o procedură paralelă (i) pentru modelare și simulare și (ii) pentru sinteză experimentală și investigație instrumentală, capabilă să demonstreze efectul caracteristicilor moleculare și cantitatea locală de agent stealth (în acest caz PEG) utilizat pentru protejând segmentul policationic al vectorilor de legarea lor de ADN și eficiența transportului. Scopul principal a fost identificarea *in silico* a mecanismului prin care lungimea lanțului PEG interacționează cu lanțurile PEI ramificate, prevenind formarea poliplexului, în contextul celei mai bune simulații a condițiilor experimentale. A fost sintetizată o bibliotecă de 3 compuși (vectorul 500, vectorul 1500 și vectorul 3000). În prima etapă (Figura 31), gruparea aldehydă a derivatului a-carbonil-squalen a reacționat cu o grupare amină a α, ω -bis (2-aminoetil) polietilen glicol (PEG) cu diferite mase moleculare (500, 1500, 3000 Da), rezultând intermediari de reacție squalen-PEG cu diferite greutăți moleculare ale PEG și funcționalizate cu grupări de amine primare terminale (Sq-PEG-NH₂). În etapa următoare de reacție, cuplarea derivatului Sq-PEG-NH₂ cu bPEI-0,8kDa a fost efectuată prin intermediul agentului de cuplare 2,6-diformil-4-metilfenol (FDA2). FDA2 este un compus reactiv difuncționalizat cu grupări aldehyde, care reacționează rapid și ușor în reacție cu grupările amino primare, rezultând legături dinamice de imină ($-\text{CH} = \text{N}-$) (Figura 27).

A.3.1.4.2. Simulare *in silico* pentru obținerea structurilor miceliale ale vectorilor Sq-PEG-PEI și interacțiunea lor cu dsDNA

Structurile vectorilor non-virali (Sq-PEG-PEI) prezentate în Figura 27 au fost simulate și codificate în funcție de masa moleculară a PEG, după cum urmează: VECTOR 500 (Sq-PEG-PEI PEG este 500 Da), VECTOR 1500 (Sq-PEG-PEI unde masa moleculară a PEG este 1500 Da) și VECTOR 3000 (Sq-PEG-PEI unde masa moleculară a PEG este 3000 Da) și numărul corespunzător de unități PEG repetate (n) este 11, 31, respectiv 62. Structurile de pornire și configurațiile vectoriale au fost construite folosind software-ul Avogadro. Pe baza valorilor pKa,

la pH = 7,4 gradul de protonație al PEI este de 50% (10 grupe de amine dintr-un total de 20 sunt protonate), asigurând o încărcare netă de +10. Fragmentul dsDNA simulat cuprinde 25 de perechi de baze cu secvența 5-CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3 și a fost creat utilizând software-ul Ambertools18. Încărcarea totală a moleculei de dsADN este -48 (numărul de grupări fosfat). Parametrizarea vectorului a fost efectuată prin aplicarea metodologiei câmpului de forță GAFF2. Sarcinile atomice parțiale ale vectorului au fost calculate utilizând metodologia RESP. Câmpul de forță Amber FF14SB DNA.bsc1 a fost utilizat în parametrizarea dsDNA, iar parametrii ionsjc_tip3p au fost folosiți pentru a descrie ionul.

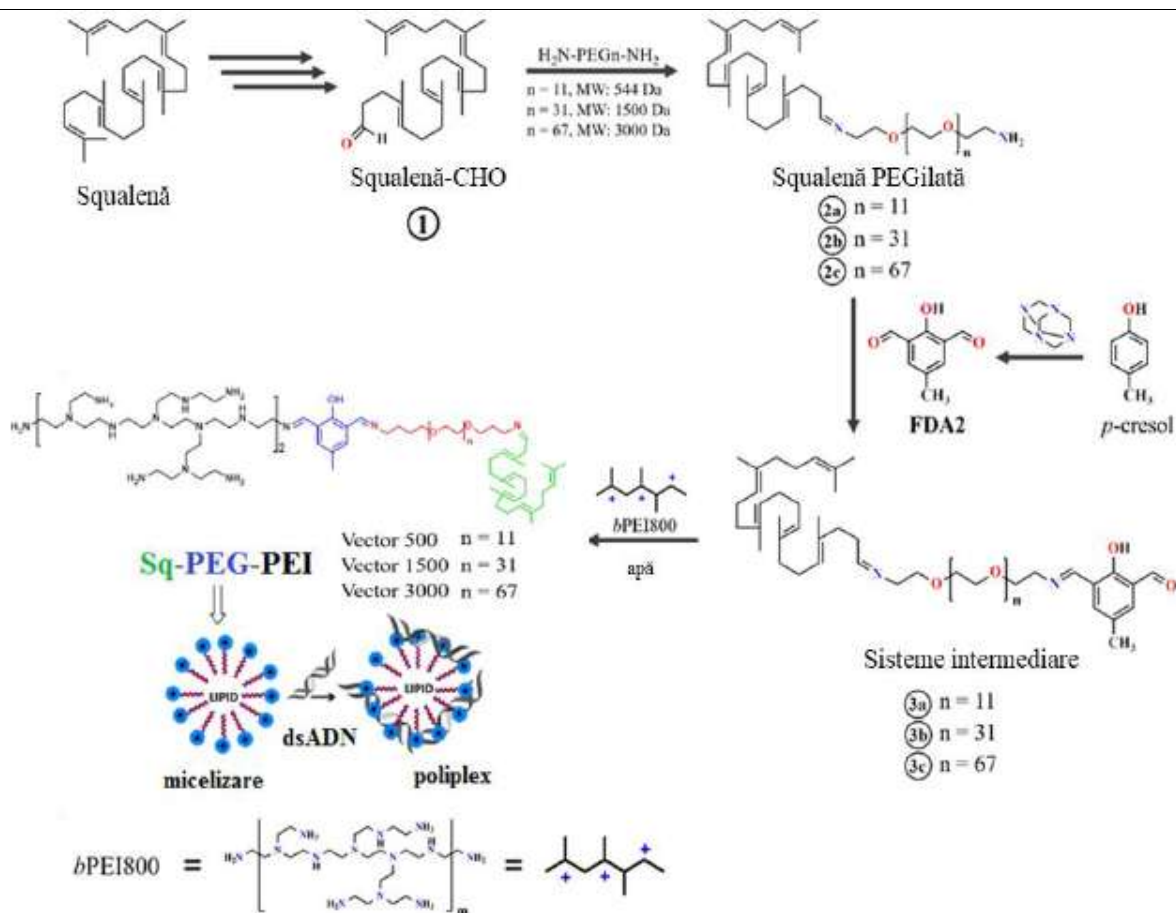


Figura 27. Procesul de obținere a conjugatelor pe bază de scualenă. Scualena în gri, PEG în roșu, dialdehida în albastru, PEI în negru.

Pentru a simula mai bine condițiile „reale” ale complexării vectoriale cu dsDNA, a fost implementat un protocol de simulare în două etape: „agregare” urmată de „complexare”. vectori și ADN. A fost urmat procesul de agregare (miceliu) a vectorilor în soluție apoasă (Figura 28). Rezultatele simulării arată că lanțurile PEG interacționează cu atomii de N protonați ai lanțurilor PEI, formând legături de hidrogen. Aceste interacțiuni sunt atât de puternice încât, odată formată, structura prăbușită rămâne stabilă pe tot parcursul simulării, iar numărul de legături de hidrogen este invers proporțional cu numărul de atomi fără N. Rezultatele metodelor de calcul sunt în concordanță cu datele experimentale, astfel, valorile măsurate ale potențialului Zeta al vectorilor în soluție (Tabelul 5) indică faptul că sarcina electrostatică a suprafeței scade odată cu creșterea lungimii lanțului PEG. Acest fenomen este în bună corelație cu observațiile obținute pe baza simulărilor MD și care arată că în cazul sistemelor VECTOR 1500 și VECTOR 3000 lanțul PEG acoperă lanțurile PEI, protejând atomii de azot din structura PEI, în timp ce sistemul VECTOR

500 are cea mai înaltă parte a lanțurilor PEI neprotejate de PEG și care sunt orientate spre suprafața agregatului.

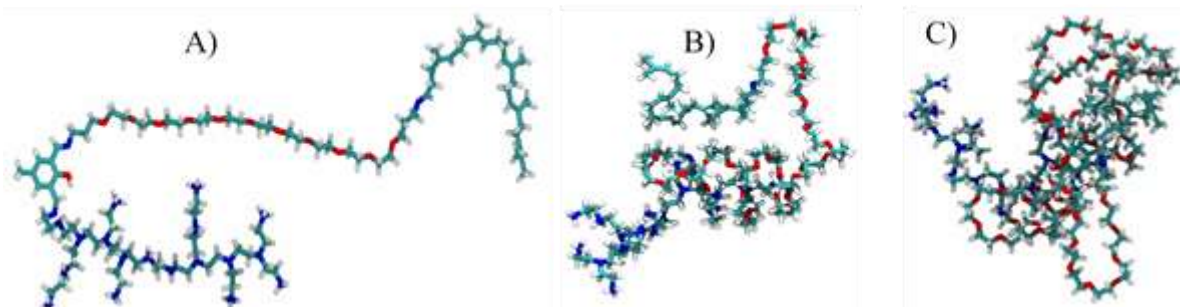


Figura 28. Conformația initială a celor trei vectori utilizați în simulare. (A) conformația extinsă a VECTOR 500. (B) și (C) conformațiile ale VECTOR 1500, respectiv VECTOR 3000. Codificarea culorilor atomilor de polimer este după cum urmează: azuriu pentru C; roșu pentru O; albastru pentru N; alb pentru H.

Tabel 5. Rezultatele experimentale pentru potențialul zeta.

Vector	Potențial zeta (mV)	Valoarea medie (mV)	Deviața Standard
Vector 500	14.49	14.07	± 0.3007
	13.82		
	13.89		
Vector 1500	6.1	6.67	± 0.5436
	6.5		
	7.4		
Vector 3000	4.32	5.17	± 0.611
	5.73		
	5.46		

Pentru a imita experimentul, simularea MD a implicat generarea de soluții vectoriale echilibrate la miceliu. Acest lucru este de o importanță crucială pentru pasul următor, când are loc interacțiunea vectorilor Sq-PEG-PEI (cu diferite mase moleculare ale PEG) cu ADNs, pentru a forma structuri supramoleculare de tip polyplex. Simulările MD au fost efectuate pe scări de timp cu o lungime suficientă pentru a permite identificarea mecanismelor cheie prin care lanțurile PEG interacționează cu cele ale PEI ramificat și, de asemenea, pentru a explica de ce lungimea lanțului PEG afectează procesul de auto-asamblare între vectorul non-viral și dsDNA. Trebuie subliniat faptul că dimensiunea mare a sistemelor și simulările efectuate pe perioade lungi de timp au avut o importanță fundamentală în explicarea mecanismului de formare a poliplexului. Figurile 29, 30 și 31 prezintă instantanee reprezentative ale configurațiilor inițiale și finale ale fiecărui sistem vectorial și ADN, împreună cu inserții care detaliază interacțiunile dintre PEI și ADN. În modelul experimental, precum și în cel silico, s-a utilizat ADN-ul scurt, cu 25 de perechi de baze cu secvența 5'-CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3' și secvența complementară 5'-TACGTTGAAGTTCGTTAAGGGCTTG-3'. Pe baza analizei vizuale a traiectoriei VECTOR 500 (Figura 29), este evident că PEI ramificat interacționează puternic cu dsDNA. Micelele se „lipesc” de ADN, atunci când firele PEI interacționează atât cu canelurile

majore, cât și cu cele minore ale ADN-ului. În cazul VECTOR 1500, observăm aproape aceleași interacțiuni ca și în cazul VECTOR 500 (Figura 30).

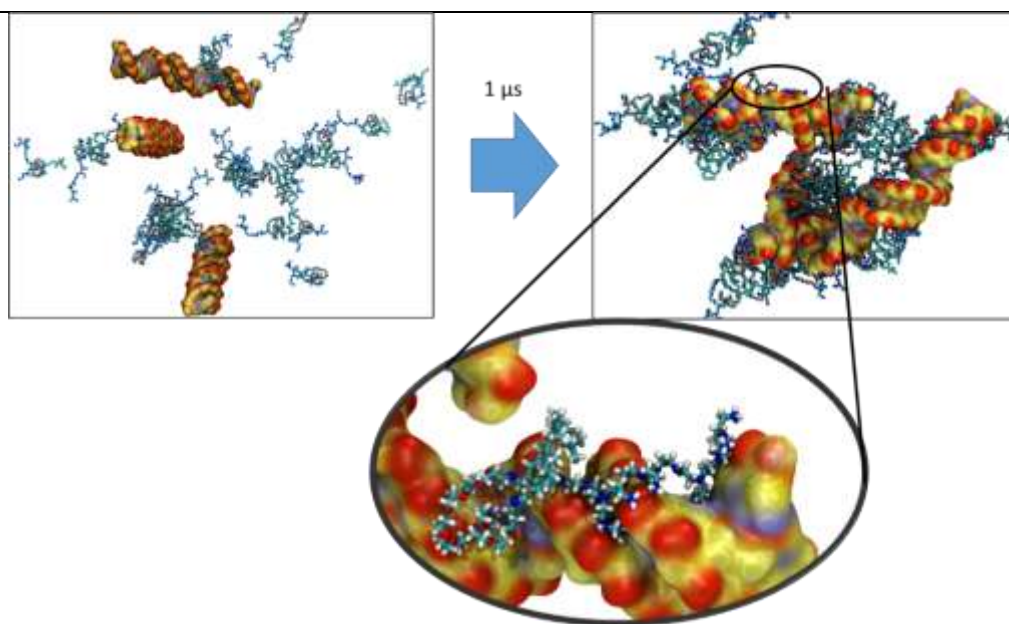


Figura 29. Interacțiunea VECTOR 500 cu 25 bp dsDNA. Atomii de carbon sunt colorați în azur în cazul vectorului și în galben pentru molecula de ADN. Pentru toate moleculele, atomii de azot sunt albaștri, atomii de oxigen sunt roșii, iar atomii de hidrogen sunt albi.

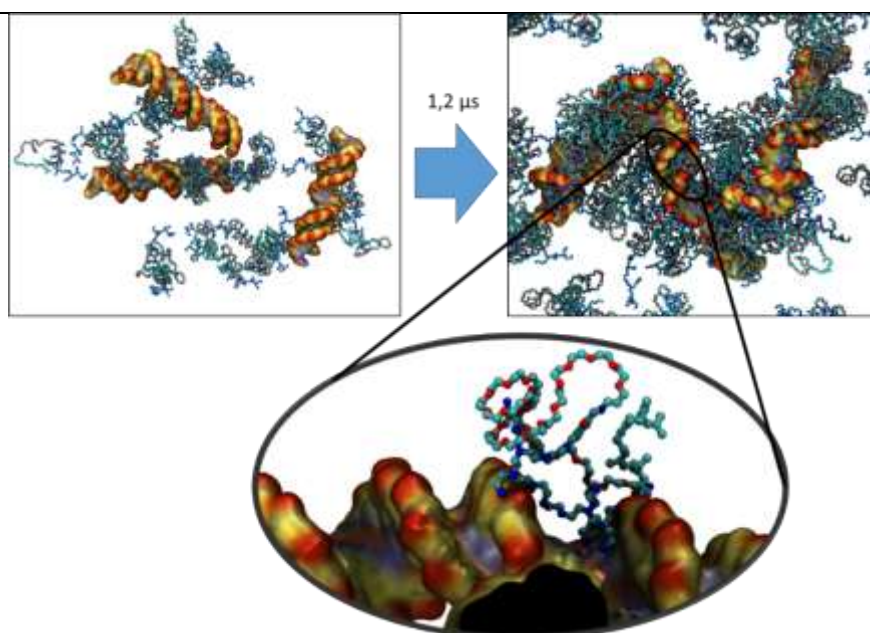


Figura 30. Interacțiunea VECTOR 15000 cu dsDNA.

În contrast, analiza vizuală pentru sistemul VECTOR 3000 (Figura 31) arată că numărul de interacțiuni dintre firele PEI și dsDNA este mai mic comparativ cu alți vectori, ceea ce se susține prin faptul că lungimea lanțului PEG fiind mare a dus la o scădere drastică a cantității de PEG. Fără PEI și capabil să interacționeze cu lanțuri dsDNA. Trebuie remarcat faptul că micellele preformate ale tuturor celor trei vectori sunt capabili să interacționeze cu cele trei

molecule de dsADN adăugate inițial la celula de simulare, iar procesul de complexare este mediat de numărul de atomi liberi de azot necomplicat de lanțurile PEG.

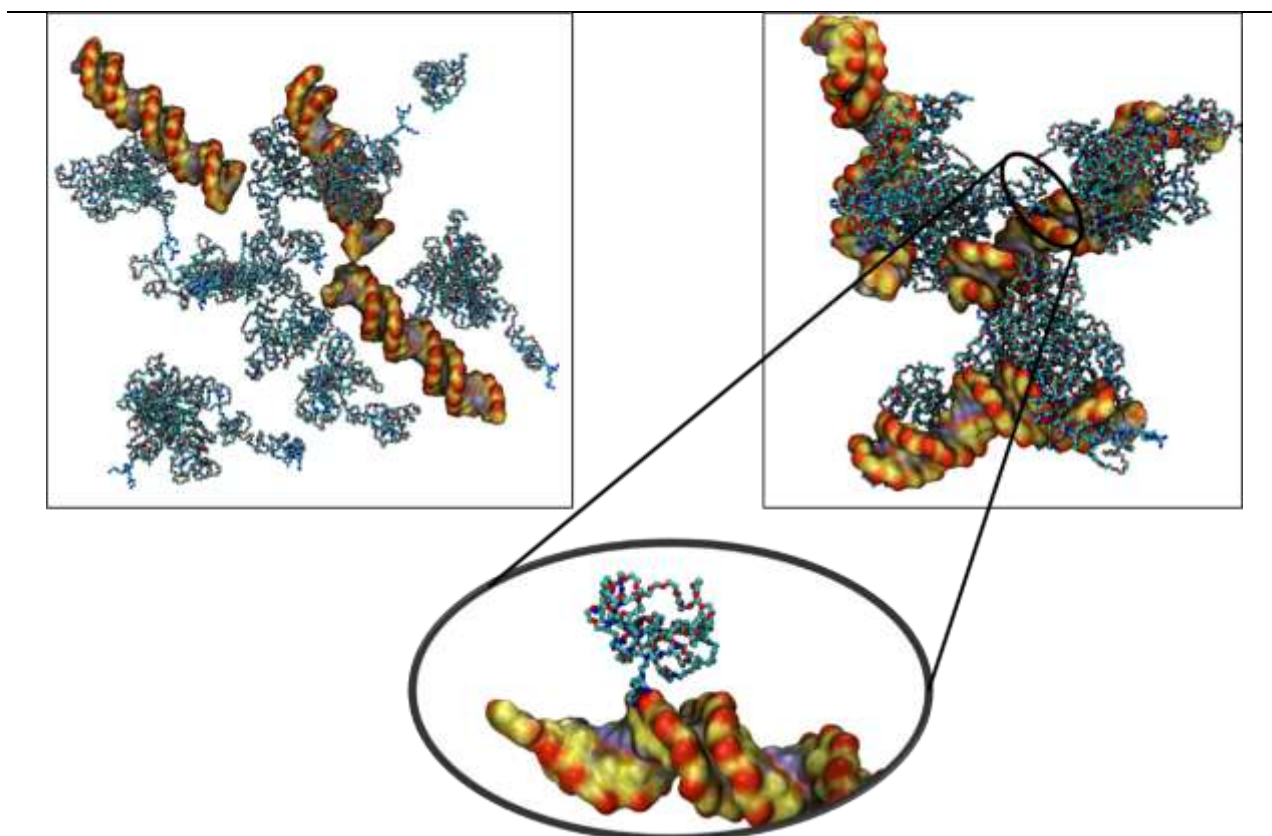


Figura 31. Interacțiunea între VECTOR 3000 și ADN.

Experimental, interacțiunea vectorilor sintetizați cu dsADN a fost investigată prin electroforeză pe gel de agaroză. Această metodă a evidențiat proprietățile de auto-asamblare dintre vectorii Sq-PEG-PEI și dsDNA în funcție de lungimea lanțului PEG, care a fost observată simultan în simulările efectuate. Tendința electroforetică observată în Figura 32 indică faptul că, pe măsură ce masa moleculară a lanțului PEG în structura vectorului crește, aceasta duce la o creștere a raportului N / P necesară pentru a lega complet aceeași cantitate de dsADN. Această observație este în concordanță cu măsurătorile potențialului zeta, precum și cu simulările MD și confirmă, de asemenea, că, pe măsură ce crește numărul sarcinilor pozitive neprotejate de pe suprafața agregatului vectorial, aceasta conduce la formarea de poliplexe în prezența ADN-ului ADN la N / P rapoarte. inferior (1,5 pentru PEG 500; 2,5 pentru PEG 1500; 3,0 pentru PEG 3000). Rezultatele simulărilor pe care le-am efectuat sunt confirmate și validate prin acordul excelent cu rezultatele experimentelor de laborator. Detaliile atomice și interacțiunile pe care le-am observat în MD explică foarte bine diferențele în comportamentul vectorilor. Într-adevăr, suprafața de suprafață mai mare VECTOR 500 în comparație cu VECTORII 1500 și 3000, după cum arată datele cu potențial zeta din Tabelul 5, poate fi explicată prin localizarea lanțului PEG în agregate, observate în simulările MD. În cazul VECTOR 500, PEG formează un strat intermediar între miezul squalenului și PEI, plasat pe exteriorul ansamblului. Pentru ceilalți doi vectori, lanțul PEG mai mare este capabil să înfășoare o porțiune mai mare de PEI, generând astfel un strat exterior mixt, care include atât PEG, cât și PEI, reducând practic sarcina pe suprafața agregată. Un astfel de efect este predominant în cazul VECTOR 3000. Simularea polipeților studiați ne permite să explicăm rezultatele analizelor de electroforeză pe gel de

aragoză, care indică faptul că lungimea fragmentului PEG joacă un rol crucial în capacitatea sistemelor de a lega ADN. De fapt, experimentele arată că atunci când este implicat un segment PEG mai scurt, legarea dsDNA are loc la raporturi N / P foarte scăzute. Conform simulărilor noastre, VECTOR 500 este capabil să interacționeze mai puternic cu ADN în comparație cu vectorii mai mari, în principal datorită prezenței PEI în stratul exterior în cantități mai mari. Acest lucru îi permite să formeze mai multe legături de hidrogen cu dsDNA și, prin urmare, îl leagă la un raport N / P foarte scăzut. Pentru vectori mai mari, legarea completă are loc la un raport N / P mai mare, ceea ce este bine explicat prin simulări și indică modul în care PEG protejează sarcinile pe lanțul PEI, acționând și ca o barieră fizică la distanță între PEI și ADN.

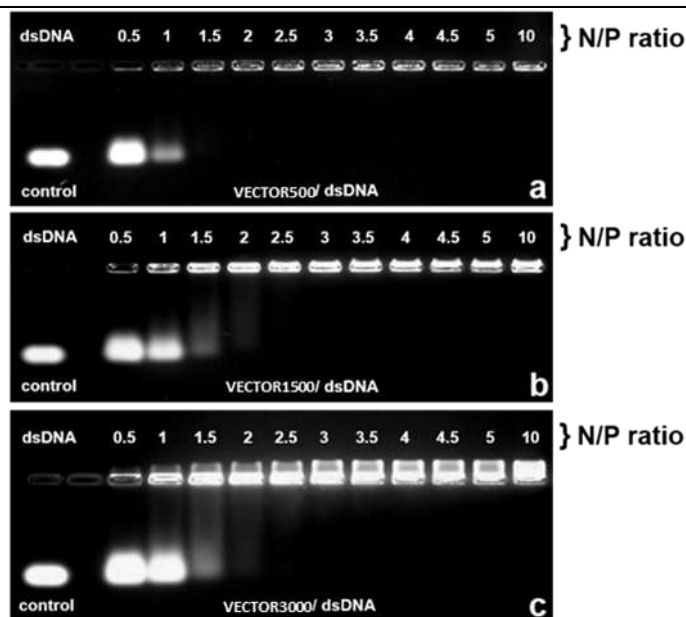


Figura 32. Mobilitatea electroforetică a polipeplexilor formați prin complexarea dsDNA cu VECTOR 500, 1500 și 3000, la diferite rapoarte N/P.

Înțelegerea fenomenului de ecranare este importantă pentru proiectarea rațională a sistemelor vectoriale pentru ambalarea și transportul acizilor nucleici, care necesită un echilibru adecvat între raportul rezonabil N / P și solubilitatea în apă. Într-adevăr, un lanț PEG mai lung îmbunătățește solubilitatea în apă, dar duce, de asemenea, la o creștere a raportului N / P, care, la rândul său, duce la creșterea toxicității vectoriale. Studiul nostru evidențiază faptul că, în cazul vectorilor complexi, care includ blocuri componente multiple și chimic distincte, procesul de formare a polipeptidelor nu poate fi studiat prin modelarea separată a interacțiunilor dintre componente datorită interacțiunilor inerente dintre toate blocurile componente, determinând în cele din urmă legarea particulară mecanism.

A.3.1.4.3. Andocare moleculară pentru evaluarea interacțiunii dintre colorantul anionic PEI și AO7

Eliminarea speciilor ionice din ape prin ultrafiltrare poate fi îmbunătățită prin adăugarea de polimeri de legare solubili în apă. Acest proces este cunoscut în literatură ca ultrafiltrare asistată de polimeri (PAUF). Unul dintre pașii principali ai acestui proces este complexarea dintre speciile ionice (ioni sau molecule organice dizolvate) și polimerul de legare. În acest sens, aici am studiat interacțiunea dintre tautomeri AO7 (liganzi - specii ionice) și PEI (receptor - polimer de legare) prin andocare moleculară asistată de computer. Liganzii (tautomeri AO7) au fost considerați în forma lor anionică, fiecare purtând o sarcină de -1. Structura macromoleculi

PEI (oligomer) a fost construită și optimizată la nivelul mecanicii moleculare folosind câmpul de forță YASARA. Rețineți că, am modelat un oligomer PEI ramificat care conține opt grupuri de amine în coloana vertebrală și patru grupuri de amine în segmentele atașate. Ca atare, PEI ramificat modelat a cuprins cinci grupe de amine primare ($-NH_2$), trei grupe de amine secundare ($=NH$) și patru grupuri de amine terțiare ($=N-$). Acest oligomer PEI a purtat o încărcare totală de +12 în starea complet protonată. Prin urmare, modurile de legare ale tautomerilor AO7 la oligomerul PEI au fost calculate prin simulări de andocare moleculară. În acest scop, receptorul (PEI) a fost ținut ca un corp rigid. La rândul lor, geometriile liganzilor au fost tratate ca structuri flexibile. Numărul de teste de andocare a fost stabilit la 100 de ipostaze care au fost apoi supuse analizei de grupare. În cele din urmă, complexul ligand-receptor cu cea mai mică constantă de disociere (K_d) a fost selectat ca cel mai probabil mod de legare pentru fiecare ligand (tautomer AO7). Rețineți că, cu cât este mai mică constanta de disociere (K_d), cu atât este mai bună interacțiunea ligand-receptor. Rezultatele computaționale ale andocării sunt ilustrate în Figura 33. După cum se poate vedea, complexe ancorate (PEI @ AO7) sunt stabilizate prin interacțiuni hidrofobe (Figura 33). În cazul tautomerului AO7-hidrazonă, calculele au dezvăluit formarea unei legături de hidrogen (legătura H) între un atom de oxigen din grupul sulfonat al AO7 și o amină secundară a PEI (Figura 33a). Conform valorilor K_d , s-ar putea afirma că tautomerul AO7-hidrazonă interacționează destul de puternic cu oligomerul PEI ($K_d = 8,01$ mM, Figura 33a), în comparație cu forma AO7-azo ($K_d = 13,58$ mM, Figura 33b). Rezultatele referitoare la acest subiect au fost publicate în²⁰.

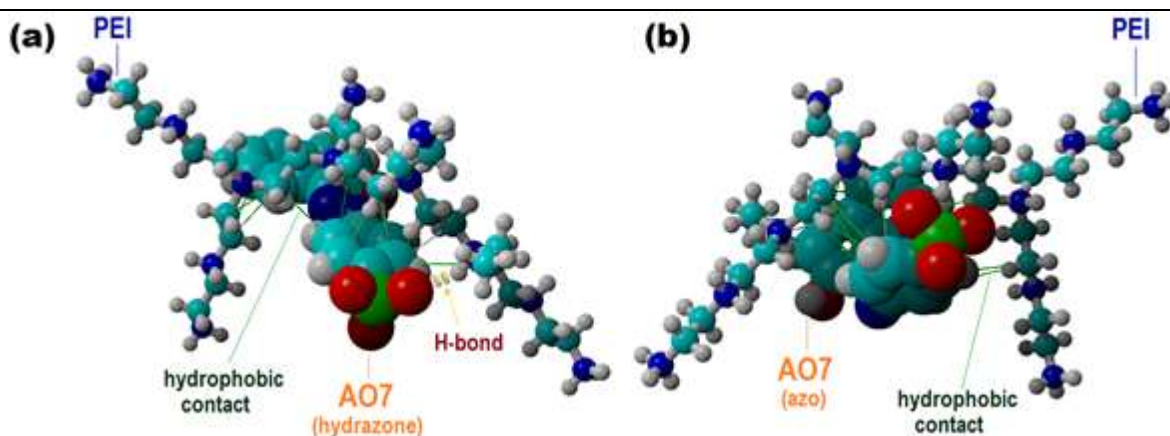


Figure 33. Rezultate de andocare moleculară care arată interacțiunea dintre colorantul AO7 și oligomerul PEI ramificat: (a) cea mai bună poziție de andocare cu AO7 în formă de hidrazonă ($K_d = 8,01$ mM); (b) cea mai bună poziție de andocare cu AO7 în formă azoică ($K_d = 13,58$ mM).

A.3.1.4.4. Andocare moleculară pentru a evalua interacțiunea dintre oligosilan și derivatul de pirazolină

S-a studiat interacțiunea dintre molecula derivată de pirazolină (ligand - denumită în continuare L1) și un oligomer polisilanic (receptor - denumit în continuare PS). Acesta din urmă (receptor) a reprezentat un polisilan substituit cu șase atomi de siliciu pe lanț, adică poli(metilhidrodifenil)silan. Pentru a efectua simulări de andocare moleculară, am folosit metoda AutoDock Vina integrată în pachetul software YASARA Structure.

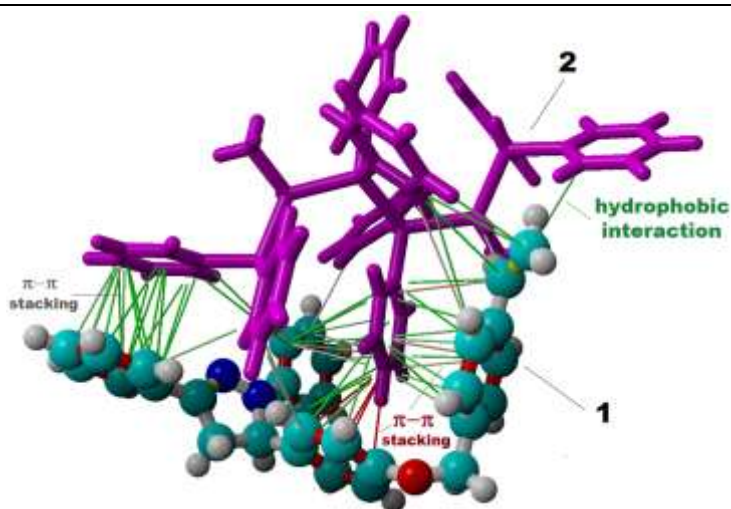


Figura 34. Cea mai bună poziție a complexului ancorat care arată interacțiunea dintre molecula pirazolină (1) și oligomerul polisilanic (2); redarea liniilor verzi solide denotă interacțiuni hidrofobe, în timp ce liniile gri și roșie denotă interacțiunile de stivuire π - π ; energie de legare $E_b = -6,79$ kcal / mol; constanta de disociere a complexului supramolecular format $K_d = 10.558 \mu M$.

Parametrii câmpului de forță al polisilanului au fost generați în YASARA luând în considerare lanțul de polisilan în stare înghețată, adică la nivelul modelului DFT dezvoltat anterior (folosind opțiunea de atomi fiși). De fapt, parametrii empirici pentru atomul de Si au fost preluați de la carbon (care este izoelectronic cu atomul de Si). În cursul simulărilor de andocare moleculară, receptorul (polisilan) a fost tratat ca o structură rigidă, în timp ce ligandul (L1) a fost tratat ca o moleculă flexibilă. Calculele (prin algoritmul AutoDock VINA) au fost efectuate folosind un număr de 25 de rulări de andocare. Fiecare complex ancorat (PS @ L1), rezultat din simulare, a fost evaluat în termeni de energie de legare (E_b , kcal / mol) și constantă de disociere (K_d , μM). În consecință, cea mai bună poziție ancorată a fost selectată pe baza celor mai mici valori ale E_b și K_d . Figura 34 prezintă cea mai bună poziție a complexului supra-molecular ancorat PS @ L1; pentru acest caz particular, am găsit $E_b = -6,79$ kcal / mol și $K_d = 10,558 \mu M$. Rezultatele simulării au arătat că complexul supra-molecular format (PS @ L1) a fost stabilizat prin contactele hidrofobe și interacțiunile de stivuire π - π (vezi Figura 34). Rezultatele de calcul pentru acest sistem au fost publicate în²¹.

A.3.1.4.5. Modelarea moleculară prin auto-asamblarea moleculelor pentru transportul ionilor sau a apei.

A fost sintetizat un nou compus mic molecular prin legarea a două fragmente pirenice la diaminodibenzo-18-coroană-6-eter prin legături $-HC = N-$, rezultând produsul DPyDB-CH = N-18C6. Sinteza noului compus a fost confirmată prin tehnici FTIR, 1H -RMN, ^{13}C -RMN, TGA și DSC. Analiza cantitativă ^{13}C -RMN a relevat prezența celor doi izomeri de poziție. Tehnica WAXD și simulările MD au fost utilizate pentru a evalua posibilitatea aranjamentului supramolecular al DPyDB - CH = N - 18C6. Ambele metode experimentale și teoretice au arătat că compusul formează un agregat cu interacțiuni slabe π - π . Rezultatele de calcul MD au indicat existența unor structuri ca un agregat alunecat-paralel cu distanță de interacțiune non-covalentă între 3,28 și 3,45. Rezultatele QM au arătat că acești doi izomeri erau aproape energetic din punct de vedere energetic. Prin calculele QM, s-a observat că unghiul diedru $-C - HC = N - C-$, care leagă unitățile pirenice de inelele fenilice ale eterului coroanei, a fost răsucit în jur de 40° . Această situație explică incapacitatea de a alinia ambele inele de pireni din aceeași moleculă DPyDB - C = N - 18C6 cu pirenii de la o altă moleculă, după cum se observă din rezultatele simulării MD. Această incapacitate este, de asemenea, guvernată de prezența unei legături C-H și

a unor perechi solitare de azot din legătura --HC = N-- , inducând o repulsie de piedică între molecule individuale. Mai mult, compusul DPyDB – C = N – 18C6 a fost investigat din punctul de vedere al proprietăților sale fotofizice. Pentru a înțelege structura electronică, experimentele UV-vis și fluorescență împreună cu studiile teoretice (calculare QM) au fost efectuate în solvenți cu polarități diferite (n-hexan, toluen, 1,2-dicloroetan și etanol). Din aceste date, am observat prezența tranzițiilor $\pi \rightarrow \pi^*$ și $n \rightarrow \pi^*$, printre care predomină tranziția $\pi \rightarrow \pi^*$ datorită conjugării extinse π . Prin contrast, prin analiza fluorescenței, s-a observat o emisie slabă care ar putea fi explicată prin transferul fotoindus de electroni (PET) și agregarea cauzată de efectele de stingere (ACQ). Orbitalii moleculari de frontieră în starea de bază au demonstrat că densitatea electronică a DPyDB – C = N – 18C6 a fost localizată doar pe o singură secvență pirenică – CH = N – fenilică a eterului coroanei, ducând la o perturbare a unui π intermolecular bine ordonat – Π stivuire. Având în vedere o aplicație chimico-senzorială pentru noul nostru compus, am efectuat o simulare dinamică moleculară a zece molecule DPyDB – C = N – 18C6 într-o soluție mixtă de ioni pentru a testa selectivitatea ionică. Moleculele au fost distribuite aleatoriu într-o cutie de $8 \times 8 \times 8$ nm. Apoi, s-au adăugat 10 din fiecare ion Na^+ , K^+ și Ca^{2+} și 40 ioni Cl^- și întregul sistem a fost solvatat cu apă. Au fost efectuate două simulări de câte 40 ns, pornind de la două structuri diferite dispersate aleatoriu pentru a investiga ce ioni interacționează cu DPyDB – C = N – 18C6 și pentru a elimina orice prejudecată care ar fi putut fi indusă de poziția inițială a moleculelor simulate. Simularea MD indică faptul că moleculele DPyDB – C = N – 18C6 au interacționat numai cu ionii K^+ , formând complexe stabile. Aceste simulări indică o utilizare cu succes a moleculelor DPyDB – C = N – 18C6 ca chimio-senzor selectiv pentru ioni K^+ . Un rezumat grafic reprezentativ al prezentei lucrări a fost descris în Figura 35²².

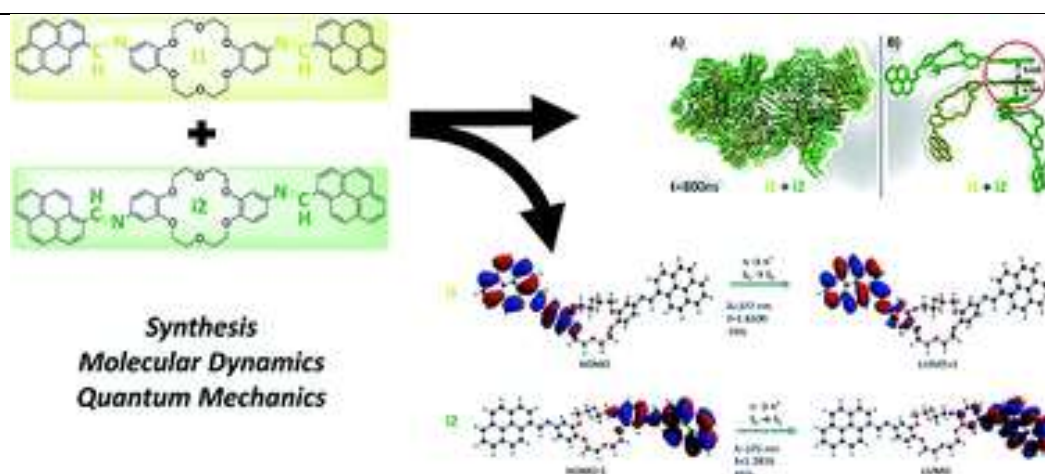


Figura 35. Reprezentare schematică a simulărilor moleculare de auto-asamblare a moleculelor DPyDB–C=N–18C6 molecules.

A.3.1.4.6. Modelarea moleculară a unei componente potențiale utilizată ca actuator în formarea nanoplatformelor

Derivații de piren au proprietăți optice interesante descrise de o absorbție puternică în domeniul UV-Vis. Spectrele de absorbție și fluorescență sunt sensibile la polaritatea solventului, acest fapt sugerând utilizarea acestei clase de compuși ca test pentru a determina comportamentul mediului. Studiul literaturii arată ca fragmentul pirenic a prezentat un puternic efect donator de electroni care poate fi combinat în mai multe materiale pentru a proiecta sistemele donator-acceptor de electroni care pot fi utilizate în conversia energiei și în aplicațiile

de recoltare a luminii. Prezența unei duble legături ($-\text{HC} = \text{N}-$) în structura derivaților pirenici determină formarea atât a conformațiilor lor trans, cât și a cis. În acest context, scopul principal al prezentului studiu a fost de a investiga, prin studii DFT și TD-DFT, efectul conformațional în sol și stările excitate pentru a prezice spectrele de absorbție electronică teoretică și tranzițiile $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ a compusului di-iminopiren-di-benzo-18-coroană-6-eter. De asemenea, aceste studii ne ajută în identificarea interacțiunilor intramoleculare, cum ar fi transferul de sarcină, π -efect de conjugare extinsă. Rezultatele noastre obținute prin simulări teoretice sunt în concordanță cu determinările experimentale (Tabelul 6).

Tabel 6. Valorile teoretice ale oscilatorului (f), calculate cu TD-DFT / 6-311 ++ Nivelul teoriei G (d, p) și lungimile de undă de absorbție experimentale (λ_{abs} , nm) pentru di-iminopiren-di-benzo-18-coroana-6-eter (izomeri trans) în diferiți solvenți.

Solvent	TD-CAMB3LYP		TD-PBE0		Exp.
	λ_{abs}	f	λ_{abs}	f	
toluen	388	1.6324	437	1.7386	396
	382	0.8391	433	0.2384	377
	330	0.0601	389	0.0001	345
ethanol	385	1.7130	433	1.7582	390
	380	0.6972	429	0.2082	380
	316	0.1111	367	0.0284	289

O altă direcție a fost investigarea efectului conformațional al compușilor țintă. Rezultatele computaționale (bazate pe DFT-PBE0 / 6311 + G (d, p)) indică faptul că izomerul conformației trans-cis a fost cel mai stabil din punct de vedere energetic (Figura 36). Reprezentările electronice în stare de bază, precum și în stare excitată au fost localizate pe unități de piren și benzen. Ca efect al excitației, densitatea electronilor a fost delocalizată de la $-\text{CH} = \text{N}$ -benzen la secvența pirenică datorită transferului de încărcare. În toate cele trei conformații trans-trans, trans-cis și cis-cis s-a observat efectul transferului de încărcare. De asemenea, rezultatele teoretice utilizate CAM-B3LYP / au indicat prezența tranzițiilor $\pi \rightarrow \pi$ și $\pi \rightarrow \pi^*$ datorită conjugării extinse π . Toate rezultatele teoretice sunt de acord cu determinările experimentale. Acest studiu este încă o chestiune de dezbatere.

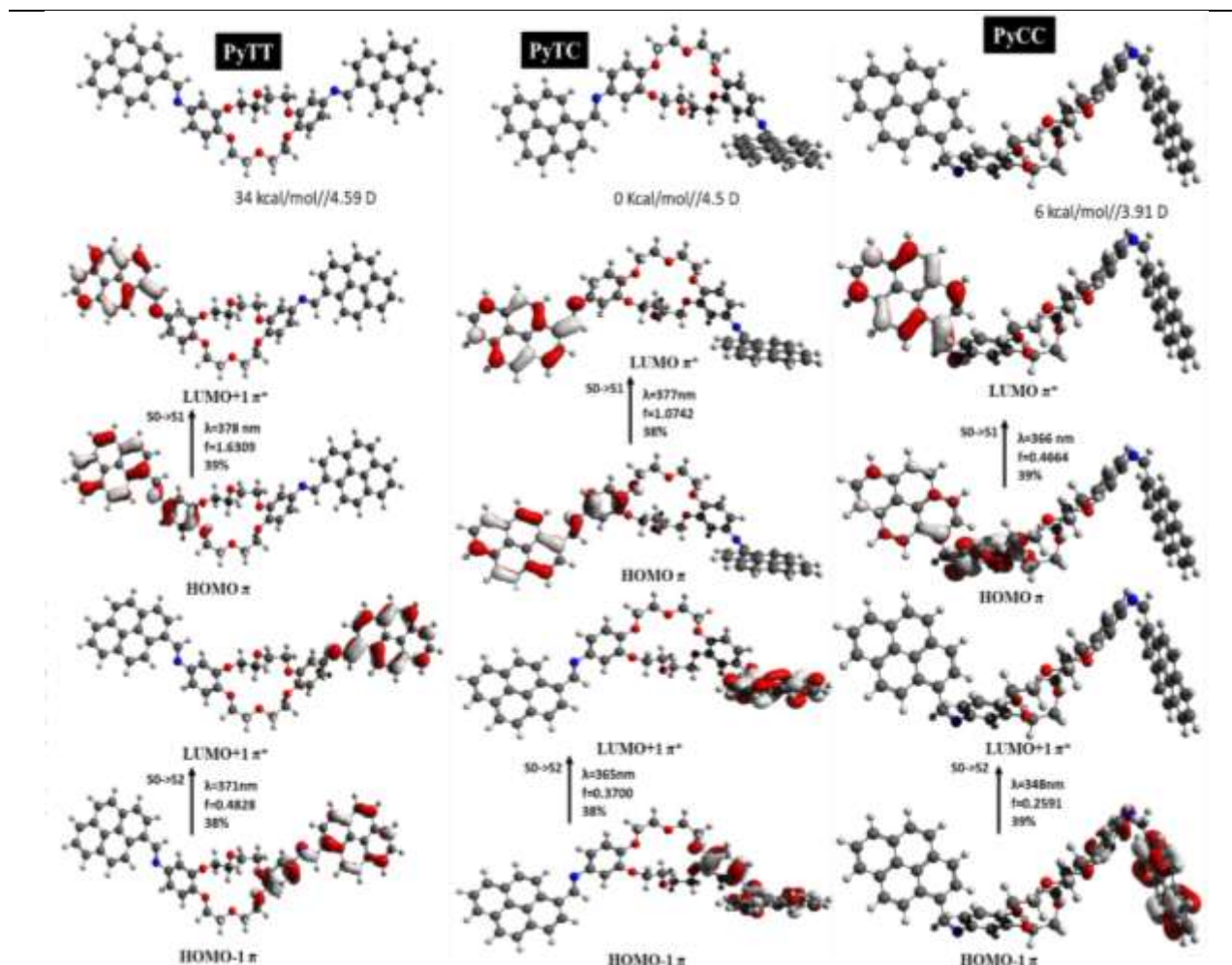


Figure 36. *Structura electronica a DPyDB–C=N–18C6 în conformațiile trans-trans, trans-cis, și cis-cis²².*

A.3.2. – Studiul variantelor fezabile de asamblare a constituenților nanoplatformelor

A.3.2.1. Construcția platformei bioactive pe bază de i-PP

Platforma bioactiva a fost obținută utilizând un proces în trei etape prezentat schematic în figura 37. În prima etapă, suprafața filmelor de i-PP ($10 \times 10 \text{ cm}^2$), utilizate în mod uzual în aplicații biomedicale (de ex. pentru suturi sau ca mese chirurgicale), obținute prin amabilitatea Braun Surgical S.A. (Rubi, Barcelona, Spania), a fost funcționalizată prin descarcare în plasma de oxigen (0.30 mbar) timp de 180 secunde, folosind o descarcare cu putere de 250 W. În a doua etapă, filmele astfel funcționalizate de i-PP (i-PP_f) au fost tăiate în bucăți de $0.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$, care au fost acoperite cu un strat de nanoparticule de PHMeEDOT (PHMeEDOT NPs) obținut prin imersarea fiecărei bucăți în câte 5 mL de soluție 50 mM de MHeEDOT în 0.2 M HCl, timp de 30 minute sub agitare (250 rpm), timp în care polimerizarea oxidativă a MHeEDOT a avut loc sub acțiunea persulfatului de amoniu (1 mL soluție 60 mM în HCl 0.2 M) ca agent de oxidare, adăugat prin picurare lentă. Reacția a avut loc timp de 24 h la 37 °C și 80 rpm. După această etapă, materialul funcționalizat și electroactivat, denumit în continuare i-PP_f/NP, a fost spălat cu o soluție 0.2 M de NaOH pentru a echilibra sarcina, apoi a fost uscat. **Cele două etape de construcție au oferit oportunitatea unică de a funcționaliza suprafața bioplatformei la nivel molecular.** Astfel, primele lanțuri de PHMeEDOT formate, datorită grupărilor funcționale

hidroxil, pot fi orientate si puternic ancorate pe suprafata $i\text{-PP}_f$ prin legaturi de hidrogen cu gruparile polare existente pe substratul initial (de ex. $\text{C}=\text{O}$ si $\text{C}-\text{O}$), formate in timpul descarcarii in plasma. Aceasta orientare a primelor lanturi de polimer va determina si dirija organizarea tuturor celorlalte lanturi polimere care se formeaza ulterior in interiorul NPs, organizare guvernata, de asemenea, si de alte tipuri de interactiuni intermoleculare de natura fizica (de tip hidrofob si de asamblare prin interactiune $\pi-\pi$ a ciclurilor aromatice). In cea de a treia etapa, un strat de copolimer, obtinut prin electropolimerizarea macromonomerul EDOT-PCL cu EDOT a fost depus peste filmele de $i\text{-PP}_f/\text{NP}$. In acest scop, fiecare esantion de $i\text{-PP}_f/\text{NP}$ a fost introdus intr-o celula cu trei electrozi continand 20 mL solutie de acetonitril ca solvent de electroliza, LiClO_4 (0.1 M) drept electrolit, impreuna cu EDOT si EDOT-PCL in raport milimolar de 7/3. Procesul electrochimic a fost condus la potential constant de 1.40 V, sarcina de polimerizare fiind ajustata la 1 Coulomb.

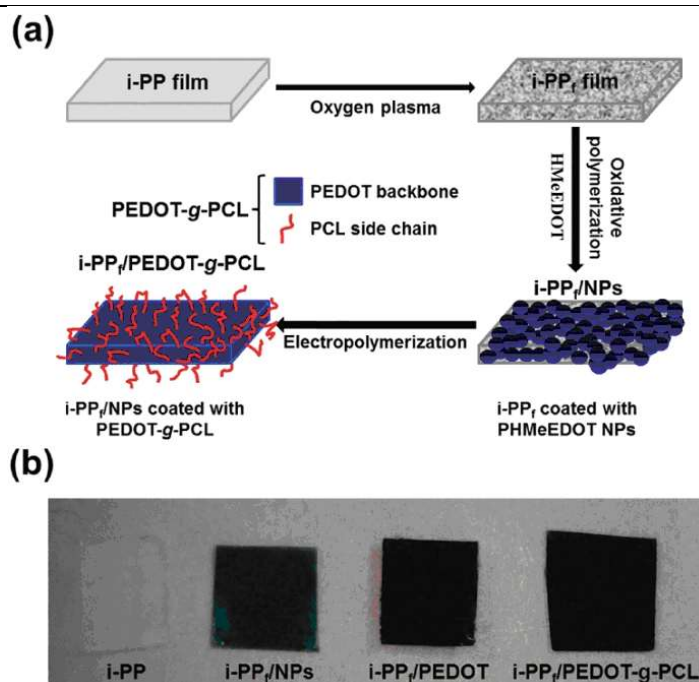


Figura 37. (a) Reprezentarea schematica a obtinerii bioplatformei flexibile $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ prin functionalizari fizice si chimice aplicate substratului de $i\text{-PP}$ in trei etape; **(b)** Imagini ale substratului $i\text{-PP}$ de plecare si ale bioplatformelor 3D, $i\text{-PP}_f/\text{NP}$, $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$.

In fapt $i\text{-PP}_f/\text{NP}$ a fost folosit drept electrod in electrocopolimerizarea celor doi reactanti, stratul de nanoparticule de PHMeEDOT functionand ca unul cu nuclee de polimerizare pentru formarea de noi lanturi de copolimer conjugat grefat PEDOT-g-PCL, atasate ferm acestuia prin legaturi covalente. O bioplatfoma construita in conditii experimentale identice, folosind doar EDOT (10 mM), a fost obinuta ca sa fie utilizata drept "control" in investigarea ulterioara a proprietatilor urmarite. Este de precizat faptul ca tehnica de electro(co)polimerizare permite un control precis al grosimii stratului de acoperire (vezi mai jos) prin modularea sarcinii de polimerizare, asa cum a fost demonstrat in studii cinetice anterioare pentru PEDOT si pentru alti polimeri conjugati²³. Desi s-a dovedit inactiv din punct de vedere electrochimic, (*vide infra*), stratul de PHMeEDOT NPs pare sa nu blocheze transportul sarcinilor electrice dinspre si inspre electrozi prin interfata. Pe de alta parte acest strat ofera centri de reactie (radical-cationi) situati in imediata vecinatate a suprafetei de depunere, centri care permit legarea covalenta a lanturilor

copolimerice/polimerice nou formate de suprafata suportului. Astfel, formarea ulterioara a copolimerului PEDOT-*g*-PCL sau a homopolimerului PEDOT are loc datorita asa-numitului fenomen de "nucleatie", declansat de prezenta centrilor activi din punct de vedere electrochimic de pe nanoparticulele de PHMeEDOT²⁴, obtinandu-se lanturi polimerice conectate intim la suprafata platformei.

Existenta copolimerului PEDOT-*g*-PCL sau a lanturilor de PEDOT adsorbite fizic pe suprafata filmului de PHMeEDOT NPs, ca un strat de acoperire format prin legaturi necovalente ce poate avea loc mai ales in ultima faza a electropolimerizarii, totusi nu trebuie exclusa. Aceste lanturi libere pot fi atasate ferm de suprafata suportului prin interactiuni de tip π - π cu suprafata nanoparticulelor de PHMeEDOT, intr-o maniera similara celor formate la suprafata nanotuburilor de carbon de catre o poli-*p* fenilena cu lanturi de PCL grefate²⁵. Figura 3 b prezinta imagini ale bioplatformelor 3D, in succesiunea obtinerii lor, bioplatformele acoperite cu PEDOT-*g*-PCL sau PEDOT (cele de control) fiind notate cu i-PP_f/PEDOT-*g*-PCL, respectiv i-PP_f/PEDOT. Se poate observa ca suportul transparent de i-PP devine opac si albastrui dupa incorporarea PHMeEDOT NPs, care la randul sau devine albastru inchis odata cu depunerea straturilor de PEDOT sau de PEDOT-*g*-PCL prin electropolimerizare. Aceasta transformare, constatata vizual, sugereaza si argumenteaza faptul ca atat polimerizarea oxidativa cat si electro(co)polimerizarea au avut loc cu succes.

A.3.2.2. Construcția platformelor bioactive bazate pe nanoentități funcționalizate la suprafață pe bază de silice funcționalizată

S-a urmarit incapsularea clorhidratului de doxorubicina in silicele mentionate, in diferite conditii, conform Tabelului 7, in care "pHi" se refera la pH-ul solutiei initiale (apa distilata sau PBS). Pe baza analizei spectrofotometrice a supernatantului dupa 24h de contact intre silice si solutia de Dox, s-au calculat urmatoarele marimi: eficienta de incapsulare (EE) -ecuatia (1) si gradul de incarcare al silicei (LE) - ecuatia (2).

$$EE = 100 \times (\text{Cantitate initiala Dox} - \text{cantitate neincapsulata}) / \text{Cantitate initiala Dox} \quad (1)$$

$$LE = (\text{Cantitate initiala Dox} - \text{cantitate neincapsulata}) / \text{Cantitate de silice initiala} \quad (2)$$

Tabel 7. Eficienta de incapsulare a doxorubicinei, EE (%) si gradul de incarcare in silice, LE ($\mu\text{g}/\text{mg}$) - in paranteze -. Conditii: 10mg silice in 5 ml solutie Dox, 24h la temperatura camerei, sub agitare usoara.

Proba	Concentratie initiala Dox 0.1 g/l		Conc Dox 0.2 g/l; pHi =7.4		
	pHi = 7.4	pHi = 5.5 (apa)	16h	24h	x 2*
MD1	84.69 (72.3)	-	86.49 (112.4)	90.05 (117)	-
Sil2	89.59 (76.4)	33.43 (21.4)	13.48 (17.5)	22.75 (29.6)	-
Sil84	89.70 (76.5)	7.8 (5)	20.39 (26.5)	30.4 (39.5)	-
MSil2	98.50 (84)	91.81 (58.9)	97.36 (126.5)	96.86 (125.8)	+76.2(224.9)
MSil84	96.97 (82.7)	56.65 (36.3)	76.12 (98.9)	89.83 (116.7)	+57.6(173.8)

*Incarcare repetata pe aceeasi silice

Se poate observa ca incapsularea este mult mai eficienta la pH slab bazic fata de apa distilata. Gradul de incarcare depinde atat de porozitatea silicei (sunt mai eficiente silicele mezoporoase in ambele perechi testate), cat si de natura grupei functionale. Atasarea derivatului de glucoza are ca efect scaderea eficientei incapsularii in cazul solutiei apoase, in timp ce in solutie tampon pH 7.4 influenta glucozei este practic nesemnificativa. Din solutie diluata, Dox este incapsulata in proportie foarte mare, (85-99% EE), ceea ce echivaleaza in conditiile testate, cu incarcari in jur de 80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de silice. Dubland concentratia solutiei initiale, se observa ca pentru probele mezoporoase gradul de incarcare creste de cca. 1.5 ori, in timp ce in cazul silicelor fara mezopori (Sil2 si Sil84), eficienta incapsularii si gradul de incarcare scad fata de situatia cand s-a folosit solutie diluata de Dox. In cazul silicei MSil2, urmarind evolutia gradului de incarcare se remarca o usoara scadere la 24h fata de valoarea la 16h, ceea ce semnifica inceputul unei desorbti si faptul ca in mai putin de 16h se atinge incarcarea maxima. De aceea, aceasta silice, cat si MSil84 (pentru comparatie) au fost supuse unui al doilea ciclu de incarcare, in care, dupa alte 24h s-a atins un grad maxim de incarcare de 225 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de silice pt MSil2 si 174 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pentru MSil84. Probabil si MD1 ar putea primi mai mult medicament la timp mai lung si volum mai mare de solutie concentrata.

Gradul de incarcare (LE) in silice din solutie diluata este in domeniul raportat in literatura pentru nanotuburi de silice²⁶, iar din solutie mai concentrata, este mult superior. Esentiale sunt legaturile fizice care se pot forma intre silice si Dox in solutie, anume legaturi de hidrogen, interactiuni electrostatice si interactiuni hidrofobe. Este evident ca in mediu slab acid, nivelul acestora este mult mai scazut, in special in cazul silicelor cu derivat de glucoza. Pe baza constantelor de aciditate ale principalelor componente din sistem (Tabel 8), se poate estima natura acestor interactiuni. In ambele conditii de pH, gruparile aminice din Dox sunt in forma protonata, grupele Si-OH sunt preponderent protonate in pH= 5.5 si preponderent ionizate in pH=7.4²⁷, in timp ce gruparile OH din glucoza si grupele tiol sunt protonate in ambele situatii. Rezulta ca in pH=5.5 interactiunile principale sunt legaturi de hidrogen si interactiuni hidrofobe, nivelul interactiunilor electrostatice fiind cel mai scazut, ceea ce explica legarea mai slaba a Dox. La pH=7.4, legarea Dox se face in special prin interactiuni electrostatice cu grupele Si-O⁻ in toate cazurile, intarite probabil de legaturi de hidrogen, precum si interactiuni hidrofobe intre Dox si "coada" hidrocarbonata a derivatului organic. Avand in vedere aceste ipoteze, ar fi de asteptat ca eliberarea Dox sa prezinte aceeasi tendinta. Dupa cum se va vedea in continuare, din Tabelul 7 rezulta clar ca procentul de Dox eliberat din formulele incarcate in apa este mult mai mare

comparativ cu cazul incarcarii din PBS pH7.4, ceea ce confirma nivelul mai scazut al interactiunilor in primul caz (si cu precadere pentru proba MSil84).

Tabel 8. Valorile pKa ale componentelor amestecurilor, conform literaturii

Grupa functionala	pKa	Ref
Si-OH	4.5; 8.5	28
(CH ₂) ₃ SH	10.2	29
glucoza	15.8*	30
doxorubicina	7.34 (fenol); 8.46 (amina); 9.46 (est.)	31

*OH din pozitiile 4 si 6, deoarece cel din pozitia 1 (cel mai acid) este deja reactionat in compusul nostru

Auto-asocierea intre componentele sistemului s-a studiat preliminar prin doua simulari de dinamica moleculara, folosind soft-ul YASARA, pentru a testa modul in care grupele functionale atasate silicelor influenteaza legarea Dox. Pentru simplificare, au fost simulate doar partile de molecule aratate in Figura 38.

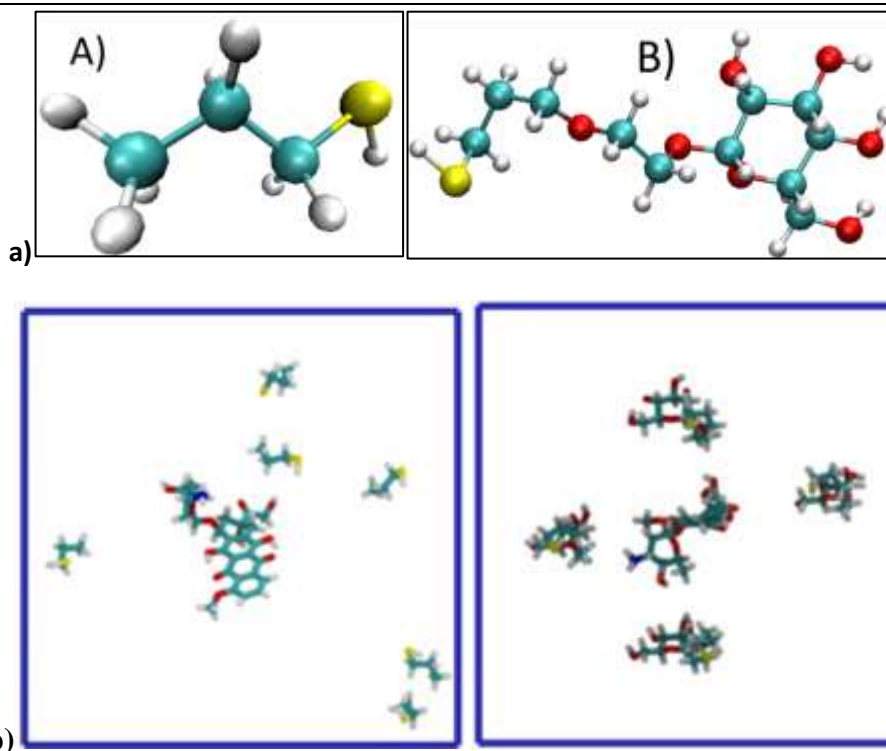


Figura 38. Structurile fragmentelor organice de interes din silicele investigate (a) si configuratia de start a sistemelor (b) – apa a fost omisa pentru claritate

Protocolul de simulare a implicat plasarea unei molecule de Dox in centru, inconjurata de 6 molecule de compus A si respectiv 4 in cazul B, s-a adaugat apa si ioni pentru neutralizare (pH simulat 7.4) si s-a simulat dinamica sistemelor timp de 120 ns.

Prin analiza vizuala nu s-au observat interactiuni semnificative intre compusul A si Dox, in afara unor interactiuni hidrofob-hidrofob pentru o perioada scurta de timp. In cazul compusului B s-au observat ceva mai multe interactiuni intre molecule (Figura 39), insa nu s-a putut discerne un mecanism clar, fiind necesar un studiu mai detaliat. In aceste conditii nu au fost observate legaturi de hidrogen.

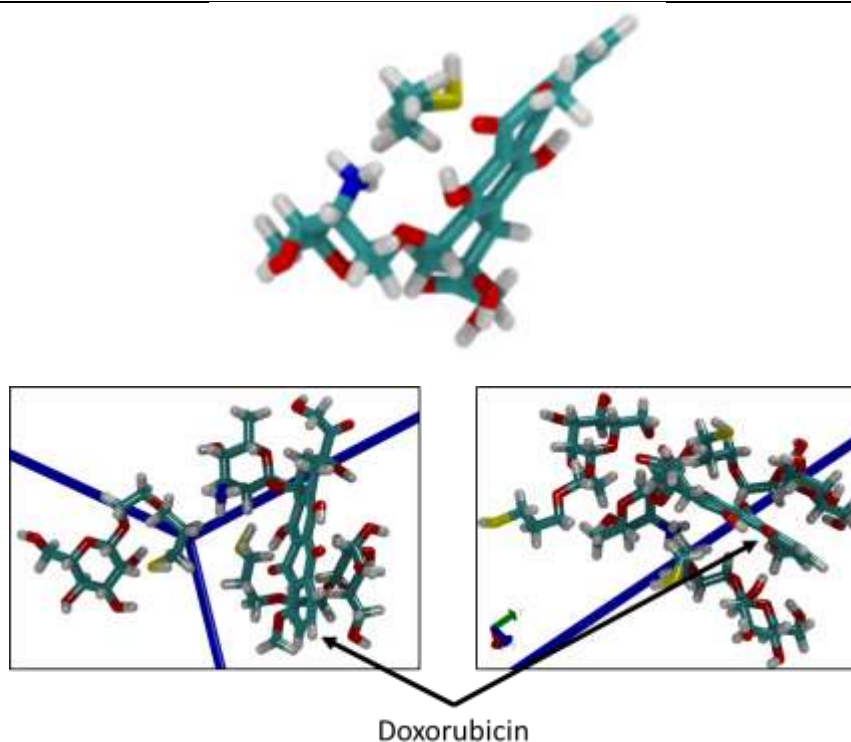


Figura 39. Exemple de interactiviuni intre doxorubicina si compusul A, respectiv B

A.3.4. Evaluarea funcționalității constituenților nanoplatformelor asamblate

A.3.4.1. Caracterizarea platformei hibride electrosensibile

(A) Caracterizarea chimica si a hidrofiliei suprafetelor bioplatformelor

Spectrele FTIR ale bioplatformelor i-PPf/PEDOT si i-PPf/PEDOT-g-PCL (Figura 40) sunt dominate de benzile de absorbtie ale substratului i-PP si respectiv, de benzile specifice PEDOT-ului, specificate in diferite studii³²⁻³⁶. Benzile de absorbtie caracteristice i-PP corespund vibratiei de deformatie ale grupei CH₂ la 1461 cm⁻¹, vibratiilor grupei metil la 1385 cm⁻¹ si vibratiile caracteristice grupelor CH₂ prezinta picuri de absorbtie la 998 si 1164 cm⁻¹. Pe langa aceste picuri, spectrul FTIR mai prezinta semnale largi, intense, la 1600 cm⁻¹, atribuite vibratiei de intindere C=O din grupele functionale aparute in urma tratarii in plasma cu oxigen. Benzile corespunzatoare PEDOT observate in spectrele FTIR la 869, 757 si 628 cm⁻¹ apartin vibratiilor C-S si C-S-C din ciclul tiofenic. Semnalul caracteristic gruparii esterice din structura PCL, ce se inregistreaza de obicei in jur de 1723 cm⁻¹, se suprapune cu picul larg al i-PP_f. Desi detectarea prin spectroscopie FTIR a lanturilor laterale de PCL este aproape imposibil de realizat atat datorita lungimii lor scurte cat si a densitatii de grefare redusa in raport cu PEDOT, precum si datorita suprapunerii cu semnalele i-PP_f, identificarea lor a fost realizata prin spectroscopie de inalta rezolutie de tip Raman. Chiar daca in spectrele Raman ale ambelor bioplatforme (Figura 40 b) predomina benzile caracteristice PEDOT, s-au intregit si unele diferente clare care ne-au permis identificarea lanturilor laterale de PCL in i-PP_f/PEDOT-g-PCL. Mai exact, au fost identificate urmatoarele semnale: 988 cm⁻¹ atribuit vibratiei legaturii C-S, 1085 cm⁻¹ corespunzator vibratiei de intindere a grupei etilendioxi, 1258 cm⁻¹ datorita vibratiei de intindere a legaturii C-C dintre cicluri, 1365 cm⁻¹ atribuit vibratiei de intindere a legaturii C-C si 1420 cm⁻¹ vibratia de intindere a legaturii C=C. Picurile corespunzatoare vibratiilor de intindere ale

legaturilor C=O si C-C (1575 , respectiv 1137 cm^{-1}), care pot fi atribuite atat $i\text{-PP}_f$ cat si PCL, sunt semnificativ mai intense in cazul $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ decat in cazul $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$.

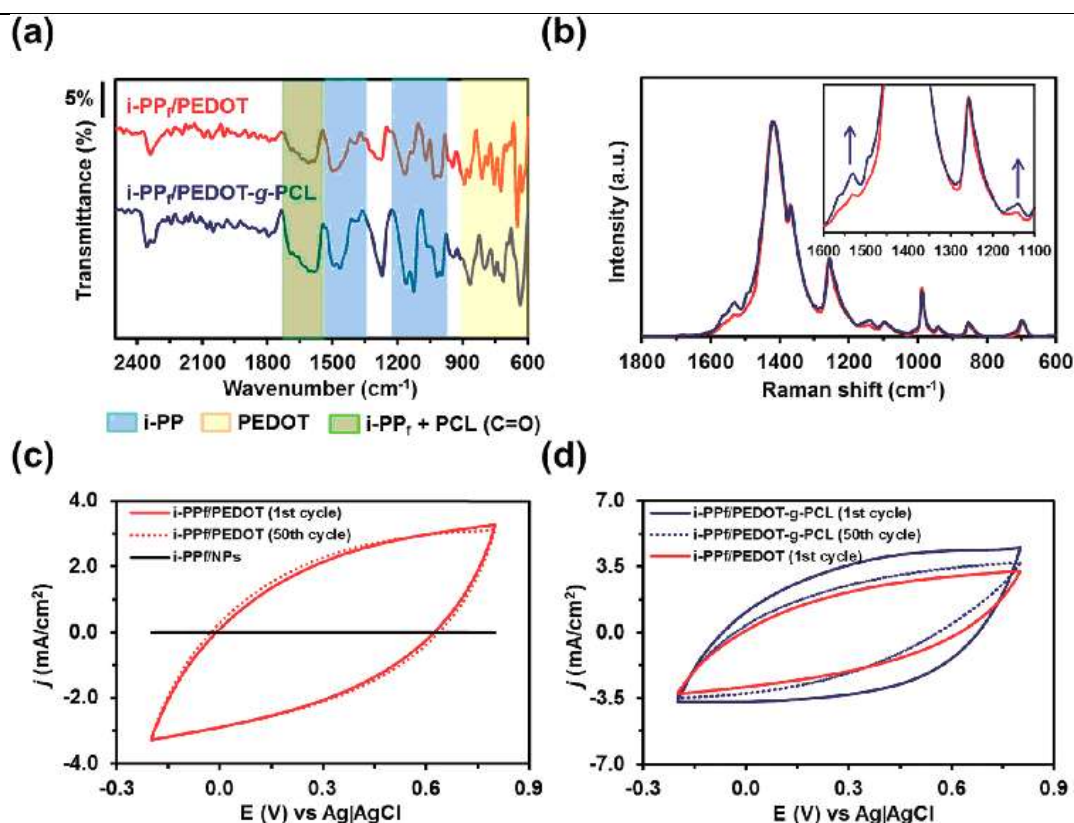


Figura 40. (a) Spectrele FTIR si (b) Raman ale bioplatformelor $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$. (c) Compararea voltamogramelor ciclice inregistrate in PBS 0.1 M pentru $i\text{-PP}_f/\text{NP}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$. (d) Compararea voltamogramelor ciclice inregistrate in PBS 0.1 M pentru $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$. Voltamogramele inregistrate pentru $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ dupa 50 cicluri redox consecutive (liniile punctate) sunt incluse in (c, respectiv d). Testele CV au fost realizate utilizand urmatoarii parametri: viteza de scanare, 50 mV s^{-1} ; potentialul initial si final, -0.20 V ; potentialul de inversare, $+0.80\text{ V}$

Incorporarea cu succes a EDOT-PCL in bioplatforma de tip $\text{PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ este sustinuta si de studiile de hidrofilie a suprafetei. Unghiul de contact (CA) cu apa Milli-Q a fost $CA=102^\circ \pm 3^\circ$, $78^\circ \pm 5^\circ$, $82^\circ \pm 3^\circ$, $< 20^\circ$, respectiv $84^\circ \pm 5^\circ$ pentru filmele $i\text{-PP}$, $i\text{-PP}_f$, $i\text{-PP}_f/\text{NP}_s$, $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$, respectiv $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ (Figura 41).

Dupa tratarea in plasma, $i\text{-PP}$ cu caracter hidrofob se transforma in $i\text{-PP}_f$ cu caracter usor hidrofil datorita nu numai aparitiei grupelor polare (anume C=O si C-O identificate in FTIR, dar si datorita formarii unui strat superficial prin modelare la nivel nanometric, asa cum se observa in imaginile de microscopie electronica de baleiaj SEM (*vide infra*). Cu toate acestea, functionalizarea cu PHMeEDOT NPs in urmatoarea etapa, in mod surprinzator, nu a dus la o crestere a umectabilitatii. Acest fenomen a fost pus pe seama actiunii combinate a doi factori diferiti (discutati in urmatoarea sub-sectiune): (1) PHMeEDOT NPs acopera in totalitate suprafata $i\text{-PP}_f$; si (2) modificarile topografice ale $i\text{-PP}_f/\text{NPs}$ au loc mai degraba la nivel submicrometric decat la nivel nanometric.

Pe de alta parte, hidrofilicitatea PEDOT-ului este data de cantitatea mare de contraioni dopanti³⁷. Aceasta poate fi explicatia pentru care, dupa acoperirea cu un strat omogen de

PEDOT, in a treia etapa de obtinere controlata a bioplatformei, suprafata obtinuta devine puternic hidrofila. In schimb, hidrofilicitatea $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ este redusa datorita prezentei lanturilor laterale de PCL. Cu toate acestea, copolimerizarea macromonomerului EDOT-PCL cu monomeri de EDOT imbunatateste hidrofobocitatea $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$, (PCL este un polimer hidrofob cu o valoare a CA cu apa de $\sim 120^\circ$ ³⁸, fapt care ar trebui sa fie benefic in aplicatii de inginerie tisulara.

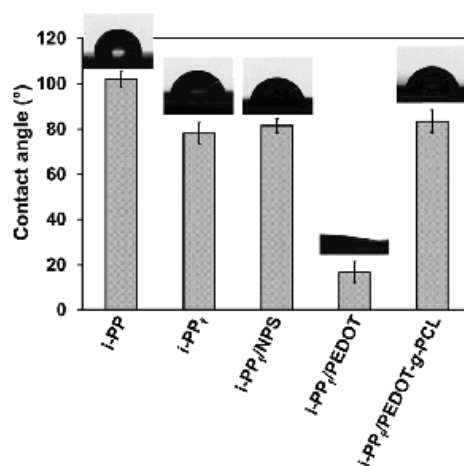


Figura 41. Valorile unghiul de contact pentru materialele examinate si imaginile fotografice ale acestora

(B) Caracterizarea termica, electrochimica si ilustrarea flexibilitatii

Figura 42 ilustreaza robustetea cat si flexibilitatea platformei $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ si, dupa cum se poate observa, stratul de PEDOT-g-PCL ramane intact dupa o indoire semnificativa, fara sa prezinte vreun semn de deteriorare la suprafata. Acest aspect reflecta adeziunea excelenta intre substratul $i\text{-PP}_f$ si stratul de copolimer. Mai mult, s-a aratat ca singura deformare a bioplatformelor ce contin stratul copolimeric, $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$, apare numai in zona in care platformele sunt fixate de cleme, ceea ce indica faptul ca prezenta stratului polimeric amplifica rezistenta la intindere a acestor platforme³⁶. Caracterizarea electrochimica a fost realizata utilizand voltametria ciclica. Figura 40 compara voltamogramele ciclice inregistrate pentru $i\text{-PP}_f/\text{NP}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ in solutia de buffer fosfat (PBS) 0.1 M. Dupa cum se observa, activitatea electrochimica a $i\text{-PP}_f$ este practic inexistentă, chiar si dupa functionalizarea cu PHMeEDOT NPs. Acest aspect reflecta faptul ca stratul de PHMeEDOT NPs are doar rolul de "rezervor" al "nucleelor" de crestere a lanturilor de PEDOT sau PEDOT-g-PCL in timpul polimerizarii electrochimice, asa cum s-a precizat in sectiunea anterioara. In schimb, dupa cum reiese din aria voltamogramei, activitatea electrochimica creste considerabil dupa formarea stratului de PEDOT. Dupa 50 de cicluri consecutive de oxidare-reducere, aria voltamogramei inregistrata pentru probele de $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ scade foarte putin (Figura 40.c), indicand faptul ca aceasta este o bioplatforma stabila electrochimic. Mai precis, pierderea electroactivitatii (LEA) dupa 50 de cicluri a fost de doar $6\% \pm 1$.

Comparand ariile voltamogramelor ciclice se constata faptul ca electroactivitatea $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ este semnificativ mai mare decat a $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$. Tinand cont de faptul ca grosimea celor doua straturi electroactive este aproximativ aceeasi (9.0 ± 2.5 si $8.2 \pm 2.4 \mu\text{m}$

pentru PEDOT-g-PCL, respectiv PEDOT, determinate prin profilometrie), putem atribui aceasta crestere a electroactivitatii morfologiei si structurii PEDOT-g-PCL.

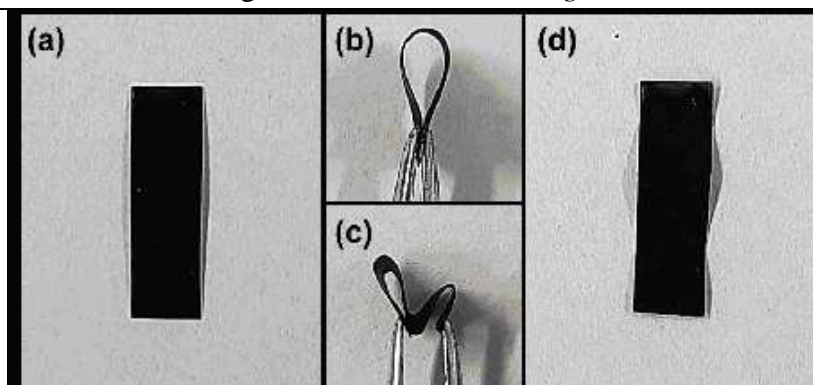


Figura 42. Bioplatforma $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$ ($0.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$) (a) înainte, (b si c) in timpul si (d) dupa deformare

Astfel, datorita morfologiei poroase (evidentiata prin SEM) schimbul ionic in procesul de oxidare-reducere are loc mai usor in cazul copolimerului in comparatie cu homopolimerul. Pe de alta parte, prezenta lanturilor laterale sterice, polare de PCL din PEDOT-g-PCL³⁹, datorita conductivitatii ionice inalte⁴⁰, a capacitatii de solvatare ionica mari⁴¹, si a prezentei grupelor finale hidroxilice⁴² pot usura si amplifica fluxul ionic spre interiorul substratului, catre lantului conjugat de PEDOT. Totusi, pierderea activitatii electrochimice este mai rapida in cazul $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$, cu o valoare a LEA de $29\% \pm 5\%$ dupa 50 de cicluri redox (Figura 40), decat pentru $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$. Acest comportament a fost atribuit degradarii electrochimice a lanturilor laterale de PCL, care sunt probabil deteriorate de procesele succesive de scanare potentiala, fiind bine cunoscut faptul ca grupele esterice din PCL sunt active din punct de vedere redox, cu o valoare a potentialului electric apropiata de cea de decapare si placare a litiului, formand produși de degradare⁴³. Degradarea progresiva afecteaza structura moleculara a copolimerului, reflectata in reducerea porozitatii filmului, facand astfel mult mai dificil accesul si eliberarea ionilor dopanti atunci cand este aplicat potentialul de oxidare, respectiv reducere.

Caracterizarea si stabilitatea termica a platformelor bioactive obtinute au fost realizate folosind calorimetria diferentia (DSC) si analiza termogravimetrica (TGA)^{36,44-47}. Inainte de evaluarea $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ si $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$, au fost studiate proprietatile termice ale macromonomerului EDOT-PCL, $i\text{-PP}$, $i\text{-PP}_f$ si $i\text{-PP}_f/\text{NP}$. Acelasi program de incalzire-racire-incalzire a fost folosit pentru toate probele investigate.

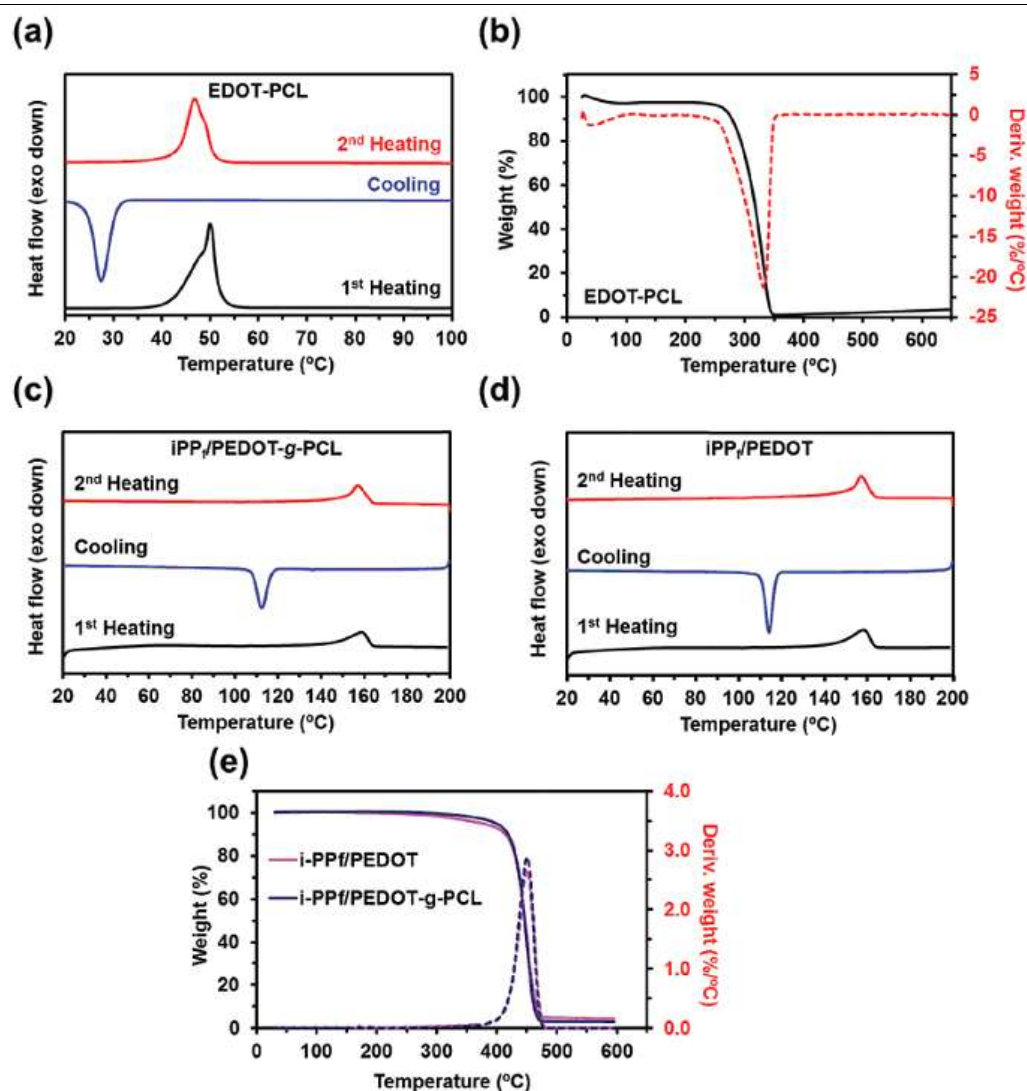


Figura 43. Curbele DSC (a, c, și d) și TGA-DTGA (b și e) ale EDOT-PCL (a și b), i-PP/PEDOT-g-PCL (c și e) și i-PP/PEDOT (d și e)

Curbele DSC ale ambelor etape de încălzire pentru macromonomerul EDOT-PCL (Figura 43), evidențiază o dublă topire. Pe lângă picul endotermic principal, este prezent și un umăr secundar. Acest comportament al macromonomerului EDOT-PCL poate fi asociat unui efect morfologic care implică prezenta a două populații de cristale, de dimensiuni și grosimi diferite. Fiind observat pentru prima dată în cazul unui macromonomer electroactiv care conține lanțuri de PCL, acest fenomen poate fi, de asemenea, justificat de geometria deosebită și de caracterul biciclic al fragmentului EDOT, care pare să interfereze cu procesul de cristalizare a PCL atât în soluție cât și în stare topită într-o manieră particulară. În cazul macromonomerului EDOT-PCL valorile experimentale ale picului de topire și a celui de cristalizare au fost găsite în jurul valorii de 50 °C, respectiv 27 °C (Figura 43.a.), indicând dezvoltarea unei faze cristaline. Aceste valori sunt în bună concordanță cu cele raportate pentru PCL. Gradul de cristalinitate, măsurat în primul și al doilea ciclu de încălzire, a fost mare, apropiat de 78%, respectiv 58%. Pe de altă parte, experimentele termogravimetrice ale macromonomerului EDOT-PCL (Figura 43.b.) au arătat o pierdere continuă de masă de la 250° până la 350 °C caracterizată de un singur pic DTGA (cea mai înaltă temperatură de degradare) la 332 °C cu un rest residual de 3.4%.

Acest tip de comportament este previzibil, ținând cont de faptul că stabilitatea termică a PCL depinde de masa sa moleculară. Astfel, temperatura de degradare inițială (IDT) a unui

oligomer de PCL care contine 16 unitati structurale ($M_n = 1800$) a fost de 230 °C (Persenaire, O. et al, 2001). Mai mult decat atat, studii anterioare realizate pentru alti macromonomeri electroactivi care contin lanturi de PCL, au demonstrat faptul ca stabilitatea termica a PCL depinde si creste functie de natura partii aromatice atasata lantului PCL. Acest comportament este confirmat si in cazul de fata al EDOT-PCL, pentru care gradul de polimerizare stabilit in baza datelor ^1H RMN este de 16.5. Radicalul EDOT atasat la unul din capetele de lant al PCL a dus la cresterea stabilitatii termice al acestuia prin cresterea valorii IDT cu 20 °C (de la valoarea raportata de 230 °C. Nu au fost inregistrate diferente semnificative in datele DSC pentru i-PP, i-PP_f si i-PP_f/NP. In toate cazurile au fost observate un punct de topire in jur de 158 °C si un pic de cristalizare centrat la 114 °C la prima, respectiv a doua scanare. Punctul de topire observat pentru i-PP utilizat in acest studiu pare sa fie corespunzator formei β a i-PP, forma mai putin stabila si cu temperatura de topire (~155 °C) mai mica decat forma α (~170 °C). Valorile cristalinitatii masurate pentru probele cristalizate din solutie au fost usor mai scazute decat cele masurate pentru probele cristalizate din topitura (aproximativ 37% vs. 43%). Influenta PHMeEDOT NPs asupra cristalizarii i-PP nu a fost semnificativa, nefiind observate variatii importante pentru i-PP_f/NP nici in cazul temperaturii de cristalizare, nici a cristalinitatii.

Analizele termogravimetrice au demonstrat faptul ca stabilitatea termica creste odata cu cresterea functionalizarii i-PP. Descompunerea a avut loc intr-o singura etapa, cu un pic de degradare DTGA maxim care creste de la 416 °C pentru i-PP la 453 °C pentru i-PP_f/NP. Temperatura de degradare initiala (stabilita in curba TGA ca fiind temperatura la care pierderea de greutate este de 5%) a fost mare pentru toate probele si creste pe masura functionalizarii i-PP (338 °C, 361 °C si 413 °C pentru i-PP, i-PP_f, respective i-PP_f/NP), reflectand faptul ca functionalizarea cu plasma si electroactivarea ulterioara cu PHMeEDOT NPs au imbunatatit stabilitatea termica a polimerului. Termogramele DSC ale i-PP_f/PEDOT-g-PCL si i-PP_f/PEDOT sunt prezentate in figura 45 c and d. Totusi, trebuie mentionat ca polimerizarea cu EDOT sau EDOT-PCL a condus la o scadere semnificativa a cristalinitatii i-PP (40% si 35% masurata in al doilea ciclu de incalzire pentru i-PP_f/PEDOT, respectiv i-PP_f/PEDOT-g-PCL).

Pe de alta parte, in toate inregistrarile DSC pentru i-PP_f/PEDOT-g-PCL (Figura 43.c) picurile caracteristice topirii sau cristalizarii lanturilor laterale de PCL lipsesc. Acest fenomen a fost explicat fie pe baza valorii gradului de polimerizare a PCL (in cazul structurii liniare), fie pe baza valorii fractiei molare de macromonomer PCL incorporate in copolimerul final (in cazul copolimerilor grefati). Bazandu-ne pe experienta noastra, presupunem ca in cazul i-PP_f/PEDOT-g-PCL viteza mica de cristalizare a PCL asociata cu arhitectura copolimerului PEDOT-g-PCL, care permite interactiunea intermoleculara ce poate avea loc in stare topita (interactiuni de tip π - π puternice catenele principale conjugate si/sau interactiuni intre catenele principale si cele laterale); incetinesc, impiedica si chiar previne cristalizarea lanturilor laterale de PCL. Stabilitatea termica a celor doua bioplatforme (Figura 43.e) este mai mare decat cea a i-PP si i-PP_f, desi usor scazuta fata de cea a i-PP_f/NP. Curbele TGA si DTGA inregistrate pentru cele doua platforme au o forma similara (Figura 43.e) cu aceeasi temperatura maxima de degradare, T_{max} , 450 °C, valoare similara cu cea obtinuta in cazul i-PP_f/NP.

De asemenea, ambele platforme au atins punctul de degradare finala la aceeasi temperatura, 475 °C, si un reziduu de 3% si 5% pentru i-PP_f/PEDOT, respectiv i-PP_f/PEDOT-g-PCL, in functie de proportia de EDOT si EDOT-PCL din compozitia finala a platformelor investigate. Totusi este o mica diferenta in temperatura de degradare initiala. i-PP_f/PEDOT-g-

PCL incepe sa se degradeze cu 23°C mai tarziu decat i-PP_f/PEDOT, ceea ce indica o imbunatatire a performantei platformei bioactive atunci cand sunt grefate grupe laterale de PCL.

(C) Caracterizarea morfologica si topografica

Prin microscopie electronica de baleiaj (SEM) si prin microscopie de forta atomica (AFM) ale i-PP, s-a aratat ca suprafata acestui substrat este una omogena, neteda si relativ plata, cu o rugozitate medie (R_q) de doar $30 \pm 6 \text{ nm}$ ³⁶. Efectele functionalizarii si electroactivarii asupra morfologiei si topografiei i-PP_f si i-PP_f/NP sunt prezentate in figura 44. Suprafata devine mai complexa dupa functionalizare. Astfel, tratarea in plasma cauzeaza aparitia unui strat superficial si omogen la nivel nano pe toata suprafata (Figura 44.a). Aceste modificari morfologice afecteaza semnificativ topografia, prezentand o usoara crestere a rugozitatii suprafetei ($R_q = 38 \pm 6 \text{ nm}$) datorita aparitiei picurilor mici si ascutite, abundent si omogen distribuite. Prezenta mare a PHMeEDOT NPs cu morfologii speciale este clar observata pe suprafata i-PP_f/NP (Figura 44.b), care prezinta o crestere puternica a rugozitatii ($R_q = 312 \pm 12 \text{ nm}$) comparativ cu i-PP_f.

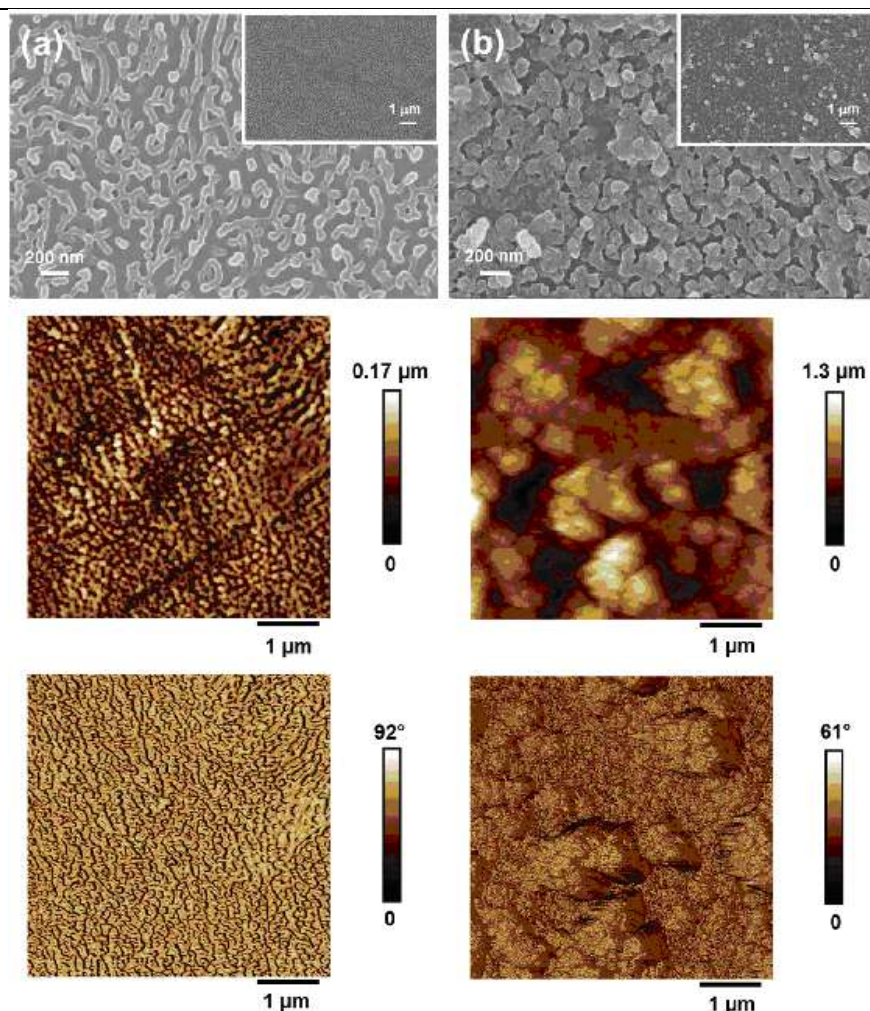


Figura 44. Imaginile microscopiei electronica de baleiaj SEM si ale microscopiei de forta atomica AFM (contrast si faza) ale (a) i-PP_f si (b) i-PP_f/NP

Acele NPs, organizate intr-un strat poros cu o grosime de $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$, au fost distribuite la intamplare pe suprafata i-PP_f, formand o structura neordonata de tip retea. Totusi, contactul

dintre aceste NPs nu a fost suficient de mare pentru a asigura percolarea și pentru a forma cai de conductie, lucru care explica lipsa activității electrochimice în cazul filmelor de $i\text{-PP}_f/\text{NP}$.

Figura 44 prezintă diferențele morfologice semnificative între $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ și $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$. După cum se poate observa, în cazul $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$, homopolimerul PEDOT acoperă în totalitate PHMeEDOT NPs, integrându-le într-un singur strat conductor cu o cale de conductie continuă și bine definită. Acest strat prezintă o morfologie heterogenă tipică filmelor electropolimerizate de PEDOT⁴⁸, care constă în agregarea clusterilor rezultați în urma procesului de aglomerare (condensare) moleculară. Astfel, creșterea liniară a lanțurilor de PEDOT, care sunt formate exclusiv prin legături $\alpha\text{-}\alpha$ (pozițiile β ale ciclului tiofenic sunt ocupate de ciclul dioxanic), favorizează apariția de clusteri sferoidali compacti, care se agregă și formează structuri poroase cu numeroși pori de dimensiuni submicrometrice. Această structură unică favorizează mobilitatea ionilor dopanți în timpul proceselor redox, explicând astfel comportamentul electrochimic excelent raportat pentru PEDOT⁴⁹. În plus, această organizare morfologică prezintă o rugozitate ridicată $R_q = 611 \pm 57 \text{ nm}$ (Figura 45.a).

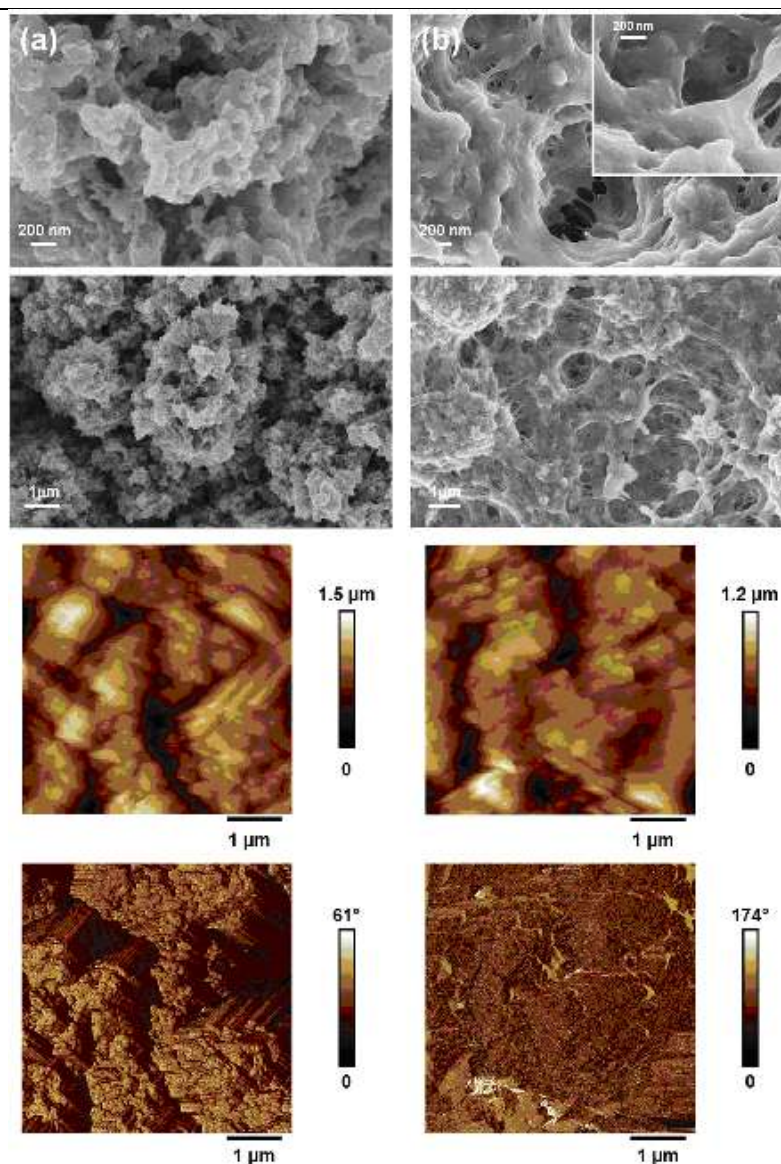


Figura 45. Imaginile microscopiei electronice de baleiaj SEM și ale microscopiei de forță atomică AFM (contrast și fază) ale (a) $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT}$ și (b) $i\text{-PP}_f/\text{PEDOT-g-PCL}$

Textura microscopica a i-PP_f/PEDOT-g-PCL este mai neteda decat a i-PP_f/PEDOT, fapt atribuit localizarii superficiale a lanturilor laterale de PCL. Aceasta presupunere este confirmata de contrastul inregistrat in imaginile de faza din AFM, inclusa in figura 47.b, care permite diferentierea a doua faze in i-PP_f/PEDOT-g-PCL. Imagistica de faza este un instrument puternic sensibil la rigiditatea/moliciunea suprafetei si aderenta intre varful cantileverului si suprafata. Imaginile inregistrate pentru i-PP_f/PEDOT-g-PCL prezinta zone luminoase si intunecate, care corespund modificarii de faza chimic-dependenta de pana la 174°. Zonele luminoase, corespunzatoare unghiurilor mari, sunt asociate cu PEDOT, in timp ce zonele intunecate reprezinta PCL. Trebuie mentionat faptul ca PCL ocupa cea mai mare parte a suprafetei, in timp ce PEDOT apare in regiuni dominate de incorporarea monomerilor EDOT in raport cu macromonomerul EDOT-PCL. Aceste rezultate pot fi explicate daca sunt luate in considerare detaliile experimentale. Electropolimerizare a avut loc in acetonitril, care este un solvent marginal pentru PCL. In timpul evaporarii solventului si formarii filmului, lanturile laterale de PCL din PEDOT-g-PCL migreaza in mod natural spre suprafata, expunand, cel mai probabil, partea cea mai bogata in grupari alifatic. Pe de alta parte, rugozitatea i-PP_f/PEDOT-g-PCL ($R_q = 448 \pm 34$ nm) este mult mai mica decat cea a i-PP_f/PEDOT, chiar daca valorile grosimei stratului de PEDOT-g-PCL si de PEDOT sunt foarte apropiate (9.0 ± 2.5 , respectiv 8.2 ± 2.4 μm).

O alta diferenta importanta intre i-PP_f/PEDOT-g-PCL si i-PP_f/PEDOT se refera la structura porilor. Desi ambele bioplatforme prezinta o suprafata poroasa cu un numar mare de pori submicrometrici, i-PP_f/PEDOT-g-PCL are o distributie unica de pori nanometrici cu marimi cuprinse intre ~ 50 si ~ 100 nm. Acesti nanopori suplimentari (aditionali), care au fost atribuiti auto-asamblarii lanturilor laterale de PCL, sunt in concordanta cu activitatea electrochimica inalta si cu stabilitatea electrochimica scazuta a i-PP_f/PEDOT-g-PCL in comparatie cu i-PP_f/PEDOT. Atunci cand se utilizeaza domeniul cuprins intre -0.3 V – 0.9 V, ar fi de asteptat ca lanturile laterale de PCL sa fie foarte sensibile la degradarea electrochimica, in special datorita masei moleculare scazute. De aceea, probabil, porii nanometrici colapseaza dupa cateva cicluri redox consecutive, reducand drastic activitatea electrochimica a sistemului odata cu cresterea numarului de cicluri redox.

(D) Studii privind influenta PEDOT-g-PCL asupra adesiunii si proliferarii celulare

Efectul prezentei PEDOT-g-PCL asupra adesiunii si proliferarii celulare (Figura 46) a fost evaluat testand doua tipuri de cellule, si anume HeLa si IMR-90, ambele folosite frecvent in astfel de studii datorita cresterii lor rapide. Rezultatele cantitative atat pentru aderenta (dupa o zi) cat si cele de proliferarea celulara (dupa 7 zile) reprezentate in figura 46 corespund mediei a trei replici indepentende pentru fiecare material testat si sunt exprimate in termeni de viabilitate celulara relativa (cv) fata de materialul de control TCPS.

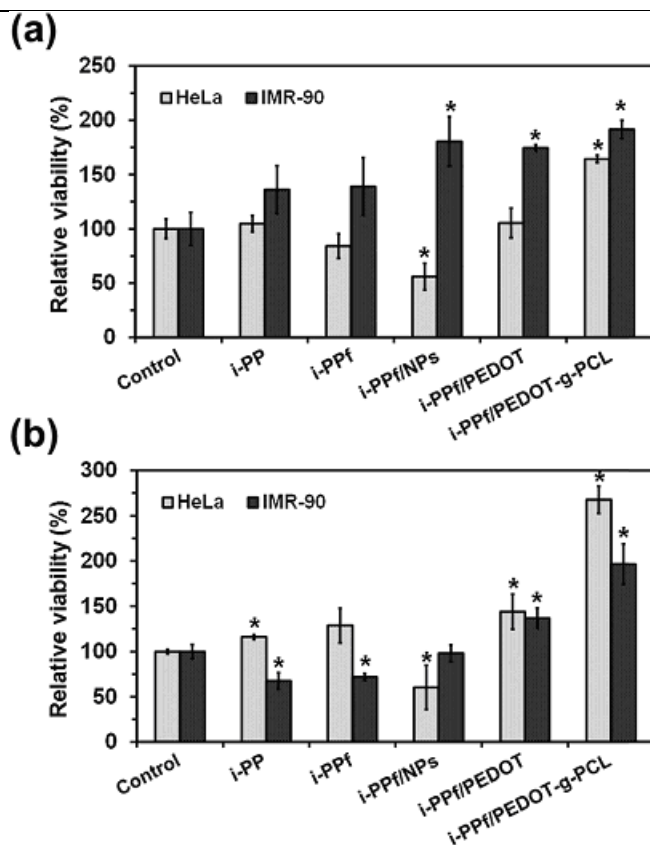


Figure 46. (a) Adeziunea celulara si (b) proliferarea celulara pe suprafata i-PP, i-PPf, i-PPf/NPs, i-PPf/PEDOT si i-PPf/PEDOT-g-PCL. TCPS a fost folosit ca substrat de control. Celulele Human HeLa si IMR-90 au fost crescute timp de (a) 24 h si (b) 7 zile.

(*) reprezintă diferența semnificativă față de control în cazul testului Student T ($p = 0.05$).

Cantitatea de celule aderate pe suprafata i-PP este similara (HeLa) sau usor crescuta (IMR-90) comparative cu substratul de control TCPS. O aderență similară a fost înregistrată și în cazul suprafețelor tratate în plasmă, i-PPf, indicând faptul că o astfel de funcționalizare nu are un impact major asupra aderenței și interacțiunii celulare cu aceste suprafețe, fenomen explicabil dacă ținem cont de faptul că (i) diametrul filamentelor filopodice, filamente ce au un rol crucial în procesul de adeziune celulară, este de aproximativ 100-200nm⁵⁰, în comparație cu (ii) valorile rugozităților suprafețelor testate 30 ± 6 nm pentru i-PP și respective, $R_q = 38 \pm 6$ nm pentru i-PPf. Deși ușor crescută rugozitatea i-PPf nu este suficient de mare astfel încât să influențeze aderența celulelor⁵¹. Incorporarea primului strat de polimer conductor influențează semnificativ procesul de aderență celulară. Astfel, în funcție de tipul de celule, prezența PHMEDOT NPs a condus la o creștere de 80% a aderenței celulelor IMR-90 și o scădere de 50% în aderența celulelor cancerigene HeLa (Figura 46.a).

Adăugarea celui de-al doilea strat de CP determină o creștere semnificativă a aderenței celulelor în comparație cu i-PPf/NP, acest efect fiind remarcabil pentru celulele IMR-90. Astfel, aderența celulelor fibroblaste pe i-PPf / PEDOT și i-PPf / PEDOT-g-PCL este cu aproximativ 70% și respectiv 90% mai mare comparativ cu i-PP, în timp ce pentru celulele HeLa creșterea aderenței este neglijabilă pentru i-PPf / PEDOT și de aproximativ 60% pentru i-PPf / PEDOT-g-PCL. Răspunsul diferit al celor două tipuri de celule față de CP se datorează cel mai probabil conținutului lor diferit de fibronectină, a cărei adsorbție este esențială pentru aderența celulară⁵². S-a constatat că, în general, în liniile celulare derivate din țesuturi non-cancerigene fibronectina se găsește localizată predominant în matricea extracelulară, în timp ce în liniile celulare cancerigene conținutul de fibronectină extracelulară este foarte redus sau chiar absent în cazul celulelor HeLa. În liniile de celule HeLa fibronectina este localizată în nucleul celular. Această particularitate explică aderența redusă a celulelor HeLa pe suprafețele de i-PPf / PEDOT-g-

PCL si i-PPf / PEDOT, desi PEDOT-ul si polimerii conjugati, au in general, o mare afinitate fata de fibronectina.

Grefarea covalenta a lanturilor laterale biocompatibile la CPs este o strategie inteligenta pentru a imbunatati biocompatibilitatea structurilor bazate pe CP, a caror proprietati fizice si chimice mimeaza caracteristicile matricei extracelulare (polimerii conductor permit difuzia si schimbul ionic la intrerfata cu mediile biologice).

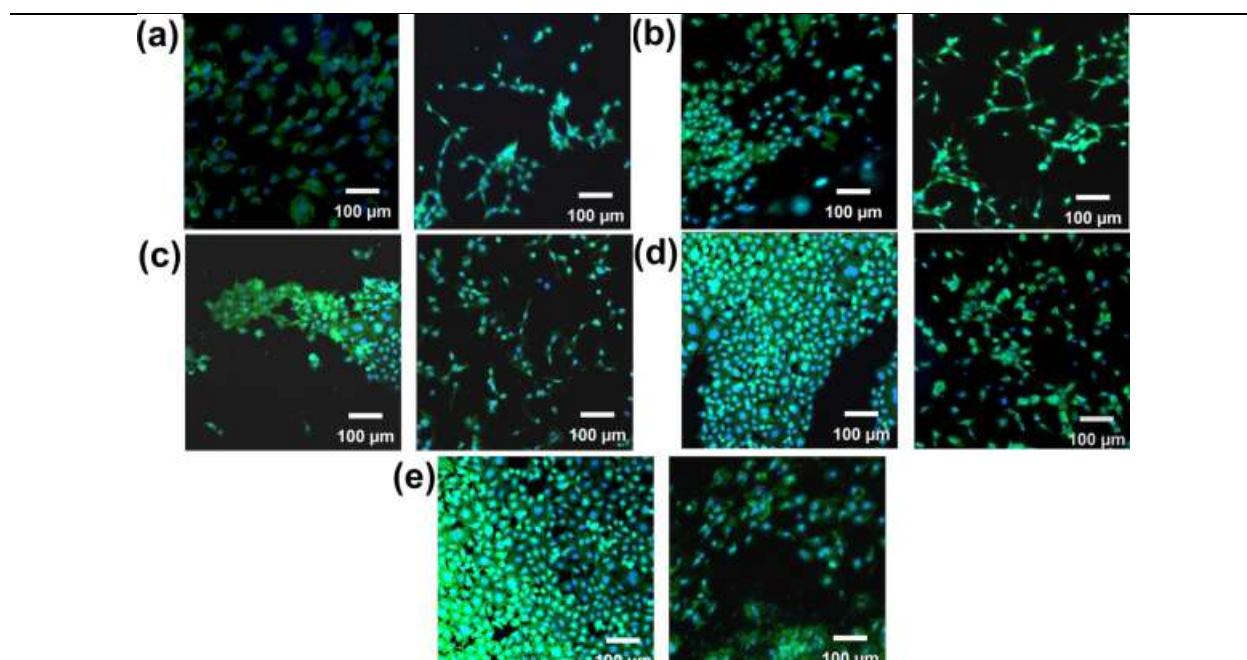


Figura 47. Imaginile de microscopie confocala prezentand morfologia celulelor HeLa (stanga) si celor IMR-90 (dreapta) dupa incubarea timp de 7 zile (a) i-PP, (b) i-PP_f, (c) i-PP_f/NP, (d) i-PP_f/PEDOT si (e) i-PP_f/PEDOT-g-PCL.

Analiza viabilitatii celulare prin teste simple de proliferare este o metoda utila in evaluarea impactului “scaffold-urilor” in metabolismul celular si prin urmare, un prim indiciu asupra utilizarii lor in ingineria tisulara. Rezultatele proliferarii celulare pentru materialele investigate sunt prezentate in figura 47 si asa cum asteptam, depind de tipul de celula. Proliferarea celulelor HeLa pe i-PP si i-PP_f ($cv = 116\% \pm 2\%$ si respective, $129\% \pm 19\%$) a fost usor mai mare fata de control, TCPS si redusa pentru i-PP_f/NP ($cv = 60\% \pm 24\%$). In schimb, i-PP_f / PEDOT ($cv = 144\% \pm 19\%$) au inregistrat o crestere semnificativa a numarului de celule datorate diviziunii celulare (citokineza) in comparatie cu substraturile i-PP functionalizate sau nu in plasma. Rezultatele obtinute indica faptul ca PHMEDOT NPs, sintetizat prin polimerizare chimica, nu are un grad de dopare suficient de ridicat astfel incat sa faciliteze schimbul ionic cu celulele HeLa aderate. In schimb, PEDOT-ul preparat in aceleasi conditii cu cele descrise in partea experimentală are un grad inalt de dopare, caracteristica comuna CP obtinuti prin polimerizarea electrochimica si in consecinta, se acumuleaza o concentratie foarte mare de contraioni in matricea polimerica. Aceste structuri cu proprietati chimice si electronice unice, faciliteaza schimbul ionic la interfata PEDOT/celula, promovand diviziunea celulara. Intr-adevar aceasta proprietate permite compusilor sintetizati sa depaseasca chiar si limitarile asociate cu lipsa fibronectinei extracelulare in celulele HeLa, imbunatatind raspunsul suprafetelor inerte electrochimic, precum TCPS, i-PP, i-PP_f si i-PP_f/NP. Trebuie mentionat ca aceste rezultate, vizibile in figura 47 sunt in concordanta perfecta cu voltamogramele ciclice.

i-PPf/PEDOT-g-PCL prezinta o capacitate extraordinara de promovare a cresterii celulelor HeLa, $cv = 268\% \pm 15\%$, caracteristica nemaintalnita pana in prezent (Figura 11 d) si atribuita sinergiei dintre activitatea electrochimica a PEDOT, biocompatibilitatea ridicata a PCL, polimer frecvent utilizat in aplicatii biomedicale si conductivitatea ionica datorita anionilor dopanti ai PEDOTsi imbunatatita de capacitatea de solvatare ionica a PCL^{40,41}. Adaugarea stratului de polimer grefat suprafetelor i-PP induce o crestere a viabilitatii celulare de 2.3 ori. In cazul celulelor IMR-90 rezultatele obtinute sunt si mai impresionante. Astfel, viabilitatea celulelor depuse pe suprafetele i-PP si i-PPf ($cv = 68\% \pm 9\%$ si respective $72\% \pm 4\%$) este mai mica comparative cu controlul, cel mai probabil datorita umectabilitatii lor reduse, cunoscand fiind faptul ca suprafetele hidrofile promoveaza cresterea celulelor de acest tip. Rezultate opuse au fost inregistrate pentru i-PPf/NP ($cv = 98\% \pm 9\%$), desi unghiul lor de contact cu apa are valori similare cu cele ale i-PPf, cel mai probabil datorita capacitatii CP de a realiza schimbul ionic cu celulele, afirmatie susutinita si de rezultatele obtinute atunci cand un strat relative subtire de PEDOT este depus pe suprafata PHMeEDOT NPs. Astfel, viabilitatea celulara pentru i-PPf/PEDOT ($cv = 137\% \pm 11\%$) este de doua ori mai mare fata de cea a suprafetelor de i-PP folosite in aplicatii biomedicale. Pentru i-PPf/PEDOT-g-PCL, datorita prezentei PCL, ($cv = 196\% \pm 22\%$) cresterea este de aproape 3 si respective 1.5 ori fata de i-PP si i-PPf/PEDOT.

Rezultatele obtinute demonstreaza sinergia dintre efectele prezentei PEDOT-ului si PCL-ului la interfata bioplatformei. Prin urmare, modul de abordare a copolimerului grefat din acest studiu, reprezinta o strategie inteligenta de functionalizare a materialelor plastice biomedicale utilizate in prezent, cum este i-PP, pentru a putea combina in mod optim flexibilitatea si capacitatea de transport de sarcini electrice dintre biointerfata materialelor si tesuturilor vii, promovand considerabil aderența si cresterea celulara.

Concluzii

Bioplatforma rezultata este un substrat flexibil, acoperit cu un copolimer grefat care prezinta, sinergic, avantajele catenei principale de PEDOT și ale lanțurilor laterale PCL. Acest studiu arata ca i-PP / PEDOT-g-PCL are multe proprietati imbunatatite in raport i-PP si i-PP / PEDOT pentru aplicatii in inginerie a tesuturilor. Acest lucru a fost confirmat de testele de aderența și proliferare celulara utilizând doua linii celulare umane cu caracteristici foarte diferite (HeLa și IMR-90), i-PP / PEDOT-g-PCL îmbunătățind viabilitatea celulară a i-PP cu un factor de aproape trei . Per total, acest studiu are implicatii largi asupra dispozitivelor medicale polimerice utilizate in prezent ca implanturi, care pot fi optimizate multiplicand performanta lor de integrare a tesuturilor.

A.3.4.2. Evaluarea funcționalității constituenților nanoplatformelor asamblate pe bază de silice

Studiul de eliberare a doxorubicinei s-a facut imersand o cantitate de 7 mg silice incarcata in 2.5 ml solutie tampon pH 7.4, 5 sau 2.6. Tuburile s-au agitat la 37 °C, iar la anumite intervale de timp s-au supus centrifugarii, supernatantul fiind colectat pentru analiza UV-Vis si inlocuit imediat cu aceeasi cantitate de solutie tampon. Am preferat evitarea folosirii membranei de dializa, care poate induce erori din cauza fenomenelor de adsorbție. Eliberarea s-a testat in conditii de pH fiziologic (7.4), pH slab acid corespunzator tesutului tumoral (5), dar si la un pH

foarte acid (2.6), pentru observarea comportarii *in extremis* a interactiunilor din sistemul medicament-ligand prin fortarea procesului de eliberare.

Valorile maxime ale capacitatii de eliberare calculate ca % Dox eliberat/Dox incapsulat, sunt prezentate in Tabelul 9, iar in Figurile 48-50 sunt comparate profilurile de eliberare pentru silicele incarcate cu Dox. Se remarca faptul ca atat eficienta incarcarii, cat si eliberarea cumulata au atins valori comparabile cu datele de literatura –spre exemplu, in cazul NP de silice cu nanovalve controlate de pH²⁷.

Alura profilului de eliberare este aceeași in majoritatea cazurilor, cu atingerea unui maxim dupa cca 4-5h, cu doua exceptii: proba MD1 elibereaza sustinut in 24h la pH7.4 (Figura 48), iar proba MSil2 elibereaza sustinut in 24h la pH 5 (Figura 49). Valoarea acestui maxim variaza de la 25-75% in pH 7.4 si intre 57-80% in pH 5, in timp ce in conditii extreme de pH s-ar elibera cca. 29-60%, raportat la cantitatea incapsulata. In termeni de cantitate Dox eliberata per masa silice (ultima coloana din Tabelul 9), silicea fara mezopori cu glucoza (Sil84) elibereaza o cantitate aproape dubla in mediu acid fata de cea fara glucoza (Sil2). Silicele mezoporoase elibereaza mult mai mult decat Sil2 (de 10 ori mai mult in cazul lui MSil2), desi ca procent din cantitatea incapsulata diferentele nu sunt foarte mari. Este interesant efectul derivatului de glucoza: cand acesta este atasat pe silicea fara mezopori, atat capacitatea de incarcare, cat si cantitatea de Dox eliberata cresc, in timp ce in cazul silicelor mezoporoase, efectul este invers. Efectul se datoreaza, probabil, blocarii parțiale a mezoporilor cu derivatul de glucoza. Reamintim faptul ca, pe baza evolutiei incapsularii din solutie concentrata, in silicele mezoporoase functionalizate s-a incarcat o a doua sarja de Dox, pentru a avea o idee despre capacitatea maxima de incapsulare, iar eliberarea s-a facut din silicele incarcate la maximum.

Avand in vedere criteriul eliberarii controlate de pH, in sensul eliberarii cu precadere in mediul acid al tumorii, se poate concluziona ca Sil84 si MSil2 ar indeplini cel mai bine aceasta cerinta. In plus, cazul MSil2 este unul aparte, proba fiind incarcata de doua ori si avand o eliberare progresiva. Comparand probele dupa 5h, cel mai mare procent de medicament elibereaza MD1 si Sil84, insa prima are o eliberare sustinuta si in pH 7.4. Efectul benefic al modificarii cu derivatul de glucoza se observa si analizand profilul eliberarii in pH 2.6. In aceste conditii extreme, Sil84 este cea mai buna proba, in sensul eliberarii moderate in pH fiziologic, si eliberarii maxime in pH 2.6, ceea ce indica natura diferita a interactiunilor intre medicament si silicea cu glucoza in conditii diferite de pH.

Tabelul 9. Valorile maxime ale capacitatii de eliberare (% din Dox incapsulat) in diferite conditii (concentratie initiala, pH eliberare), dupa 72h

Proba	Conc initiala 0.1g/l			Conc initiala 0.2g/l	
	pH 7.4	pH 2.6	pH 2.6 ^a	pH 5	
MD1	66.49	28.71	-	67.97	79.5 ^d
Sil2	24.94	49.32	83.96 (28.07) ^b	56.89	16.8
Sil84	29.60	61.05	-	76.37	30.2
MSil2	34.03	35	91.13 (83.67)	79.80 ^c	179.5
MSil84	75.42	48.26	96.74 (54.61)	58.05 ^c	100.9

^a Incarcarea din apa distilata (pH_i 5.5)

^b Fata de cantitatea initiala de Dox

^c Raportat la cantitatea totala incapsulata din doua portii de solutie concentrata

^d Cantitatea de Dox eliberata, µg/mg silice

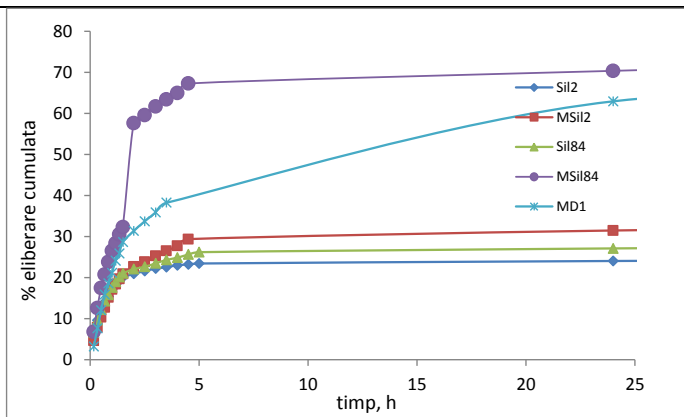


Figura 48. Eliberarea Dox la pH=7.4 (incapsulare la pH=7.4 din solutie 0.1g/l)

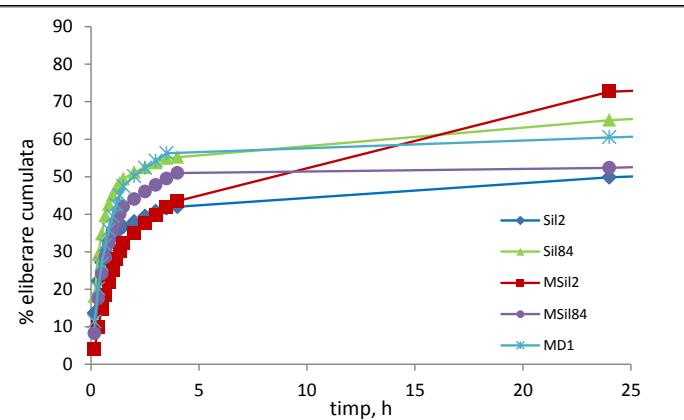


Figura 49. Eliberarea Dox la pH=5 (incapsulare la pH=7.4 din solutie 0.2g/l)

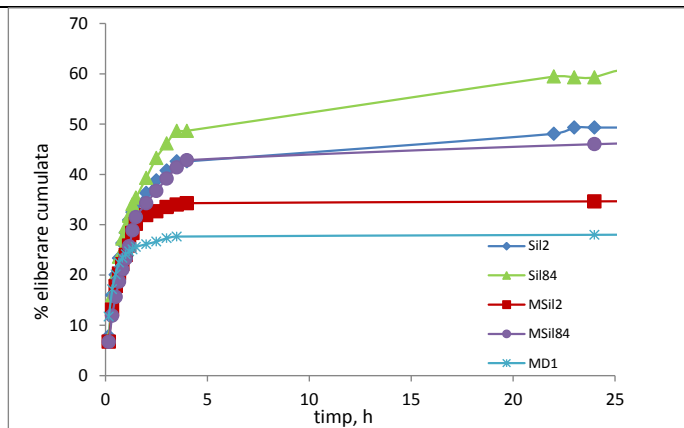


Figura 50. Eliberarea Dox la pH=2.6 (incapsulare la pH=7.4 din solutie 0.1g/l)

Un alt aspect interesant se poate discuta in cazul incapsularii din apa fara PBS si eliberarii in mediu acid “extrem” (Figura 51). Tinand cont de gradul de incarcare in general mai mic din apa fata de solutia PBS pH=7.4, am reprezentat in paranteze (Tabelul 10) si procentul de Dox eliberat in mediu acid fata de cantitatea de Dox din solutia initiala, pentru o mai buna comparatie intre probe. Se observa o situatie interesanta in cazul silicei MSil2. Gradul de incarcare din apa a fost cel mai mare, si aproape intreaga cantitate incarcata a fost eliberata. Si silicea mezoporoasa cu glucoza a eliberat practic toata cantitatea incapsulata, dar aceasta a fost initial mult mai mica. Aceste valori indica clar un mecanism diferit de incapsulare in cele doua situatii, si anume

interactiuni mai slabe dar mai numeroase in cazul silicelor mezoporoase la incarcarea din apa fara PBS. Aceasta observatie confirma ipoteza enuntata pe baza constantelor de aciditate (Act. 3.2.) si permite modularea eliberarii prin alegerea conditiilor de incarcare.

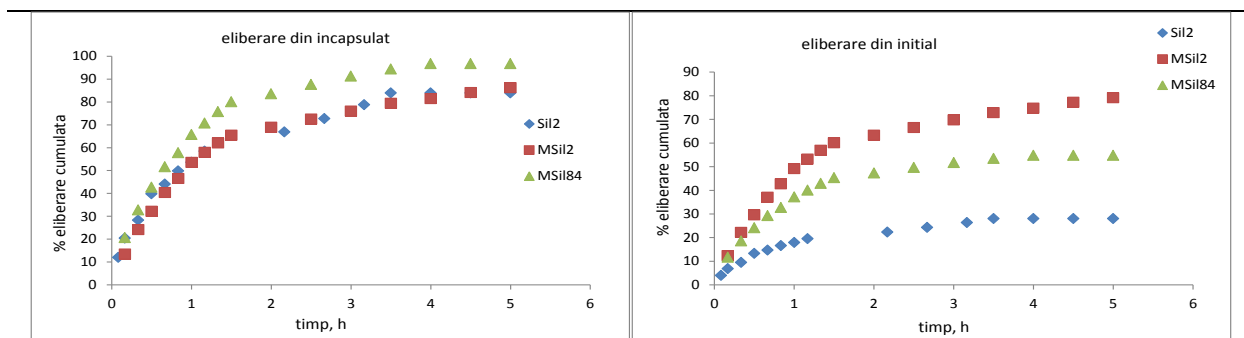


Figura 51. Eliberarea Dox la pH = 2.6 (incapsulare din apa)

Cinetica eliberarii Dox din silice s-a studiat aplicand doua modele matematice: Higuchi (ecuatia 3)⁵³ and Korsmeyer–Peppas (ecuatia 4)⁵⁴.

$$M_t = K_H t^{1/2} \quad (3)$$

$$M_t/M_\infty = K_{KP} t^n \quad (4)$$

unde M_t este cantitatea de medicament eliberat la momentul t , M_∞ este cantitatea initiala de medicament incapsulat, K este constanta de viteza si n este coeficientul de eliberare, care caracterizeaza mecanismul eliberarii⁵⁵.

Ambele modele pot fi aplicate cand $M_t/M_\infty \leq 60\%$, cum este si cazul de fata. Prin fitarea datelor de pe zonele crescatoare ale curbelor profilului de eliberare, s-au obtinut coeficientii listati in Tabelele 10-12.

La eliberarea in pH=7.4, coeficientul de corelatie pentru ecuatia Korsmeyer–Peppas (care se aplica materialelor poroase hidrofile) este ceva mai mare (Tabelul 10). Analizand graficele M_t vs. $t^{1/2}$ (ecuatia Higuchi) s-a observat in toate cazurile un punct de inflexiune la 90 min, ceea ce denota doua procese succesive. Tratand separat datele, s-au gasit coeficienti de corelatie foarte buni pe ecuatia Higuchi, ceea ce arata ca procesul de eliberare poate fi descris de doua etape de difuzie. In toate cazurile, profilul eliberarii este similar, cu atingerea maximului in jur de 4.5h, cu exceptia silicei MD1, care prezinta o eliberare sustinuta in 24h (Figura 52).

Tabel 10. Cinetica procesului de eliberare in pH= 7.4

Proba	Higuchi		Korsmeyer–Peppas	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	12.67 ^a (31.31; 8.97) ^b	0.8562 (0.9988; 0.9887)	0.581	0.8511
Sil2	9.19 (17.09; 3.54) ^b	0.8628 (0.9937; 0.988)	0.378	0.9134
Sil84	9.89 (17.98; 5.1) ^b	0.9002 (0.9985; 0.9967)	0.383	0.937
MSil2	13.78 (20.46; 9.13) ^b	0.9535 (0.9976; 0.9943)	0.530	0.9539
MSil84	39.53 (31.21; 13.36) ^b	0.9463 (0.996; 0.9951)	0.711	0.975

^a Date cinetice pentru 24h

^b Doua procese succesive, inainte si dupa 90 min

In mediul acid al tesutului tumoral (pH 5) probele Sil2, Sil84 si MSil2 au eliberare sustinuta pe tot domeniul de observatie (72h), dar Sil2 si Sil84 prezinta o viteza de eliberare foarte lenta dupa primele 4h, in timp ce proba MSil2 are o crestere continua in primele 24h, urmata de o eliberare foarte lenta. De asemenea, s-a considerat cinetica eliberarii in primele 4h pentru toate probele, cu exceptia MSil2.

Tabel 11. Cinetica procesului de eliberare in pH= 5

Proba	Higuchi		Korsmeyer–Peppas	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	29.71 (44.05; 13.48) ^a	0.9177 (0.9942; 0.9994)	0.503	0.9338
Sil2	14.92 (27.09; 7.27)	0.8209 (0.9265; 0.987)	0.309	0.8717
Sil84	20.02 (36.98; 7.67)	0.8212 (0.9541; 0.9868)	0.313	0.8815
MSil2	14.55 (35.07; 10.69) ^b	0.8781 (0.9995; 0.9942)	0.548	0.8681
MSil84	26.45 (40.67; 11.67)	0.8982 (0.9851; 0.9993)	0.537	0.899

^a Doua procese succesive, inainte si dupa 90 min

^b Date cinetice pentru 24h

La eliberarea in pH=2.6, modelul Higuchi a definit cel mai bine procesul de eliberare din silicele fara mezopori, indicand un proces de difuzie care respecta legea lui Fick. Pentru silicele mezoporoase, ecuatia Korsmeyer–Peppas s-a potrivit mai bine, dar exponentii de eliberare (in general sub 0.5) indica preponderent un proces de difuzie (Tabelul 12). Observand mai atent graficele M_t vs. $t^{1/2}$ se constata existenta unui punct de inflexiune doar in cazul silicelor mezoporoase. Astfel, procesul de eliberare poate fi cel mai bine descris de doua etape de difuzie, probabil o difuzie de pe suprafata in primele 90 min (chiar 50 min in cazul lui MD1) si una din

pori, in urmatoarele 2h (respectiv 2.5h). Ca o observatie generala, viteza de eliberare din pori (cea de a doua constanta K_H) este mai mare la silicele mezoporoase decat in cele fara mezopori, ceea ce indica faptul ca medicamentul incapsulat in mezopori este implicat in interactiuni mai slabe si/sau mai putine.

Tabel 12. Cinetica procesului de eliberare in pH= 2.6

Proba	Higuchi		Korsmeyer–Peppas	
	K_H	R^2	n	R^2
MD1	9.00 (23.46; 4.19) ^a	0.7755 (0.9726; 0.9685)	0.250	0.8614
Sil2	22.25	0.9407	0.508	0.9311
Sil84	26.93	0.9738	0.569	0.9484
MSil2	18 (27.2; 1.67) ^b	0.899 (0.9867; 0.9598)	0.498	0.9137
MSil84	23.98 (29.34; 15.31) ^b	0.9782 (0.9958; 0.9994)	0.586	0.9767

^a Doua procese succesive, inainte si dupa 50 min

^b Doua procese succesive, inainte si dupa 90 min

Au fost efectuate teste preliminare privind viabilitatea celulara in prezenta silicelor cu sau fara Dox incapsulat, pe doua linii de celule: NDHF (fibroblasti) si MCF 7 (celule tumorale breast cancer). Rezultatele obtinute (Figurile 52 si 53), se remarcă faptul că silicile mezoporoase MSil2 si MSil84 nu sunt toxice in concentratii mici; se observa o viabilitate foarte mare mai ales a celulelor canceroase, si un efect benefic mai ales al probei cu derivat de glucoza. De asemenea, se remarca o scadere a viabilitatii celulelor canceroase in prezenta silicei Sil84 cu glucoza, comparativ de celulele normale, pe intregul domeniu studiat. De asemenea, efectul asupra MCF 7 este evident fata de proba omologa fara glucoza Sil2. In celelalte cazuri, viabilitatea celulelor canceroase este cel putin egala cu a fibroblastilor. Totusi, datele nu sunt neaparat concludente, avand in vedere un grad diferit de inglobare a Dox.

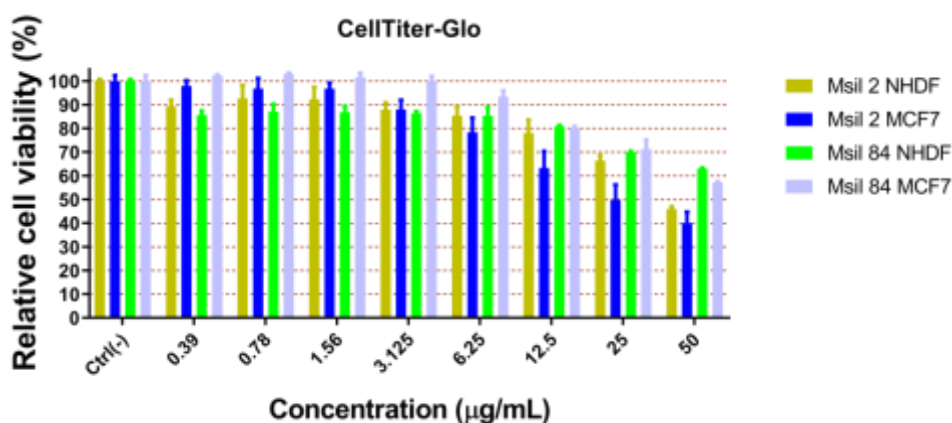


Figura 52. Viabilitatea celulara in prezenta silicelor mezoporoase cu grupe SH si respectiv modificate cu glucoza

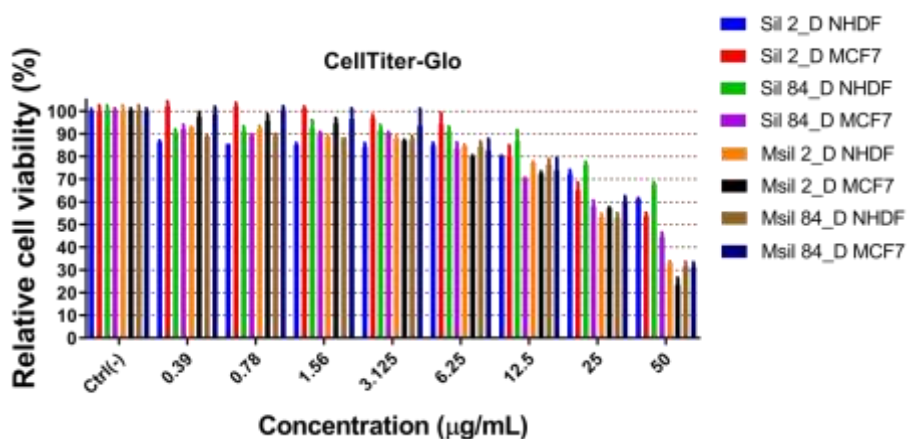


Figura 53. Viabilitatea celulara in prezenta silicelor continand doxorubicina

A.3.3. – Studiul variantelor fezabile de obținere a matricelor (bio)macromoleculare destinate testării *ex vivo* a nanoplatformelor

A.3.3.1. Surogate de tesuturi dure pe baza de collagen/hialuronan/nanoparticule de hidroxiapatita

Cu scopul realizarii unui material biomimetic care sa poata fi utilizat ca substitut de tesut dur s-a optat pentru o formulare care sa contina biopolimeri specifici matricii extracelulare (ECM) –colagen, derivat de acid hialuronic si nanoparticule de hidroxiapatita (HAp) functionalizate superficial cu polietilenimina liniara (PEI) (nHAp_{LPEI}) care sa aiba rol de agent de cuplare pentru componenta de ranforsare anorganica, dar sa si ofere posibilitati de interactiune cu produsii bioactivi eventual inclusi in matricea finala.

S-au realizat hidrogeluri compozite prin criogelare, folosind collagen (Sanimed, Romania), silandiolihiuronat (Exsimol, Monaco) si nHAp_{LPEI} (25 %, g/g, in raport cu biopolimerii) si glutaraldehida ca agent de reticulare (solutie in PBS 0,5%). Pe langa matricea neranforsata s-a realizat si un hidrogel compozit pentru care s-a folosit ca material de ranforsare hidroxiapatita comerciala (Hap_c, Sigma-Aldrich). Codurile materialelor rezultate, luand in considerare compozitia sunt: CH10, CH10-HAp_c25 and CH10-HAp_{LPEI}25. Datele de microscopie electronica (SEM corelat cu EDAX) au evidentiat faptul ca dimensiunea in domeniul nanometric si functionalizarea superficiala cu agent de compatibilizare a favorizat o distributie uniforma a particulelor in matrice, avand ca efect imbunatatirea coeziunii si stabilitatii materialului hibrid. (Figura 54).

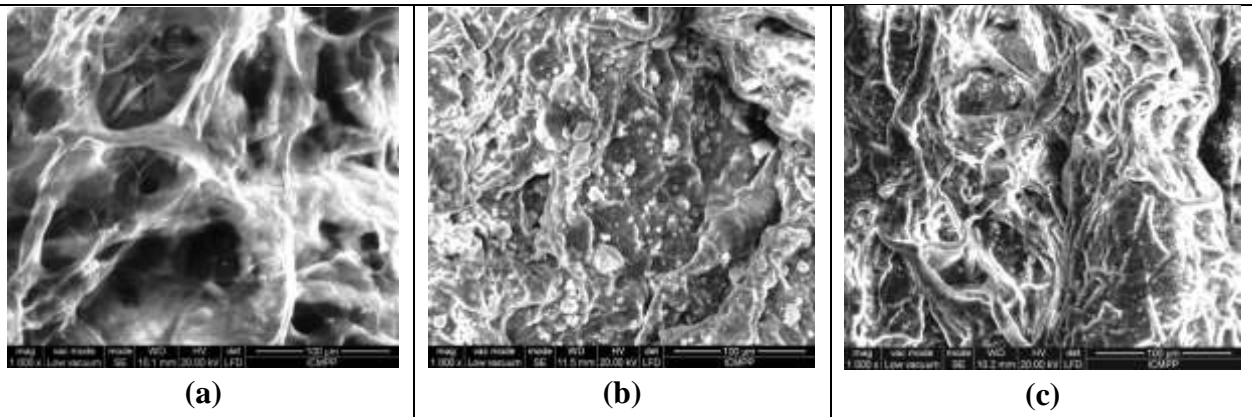


Figura 54. Microfotografii tipice SEM pentru matricile investigate: (a) fara HAp, (b) CH10-HAp_c25 si (c) CH10-HAp_{LPEI}25. Scara-100 μ m.

(A) Caracterizarea matricilor hibride

Matricile poroase hibride pe baza de biopolimeri (colagen, dimetilsilandioli hialuronat 10 % in raport cu proteina – CH10) si nano-hidroxiapatita functionalizata la suprafata cu polietilenimina (HAp_{LPEI}), au fost investigate din punct de vedere structural si functional (comportare la compresie) comparativ cu matrici constituite doar din biopolimeri sau care contin biopolimeri si nano-hidroxiapatita comerciala⁵⁶. Toate componentele selectate sunt biocompatibile, osteoconductive si posedea abilitati de atasare la tesutul dur⁵⁷. Ca material de ranforsare s-a optat pentru nano-hidroxiapatita functionalizata cu LPEI, avand in vedere efectul optim obtinut in urma modificarii de suprafata asupra stabilitatii coloidale, a capacitatii de legare a pADN in raport cu alte alternative de functionalizare sau nHAp nemodificata (Figura 55), cat si proprietatile recunoscute de promotor de adeziune ale LPEI.

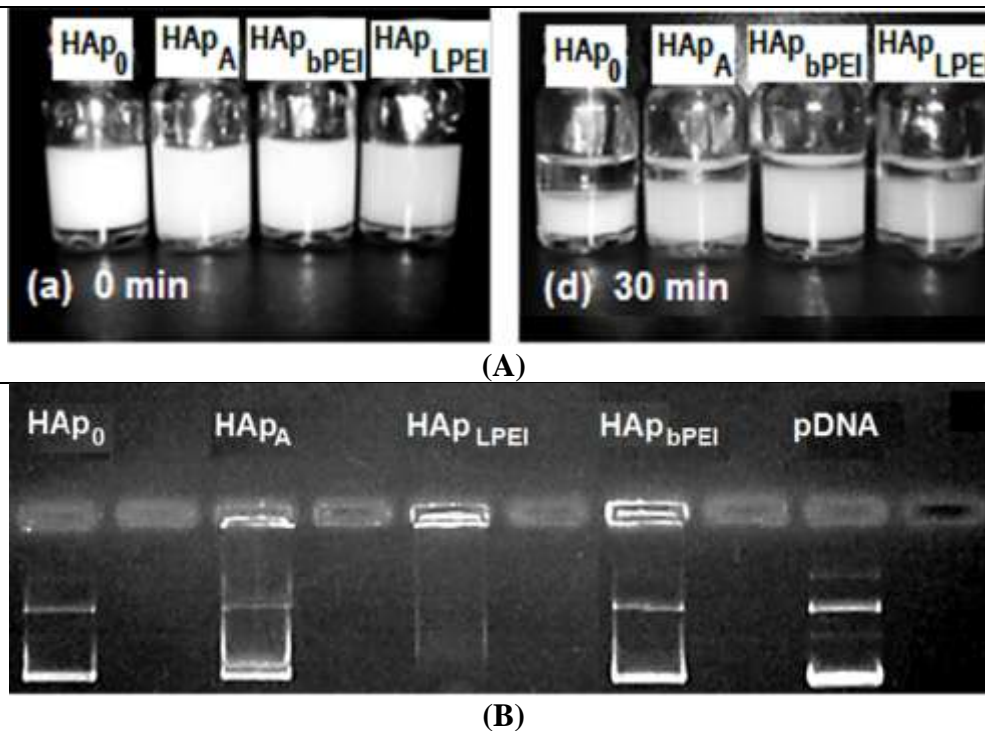


Figura 55. A. Variatia stabilitatii coloidale functie de timp pentru nano-hidroxiapatita (nHAp) modificata superficial in comparatie cu nHAp nemodificata. **B.** Evaluare comparativa a capacitatii de legare a pCS2 + MT-Luc de catre nHAp functionalizata sau nemodificata.

Proportia de material anorganic s-a fixat la 10 % sau 25% raportat la cantitatea totala de material solid. Marirea coeziunii indusa de LPEI (promotor de adeziune) a fost evidentiata printr-un studiu comparativ al probelor incluzand determinari ATR-FTIR, investigarea capacitatii de umflare si a proprietatilor mecanice. Astfel, s-a constatat o variatie a raportului A_V/A_A , corelat cu gradul de reticulare ce implica participarea colagenului, in ordinea:

$$CH10 > CH10-HAp_{LPEI10} > CH10-HAp_c10 > CH10-HAp_{LPEI25} > CH10-HAp_c25.$$

Capacitatea de absorbtie minima a apei a fost inregistrata pentru proba CH10-HAp_{LPEI}25, evidentiind si participarea LPEI la reactia cu glutaraldehida (Figura 56).

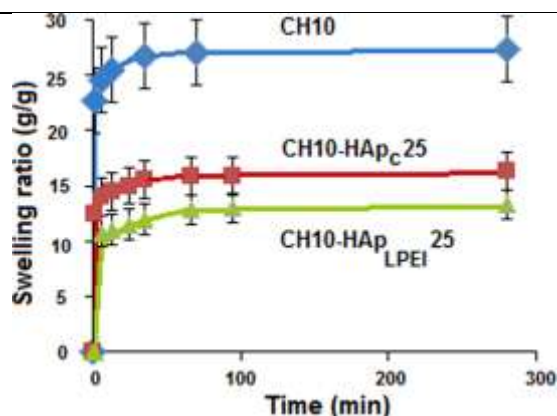


Figura 56. Comportarea la umflare a probelor studiate: proba standard CH 10; compozitul cu HAp comercial netratat si compozitul cu nHAp acoperite cu LPEI

Evaluarea comportarii la compresie pentru diferitele probe a evidentiat obtinerea de materiale stabile, flexibile, cu rezistenta ridicata, cele mai bune performante fiind inregistrate in cazul hidrogelului compozit biopolimeri/HAp_{LPEI}. Utilizarea LPEI pentru functionalizarea la suprafata a nanoparticulelor de HAp a determinat o crestere importanta a proprietatilor mecanice comparativ cu pulberea comerciala HAp_c, datorita facilitarii unei dispersari mai bune/uniforme a materialului anorganic in matricea polimera cat si a adeziunii interfaciale ameliorate. Efectul de ranforsare al materialului anorganic este dependent de concentratie, dupa cum se poate observa in Tabelul 13 si Figura 57.

Tabel 13. Modulul de elasticitate al hidrogelurilor composite in stare umflata la echilibru

Sample code	Applied force (N)	Elastic modulus (MPa)	R ²
CH10	100	0,79 ± 0,55	0,998
CH10-HAp _c 10	100	0,90 ± 0,48	0,983
CH10-HAp _{LPEI} 10	100	1,02 ± 0,33	0,997
CH10-HAp _c 25	100	2,70 ± 0,32	0,999
CH10-HAp _{LPEI} 25	100	6,13 ± 0,75	0,997
CH10	450	0,64 ± 0,17	0,998
CH10-HAp _c 10	450	0,87 ± 0,22	0,998
CH10-HAp _{LPEI} 10	450	0,93 ± 0,42	0,999
CH10-HAp _c 25	450	2,31 ± 0,56	0,998
CH10-HAp _{LPEI} 25	450	5,41 ± 1,07	0,999
CH10-HAp _c 25*	450	0,47	0,997
CH10-HAp _{LPEI} 25*	450	2,62	0,998

CH10-HAp_c25* and CH10-HAp_{LPEI}25*- biocompozite mentinute in PBS timp de trei luni.

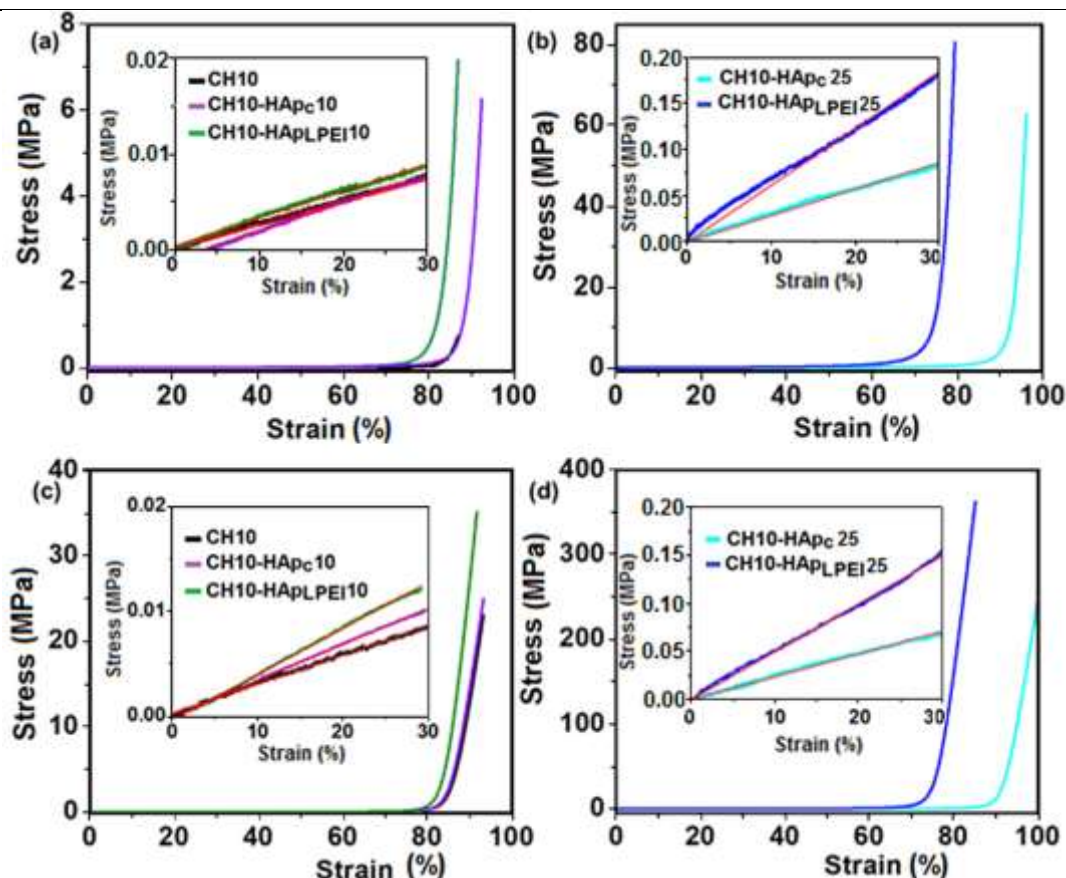


Figura 57. Reprezentari grafice tensiune-deformatie pentru structurile 3D investigate sub compresie uniaxiala pentru o valoare a fortei aplicate de 100 N (a, b) si respectiv 450 N (c, d) si o viteza de deplasare de 1 mm/min. Graficele inserate prezinta dependenta liniara a curbelor tensiune-deformatie din care s-au calculat modulele de elasticitate ale tuturor compozitelor.

Compozitul HAp_{LPEI}-25 a prezentat o rezistenta ridicata rezistand la 5 cicluri consecutive de teste de compresie la sollicitari intre 0 si 80% fara a suferi deformatie permanenta

sau fisuri (recuperare completa), ceea ce evidentiaza capacitatea de recuperare rapida a deformatii si rezistenta la oboseala (Figura 58).

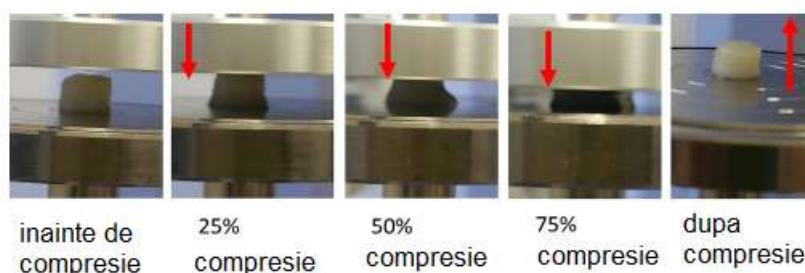


Figura 58. Imagini ale probei CH10-HApLPEI10 in timpul testelor de compresie uniaxiala.

In literatura de specialitate^{58,59} se specifica dependenta modulului de elasticitate la compresie a hidrogelurilor compozite de compozitie (polimeri utilizati, raport material de ranforsare/matrice polimera), mod de preparare, grad de reticulare si alternativa de reticulare. Valorile obtinute in cadrul acestui studiu sunt mai mari (cu 1-2 ordine de marime) fata de cele raportate pentru conditii si compozitii apropiate (proportia HAp, concentratia proteinei, porozitatea matricei).

Se evidentiaza astfel importanta compozitiei (derivatul hialuronic actioneaza ca un co-agent de reticulare; LPEI intervine si in procesul de reticulare) si a adeziunii interfaciale adecvate in sistemul material de ranforsare/matrice polimera.

Performantele raportate recomanda utilizarea HAp_{LPEI} ca pe o alternativa optima, simpla, eficienta de realizare a unor biocompozite cu proprietati mecanice remarcabile, controlabile din compozitie. Avand in vedere importanta deosebita pe care o reprezinta rezistenta mecanica in aplicatii ce vizeaza utilizarea in ingineria tesutului dur, in obtinerea de substitute pentru cartilaj sau modele de laborator pentru acest tip de tesut, astfel de materiale prezinta o reala posibilitate de realizare a unor scaffold-uri sau modele de laborator pentru studiul tesutului osos sau al cartilagiilor. Continutul de derivat hialuronic, matricea similara ECM, asigura conditii pentru studiul dezvoltarii/tratarii tumorilor.

(B) Surogate de tesuturi pe baza de collagen/acid hialuronic acid/poli(ϵ -caprolactona)

Avand in vedere scopul final de a realiza matrici 3D pe baza de collagen pentru modele de laborator (testarea medicamentelor sau surrogate de tesuturi) au fost evaluate structuri 3D hibride care contin polimeri naturali / sintetici (atelocollagen - derivat de acid hialuronic - poli (ϵ -caprolactona)) in ceea ce priveste umflarea (Figura 59), comportamentul la degradare, absorbtia vaporilor de apa (Figura 60) si eliberarea medicamentului (Figura 61), comparativ cu un burete comercial de collagen. Derivatul de poli(ϵ -caprolactona) a fost folosit ca un reticulant si ca un regulator al cineticii de degradare. Derivatul acidului hialuronic poate imbunatati proprietatile biologice si creste caracterul hidrofil dar poate influenta si comportarea materialului final datorita interactiunilor specifice cu proteine si compusi cu incarcare pozitiva. Se considera ca structura hibrida nu numai ca imbunatateste unele caracteristici fizico-chimice si biologice necesare pentru matricea 3D dar poate permite, de asemenea, o livrare controlata a medicamentului inclus, recomandand-o ca model biomimetic de laborator.

Matricile au fost obtinute in conformitate cu diferite protocoale pregatitoare care duc la structuri cu diverse morfologii: liofilizare simpla (structura poroasa); criogelare (structura

macroporoasa); metoda de preparare a vitrigelurilor - vid progresiv la temperatura camerei (film dens).

Dupa cum se poate observa din Figurile 59 si 60, vitezele de absorbtie ale apei si de sorbtie a vaporilor de apa scad odata cu continutul de reticulant PCL, datorita cresterii densitatii de reticulare și a raportului hidrofob/hidrofil in matrice. Exista un interval de continut optim pentru derivatul acidului hialuronic de la 2% la 5%. Acest comportament poate fi atribuit competitiei dintre cresterea hidrofilicitatii si capacitatea de complexare cu collagenul, ducand la o reticulare fizica suplimentara, cu cresterea concentratiei de acid hialuronic.

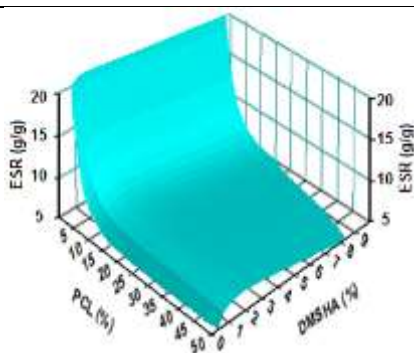


Figura 59. Comportarea la umflare in apa functie de compozitie.

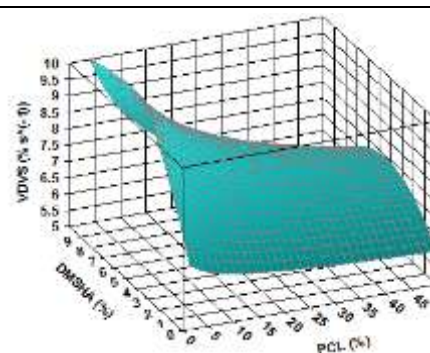


Figura 60. Sorbtia dinamica a vaporilor de apa functie de compozitie

Luand in considerare compozitia, pentru studiul incarcarii/eliberarii de principii active s-au testat 2 modele: albastru de metilen (derivat cationic de fenotiazina, compus hidrofil) si curcumina (nutraceutic, lipofil) (Figura 61). Probele de matrice s-au selectat astfel incat porozitatea sa fie similara.

Intr-adevar, in cazul albastrului de metilen se observa o viteza de eliberare mai mica comparativ cu proba de collagen martor, livrarea fiind controlata de difuzie, fiind astfel dependenta de morfologie si compozitie (Figura 61.a).

In cazul curcuminei, aceasta actioneaza ca un agent de reticulare pentru matricea de collagen, asa cum se poate observa din imaginile SEM pentru matricea de collagen inainte si dupa incarcarea medicamentului (Figura 62), unde ingrosarea peretilor porilor este evidenta, precum și din testele microbiologice la nivel macroscopic (Figura 63). Astfel, matricile 3D incarcate cu curcumina elibereaza componenta activa hidrofoba in principal prin degradare (Figura 61.b). Astfel de matrici pot fi utilizate pentru a studia efectul sinergetic al curcuminei și al altor medicamente. Eliberarea medicamentului poate fi controlata prin varierea compozitiei, gradului de reticulare (inclusiv incarcarea curcuminei), morfologie (rezultata din protocolul de sinteza).

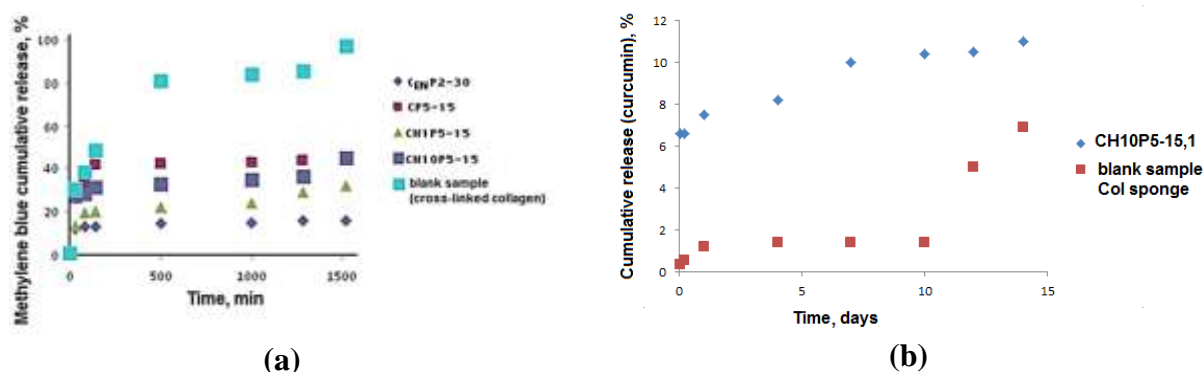


Figura 61. Profilul curbelor de eliberare a medicamentelor model din matricile hibride comparativ cu proba martor de collagen: (a) albastru de metilen; (b) curcumina.

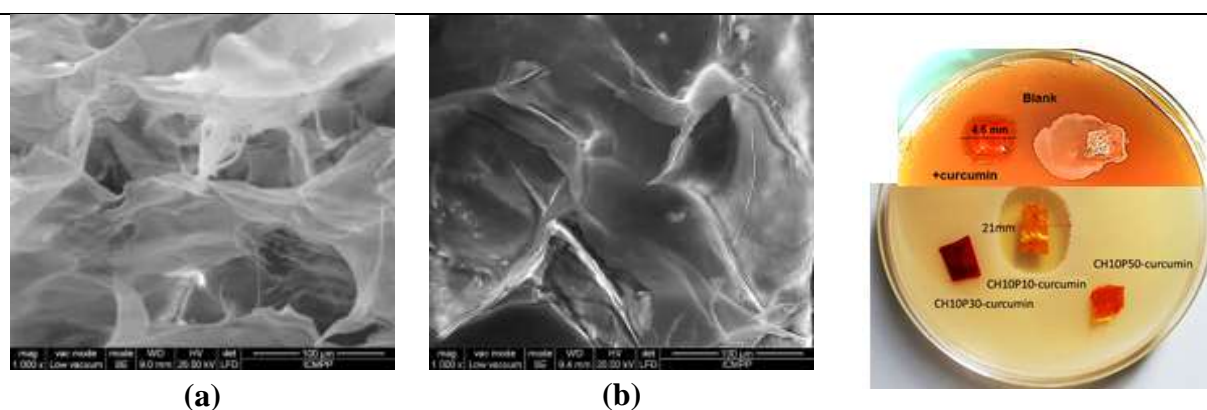


Figura 62. Microfotografii SEM ale probei de collagen (a) inainte si (b) dupa incarcarea cu curcumina.

Figura 63. Teste microbiologice (*Staphylococcus Aureus*)

In concluzie, cresterea tesuturilor poate fi maximizata prin controlul marimii și porozitatii porilor; astfel matricile liofilizate și criogelate sintetizate cu 90-95% porozitate, pori de 80-150 μm , conținand 2-5% pana la maxim 10% derivati de acid hialuronic și cu $\leq 10\%$ PCL-DI, sunt cele mai recomandate materiale pentru utilizare ca suporturi 3D sau modele de laborator pentru investigarea tumorilor.

(C) Surogate de tesuturi pe baza de derivati de celuloza

Patru tipuri de de celuloza, incluzand fulgi de bumbac (CL), microcristalina (CM), pulpa celulozica sulfatata niciodata uscata (CI) și viscoza (CV), au fost testate ca surse potentiale pentru a prepara derivati pe baza de celuloza, care pot fi utilizate ca surrogat pentru testarea bio-medicala. In acest fel, prin utilizarea apei ca solvent, poate fi depasit unul dintre dezavantajele majore ale celulozei native, recalcitranta sa față de solventii obisnuiti. Procedura de derivatizare aleasa implica oxidarea chimica folosind radicalul 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO), hipocloritul de sodiu si bromura de sodiu. Dupa acest tratament, fiecare proba de celuloza a fost prelucrta in asa fel incat sa se maximizeze continutul in fractii solubile în apa. Prin urmare, pentru fiecare tip de celuloza (cu exceptia vascozei), am putut izola trei probe oxidate. Toate aceste probe au fost complet caracterizate folosind analize spectrale (FT-IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN), conținutul gruparilor incarcate negativ si gradul de polimerizare. Morfologia produselor

oxidate a fost evaluata prin microscopie electronica de baleiaj (SEM), iar cristalinitatea a fost evaluata utilizand difractia de raze X (XRD). Au fost efectuate si analize termice pentru probele de celuloza pura si oxidata. Limita solubilitatii in apa pentru fractiile oxidate a fost verificata utilizand microscopia electronica de joasa tensiune (LVEM). Datorita expunerii mai indelungate la mediul oxidativ, ne asteptam la o incorporare mare a grupelor COOH in celuloza, nu numai pe suprafata regiunilor amorfe, dar in interiorul structurii cristaline. Dupa 24 de ore, amestecul de reactie a fost filtrat si supernatantul rezultat a fost precipitat intr-un volum mare de acetona. Precipitatul rezultat a fost supus in continuare purificarii prin dializa și uscare folosind liofilizarea, rezultand prima fractie, denumita fractia I (Figura 61) . Solidul ramas a fost dispersat intr-un volum mare de apa distilata si lasat sub agitare puternica pentru alte 24 de ore. Dupa acest timp, fractia limpede a fost decantata si precipitata in acetona, urmand acelasi procedeu ca si fractia I. In acest fel, a fost izolata o a doua fractie (denumita fractia II). Fractia solida ramasa colectata dupa decantare, a fost spalata in mod repetat cu acetona si apa distilata, uscata sub vid la 40 ° C, rezultand astfel, fractia insolubila in apa, denumita fractia III (Figura 64).

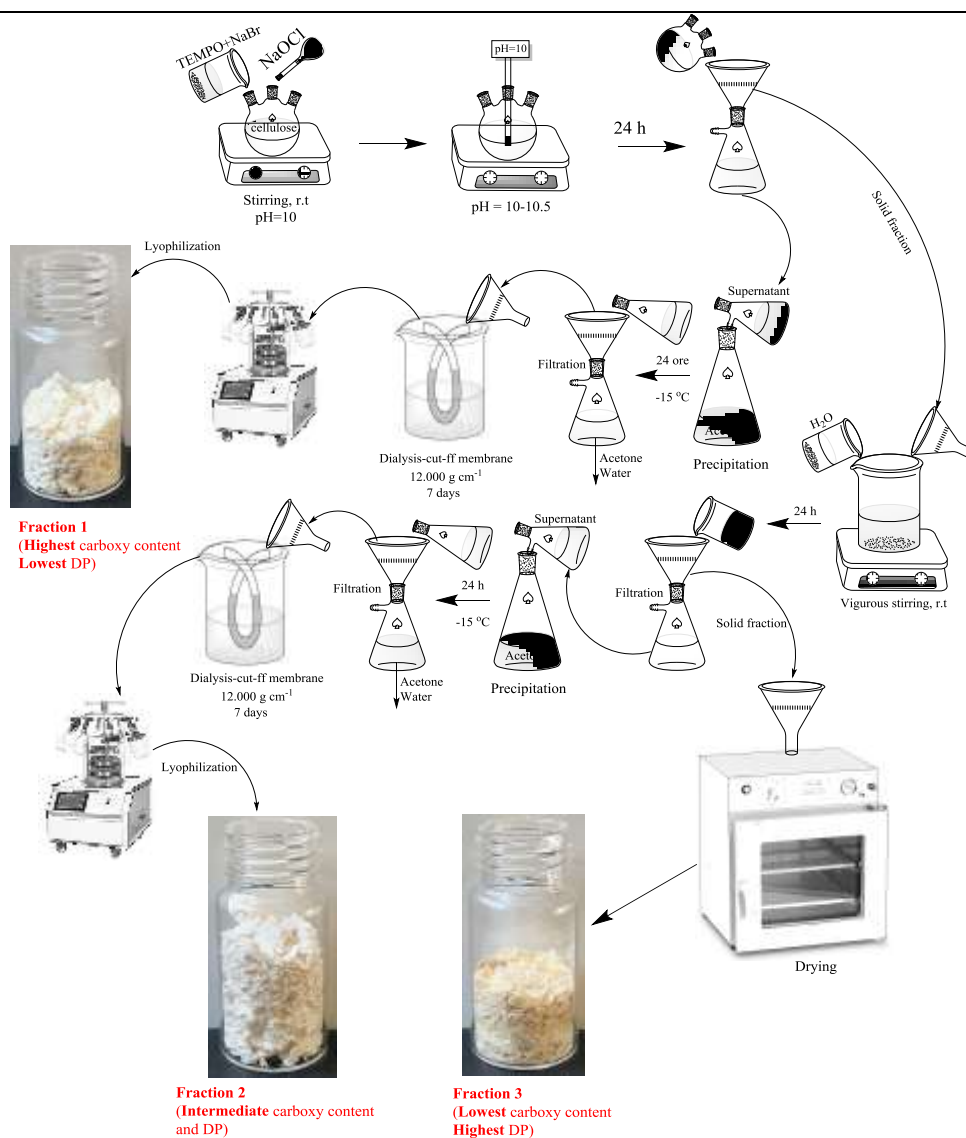


Figura 64. Schema generala pentru ciclul de productie a fractiilor de celuloza oxidata capabile sa actioneze ca surrogate pentru testarea bio-medicala, cu solubilitate diferita in apa.

Randamentele acestor fractii depind in mare masura de sursa de celuloza, variind de la aproximativ 20% în CL la aproximativ 36% în cazul probei CV. Rezultatele sunt in concordanta cu un studiu anterior, atunci cand o proba de nanoceluloza, extrasa din *cladophora sp.* cu cristalinitate de 92% a fost oxidata cu succes de sistemul TEMPO-NaClO-NaBr. Randamentul fractiei 1 este mai mare decat cel al fractiei 2 pentru toate probele de celuloza, cu exceptia CM, cand fractia 2 este izolata intr-o cantitate mai mare, ceea ce se poate datora DP mai mic al materiei prime. DO în ceea ce priveste C6, din fractiile 1, este in toate cazurile 100% ceea ce le confera o solubilitate ridicata in apa, fractiile 2, sunt inca oxidate intr-o proportie mare la C6 (DO mai mare de 80%), facandu-le, de asemenea solubile in apa dar intr-o masura mai mica. Toate fractiile 3 sunt oxidate doar partial la C6, DO fiind in jur de 20%, ceea ce nu este suficient pentru a asigura solubilitatea lor în apa.

(D) Surogate de tesuturi pe baza de curdlan

Curdlanul si derivatii sai sunt polimeri naturali (polizaharide), biocompatibili si biodegradabili ceea ce le confera un potential ridicat de utilizare ca materii prime pentru proiectarea de materiale medicale. De asemenea, pot fi utilizati in prepararea de matrici solide sub diferite forme (hidrogeluri, micro- sau nanoparticule, filme) cu rol de vehicule pentru transportul si eliberarea de principii active sau ca schelet (*scaffold*) pentru ingineria tisulara. In cadrul proiectului au fost obtinute hidrogeluri (HG) cu diferite compozitii prin reticularea covalenta a curdlanului (C) si a curdlanului fosforilat (PC) folosind 1,4-butandiol diglicidil eter (BDDE) ca agent de reticulare, procesul decurgand la temperatura camerei un timp de 48 de ore.

In aceasta etapa au fost efectuate studii privind atat proprietatile mecanice (rezistenta la compresie) cat si studii privind cinetica si mecanismul de eliberare a unui medicament model.

Proprietatile mecanice (testul de compresie)

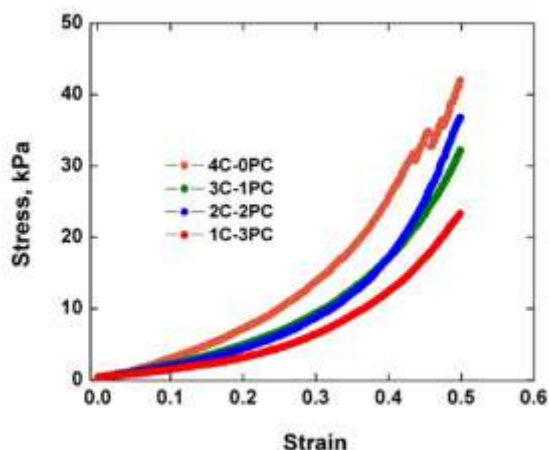
Testul de compresie a fost efectuat pentru a obtine informatii despre comportamentul elastic al hidrogelurilor sintetizate, prin calcularea modulului Young din panta drepte (partea liniara între 5 - 15% din compresie) a curbei tensiune – deformare, folosind un echipament Brookfield Texture PRO CT® (Texture Analyzer). Hidrogelurile cu forma cilindrica (diametru = 20 mm si inaltimea = 7,5 mm) au fost testate imediat dupa purificare, sub compresie uniaxiala pana la 50% deformare, in conditii neconfigurate, la temperatura camerei, cu o celula de incarcare de 4500 g. Modulul elastic (E) a fost calculat cu ecuati:

$$E = \sigma/\varepsilon = F/A \times l_0/\Delta l$$

unde σ – tensiunea de compresie, ε – deformatia, F - forta (N), A – aria sectiunii transversale (m^2), Δl – diferenta de lungime (m), l_0 – lungimea initiala (m).

Pentru toate probele a fost observat un comportament elastic neliniar (Figura 65). De asemenea, s-a observat ca odata cu cresterea componentei ionice (PC) in structura hidrogelului, valorile modulului Young scad de la 35,19 kPa la 13,83 kPa (Tabelul 14), deci hidrogelurile devin elastice. Dupa eliberarea incarcarii, toate esantioanele si-au recuperat forma initiala chiar si dupa trei cicluri de deformare de 50% din inaltimea lor, cu o singura exceptie si anume, esantionul fara continut de PC. In cazul hidrogelului 4C-0PC, au aparut mici fracturi in structura hidrogelului chiar din primul ciclu de incarcare, asa cum se vede in Figura 65. Acesta

comportare a dovedit faptul ca, adaugarea componentei ionice, PC, in procesul de obtinere a hidrogelurilor, conduce la cresterea porozitatii si totodata confera elasticitate hidrogelurilor.



Tabelul 14. Modulul elastic al hidrogelurilor

Cod proba	Modul elastic, kPa	R ²
4C-0PC	35,19	0,998
3C-1PC	21,38	0,996
2C-2PC	18,55	0,996
1C-3PC	13,83	0,995

Figura 65. Curba tensiune-deformare a hidrogelurilor C-PC

Mecanismul de transport al medicamentului

Pentru a studia mecanismul de transport al medicamentului model ales (clorhidratul de tetraciclina –TCH) din hidrogelurile C-PC incarcate, au fost alese diferite modele de difuzie si anume: modelul Ritger-Peppas, modelul de ordin zero, ecuatia Higuchi si modelul Hopfenberg, modele ce au fost considerate a se potrivi cel mai bine cu datele experimentale (Figura 66).

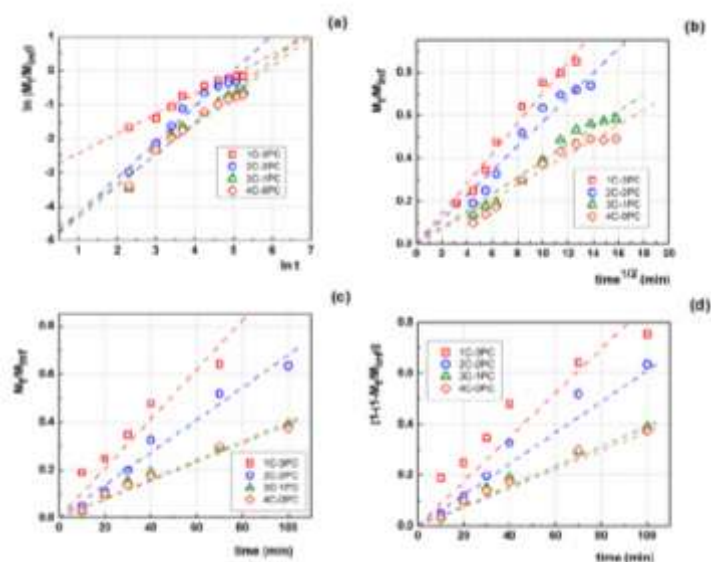


Figura 66. Dinamica de eliberare in PBS la 37 °C (pH 6,8) a tetracilinei din hidrogelurile incarcate C-PC: (a) modelul Ritger–Peppas, (b) modelul Higuchi, (c) modelul de ordin zero si (d) modelul Hopfenberg

Folosind modelul Ritger – Peppas a fost calculata pentru toate sistemele valoarea exponentului n , o marime semnificativa pentru stabilirea mecanismul de transport al medicamentului din structura hidrogelului in mediul apos. Valorile obtinute intre 0,64 si 0,81

(Tabelul 15) indica un mecanism de transport al medicamentului tip non-Fickian (anormal), ceea ce sugerează ca în matricea polimerică procesul de difuzie a medicamentului are loc cu aceeași viteză cu procesul de relaxare a lanțurilor polimerice.

De asemenea, s-a observat că datele experimentale nu s-au potrivit cu ecuația Hopfenberg, confirmând rezultatele obținute în cadrul studiului de stabilitate hidrolitică (date prezentate în etapa din 2019), când nu a fost observată degradarea matricei polimerice după 30 de zile de imersie în PBS, pH = 6,8.

Tabelul 15. Parametrii eliberării TCH din hidrogeluri

Proba	Ritger-Peppas			Zero-order		Huiguchi - Fickian		Hopfenberg	
	$k_{RP} \times 10^2$	n	R ²	k ₀	R ²	k _{HF}	R ²	k _H × 10 ²	R ²
4C-0PC	0,633	0,809	0,9944	0,0040	0,9826	0,0347	0,9599	0,76	0,9826
3C-1PC	0,530	0,811	0,9946	0,0039	0,9784	0,0387	0,9667	0,88	0,9822
2C-2PC	3,025	0,655	0,9749	0,0068	0,9822	0,0570	0,9535	2,134	0,9784
1C-3PC	4,092	0,640	0,9789	0,0103	0,9164	0,0704	0,9794	4,180	0,9606

În concluzie au fost preparate hidrogeluri ionice încărcate cu clorhidrat de tetraciclină prin reticularea chimică a curdlanului și a derivatului său fosforilat cu 1,4 butandiol diglicidil eter. S-a observat că încărcarea și eliberarea medicamentului este influențată de cantitatea de polizaharidă ionică din hidrogeluri.

Abordarea matematică a cineticii de eliberare a indicat faptul că mecanismul de transport al medicamentului a fost un mecanism de difuzie „anormal”, ceea ce înseamnă că în matricea polimerică procesul de difuzie a medicamentului are loc cu aceeași viteză cu procesul de relaxare a lanțurilor polimerice.

De asemenea, creșterea componentei ionice în structura hidrogelului conduce la scăderea valorilor modulului Young. Aceste rezultate sunt utile în dezvoltarea ulterioară a hidrogelurilor ionice pentru sistemele locale de administrare a medicamentelor.

(E) Evaluarea funcționalității matricilor extracelulare la nivelul celulelor cultivate și a surogatelor populate de celule

În ultimii ani, au fost propuse diferite biomateriale care conțin alginat sau poli (etilen glicol) pentru regenerarea țesuturilor, în aplicații precum administrarea de medicamente și tratamentul rănilor^{60,61}. De asemenea, s-a observat că diferite hidrogeluri injectabile termosensibile dezvoltate până în prezent nu au prezentat efecte citotoxice asupra celulelor cultivate și multe dintre aceste geluri au fost propuse pentru diferite aplicații biologice⁶²⁻⁶⁴.

Activitatea are ca scop evaluarea funcționalității unor nanoplatforme nou dezvoltate la nivelul celulelor cultivate și a surogatelor de țesut populate cu celule. Pentru a îndeplini obiectivul acestei activități, s-au efectuat studii *in vitro* pe două linii de celule umane din piele: keratinocite (HaCaT) pentru hidrogelul Alg-SH/ PL-DA și fibroblaste din piele (153BR) pentru CMPox 4.

(E.1.) Evaluarea biologică a hidrogelului Alg-SH/ PL-DA

Metode

Keratinocitele umane din linia HaCaT au fost cultivate în mediu Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) fără fenol red și suplimentat cu 0.45% glucoză, 10% ser fetal bovin și 1% antibiotic și incubate la 37°C într-un incubator cu 5% CO₂ în atmosferă.

Evaluarea viabilității celulare

Testul XTT

Hidrogelul Alg-SH/ PL-DA (prescurtat S1), liofilizat a fost tăiat în piese cu dimensiunea de 2 mm x 2 mm x 1 mm care au fost cântărite (0.98 ± 0.059 mg), plasate în godeurile unei plăci sterile și incubate pentru 48 de ore în mediu de cultură, apoi sterilizate prin expunere la radiație UV timp de 10 minute. Testul de viabilitate XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) a fost folosit pentru a evalua efectul hidrogelului Alg-SH/ PL-DA asupra viabilității și proliferării celulelor HaCaT. Astfel, 5×10^4 celule HaCaT au fost însămânțate într-o placă de 24 de godeuri. Piesele de hidrogel au fost incubate în godeurile populate cu celule HaCaT și incubate la 37°C pentru 24, 48, 72, și 96 de ore, fără schimbarea mediului. Controlul a fost reprezentat de celule cultivate în absența hidrogelului. La finalul fiecărei perioade experimentale, mediul de cultură a fost colectat, iar celulele au fost expuse amestecului XTT- phenazine methosulfate (PMS) în DMEM pentru 3 ore. Absorbanta optică a formazanului format a fost măsurată la 450 nm folosind spectrofotometrul TECAN Infinite M200Pro.

Testarea viabilității celulare cu ajutorul kit-ului Live/Dead

Celulele au fost însămânțate și tratate cum s-a descris anterior. La final, celulele au fost marcate cu calceină AM și iodură de propidiu (PI) (componente ale kit-ului Live/Dead). Ambii coloranți au proprietăți fluorescente, ceea ce a făcut posibilă examinarea celulelor prin microscopie de fluorescență (Microscopul Olympus IX81). Calceina AM marchează celulele vii în verde iar PI le marchează pe cele moarte în roșu.

Cuantificarea nivelurilor secretate ale TNF- α prin citometrie în flux

1×10^5 celule HaCaT/ mL au fost însămânțate pe o placă de 24 de godeuri. După 24 de ore, celulele aderate au fost stimulate timp de 24 de ore cu endotoxine bacteriene- lipopolizaharide (LPS, 100 ng/mL). La finalul expunerii, celulele au fost tratate pentru diferite intervale de timp cu hidrogelul Alg-SH/ PL-DA (0.98 ± 0.059 mg) sau cu precursorii acestuia: Alg-SH (0.238 mg/mL, 12.2% Alg-SH în S1) și PL-DA (1.720 mg/mL, 87.8% PL-DA în S1). Celulele control (netratate) și celulele expuse la agentul anti-inflamator dexametazonă (Dexa, 2.5 μ M) au fost utilizate. Concentrația de TNF- α a fost cuantificată prin Citometrie în flux (Gallios Beckman Coulter).

Analiza imunologică prin tehnica Western blotting

Celulele stimulate cu LPS și incubate cu hidrogelul, precursorii săi și cu Dexa au fost supuse lizei celulare cu tamponul RIPA (radio immune-precipitation assay buffer). Cantitatea totală de proteină a fost determinată prin metoda BCA. Ulterior, diferite volume de lizat (50 μ g de proteină) au fost încărcate în godeurile unui gel SDS-PAGE. Proteinele au fost separate,

transferate pe o membrană de nitroceluloză și supuse blocării pentru o oră cu 1% BSA. Membranele au fost incubate peste noapte cu anticorpii primari: rabbit anti-NF- κ B și rabbit anti-fosfo- extracellular signal-regulated kinases (ERK), mouse anti-total ERK, și β -actină. Detecția imunologică a fost realizată cu ajutorul anticorpilor secundari conjugați cu HRP (anti-rabbit IgG și anti-mouse IgG) și cu substratul chemiluminescent ECL. Imaginile de Western blotting au fost achiziționate cu analizorul de imagine G: Box Chemi XX6 System analyzer.

Rezultate

Evaluarea viabilității celulare

Testul XTT a evidențiat că hidrogelul Alg-SH/ PL-DA (S1) nu este citotoxic și componentele eliberate în mediul de cultură promovează proliferarea celulară într-o manieră dependentă de timp (Figura 67).

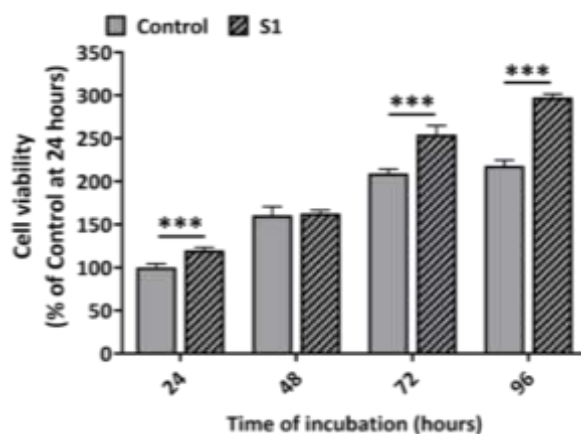


Figura 67. Viabilitatea celulelor HaCaT incubate cu mediu de cultură (control) sau mediu care conține hidrogelul Alg-SH/PL-DA (S1). Rezultatele au fost exprimate ca procent (%) din celulele control. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Din imaginile de microscopie de fluorescență, obținute după marcarea celulelor folosind kittul live/dead, s-a observat că hidrogelul și precursorii săi nu afectează viabilitatea keratinocitelor activate în prealabil cu LPS (Figura 68).

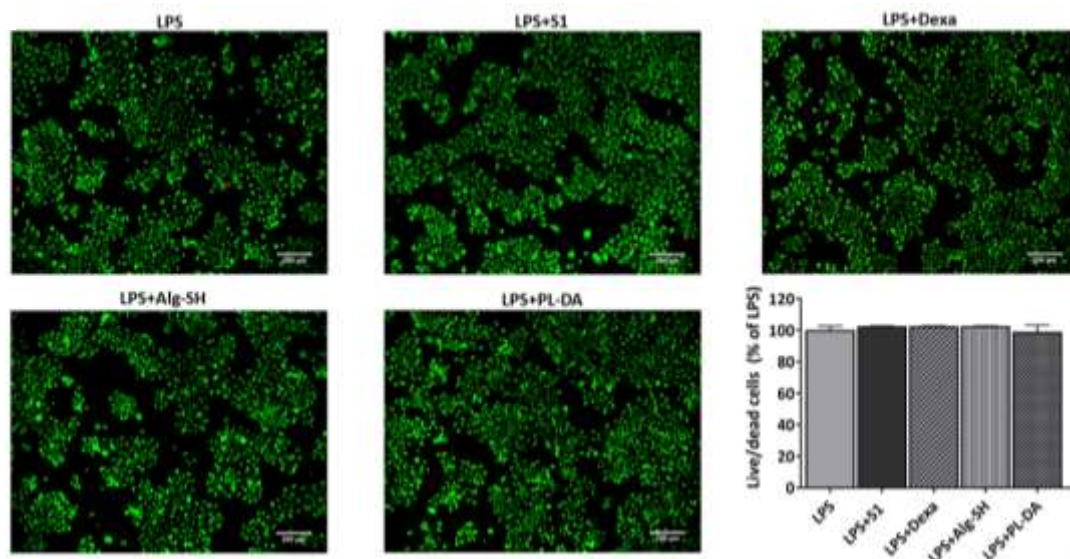


Figure 68. Suprapunerile imaginilor obținute din colorația cu calceină-AM (verde) și PI (roșu) și graficul care evidențiază viabilitatea celulară exprimată ca procent de celule vii/celule moarte. Scale bar: 200 μm.

Potențialul anti-inflamator al hidrogelului Alg-SH/ PL-DA

Hidrogelul prezintă efect anti-inflamator crescut, manifestat prin scăderea nivelurilor bazale ale TNF- α , ca rezultat al eliberării componentelor Alg-SH și PL-DA (Figura 69).

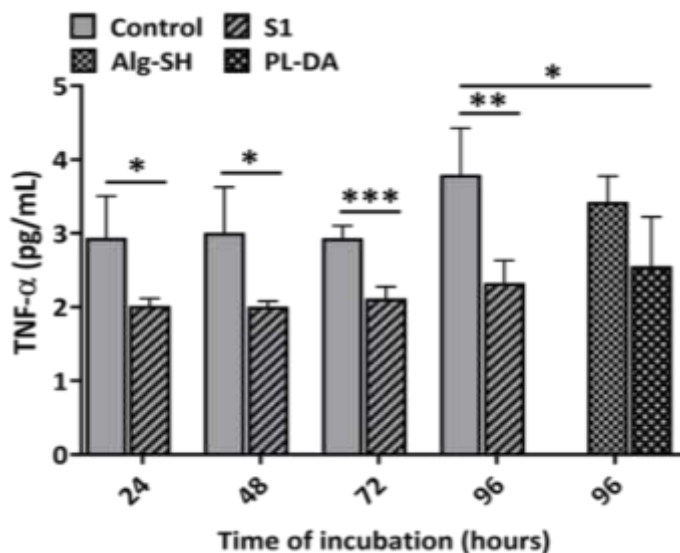


Figure 69. Nivelurile bazale ale factorului de necroză tumorală (TNF)- α eliberate de celulele HaCaT. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

De asemenea, hidrogelul reduce efectul pro-inflamator al LPS prin scăderea concentrației eliberate de TNF- α , a expresiei formei fosforilate a kinazei ERK și a nivelului factorului nuclear NF- κ B (Figura 70).

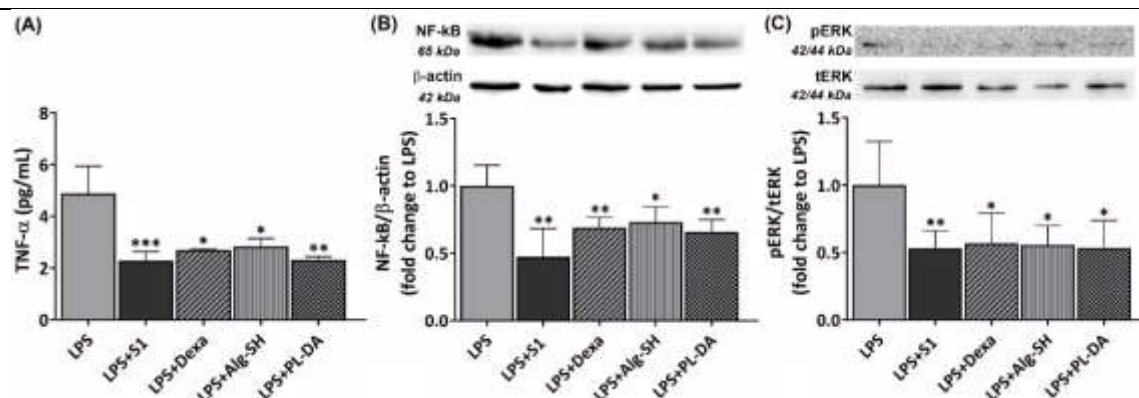


Figura 70. Nivelurile factorului de necroză tisulară (TNF)- α (A) în mediul de cultură. Expresia proteică a factorului nuclear (NF)- κ B (B) și a formei fosforilate a kinazei ERK (C). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ versus LPS.

E.2. Evaluarea biologică a hidrogelului termosensibil pe bază de pullulan grefat cu poloxamer 407 (CMPox 4)

Metode

Cultura celulară utilizată în studiu

Fibroblastele umane izolate din piele (linia celulară 153BR achiziționată de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC 90011808), Sigma-Aldrich Co.) au fost cultivate în Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplimentat cu 0,45% glucoză, 10% ser fetal bovin, și 1% penicilină și streptomycină (100 U / ml). Celulele au fost crescute pe plăci Petri sterile (plăci de cultură TPP®) și menținute la 37 ° C într-un incubator cu 5% CO₂. Celulele 153BR confluențe au fost subculturate la fiecare 2-3 zile în urma detașării de la suportul de plastic prin tratamentul cu 0.25% tripsină / 0.5 mM EDTA.

Studiul viabilității celulare

Efectul hidrogelului **CMPox 4** asupra viabilității fibroblastelor umane din piele a fost determinat folosind testul XTT. 5×10^4 fibroblaste/ mL au fost însămânțate într-o placă de cultură cu 96 de godeuri și incubate la 37 ° C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂. După 24 de ore, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de **CMPox 4**, variind de la 0.3125 până la 10 mg / mL și incubate în continuare timp de 24 și 48 de ore. La fiecare moment experimental, celulele netratate au fost utilizate ca martor. La sfârșitul timpului de incubație, celulele au fost spălate de două ori cu tampon fosfat salin (PBS) și incubate cu 100 μ L XTT și PMS în DMEM fără roșu fenol pentru 2 ore. Absorbanta derivatului de formazan solubil a fost măsurată la 450 nm folosind cititorul de plăci Tecan Infinite M200. Rezultatele au fost exprimate ca procent din celulele netratate (martor) la 24 de ore, care a fost considerat 100%.

Studiul citotoxicității

Pentru a evalua citotoxicitatea **CMPox 4** asupra fibroblastelor umane din piele, s-a efectuat testul de colorare a celulelor vii / moarte. Fibroblastele au fost însămânțate la o densitate celulară de 5×10^4 celule / mL în plăci cu 96 de godeuri și incubate în prezența hidrogelului timp de 24 și 48 de ore. Apoi, monostratul de fibroblaste a fost spălat de două ori cu PBS și apoi incubat la 37 ° C cu amestec de calceină-AM și iodură de propidiu (PI) timp de 10 minute.

Celulele viabile vor emite o fluorescență verde ca urmare a colorării cu calceină-AM, în timp ce celulele moarte vor fi colorate de iodură de propidiu (PI) și vor emite fluorescență roșie. Imaginile au fost înregistrate folosind microscopul inversat Olympus IX81 echipat cu filtre de fluorescență pentru fluorescența verde și roșie.

Studii in vitro de evidențiere a morfologiei celulare

Pentru a examina morfologia fibroblastelor control și a celor tratate cu CMPox 4, imagini în contrast de fază au fost preluate cu microscopul Olympus IX81. Studiul a constatat în incubarea celulelor stimulate cu LPS cu diferite concentrații de CMPox 4 pentru 24 și 48 de ore.

Analiza statistică

Datele sunt raportate ca medie \pm deviație standard (SD) a trei experimente independente diferite, utilizând software-ul GraphPad Prism 7. Diferențele, calculate cu ajutorul testului t-Student, au fost considerate relevante statistic atunci când $p < 0.05$.

Rezultate

Evaluarea viabilității celulare

Testul XTT a fost efectuat pe fibroblaste din piele tratate cu diferite concentrații de polimer (0.3125 ÷ 10 mg/mL) timp de 24 și 48 de ore și comparat cu celulele de control, netratate (Figura 71). Rezultatele arată că, la concentrații cuprinse între 0.3125 și 2.5 mg/mL, hidrogelul promovează proliferarea fibroblastelor la 48 de ore comparativ cu 24 de ore (cu ~ 60% pentru 0.3125 mg/mL, ~ 55% pentru 0.625 mg/mL, ~ 35% pentru 1.25 mg/mL și ~ 25% pentru 2.5 mg/mL, $p < 0,001$). Această tendință a fost observată și în cazul celulelor control după 48 de ore (~ 40%, $p < 0,001$) comparativ cu controlul de la 24 de ore, totuși, proliferarea celulară a fost mai mică comparativ cu celulele tratate cu 0.3125 mg/mL și 0.625 mg/mL soluții polimer. La 24 de ore, soluția de 1.25 mg/mL CMPox 4 nu afectează viabilitatea celulelor testate în comparație cu celulele martor corespunzătoare, în timp ce la 2.5 mg/mL hidrogelul reduce viabilitatea celulară cu ~ 30% ($p < 0.001$). La concentrații de CMPox 4 egale sau mai mari de 5 mg/mL, viabilitatea celulară a scăzut semnificativ. Astfel, viabilitatea a fost sub 20% pentru soluția de concentrație 5 mg/mL și sub 5% pentru 10 mg/mL atât la 24, cât și la 48 de ore, comparativ cu celulele martor.

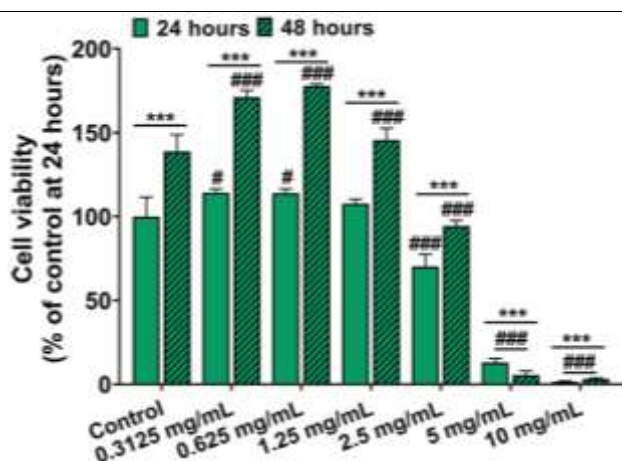


Figura 71. Viabilitatea fibroblastelor umane din piele după tratamentul cu CMPox 4. *** $p < 0.001$ pentru compararea 24 ore vs 48 ore și # $p < 0.05$, #### $p < 0.001$ față de celulele control la 24 de ore.

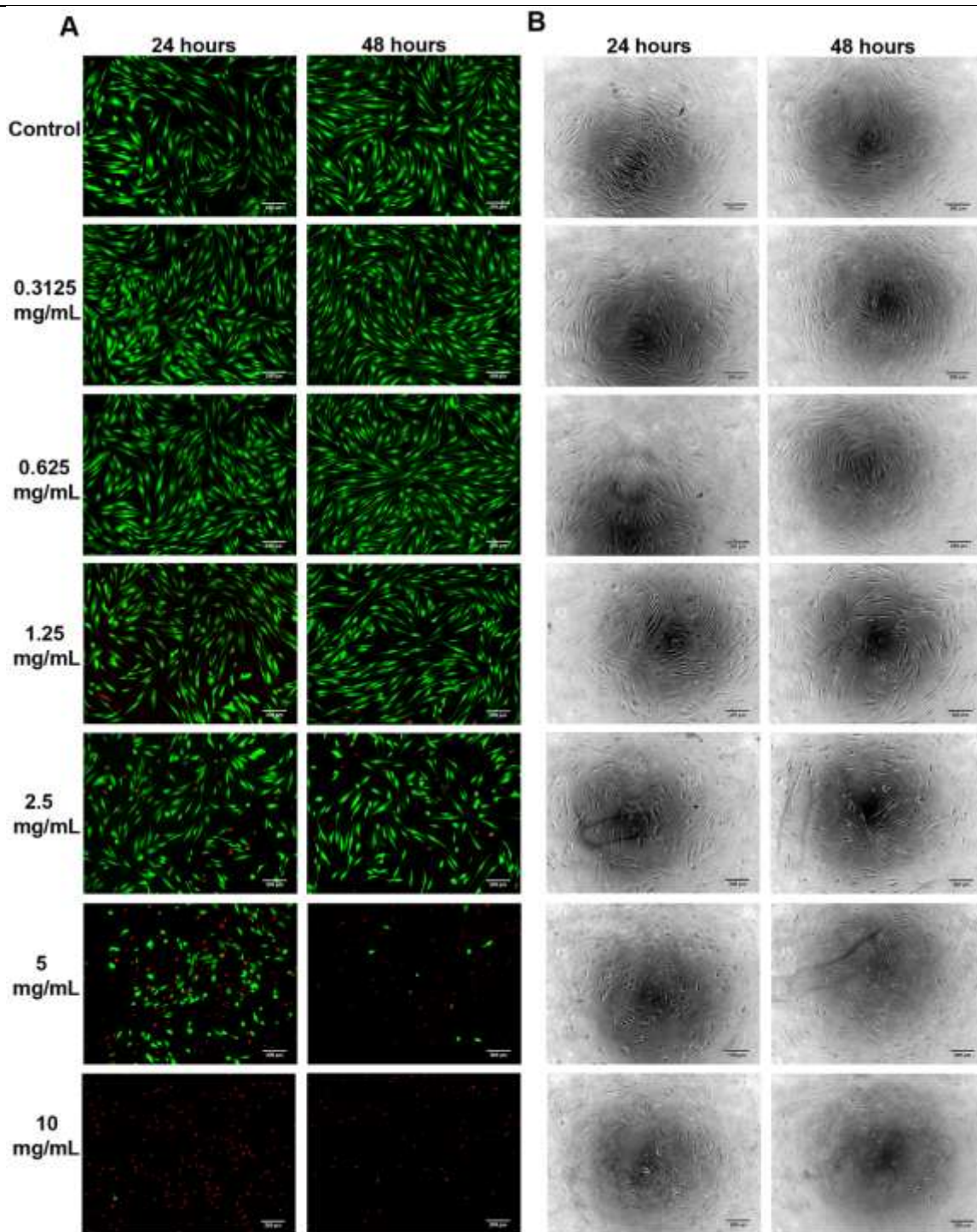


Figura 72. Suprapunerea imaginilor de fluorescență rezultate din marcarea celulelor cu calceină-AM (verde) și iodură de propidiu (roșu) (A) și imagini de microscopie în contrast de fază pentru evidențierea morfologiei celulare (B) a fibroblastelor expuse la diferite concentrații de polimeri. Bara de scalare: 200 μm . Colorația Calceină AM/ PI pentru fibroblastele tratate cu 1.25 și 2.5 mg/mL CMPox 4. Scale bar: 200 μm .

Rezultatele testului XTT au fost susținute de imaginile obținute din colorația Live/Dead (Figura 72.A) și de imaginile în contrast în fază prin care s-a realizat evaluarea morfologiei celulelor (Figura 72.B). Prin urmare, se poate observa că CMPox 4 nu este citotoxic atunci când concentrația de polimer a fost de maxim 1.25 mg/mL. În acord cu rezultatele viabilității, se poate observa o ușoară citotoxicitate atunci când celulele sunt tratate cu soluții în care concentrația de polimer este de 2.5 mg/mL. Expunerea celulelor la concentrații mai mari sau egale cu 5 mg/mL polimer determină un efect citotoxic crescut, mai mult la concentrația maximă de 10 mg/mL aproape nici o celulă viabilă nu a putut fi detectată.

Concluzii

1. Noul hidrogel pe bază de alginat și PL-DA promovează proliferarea keratinocitelor într-o manieră dependentă de timp și diminuează inflamația prin scăderea nivelurilor de TNF- α de către celulele stimulate cu LPS, printr-un mecanism care implică inhibarea fosforilării extracelular signal-regulated kinases (ERKs) și reducerea factorului de transcriere NF-kB.

2. Hidrogelul injectabil pe bază de pullulan grefat cu Poloxamer 407 (CMPox 4) exercită un efect pro-proliferativ asupra fibroblastelor din piele la concentrații cuprinse între 0.3125 ÷ 1.25 mg/mL și manifestă citotoxicitate marcantă la concentrații mai mari. În plus, hidrogelul nu modifică morfologia fibroblastelor la concentrații non-citotoxice. Astfel, noul polimer pe bază de pullulan grefat cu poloxamer 407 este citocompatibil și poate fi utilizat ca biomaterial în tehnologia cartilajului pentru tratamentul bolilor degenerative ale articulațiilor.

A.3.5 - Studiul preliminar al funcționalității nanoplatformelor în ansamblu

Introducere

Cele mai folosite două sisteme de cultură pentru testarea medicamentelor anti-tumorale sunt suportul convențional de creștere în două dimensiuni (2D) și modelele tumorale în trei dimensiuni (3D), care includ sferoizii, multistraturile celulare, culturile încorporate în matrice, bioreactoarele și dispozitivele microfluidice. În ciuda rezultatelor neconcludente cu privire la acțiunea diferitelor medicamente în diferite cancere umane, cultura de celule 2D rămâne cea mai utilizată în stadiile incipiente de screening și testare a medicamentelor. Deși dezvoltarea sistemelor 3D implică costuri mari, complexitatea lor a limitat utilizarea suporturilor 2D pentru screening-ul medicamentelor și a redus semnificativ efectuarea de studii pe animale de laborator^{65,66}.

În această activitate, un hidrogel pe bază de acid hialuronic (HA) și poli (metil vinil eter-alt-acid maleic) (G) și anume HA³P50 (unde „3” este concentrația ambilor polimeri (% greutate / volum) în amestecul inițial și „50”, conținutul în P (MVE-alt-MA) (% greutate / greutate)), sintetizat și furnizat de echipa parterului P3 coordonată de Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin, a fost evaluat ca suport 3D pentru creșterea celulelor de carcinom hepatic (HepG2) și pentru a obține surrogate tumorale pentru studii ulterioare de screening de medicament. Capacitatea hidrogelului de a promova adeziunea celulelor HepG2 a fost examinată printr-o metodă de numărare a celulelor și analizată prin microscopie de baleaj (SEM). În plus, citocompatibilitatea hidrogelului a fost investigată pe o perioadă de 21 de zile prin trei metode diferite (anume: testul XTT, testul de citotoxicitate ToxiLight și colorația Calceină AM/ PI).

Metode

Cultura celulară utilizată în acest studiu

Linia celulară de carcinom hepatocelular uman (HepG2) a fost achiziționată de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, SUA). Pentru cultura de celule 2D, celulele HepG2 au fost cultivate în mod obișnuit în plăci de cultură alcătuite din polistiren în Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplimentat cu 0.45% glucoză, 10% (v/v) ser fetal bovin (FBS), 100 unități/mL penicilină, și 100 unități/mL streptomycină și au fost menținute la 37 °C într-un incubator cu atmosferă umidificată având 5% CO₂ în aer. Pentru subcultivare, celulele au fost tripsinizate utilizând o soluție de tripsină 0.25% cu 0.5 mM EDTA, conform protocoalelor ATCC. În experimente, suporturile 2D formate din plăci de cultură cu 24 de godeuri (diametru = 15.6 mm) au fost însămânțate cu celule HepG2 la o densitate de 2.5×10^5 celule / godeu.

Cultura celulară 3D a fost stabilită după cum urmează. Hidrogelul ales pentru evaluarea biologică a fost HA³P50, unde „3” este concentrația ambilor polimeri (% g/v) în amestecul inițial și „50”, conținutul de P(MVE-alt-MA) (% g/w). Hidrogelul HA³P50 liofilizat de au fost tăiate sub stereomicroscop (aprox. 2 mm × 2 mm × 1 mm) și apoi piesele au fost cântărite și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 3 minute pe fiecare parte. Fără nicio procedură de spălare, hidrogelurile au fost populate cu celule HepG2 la o densitate celulară de 2.5×10^5 celule/suport 3D prin spotarea a 10 μL suspensie celulară.

Evaluarea adeziunii celulare

Metoda de numărare a celulelor

Testul de adeziune celulară a fost adaptat după Deng și colab⁶⁷. Celulele HepG2 au fost însămânțate în suporturi 2D și 3D așa cum s-a descris mai sus și au fost incubate timp de 4 și 24 de ore la 37 °C. Apoi, hidrogelurile au fost mutate cu grijă în godeuri noi, spălate de 3 ori cu PBS (pH = 7.4) pentru a îndepărta celulele neaderate, scufundate într-o soluție conținând 0.25% tripsină și 0.5 mM EDTA și plasate în incubator la 37 °C timp de 10 minute. Celulele eliberate au fost sedimentate (centrifugare 5 minute, 4°C, 1050 rpm), colorate cu Tripian blue și numărate folosind hemocitometrul și un microscop optic în câmp luminos. Celulele însămânțate pe suporturi 2D au fost, de asemenea, supuse procedurii de spălare cu PBS, tripsinizării, testului de excludere cu Tripian blue și numărării. Numărul de celule aderate a fost normalizat la aria celor două suporturi 2D și 3D. Aria (A) a suporturilor 2D și 3D a fost calculată conform ecuațiilor 5 și 6:

$$A_{2D} = \pi r^2 \quad (5)$$

$$A_{hidrogel} = 2 (L \times l + L \times h + l \times h) \quad (6)$$

unde L, l și h sunt lungimea, lățimea și respectiv înălțimea, π este 3,141 și r este raza godeului plăcii de cultură. Două experimente independente de adeziune celulară au fost efectuate în duplicat.

Evaluarea adeziunii și morfologiei celulare prin microscopie SEM

Morfologia celulelor HepG2, precum și adeziunea și răspândirea lor în hidrogelul HA³P50 au fost investigate pe durata a 21 de zile folosind tehnica ESEM (Quanta 200). La sfârșitul fiecărei perioade experimentale, hidrogelurile populate cu celule au fost relocalate în

godeuri noi, spălate de două ori cu PBS, fixate în 4% PFA timp de 90 de minute și supuse procedurilor de preparare a probelor pentru SEM.

Evaluarea citotoxicității

Testul XTT

Viabilitatea celulelor HepG2 crescute în hidrogelul HA³G50 a fost investigată cu testul colorimetric XTT. 2.5×10^5 celule HepG2 au fost însămânțate în hidrogeluri HA³P50 și pe suporturi 2D și au fost incubate la 37 °C, timp de 1 zi (D1, luată ca control), 7 zile (D7), 14 zile (D14) și 21 de zile (D21). La 24 de ore după însămânțare (D1), hidrogelurile au fost mutate în godeuri noi și mediul de cultură a fost reîmprospătat la fiecare 2-3 zile. Hidrogelurile populate cu celule au fost examinate după înlocuirea mediului prin microscopie optică în camp luminos (microscop ZEISS). La fiecare timp experimental, hidrogelurile și suporturile 2D populate cu celule au fost spălate cu PBS și apoi incubate cu un amestec de 250 μl conținând XTT - PMS în DMEM incolor, timp de 3 ore la 37 °C. Intensitatea culorii portocalii a formazanului în mediu a fost cuantificată spectrofotometric prin măsurarea absorbanței la 450 nm. Rezultatele au fost exprimate ca procent de valori obținute din celule însămânțate pe suporturi 2D incubate timp de 24 de ore (D1) și normalizate la A_{hidrogel} și, respectiv, A_{2D} .

Testul de citotoxicitate ToxiLight

În acest caz s-a utilizat kitul ToxiLight™ BioAssay. Metoda este concepută pentru a măsura eliberarea enzimei adenilat kinaza (AK) eliberată în mediu de către celulele moarte. Nivelurile de AK au fost măsurate în mediul colectat în prima zi (D1) și în ziua 21 (D21) după însămânțarea celulelor în hidrogeluri HA³P50 și pe plăcile cu 24 de godeuri (suporturi 2D) la o densitate de 2.5×10^5 celule HepG2/ hidrogel sau suport 2D. La fiecare moment, celulele au fost supuse lizei cu tamponul RIPA, sonicate și centrifugate la 10.000xg, la 4 ° C, timp de 10 minute. Conținutul total de proteină (mg/ mL) a fost evaluat prin metoda colorimetrică BCA și a fost utilizat pentru normalizarea rezultatelor.

Testarea citotoxicității cu kit-ul Live/Dead

De asemenea, s-a folosit o altă metodă pentru a investiga citotoxicitatea potențială a hidrogelului HA³P50, și anume testul de colorare a celulelor vii/moarte. Celulele HepG2 au fost însămânțate la aceeași densitate (2.5×10^5 celule) atât în hidrogelul HA³P50 (3D) cât și pe suportul 2D. După cultivarea timp de 1 zi și 21 de zile, celulele crescute atât în 3D, cât și în 2D au fost colorate folosind kitul de colorare dublă a celulelor vii și a celor moarte (Live/Dead staining kit) în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Astfel, celulele viabile sunt colorate de calceină-AM, emitând o puternică fluorescență verde, în timp ce celulele moarte sunt colorate de iodură de propidiu (PI) și emit fluorescență roșie. O serie de imagini au fost achiziționate cu funcția Z-stacking a microscopului Olympus IX81 echipat cu filtre de fluorescență pentru a detecta fluorescența verde și roșie. Imaginile de reconstrucție 3D au fost generate utilizând software-ul Image J (dezvoltat la National Institutes of Health (NIH), SUA) pentru a oferi o reprezentare 3D a viabilității celulare și a infiltrării celulelor în hidrogel.

Analiza statistică

Toate rezultatele sunt raportate ca medie \pm deviație standard. Evaluarea statistică a fost efectuată prin testul “unpaired Student’s t-test (two tailed)” utilizând soft-ul GraphPad Prism 7. Diferențele au fost considerate relevante statistic atunci când $p < 0.05$ și statistic foarte relevante atunci când $p < 0.001$.

Rezultate

Biocompatibilitatea in vitro a hidrogelului HA³P50

Pentru a evalua biocompatibilitatea hidrogelului HA³P50, celulele HepG2 au fost însămânțate în hidrogel; apoi, aderența și viabilitatea celulelor au fost investigate în timp. Efectul hidrogelului HA³P50 asupra morfologiei și aderenței celulelor HepG2 a fost investigat prin SEM. Schema experimentală și imaginea stereomicroscopică a hidrogelului liofilizat HA³P50 achiziționată cu stereomicroscopul Zeiss.

Testul de adeziune celulară

Adeziunea celulelor HepG2 pe HA³P50 a fost investigată printr-o metodă de numărare a celulelor la 4 și 24 de ore după însămânțare. Deși celulele HepG2 aderă la hidrogelul HA³P50 la 4 ore după însămânțare, numărul de celule aderate la hidrogel este semnificativ mai mic comparativ cu numărul celulelor aderate la suportul 2D (aproximativ 33%, $p < 0.01$). Cu toate acestea, raportul dintre numărul de celule recuperate din hidrogel la 24 și 4 ore este aproximativ același ($= 1.4$) atât pentru hidrogel cât și pentru suportul 2D (Figura 73). Astfel, celulele HepG2 proliferază rapid în intervalul de timp de 4-24 ore, fie pe suport 2D, fie pe hidrogel HA³P50 (Figura 73). Imaginile de microscopie optică ale hidrogelurilor populate cu celule, achiziționate în ziua 1 și ziua 21 (Figura 73) arată prezența unor grupuri mici și individuale de celule care au aderat la fibrele HA³P50 la D1 (săgeți galbene), în timp ce după 21 de zile de la cultivare, celulele proliferază conducând la formarea clusterilor celulari (pătratul roșu). Aderarea celulelor HepG2 la hidrogel poate fi rezultatul atașării la resturile de HA din fibrele hidrogelului. S-a arătat, de asemenea, că adeziunea hepatocitelor la o matrice de chitosan este cescută atunci când în compoziția acesteia se adăugă acid hyaluronic (HA)⁶⁸. Aceste date indică faptul că HA³P50 este un suport 3D non-citotoxic pentru celulele HepG2, asigurând interacțiunea și proliferarea celulară.

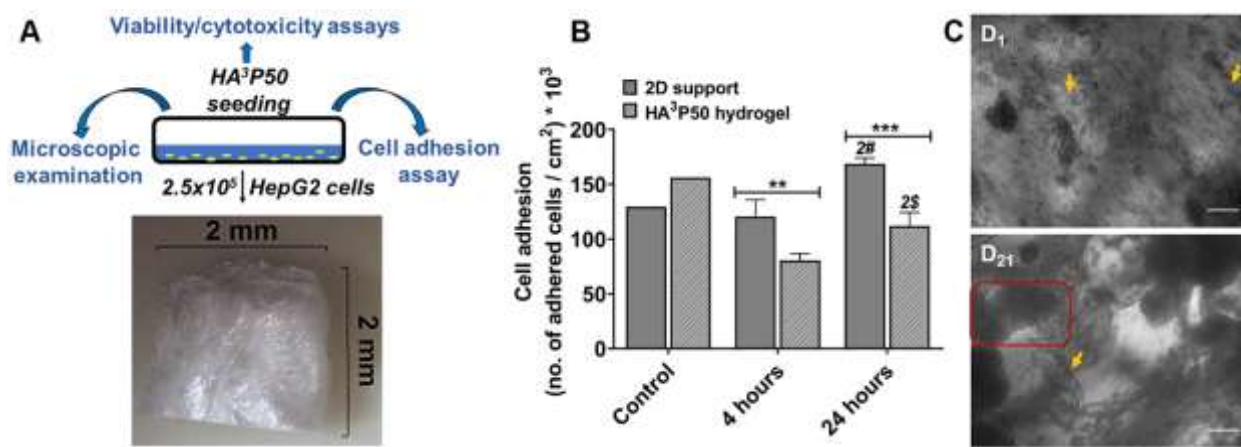


Figura 73. (A) Reprezentarea schematică a procedurii experimentale. (B) Numărul de celule HepG2 însămânțate pe suportul 2D și hidrogelul HA³P50 la doi timpi experimentali (4 și 24 de ore). Datele sunt raportate ca medie ± SD. „Controlul” reprezintă numărul de celule însămânțate normalizat la aria suportului 2D și a hidrogelului 3D. 2 # $p < 0.01$ când se compară 2D la 24 de ore versus 4 ore, 2 \$ $p < 0.01$ pentru hidrogelul HA³P50 la 24 de ore versus 4 ore, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$ pentru hidrogelul HA³P50 față de suportul 2D la 4 ore și, respectiv, 24 de ore. (C) Imaginile de microscopie optică ale hidrogelurilor populate cu celule, realizate în ziua 1 și în ziua 21. Celulele individuale pot fi văzute ca puncte mici (săgeți galbene), în timp ce în ziua 21 de cultivare a celulelor, se observă clusteri mari de celule (pătrat roșu). Scale bar: 200 μm .

Examinarea morfologiei celulare

Pentru a investiga atașarea celulelor la fibrele de hidrogel și răspândirea lor în porii hidrogelului, celulele HepG2 au fost însămânțate pe hidrogelul HA³P50 și incubate la 37 °C timp de 1, 7, 14 și 21 de zile. Analiza SEM a evidențiat atașarea celulelor la fibrele de hidrogel la 24 de ore după însămânțare (Figura 74, săgeata galbenă). Ulterior au loc proliferarea celulară în structura HA³P50 și formarea clusterilor celulari (Figura 74, pătrat roșu). Celulele au fost observate atât la suprafață, cât și în porii interiori ai hidrogelului. Mai mult, clusterii de celule din aranjamentul asemănător unui șirag de mărgele au fost atașate ferm la fibrele hidrogelului, distribuite omogen în interiorul hidrogelului și au proliferat în porii interiori hidrogelului HA³P50 într-o manieră dependentă de timp, indicând absența produșilor de degradare toxici.

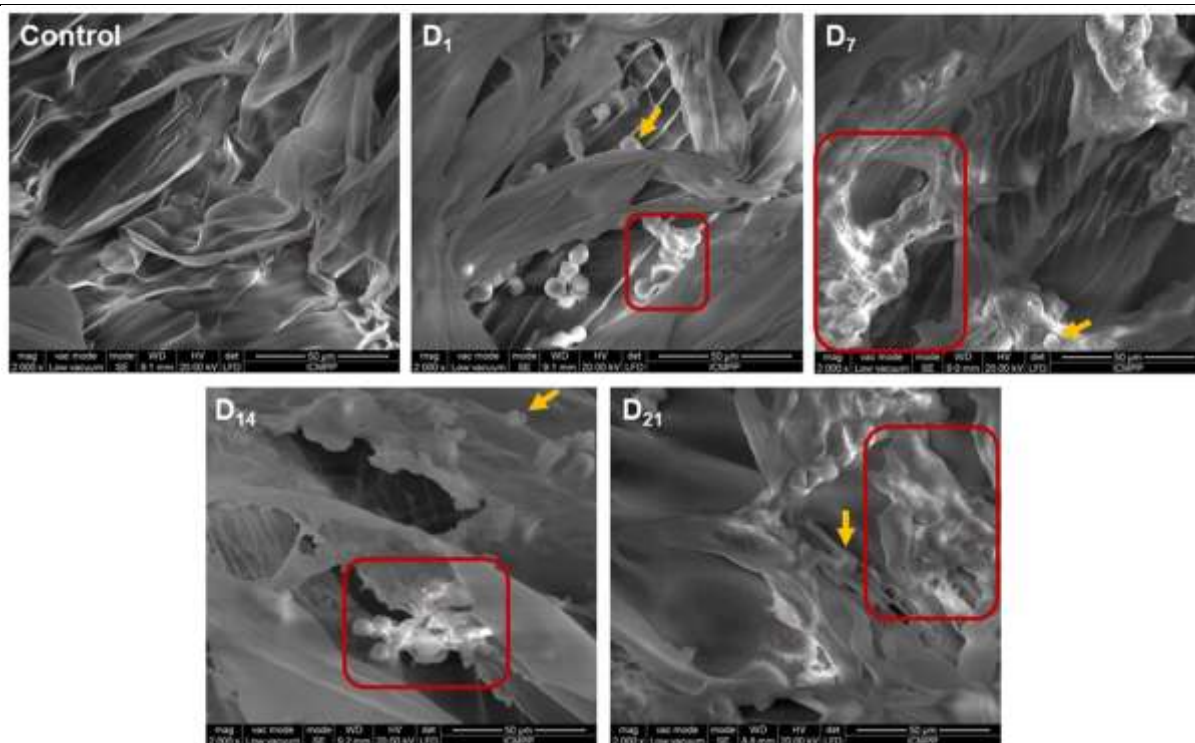


Figura 74. Imaginile SEM ale hidrogelului HA³P50 populat cu celule HepG2 la 1 zi (D1), 7 zile (D7), 14 zile (D14) și 21 de zile (D21) după însămânțare. Săgețile galbene indică celulele aderate la fibrele hidrogelului, în timp ce pătratele roșii descriu formarea clusterilor celulari. Scara: 50 μm.

Evaluarea viabilității/ citotoxicității celulare

Efectul hidrogelului HA³P50 asupra viabilității celulelor HepG2 a fost investigat cu ajutorul testului XTT și confirmat folosind alte două teste folosite pentru evidențierea citotoxicității, ToxiLight bio-assay și colorarea celulelor vii și a celor moarte (Live/Dead assay) (Figura 75). S-a observat că hidrogelul HA³P50 reduce semnificativ viabilitatea celulelor HepG2 cultivate la 24 de ore după însămânțare (44%, $p < 0,001$) în comparație cu suportul 2D (Figura 75.A). Acest rezultat este în acord cu testul de adeziune celulară și este susținut și de testul de citotoxicitate, care a evidențiat concentrații crescute ale enzimei AK în mediul celulelor HepG2 cultivate în hidrogelul HA³P50 (Figura 75.B) și, de asemenea, de testul live/dead (Figura 75.C) și de procentul scăzut al celulelor vii calculat prin intermediul acestui test (Figura 75.D). O posibilă explicație a diferenței în viabilitatea celulelor între suporturile 3D și 2D ar putea fi că, în primele 24 de ore, celulele aderă mai întâi la fibrele hidrogelului, care sunt situate la o anumită distanță pentru a forma porii, iar numărul de celule aderente este mai mic în comparație cu cel al suportului 2D care are întreaga suprafață disponibilă pentru aderarea celulelor (1.9 cm²). În plus, precursorii nepolimerizați nespălați înainte de însămânțarea celulelor pot influența viabilitatea celulelor în primele 24 de ore după însămânțare. Cu toate acestea, am putut observa că proliferarea celulară la 7, 14 sau 21 de zile este mai mare în 3D față de 2D și în comparație cu ziua 1 (Figura 75.A), sugerând că celulele formează o rețea în hidrogel. Astfel, hidrogelul HA³P50 promovează proliferarea celulelor HepG2 la 7 zile după însămânțare (D7) comparativ cu D1 (creșterea proliferării celulare este de ~ 60%, $p < 0,001$) (Figura 75.A). După cum se observă în imaginile SEM, numărul clusterilor celulari este crescut. Pe de altă parte, viabilitatea celulelor HepG2 însămânțate pe suportul 2D a scăzut semnificativ la D7 comparativ cu D1 (~ 20%, $p < 0,001$), reflectând probabil suprapopularea celulară pe suprafața de plastic disponibilă;

formarea clusterilor și detașarea celulară, în absența subcultivării celulare, recomandată la fiecare 3-5 zile. La D14, viabilitatea celulelor HepG2 a fost semnificativ mai mică pentru ambele condiții de cultivare în comparație cu D7, fiind observat un procent similar de reducere (~ 40%, $p < 0,001$ versus D7) (Figura 72.A). Acest rezultat este de așteptat pentru cultura de celule 2D, deoarece s-a arătat că, dacă numărul de celule nu este redus prin efectuarea unor subcultivări periodice, celulele își pierd viabilitatea, iar numărul lor scade⁶⁹. Alte grupuri au raportat rezultate similare⁷⁰. În mod neașteptat, am observat o reducere a viabilității celulelor HepG2 cultivate în hidrogelul HA³P50 la D14 comparativ cu D7, urmată de o creștere la D21 (Figura 75.A). Acest lucru poate reflecta faptul că celulele HepG2 se organizează în grupuri (așa cum se poate observa în imaginile de SEM) care nu sunt interconectate ferm și își pot pierde contactele cu fibrele de hidrogel atunci când mediul de cultură este schimbat, ducând la îndepărtarea lor. Mai mult, la D21 celulele HepG2 proliferază în hidrogelul HA³P50 (Figura 75.A) generând agregate celulare atașate la fibrele hidrogelului, care sunt interconectate (Figura 74). Astfel, o creștere cu ~ 100% și cu ~ 130% ($p < 0,001$) în comparație cu D1 și D14, respectiv s-a observat la D21 (Figura 75.A). De asemenea, merită menționat faptul că viabilitatea celulelor HepG2 crescute pe hidrogelul HA³P50 este semnificativ crescută la D21 (cu ~ 70%, $p < 0,01$) în comparație cu suportul 2D corespunzător. Acest lucru se corelează cu testul de citotoxicitate ToxiLight (Figura 75.B) unde eliberarea enzimei adenilat kinază, un indicator al deteriorării membranei celulare și a toxicității crescute, este redusă cu ~ 80% în cazul cultivării celulelor HepG2 timp de 21 de zile în HA³P50 comparativ cu celulele cultivate pe suport 2D. Mai mult, datele sunt susținute de testul de colorare a celulelor vii / moarte, unde procentul de celule vii față de celulele totale este crescut atunci când celulele HepG2 sunt cultivate timp de 21 de zile în hidrogel HA³P50 în comparație cu celulele care cresc în 2D (~ 120%, $p < 0,001$) (Figura 75.C și 75.D).

Pentru o mai bună înțelegere a distribuției celulelor HepG2 în interiorul hidrogelului HA³P50, a fost realizată o reconstrucție 3D a imaginilor preluate cu funcția Z -stacking a în cazul colorației Live/Dead. Astfel, se poate observa că atât celulele vii (colorate în verde), cât și cele moarte (colorate în roșu) sunt răspândite în profunzimea hidrogelului, totuși, numărul de celule moarte în ziua 1 este mai mare decât cel determinat în ziua 21 (Figura 75.E), un rezultat în conformitate cu testele XTT și ToxiLight. Se poate observa, de asemenea, că un număr mare de celule viabile s-au infiltrat în interiorul hidrogelului după 21 de zile de la cultivare (Figura 75.D și 75.E).

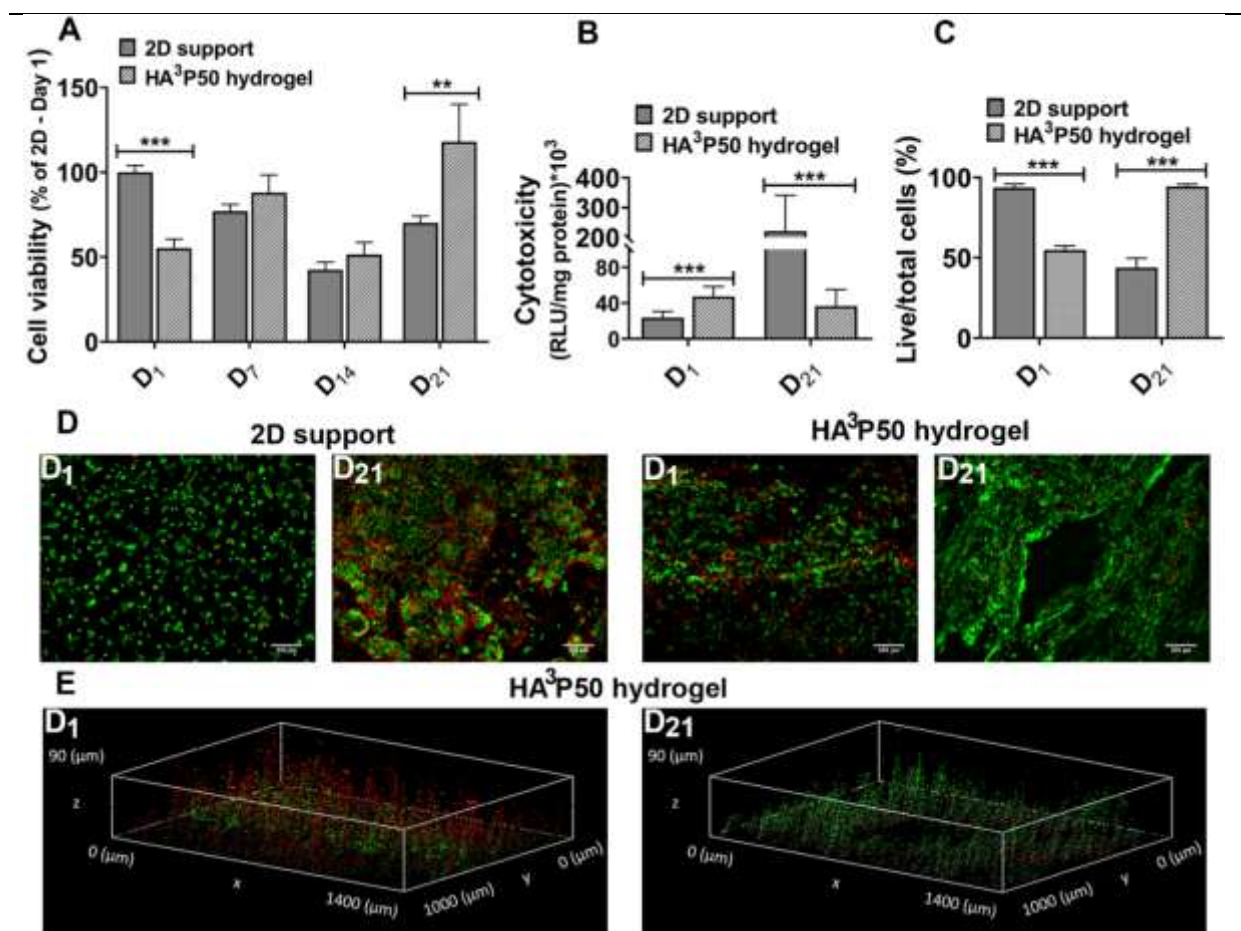


Figura 75. Viabilitatea și proliferarea celulelor HepG2 pe parcursul a 21 de zile de cultivare pe suportul 2D și în hidrogelul HA³P50. (A) Viabilitatea celulară evaluată prin testul XTT; (B) Citotoxicitatea celulară investigată prin eliberarea adenilat kinazei în mediul de cultură; (C) Procentul de celule viabile raportat la numărul total de celulele determinat prin testul Live/Dead; (D) Suprapunerea imaginilor obținute din colorația calceină AM (verde)/ iodură de propidiu (PI, roșu) a celulelor HepG2 cultivate pe suportul 2D (stânga) și hidrogelul HA³P50 (dreapta). Scale bar: 200 μm; (E) Reconstrucția 3D a imaginilor colorației calceina/PI preluate cu funcția Z-stacking pentru celulele HepG2 cultivate în hidrogel HA³P50. Semnificație statistică: ** $p < 0.01$ și *** $p < 0.001$ pentru comparații între hidrogelul HA³P50 și suportul 2D.

Concluzii

Investigațiile biologice indică faptul că hidrogelul HA³G50 este un material biocompatibil, capabil să susțină creșterea celulelor tumorale HepG2, fiind astfel potrivit pentru utilizarea ca platformă 3D pentru a mima funcționalitatea tumorală adecvată pentru screeningul de medicamente anti-tumorale.

III. Rezultate cuantificabile la proiectul 5D-nanoP în etapa 2020:

III.1. Articole publicate care sunt direct asociate cu proiectul (conțin mulțumiri la proiect)

1. E. L. Ursu, G. Gavril, S. Morariu, M. Pinteala, M. Barboiu, A. Rotaru. Single-walled carbon nanotubes-G-quadruple hydrogel nanocomposite matrixes for cell support applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *111*, 110800; DOI: 10.1016/j.msec.2020.110800.
2. L. Clima, B. F. Craciun, A. Angeli, A. Petreni, A. Bonardi, A. Nocentini, F. Carta, P. Gratteri, M. Pinteala, C. T. Supuran. Synthesis, computational studies and assessment of *in vitro*

- inhibitory activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2052; DOI: 10.1002/cmdc.202000500.
3. A. Angeli, M. Pinteala, S.S. Maier, B.C. Simionescu, A. Milaneschi, G. Abbas, S. del Prete, C. Capasso, A. Capperucci, D. Tanini, F. Carta, C.T. Supuran. Evaluation of thio- and seleno-acetamides bearing benzenesulfonamide as inhibitor of carbonic anhydrases from different pathogenic bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 598; DOI: 10.3390/ijms21020598.
 4. A. Angeli, M. Ferraroni, M. Pinteala, S.S. Maier, B.C. Simionescu, F. Carta, S. Del Prete, C. Capasso, C.T. Supuran. Crystal structure of a tetrameric type II β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Burkholderia pseudomallei*, *Molecules* **2020**, *25*, 2269; DOI: 10.3390/molecules25102269.
 5. D. Macocinschi, D. Filip, B.-I. Ciubotaru, R. P. Dumitriu, C. D. Varganici, M.-F. Zaltariov. Blends of sodium deoxycholate-based poly(ester ether)urethane ionomer and hydroxypropyl cellulose with mucosal adhesiveness, *Int J Biol Macromol* **2020**, *162*, 1262-1275; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.191.
 6. S. Shova, A. Vlad, M. Damoc, V. Tiron, M. Dascalu, G. Novitchi, C. Ursu, M. Cazacu. Nanoscale coordination polymer of dimanganese(II) as infinite, flexible nano-sheets with photo-switchable morphology. *Eur J Inorg Chem* **2020**, *8*, 2043-2054; DOI: 10.1002/ejic.202000098.
 7. S. Shova, V. Tiron, A. Vlad, G. Novitchi, D. G. Dumitrescu, M. Damoc, M.-F. Zaltariov, M. Cazacu. Permethylated dinuclear Mn(III) coordination nanostructure with stripe-ordered magnetic domains. *Appl Organomet Chem* **2020**, *34*, e5957; DOI: 10.1002/aoc.5957.
 8. S. P. Gavriș, S. Shova, M. Cazacu, Y. D. Lampeka. Crystal structure of the one-dimensional coordination polymer formed by the macrocyclic [Ni(cyclam)]²⁺ cation and the dianion of diphenylsilanediybis(4-benzoic acid). *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun* **2020**, *76*, 929-932, DOI: 10.1107/S2056989020006544.
 9. B. G. Molina, A. D. Bendrea, S. Lanzalaco, L. Franco, L. Cianga, L. J. del Valle, J. Puiggali, P. Turon, E. Armelin, I. Cianga, C. Aleman. Smart design for a flexible, functionalized and electroresponsive hybrid platform based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) derivatives to improve cell viability. *J Mater Chem B* **2020**, *8*, 8864-8877; DOI: 10.1039/d0tb01259a.
 10. S. Cibotaru, A.-I. Sandu, D. Belei, L. Marin. Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for bio-materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *116*, 111216; DOI: 10.1016/j.msec.2020.111216.
 11. S. M. Bucatariu, M. Constantin, C. D. Varganici, D. Rusu, A. Nicolescu, I. Prisacaru, M. Carnuta, M. Anghelache, M. Calin, P. Ascenzi, G. Fundueanu. A new sponge-type hydrogel based on hyaluronic acid and poly(methylvinylether-alt-maleic acid) as a 3D platform for tumor cell growth. *Int J Biol Macromol* **2020**, *165*, 2528-2540; DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.095.
 12. D. M. Suflet, I. Popescu, A. I. Prisacaru, I. M. Pelin. Synthesis and characterization of curdlan-phosphorylated curdlan based hydrogels for drug release. *Int J Polym Mat Polym Biomat* **2020**, 1-10; DOI: 10.1080/00914037.2020.1765360.
 13. D. Timpu, L. Sacarescu, T. Vasiliu, M. V. Dinu, G. David. Surface cationic functionalized nano-hydroxyapatite – Preparation, characterization, effect of coverage on properties and related applications. *Eur Polym J* **2020**, *132*, 109759; DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109759.
 14. C. Cojocaru, L. Clima. Polymer assisted ultrafiltration of AO7 anionic dye from aqueous solutions: Experimental design, multivariate optimization, and molecular docking insights. *J Membr Sci* **2020**, *604*, 118054; DOI: 10.1016/j.memsci.2020.118054.

15. A.L. Chibac-Scutaru, C. Cojocaru, A. Coroaba, Gh. Roman, G. Sacarescu. M. Simionescu, L. Sacarescu, Nano-assembled oligosilane-pyrazoline structures and their optical properties. *J Mol Liq* **2020**, *303*, 112657; DOI: 10.1016/j.molliq.2020.112657.
16. A. Coroaba, D.-L. Isac, C. Al-Matarneh, T. Vasiliu, S.-A. Ibanescu, R. Zonda, R. Ardeleanu, A. Neamtu, D. Timpu, A. Nicolescu, F. Mocci, S. S. Maier, A. Laaksonen, M. J. M. Abadie, M. Pinteala. Probing the supramolecular features via π - π interaction of a diiminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether compound: experimental and theoretical study. *RSC Adv* **2020**, *10*, 38304-38315; DOI: 10.1039/D0RA06929A.

III.2. Articole publicate care sunt conexe la subiectul proiectului (conțin multumiri la proiect)

1. O. E. Carp, A. Moraru, M. Pinteala, A. Arvinte. Electrochemical behaviour of piperine. Comparison with control antioxidants. *Food Chem* **2021**, *339*, 128110; DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128110.
2. Y. Sun, A. Laaksonen, X. Lu, X. Ji. How to detect possible pitfalls in ePC-SAFT modelling. 2. Extension to binary mixtures of 96 ionic liquids with CO₂, H₂S, CO, O₂, CH₄, N₂, and H₂. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, in Press; DOI: 10.1021/acs.iecr.0c04485.
3. Q. Gao, Y. Zhang, A. Laaksonen, X. Ji, S. Zhao, Y. Chen, X. Lu. Effect of dimethyl carbonate on the behavior of water confined in carbon nanotube. *Chin J Chem Eng* **2020**, in Press.
4. F. Li, F. Mocci, X. Zhang, X. Ji, A. Laaksonen. Ionic liquids for CO₂ electrochemical reduction. *Chin J Chem Eng* **2020**, in Press; DOI: 10.1016/j.cjche.2020.10.029.
5. Y. A. Dmitriev, A. Laaksonen, N. P. Benetis. H/D isotope effect observed in the isotropic Fermi contact interaction of formyl radical: Experimental and theoretical analysis of the inter- and intra-molecular dynamics. *AIP Adv* **2020**, *10*, 000000; DOI: 10.1063/5.0027835.
6. Y. Dong, F. Huo, A. Laaksonen. Detecting confined fluid behavior by SFA: Past, present, and future. *Green Energy Environ* **2020**, In press. DOI: 10.1016/j.gee.2020.08.002.
7. Y. Dong, X. Ji, A. Laaksonen, W. Cao, H. He, X. Lu. Excellent protein immobilization and stability on heterogeneous C-TiO₂ hybrid nanostructures: A single protein AFM study. *Langmuir* **2020**, *36*, 9323-9332; DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c01942.
8. Q. Gao, Y. Zhang, S. Xu, A. Laaksonen, Y. Zhu, X. Ji, X. Lu. Physicochemical properties and structure of fluid at nano-/ micro-interface: Progress in simulation and experimental study. *Green Energy Environ* **2020**, *5*, 274-285; DOI: 10.1016/j.gee.2020.07.013.
9. Qingwei Gao, Nanhua Wua, Yao Qin, Aatto Laaksonen, Yudan Zhu, Xiaoyan, Xiaohua Lu. Molecular insight into wetting behavior of deep eutectic solvent droplets on ionic substrates: A molecular dynamics study. *J Mol Liq* **2020**, *319*, 114298; DOI: 10.1016/j.molliq.2020.11429.
10. C. Correa Girona, A. Laaksonen, F. L. Barroso da Silva. On the interactions of the receptor-binding domain of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 spike proteins with monoclonal antibodies and the receptor ACE2. *Virus Res* **2020**, *285*, 198021; DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198021.
11. S.-C. Yang, B. Li, Y.-L. Zhu, A. Laaksonen, Y.-L. Wang. The ENUF method - Ewald summation based on non-uniform fast Fourier transform: implementation, parallelization, and application. *J Comput Chem* **2020**, *41*, 2316-2335; DOI: 10.1002/jcc.26395.

12. Y. Sun, Z. Zuo, A. Laaksonen, X. Lu, X. Ji. How to detect possible pitfalls in ePC-SAFT modelling: Extension to ionic liquids. *Fluid Phase Equilib* **2020**, *519*, 112641, DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112641.
13. H. Wang, Y. Liu, A. Laaksonen, A. Krook-Riekkola, Z. Yang, X. Lu, X. Ji. Carbon recycling – an immense resource and key to a smart climate engineering: A survey of technologies, cost and impurity impact. *Renew Sust Energ Rev* **2020**, *131*, 110010; DOI: 10.1016/j.rser.2020.110010.
14. Y.-L. Wang, B. Li, S. Sarman, F. Mocci, Z.-Y. Lu, J. Yuan, A. Laaksonen, M. D. Fayer. Microstructural and Dynamical Heterogeneities in Ionic Liquids. *Chem Rev* **2020**, *120*, 5798-5877; DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00693.
15. H.-W. Pei, B. Li, A. Laaksonen, Y.-L. Wang. How molecular chiralities of bis(mandelato)borate anions affect their binding structures with alkali metal ions and microstructural properties in tetraalkylphosphonium ionic liquids. *Front Chem* **2020**, *8*, 65; DOI: 10.3389/fchem.2020.00065.
16. Y.-L. Wang, B. Li, J. Yuan, A. Laaksonen. The Effect of phenyl substitutions on microstructures and dynamics of tetraalkylphosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquids. *ChemPhysChem* **2020**, *21*, 1202-1214; DOI: 10.1002/cphc.201901206.
17. A. Nicolescu, D. Blanita, C. Boiciuc, V. Hlistun, M. Cristea, D. Rotaru, L. Pinzari, A. Oglinda, A. Stamati, I. Tarcomnicu, A. Tutulan-Cunita, D. Stambouli, S. Gladun, N. Revenco, N. Usurelu, C. Deleanu. Monitoring methylmalonic aciduria by NMR urinomics. *Molecules* **2020**, *25*, 5312; DOI:10.3390/molecules25225312.
18. A. Nicolescu, E. Georgescu, F. Dumitrascu, F. Georgescu, F. Teodorescu, C. Draghici, M.R. Caira, C. Deleanu. Exocyclic enamine of pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines generated by 1,3-dipolar cycloaddition reactions of benzimidazolium ylides to activated alkynes. *Rev Chim* **2020**, *71* (3), 197-209; DOI: 10.37358/RC.20.3.7989.
19. R. Vultur, A. Chis, M. Baizat, A. Cozma, R. Suharoschi, A. Nicolescu, C. Deleanu. A severe neonatal argininosuccinic aciduria case investigated by ¹H NMR spectroscopy. *Rev Chim* **2020**, *71* (3), 210-218; DOI: 10.37358/RC.20.3.7990.
20. E. Georgescu, F. Georgescu, F. Dumitrascu, C. Draghici, A. Nicolescu, D. Marinescu, C. Deleanu. Microwave-assisted multicomponent synthesis of benzo[*f*]pyrrolo[1,2-*a*]quinoline derivatives. *Rev Roum Chim* **2020**, *65* (1), 97-102; DOI:10.33224/rch.2020.65.1.11

III.3. Articole revizuite sau care sunt in revizuire (contin multumiri la proiect)

1. I. Popescu, M. Carnuta, D.M. Suflet, M.V. Dinu, R.N. Darie-Nita, M. Anghelache, M. Calin, M. Constantin, Thiol-ene photo-click alginate/poloxamer hydrogel for alleviation of the inflammatory response of human keratinocytes, *Int J Biol Macromol* - under review.

III.4. Lucrari trimise spre publicare care sunt asociate in mod direct cu proiectul (contin multumiri la proiect)

1. T. Vasiliu, B. F. Craciun, A. Neamtu, L. Clima, D. L. Isac, S. S. Maier, M. Pinteala, F. Mocci, A. Laaksonen. Combined *in silico* and experimental study of PEI-PEG-dsDNA polyplex formation. The importance of PEG size to vector-nucleic acid binding and biocompatibility – *Submitted*.

III.5. Capitole in carti care sunt asociate in mod direct cu proiectul (contin multumiri la proiect)

1. A. Lyubartsev, A. Laaksonen, **Chapter 8:** Inverse Problems and Hierarchical Multiscale Modelling of Biological Matter in *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications* (Editors: Marc Abadie, Mariana Pinteala, Alexandru Rotaru), Springer Nature Switzerland AG Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland, 2021.
2. L. Engelbrecht, F. Mocci, S. Perepelytsya, T. Vasiliu, A. Laaksonen, **Chapter 3:** Molecular Perspective on Solutions and Liquid Mixtures: View from Modelling & Experiment in *Soft Matter Systems for Biomedical Applications* (Editors: L. Bulavin, N. Lebovka), Springer Proceedings in Physics, © Springer Nature Switzerland AG, 2021.

III.6. Participari la manifestari stiintifice care sunt asociate in mod direct cu proiectul (contin multumiri la proiect)

1. G. Fundueanu, M. Constantin, Polymeric micro- and nano-particles for drug delivery, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania - Invited conference.
2. S. Bucatariu, M. Constantin, G. Fundueanu, M. Calin, A new sponge-type hydrogel as a 3D support for tumoral cell culture, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October 2020, Iasi, Romania – Oral presentation.
3. I. Popescu, M. Constantin, Stimuli-sensitive pluronic-alginate hydrogels formed by photoinitiated thiol-ene reaction, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
4. I. M. Pelin, D. M. Suflet, I. Popescu, Hydrogel as component for buccal patches: synthesis, characterization and antibiotic release, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
5. D. L. Isac, A. Coroaba, T. Vasiliu, R. Zonda, S.-A. Ibanescu, C. Al Matarneh, A. Airinei, M. Pinteala, Interplay of electronic structure in ground and excited states of new di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether derivative by TD-DFT studies, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October 2020, Iasi, Romania – Oral presentation.
6. B.-I. Ciubotaru, M.-F. Zaltariov, M. Cazacu, C. Racles, Functionalized mesoporous silica in drug delivery and biomedical applications, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX, 27th of February – 1st of March 2020*, Iasi, Romania – Oral presentation.
7. B.-I. Ciubotaru, M. Cazacu, Evaluation of silicone-based biomaterials from the bio- and mucoadhesive perspective, *Scientific communications session of young researchers, PPIMC - Open door to the future (MacroYouth '2020)*, 1st Edition, 19th of November 2020, Iasi, Romania – Oral presentation.
8. A.-D. Bendrea, L. Cianga, G.-L. Ailiesei, I. Cianga, Fluorescent EDOT-functionalized poly- ϵ -caprolactone: Synthesis, photophysical and self-assembling properties in organic solvents and its serendipitously noticed behaviour in protonated media (on-line registration doi:10.3390/CGPM2020-07208), *The First International Conference on „Green” Polymer Materials*, 05-25th of November 2020 – online – Oral presentation

9. A.-D. Bendrea, L. Cianga, I. Cianga, Graft Conjugated Polymers: Toward Smarter and Versatile Materials for Biomedical Applications, *The 5th International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2020)*, 28-30th of October 2020, Iasi, Romania – Poster communication.
10. S. Bucatariu, G. Fundueanu, M. Constantin, Design of hyaluronan scaffold via solvent free thermal cross-linking method, *International Congress of „Apollonia” University from Iasi, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXX*, 27th of February – 1st of March 2020, Iasi, Romania – Poster communication.

III.7. Teze de doctorat sustinute care au adus multumiri la proiectul 5D-nanoP

1. *Conjugates for genes and drugs delivery*, PhD Student – Bogdan Florin Craciun, Scientific Supervisor – Dr. Mariana Pinteala.
2. *Self-assembled dynamic macromolecular systems: Molecular modeling and experimental validation studies*, PhD Student – Tudor Vasiliu, Scientific Supervisor – Dr. Mariana Pinteala.

IV. Prognoza activităților pentru etapa 2021

1. În ceea ce privește entitățile moleculare implicate în asamblarea supramoleculară
- Înființarea de biblioteci de compuși.
 - Investigarea anumitor inhibitori ai anhidrazelor carbonice.
 - Investigarea *in silico* a andocării și asamblării supramoleculare a unimerilor de bibliotecă.
2. În ceea ce privește sinteza nanoplatformelor și evaluarea fizico-chimică
- Extinderea proiectării, sintezei și caracterizării componentelor (macro) moleculare ale nanoplatformelor funcționale.
 - Pregătirea componentelor stoc și etalon ale nanoplatformelor funcționale, pentru investigarea precisă și sistematică a funcționalității acestora în medii aglomerate.
3. În ceea ce privește producerea de constituenți simpli ai viitorului surogat de țesut / tumoră
- Diversificarea substraturilor sintetizate.

Certificăm că toate obiectivele etapei 2020 a proiectului 5D-nanoP au fost atinse.

02 Decembrie 2020

**Director Proiect,
Professor Aatto Laaksonen, PhD.**

Referinte bibliografice

- (1) Clima, L.; Craciun, B. F.; Gavril, G.; Pinteala, M. Tunable Composition of Dynamic Non-Viral Vectors over the DNA Polyplex Formation and Nucleic Acid Transfection *Polymers* **2019**, *11*, 1313.
- (2) Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. DyNAVectors: dynamic constitutional vectors for adaptive DNA transfection *Chem Commun* **2015**, *51*, 17529.
- (3) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 615.
- (4) Hossein-Nejad-Ariani, H.; Althagafi, E.; Kaur, K. Small Peptide Ligands for Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer Cells *Scientific Reports* **2019**, *9*, 2723.
- (5) Clima, L.; Craciun, B. F.; Angeli, A.; Petreni, A.; Bonardi, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Gratteri, P.; Pinteala, M.; Supuran, C. T. Synthesis, computational studies and assessment of in vitro inhibitory activity of squalene derivatives as carbonic anhydrase inhibitors *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2052.
- (6) Cibotaru, S.; Sandu, A.-I.; Belei, D.; Marin, L. Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for bio-materials *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *116*, 111216.
- (7) Bendrea, A. D.; Cianga, L.; Cianga, I. Review paper: progress in the field of conducting polymers for tissue engineering applications *J Biomater Appl* **2011**, *26*, 3.
- (8) Zeglio, E.; Rutz, A. L.; Winkler, T. E.; Malliaras, G. G.; Herland, A. Conjugated Polymers for Assessing and Controlling Biological Functions *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1806712.
- (9) Sisson, A. L.; Ekinci, D.; Lendlein, A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures *Polymer* **2013**, *54*, 4333.
- (10) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 1217.
- (11) Rainbolt, E. A.; Washington, K. E.; Biewer, M. C.; Stefan, M. C. Recent developments in micellar drug carriers featuring substituted poly(ϵ -caprolactone)s *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 2369.
- (12) Chang, S. H.; Lee, H. J.; Park, S.; Kim, Y.; Jeong, B. Fast Degradable Polycaprolactone for Drug Delivery *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2302.
- (13) Schenning, A. P. H. J.; George, S. J. Phases full of fullerenes *Nature Chemistry* **2014**, *6*, 658.
- (14) Bendrea, A.-D.; Cianga, L.; Ailiesei, G.-L.; Cianga, I. In *The first International Electronic Conference on “Green” Polymer Materials*; MDPI: Online, 2020.
- (15) Huh, S.; Wiench, J. W.; Yoo, J.-C.; Pruski, M.; Lin, V. S. Y. Organic Functionalization and Morphology Control of Mesoporous Silicas via a Co-Condensation Synthesis Method *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 4247.
- (16) Persi, E.; Duran-Frigola, M.; Damaghi, M.; Roush, W. R.; Aloy, P.; Cleveland, J. L.; Gillies, R. J.; Ruppin, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy *Nature Communications* **2018**, *9*, 2997.
- (17) Tannock, I. F.; Rotin, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation *Cancer Research* **1989**, *49*, 4373.

- (18) Larkin, P. J. In *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*; Larkin, P. J., Ed.; Elsevier: 2018, p 85.
- (19) Ursu, E.-L.; Gavril, G.; Morariu, S.; Pinteala, M.; Barboiu, M.; Rotaru, A. Single-walled carbon nanotubes–G-quadruple hydrogel nanocomposite matrixes for cell support applications *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *111*, 110800.
- (20) Cojocaru, C.; Clima, L. Polymer assisted ultrafiltration of AO7 anionic dye from aqueous solutions: Experimental design, multivariate optimization, and molecular docking insights *Journal of Membrane Science* **2020**, *604*, 118054.
- (21) Chibac-Scutaru, A. L.; Cojocaru, C.; Coroabă, A.; Roman, G.; Săcărescu, G.; Simionescu, M.; Săcărescu, L. Nano-assembled oligosilane–pyrazoline structures and their optical properties *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *303*, 112657.
- (22) Coroaba, A.; Isac, D.-L.; Al-Matarneh, C.; Vasiliu, T.; Ibanescu, S.-A.; Zonda, R.; Ardeleanu, R.; Neamtu, A.; Timpu, D.; Nicolescu, A.; Mocci, F.; Maier, S. S.; Laaksonen, A.; Abadie, M. J. M.; Pinteala, M. Probing the supramolecular features via π – π interaction of a di-iminopyrene-di-benzo-18-crown-6-ether compound: experimental and theoretical study *RSC Advances* **2020**, *10*, 38304.
- (23) Ocampo, C.; Oliver, R.; Armelin, E.; Alemán, C.; Estrany, F. Electrochemical Synthesis of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on Steel Electrodes: Properties and Characterization *Journal of Polymer Research* **2006**, *13*, 193.
- (24) Patton, A. J.; Green, R. A.; Poole-Warren, L. A. Mediating conducting polymer growth within hydrogels by controlling nucleation *APL Materials* **2015**, *3*, 014912.
- (25) Ag, D.; Selec, M.; Bongartz, R.; Can, M.; Yurteri, S.; Cianga, I.; Stahl, F.; Timur, S.; Scheper, T.; Yagci, Y. From Invisible Structures of SWCNTs toward Fluorescent and Targeting Architectures for Cell Imaging *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3532.
- (26) Al Tameemi, M.; Dobrinescu, R.; Marton, G.; Ott, C. Doxorubicin loaded silica nanotubes: An investigation of the release behavior *Scientific Bulletin Series B* **2015**, *77*, 185.
- (27) Roik, N. V.; Belyakova, L. A. Mesoporous silica nanoparticles equipped with surface nanovalves for pH-controlled liberation of doxorubicin *Interface Focus* **2016**, *6*, 20160041.
- (28) Ong, S.; Zhao, X.; Eisenthal, K. B. Polarization of water molecules at a charged interface: second harmonic studies of the silica/water interface *Chemical Physics Letters* **1992**, *191*, 327.
- (29) HMDB; HMDB: <https://hmdb.ca/>, 2012; Vol. 2020, p 1.
- (30) Feng, S.; Bagia, C.; Mpourmpakis, G. Determination of Proton Affinities and Acidity Constants of Sugars *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117*, 5211.
- (31) PubChem; PubChem: [PubChem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), 2005; Vol. 2020, p Doxorubicin is an anthracycline antibiotic with antineoplastic activity. Doxorubicin.
- (32) Lanzalaco, S.; Turon, P.; Weis, C.; Alemán, C.; Armelin, E. The mechanism of adhesion and graft polymerization of a PNIPAAm thermoresponsive hydrogel to polypropylene meshes *Soft Matter* **2019**, *15*, 3432.
- (33) Lanzalaco, S.; Del Valle, L. J.; Turon, P.; Weis, C.; Estrany, F.; Alemán, C.; Armelin, E. Polypropylene mesh for hernia repair with controllable cell adhesion/de-adhesion properties *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*, 1049.

- (34) Coleman, M. M.; Zarian, J. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly(ϵ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1979**, *17*, 837.
- (35) Stuart, B. H. In *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Ando, D. J., Ed.; John Wiley & Sons: 2004.
- (36) Molina, B. G.; Bendrea, A. D.; Lanzalaco, S.; Franco, L.; Cianga, L.; del Valle, L. J.; Puiggali, J.; Turon, P.; Armelin, E.; Cianga, I.; Aleman, C. Smart design for a flexible, functionalized and electroresponsive hybrid platform based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) derivatives to improve cell viability *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*, 8864.
- (37) Gueye, M. N.; Carella, A.; Faure-Vincent, J.; Demadrille, R.; Simonato, J.-P. Progress in understanding structure and transport properties of PEDOT-based materials: A critical review *Progress in Materials Science* **2020**, *108*, 100616.
- (38) Planz, V.; Lehr, C.-M.; Windbergs, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery *J Control Release* **2016**, *242*, 89.
- (39) Collier, G. S.; Pelse, I.; Reynolds, J. R. Aqueous Electrolyte Compatible Electrochromic Polymers Processed from an Environmentally Sustainable Solvent *ACS Macro Letters* **2018**, *7*, 1208.
- (40) Fresta, E.; Fernández-Luna, V.; Coto, P. B.; Costa, R. D. Merging Biology and Solid-State Lighting: Recent Advances in Light-Emitting Diodes Based on Biological Materials *Advanced Functional Materials* **2018**, *28*, 1707011.
- (41) Jürgensen, N.; Zimmermann, J.; Morfa, A. J.; Hernandez-Sosa, G. Biodegradable Polycaprolactone as Ion Solvating Polymer for Solution-Processed Light-Emitting Electrochemical Cells *Scientific Reports* **2016**, *6*, 36643.
- (42) Pacheco-Moreno, C. M.; Schreck, M.; Scaccabarozzi, A. D.; Bourgun, P.; Wantz, G.; Stevens, M. M.; Dautel, O. J.; Stingelin, N. The Importance of Materials Design to Make Ions Flow: Toward Novel Materials Platforms for Bioelectronics Applications *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1604446.
- (43) Bergfelt, A.; Lacey, M. J.; Hedman, J.; Sångeland, C.; Brandell, D.; Bowden, T. ϵ -Caprolactone-based solid polymer electrolytes for lithium-ion batteries: synthesis, electrochemical characterization and mechanical stabilization by block copolymerization *RSC Advances* **2018**, *8*, 16716.
- (44) Vázquez-Torres, H.; Cruz-Ramos, C. A. Blends of cellulosic esters with poly(caprolactone): Characterization by DSC, DMA, and WAXS *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, *54*, 1141.
- (45) Díaz, A.; Bacaicoa, A.; Casas, M. T.; Franco, L.; Serra, A.; Puiggali, J. Study on the crystallization of multiarm stars with a poly(ethyleneimine) core and poly(ϵ -caprolactone) arms of different length *Thermochimica Acta* **2015**, *607*, 39.
- (46) Nur, Y.; Colak, D. G.; Cianga, I.; Yagci, Y.; Hacıoglu, J. Pyrolysis of poly(phenylene vinylene)s with polycaprolactone side chains *Polymer Degradation and Stability* **2008**, *93*, 904.
- (47) Nur, Y.; Yurteri, S.; Cianga, I.; Yagci, Y.; Hacıoglu, J. Thermal degradation of poly(p-phenylene-graft/[ϵ -caprolactone) copolymer *Polymer Degradation and Stability* **2007**, *92*, 838.

- (48) Aradilla, D.; Azambuja, D.; Estrany, F.; Casas, M. T.; Ferreira, C. A.; Alemán, C. Hybrid polythiophene–clay exfoliated nanocomposites for ultracapacitor devices *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 13110.
- (49) Kayser, L. V.; Lipomi, D. J. Stretchable Conductive Polymers and Composites Based on PEDOT and PEDOT:PSS *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1806133.
- (50) Mattila, P. K.; Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 446.
- (51) Gallop, J. L. Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2020**, *102*, 81.
- (52) Puiggali-Jou, A.; del Valle, L. J.; Armelin, E.; Alemán, C. Fibrin Association at Hybrid Biointerfaces Made of Clot-Binding Peptides and Polythiophene *Macromolecular Bioscience* **2016**, *16*, 1461.
- (53) Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, *52*, 1145.
- (54) Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers *Int J Pharmaceut* **1983**, *15*, 25.
- (55) Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs *J Control Release* **1987**, *5*, 23.
- (56) Timpu, D.; Sacarescu, L.; Vasiliu, T.; Dinu, M. V.; David, G. Surface cationic functionalized nano-hydroxyapatite – Preparation, characterization, effect of coverage on properties and related applications *European Polymer Journal* **2020**, *132*, 109759.
- (57) David, G. In *Biopolymer-Based Formulations*; Pal, K., Banerjee, I., Sarkar, P., Kim, D., Deng, W.-P., Dubey, N. K., Majumder, K., Eds.; Elsevier: 2020, p 881.
- (58) Yin, Y.; Ye, F.; Cui, J.; Zhang, F.; Li, X.; Yao, K. Preparation and characterization of macroporous chitosan–gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, *67A*, 844.
- (59) Szustakiewicz, K.; Gazińska, M.; Kryszak, B.; Grzymajło, M.; Pięłowski, J.; Wiglusz, R. J.; Okamoto, M. The influence of hydroxyapatite content on properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite porous scaffolds obtained using thermal induced phase separation technique *European Polymer Journal* **2019**, *113*, 313.
- (60) Fernando, I. P. S.; Jayawardena, T. U.; Sanjeeva, K. K. A.; Wang, L.; Jeon, Y.-J.; Lee, W. W. Anti-inflammatory potential of alginic acid from *Sargassum horneri* against urban aerosol-induced inflammatory responses in keratinocytes and macrophages *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *160*, 24.
- (61) Shih, H.; Lin, C.-C. Photoclick Hydrogels Prepared from Functionalized Cyclodextrin and Poly(ethylene glycol) for Drug Delivery and in Situ Cell Encapsulation *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1915.
- (62) Soni, S. R.; Kumari, N.; Bhunia, B. K.; Sarkar, B.; Mandal, B. B.; Ghosh, A. Synthesis and characterization of a non-cytotoxic and biocompatible acrylamide grafted pullulan – Application in pH responsive controlled drug delivery *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *120*, 753.

- (63) Li, Z.; Shim, H.; Cho, M. O.; Cho, I. S.; Lee, J. H.; Kang, S.-W.; Kwon, B.; Huh, K. M. Thermo-sensitive injectable glycol chitosan-based hydrogel for treatment of degenerative disc disease *Carbohydrate Polymers* **2018**, *184*, 342.
- (64) Stefan, J.; Kus, K.; Wisniewska, A.; Lorkowska-Zawicka, B.; Kaminski, K.; Szczubialka, K.; Nowakowska, M.; Korbut, R. The antiatherogenic effect of new biocompatible cationically modified polysaccharides: chitosan and pullulan-the comparison study *Journal of Physiology and Pharmacology* **2018**, *69*, 995.
- (65) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Sacarescu, L.; Daraba, O. M.; Anghelache, M.; Fundueanu, G. Pullulan derivative with cationic and hydrophobic moieties as an appropriate macromolecule in the synthesis of nanoparticles for drug delivery *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *164*, 4487.
- (66) Westhouse, R. A. Safety assessment considerations and strategies for targeted small molecule cancer therapeutics in drug discovery *Toxicologic pathology* **2010**, *38*, 165.
- (67) Deng, X.; Cao, Y.; Yan, H.; Yang, J.; Xiong, G.; Yao, H.; Qi, C. Enhanced liver functions of HepG2 cells in the alginate/xyloglucan scaffold *Biotechnology Letters* **2015**, *37*, 235.
- (68) Pan, S.; Ragauskas, A. J. Preparation of superabsorbent cellulosic hydrogels *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1410.
- (69) Hoarau-Véchet, J.; Rafii, A.; Touboul, C.; Pasquier, J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 181.
- (70) Luckert, C.; Schulz, C.; Lehmann, N.; Thomas, M.; Hofmann, U.; Hammad, S.; Hengstler, J. G.; Braeuning, A.; Lampen, A.; Hessel, S. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells *Archives of toxicology* **2017**, *91*, 393.