

RAPORT STIINTIFIC

pentru perioada 2012-2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Denumirea proiectului: **SISTEME DE INSPIRATIE BIOLOGICA PENTRU ENTITATI PROIECTATE STRUCTURAL SI FUNCTIONAL**

Coordonator: **INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARA „PETRU PONI” DIN IASI**

Director de proiect: **DR. MARIANA PINTEALA**

ADRESA WEB: http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/ro/
http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/ro/index.html

CUPRINS:

Preambul	2
RAPORT STIINTIFIC pentru faza 2012	3
RAPORT STIINTIFIC pentru faza 2013	9
RAPORT STIINTIFIC pentru faza 2014	30
Bibliografie 2012-2014	86
RAPORT STIINTIFIC pentru faza 2015	91
Bibliografie 2015	130

PREAMBUL

Datorita cerintelor crescande pentru un nivel ridicat al calitatii vietii, in ultimii ani s-a remarcat o crestere a pietii de desfacere a produselor de uz biomedical, inregistrandu-se sporuri anuale ale vanzarilor de peste 29%, ceea ce a stimulat intensificarea cercetarilor si extinderea investitiilor in acest domeniu. Un rol important revine dispozitivelor dedicate medicinei regenerative si a sistemelor cu eliberare a principiilor active, inclusiv a materialului genetic. Astfel, din cele aproximativ 454,3 miliarde de dolari reprezentand valoarea estimata la nivelul anului 2014 pentru cele mai importante zece categorii de produse de uz biomedical si domeniile tehnologice aferente, piata sistemelor de eliberare a principiilor active reprezinta circa 110,8 miliarde (*Today's Medical Developments*)¹.

Cautarea de noi metode pentru a controla interactiunile nanomaterialelor cu sistemele biologice, reprezinta una dintre provocarile recente pentru transpunerea acestor noilor (bio)tehnologii in terapii. Cercetarile recente urmaresc dezvoltarea de sisteme si dispozitive multifunctionale, proiectate rational, care sa asigure obtinerea performantelor vizate in sfera biomedicala. Obiectivele curente in acest sens sunt: (i) studiul fezabilitatii proceselor de mimare a mecanismelor viului, in scopul aducerii pe piata a unor tehnici terapeutice inovatoare, (ii) posibilitatea de a realiza sisteme multifunctionale care sa indeplineasca simultan multiple cerinte biologice si terapeutice si (iii) extinderea performantelor tehnicilor terapeutice secondate de micro- si nano-entitati, in conditiile respectarii standardelor privind toxicologia si biocompatibilitatea.

In acest context, un rol important revine stiintei si ingineriei materialelor polimerice, in sensul controlului compozitiei, functionalitatii si topologiei polimerilor, pe fundalul utilizarii instrumentelor avansate de caracterizare, simulare si predictie². In scopul generarii de arhitecturi macromoleculare complexe, capabile sa indeplineasca functii biologice, s-au dezvoltat strategii eficiente, care au la baza, pe de-o parte, utilizarea entitatilor functionale (macro)moleculare drept unitati de asamblare (building blocks), iar pe de alta, combinarea alternativelor conventionale si noi de preparare a respectivelor unitati.

Asigurarea concomitenta a performantelor fizico-chimice, biologice si a prelucrabilitatii, cu relevanta in aplicatiile clinice, impune combinarea de materiale din clase si subclase diferite (materiale organice/anorganice, polimeri sintetici si naturali etc.), dar si a unor procedee si sisteme din domenii diferite de aplicare.

Obiectivul general al proiectului: Proiectarea, generarea si caracterizarea unor entitati nano- si micro-structurate, active drept „unelte” in tehnicile de reprogramare si terapie genica, precum si in ingineria tisulara.

RAPORT STIINTIFIC

pentru faza 2012, unica, a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Problematica abordata de catre colectivul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-028, in etapa 2012:

1. Conceperea principiilor de realizare a vectorilor genetici non-virali

2. Realizarea de vectori non-virali:

- *sinteza si purificarea derivatilor de fullerena C₆₀*
- *simularea moleculara a precursorilor vectorilor non-virali.*
- *sinteza, purificarea, caracterizarea si testarea citotoxicitatii pe linia celulara HepG2 a nanoparticulelor magnetice de tip miez-manta, cu structura magnetita-heparina-Rheina*
- *sinteza structurilor rotaxanice pe baza de ciclodextrina*
- *sinteza si caracterizarea nanoparticulelor cu capacitate de raspuns la stimuli externi*
- *obtinerea si caracterizarea precursorilor destinati realizarii substitutelor matricei extracelulare*
- *obtinerea si caracterizarea hidrogelurilor si a criogelurilor pe baza de atelocolagen si glicozamino-glicani, destinate realizarii substitutului matricei extracelulare*

3. Formarea si extinderea resursei umane alocate proiectului

4. Diseminarea rezultatelor studiilor derulate in cadrul etapei 2012 a proiectului

Preambul - La originea multor afectiuni ale organismelor vii se regasesc gene imperfecte („defecte”), care determina evolutii anormale ori chiar aberante ale celulelor. Ele induc supraexprimarea unor proteine, sau determina biosinteza de protine nefunctionale, fapt care se soldeaza cu devierea severa a metabolismului celular, tisular, ori chiar al organismului in ansamblul sau, deviere ce poate conduce la moartea celulelor afectate, ori, dimpotriva, la „functionarea” lor la parametrii supradimensionati si/sau la multiplicarea lor necontrolabila. Pentru a corecta consecintele activitatii genelor „defecte”, terapia genica propune doua cai pentru interventia in functionarea aberanta a celulelor, respectiv:

(i) – introducerea unor gene suplimentare in zestrea genetica a celulelor afectate, gene care de regula sunt versiuni corect functionale ale celor „defecte”, dar care pot fi si distincte fata de acestea din urma, actionand complementar ori antagonic lor; in aceasta varianta de interventie, in nucleul celular se introduc tronsoane de ADN simplu sau dublu catenar ce poarta informatie genetica valida, ori plasmide ce au fost suplimentate cu tronsoane de ADN special inserate, purtatoare de informatie genetica;

(ii) – suspendarea manifestarii genelor „defecte” prin suprimarea replicarii lor in celulele fiice, prin limitarea transcrierii lor, ori prin interventia asupra mecanismelor post-transcriptionale, respectiv asupra sistemelor de translatate a informatiei genetice in structuri proteice (asa numita tehnica a interferentei ARN, RNAi, soldata cu moderarea exprimarii proteinelor codificate).

Procesul de introducere deliberata a acizilor nucleici (cDNA, dsDNA, ssDNA, siRNA) in celule eucariote uzand de vectori non-virali poarta denumirea de **transfectie**. Atunci cand se recurge la vectori virali, procesul este denumit **transductie**. Pentru „livrarea” informatiei genetice prin transfectie se aplica procedee fizice sau chimice (Figura 1).

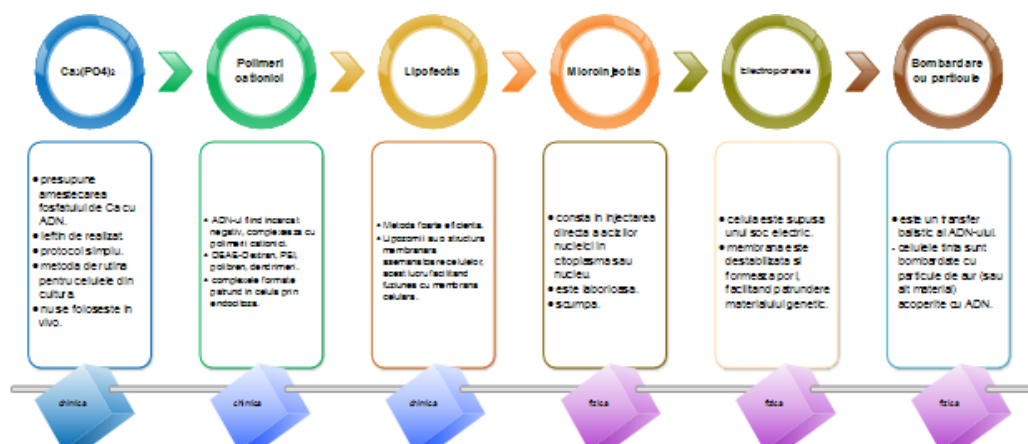


Figura 1. Cai uzuale pentru realizarea transfectiei asupra celulelor eucariote.

2. Obiectivul general al studiilor: Proiectarea, generarea și caracterizarea unor entități nano- și micro-structurate, active drept „unelte” în tehnicile de reprogramare și terapie genetică, precum și în ingineria tisulară.

3. Problematika abordată de către colectivul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-028, în etapa 2012

(i) – în planul conceperii principiilor realizării de vectori genetici non-virali:

- constituirea unei baze documentare asupra tehnicilor și metodelor de transfecție, precum și asupra realizării vectorilor genetici non-virali;
- proiectarea compozițională și structurală a vectorilor genetici destinați transfecției celulelor canceroase și a celor specifice țesutului osos;
- proiectarea metodelor de sinteză/preparare a precursorilor vectorilor genetici destinați transfecției celulelor canceroase și specifice țesutului osos;
- stabilirea tehnicilor de investigare specifice etapelor de sinteză / preparare a precursorilor vectorilor genetici destinați transfecției celulelor canceroase și specifice țesutului osos;
- stabilirea cailor și a etapelor de preparare a unor vectori non-virali ca entități funcționale, caracterizate prin: (a) dimensiuni și conformații apte asocierii cu tronsoane de ADN/ARN, în condiții non-inactivante; (b) solubilitate în mediu apos, atât individual, cât și în asocierie cu tronsoanele de ADN/ARN; (c) stabilitate compozițională și conformatională în mediul tisular și intracelular; (d) abilitatea de a străpunge membrana celulară fără de structurarea asocierii cu acizii nucleici; (e) rezistența la agresiunile enzimice din mediul intracelular; (f) trasabilitate fluorimetrică *per se* și în asocierie cu tronsoane de acizi nucleici; (g) posibilitatea de determinare cantitativă extra- și intra-celulară, prin tehnici non-invazive; (h) destructibilitate extra- și intra-celulară în regim controlat, fără generarea de debrisuri cito-toxice, imunogene ori sistemic adverse;
- stabilirea cailor și a etapelor de preparare și de condiționare a substitutelor matricei extracelulare apte a funcționa drept „rezervoare” de material genetic în tehnicile de transfecție osoasă;
- identificarea exigentelor și a restricțiilor impuse compusilor utilizabili pentru realizarea vectorilor non-virali cu rol terapeutic în diverse forme de cancer și cu rol de „rezervor” în transfecția osoasă;

(ii) – în planul studiilor experimentale privind realizarea de vectori genetici non-virali, a se vedea punctul 4, „Rezultate experimentale obținute în cadrul fazei 2012”;

(iii) – în planul formării și extinderii resursei umane alocate proiectului:

- stabilirea necesarului de manoperă în etapa 2012 a proiectului;
- stabilirea sarcinilor de lucru în cadrul etapei 2012 a proiectului;

- derularea etapelor legale privind angrenarea si remunerarea personalului necesar derularii proiectului;
- ocuparea unei pozitii postdoctorale prin concurs (pagina ANCS (nr. 8166), EURAXESS (nr. 33821331)).

(iv) – in planul asigurarii materiale a derularii proiectului:

- inventarierea si stabilirea functionalitatii echipamentelor suport pentru realizarea sarcinilor in cadrul proiectului, echipamente deja disponibile colectivelor partenerilor implicati in proiect;
- stabilirea necesarului de echipamente noi si de instrumentar de laborator suplimentar, destinate derularii experimentelor in cadrul proiectului;
- stabilirea necesarului de facilitati si utilitati necesare derularii etapei 2012 a proiectului;
- derularea etapelor legale privind achizitionarea de echipamente noi si de instrumentar de laborator;
- derularea etapelor legale privind achizitionarea de facilitati si servicii necesare derularii etapei 2012 a proiectului;
- stabilirea necesarului de reactivi implicati in derularea experimentelor in etapa 2012 a proiectului;
- derularea etapelor legale privind achizitionarea de reactivi necesari derularii etapei 2012 a proiectului;

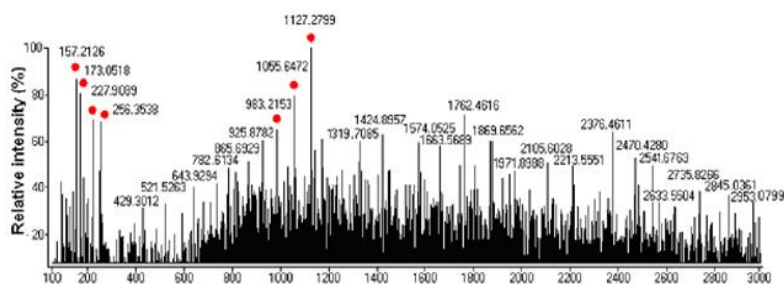
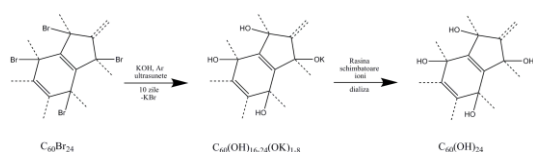
(v) – in planul diseminarii rezultatelor studiilor derulate in cadrul etapei 2012 a proiectului:

- evaluarea volumului de date experimentale disponibile;
- evaluarea nivelului fezabil privind accesul cu lucrari in publicatii si la manifestari stiintifice;
- pregatirea manuscriselor si depunerea lor spre publicare in cea mai favorabila varianta;
- diseminarea rezultatelor obtinute, in cadrul unor manifestari stiintifice nationale si internationale.

4. Rezultate experimentale obtinute in cadrul fazei 2012

4.1. Sinteza si purificarea derivatilor de fullerena C_{60} ($C_{60}(Br)_{24}$, $C_{60}(OH)_{24}$, $C_{60}(COOH)_{24}$), in calitate de precursori pentru obtinerea de vectori non-virali.

Fullerena bromurata ($C_{60}(Br)_{24}$) s-a obtinut prin reactia de aditie 1,4 a bromului la C_{60} , reactie catalizata de ferul metalic³. Solutia apoasa bazica de $C_{60}(Br)_{24}$ a fost mentinuta la temperatura camerei timp de zece zile, sub agitare continua si ultrasonata zilnic (cate 10 min.). Supernatantul rezultat in urma centrifugarii a fost tratat cu rasina schimbatoare de ioni pentru indepartea ionilor de potasiu si supus dializei timp de patru zile^{4,5} (Schema 1). $C_{60}(COOH)_{24}$ a fost obtinut prin reactia gruparilor hidroxilice ale $C_{60}(OH)_{24}$ (dizolvat in THF anhidru) cu anhidrida succinica, la temperatura camerei, sub agitare in atmosfera inerta timp de 24 ore, in prezenta trietilaminei. Structura compusilor $C_{60}(OH)_{24}$, $C_{60}(COOH)_{24}$ a fost elucidata prin spectroscopie de masa (ESI-MS), in ionizare negativa. In spectrul de masa (Figura 2) se observa picul predominant $m/z = 1127,2799$, specific pentru $C_{60}(OH)_{24}$.



Schema 1. Sinteza fullerenolului $C_{60}(OH)_{24}$

Figura 2. Spectrul de masa al $C_{60}(OH)_{24}$ in ionizare negativa

4.2. Simularea moleculara a precursorilor vectorilor non-virali.

Formarea, stabilitatea si reactivitatea compusului $C_{60}(OH)_{24}$ a fost confirmata si prin calcul teoretic *in silico*. Moleculele de fullenera si $C_{60}(OH)_{24}$ au fost optimizate, fara restrictii de simetrie, prin metoda semi-empirica PM3, iar apoi prin metoda DFT, folosind functionala B3LYP/6-31G.

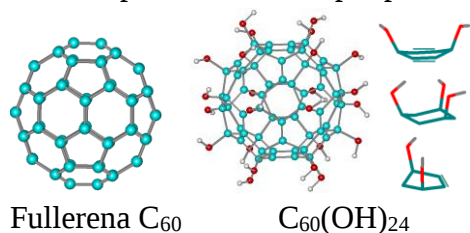


Figura 3. Structura optimizata a precursorului fulerenic

Pierderea conjugarii extinse in urma functionalizarii produce modificari conformationale specifice, dependente de gradul de nesaturare al ciclurilor condensate (ciclurile saturate de ciclohexan trisubstituite au o conformatie de tip scaun, in care substituentii hidroxil se gasesc in pozitiile axiale, pozitiile ecuatoriale fiind implicate in interconectarea cu ceilalti atomi din scheletul de baza). De aceea, reactia tuturor grupelor functionale ar putea fi dificila, dar este fezabila, in timp ce reactia partiala ar trebui sa decurga in conditii uzuale (reactivitatea gruparilor hidroxilice ar trebui sa fie similara cu cea a alcoolilor tertieri).

4.3. Sinteza, purificarea, caracterizarea si testarea citotoxicitatii pe linia celulara HepG2 a nanoparticulelor magnetice de tip miez-manta, cu structura magnetita-heparina-Rheina, in calitatea lor de sisteme nanometrice dirijabile la tinta, ce poseda activitate anticoagulanta si antitumoral.

Nanoparticulele magnetice acoperite cu specii chimice active mic- sau macro-moleculare pot fi dirijate si retinute in tesuturi prin intermediul unui camp magnetic local. Astfel de entitati s-au aplicat in imagistica de rezonanta magnetica nucleara, ca vectori pentru hipertermie in tratarea tumorilor maligne solide, sau ca agenti de transport a unor principii bioactive^{6,7}. In acest context a fost conceput, sintetizat si caracterizat un agent de transport complex, cu dimensiuni de 8 ± 2 nm, alcatuit dintr-un miez magnetic acoperit cu heparina, capabil a fi incarcat cu Rheina (medicament cu actiune antitumoral), ce a dovedit dubla functionalitate, respectiv ca sistem de vehiculare/eliberare a medicamentului si ca vector termoinductor in hipertermia curativa a cancerelor (Figura 4). Caracteristicile fizico-chimice si morfologice ale particulelor au fost evaluate prin FTIR, spectroscopie fotoelectronica de raze X (XPS), difuzia dinamica a luminii (DLS) si microscopia electronica de transmisie de inalta rezolutie (HRTEM), iar profilul eliberarii medicamentului s-a urmarit in UV-Vis. Citotoxicitatea complexului rezultat a fost testata *in vitro* pe o linie celulara de hepatocarcinom, HepG2. Rezultatele releva o activitate citotoxica ridicata, ce atinge maximul la o concentratie a Rheinei de 30 μ M.

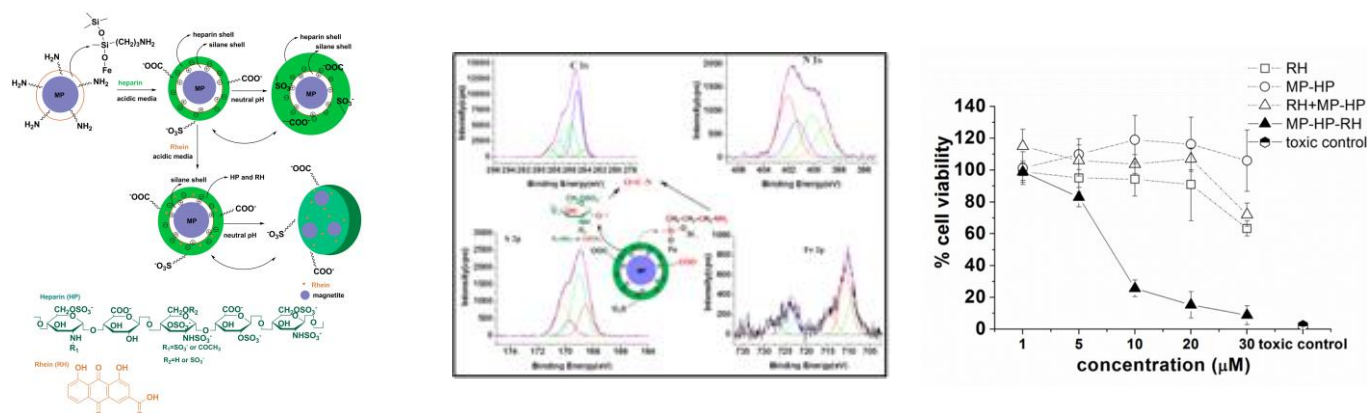


Figura 4. Sinteza, caracterizarea si testarea citotoxicitatii nanoparticulelor de magnetita-heparina-Rheina.

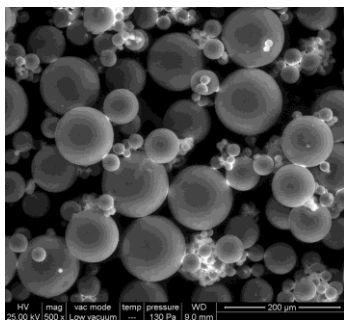


Figura 5. Microsfere de poli(NIPAAm-co-HEAAm)

isopropilacrilamida-co-N-hidroxietilacrilamida) reticulat cu aldehida glutarica sub temperatura LCST (Lower Critical Solution Temperature) (Figura 5). Copolimerul prezinta tranzitii de faza (proprietati termosensitive) la temperaturi de circa 37°C. LCST a fost determinat in conditii fiziologice, prin microcalorimetrie si turbidimetrie. Curba de eliberare a speciilor mic moleculare incarcate in microsfere prezinta un salt net la variatia temperaturii de la 32 la 40°C.

4.6. Obținerea si caracterizarea precursorilor destinati realizarii substitutelor matricei extracelulare

Strategia experimentală generală avută în vedere în cazul precursorilor componente organice a compozitului ce urmează a constitui substitutul matricei extracelulare cuprinde: **(i)** prepararea soluțiilor coloidale ale precursorilor (aK: ateloclagen, NaHyal: sarea de sodiu a acidului hialuronic, Gellan: gelan nativ); **(ii)** investigarea comparativă a domeniilor de autoasociere a macromoleculelor de scleroproteina (aK) și polizaharide (NaHyal și Gellan) pe scala de pH; **(iii)** estimarea pragului la care apare efectul de „încălire” (entanglement threshold) în soluțiile de biopolimeri, precum și a dependenței acestui efect de temperatura soluțiilor coloidale; **(iv)** estimarea dependenței vascozității soluțiilor diluate de biopolimeri cu temperatura; **(v)** estimarea domeniilor de concentrație fezabile la amestecarea aK cu NaHyal și respectiv cu Gellan, astfel încât să nu se depășească pragul de „încălire” al biomacromoleculelor în soluția rezultată; **(vi)** investigarea segregării de faza în amestecuri binare de aK și polizaharide; **(vii)** stabilirea limitelor de miscibilitate în amestecuri ternare de aK, NaHyal și Gellan. Diagramele binare de faza obținute în cadrul etapei (vi) sunt prezentate în figura 6.

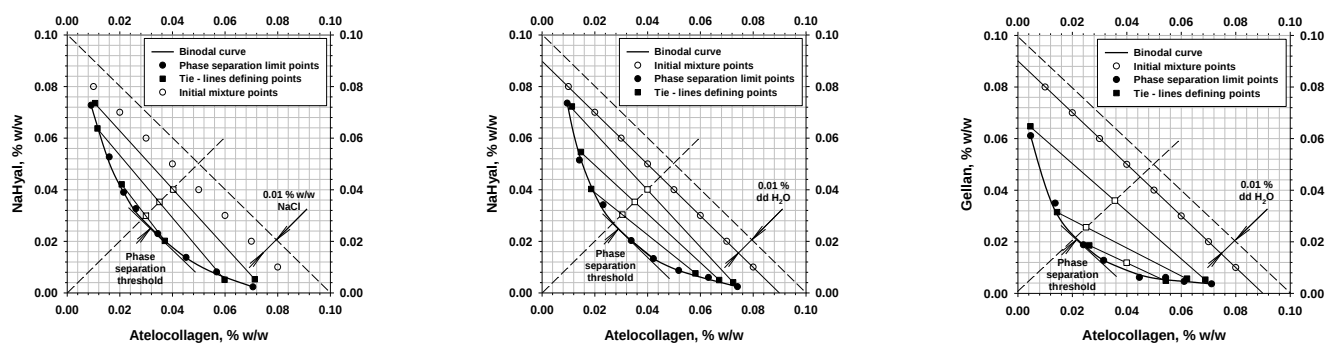


Figura 6. Diagramele binare de faza pentru amestecurile de ateloclagen si hialuronat, respectiv gelan.

4.7. Obținerea si caracterizarea hidrogelurilor si a criogelurilor pe baza de ateloclagen si glicozamino-glicani, destinate realizarii substitutului matricei extracelulare, prin tehnici combinate de reticulare cu polimeri bifuncționali reactivi (agenți de reticulare la mare distanță), urmată de iradiere UV (reticulare la mică distanță). Opt variante de criogeluri ateloclagen / dimetilsilandioli - hialuronat / poli(ε-

caprolactona) (AteCol-DMSHA-PCL) au fost produse si testate *in vitro* si *in vivo*. Biocompatibilitatea si totala bioresorbabilitate a probelor sunt dovedite prin analiza histologica a situsurilor de implantare in derma animalelor de laborator (Figura 7).

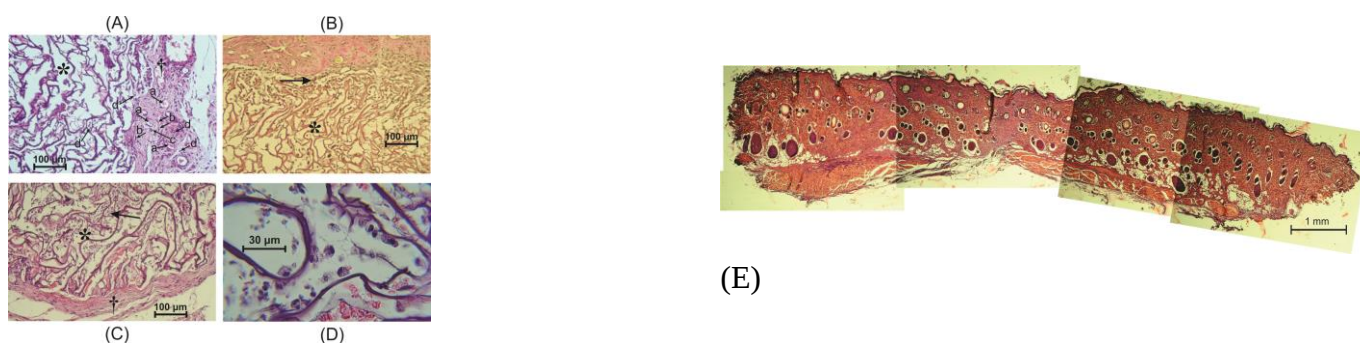


Figura 7. Caracterizarea histologica a situsului de implantare a criogelurilor testate, in cursul resorbției la nivelul dermei (A – D) si la finalul procesului de resorbție si remodelare tisulara (E).

Rezultatele științifice ale derularii etapei 2012 in cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Sinoptic:

- lucrari stiintifice publicate: **2**;
- lucrari stiintifice trimise spre publicare: **7**;
- participari la manifestari stiintifice, prezentari orale si postere: **14**;
- cursuri / traininguri: **6**;
- actualizare pagina web: <http://www.intelcentru.ro/index-5-a.html>;
- lansare proiect: 27 iunie 2012 la sediul beneficiarului.

RAPORT STIINTIFIC

pentru faza 2013, unica, a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Problematica abordata in cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-028, in etapa 2013

Conform obiectivelor prevazute pentru etapa 2013, activitatile in cadrul proiectului au vizat:

(i) - in planul formularii principiilor si in cel al studiilor experimentale privind realizarea de vectori genetici non-virali:

- elaborarea schemelor si alternativelor de sinteza, precum si a protocoalelor de caracterizare a unor precursori si vectori unitari destinati transfectiei mediate non-viral;
- sinteza si caracterizarea unor carrieri particulati, de tipul microsferelor termosensibile, destinati legarii si vehicularii unor adjuvanti ai transfectarii *ex-vivo* (specii farmacologic-active model);
- sinteza si caracterizarea unor (nano)conjugate apte a chemo-mima histonele, asociind reversibil acizi nucleici in vederea vehicularii lor in proceduri *ex-vivo*;
- generarea si caracterizarea unor structuri tridimensionale apte a functiona drept substrat citiprietenos cu abilitati de transfectie, din clasa substitutelor matricei extracelulare a tesutului osos;

(ii) - in planul coeziunii colectivelor si in cel al extinderii competentelor profesionale:

- formarea profesionala integrata, complementara, prin elaborarea in comun a strategiilor de documentare si experimentare, precum si a politicii de diseminare a rezultatelor stiintifice;

(iii) - in planul asigurarii materiale a derularii proiectului:

- evaluarea functionalitatii echipamentelor suport ce sustin realizarea sarcinilor de cercetare in cadrul proiectului;
- achizitionarea de echipamente noi, instrumentar de laborator, reactivi necesari derularii etapei 2013 si/sau a studiilor preliminare pentru etapa 2014 a proiectului;
- asigurarea functionalitatii echipamentelor achizitionate;
- stabilirea necesarului de echipamente noi, de instrumentar de laborator si de reactivi destinate derularii experimentelor in cadrul etapei 2014 a proiectului;

(iv) - in planul diseminarii rezultatelor studiilor derulate in cadrul etapei 2013 a proiectului:

- evaluarea volumului de date experimentale disponibile si a bazei documentare si logistice pentru raportarea rezultatelor in cadrul etapei 2013, precum si schitarea sarcinilor de experimentare si modelare pentru sustinerea diseminarii rezultatelor in cadrul etapei urmatoare;
- participare la manifestari stiintifice;
- efectuare de stagii de pregatire si training-uri in laboratoare din strainatate;
- pregatirea manuscriselor si depunerea lor spre publicare.

1. Rezultate experimentale obtinute in cadrul fazei 2013 a proiectului

1.1. Obținerea și caracterizarea unor conjugate ale fullerenei, cu abilități de vector genetic

Un carrier unitar având fullerenul C_{60} drept entitate centrală și polietilenimina ramificată (PEI, M_n 2000) drept înveliș cationic a fost sintetizat conform schemei de reacție generice prezentată în Figura 1.a. Cinetica reacției a fost urmărită prin spectroscopie UV-VIS, monitorizând picul de la $\lambda=330$ nm până la dispariția sa⁸. Abilitatea conjugatului de a transporta tronsoane de ADN cu lungimea de 25 kilobaze azotate, extras din sperma de somon, a fost demonstrată prin electroforeza pe gel de agaroză, pentru diverse rapoarte între numărul de moli de grupări aminice ale carrier-ului și numărul de moli de grupări fosfat ale ADN-ului (N/P), așa cum se prezintă în Figura 1.b. Caracterizarea fizico-chimică a carrier-ului unitar s-a efectuat, între altele, prin analiză XPS și termogravimetrică⁹ (Figurile 1.c. și 1.d.; tabelul 1). Diferența de 5°C între temperatura de vitrifiere, T_g , pentru PEI (-57°C) și cea pentru conjugatul C_{60} – PEI (-52°C) confirmă faptul că fullerenul a reactionat cu polimerul prin formarea a cel puțin unei legături covalente (-C-NH-), iar picul exoterm de la 160°C pune în evidență împachetarea conjugatului printr-un proces similar cristalizării, ca urmare a grefării macromoleculelor de PEI pe suprafața C_{60} .

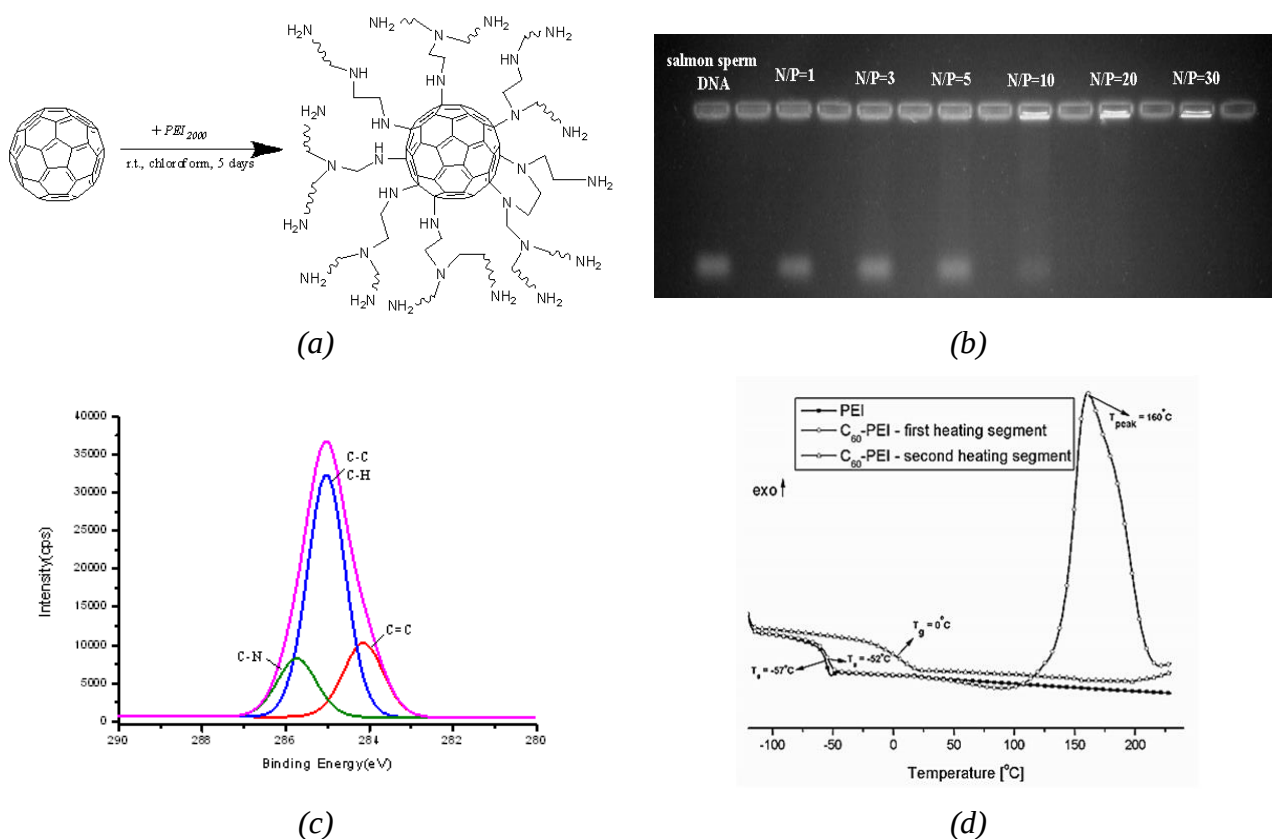


Figura 1. Schema de sinteză a carrier-ului unitar C_{60} – PEI și caracterizarea acestuia.

Tabelul 1. Rezultatele analizei XPS pentru conjugatul C_{60} – PEI.

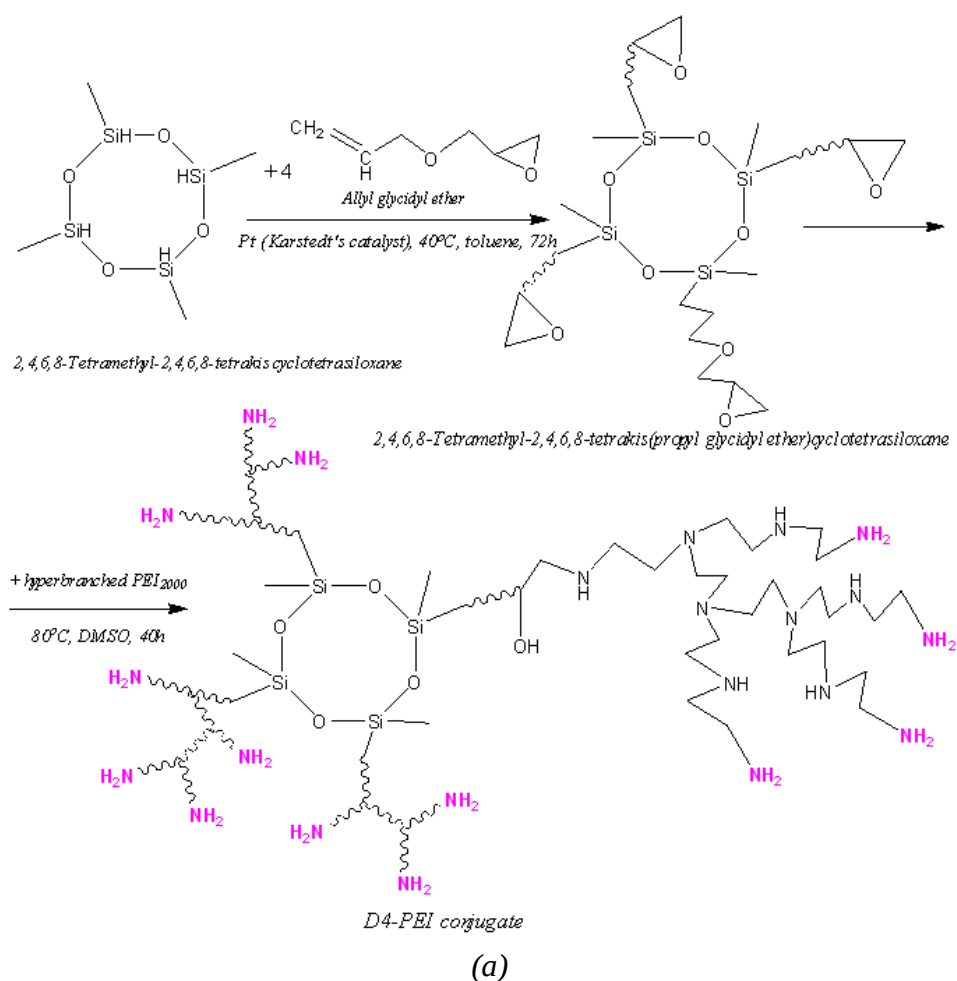
Elementul chimic	C	N	Atribuirea legaturilor	C=C	C-C/C-H	C-N
Concentratia elementala (%)	72.41	27.59	Energia de legatura (eV)	284.2	285	285.7
Concentratia masica (%)	69.23	30.77	Concentratia relativa (%)	20.49	63.66	15.85

1.2. Obținerea și caracterizarea unor conjugate de tipul 2,4,6,8-tetrametil-ciclo-tetrasiloxan-PEI (D4-PEI)

Sinteza conjugatului dintre 2,4,6,8-tetrametil-2,4,6,8-tetrakis-ciclo-tetrasiloxan și polietilenimina ramificată s-a realizat în două etape, conform schemei de reacție din Figura 2.a. Capacitatea sa de transport a ADN-ului s-a determinat prin electroforeza pe gel de agaroză (Figura 2.b), similar tehnicii menționate în paragraful 4.1. Dimensiunile complexului conjugat – ADN au fost măsurate prin AFM (Figura 2.c). Structura sa a fost pusă în evidență, între altele, prin ^1H -RMN și XPS (Figurile 2.d și 2.e; Tabelul 2).

Tabelul 2. Rezultatele analizei XPS pentru conjugatul D4-PEI.

Elementul	O	N	C	Si
Concentrația elementală (%)	7.43	24.48	65.94	2.15
Concentrația masică (%)	9.05	26.10	60.27	4.59



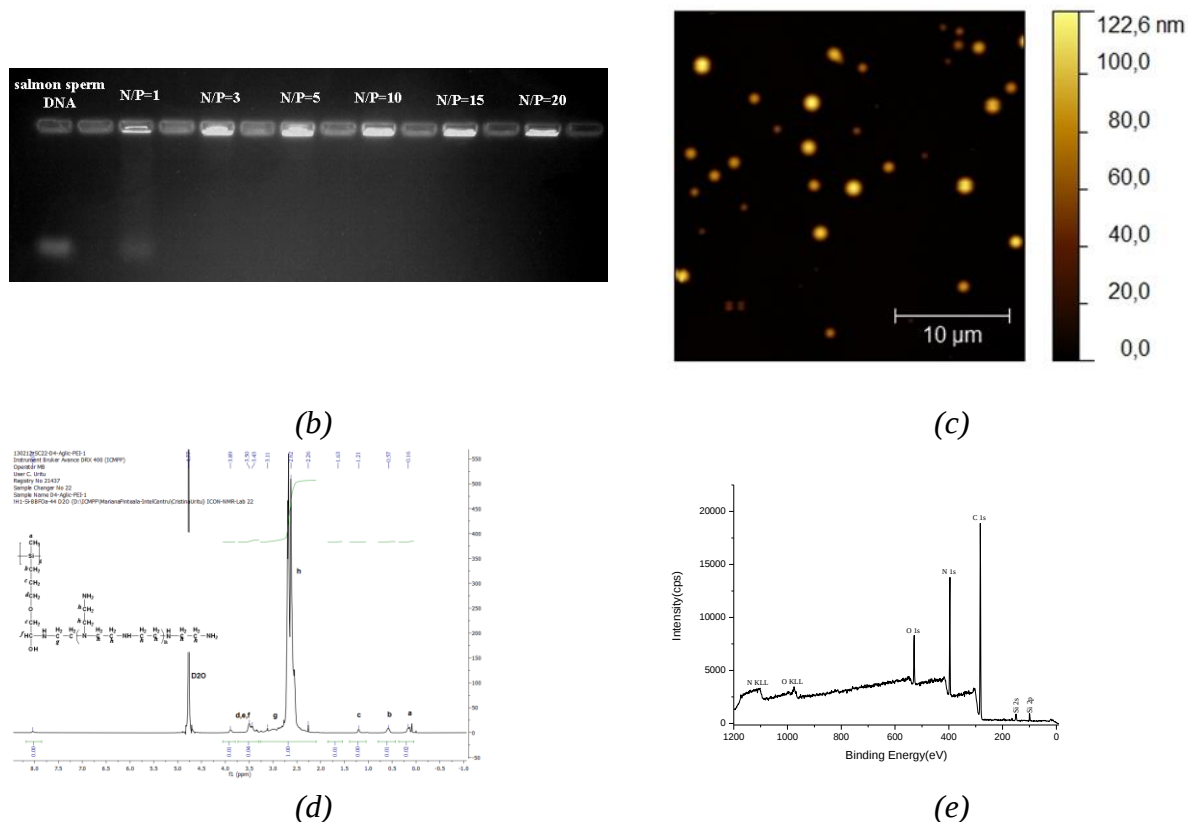


Figura 2. Schema de sinteza si caracterizarea carrier-ului cu miez ciclo-siloxanic si invelis cationic.

Electroforeza pe gel de agaroză pentru diferite rapoarte N/P a confirmat abilitatea carrier-ului D4/PEI de a complexa tronsoanele de ADN din sperma de somon (25 kb lungime). Valorile potențialului zeta ale complexelor formate variază între 20 mV, pentru D4/PEI neîncărcat, și -20 mV pentru o încărcare cu ADN la raportul N/P de aproximativ 1:1, confirmând o dată în plus abilitatea conjugatului D4/PEI de a complexa ADN. Pentru cargocomplexul D4-PEI/ADN cu aceeași încărcare (raportul N/P de 1:1) imaginea AFM pune în evidență o morfologie sferoidală, la dimensiuni omogene de circa 200 nm.

1.3. Studiul *in vitro* a cargocomplexelor C₆₀-PEI/ADN și D4-PEI/ADN

Studiul *in vitro* s-a realizat pentru conjugatele C₆₀-PEI cu compoziția elementală 76,63 % C și 23,37 % N, respectiv D4-PEI conținând 4,59 % Si, 60,27 % C, 26,1 % N și 9,05 % O, prin comparare cu compusul model PEI, caracterizat prin compoziția elementală 62,01 % C și 37,99 % N, toate contribuțiile procentuale fiind determinate prin analiza XPS. Drept partener de complexare s-a utilizat plasmida pEYFP-C1, care codifică o proteină fluorescentă cu lungimile de undă de excitație/emisie: 513/527 nm. Cunoșcându-se că 1 mg DNA plasmidic conține 3 μmoli de fosfor, s-au calculat diverse rapoarte N/P prin varierea cantității de carrier, pentru o cantitate constantă de ADN. Conjugatele C₆₀-PEI/ADN, D4-PEI/ADN, PEI/ADN au fost incubate timp de 30 minute la temperatura ambiantă, înaintea utilizării, iar apoi au fost analizate prin electroforeza pe gel de 0.8% agaroză conținând SYBR[®] Green (pentru colorarea ADN) în tampon TAE (Tris-acetat - EDTA). Electroforeza a fost efectuată la o diferență de potențial de 60 V, timp de 30 minute. La final, gelurile au fost fotografiate sub expunere la UV (Figura 3). Rezultatele DLS (prezentate în Tabelul 3) indică faptul că nu apar modificări semnificative ale dimensiunilor carrier-ilor înainte și după complexarea cu ADN (pEYFP), un bun indiciu asupra capacității de încărcare cu plasmid, fapt echivalent cu

o foarte buna impachetare a ADN-ului in cargocomplex. Asadar, carrier-ii nanoparticulati sintetizati si testati isi joaca, *in vitro*, in mod evident, rolul scontat, acela de vector genetic non-viral.

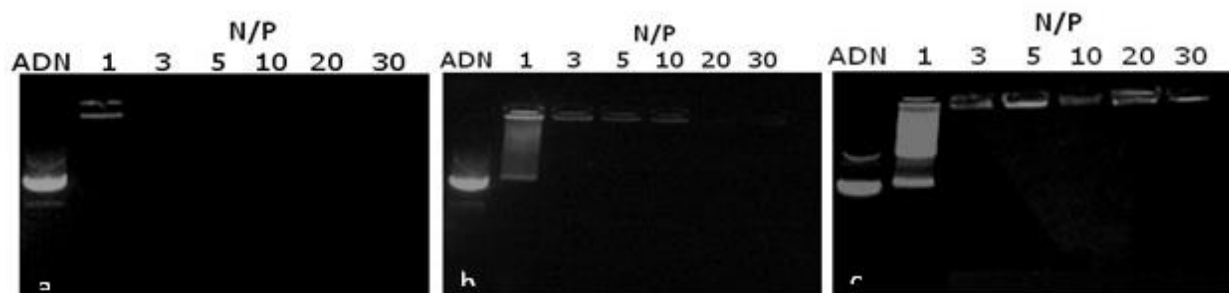
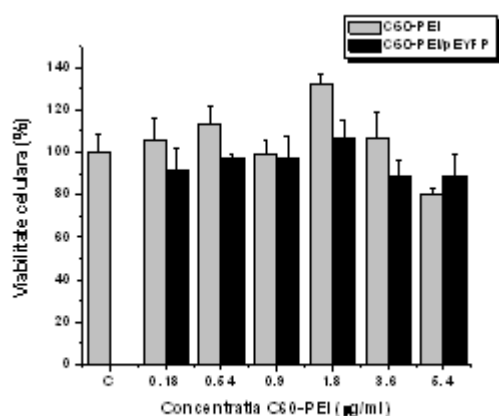


Figura 3. Rezultatele electroforezei pe gel de agaroz a cargocomplexilor C_{60} -PEI/pEYFP (a), D4-PEI/pEYFP (b) si PEI/pEYFP (c), pentru diferite rapoarte N/P. Cantitati crescande de carrieri (C_{60} -PEI, D4-PEI si PEI) au fost adaugate la o cantitate constanta de ADN, de 1µg/mL, pentru a se obtine valori ale raportului N/P de 1:1, 3:1, 5:1, 10:1, 20:1 si 30:1.

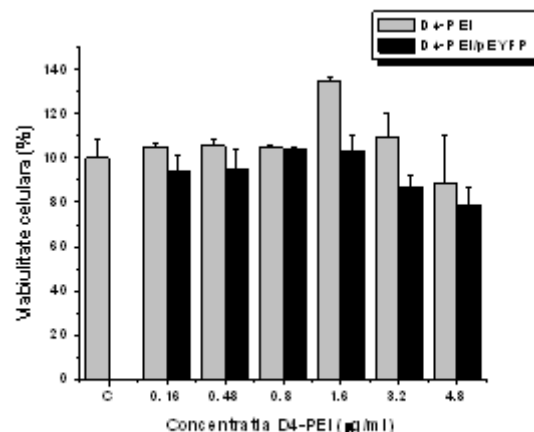
Citotoxicitatea cargocomplexilor incarcati sau nu cu ADN a fost testata asupra liniei celulare HEK 293T. Analizand rezultatele prezentate in Figurile 4.a si 4.b se constata, in cazul incubarii in prezenta C_{60} -PEI, D4-PEI, C_{60} -PEI/pADN si D4-PEI/pADN, ca viabilitatea celulelor se situeaza in plaja culturii de control (notata cu C), insa pentru concentratii de peste 5.4 µg/mL, pentru C_{60} -PEI, respectiv de peste 4.8 µg/mL, pentru D4-PEI, viabilitatea se reduce la circa 80 % in raport cu cultura de control. In cazul compusului PEI (Figura 4.c) se constata scaderea progresiva a viabilitatii pentru concentratii mai mari decat 0.55 µg/mL, atingandu-se o valoare de circa 50 % in cazul concentratiilor de 2.2 µg/mL si 3.3 µg/mL, concentratii de PEI similre cu cele utilizate pentru obtinerea rapoartelor N/P de 20:1 si respectiv 30:1. Asadar, complexarea PEI cu pADN determina cresterea viabilitatii celulare la valori peste cele ale probelor de control (celule incubate in mediu de cultura in absenta PEI ori a cargocomplexilor incarcati sau nu cu pADN), pentru concentratii ale PEI intre 0.1 si 2.2 µg/mL. Incubarea celulelor HEK 293T in prezenta cargocomplexilor incarcati cu pADN, la concentratii echivalente in PEI de 3.3 µg/mL determina reducerea viabilitatii pana la circa 70 % in raport cu proba de control.

Tabelul 3. Rezultatele analizei DLS pentru cargocomplexii incarcati cu ADN plasmidic si respectiv liberi de acesta, prin comparatie cu etalonul PEI.

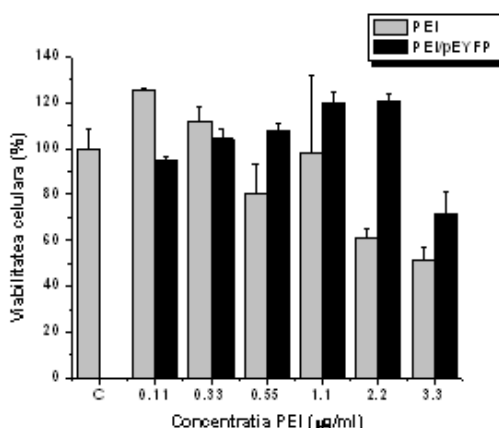
Proba	Dimensiunea (nm) ± SD					
	N/P 1:1	N/P 3:1	N/P 5:1	N/P 10:1	N/P 20:1	N/P 30:1
C_{60} -PEI/pADN	8.4±0.8 (99.9%) 54±5.5 (0.1%)	8.4±0.8 (99.4%) 51.5±6.5 (0.6%)	7.3±1.3(99.5%) 84±8(0.43%)	8.4±0.8(99.5%) 73.9±8.1(0.5%)	5.7±0.3(82.99%) 12.7±1.8(16.96%) 205.2±20.7(0.05%)	7±0.6(97.35%) 18.6±2(2.64%)
D4-PEI/pADN	6.1±0.6 (88.5%) 15.7±1.6 (11.46%) 224±14.2 (0.04%)	6.2±0.8 (88.5%) 60.4±7.2 (0.55%)	8.5±1.1(99.3%) 59.3±5.4(0.67%)	7.4±0.7(99.76%) 70.4±2.9(0.24%)	6.5±0.6(92.46%) 17.2±1.9(7.5%)	6.3±0.5 (100%)
PEI/pADN	7.7±0.7 (97.56%) 31±2.9 (2.4%) 228.6±12.2 (0.05%)	7.2±0.8 (95.33%) 21.9±2.7 (4.62%) 228.5±12.2(0.05%)	5.7±0.3(86.27%) 15.4±1(11.91%) 21.8±0.9(1.83%)	6.2±0.3(59.12%) 10.1±1.1(40.66%) 92.5±0.3(0.22%)	7.4±0.8(98.17%) 36.2±3.9(1.8%) 229±21(0.02%)	6.6±0.7(99.96%) 228.5±12.3(0.04%)
C_{60} -PEI			7.08±0.89 (98.89%) 60.46 ±19.18 (1.11%)			
D4-PEI			7.18±1.29 (82.6%) 32.46±18.06 (17.38%) 215.66±23.18 (0.02%)			
PEI			7.35±0.723 (97.1%) 31.2±8.1 (2.88%) 219±8.48 (8.48%)			



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Citotoxicitatea compusilor C_{60} -PEI (a), D4-PEI (b) si PEI (c), liberi sau complexati cu ADN plasmidic pEYFP, indusa asupra celulelor epiteliale HEK 293T, dupa 48 de ore, in cultura.

Concentratia pADN a fost mentinuta la valoarea constanta de $1\mu\text{g/mL}$, iar concentratia compusilor studiiati a fost variata astfel incat sa se obtina rapoarte N/P de 1:1, 3:1, 5:1, 10:1, 20:1 si 30:1.

1.4. Evaluarea eficientei de transfectie *in vitro* a cargocomplexsilor C_{60} -PEI/ADN si D4-PEI/ADN

Expresia genei reporter purtate de plasmida pEYFP-C1 si respectiv exprimarea proteinei fluorescente YFP ca urmare a transfectarii aplicate liniei celulare HEK 293T a fost estimata prin tehnica microscopiei de fluorescenta, utilizand microscopul Olympus IX81. Au fost astfel obtinute imagini reprezentative pentru transfectarea cargocomplexsilor C_{60} -PEI/pEYFP, D4-PEI/pEYFP si pentru poliplexul PEI/pEYFP, la rapoartele N/P de 1:1, 10:1, 20:1 si 30:1. Figura 5 prezinta, in mod ilustrativ, efectele transfectiei efectuate cu cargocomplexul C_{60} -PEI/pEYFP. Eficienta de transfectie asupra celulelor HEK 293T atinge un maxim pentru raportul N/P de 1:10, scazand apoi in seria experimentală. Transfectarea mediata de cargocomplexul D4-PEI/pEYFP si de catre poliplexul PEI/pEYFP conduce la exprimarea proteinei YFP in cantitati extrem de scazute (sub 10 celule transfectate per camp, in observarea la o marire de 400 de ori).

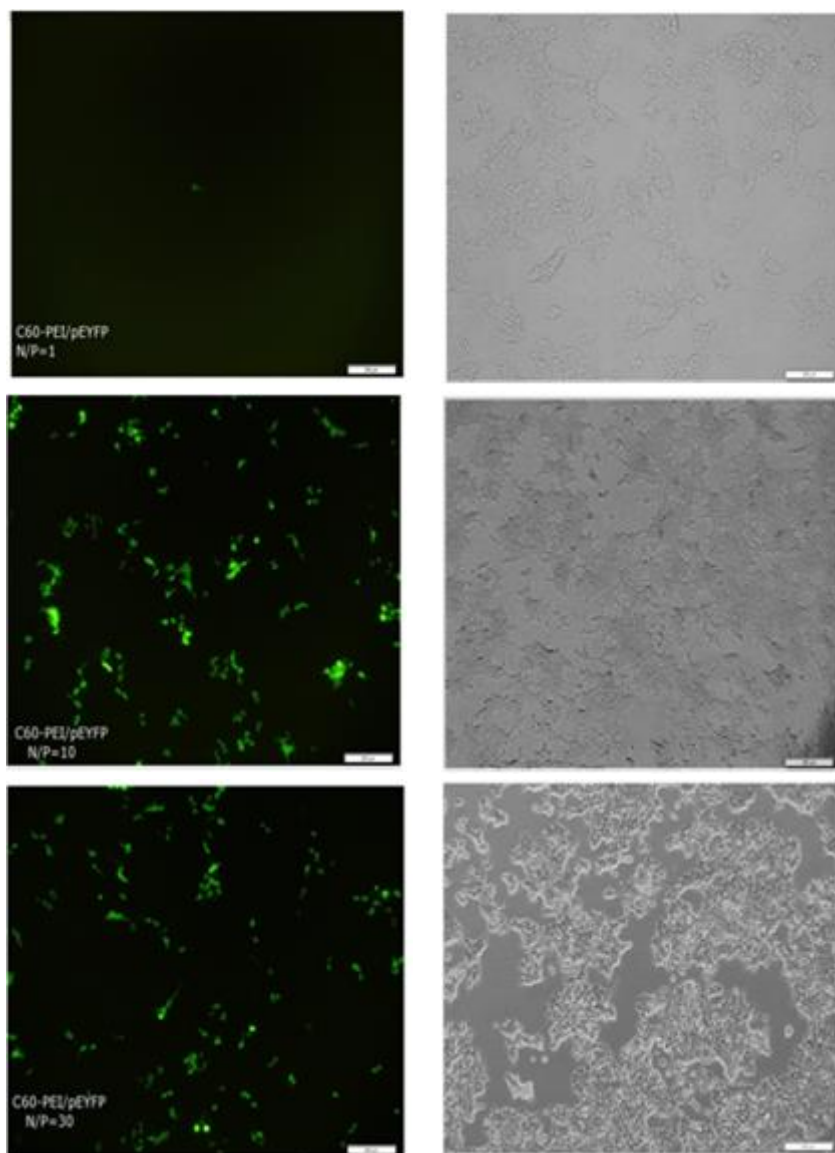
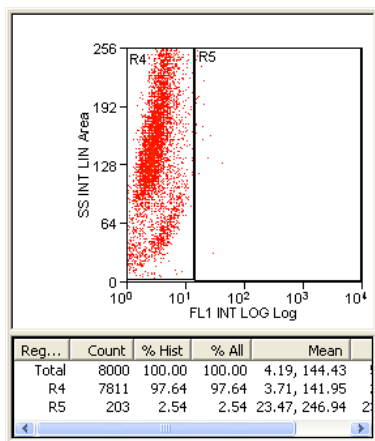


Figura 5. Imagini obtinute prin microscopie de fluorescență (stanga) și cu contrast de fază (dreapta) pentru același câmp, reprezentând exprimarea proteinei fluorescente YFP în celule HEK 293T transfectate cu plasmida pEYFP încarcată în cargocomplexul C₆₀-PEI, la rapoartele N/P de 1:1, 10:1 și 30:1.

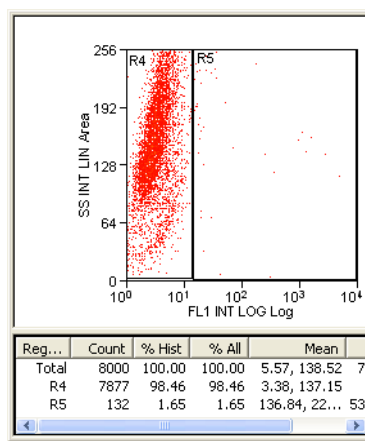
Bara: 200 μ m.

Eficiența transfecției a fost, de asemenea, urmărită prin flux-citometrie, determinând procentul celulelor YFP-pozitive în canalul FL1 (Figura 6, ilustrativă). Această analiză cantitativă a confirmat rezultatele stabilite prin microscopia de fluorescență, indicând că, după transfectarea cu cargocomplexul C₆₀-PEI/pEYFP, 4.32 %, 20.8 %, 15 % și respectiv 28 % din 8.000 de celule analizate au exprimat proteina fluorescență YFP, corespunzător rapoartelor de încărcare cu plasmida, N/P, de 5:1, 10:1, 20:1 și respectiv 30:1. Intensitatea medie a fluorescenței celulelor transfectate reprezintă o măsură a eficienței transfecției. În acest sens, compararea cu proba de control indică o creștere de peste 50 de ori a intensității fluorescenței celulelor după transfectarea cu C₆₀-PEI/pEYFP, la rapoarte N/P mai mari decât 10:1. Acest fapt confirmă încă o dată abilitatea de vector genetic non-viral a conjugatului C₆₀-PEI.

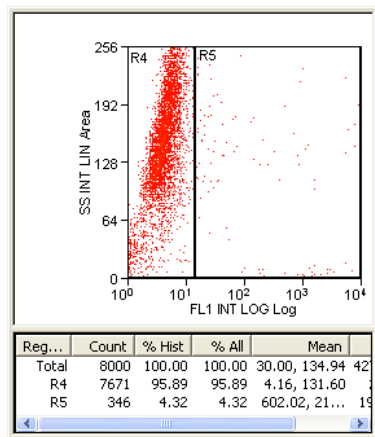
În cazul conjugatului D4-PEI și a poliplexului PEI, procentul de celule transfectate este scăzut, înregistrându-se maximum 7 % și respectiv 20 % celule fluorescente. Comparativ cu conjugatele C₆₀-PEI, intensitatea medie a fluorescenței celulelor transfectate cu cei doi vectori menționați se menține relativ scăzută, sugerând o eficiență modestă de transfecție, probabil și drept urmare a citotoxicității sporite.



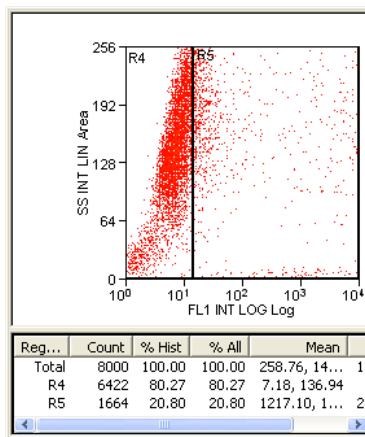
C₆₀-PEI; N/P = 1



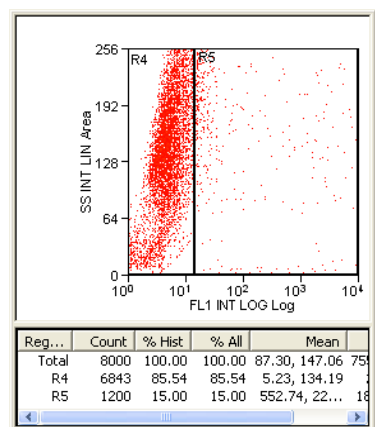
C₆₀-PEI; N/P = 3



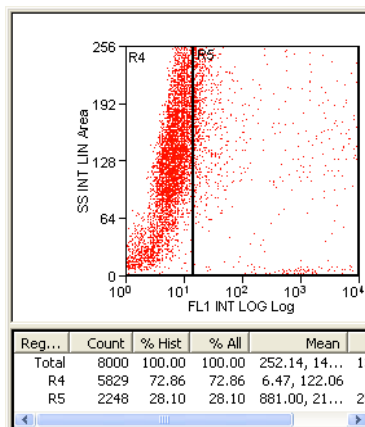
C₆₀-PEI; N/P = 5



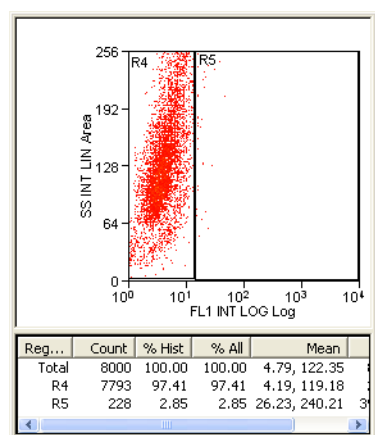
C₆₀-PEI; N/P = 10



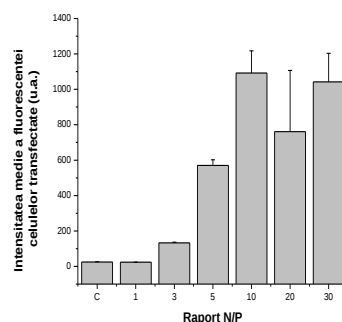
C₆₀-PEI; N/P = 20



C₆₀-PEI; N/P = 30



Proba de control



Compararea statistica a eficientei transfectarii in raport cu proba de control

Figura 6. Identificarea prin flux-citometrie a celulelor HEK 293T netransfectate (proba de control) si respectiv transfectate cu plasmida pEYFP incarcata pe C₆₀-PEI, la diverse rapoarte N/P. Sunt prezentate dot ploturi SSC (side scattering) versus FL1 (canalul de fluorescenta in care se masoara fluorescenta YFP); in poarta R4 se observa celulele YFP-negative, iar in poarta R5 se situeaza populatia de celule YFP-pozitive. Pentru fiecare dot plot se observa procentul de celule YFP-pozitive in poarta R5 si intensitatea medie a fluorescentei celulelor. Histograma finala reda intensitatea medie a fluorescentei celulelor transfectate in functie de raportul N/P pentru cargocomplecscii C₆₀-PEI/pEYFP.

În urma studiilor de evaluare a eficienței transfecției mediate de cei doi cargocomplecși studiați (C₆₀-PEI/pEYFP, D4-PEI/pEYFP) și de poliplexul PEI/pEYFP, se desprind următoarele concluzii:

(1) analiza dimensiunii celor trei vectori (C₆₀-PEI/pEYFP, D4-PEI/pEYFP și PEI/pEYFP) efectuată măsurând imprastierea elastică a luminii laser a indicat o populație majoritară, în cazul tuturor complexelor, cu dimensiuni de aproximativ 7 nm;

(2) electroforeza pe gel de agaroză a arătat că C₆₀-PEI complexează total ADN plasmidic începând de la valori ale raportului N/P de 1:1, în timp ce D4-PEI și PEI complexează pADN-ul începând de la valori ale raportului N/P de 3:1.

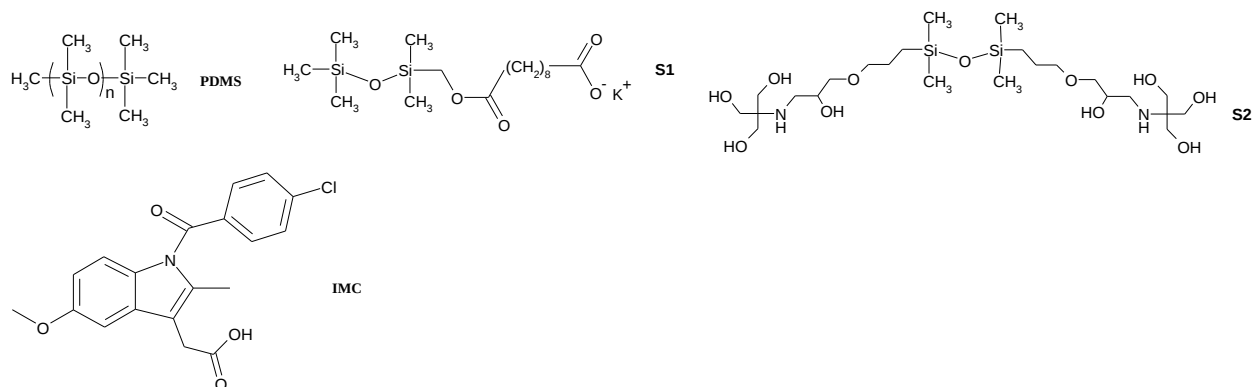
(3) viabilitatea celulelor HEK 293T nu este afectată semnificativ de incubarea cu compusii C₆₀-PEI și D4-PEI, ori cu poliplexii C₆₀-PEI/pEYFP și D4-PEI/pEYFP, obținându-se valori de circa 80 % în raport cu proba de control; în schimb, în polimerul cationic PEI induce un efect citotoxic mai pronunțat, înregistrându-se viabilități de doar 50 % pentru concentrații peste 2.2 μg/mL. Complexarea PEI cu pADN determină creșterea viabilității celulare, obținându-se valori peste cele ale probei de control pentru concentrații ale PEI cuprinse între 0.1 și 2.2 μg/mL, fapt echivalent cu inducerea proliferării;

(4) folosind două metode de investigare, microscopia de fluorescență și flux-citometria, s-a stabilit faptul că eficiența de transfecție asupra celulelor HEK 293T a cargocomplexelor C₆₀-PEI/pEYFP crește odată cu creșterea raportului N/P de la 1:1 la 10:1, iar apoi scade sensibil pentru valori ale raportului N/P de 20:1 și 30:1; în cazul complexelor D4-PEI/pEYFP și PEI/pEYFP, exprimarea proteinei fluorescente YFP poate fi detectată, dar eficiența transfecției este extrem de scăzută, de sub 10 celule transfectate per câmp vizual.

1.5. Obținerea și caracterizarea micro- și nano-particulelor siloxanice cu potențial de transfecție

Siliciul amorf este un material biodegradabil. Atunci când este utilizat drept biomaterial ori ca vector pentru compusi farmacologic-activi, este rapid metabolizat, iar excesul se elimină din organismul uman prin urină, fără a afecta local ori sistemic ciclurile biochimice fiziologice. Din acest motiv, compusii cu siliciu (mic-moleculari, ori polimerici), precum și particulele continuând diverse forme și compusi ai siliciului, prezintă interes drept transportori și ca substraturi în transfecție. În acest sens, în cadrul proiectului s-au investigat posibilitățile de realizare a unor carrier-i coloidalii ai acizilor nucleici și ai adjuvanților necesari pentru a asista procesele de transfecție, bazate pe polidimetilsiloxan (PDMS).

Precursorii utilizați pentru realizarea nanoparticulelor sunt un telomer polidimetilsiloxanic dihidroxilat (Mn=30000, Rhodia), tetraetoxisilanul (TEOS) și doi surfactanți (S1 și S2); structurile chimice ale precursorilor sunt prezentate mai jos, alături de compusul farmaceutic model utilizat, indometacinul (IMC). Sarea de potasiu a pentametilsilicometildisiloxanului (S1) a fost preparată conform referinței [4], atingându-se valoarea CMC la 0.087 g/L. Disiloxanul modificat cu trometamol (S2) a fost sintetizat conform referinței [5], iar valoarea CMC determinată a fost de 0.066 g/L.



În vederea sintezei, PDMS și IMC au fost dizolvați separat în THF, apoi soluțiile lor s-au amestecat în diferite proporții și s-au supus agitații la temperatura ambiantă. În continuare, solventul a fost eliminat la presiune redusă iar reziduul rămas a fost stocat în recipiente închise. Amestecuri cu un conținut de 20-60 % IMC (PDMS+IMC = 40mg) au fost dizolvate în câte 4 mL THF și au fost pregătite pentru prepararea nanoparticulelor, prin precipitare în soluții apoase diluate de surfactanți cu structură siloxanică. Pentru a verifica compoziția precipitatului, IMC a fost recuperat prin extracție cu etanol (în care PDMS nu este solubil). Determinarea cantitativă s-a realizat gravimetric și spectrofotometric (la 318 nm, în etanol). În precipitat s-a identificat un conținut de IMC mai ridicat cu 2-5 %. În paralel, din dispersia de nanoparticule s-au extras probe a câte 0.1 mL, care au fost diluate cu câte 4 mL etanol și apoi conținutul lor de IMC a fost determinat spectrofotometric. Pentru a studia influența matricei reticulate, în experimente separate, înainte de precipitare, la soluția de THF rezultată după amestecarea inițială s-a adăugat drept agent de reticulare 50% w/w TEOS raportat la conținutul de PDMS, precum și catalizator de condensare (dibutil-staniu dilaurat, DBTDL), așa cum se exemplifică în Tabelul 4. Faza organică a fost apoi injectată în 8 mL soluție apoasă de surfactanți (1g/L în cazul S1, respectiv 0.8 g/L în cazul S2), sub agitare moderată. După 15 minute, THF și o cantitate mică de apă (1-2 mL) au fost eliminate la rotaevaporator (40 °C, 40 mmHg). Atunci când s-a observat formarea unui precipitat, amestecul de reacție a fost filtrat prin hârtie de filtru, iar filtratul a fost utilizat în continuare pentru izolarea și caracterizarea dispersiei de nanoparticule. Diametrul mediu al particulelor și distribuția lor dimensională (indicele de polidispersitate, PDI) au fost determinate prin tehnica dispersiei dinamice a luminii (DLS), utilizând echipamentul Zetasizer NS (Malvern Instruments, UK), care utilizează detectarea prin retrodifuziune non-invazivă (NIBS), sub un unghi de 173° și la lungimea de undă a laserului de 633 nm.

Tabelul 4. Receptura de preparare și caracteristicile nano- și micro-particulelor obținute.

Cod NP	Cod amestec; conținut M %	Agentul de reticulare	Surfactantul	Randament (M) % ^a	Conținut M în NP, % DL ^b	Z _{ave} (nm)	PDI
A	1; 20	-	S1	100	19.9±0.1	252	0.413
B	1; 20	TEOS, DBTDL	S1	93	39.8±0.3	214	0.432
C	3; 50	TEOS	S1	88	49±0.3	246	0.422
D	4; 60	TEOS, DBTDL	S1	81	58.6±0.2	165	0.240
E	1; 20	-	S2	100	20±0.1	298	0.443
F	2; 40	-	S2	89	39.7±0.2	485	0.534
G	2; 40	TEOS,	S2	51	39.2±0.3	452	0.256

		DBTDL					
H	3; 50	-	S2	64	48.5±0.2	488	0.470

^a Calculat ca $[(m_0 - m_p) / m_0] \times 100$.

^b Calculat ca $[m_d / (m_0 - m_p)] \times 100$.

m_0 – masa initiala a amestecului; m_p – masa precipitatului; m_d – masa de IMC incapsulat.

Eficienta procesului de nanoprecipitare (exprimata ca randament de obtinere a nanoparticulelor, M) a scazut odata cu cresterea continutului de IMC in amestecul initial. Cantitatea de IMC cristalin care nu este dizolvata in matricea polimera ar putea fi motivul pentru diminuarea eficientei de nanoprecipitare. Adaugarea reactivilor de reticulare a dus la o precipitare mai pronuntata, scazand astfel randamentul nanoprecipitarii. Reactia de reticulare a PDMS are loc in interiorul particulelor formate. Incarcatura de IMC in nanoparticule a fost usor mai scazuta decat dozajul in compozitia initiala, diferenta regasindu-se in precipitatul format si separat. In particulele reticulate, continutul initial de IMC a fost calculat tinand cont de reactivii adaugati.

Nanoparticulele rezultate au fost caracterizate prin SEM, utilizand Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) Quanta 200, la 30 kV si detectorul de electroni secundari. Analiza elementala calitativa si cantitativa a fos efectuata utilizand sistemul EDX al aceluasi echipament. Figura 7 prezinta imagini ilustrative ale nanoparticulelor obtinute, iar in Figura 8 se reda distributia dimensionala a particulelor ale caror imagini sunt reunite in Figura 7. Se pot observa particule sub-micronice, care tind sa se aglomereze datorita concentrarii ce survine in cursul uscarii. Rezultatul analizei EDX aplicate suprafetei nanoparticulelor indica un continut semnificativ mai mic decat cel teoretic de IMC, respectiv un raport atomic Si/Cl de 22,7 fata de 8,49. Acest fapt sugereaza ca IMC nu este localizat pe suprafata particulelor, ci in volumul lor. Datele analizei DLS cuprinse in Tabelul 4, indica dimensiuni medii ale particulelor de circa 200 nm in cazul probelor preparate cu surfactantul S1 si de aproximativ doua ori mai mari in cazul utilizarii surfactantului S2. Nanoparticule de aproximativ 300 nm au fost obtinute si utilizand S2, in cazul amestecului cu continut scazut de IMC (cod E). Din analiza distributiei dimensionale rezulta in mod evident faptul ca particulele cu diametre de 200-300 nm predomina in majoritatea sintezelor efectuate. In cele mai multe cazuri s-au observat indici de polidispersitate mari, ceea ce indica tendinta de aglomerare a particulelor.

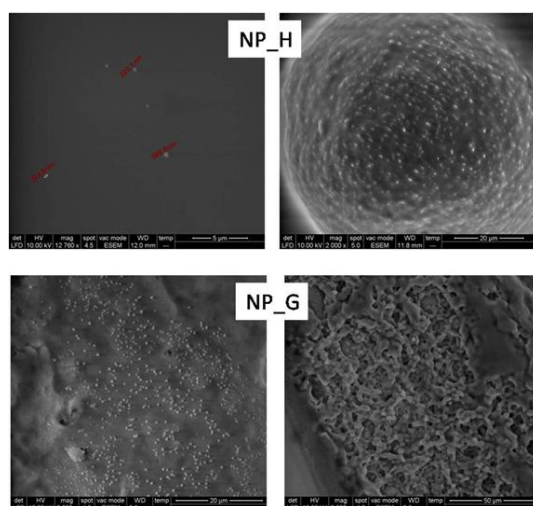


Figura 7. Imagini SEM reprezentative ale nanoparticulelor obtinute din amestecuri PDMS/IMC, corespunzator codificarii H si G din tabelul 4.

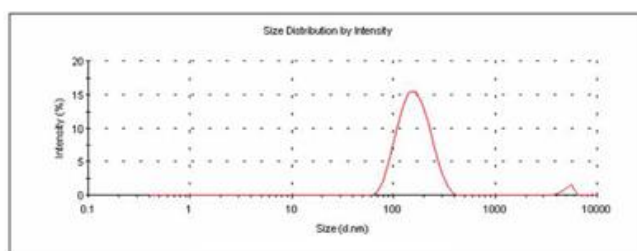


Figura 8. Distributia dimensionala a particulelor codificate cu D in tabelul 4.

Deși randamentul de obtinere a nanoparticulelor este mai redus în cazul aplicării reticulării, rezultatele analizelor DLS indică atingerea celor mai mici valori ale PDI. Distribuția mai îngustă sugerează faptul că aglomerarea este diminuată pentru particulele cu proprietăți mecanice mai bune, datorită forțelor de repulsie și/sau incompresibilității dezvoltate, specifice dispersiilor rezultate prin precipitare. Pe de altă parte, măsurările DLS au fost realizate asupra unor probe filtrate, ceea ce a înlăturat particulele cu dimensiuni foarte mari, care au fost înlăturate odată cu precipitatul.

Pentru studiul interacțiunilor dezvoltate între componentele lor, sistemele nanoparticulate obținute au fost supuse investigației prin tehnicile FTIR și DSC (Figura 9).

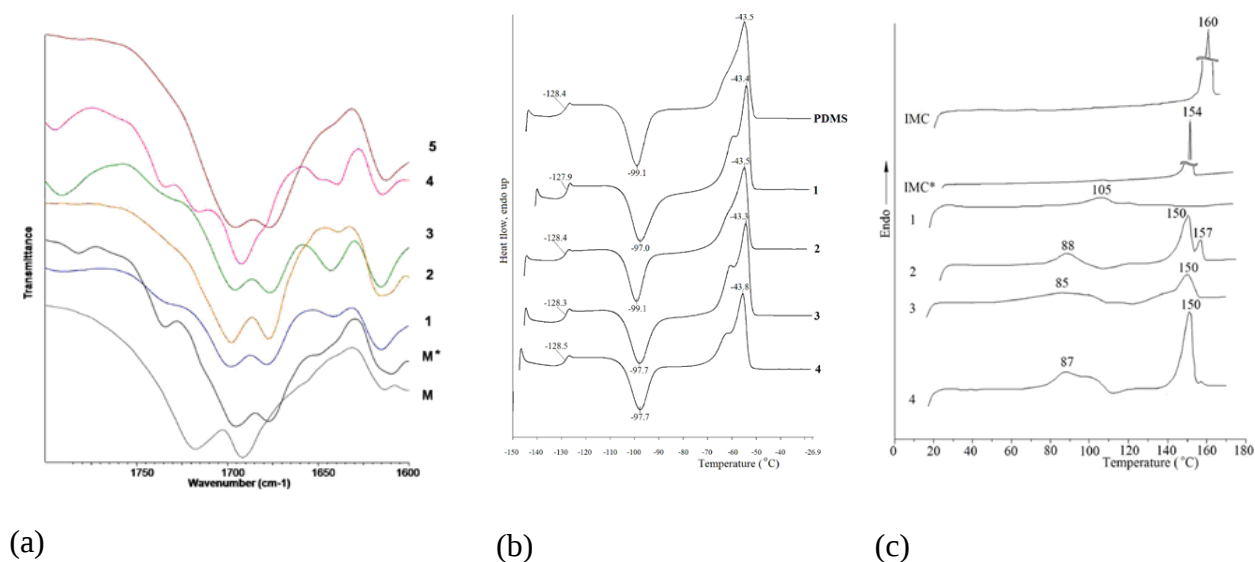


Figura 9. Analizele FTIR (a) și DSC (b, c) aplicate precursorilor și respectiv amestecurilor de reacție în procesele de obținere a micro- și nano-particulelor.

Spectrele FT-IR ale amestecurilor initiale au fost analizate în domeniul 1600-1800 cm^{-1} , pentru medicamentul pur, pentru cel recristalizat din THF (M^*) și pentru cinci amestecuri cu PDMS. Se observă importante diferențe, care dovedesc implicarea grupărilor carboxilice IMC în legături de hidrogen, cel mai probabil cu grupările OH finale ale derivatului PDMS.

S-a constatat că, indiferent de încărcatura de IMC, tranziția vitroasă a PDMS (T_g) se înregistrează la aceeași valoare a temperaturii, respectiv -128°C . Cristalizarea la rece a PDMS decurge la circa -98°C , iar temperatura de topire este de aproximativ -43.3°C , constantă pentru toate probele. Menținerea constantă a valorii T_g demonstrează separarea de faze dintre cele două componente. Temperatura de topire este o caracteristică importantă a oricărui material, fiind direct legată de puritatea acestuia. Faptul că a fost înregistrată o valoare constantă a temperaturii de topire a matricei de PDMS, indiferent de încărcatura de IMC, confirmă separarea de faze, cauzată de incompatibilitatea dintre cele două componente.

Corelarea datelor analizelor DSC și XRD a condus la ipoteza că PDMS se comportă drept plastifiant intern (asemănător unui solvent) pentru moleculele de IMC, iar o parte dintre acestea din urmă formează o fază “mixtă” care se topește la temperaturi mai joase decât medicamentul pur. Amestecurile preparate ce conțin și IMC pot fi stocate perioade lungi de timp (între 6 și 12 luni) fără a-și altera caracteristicile.

Pe baza datelor experimentale mai sus prezentate, se poate concluziona că: (a) forma cristalină a IMC se modifică după dizolvarea în THF; (b) amestecurile obținute prezintă separare de fază pronunțată, dat fiind faptul că temperaturile de tranziție ale PDMS nu se modifică odată cu modificarea compoziției amestecurilor; (c) medicamentul din amestecuri se regăsește total (proba cu 20 % IMC) sau parțial (probele cu peste 40 % IMC) dizolvat în matricea polimerică, formând o fază “mixtă” care se topește la 105°C în cazul probei 1, respectiv la circa 85°C în celelalte probe; (d) în probele cu încărcatura mare de IMC, acesta

separa partial, ceea ce conduce la o temperatura de topire mai mica, ca urmare a efectului de plastifiere indus de PDMS.

Cunoscand incompatibilitatea PDMS cu moleculele organice, natura siloxanica a matricei polimerice si a tronsoanelor hidrofobe ale surfactantilor asigura o mai buna compatibilizare cu IMC, asociata cu o mai buna stabilitate a particulelor, asociata cu o buna uniformitate a dimensiunilor acestora. Pe de alta parte, incapsularea medicamentului cristalin intr-o matrice polimerica moale conduce la cresterea stabilitatii formei si dimensiunilor particulelor.

Cinetica eliberarii IMC in solutie tampon fosfat a fost evaluata in cazul a doua dintre dispersiile apoase obtinute, constatandu-se ca doar 20-30 % din medicament a fost eliberat, cel mai probabil din cauza hidrofobiei PDMS. Trebuie mentionat faptul ca PDMS nu este uzual folosit drept vehiculant al formelor farmaceutice, preferandu-se polimeri cu hidrofilie neta. Cu toate acestea, datorita permeabilitatii siliconilor pentru diverse principii active, eliberarea acestora din urma prin difuzie este exploatata in diverse aplicatii, de la cele de ingrijire personala (formule topice locale sau pansamente), pana la implanturi. S-a stabilit ca polimerii hidrofobi sunt capabili sa elibereze lent medicamente, fiind astfel eficienti, spre exemplu, in tratarea cancerului. Lipsa interactiunilor chimice si fizice dintre matricea PDMS si IMC, precum si predispozitia pentru separarea fazelor, sunt aspecte importante in aplicatiile de transport a formelor farmacologic active ce uzeaza de PDMS drept vehiculant.

1.6. Surfactanti polisiloxanici cu potentiale utilizari in transfectie

In calitatea lor de sisteme pe baza de lipide si surfactanti (LSBDDS), emulsiile coloidale ale lipidelor si dispersiile nanoparticulelor obtinute pornind de la lipide solide sunt larg utilizate pentru transportul speciilor farmaceutice slab solubile in apa, dar si pentru transferul genic (polimerozomi).

In vederea testarii preliminare a capacitatii unor polimeri siloxanici de a genera polimerzomi utili in transfectie s-au realizat experimente privind capacitatea acestora de a solubiliza un medicament model insolubil in apa, nistatina. S-a constatat astfel diminuarea toxicitatii medicamentului, in conditiile eliberarii sale controlate.

Surfactantul siloxanic luat in considerare este simplu de sintetizat si este biocompatibil prin chiar structura sa. El face parte din grupa surfactantilor ce contin tris(hidroximetil)amino-metan, fiind cunoscut sub denumirea de trometamol si sub acronimul THAM. Structura sa chimica si modelul molecular asociat sunt prezentate in Figura 10. Proprietatile sale superficial-active si caracteristicile lui amfifile fost evaluate prin tensiometrie si sunt prezentate in Tabelul 5. Pentru caracterizarea surfactantului au fost efectuate masuratori de tensiune superficiala, CMC si unghi dinamic de contact, utilizand tensiometrul automat Sigma 700 (KSV), ce utilizeaza metoda placutei Wilhelmy. Rezultatele experimentale au fost procesate utilizand aplicatia software a echipamentului, care asigura si dozarea automata in vederea stabilirii CMC. Surfactantul prezinta o valoare CMC foarte scazuta (45 mg/L) si valori mici ale unghiului dinamic de contact la intrare, precum si valoarea de 0° la iesire, atat in cazul sticlei (material hidrofil), cat si al PDMS (material hidrofob). Masuratorile au fost efectuate asupra unei solutii cu concentratia de 400 mg/L, valoare ridicata comparativ cu cea posibil de atins, in general.

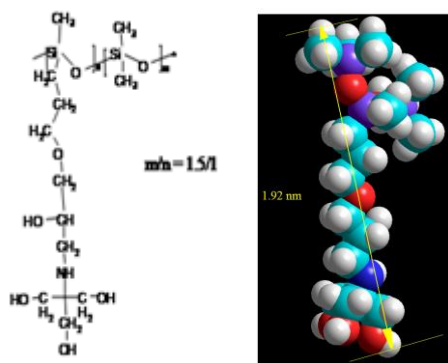


Figura 10. Structura chimică și modelul molecular reprezentat utilizând aplicația Hyperchem asociate surfactantului testat, ST.

Tabelul 5. Caracteristicile tensioactive ale surfactantului testat.

HLB	η_{CMC} , mN/m	CMC, mg/L	CMC, mol/L	θ_{adv} (°) sticlă	θ_{rec} (°) sticlă	θ_{adv} (°) PDMS	θ_{rec} (°) PDMS
9.6	25.42	45	1.1×10^{-5}	44	0	52	0

Autoasamblarea surfactantului în apă s-a observat prin microscopie electronică de transmisie. Investigatiile TEM au fost efectuate cu microscopul Hitachi High-Tech HT7700, operat în modul *high contrast* la un potențial de accelerare de 100 kV. Probele au fost aplicate din soluții diluate (1 g/L) pe grile din cupru de 300 mesh, acoperite cu carbon și s-au uscat sub vacuum. În Figura 11 se observă formarea de micle, dar și apariția unor structuri de tip vezicular. Grosimea peretilor veziculelor, măsurată pe o imagine TEM, are valoarea de 4 nm, în concordanță cu grosimea unui dublu strat, așa cum rezulta din lățimea moleculei (1,92 nm) calculată prin modelare moleculară.

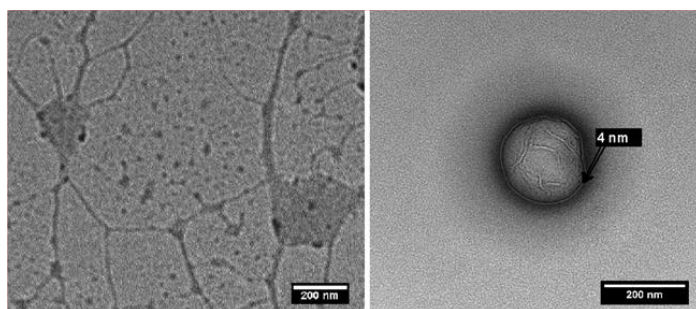


Figura 11. Imagini TEM ale agregatelor generate de către surfactantul studiat.

Pentru verificarea capacității de solubilizare a unei specii farmaceutice insolubile s-a apelat la un procedeu simplu, care presupune folosirea unei soluții diluate de surfactant, fără adăugarea de excipienți. Protocolul este asemănător celui de nanoprecipitare, prezentat anterior. În prima etapă, nistatina (25 mg) a fost dizolvată în 3.5 mL metanol. Soluția a fost apoi injectată în 6 mL soluție de surfactant (1 g/L) și agitată moderat la temperatura ambiantă, timp de câteva minute. În continuare, metanolul și circa 1 mL de apă s-au îndepărtat la rota-evaporator (40 °C, 40 mm Hg). S-a obținut o soluție apoasă galbenă, limpede, de Nys continuând un raport masic de Nys/surfactant de 4/1, care s-a menținut stabilă timp de mai multe luni. Chiar după uscare, preparatul a putut fi complet re-dizolvat în apă, ceea ce arată că practic s-a asigurat o solubilizare nelimitată. Amestecul Nys/surfactant a fost caracterizat prin diverse metode (FT-IR, TG-DTG-DTA, UV-VIS, MS, TEM, AFM și DLS), pentru a elucida derularea procesului de solubilizare.

Eficiența încapsulării poate fi considerată, în condițiile date, ca fiind 100 %, deoarece nu s-a putut pune în evidență precipitarea, nici vizual și nici microscopic. Cantitatea de surfactant folosită în acest experiment este mică (un raport medicament/surfactant de 4/1) în comparație cu cazul încapsulării vitaminei B6 (la raport de 1/1), ori cu producerea lipozomilor (la rapoarte de 1/20).

Masuratorile DLS indica prezenta unui pic principal asociat (dupa intensitate) dimensiunii de 134 nm, care poate fi atribuit agregatelor Nys-surfactant. Au fost detectate si formatiuni cu dimensiuni medii de 7 nm (aceasta fiind populatia majoritara pe curba distributiei dupa numar). Acestea sunt probabil cele mai mici entitati supra-moleculare, care asociaza dinamic, generand formatiuni ori agregate cu dimensiuni mai mari. Valoarea masurata a potentialului Zeta este de 33.3 mV, indicand o buna stabilitate a dispersiei apoase. Marimea ansamblurilor structurale stabile (diametrul mediu), distributia (indicele de poldispersitate) si potentialul Zeta s-au determinat prin tehnica difuziei dinamice a luminii (DLS), utilizand instrumentul Zetasizer NS (Malvern Instruments, UK). Solutiile au fost diluate de 4 ori inaintea analizei.

Imaginile TEM ale formatiunilor Nys/ST au revelat o mare diversitate de structuri supramoleculare: micle sferice mai mici decat 20 nm, micle cilindrice, formatiuni veziculare quasi-sferice si chiar formatiuni cu forma neregulata. Probabil, acestea au aparut in procesul de uscare a probei pregatite pentru imagistica TEM. La examinarea unei vezicule izolate (Figura 12, stanga), se disting mai multe straturi ce alcatuiesc peretii veziculelor. Se disting monostraturi de surfactant de circa 2 nm grosime, care incapsuleaza nistatina intre ele, plasate in regiunea polisiloxanica hidrofoa. Grosimea totala a peretelui vezicular este de circa 7 nm, valoare care coincide cu populatia de mici dimensiuni detectata prin DLS, sustinand ipoteza unei auto-asocieri treptate a structurilor primare Nys-surfactant. Agregate similare au fost observate si prin AFM.

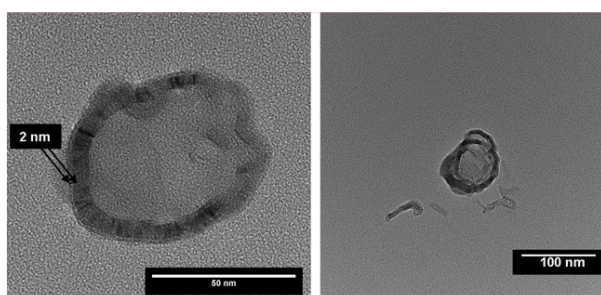


Figura 12. Imagini TEM ale agregatelor Nys/surfactant.

Masuratorile AFM s-au efectuat pe o platforma SPM Solver Pro-M (NT-MDT, Rusia), in aer, in modul semi-contact, folosind un cantilever dreptunghiular din aur, NSG10, cu constanta de elasticitate nominala $K_N = 11.5 \text{ Nm}^{-1}$.

Datele obtinute prin metode spectrale (FT-IR, UV-VIS) si prin ESI-MS, precum si analiza termica (TG-DTG-DTA) nu indica formarea de complexi stabili de tip Nys/surfactant. Spectrele IR au fost inregistrate cu spectrometrul Bruker Vertex 70, in modul transmisie, in domeniul $300\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ (rezolutie 2 cm^{-1} , 32 scanari), la temperatura camerei. Spectrele electronice de absorbtie au fost masurate cu spectrofotometrul Analytic Jena SPECORD 200, in celule din quart cu drumul optic de 10 mm, prevazute cu dop din PTFE. Analiza termogravimetrica a fost efectuata utilizand echipamentul STA 449F1 Jupiter NETZSCH (Germania). Masuratorile au fost efectuate in intervalul de temperatura $20\text{-}700^\circ\text{C}$, sub curent de azot (50 mL/min), cu o panta a incalzirii de 10°C/min . Datele de spectrometrie de masa s-au obtinut pe un spectrometru Agilent 6520 Series, Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS, in modul negativ de ionizare.

Rezultatele studiului indica faptul ca nistatina este incapsulata fizic in agregatele surfactantului, nefiind legata chimic. Mecanismul solubilizarii a fost sugerat de observatiile TEM si implica inserarea moleculelor de nistatina in regiunea hidrofoa a veziculelor de surfactant. Studiul a demonstrat: (a) posibilitatea obtinerii eficiente a nanoparticulelor pe baza de PDMS si a agregatelor de tip vezicular pe baza de surfactanti polisiloxanici, printr-un procedeu simplu, reproductibil; (b) abilitatea entitatilor anterior citate de a incarca sau de a include principii active, fara dezvoltarea de interactiuni puternice, care sa afecteze structura sau functia terapeutica a acestora.

Date preliminare mai sus raportate dovedesc abilitatea compusilor siloxanici de a functiona drept polipepsi cu potential rol in transfectia non-virala. Respectivii compusi vor fi testati, in etapa urmatoare, drept componente ale unor sisteme de includere in matrice polimerice, sau in scaffold-uri ternare ((atelo) collagen / dimetilsilandiolihiyaluronat / poli(ϵ - caprolactona)), ca atare, sau dupa asocierea cu nanoparticule de hidroxiapatita.

1.7. Microsfere termosensibile de poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxiethylacrilamida) cu abilitati de eliberare a principiilor active

Microsferele au fost sintetizate prin reticularea gruparilor hidroxil ale poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroxiethylacrilamidei) cu aldehida glutarica, la o temperatura situata imediat sub temperatura critica de solubilizare (LCST) a solutiei de polimer. Microsferele au fost caracterizate din punctul de vedere al gradului de umflare functie de temperatura. In microsfere a fost inclusa indometacina in calitate de medicament model, prin metoda evaporarii solventului, iar cineticile de eliberare a acesteia au fost studiate functie de marimea microsferelor. S-a stabilit astfel ca microsferele cu diametrul cuprins intre 5 si 60 μm elibereaza medicamentul cu aceeasi viteza indiferent daca temperatura se afla sub sau deasupra temperaturii critice a hidrogelului (VPTT, volume phase transition temperature). In schimb, microsferele cu diametru cuprins intre 125 si 220 μm elibereaza cantitati mai mari de medicament la temperaturi situate sub VPTT, comparativ cu cele plasate deasupra VPTT. Aceasta diferenta este suficienta pentru a asigura o eliberare de tip pulsatoriu atunci cand temperatura variaza ciclic, sub si deasupra VPTT.

1.8. Retele interpenetrante obtinute pornind de la poli(N-isopropilacrilamida)/Carboximetil pululan (PNIPAAm/CMP), sensibile la stimuli externi (pH si temperatura)

Au fost obtinute printr-un procedeu in doua etape: (i) polimerizarea reticulanta a NIPAAm cu bis-acrilamida, in prezenta CMP, urmata de reticularea polizaharidei cu aldehida glutarica. Hidrogelurile au fost caracterizate prin spectrofotometrie IR, microscopie electronica de baleiaj si prin masuratori ale gradului de umflare la diferite pH-uri si temperaturi. Dupa incarcarea lor cu difenhidramina (DPH), hidrogelurile au fost testate din punctul de vedere al capacitatii de eliberare sub stimuli externi, studiindu-se profilele curbelor de eliberare a DPH in conditii de temperatura si pH similare celor fiziologice. S-a observat ca viteza de eliberare este mai mare la pH 10 decat la pH 7.4 si 1.2, spre exemplu, la 37°C. Eliberarea s-a dovedit a fi temporizata la 37°C, comparativ cu cea la 20°C, care a fost rapida.

1.9. Microsfere din dextran, capabile de a elibera in mod controlat principii active

Microsfere din dextran in care s-au imobilizat α -, β - si γ -ciclodextrine, umflate apoi la echilibru in fluide ce simuleaza mediile fiziologice, au fost introduse intr-o coloana cromatografica. Peste stratul astfel obtinut au fost trecute diferite medicamente ori compusi model, in vederea determinarii timpilor de retentie a acestora din urma. Speciile retinute in microsfere ca urmare a includerii in cavitatea ciclodextrinelor au evidentiat timpi de retentie variabili, dar diferiti de cei inregistrati pentru compusii neinclusi. S-a demonstrat ca viteza de eliberare a medicamentelor este foarte mare chiar pentru compusii care prezinta timpi de retentie foarte mari (au constante de asociere foarte mari). De asemenea, volumul solutiei tampon ce simuleaza fluidele fiziologice influenteaza net viteza de eliberare.

1.10. Caracterizarea unor sisteme 3D hibride tip biopolimer/polimer sintetic, reticulate prin tehnici combinate

Producerea de substraturi capabile de transfectie *ex vivo* implica realizarea de matrici macromoleculare cu caracteristicile morfologice si de reactivitate ale tesuturilor conjunctive. In acest sens, in etapa anterioara a proiectului, au fost realizate si testate hidrogeluri si vitrigeluri mixte atelocolagen / poli- ϵ -caprolactona stabilizate microstructural prin aplicarea mai multor tipuri de reticulare. In prezenta etapa, caracterizarea respectivelor substraturi a fost extinsa, in vederea optimizarii iterative a procedeelor de preparare.

Avand in vedere faptul ca investigarea proprietatilor dielectrice poate oferi informatii asupra structurii si proprietatilor materialelor la nivel molecular si microscopic, s-au studiat efectele individuale si cumulate ale compozitiei, procedului de reticulare aplicat, continutului de umiditate, frecventei campului electric si temperaturii asupra comportarii dielectrice a materialelor complexe, multifazice, reprezentate de substraturile mai sus mentionate. Domeniul de temperatura in care s-au realizat masuratorile (de la -100°C , pana la $+100^{\circ}\text{C}$) il include si pe cel de stocare, manipulare si utilizare a respectivelor substraturi.

Masuratorile dielectrice s-au efectuat utilizand spectrometrul Novocontrol Dielectric Spectrometer, Concept 40 (Germania). Rezultatele s-au interpretat considerand relatia: $\epsilon^*(f) = \epsilon'(f) - i\epsilon''(f)$, in care $\epsilon^*(f)$ reprezinta permitivitatea complexa, iar ϵ' si ϵ'' permitivitatea relativa si respectiv pierderile dielectrice. Determinarile s-au efectuat la temperatura constanta, in domeniul de frecventa cuprins intre 1 Hz si 1 MHz, prin scanare la intervale de cate 5°C in plaja $-100^{\circ}\text{C} \div +100^{\circ}\text{C}$. Probele s-au plasat intre doi electrozi circulari din otel, montati in interiorul unei celule de masurare termostata, in atmosfera de azot. Pentru verificarea reproductibilitatii, probele au fost mentinute in conditii de umiditate constanta, in exicator, minimum trei zile inaintea efectuarii analizei, cu exceptia probei AteCol-1 (cu caracteristicile unui burete poros) care a fost expusa in aer cu umiditatea relativa de circa 50 %, la temperatura ambientala. Pentru investigarea efectului umiditatii, probe selectate din lotul investigat (AteCol-1, Col-1, C_{EN}P2-15,1 si CH1P30-15,2) au fost supuse unui al doilea set de masuratori, dupa un prim ciclu de incalzire in spectrometrul dielectric, aplicat drept procedeu bland de uscare nedenaturanta.

Determinarile de spectroscopie dielectrica au fost completate cu investigatii asupra comportarii termice (DSC si TGA), efectuate cu un instrument Mettler 851 DSC, in atmosfera de azot, cu o viteza de incalzire de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ si $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, precum si cu testarea mecano-dinamica (DMA), utilizand echipamentul Pyris Diamond, Perkin-Elmer, la frecventa de 1 Hz si panta incalzirii de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$, in domeniul de temperatura cuprins intre -100°C si 300°C . Caracteristicile probelor supuse analizelor sunt prezentate in Tabelul 6. Rezultatele investigatiilor prin spectroscopie dielectrica sunt reunite in Figura 13, iar cele termice si mecano-dinamice se prezinta in Figura 14.

Tabelul 6. Substraturile biopolimer / polimer sintetic supuse caracterizarii.

Cod ^a	AteCol (%)	DMSHA (% rel AteCol)	PCL-DI (% rel biopolimeri)	UV ^b (min)
AteCol-1	100	-	-	-
AteCol-2	100	-	-	-
Col-1	100	-	-	-
C _{EN} -1	100	-	-	-
C _{EN} P2-30-1	100	-	2	30
CH1P-30-2	99	1	30	-
CH1P-30-15-2	99	1	30	15

Note: ^a Indicii 1 si 2 definesc protocolul de preparare aplicat si microstructura rezultata:

1 - membrane poroase; 2 - filme cu structura densa.

^b timpul de iradiere UV (lampa cu mercur la presiune ridicata tip Osram HBO 200 W).

Dupa cum se observa in Figura 13, toate probele prezinta un semnal larg, proeminent, in domeniul 0-100°C, atat pentru variatia ε' cat si pentru ε'' , cu un maxim situat la valori diferite, functie de modul de preparare a probei: peste 60 °C pentru AteCol-1 si AteCol-2, respectiv la circa 22°C pentru C_{EN} si Col-1. In literatura de specialitate, acest pic a fost asimilat eliberarii apei slab adsorbite la suprafata probelor. Pozitia sa nu depinde de frecventa. Cresterea rapida care precede extremul este atribuita cresterii conductivitatii ca urmare a percolarii clusterilor de apa. Valorile pentru ε' si ε'' in zona extremului sunt mai mari la frecvente joase, deoarece in aceste conditii purtatorii de sarcina au suficient timp sa migreze la distante mari, comportare cunoscuta ca *dispersia la frecvente joase* (LFD), intalnita la collagen si la alte biomacromolecule. La cresterea temperaturii, odata cu indepartarea moleculelor de apa, numarul purtatorilor de sarcina (protoni) scade si conductivitatea scade si ea. In cazul probei cu cel mai ridicat continut in apa, AteCol-1, s-a inregistrat doar un umar larg, continutul de circa 20 % umiditate facand imposibila manifestarea distincta a diferitelor procese migrational. In cazul Atecol-2 picul este bimodal datorita heterogeneitatii probei, care include domenii cu grade de reticulare fizica diferite, ca urmare a dezvoltarii de interactiuni necovalente intre lanturile polipeptidice (directe, puternice sau slabe, mediate de un numar redus de molecule de apa).

Pentru probele reticulate (Col-1 si C_{EN}) picul se deplaseaza spre valori mai joase de temperatura, efect raportat deja in literatura [6] si atribuit tendintei gruparilor/secventelor de reticulare de a actiona drept plastifiant intern. Se remarca pozitia similara a picului in cele doua probe, independent de tehnica de reticulare aplicata si de faptul ca forma collagenica difera de la o proba la cealalta, aspect atribuit tipului de reticulare (la mica distanta in ambele cazuri), care conduce la structuri similare, caracterizate prin puncti slabe. Pe tot domeniul de inregistrare a spectrului dielectric, intensitatea marimilor ε' si ε'' a scazut cu cel putin doua ordine de marime comparativ cu probele neretificate chimic. In acest sens, datele obtinute difera de cele raportate in literatura, acestea din urma referindu-se de regula la colage reticulate prin intermediul chimiei carbodiimidelor. In cazul probelor discutate, acest fapt se explica prin introducerea de noi cai de transport si de noi purtatori de sarcina odata cu formarea punctilor de reticulare. In mod neasteptat, purtatorii fiind mai ales protonii, in cazul de fata proba reticulata Col-1 are un continut mai mare de umiditate fata de AteCol-2, deci cauza nu este eventuala modificare a numarului de purtatori prin modificarea continutului de apa. In plus, desi AteCol-1 si AteCol-2 au un continut diferit de apa si o microstructura diferita, vadesc valori maxime similare ale celor doi parametri dielectrice, evolutia acestora diferind doar prin forma si largimea picului. Acest fapt sugereaza o importanta influenta a modului specific de organizare structurala a collagenului, respectiv a modului de dispunere a moleculelor de apa in microstructura collagenului aflat in stare solida.

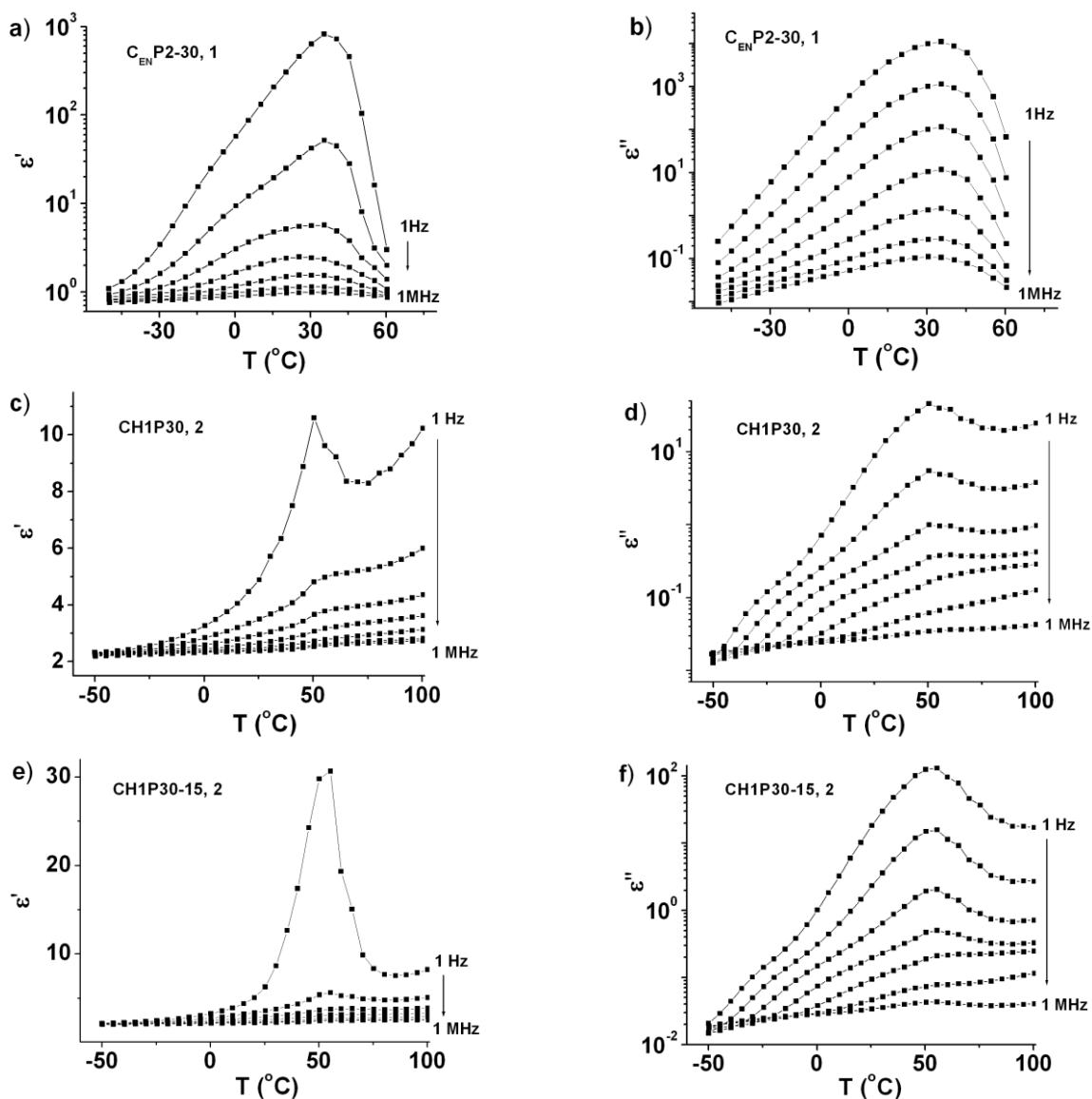


Figura 13. Dependenta de temperatura a ϵ' si ϵ'' la cateva frecvente in domeniul $1 \div 10^6$ Hz pentru probele: (a,b) $C_{EN}P2-30-1$; (c,d) $CH1P-30-2$ si (e,f) $CH1P-30-15-2$.

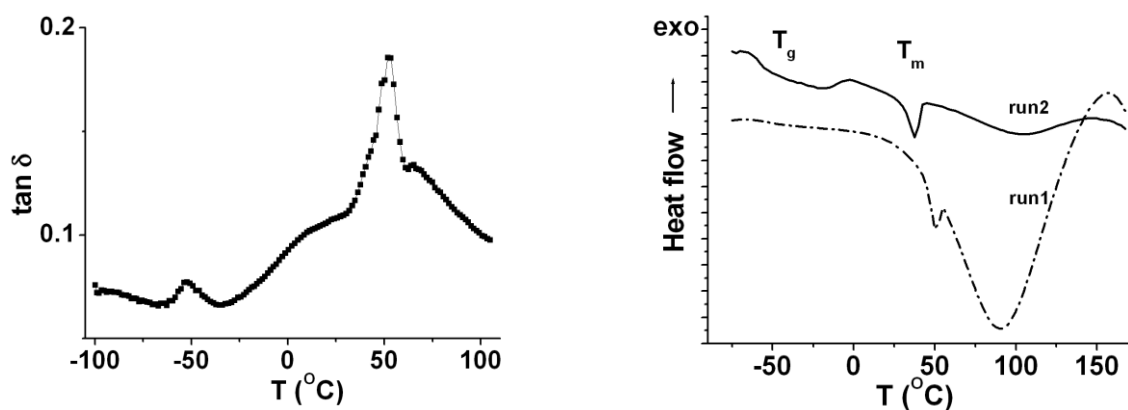


Figura 14. Evidentierea tranzitiei sticloase si a procesului de topire in proba $CH1P-30-2$, prin determinari DSC si DMA.

Figura 15 prezinta comparativ comportarea probelor analizate functie de temperatura, pentru frecventa de 10 Hz. Se observa ca ambii parametri dielectrice (dar mai ales ϵ'') cresc prin introducerea PCL in compozitie, ori prin iradiere UV. Microstructura probei (poroasa sau densa) nu pare sa influenteze in mod

esential caracteristicile dielectrice. Reticularea le afecteaza insa in mod evident, in stricta corelatie cu modul de reticulare: la mica-distanta, la mare-distanta sau in sistem combinat. In cazul aplicarii unei aceleiasi metode de reticulare, difera doar intensitatea celor doi parametri dielectrici, in timp ce forma si pozitia picului raman aproape neschimbate (spre exemplu in cazul C_{EN}-1 si Col-1). La aplicarea unor metode de reticulare diferite, spre exemplu prin combinarea reticularii la mica- si la mare-distanta, forma si pozitia picurilor in domeniul de temperaturi pozitive (0-100°C) se modifica semnificativ odata cu gradul de reticulare si dependent de componentele amestecurilor formulate.

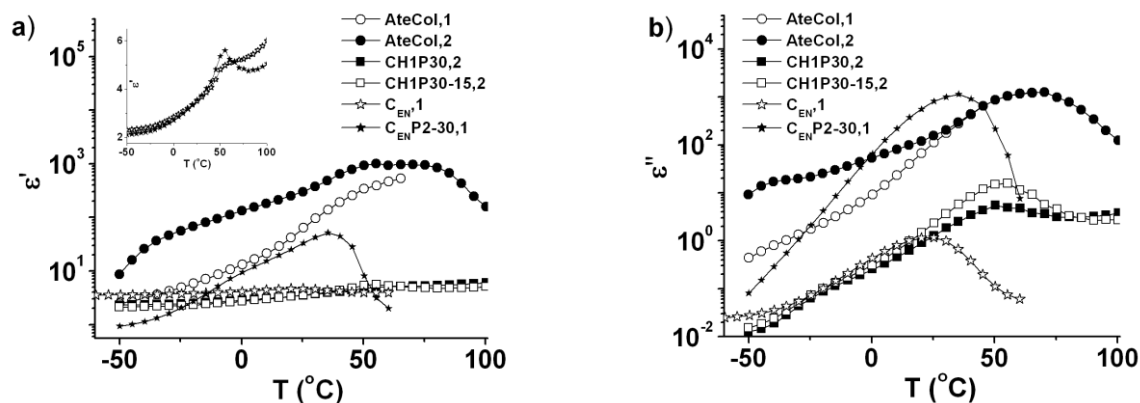


Figura 15. Reprezentarea comparativa a variatiei permitivitatii relative (a) si a pierderilor dielectrice (b) pentru probe investigate, functie de temperatura, la o frecventa a campului electric de 10 Hz.

1.11. Preliminarii in realizarea unui substitut de calus osos cu abilitati de transfectie *ex vivo*

Accelerarea refacerii osoase ghidate este posibila prin injectarea unui precursor al calusului osos, cultivat *ex vivo* cu celule transfectate (osteoblaste, dar si celule suport din clasa celor stem) cu plasmide purtatoare de gene ce codifica factori de crestere, ori cu ARN destinat silentierii unor gene ce determina exprimarea in exces a unor enzime remodelatoare (cum sunt matrix-metaloproteinazele). Transfectarea *ex vivo* este eficace daca se dispune de substraturi citoprietenoase, formulate compozitional pentru a initia si conduce refacerea osoasa locala. Substitutele injectabile ale calusului osos se dezvoltă pornind de la un scaffold (atelo)colagenic in care s-a nucleat si s-a controlat cresterea nano- si micro-cristalelor unor saruri de calciu si fosfor, cel mai adesea a hidroxiapatitei.

In cadrul etapei 2013 a proiectului s-a dezvoltat o procedura complexa, pentru generarea hidroxiapatitei care chemo- si morfo-mimeaza bioapatita prezenta in osul sanatos. Rezultatele au fost incluse intr-o cerere de brevet intitulata „Procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatita sintetizata in prezenta biomacromoleculelor”, autori: Maier Stelian Sergiu, Pinteala Mariana, Maier Vasilica, Simionescu Ana-Bogdana. In cele ce urmeaza sunt redat continuturile preambulului cererii de brevet si rezumatului acesteia.

1.11.1. Preambulul cererii de brevet A 2013 00710

Inventia se refera la un procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatita sintetizata in prezenta biomacromoleculelor, caracterizat prin aceea ca asigura obtinerea de micro- si nanoparticule de hidroxiapatita cu dimensiuni, geometrie, cristalinitate si compozitie de faza reproductibile, in contextul in care sinteza lor se conduce in conditii nedenaturante pentru biomacromoleculele prezente in sistemul de reactie (la temperaturi, pH-uri si tarii ionice in plaja valorilor

fiziologice). In virtutea caracteristicilor lor, dar si functie de biomacromoleculele asociate (proteine, polizaharide, acizi nucleici si derivatii biologic activi ai acestora), particulele obtinute sunt apte incorporarii in compozitii care chemo-, morfo- si bio-mimeaza tesutul osos, ori calusul osos. Sinteza particulelor in prezenta biomacromoleculelor asigura asocierea intima a celor doua tipuri de componente (anorganica si organica), inclusiv prin nucleerea si cresterea fazei (nano)cristaline pe matricea macromoleculara, cu adecvarea dimensionala la conformatia spatiala a acesteia din urma, functie de concentratia locala asigurata si de adjuvantii utilizati in sinteza. *Conform procedului brevetat, controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatita se realizeaza prin procedura de conducere a sintezei, precum si prin intermediul campului electric (electrostatic si / sau variabil) indus din exteriorul mediului de reactie. Particulele obtinute conform procedului brevetat, precum si compozitiile rezultate ca urmare a asocierii lor cu diverse biomacromolecule, sunt destinate* aplicatiilor din domeniul ingineriei tisulare, medicinei reconstitutive si regenerative, chirurgiei plastice, farmaceuticii si cosmeticii farmaceutice, dar si transfectiei osoase prin sisteme generate *ex vivo* pentru vehicularea informatiei genetice.

1.11.2. Rezumatul cererii de brevet A 2013 00710

Inventia se refera la un procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatita sintetizata in prezenta biomacromoleculelor, prin controlul strict al procedurii de sinteza, utilizand adjuvantii ai cristalizarii si sub asistenta campului electric (electrostatic si / sau variabil in timp) aplicat din exteriorul sistemului de reactie, in sistem capacitiv. Procedul asigura obtinerea de nanoparticule de hidroxiapatita (agregate in particule) sau derivati ai acesteia asimilabili bioapatitei, cu caracteristici reproductibile din punctul de vedere al cristalinitatii, puritatii de faza si disimetriei geometrice. Procedul este aplicabil pentru obtinerea oricarui derivat al hidroxiapatitei sintetizabil in mediu apos, indiferent de receptura amestecului de reactie. El evita impurificarea necontrolata a produselor de sinteza cu compusi ai reactiilor de oxido-reducere ori de electroliza, ca urmare a inexistentei contactului direct al mediului de reactie cu electrozii ce aplica diferenta de potential. Particulele de hidroxiapatita, individualizate sau in amestec intim cu biomacromoleculele in prezenta carora au fost sintetizate, sunt destinate aplicatiilor din domeniul ingineriei tisulare, medicinei reconstitutive si regenerative, chirurgiei plastice, farmaceuticii si cosmeticii farmaceutice, transfectiei osoase.

Rezultatele stiintifice ale derularii etapei 2013 in cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Sinoptic:

- lucrari stiintifice publicate: **16**;
- participari la manifestari stiintifice, prezentari orale si postere: **16**;
- cerere de brevet: **1**;
- cursuri / traininguri: **9**;
- sustinere teze de doctorat cu finantare partiala de la proiect: **1**
 - Narcisa Marangoci – *Structuri complexe pe baza de ciclodextrine*;
- actualizare pagina web: <http://www.intelcentru.ro/index-5-a.html>.

RAPORT STIINTIFIC

pentru faza 2014, unica, a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Planul de realizare a proiectului pentru faza 2014 si angajamentele initiale privind diseminarea

Anul	Etapa	Obiective	Activitati	Rezultate livrate per etapa
2014	Unica	1. Studiul unor sisteme chimice cu functionalitate controlata	1.1. Proiectarea, realizarea si testarea de micro- si nano-sisteme purtatoare de acizi nucleici sau active in eliberarea controlata de compusi biologic activi.	O lucrare ISI. O participare la manifestari stiintifice.
			1.2. Sinteza unor sisteme de tip hidrogel cu feed-back prin pH si temperatura.	O lucrare ISI.
		2. Proiectarea si realizarea unor sisteme biomimetice destinate transfectiei	2.1. Sinteza si testarea unor derivati ai squalenei activi ca vectori non-virali in vehicularea acizilor nucleici.	O lucrare ISI.
			2.2. Obtinerea si testarea de nanoconjugate cu componenta biomacromoleculara si optional cu miez de magnetizabil.	Doua lucrari ISI. Patru stagii de cercetare.
			2.3. Sinteza si testarea unor sisteme cu miez fullerenic sau din compusi ai siliciului, capabile de transfectie.	O lucrare ISI. Doua participari la manifestari stiintifice.
			2.4. Sinteza unor sisteme capabile de autoasamblare in prezenta acizilor nucleici.	O lucrare ISI. Un stagiu de cercetare.

Preambul - Etapa 2014 reprezinta o continuare a studiilor privind proiectarea, producerea si caracterizarea unor micro- si nano-sisteme multifunctionale inteligente, capabile sa elibereze principii active la tinta, sau sa asigure medierea transferului genic prin intermediul unor vectori non-virali, generati combinatorial in sistem poliplex - scaffold. In plus, s-a avut in vedere scaderea limitei de detectie a glucozei prin voltametrie ciclica, in scopul elaborarii unei tehnici analitice instrumentale pentru masurarea nono- si oligizaharidelor in solutii diluate si in medii de cultura formulate pentru asigurarea transfectiei.

Obiectivul 1. STUDIUL UNOR SISTEME CHIMICE CU FUNCTIONALITATE CONTROLATA

In baza datelor preliminare obtinute in fazele anterioare (si in conformitate cu planificarea elaborata in anul 2013) studiile experimentale din aceasta faza includ:

- I. Realizarea de micro- si nano-particule pe baza de polimeri inteligenti pentru eliberarea controlata a compusilor biologic activi.
- II. Realizarea de sisteme nanoparticulate cu componenta biopolimerica, urmata de functionalizarea si testarea respectivelor sisteme ca vectori non-virali.
- III. Obtinerea de hidrogeluri autoorganizate pe baza de imino-chitosan.
- IV. Obtinerea multistraturilor hibride biomimetice, prin recunoasterea multivalenta a Concanavalinei A de catre gliconanocapsule {Mo132}

I. Realizarea de micro- si nano-particule pe baza de polimeri inteligenti pentru eliberarea controlata a compusilor biologic activi

Polimerii “inteligenti” sunt sensibili la stimuli externi si reprezinta o clasa de materiale care, in solutie apoasa, sufera transformari de faza sub actiunea variatiei factorilor externi, cum ar fi pH-ul, temperatura, taria ionica, campul magnetic etc. Intre polimerii „inteligenti”, cei sensibili la variatii de pH si temperatura sunt cei mai utilizati in aplicatiile biomedicale, deoarece ei exploateaza micile modificari ale pH-ului si temperaturii corpului uman in calitate de semnale de declansare a eliberarii controlate a principiilor active (farmaceutice sau genetice).

Poli(N-isopropilacrilamida) (poli(NIPAAm)) este cel mai utilizat polimer termosensibil deoarece el sufera o tranzitie de faza abrupta (lower critical solution temperature, LCST) la valori ale temperaturii in plaja fiziologica si patologica specifica organismului uman. Sub valoarea LCST, poli(NIPAAm) se afla in stare hidratata si este deci solubil, in timp ce peste valoarea LCST, pierde apa de hidratare si devine insolubil. In mod corespunzator, hidrogelul obtinut din acest polimer se umfla sub LCST si colapseaza deasupra LCST. Acest proces de umflare/colapsare a fost exploatat pentru eliberarea pulsatorie a principiilor active.

Acidul metacrilic (MA) este un acid slab (pKa 4.8) si furnizeaza, prin homopolimerizare cel mai cunoscut polimer sensibil la pH. La pH-uri situate sub pKa, polimerul se gaseste in stare protonata, in timp ce desupra pKa, polimerul este ionizat. In mod corespunzator, sub pKa, hidrogelul obtinut din acest polimer este in stare colapsata, in timp ce deasupra pKa, hidrogelul este in stare umflata.

Copolimerizarea NIPAAm cu MA in prezenta unui reticulant uzual (N,N'-metilen-bisacrilamida) si a unui agent porogen a condus la un hidrogel poros, cu dubla sensibilitate: la pH si la temperatura (Figura 1).¹⁰

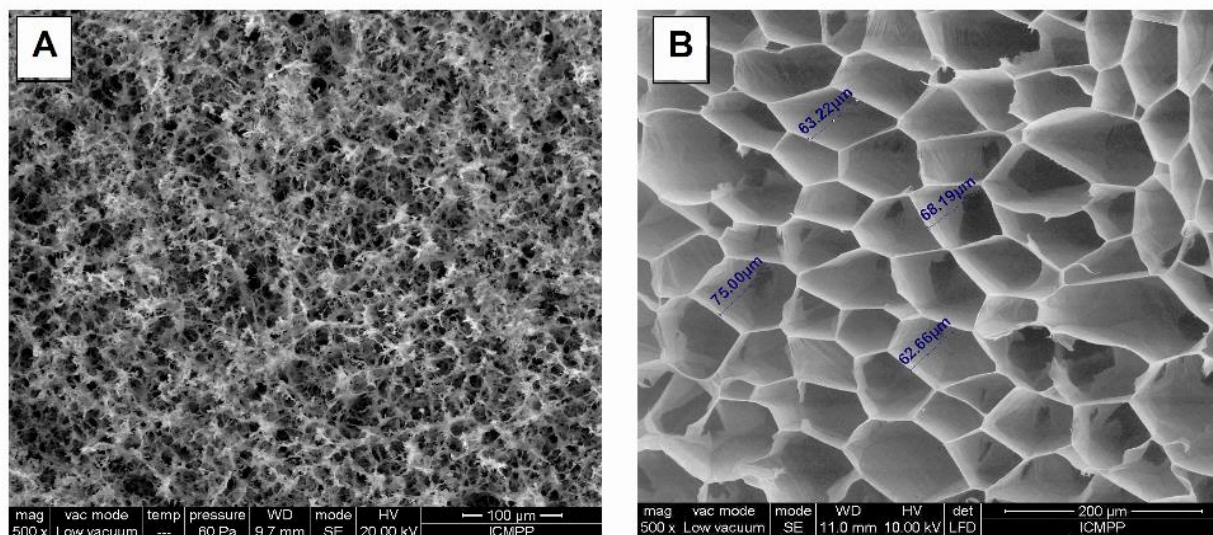


Figura 1. Microfotografii SEM ale hidrogelului de poli(NIPAAm-co-MA) (secțiune) obținut în absența (subfigura A) și respectiv în prezența agentului porogen (subfigura B).

La pH fiziologic (circa 7.4), gruparea carboxilică a MA din hidrogelul pe bază de NIPAAm și MA este ionizată, fapt care face ca hidrogelul să piardă termosensibilitatea. În mod remarcabil, atunci când gruparea carboxilică ionizată interacționează electrostatic cu anumiți compuși bioactivi, hidrogelul își recapătă termosensibilitatea, colapsează și eliberează cantități bine definite de compuși activi (Figura 2). În acest caz, comonomerul sensibil la pH (MA) joacă rol de biosenzor, iar comonomerul sensibil la temperatură (NIPAAm) joacă rol de agent de livrare a speciei active. Acest sistem dual ar putea reprezenta baza realizării unei noi generații de sisteme de eliberare controlată.

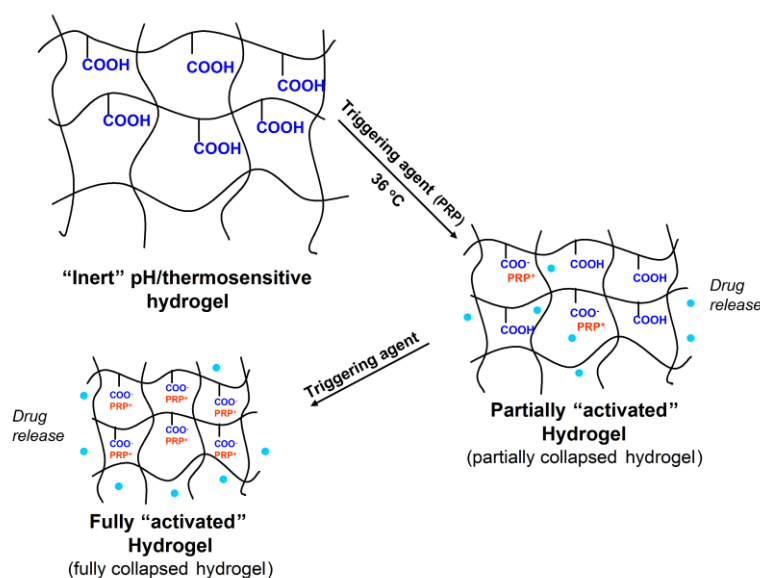


Figura 2. Reprezentarea schematică a principiului de operare a microgelurilor sensibile la pH/temperatură în prezența unui agent de declansare.

Într-o altă abordare, NIPAAm a fost copolimerizat cu derivați vinilici de β -ciclodextrina (CD) pentru a obține microgeluri sensibile la temperatură, capabile să rețină în mod selectiv compuși biologic activi¹¹. Aceste microgeluri sunt biodegradabile deoarece ciclodextrina a fost funcționalizată în așa fel încât să conțină mai mult de o grupare polimerizabilă pe moleculă. Datorită dimensiunii micrometrice și porozității

avansate, aceste microgeluri prezinta o tranzitie de faza abrupta in conditii fiziologice de pH si temperatura. Ca urmare, viteza de raspuns este foarte mare la mici modificari ale parametrilor fiziologici. Astfel, aceste microgeluri sunt capabile sa elibereze intr-un mod pulsatoriu, printr-un mecanism de tip “ON-OFF”, compusi activi inclusi in cavitatea hidrofoba a β -ciclodextrinei (Figura 3).

Pentru aplicatii biomedicale care necesita particule cu dimensiuni submicronice, au fost sintetizate, prin polimerizare precipitanta, nanoparticule sensibile la temperatura pe baza de NIPAAm si hidroxietilacrilamida (HEAM)¹². Tranzitia de faza volumica (volume phase transition temperature, VPTT) a acestor nanoparticule a fost determinata prin dispersia dinamica a luminii (DLS), spectroscopie UV-Vis si ¹H-RMN. S-a observat ca nanoparticulele au un VPTT apropiat de temperatura corpului uman, fapt care le recomanda pentru utilizari biomedicale. Microscopia de forta atomica (AFM) a fost folosita pentru a determina morfologia si polidispersitatea nanoparticulelor, constatandu-se ca acestea sunt sferice si monodisperse (Figura 4). S-a demonstrat ca prin cresterea concentratiei de agent tensioactiv utilizat in mediul de sinteza, diametrul hidrodinamic mediu scade, urmare repulsiei electrostatice dintre particule in timpul formarii lor.

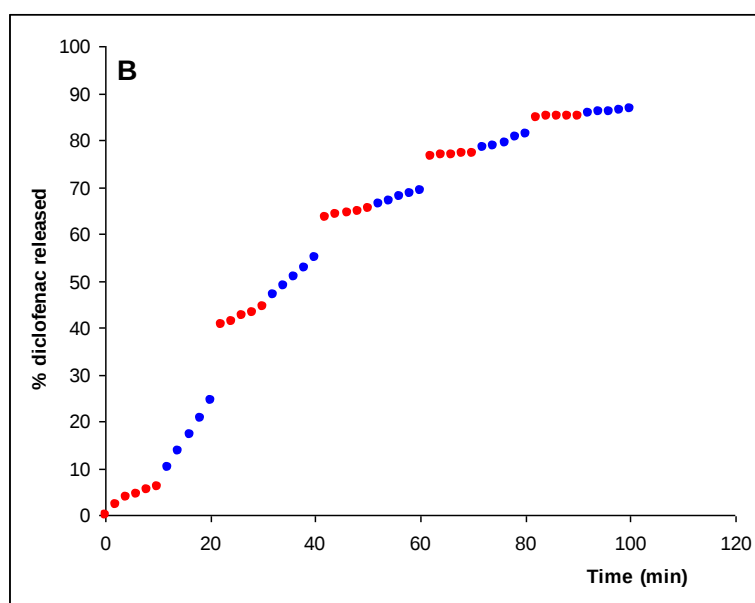


Figura 3. Influenta modificarii ciclice a temperaturii (32 °C) (●) si 40 °C (●) asupra eliberarii diclofenacului din microsfele de poli(NIPAAm-co-CD), in conditii fiziologice simulate (PBS, pH = 7.4).

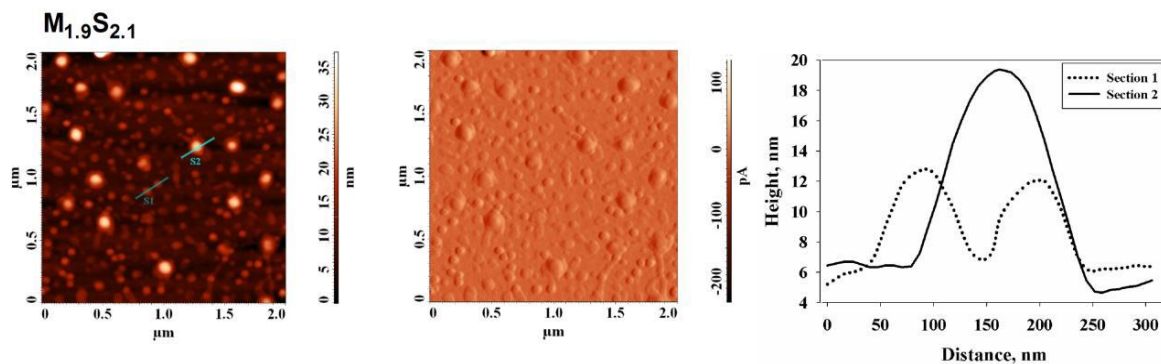


Figura 4. Imagini AFM ale nanoparticulelor de poli(NIPAAm-co-HEAM).

Viteza de eliberare a propranololului din aceste microgeluri este puternic influentata de temperatura: sub VPTT, microgelurile sunt umflate si compusul este eliberat rapid in timp ce deasupra VPTT, microgelurile sunt colapsate si eliberarea devine mai lenta.

II. Realizarea de sisteme nanoparticulate cu componenta biopolimerica, urmata de functionalizarea si testarea respectivelor sisteme ca vectori non-virali

Medierea transferului genic prin sistem non-viral combinatorial poliplex/scaffold reprezinta una dintre cele mai dinamice directii de cercetare actuale. Combinarea vehiculului pentru transfectie cu un sistem polimeric 3D (scaffold sub forma de micro-/ nano-sfere, burete poros sau hidrogel) (Figura 5) ofera certe avantaje (deja mentionate in faza anterioara, 2013), intre care:^{13,14,15}

- protejarea eficienta a purtatorului (carrier-ului) de efectul componentelor plasmei sanguine;
- o durata mai mare de eliberare a materialului genic, localizat in locul de implantare al sistemului combinat, deci facilitarea controlului spatio-temporal;
- o mai buna intelegere a relatiei structura-functie, ceea ce faciliteaza optimizarea proiectarii vectorilor non-virali la scara moleculara;
- eliminarea unor etape de preparare impuse de necesitatea evitarii/invingerii barierelor extra-/intra-celulare (specifice procesului de eliberare a materialului genic, care se desfasoara in mai multe etape; Figura 6¹⁶), ceea ce necesita adesea crearea de biblioteci/serii de compusi cu structura complexa (Figura 7^{17,18});
- posibilitatea de a asigura/dezvolta noi cai, simple de crestere a eficientei transfectiei;
- crearea de noi posibilitati de accelerare a transpunerii vectorilor de transfectie non-virali la nivel clinic.

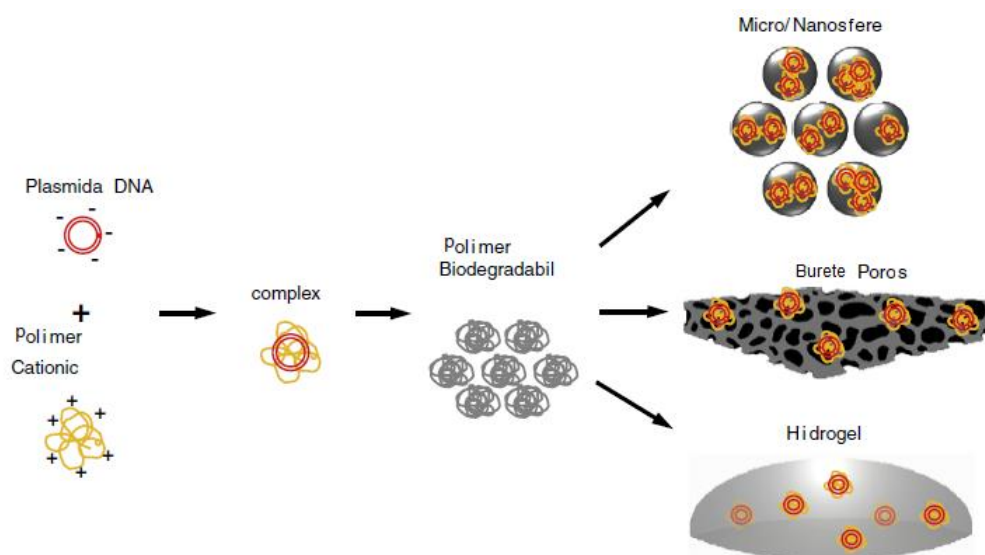


Figura 5. Transferul genic mediat de matricea polimerica tip scaffold. Plasmida complexata cu polimerul cationic (vector non-viral) este incapsulata in sisteme polimerice 3D tip scaffold pentru asigurarea unei eliberari sustinute.

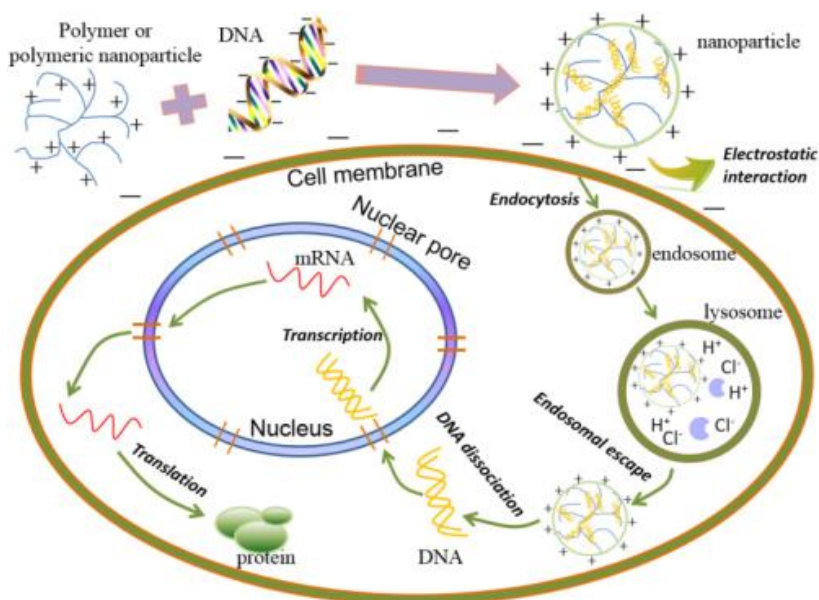


Figura 6. Reprezentare schematica a procesului de transfer genic mediat de vectori non-virali polimerici.

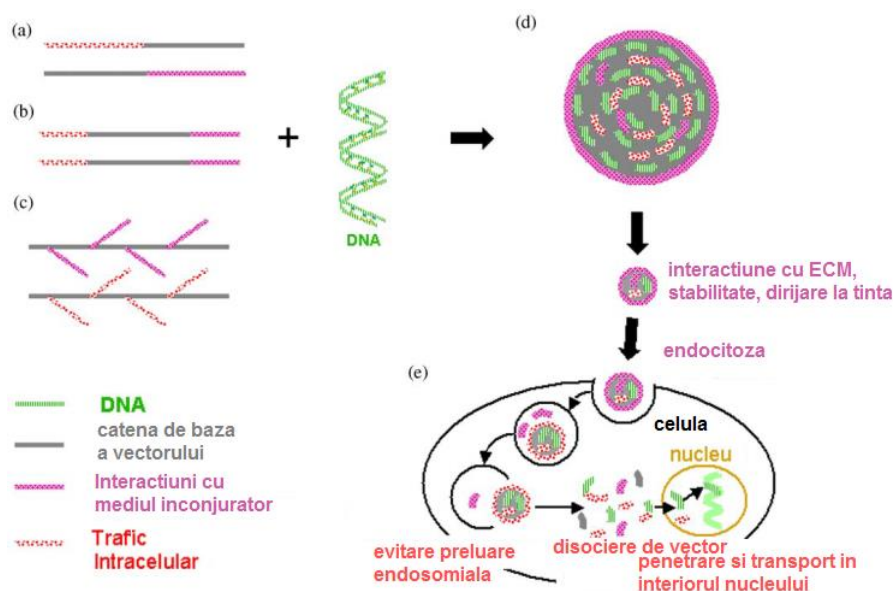


Figura 7. Reprezentarea schematica a principiilor de proiectare modulara a vectorilor genetici non-virali.

Module principale: catena de baza (gri), grupe functionale ce regleaza interactiunea cu mediul (violet), tronsoane moleculare destinate facilitarii traficului intracelular (rosu). Catena vectorului (care contine de obicei lanturi polimerice, lipide sau polizaharide) asigura complexarea / impachetarea ADN, ofera protectie fata de degradarea de catre nucleaze, si faciliteaza traficul intracelular. Functionalitatea catenei de baza este extinsa prin gruparile ce faciliteaza strabaterea barierelor extra- si intra-celulare. Gruparile functionale introduse in structura vectorului pot limita interactiunea cu componentele serice, pot induce legarea specifica la celula sau tesutul vizat (eliberarea dirijata) sau pot facilita interactiunile cu matricea extracelulara sau cu diferitele biomateriale. Gruparile functionale introduse pentru facilitarea traficului intracelular trebuie sa asigure o crestere a acumularii materialului genic in nucleu prin evitarea preluarii endosomiale, deplasarea prin citoschelet sau facilitarea traficului prin porii nucleari. Tronsoanele individuale pot fi asamblate in moduri diferite (a ÷ c) in

vederea facilitarii complexarii cu ADN (verde), ceea ce afecteaza structura si functionalitatea sistemului non-viral rezultat. (d) Reprezentarea schematica a distributiei modulelor si ADN, cu organizarea dorita a gruparilor ce regleaza interactiunea cu mediul (distribuite si orientate preferential la suprafata sistemului) si gruparilor prevazute pentru traficul intracelular, protejate, distribuite in interiorul structurii finale, pentru a asigura activitatea si functionalitatea sistemului dupa internalizare. (e) Internalizarea vectorului prin endocitoza (cel mai frecvent), urmata de evitarea preluarii de catre endosomi si transportul materialului genic catre nucleu. Pentru asigurarea transcriptiei componentele modulare odata ajunse in vecinatatea membranei nucleare trebuie sa disocieze de ADN.

In contextual mentionat, in vederea proiectarii rationale a sistemelor multifunctionale, biomimetice s-au luat in considerare:

- (1) criteriile de selectie a materialelor componente functie de cerintele impuse de domeniul de aplicare, respectiv:
 - accesibilitate;
 - adecvarea la domeniul biomedical (biocompatibile, sterilitate);
 - posibila activitate biologica;
 - capacitatea de raspuns la stimuli externi;
 - reproductibilitatea caracteristicilor.
- (2) avantajele oferite de combinarea unor procedee clasice si moderne de preparare pentru obtinerea facila de nanoparticule cu structura complexa si proprietati predeterminate (caracteristici impuse de aplicarea in transfer genic) prin:
 - completarea reactiilor specifice de functionalizare cu procese controlate de legare necovalenta si auto-asamblare;
 - selectarea si combinarea unor materiale diferite in vederea valorificarii functionalitatii si a abilitatii lor de a dezvolta interactiuni specifice, sau de a raspunde la stimuli externi, cu scopul asigurarii functiilor impuse (facilitarea transferului genic in diferitele etape ale procesului), in vederea eficientizarii si sporirii sigurantei in utilizare.

II.1. Sinteza si caracterizarea unor sisteme non-virale pe baza de biopolimeri, destinate transferului genic

Necesitatea realizarii de vectori non-virali pentru transferul genic este impusa de efectele imunologice dificil de controlat induse de catre vectorii virali, care, in ciuda eficientei ridicate a transfectiei, tind sa fie inlocuiti. Vectorii non-virali (pe baza de polimeri naturali, de polimeri sintetici, de materiale anorganice si de compusi hibrizi) pot fi obtinuti la nivel industrial, intr-o mare varietate, iar structura si caracteristicile lor pot fi controlate, datorita versatilitatii materialelor implicate. Principalul dezavantaj, constand in eficienta relativ scazuta in raport cu vectorii virali, pare sa fie diminuat tot mai mult datorita progreselor din ultimii ani in ce priveste tehnicile de obtinere si caracterizare. In concordanta cu evolutia din domeniul chimiei compusilor macromoleculari, tot mai multe din sistemele experimentale de livrare a principiilor active, inclusiv a materialului genic, includ polimeri biodegradabili, dendrimeri, polimeri electroactivi si fullerene C-60 modificate chimic si apoi conjugate cu specii macromoleculare.

Biopolimerii (precum proteinele, oligo- si poli-zaharidele) sunt materiale preferate, datorita accesibilitatii si proprietatilor lor, care permit cresterea eficientei de transfectie si evitarea efectelor secundare induse de compusii terapeutici incorporati (medicamente, peptide, proteine), respectiv. Avantajele

de remarcat ale biopolimerilor sunt: lipsa de toxicitate chiar in doze/concentratii mari, biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, mucoadezivitatea, functionalitatea ridicata, posibilitatea de modificare fizico-chimica eficienta in vederea functionalizarii suplimentare. Printre polimerii naturali investigati pentru utilizarea lor in transferul genic se numara collagenul, gelatina, chitozanul, alginatii si derivatii obtinuti prin modificarea acestora^{19,20,21}.

Colagenul este de departe materialul preferat pentru astfel de aplicatii, in ciuda unor dezavantaje legate de sursa si modul de prelucrare/purificare (Tabelul 1).

Tabelul 1. Avantajele si dezavantajele utilizarii collagenului ca biomaterial²²

Avantaje	Dezavantaje
- accesibilitate; - lipsa antigenicitatii; - biodegradabilitate, bioresorbabilitate; - lipsa toxicitatii; - biocompatibilitate intrinseca; - efect sinergic prin combinare cu diversi compusi bioactivi; - actiunea hemostatica; - biodegradabilitate posibil de controlat; - functionalitate ridicata; - compatibilitate cu polimeri sintetici.	- cost ridicat al formelor pure; - variatii ale compozitiei/caracteristicilor de la un sortiment la altul sau intre loturi; - hidrofilia ce favorizeaza umflarea si eliberarea rapida a principiilor active; - viteza variabila de degradare in vivo; - reproductibilitate modesta a proprietatilor; - dificultati la sterilizare.

Aceste caracteristici au determinat utilizarea larga a collagenului ca biomaterial²³ in domenii precum: oftalmologie (pelicule protectoare), dermatologie si tratarea ranilor ori arsurilor (matrici poroase), eliberarea de compusi activi la administrarea orala, parenterala, transdermala (sub forma de suspensii, tablete, geluri, nanoparticule), cultura celulara (criogeluri si geluri), ingineria tisulara (scaffold-uri pentru inlocuirea / regenerarea pielii, osului, vaselor de sange, valvelor cardiace), chirurgie (suturi, agenti hemostatici), stomatologie (membrane pentru regenerarea dirijata a tesuturilor, pulberi si membrane cu rol de adeziv sau agent hemostatic in interventii si implantologie).

Pentru transfer genic collagenul a fost utilizat, ca si alti polimeri naturali, drept suport, sub forme diverse, de la nanoparticule la scaffold-uri tridimensionale, membrane poroase, filme dense, geluri, paste. Studii efectuate asupra aplicabilitatii unor granule de atelocolagen in terapia genica au evidentiat capacitatea acestuia de a proteja acizii nucleici impotriva degradarii chimice sau enzimatic. Injectarea acestui sistem non-viral de transfectie a condus la prelungirea efectelor biologice, ceea ce ar putea permite ameliorarea eficientei in transfectie²⁴. Ca sistem non-viral particulat (la nivel micro- sau nano-) s-a utilizat pentru transferul de gene prin administrare pe cale orala si intramusculara²⁵. Particulele s-au obtinut prin metoda emulsifierii si reticularii collagenului nativ (3 - 40 μm). Diminuarea in continuare a dimensiunilor (pana la 1 μm , sau chiar 0,1 μm) conduce la denaturarea proteinei. O alternativa de evitare a acestui neajuns consta in conjugarea proteinei cu alte biomateriale, sau modificarea sa chimica fara afectarea structurii native (conformatia de triplu helix) si a proprietatilor corelate cu aceasta^{26,27}.

Rezultate raspornate de diverse grupuri de cercetare au demonstrat ca includerea de material genic cu rol terapeutic intr-o matrice tip scaffold din collagen este deosebit de avantajoasa in ingineria tisulara, in special in cazurile in care se doreste o prelungire a duratei de viata in fluxul sanguin, a expresiei transgenice (stabilitate a expresiei transgenice in timp) si localizarea spatiala a efectului. Structura matricei pe baza de collagen, reticulata sau nu, solida sau sub forma de gel, precum si modul de atasare a materialului genic (legare covalenta, atasare prin interactiuni necovalente sau includere – Figura 8²⁸) influenteaza mult

eficienta transfectiei prin efectul asupra atasarii, eliberarii, protectiei plasmidei sau moleculei de ADN. De exemplu s-a raportat ca matrici pe baza de colagen sau atelocolagen (obtinut prin eliminarea enzimatica a telopeptidelor din colagen) pot induce expresia transgenica si ameliorarea fiziologica in regenerarea osoasa sau in tratarea si vindecarea ranilor si afectiunilor la nivelul altor tesuturi (muscular, oftalmic, nervos, vascular), in unele cazuri ca atare, dar mai ales prin includerea sau legarea covalenta a materialului genic (ex. ADN nemodificat, sau ADN plasmidic)^{29,30,31,32,33}. Cresterea eficientei transfectiei si a regenerarii tesuturilor este mai mare in cazul legarii la matricea proteica a componentei capabile de impachetarea sau complexarea cu materialul genic, fie inainte (ex. modificare a colagenului cu polilizina prin grefare sau reticulare³⁴, ori legarea covalenta a unor anticorpi anti-ADN³⁵), fie dupa complexarea cu ADN plasmidic sau ADN liniar. In cel de al doilea caz, implantarea sistemului combinat vector non-viral/matrice se realizeaza prin tehnici chirurgicale (includere a poliplexului *in vitro* in scaffolduri preformate), sau prin injectare (celule, NP vector, NP scaffold, ADN), aceasta din urma tehnica fiind minimal invaziva. Cel mai adesea s-au utilizat polipepsi ce includ polietilenimina (PEI), poli-L-lizina (PLL) sau poliamidoamine (PMAM) drept vectori non-virali. Cateva exemple sunt cuprinse in Tabelul 2. Utilizarea acestor polimeri cationici in combinatiile mai sus prezentate se conduce la avantajele si dezavantajele rezumate in Tabelul 3, constatate in cursul procesul de transfectie. Citotoxicitatea sau biodegradabilitatea scazute, remarcate in anumite cazuri, pot fi ameliorate prin combinare cu polimeri naturali, care sunt intrinsec biocompatibili si biodegradabili.

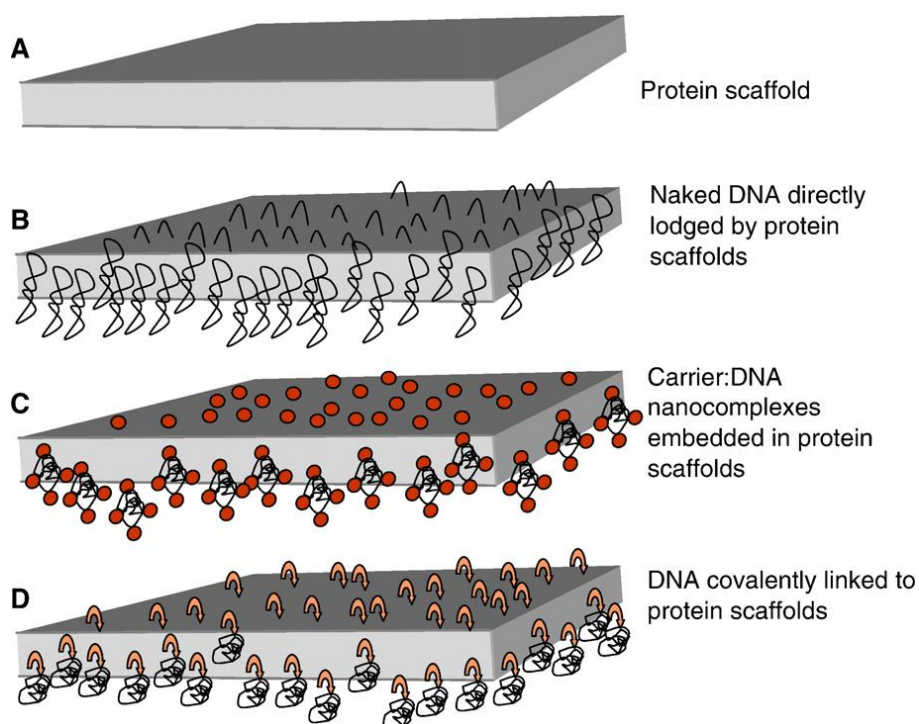


Figura 8. Sisteme de eliberare a materialului genic pe baza de scaffold-uri proteice.

A. - Matricea proteica actioneaza ca un scaffold capabil sa gazduiasca acidul nucleic cu rol terapeutic; **B.** - ADN pur este direct inclus in scaffold-ul proteic prin procese succesive de imersare – uscare prin liofilizare; **C.** - Sistemul vector/ADN este inclus in matricea proteica, apeleand la doua strategii: (i) legarea/reticularea purtatorului la matrice inainte de complexarea cu materialul genic; (ii) includerea nanocomplexului carrier/ADN deja format in matricea tip scaffold; **D.** - ADN-ul nemodificat sau complexat este legat covalent la matricea proteica. Acest tip de sistem permite prelungirea si localizarea expresiei genice in culturile celulare si in tesuturile vizate.

Tabelul 2. Sisteme combinatoriale pentru transfectie pe baza de polimeri naturali. (Scaffold-uri pe baza de (atelo)colagen ce incorporeaza poliplecsi)

Material scaffold	Structura scaffold	Polimer cationic	Raport N:P	Plasmida	Ref.
Colagen tip I (din tendon cabalin)	Burete	PEI	6:1	P55pCMV-IVS-luc+	36
Colagen tip I (din derma bovine)	Film	PEI	10:1	Plasmida pGL3	30
	Burete	PAMAM partial degradata	1:1 ÷ 10:1	gLUC plasmida luciferaza Gaussia Princeps	27
	Burete	PEI	10:1	plasmida cu gena reporter (1) fosfataza alcalina (2) pGL3- luciferaza	30
	Pasta sau granule	PLL	2 : 1	plasmida cu gena reporter (1) pEGFP-N1 (2) FGF2 cADN (3) (TK)cADN (4) NT3cADN (5) BDNF cADN	31
Colagen tip I (din derma bovine)	Film	PMAM G5 G7 G9	0,1:1 ÷ 20:1	plasmida cu gena reporter (1) pCF1-Luc (2) pCF1CAT (3) pEGF1	32
Acid hialuronic / colagen	Pasta sau granule	PLL	2:1	plasmida cu gena reporter (1) pCF1-Luc (2) GFP	32
Colagen / acid poliglicolic	Hidrogel	PEI	5:1	plasmida cu gena reporter pBacBH2	33
	Burete	PEI acetilata	3:1 masic	plasmida cu gena reporter hBMP-2	

Tabelul 3. Carrieri polimerici cu aplicatii in transfectie

Polimerul	Avantaje	Limite
Chitozan	Buna biocompatibilitate si biodegradabilitate; caracter imunogen scazut; toxicitate redusa; activitate antimicrobiana.	Slaba insolubilitate la pH fiziologic. Eficienta slaba de transfectie.
PEI	Capacitate ridicata de condensare a ADN, mai mare pentru PEI liniar comparativ cu de PEI ramificat. Activitate endosomală intrinsecă. Capacitate de tamponare. Eficienta ridicata de transfectie, cu posibila crestere in cazul PEI modificata hidrofoab.	Biodegradabilitate scazuta sau lipsa. Contradictie intre citotoxicitate si eficienta de transfectie, ambele dependente de masa moleculara.
PAMAM	Functionalitate de suprafata ridicata. Eficienta de transfectie relativ buna. Uniformitate dimensionala. Citotoxicitate mai joasa comparativ cu alte materiale.	Eficienta de transfectie modesta.
PLGA	Biodegradabilitate buna. Biocompatibilitate buna.	Eficienta scazuta de incapsulare si eliberare a pADN. Induce aciditate in mediul lichid.
PLL	Capacitate excelenta de condensare a pADN, care creste cu masa moleculara	Citotoxicitate relativ joasa. Slaba eficienta de transfectie.

Limitele actuale in cazul acestor sisteme combinate sunt corelate nu doar cu unele dezavantaje ale poliplecilor, ci si cu posibilitatile de eliberare controlata a genelor (prin procese de difuzie si biodegradare) si de sterilizare finala a sistemului complex. O varianta propusa pentru a asigura controlul spatio-temporal la eliberarea materialului genic, prezentata in Figura 9, presupune incapsularea diferitelor gene in microsfele polimerice, care prin fuziune pot genera, in anumite conditii, un scaffold tridimensional. Utilizand tehnicile actuale microsfelele pot fi distribuite rapid si in mod controlat in structura spatiala finala a complexului. Din punctul de vedere al eliberarii inlantuite in timp, se presupune ca mai intai se va elibera materialul aflat la marginea structurii spatiale si apoi cel din interior, procesul fiind controlat de difuzie si eventual de viteza de biodegradare. De remarcat este faptul ca se pot obtine rezultate mai bune, in ceea ce priveste localizarea si persistenta expresiei genice, precum si cresterea ratei de supravietuire a celulelor pe termen lung in cazul folosirii unei combinatii intre colagen si alt material (polimer natural sau sintetic, ori material anorganic) pentru realizarea scaffold-ului.

In acest context, pentru una dintre alternativele de realizare a noi vectori non-virali, s-a optat pentru nano-particule multifunctionale pe baza de atelocolagen si polimeri cationici. Aceasta optiune are in vedere posibilitatea includerii in sisteme combinate vector non-viral/matrice tridimensionala tip scaffold, in baza (i) rezultatelor bune raportate in literatura in cazul utilizarii colagenului sub diverse forme ca suport in transfectie (mai ales in tratarea/regenerarea tesutului osos), (ii) evidentierii activitatii osteoinductive a formelor colagenice³⁷, (iii) datelor anterior obtinute privind caracteristicile sistemului selectat (colagen-acid hialuronic-PCL) (lucrari anterioare ale grupului, incluzand si rezultate din etapele 2012 si 2013 ale acestui proiect^{38,39,40,41,42}).

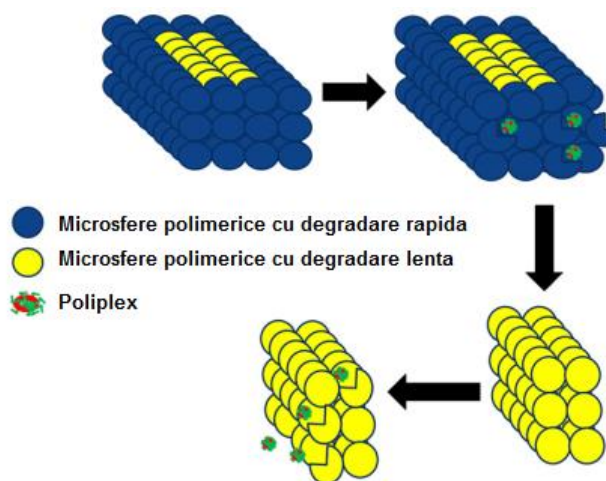


Figura 9. Principiul de alcatuire a unui scaffold ce asigura controlul spatio-temporal la eliberarea materialului genic.

Micro- si nano-particule pe baza de biopolimeri (proteine, polipeptide, acizi nucleici, polizaharide si amestecuri ale acestora) se pot obtine prin urmatoarele metode^{43,44}:

- emulsionare (Figura 10a);
- desolvatare indusa de modificarea temperaturii sau pH-ului, de adaosul de saruri sau solventi organici, de complexarea cu macromolecule, ori prin ultrasonare sau chiar prin reticulare chimica (Figura 10b);
- coacervare (Figura 10c⁴⁵);
- atomizare (spray drying);
- altele: fluidizare si precipitare; polimerizare interfaciala; extrudere prin ace, membrane sau canale ale unor dispozitive destinate tehnicilor microfluidice (microfabricare^{46,47}), tehnologii de fabricare a particulelor cu dimensiuni de inalta precizie (PPF)⁴⁸; incorporare de surfactanti in sistem⁴⁹; autoasamblare (utilizand vezicule lipidice ca matrita sau ca microreactor⁵⁰); tehnici litografice⁵¹; tehnici bazate pe utilizarea de fluide in stare supercritica sau a presiunii ridicate etc.

Metodele clasice sunt insotite adesea de alterarea structurii native. Pastrarea biocompatibilitatii este insa posibila prin evitarea utilizarii agentilor chimici de reticulare, in favoarea stabilizarii prin interactii ionice sau prin tratamente fizice⁵². Un deosebit interes s-a acordat cresterii functionalitatii si versatilitatii formelor colagenice prin modificare chimica sau conjugare cu alte molecule ori materiale functionale, ceea ce permite eliberarea succesiva sau concomitenta a mai multor agenti bioactivi (functie de modul de incarcare si localizare a componentelor bioactive in structura nanocapsulei), eliberarea dirijata (urmare functionalizarii superficiale), cresterea eficientei terapeutice si asigurarea de facilitati in strabaterea barierelor biologice (prin cresterea permeatiei si efectului de retinere)⁵³. Comparativ cu micro- sau nanoparticulele ori micro- sau nano-capsulele pe baza doar de polimeri sintetici, cele pe baza de biopolimeri sau de combinatii biopolimer/polimer sintetic ofera si avantajul reducerii imunogenicitatii⁵⁴.

Parte din alternativele preparative dezvoltate in cazul micro-/nanocapsulelor pe baza de proteine sunt redate in Figura 11.

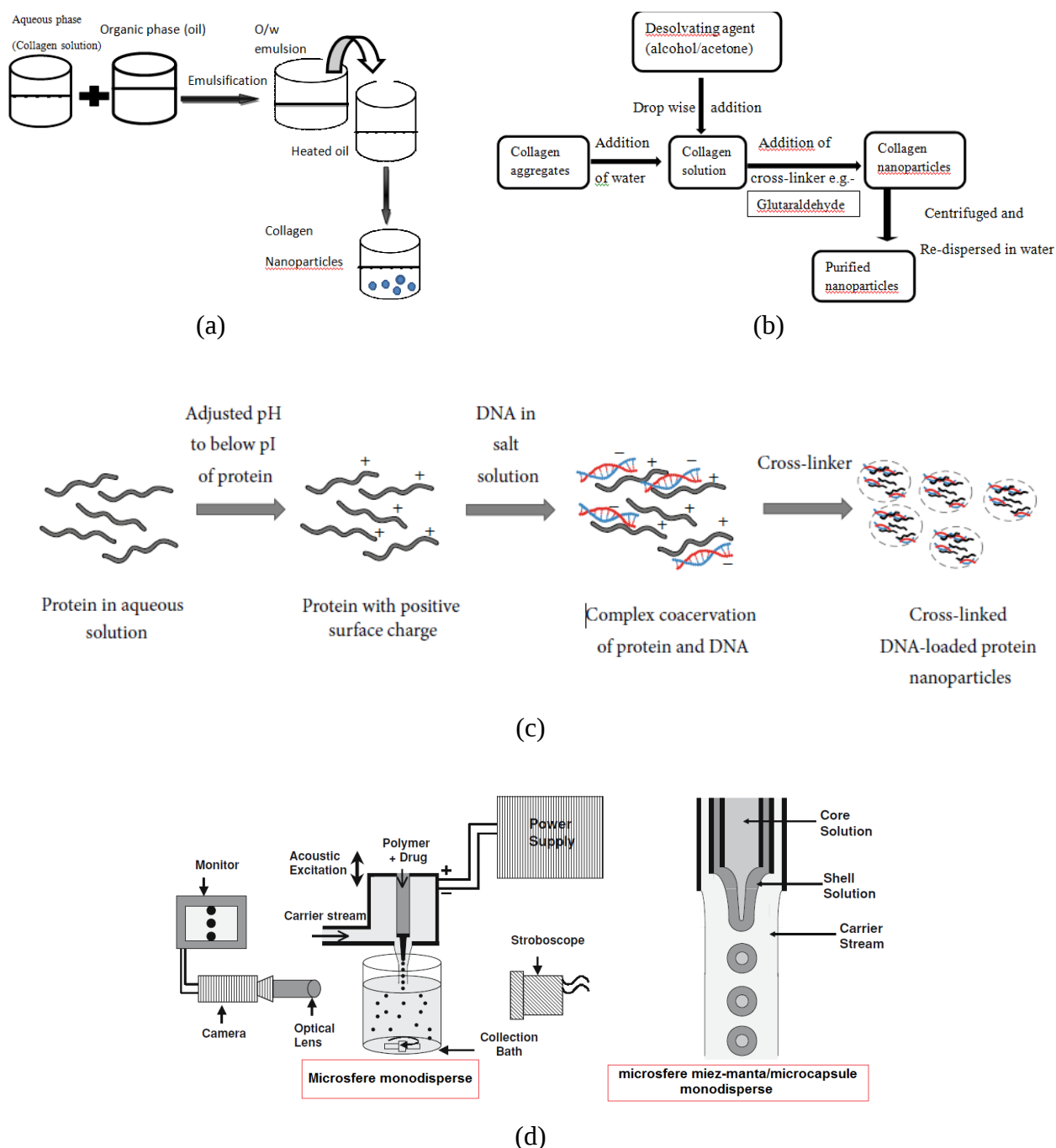


Figura 10. Alternative de preparare a micro- si nano-particulelor pe baza de proteine (colagen, gelatina etc.): (a) emulsionare; (b) desolvatare; (c) coacervare; (d) PPF.

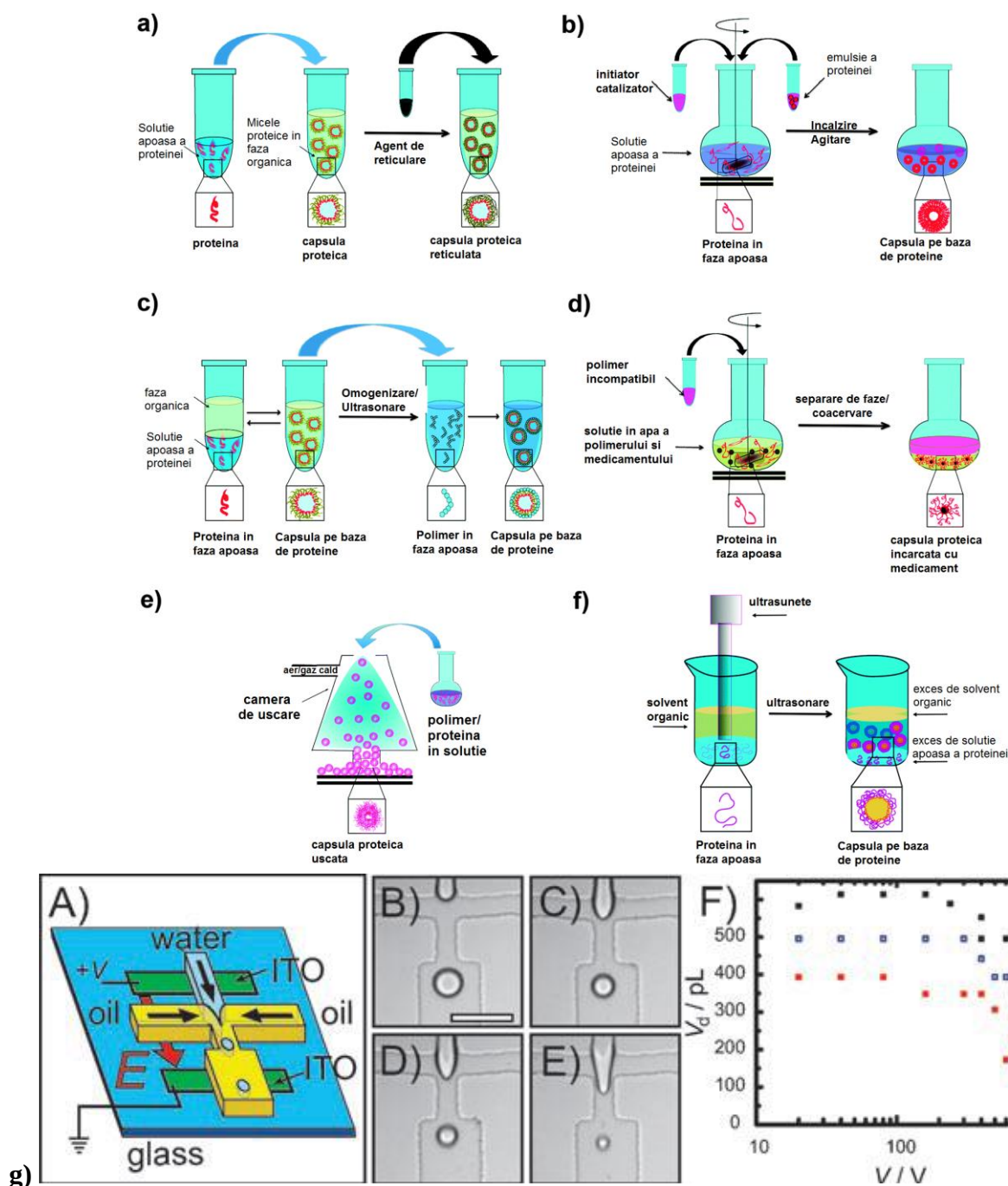


Figura 11. Reprezentarea schematica a metodelor de emulsionare utilizate la prepararea de capsule pe baza de proteine:

(a) emulsionare simpla; (b) polimerizare (reticulare); (c) dubla emulsionare; (d) separare de faze / coacervare; (e) atomizare; (f) emulsionare prin ultrasonare; (g) emulsionare in dispozitive microfluidice (A. Generarea de micropicaturi incarcate cu sarcini electrice sub actiunea curgerii si a campului electric; scaderea dimensiunilor la cresterea tensiunii aplicate: B. $V=0$ V; C. $V=400$ V; D. $V=600$ V; E. $V=800$ V; F. efectul vitezei de curgere si al campului electric asupra dimensiunilor picaturilor pentru 3 valori diferite ale vitezei de curgere a fazei uleioase continue : $Q_c=80$ nLs^{-1} (negru), 110 nLs^{-1} (albastru) si 140 nLs^{-1} (rosu)).

Pentru collagen, metodele generale de obtinere si caracteristicile sistemelor nanoparticulate rezultate sunt redade in Tabelul 4.

Tabelul 4. Realizarea micro- si nano-capsulelor pe baza de collagen.

Metoda de emulsionare	Stabilitatea	Dimensiunea nanocapsule	Toxicitate	Aplicabilitate in eliberare de principii active
Separare de faze	Medie	1-2 mm	Medie	Compatibil
Coacervare	Inalta	100-200µm	Netoxic	Compatibil
Extragerea solventului	Medie	100 nm–1 µm	Netoxic	Compatibil
Polimerizare templata	Inalta	100 nm–1 µm	Netoxic	Nu exista date

Pentru marirea functionalitatii / versatilitatii se procedeaza la functionalizarea suprafetei prin: (i) utilizarea unui amestec de doua proteine cu functionalitate diferita; (ii) acoperirea capsulelor proteice cu alti polimeri biocompatibili; (iii) conjugare cu polizaharide; (iv) conjugare cu diferiti liganzi. Selectarea polimerilor ce formeaza stratul de suprafata in structurile multistrat poate asigura o stabilitate crescuta (rigidizare) a micro-/nano-capsulei, biocompatibilitate, capacitate de raspuns la diversi stimuli externi⁵⁵ sau permeabilitate selectiva, importanta pentru etapa de incarcare/eliberare (selectiva) de component bioactiv.⁵⁶ O alternativa pentru realizarea de micro-si nano-capsule cu functionalitate crescuta prin realizarea structurilor multistrat o reprezinta aplicarea tehnicii de depunere strat-cu-strat (LbL),^{57,58} caracterizata prin versatilitate si flexibilitate. Aceasta se bazeaza pe adsorbtia succesiva a unor specii cu sarcini electrice opuse, ce genereaza structuri multistrat. Depunerea se poate realiza pe un substrat initial, care poate avea diferite forme si dimensiuni, de la suprafete plane pana la particule sferice. Desi tehnica LbL avea drept scop initial realizarea de filme pe un substrat solid, cu controlul grosimii filmului si al sarcinii de suprafata, in timp s-a demonstrat ca poate fi utilizata si pentru adaptarea porozitatii, capacitatii de umflare sau hidratare, a vascoelasticitatii, topografiei in filme si micro-/nano-particule, doar prin schimbarea naturii polielectrolitului, a pH-ului sau tarii ionice in solutia ce se utilizeaza la depunerea fiecarui strat subtire. In domeniul biomedical, structurile multistrat ofera posibilitatea varierii cineticii si profilului de eliberare in limite largi. Componenta bioactiva poate fi inglobata in interiorul rezervorului capsulei, in straturile peretelui capsulei, sau la suprafata acesteia (Figura 12). Straturile pot dobandi permeabilitate diferita, viteza diferita de degradare, eventual abilitate de raspuns la diversi factori externi. Aceasta tehnica se poate aplica cu succes si in cazul biopolimerilor.^{59,60} Exista mai multe raportari privind obtinerea si caracterizarea unor micro-/nano-particule (micro-/nano-capsule) pe baza de collagen vizand aplicatii atat in eliberarea controlata, cat si in formulari cosmetice⁶¹. Cele mai importante aspecte investigate includ: (a) controlul dimensional si structural, respectiv controlul functionalitatii, care sa asigure controlul abilitatii de eliberare a compusului bioactiv (cinetica de eliberare si eficienta terapeutica), (b) mentinerea biocompatibilitatii (indicata fiind pastrarea structurii native de triplu helix), (c) elaborarea de noi metode de obtinere sau eficientizarea celor existente, deoarece metodele clasice pentru obtinere de sisteme particulare aplicate la biopolimeri conduc adesea la matrici instabile, sau necesita etape de preparare derulate in conditii drastice (tratamente chimice, termice, iradiere UV), care afecteaza structura nativa a proteinei. Tehnicile recent elaborate pentru obtinerea de micro-/nano-particule (microsfere sau microcapsule) multistrat pe baza de polimeri naturali sau sintetici, sunt cele nanolitografice, microfluidice⁶², sau tehnologia de fabricare cu precizie a particulelor (PPF).

Cele mai multe date cu privire la sisteme particulare cu perete multistrat pe baza de collagen se refera la microparticule de dimensiuni apreciabile⁶³, in domeniul nanometric, atinse de obicei in cazul conjugatelor (formarea structurilor multistrat avand la baza procese de autoasamblare)⁶⁴ (Figura 13). Controlului distributiei dimensionale si obtinerea de particule monodisperse, cu dimensiuni controlate, este posibila doar utilizand dispozitive speciale de microfluidica. Pentru microsferile de collagen dimensiunile minime

raportate sunt de circa 350nm, produse in interiorul unor vezicule lipidice cu rol de matrita spatiala (template), printr-un proces de auto-asamblare.

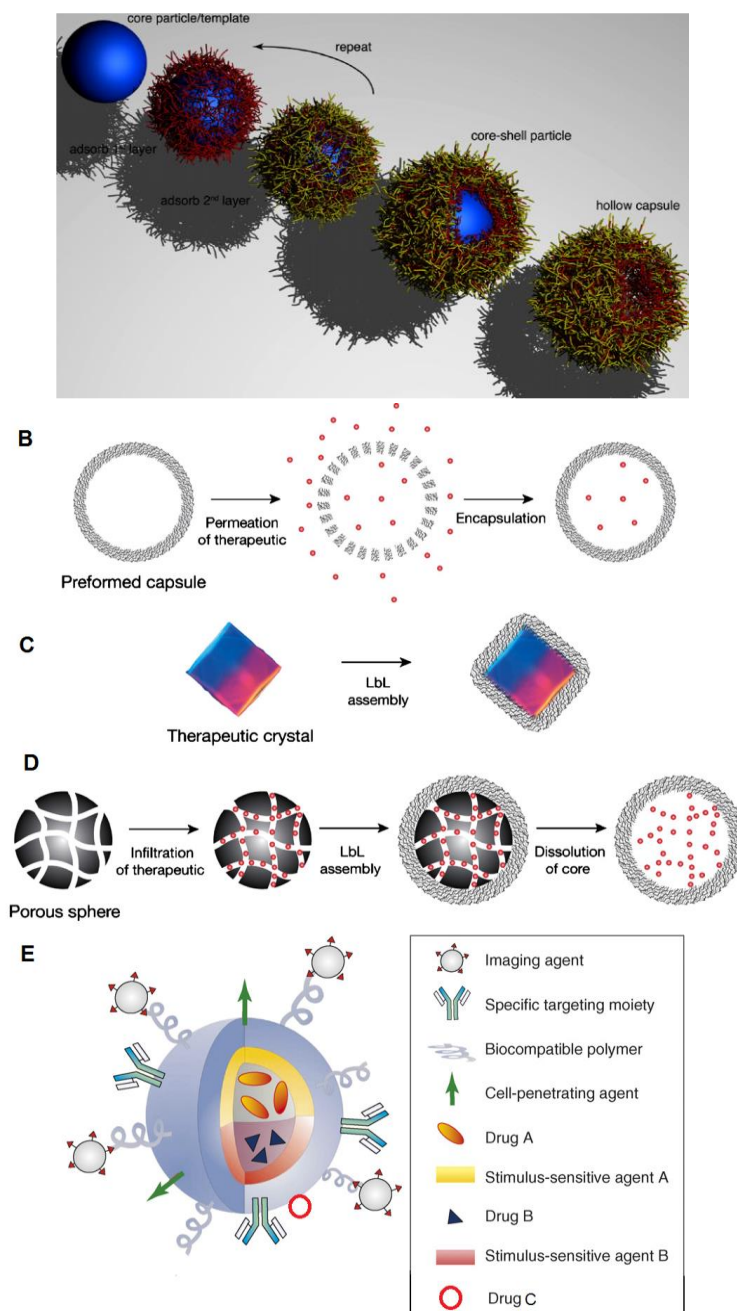


Figura 12. Micro-/nano-capsule multistrat cu aplicatii in eliberarea controlata.

(A) Formarea prin depunere succesiva pe o particula coloidala templat, urmata de indepartarea selectiva a miezului (micro-/nano-sferei templat) prin peretele polimeric semipermeabil. Diferite metode de incapsulare a compusului activ: (B) incarcarea unor capsule preformate; (C) incapsulare de particule cristaline; (D) inglobarea in particule poroase; (E) Micro-/nano-capsula multistrat cu functionalitate multipla, cu abilitate de eliberare controlata a mai multor compusi biologic activi.

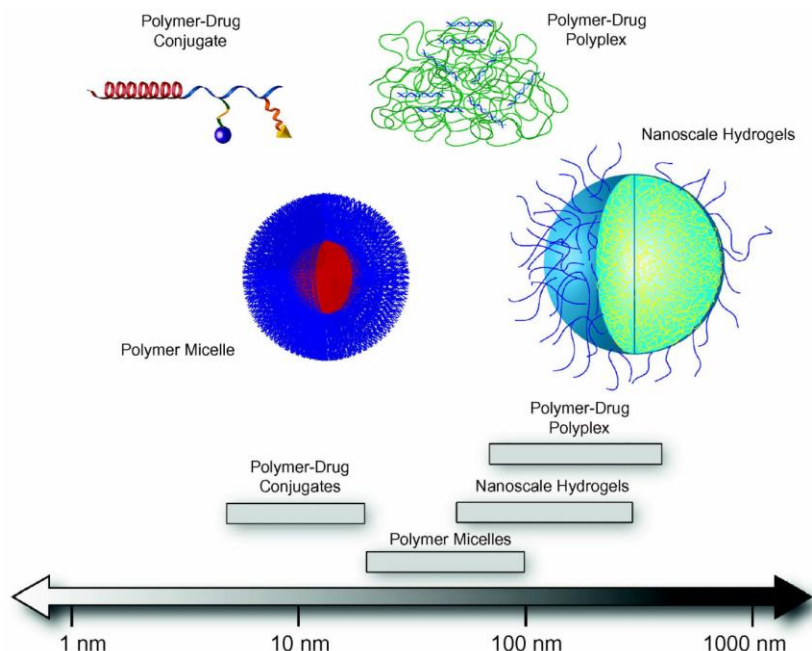
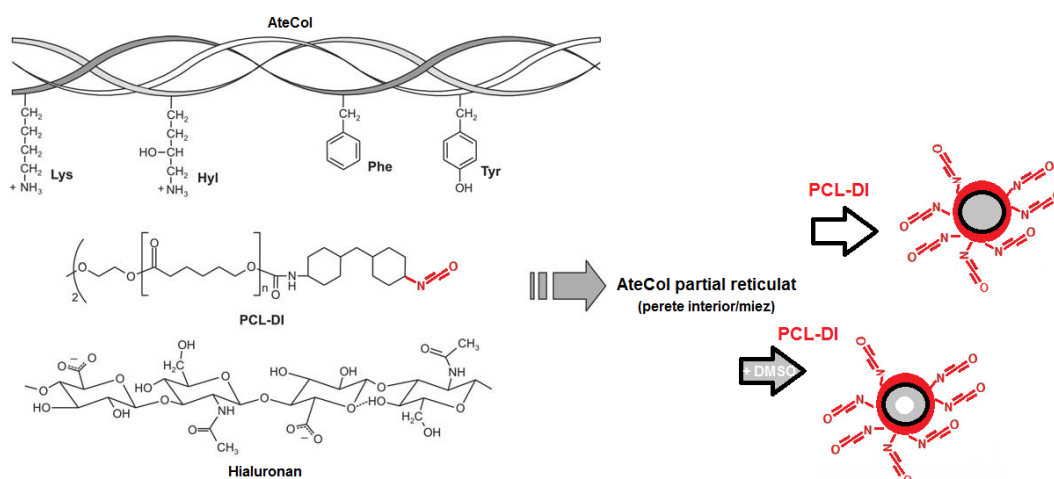


Figura 13. Dimensiuni tipice pt sisteme particulare de eliberare a compusilor bioactivi⁶⁵.

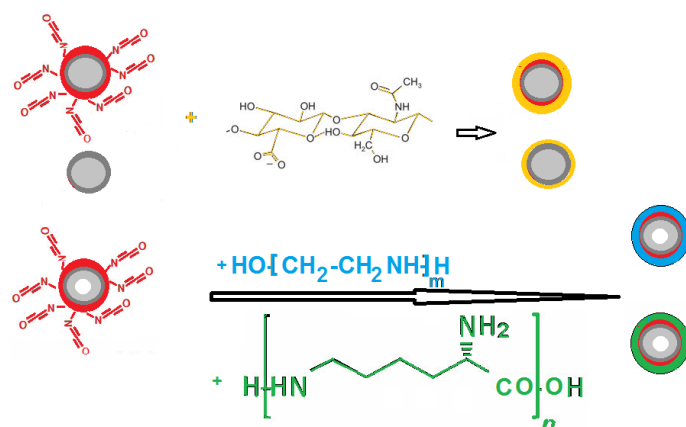
În mod original, în cadrul prezentului proiect s-a optat pentru o sinteză în mai multe etape, bazată pe metoda dublei emulsii (cu îndepărtare prin evaporare a solventului), care permite controlul dimensiunilor particulelor finale prin varierea condițiilor de reacție (concentrația polimerului, concentrația surfactantului, raportul fază dispersă/fază continuă, viteza de agitare), echipamentul de laborator fiind foarte simplu.

Într-o primă etapă s-a realizat un amestec semigelificat de proteină - polizaharidă - agent de reticulare, care apoi s-a introdus într-o soluție în clorura de metilen a polimerului vizat să formeze un prim strat de acoperire. Într-o a treia etapă, emulsia rezultată s-a transferat într-o a doua fază, apoasă, ce conține alcool polivinilic drept stabilizator, generându-se o a doua emulsie. După îndepărtarea prin evaporare a solventului, particulele au fost supuse separării (prin centrifugare), purificării (cicluri de centrifugare/spălare repetate). Funcție de condițiile de reacție particulele rezultate dețin un strat exterior de grosime variabilă, constituit din policaprolactonă grefată cu grupe izocianat nereactionate (Schema 1).



Schema 1. Reacțiile implicate în obținerea particulelor pe baza de biopolimeri cu strat exterior PCL-DI.

Parte din particule au fost redispersate in apa bidistilata si supuse unor reactii de functionalizare de suprafata. Drept material pentru ultimul strat de acoperire s-a utilizat acidul hialuronic, polietilenimina si poli(L-lizina) (Schema 2).



Schema 2. Utilizarea grupelor izocianice pentru atasarea straturilor de suprafata pe baza de DMSHA, PEI sau PLL.

Drept componenta proteica, in prima etapa, s-a utilizat atelocolagen (AteCol)⁶⁶, acesta prezentand avantajul antigenicitatii scazute fata de collagenul intact, puritate si reproductibilitate crescute, solubilitate si prelucrabilitate mai buna. Aceste caracteristici au fost valorificate in sisteme destinate transfectiei^{67,68,69,70,71}, cu rezultate promitatoare. La temperaturi joase (sub 35°C, preferabil sub 25 °C), la $\text{pH} \leq 6$ collagenul/atelocolagenul poate complexa cu ADN, asigurand compactarea si protejare acestuia din urma fata de alterarea fizico-chimica si de atacul nucleazelor, caracteristica ce sta la baza unor studii aplicative in transferul genic (Figura 14). S-a remarcat totusi faptul ca valorile expresiei genice pentru sistemul pADN/purtator biocompatibil non-viral (pADN inclusa in lipozom sau complexata cu PEI) incorporat in matrice de collagen au fost superioare in raport cu rezultatul obtinut in cazul utilizarii pADN ca atare, liber. S-a evidentiat astfel avantajul utilizarii sistemelor combinate implantabile pe baza de collagen in obtinerea expresiei genice adecvate, prelungirea si localizarea acesteia.

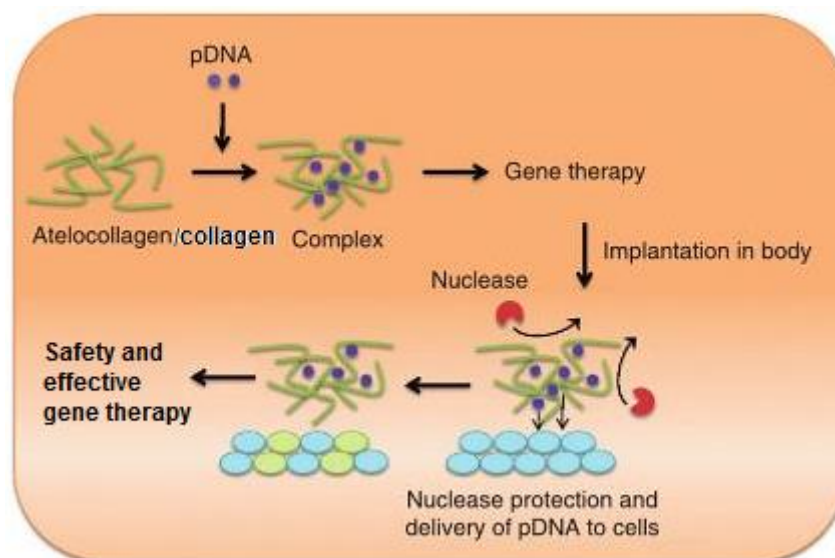


Figura 14. Mecanismul eliberarii de material genic mediata de atelocolagen/collagen.

Pentru realizarea unui material cu proprietati similare matricii extracelulare (ECM) si cu o stabilitate crescuta atelocolagenul s-a reticulat cu un derivat de acid hialuronic (dimetil-silandioli-hialuronat, DMSHA),

prin tratamente fizice si chimice: iradiere UV si utilizarea unui derivat bifunctional reactiv de poli-(ϵ -caprolactona), conform Schemei 1, in vederea ajustarii caracteristicilor fizico-chimice ale produsului. Acidul hialuronic (Figura 15) este un glicozaminoglican (GAG) solubil in apa, caracterizat prin biodegradabilitate, biocompatibilitate, non-imunogenicitate, capacitatea de a forma filme sau geluri. Acesta dobandeste incarcare anionica in conditii fiziologice, putand fi usor prelucrat si modificat chimic intr-o mare varietate de derivati.^{72,73,74} In plus acidul hialuronic joaca un rol important in modularea functiilor biologice in organism si poate proteja ADN-ul impotriva degradarii oxidative.⁷⁵ In transferul genic⁷⁶ acidul hialuronic se regaseste: (i) ca atare sau sub forma de microcapsule in care a fost inglobat ADN-ul; (ii) in copolimeri cu un policationit (polietilenimina, chitosan, poli(L-lizina))^{77,78,79}; (iii) in microsfele conjugate cu un anticorp monoclonal (cu abilitate de eliberare la tinta)⁸⁰; (iv) in nanoparticule⁸¹. pDNA complexat cu PEI a fost imobilizat intr-un hidrogel pe baza de collagen si acid hialuronic utilizand interactiuni necovalente (biotina-avidina si adsorbtie nespecifica)⁸². In toate cazurile s-au obtinut rezultate superioare fata de utilizarea de ADN simplu, respectiv diminuarea efectului toxic, prelungirea duratei de eliberare, cresterea eficientei transfectiei, eliberare la tinta etc.

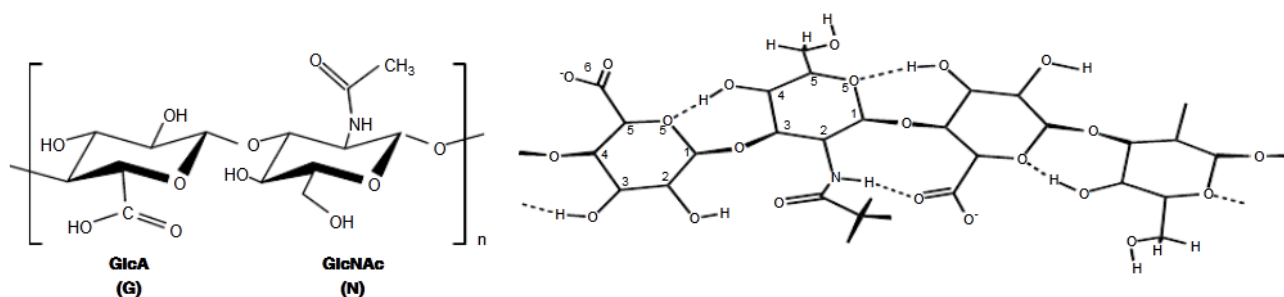


Figura 15. Acidul hialuronic. Structura chimica si reseaua legaturilor de hidrogen in hialuronan.

Derivatii de acid hialuronic a fost folositi si pentru realizarea stratului de suprafata, in baza interactiunilor specifice dintre collagen si acid hialuronic^{83,84} (complexare prin interactiuni electrostatice si legaturi de hidrogen, Figura 16), sau a interactiunilor posibile cu stratul PCL-DI exterior. De mentionat ca aceasta comportare specifica in sistemul proteina-polizaharid a fost utilizata in realizarea de filme multistrat prin tehnica LbL prima oara in 2005⁸⁵, desi primele studii de utilizare a tehnicii LbL in realizarea de structuri multistrat pe baza de collagen se raportasera in 2001 (Kotov et al.⁸⁶). Microcapsule multistrat pe baza de acid hialuronic si PLL, stabilizate prin reticulare au fost raportate in 2007⁸⁷. In nici unul din aceste cazuri nu s-au efectuat studii ale aplicabilitatii in transfectie. Recent⁸⁸ s-au realizat microcapsule biodegradabile multistrat (cu dimensiuni de 3 ÷ 6 μ m) cu perete constituit prin depunere succesiva de collagen si acid hialuronic (tehnica LbL) pe un miez de CaCO₃ (microparticule obtinute prin metoda de coprecipitare, caracterizate prin biocompatibilitate, toxicitate joasa, solubilizare facila in conditii blande, ex. in solutie apoasa HCl 1M), in care s-a inclus o proteina model (BSA). Studiul cineticii de eliberare a demonstrat posibilitatea de control si modulare a caracteristicilor peretelui multistrat (grosime si permeabilitate determinata de numarul de straturi depuse si de gradul de reticulare al acestora, realizata inainte sau dupa formarea capsulei). Nu sunt raportate studii privind realizarea de nanosfere/nanocapsule multistrat care sa contina collagen, acid hialuronic si policationiti capabili de complexare cu ADN.

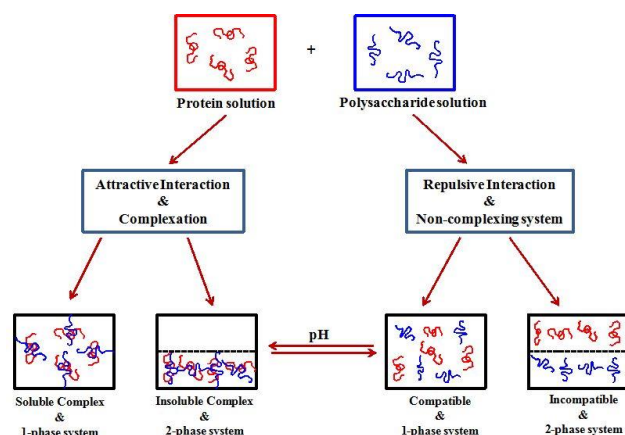


Figura 16. Comportarea sistemului proteina- polizaharid functie de pH.

Polietilenimina (Figura 17), in forma ramificata (BPEI) sau liniara (LPEI) este polimerul cationic cel mai utilizat in transfectie^{89,90,91,92} si unul dintre putinii polimeri sintetici care intra in componenta unui produs (vaccin pentru eliberarea ADN) aflat in testare la nivel clinic. Utilizarea sa in transfectie este argumentata de: capacitatea ridicata (dar mai mica decat a PLL) de compactare a ADN-ului, capacitate endosomală intrinsecă, abilitatea de a penetra membrana celulară (endocitoză), efect de tamponare (efect de burete de protoni, Figura 18, care facilitează traficul prin citoplasma și eliberarea materialului genic). Eficiența în transfectie crește în general cu raportul N/P (excesul de PEI contribuind la evitarea capturii endosomale) și masa moleculară, dar în același timp crește efectul toxic (citotoxicitate și hemocompatibilitate scăzute). Lipsa biodegradabilității este însă un dezavantaj major. În timp s-au dezvoltat diverse strategii pentru diminuarea deficiențelor, combinarea cu biopolimeri și PEG fiind printre alternativele des adoptate. S-a constatat că forma liniară, indiferent de condițiile de utilizare, asigură o viabilitate crescută a celulelor, localizare nucleară și eficiență crescută a transfectiei, comparativ cu vectorii non-virali pe baza de BPEI. LPEI cu Mw ~22kDa se afla actualmente in testare clinica. Numeroase studii efectuate cu vectori non-virali pe baza de LPEI sau BPEI cu mase moleculare mici, dar reticulate sau combinate cu alti polimeri, au demonstrat posibilitatea utilizării acestei variante pentru a obține atât eficiența crescută în transfectie, cât și citotoxicitate mult diminuată.

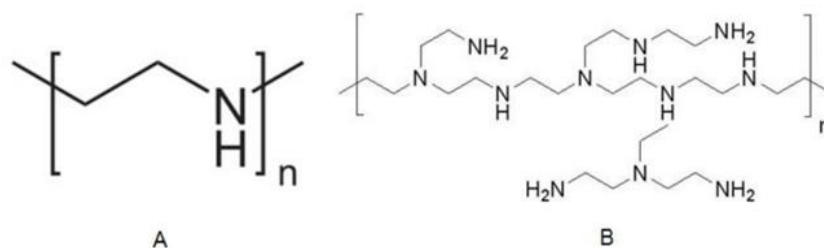


Figura 17. Structura polietileniminei liniare (A) și ramificată (B).

Cu toate că a fost primul polimer utilizat în transfectie (la sfârșitul anilor '80), datorită abilității deosebite de a împacheta ADN-ul, poli(L-lizina) (PLL) are aplicații mai restrânse în raport cu alți polimeri (inclusiv cu PEI) din cauza citotoxicității (corelată cu creșterea masei moleculare medii) și a capacității medii/reduce de transfectie. Combinarea cu alți polimeri (PEG, peptide, proteine etc) s-a impus ca o alternativă de ameliorare a unor deficiențe.

Una dintre tendințele ultimilor ani constă în combinarea mai multor materiale pentru a asigura performanțe optime (abilitate de împachetare a ADN și capacitate de transfectie) în condițiile unei

biocompatibilitati acceptabile (diminuarea citotoxicitatii), prin realizarea de nanoparticule miez/manta, care prezinta si avantajul penetrabilitatii crescute in virtutea dimensiunilor reduse (si controlabile).⁹³

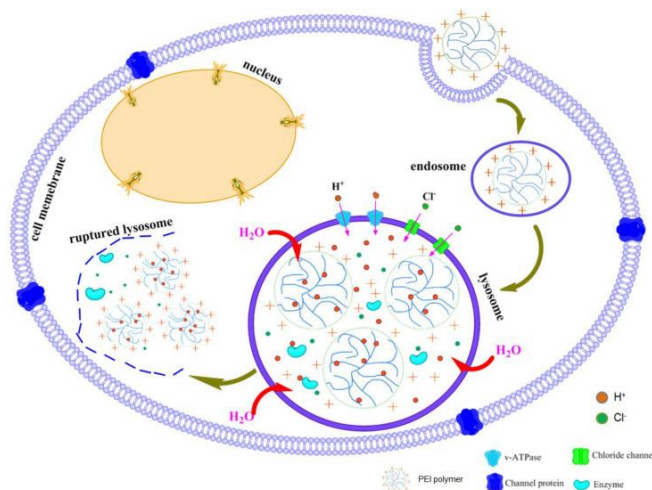


Figura 18. Efectele utilizarii PEI in tehnicile de transfectie.

In aceste conditii s-a optat pentru combinarea PEI si PLL cu biopolimeri (reducerea citotoxicitatii, cresterea biodegradabilitatii). Considerand datele de literatura, s-a preferat utilizarea de LPEI cu Mn ~1,6kDa, densitatea grefelor LPEI la suprafata nanocapsulei asigurand concentrarea adecvata a grupelor aminice secundare, cu eficienta in impachetare si transfectie.

Functie de dimensiune, particulele cu stratul superficial de derivat de acid hialuronic ar putea fi utilizate in vederea realizarii unui vector non-viral prin depunere succesiva de PLL si DMSHA (tehnica LbL, similar), sau ca o componenta (capabila de legare fizica) in sisteme injectabile tip scaffold pe baza de collagen.

II.2. Prepararea nanoparticulelor pe baza de biopolimeri acoperite cu PCL-DI

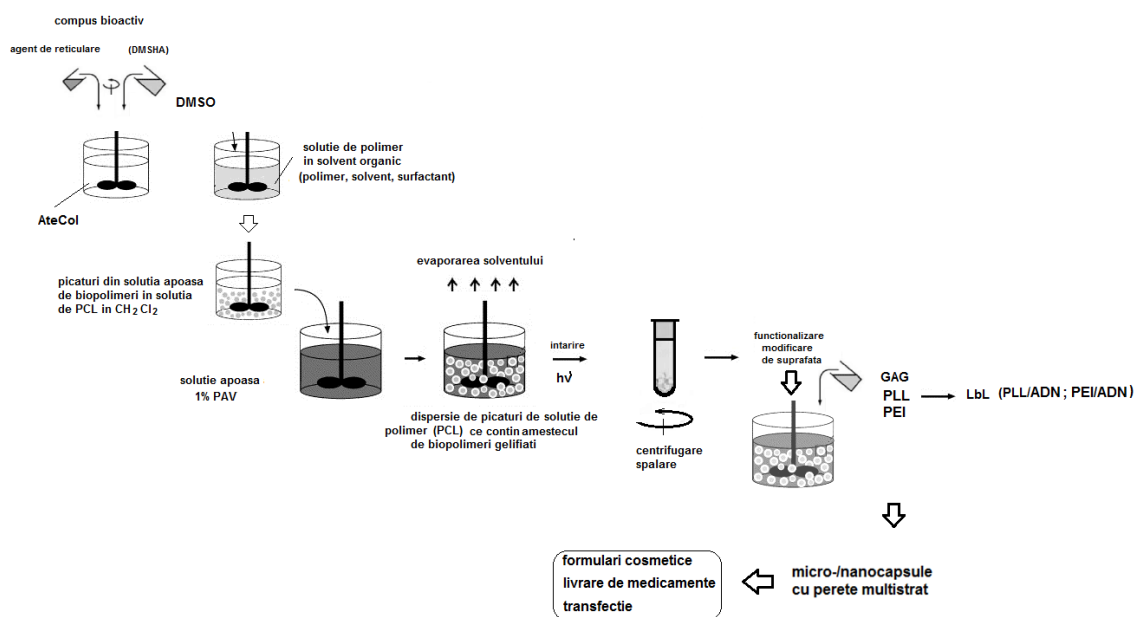
Particulele pe baza de biopolimer cu strat exterior din poli(ϵ -caprolactona) s-au preparat prin metoda dublei emulsii cu indepartarea prin evaporare a solventului. (conform schemelor 1 si 3).

S-au luat in considerare urmatorii parametri: compozitia amestecului initial de biopolimer si agent de reticulare PCL-DI (raportul DMSHA/AteCol, procent de agent de reticulare raportat la cantitatea de biopolimer), concentratia polimerului sintetic (PCL-DI) si a surfactantului in solutia de clorura de metilen (faza organica). Rezultatele sunt prezentate in Tabelul 5.

Deoarece proprietatile fizice ale unui hidrogel pe baza de collagen pot fi usor controlate prin formulare si grad de reticulare, este posibila o ajustare fina in acest mod a comportarii la eliberarea de compusi bioactivi. In acest scop, protocolul adoptat presupune realizarea intr-o prima etapa a unei dispersii de biopolimer cu reticulare slaba, datorita unui procent variabil de agent de reticulare (diizocianat de poli(ϵ -caprolactona), PCL-DI). Amestecul este introdus in lucru imediat dupa realizare, sau se folosesc cantitati definite dintr-o dispersie mama stocata la -25°C, pentru max 15 zile. Portiuni din acest amestec partial gelificat au fost solubilizate sau nu in DMSO si s-au adaugat, prin picurare, sub agitare energica (1000 rpm), la o solutie de PCL-DI in clorura de metilen (raport amestec initial : CH₂Cl₂ de 1:4 v/v), ce include un surfactant (Triton X-100).

DMSO este un solvent recunoscut pentru actiunea sa farmacologica drept antiinflamator, analgezic local, bacteriostatic, inhibitor al colinesterazei, diuretic, potentiator de actiune a medicamentelor administrate concomitent, vasodilatator, antioxidant, protector fata de actiunea distructiva a radiatiilor (prin

efect antioxidant si actiune directa asupra ADN, la concentratii mici), crioprotector.^{94,95,96,97} Poate influenta favorabil caracterul imunogen al collagenului (stimuleaza sistemul imunitar) si asigura diminuarea aderenței de trombocite (anticoagulant). Functie de concentratie poate influenta favorabil, sau nefavorabil multiplicarea si diferentierea celulelor, respectiv procesul de replicare a ADN si transcriptia. Aceasta explica aplicatiile multiple dar si masurile de precautie impuse.^{98,99} In cazul de fata DMSO este utilizat pentru solubilizarea collagenului slab reticulat, ceea ce asigura o dispersare eficienta in faza organica (dimensiuni mai mici pentru nanoparticulele rezultate), dar permite si obtinerea de nanocapsule, in lipsa sa obtinandu-se micro-/nano-sfere. DMSO, fiind un solvent miscibil cu apa si solventii organici, difuzeaza in mediul lichid prin peretele polimeric, evitand astfel acumularea in produsul final peste limita de toxicitate (fiind indepartat prin cicluri de centrifugare/spalare). Se asigura astfel un control al porozitatii/permeabilitatii peretelui micro-/nanocapsulei.



Schema 3. Prepararea micro-/nanoparticulelor cu perete multistrat pe baza de AteCol/PCL.

Dupa cum reiese din Tabelul 5 si din curbele DLS prezentate in figura 19, dimensiunea si polidispersitatea dimensionala sunt influentate mai ales de iradierea dispersiei rezultate dupa indepartarea solventului organic prin evaporare, de eficienta solvirii amestecului initial in DMSO si de procentul de surfactant in solutia de PCL-DI in clorura de metilen. Iradierea dispersiei rezultate dupa indepartarea solventului asigura stabilizarea stratului exterior format din PCL-DI printr-o slaba reticulare (rezultat al interactiunii grupelor izocianice in exces cu grupele -NH₂ si -COOH generate dupa scindarea statistica a catenelor poliesterice sub actiunea radiatiilor UV, intr-un procent minim in conditiile utilizate: 5 minute iradiere a dispersiei racite la 4°C) si legare suplimentara la grupele -NH₂ si -SH accesibile din stratul de biopolimeri. Fara iradiere se obtine o distributie multimodala (proba 1). Raportul DMSO:CH₂Cl₂ nu trebuie sa scada sub 1.2:4 v/v, cresterea dimensiunii si a polidispersitatii dimensionale fiind drastica sub aceasta valoare (Tabel 5, probele 4 si 5). Efectul concentratiei de Triton X-100 este mai modest (Tabel 5, probele 5 si 6). Alaturi de acesti doi parametri, eficienta dispersarii este puternic influentata de viteza de agitare si de forma agitatorului, toate contribuind la stabilitatea emulsiilor, aceasta din urma dictand dimensiunea si distributia dimensionala finala a particulelor generate.

Scaderea continutului in PCL-DI, atat in amestecul initial cat si in solutia in CH₂Cl₂ nu afecteaza mult randamentul, sau dimensiunea finala, dar pentru valori extreme (foarte mari sau foarte mici in raport cu gruparile cu care pot interactiona functiunile izocianice) poate crea probleme de stabilitate a stratului

exterior, cu afectarea polidispersitatii dimensionale (proba 3, proba 6). O cantitate mare de agent de reticulare afecteaza porozitatea stratului pe baza de biopolimer. Conform unor date anterioare peste 30% PCL-DI in amestecul initial presupune existenta unui exces peste maximumul de grupe reactive ce pot fi implicate in reactia cu grupele izocianice disponibile. Pentru a asigura o stabilitate si permeabilitate adecvata a peretelui polimeric s-a recurs la combinarea AteCol cu DMSHA in amestecul initial (abilitate de complexare/reticulare prin interactiuni specifice) si reducerea continutului in PCL-DI in solutia organica. Se poate observa ca rezultate optime se obtin cu un continut de 5% PCL-DI si 2% DMSHA in amestecul initial si, respectiv, 30% PCL-DI in solutia de clorura de metilen (Tabelul 5).

Tabelul 5. Influenta parametrilor de preparare asupra caracteristicilor sistemelor particulare rezultate.

Cod	AteCol (%)	DMSHA ^a	PCL-DI ^b (%)	PCL-DI ^c (%)	Surf ^d (%)	UV ^e	η (%)	Dn ^f (nm)	PDI ^f
1	100	-	50	66.7	4	-	77	32.3±8.8; 3868.6±978.4	0,53
2	100	-	50	66,7	4	+	85	33.4 ± 9.9	0,18
3	100	-	50	1	4	+	92	25.9 ± 4.4; 68.4±18.1 1065.3±227.3	0,65
4	100	-	50	30	2,5	+	67	88.1 ± 21.2	2,59
5	100	2	5	30	4	+	82	100,6±25,8	0,85
6	100	2	5	50	2,5	+	70	65,7±18,3	1.2
7	100	2	5	30	2,5	+	75	26,9±5	0,5
8	100	2	5	1	2,5	+	78	23.2±6.5	0.2
9	100	2	5	30	1,25	+	70	38,9±15	1,6

a- fata de cantitatea de AteCol din dispersia initiala;

b- fata de amestecul initial de biopolimeri;

c- PCL-DI in CH₂Cl₂ fata de amestecul de polimeri initial;

d- continut procentual de surfactant in solutia de clorura de metilen (v/v) ;

e- iradiere a sistemului W/O/W final (4 min, lampa cu mercur Osram HBO 200 W) dupa 4,5 ore de agitare la temperatura camerei si 30 min pe baie de gheata (1000 rpm);

f- Dn, diametrul mediu numeric; PDI, indice de polidispersitate ($PDI = (\sigma/D)^2$ = patrutul raportului intre deviatia standard si diametrul mediu); determinari DLS (Laser Shimadzu-SALD 700)

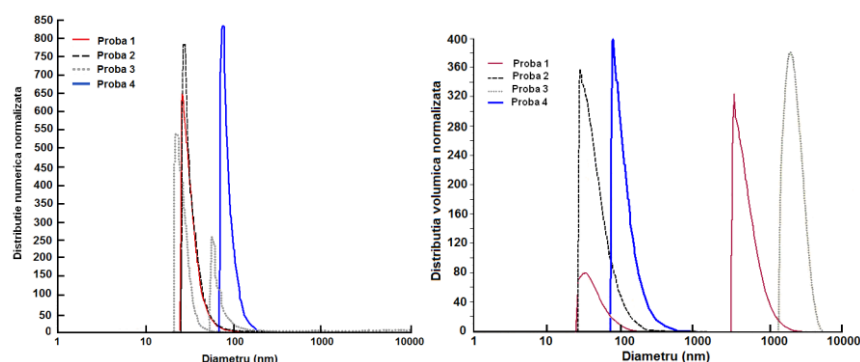


Figura 19. Distributia numerica si volumica pentru probele 1- 4 (date DLS).

Particulele rezultate se remarca prin forma sferica, stabilitate, dimensiuni in domeniul micronic sau chiar nanometric, functie de formulare. Stabilitatea creste, iar polidispersitatea dimensionala scade odata cu marirea cantitatii de PCL-DI din solutia de clorura de metilen, care formeaza stratul de suprafata. Din

microfotografiile SEM se observa ca iradierea UV in etapa finala contribuie la stabilizarea suplimentara si atasarea eficienta a stratului de PCL, dar si la diminuarea polidispersitatii dimensionale (Figura 20).

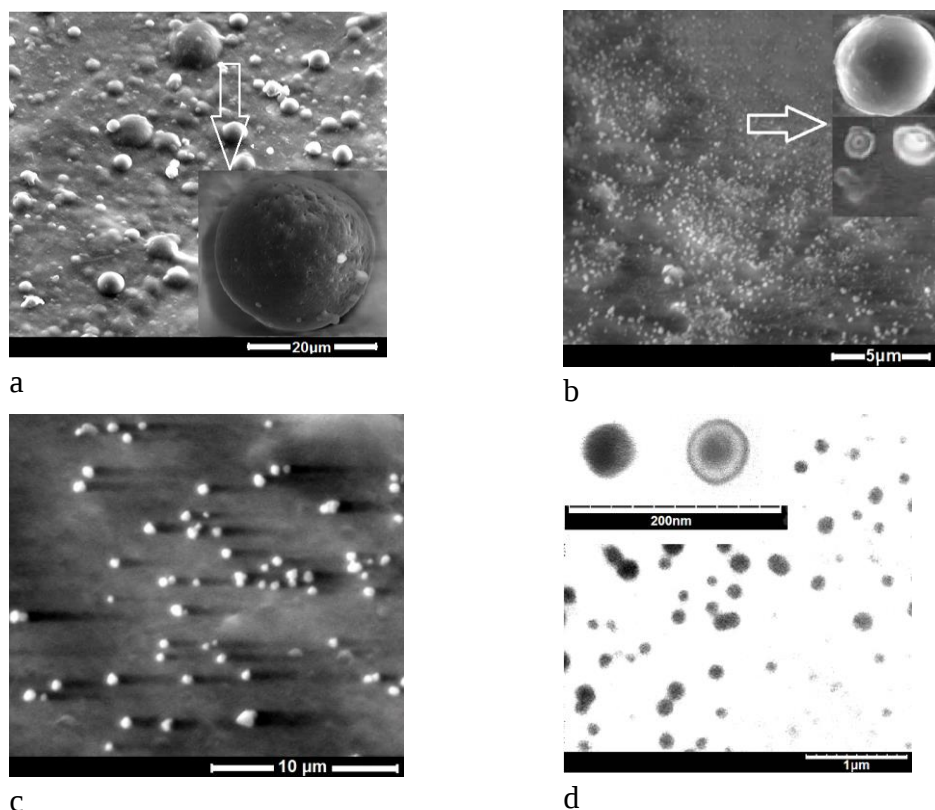


Figura 20. Microfotografii tipice pentru probele: (a) 1 (fara iradiere UV, SEM); (b) 2 (cu iradiere UV, SEM); (c) 6 (PCL-DI inlocuit cu DMSHA in amestecul initial, SEM); (d) 7,

Structura poroasa a particulei suport pe baza de biopolimeri este evidenta mai ales in cazul probei 1, neiradiate, si a probei 3, cu un aport minim de poliester in etapa a doua, la care acoperirea este deficitara fie datorita atasarii inadecvate, fie datorita unei cantitati insuficiente de poliester pentru a asigura acoperirea eficienta a particulelor (Figura 20 a, proba 1). In ultimul caz, acoperirea neuniforma, insuficienta, a fost confirmata si de o stabilitate precara a particulelor in conditiile investigarii prin SEM, acestea fiind usor deformat sub actiunea fasciculului de electroni la durate mai mari, datorita sensibilitatii biopolimerilor. Formarea de nanocapsule este confirmata prin vizualizarea particulelor polimere in sectiune (Figura 20b, detaliu proba 2). Inlocuirea partiala a PCL-DI cu DMSHA in amestecul initial asigura generarea de nanoparticule stabile, cu dimensiuni in domeniul submicronic, astfel incat s-a optat pentru aceasta formulare a amestecului initial. Retinerea AteCol in interiorul nanocapsulelor este evidentiata din observatiile de microscopie de baleiaj si transmisie (Figura 20) dar si prin microscopie de fluorescenta (microscop Leica DM 2500, dotat cu o camera color Leica DFC425 C, cu sistem de racire; Figura 21), colagenul prezentand autofluorescenta.¹⁰⁰ Eficienta procedurii s-a evidentiat si prin vizualizarea nanoparticulelor cu dimensiuni sub 100 nm (Figura 21c), separate prin ultrafiltrare cu Amicon Ultra-Centrifugal Filters (Millipore)

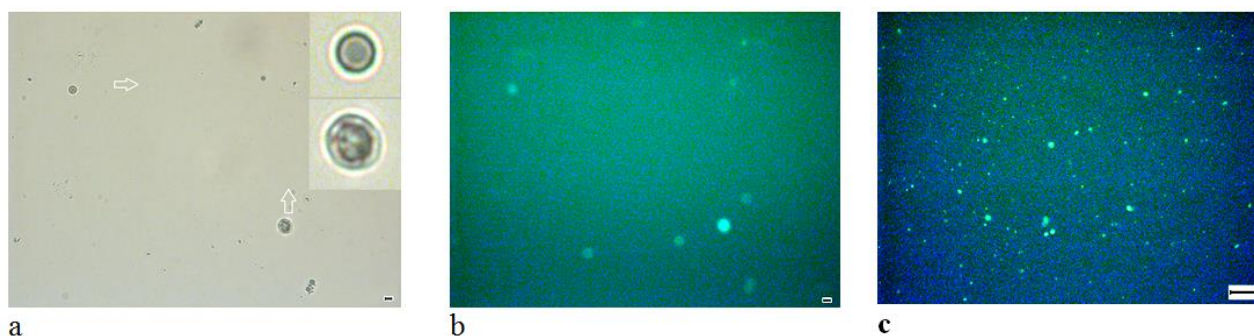


Figura 21. Vizualizarea nanoparticulelor multistrat pe baza de biopolimeri si PCL prin microscopie de fluorescenta (proba 7): inainte (a) si dupa filtrare (b) si (c). Scala: $2\mu\text{m}$.

Compozitia chimica a nanocapsulelor multistrat si mentinerea reactivitatii grupelor izocianice de suprafata dupa separare si purificare (5 cicluri de centrifugare / redispersare prin agitare si ultrasonare / spalare cu apa bidistilata) este evidentiata si in spectrele FTIR ale probelor (Figura 22). In spectrele inregistrate pentru materialele sintetizate se pot identifica semnale atribuite collagenului la 3300 cm^{-1} , 3080 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} si 1240 cm^{-1} . Acestea apartin in majoritate benzilor amidice ale acestei proteine, respectiv amida A ($\nu(\text{NH})$), amida B ($\nu(\text{NH})$), amida I ($\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{NH})$), amida II ($\nu(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$) si amida III (picuri pentru $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$) - si vibratiilor grupei CH_2 din lantul principal si lanturile laterale ale prolinei.^{101,102,103}

Banda amidei I, un marker sensibil al structurii secundare a peptidei, nu isi schimba pozitia sau forma prin adaugare de DMSHA sau PCL, ceea ce indica faptul ca structura collagenului nu este afectata. Intensitatea sa variaza esential functie de formulare.

Introducerea de poliesteri alifatici in formulari duce la cresterea intensitatii benzilor situate in jurul valorii de 2940 cm^{-1} si 2874 cm^{-1} (asociate cu grupele CH_2 ; vibratii asimetrice si simetrice) si a semnalelor de la 1079 cm^{-1} si 1031 cm^{-1} (suprapunere a absorbtiei grupelor $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ din inelul eteric si din gruparile esterice ale PCL). Sunt evidentiata noi absorbtii la 1730 cm^{-1} (atribuite grupei $\text{C}=\text{O}$ esterice din PCL) si 1160 cm^{-1} (o parte atribuita vibratiei $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ din grupa esterica si o parte vibratiei antisimetrice in inelul eteric din hialuronan, in compusii cu DMSHA¹⁰⁴). Intensitatea lor este corelata in principal cu procentul de PCL in produsul polimeric final.

Semnalul de la 2270 cm^{-1} corespunzator grupei izocianice pierde din intensitate, pana la disparitia completa, functie de cantitatea de PCL-DI adaugata in amestecul initial de biopolimeri, gradul de consumare al acesteia in reactia de reticulare, dar mai ales functie de cantitatea de PCL-DI din solutia in clorura de metilen, atasata la suprafata particulelor.

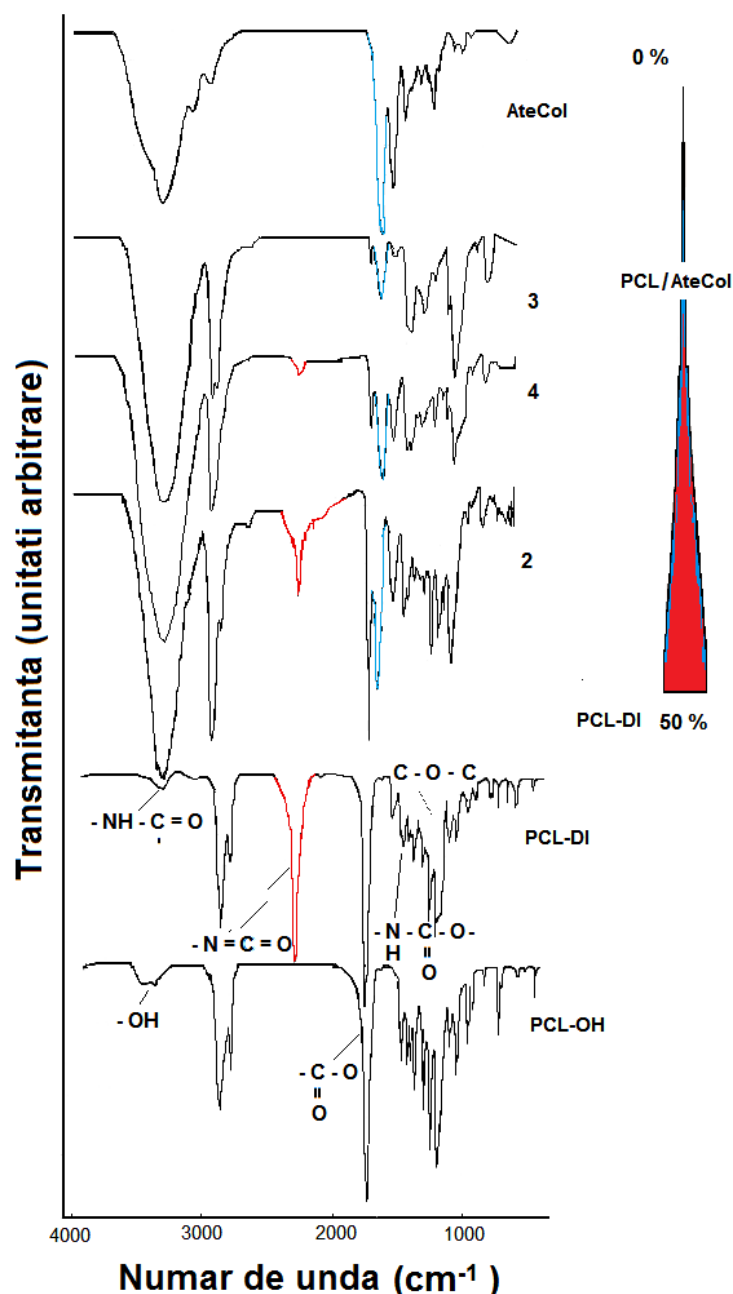


Figura 22. Spectre FT-IR pentru probele 2-4 (Tabel 5) comparativ cu AteCol, PCL-DI si PCL-OH.

II.3. Functionalizarea de suprafata

Functionalitatea superficiala poate fi utilizata pentru atasarea de noi compusi (legarea la suprafata a unor medicamente, agenti de dirijare sau de marcare etc.) sau modificarea chimiei de suprafata a nanoparticulelor rezultate. Astfel, prezenta grupelor izocianice reactive la suprafata nanoparticulelor a fost ulterior utilizata pentru atasarea unui strat superficial de poli (L-lizina) sau polietilenimina, creand astfel posibilitatea aplicarii nanoparticulelor complexe multistrat rezultate in transportul si eliberarea controlata a unor componente bioactive sau in transfectie.

In cazul nanoparticulelor pe baza de AteCol neacoperite sau acoperite cu un strat foarte subtire de PCL-DI, se poate face uz de capacitatea de complexare a collagenului cu acidul hialuronic pentru a obtine nanoparticule cu miez poros preponderent proteic si strat superficial pe baza de glicozaminoglican, materiale recomandate ca suport pentru atasare/eliberare medicamente, dar si in medicina regenerativa, pentru scaffold-uri injectabile.

Realizarea acestor modificari a fost confirmata prin analiza spectrala (FTIR, fotocolorimetrie), caracterizare dimensionala (diametrul mediu) si de suprafata (potential zeta prin masuratori DLS) si prin vizualizare cu ajutorul tehnicilor microscopice (microscopie electronica de transmisie, de baleiaj sau de fluorescenta).

Pentru grefarea cu PLL si PEI s-au utilizat probele 6, 7 si 9, iar pentru testarea abilitatii de legare a DMSHA s-au utilizat probele 6 si 8 (Tabelul 6) .

Tabelul 6. Caracteristicile nanocapsulelor dupa functionalizare de suprafata cu PLL, PEI, DMSHA

Cod	Atecol (%)	PCL-DI ^a (%)	DMSHA ^b (%)	PCL-DI ^c (%)	Surf ^d (%)	PEI ^e	PLL ^e (%)	DMSHA ^e (%)	Dn ^f (nm)
6 _{PLL}	100	5	2	50	2.5	-	10	-	20.0±4.60
7 _{PLL}	100	5	2	30	2.5	-	10	-	100.0± 26.7 110.0*
7 _{PEI}	100	5	2	30	2.5	10	-	-	100.0*
9 _{PEI}	100	5	2	30	1.25	10	-	-	117,5*
6 _H	100	5	2	50	2.5	-	-	10	68.7±18.1
8 _H	100	5	2	1	2.5	-	-	10	150.3±40.6

^a fata de cantitatea totala de biopolimeri din dispersia apoasa initiala

^b fata de cantitatea de AteCol in amestecul alimentat initial

^c PCL-DI in CH₂Cl₂ raportat la amestecul initial de polimeri din faza apoasa

^d concentratia de surfactant in CH₂Cl₂

^ePEI, PLL, DMSHA raportat la cantitatea de nanoparticule introduse in reactia de functionalizare

^fdiametrul mediu numeric din date DLS si TEM* (*Dn= $\sum NiDi/\sum Ni$, unde Ni=numar de particule cu diametrul Di)

Din compararea spectrelor FTIR (Figura 23) pentru nanoparticule inainte si dupa tratarea cu poli(L-lizina) se poate observa disparitia (banda specifica grupei izocianice de la 2270 cm⁻¹) sau diminuarea (benzile de la 1160 si 1031 cm⁻¹, caracteristice C-O-C in gruparea esterica) semnalelor specifice PCL-DI. Creste intensitatea semnalelor de la aproximativ 1080 si 1350 cm⁻¹ (corelate cu prezenta benzilor amida III si V) si se intensifica si largeste semnalul ce corespunde benzii amida I.

Spectrele FTIR sunt utilizate frecvent pentru a monitoriza tranzitia conformationala a collagenului, deoarece pot fi detectate schimbari specifice regiunilor amidice. Aceste regiuni evidentiaza structura secundara a acestei proteine. Se observa ca raportul intensitatii semnalelor de la 1240 cm⁻¹ si 1540 cm⁻¹ este aproximativ 1 dupa tratare cu poli(L-lizina), ceea ce confirma mentinerea structurii de triplu helix pana la aceasta etapa. Faptul ca structura nativa a collagenului nu a fost afectata de includerea proteinei in retea 3D este corelat, conform datelor de literatura, cu mentinerea bioactivitatii, respectiv a caracterului imunogen scazut. Pe de alta parte acest aspect al spectrului FT-IR sugereaza (impreuna cu restul modificarilor spectrale mentionate anterior) pentru proba 6_{PLL} o cuplare a PLL cu excesul de PCL-DI si formarea de copolimeri solubili, care trec partial in faza apoasa. Acest aspect este argumentat si de prezenta unor semnale mai puternice pentru fragmentul de poli(L-lizina) atasat in cazul NP cu un strat mai subtire de PCL-DI, implicit mai bine legat de peretele interior de AteCol (proba 7, Figura 23). Aceasta comportare poate fi corelata si cu

diminuarea aparenta a dimensiunii medii a nanoparticulelor generate dupa modificare cu PLL, concomitent cu o crestere drastica a polidispersitatii in cazul probei 6_{PLL} (Tabelul 6), efecte care nu pot fi atribuite cresterii stabilitatii coloidale prin atasarea catenelor hidrofile. Din acest considerent, pentru modificare ulterioara cu PLL sau cu PEI, s-a utilizat formularea ce implica doar 30% PCL-DI (in raport cu amestecul initial de polimeri, constituit din AteCol, 2% DMSHA raportat la AteCol si 5% PCL-DI raportat la total biopolimeri) in solutia de clorura de metilen. Aspectele constatate pentru proba 6_{PLL} au fost astfel evitate in cazul probelor 7_{PLL} si 9_{PLL} (Tabel 6, Figura 23). Eficienta atasarii PLL a fost verificata prin analiza nanoparticulelor (proba 7) functionalizate cu PLL marcata fluorescent cu fluorescein-izotiocianat (PLL-FITC) in paralel cu proba 7_{PLL} (nemarcata). Datele de spectroscopie de fluorescenta (evaluare la λ_{ex} : 485 nm; λ_{em} : 527 nm) au indicat un continut de 15 mg PLL-FITC/g nanoparticula. Microfotografiile ale probelor marcate evidentiaza atat atasarea eficienta a PLL-FITC, cat si structura multistrat a nanocapsulelor astfel obtinute (Figura 24 a, b), remarcata de altfel si in microfotografiile SEM (Figura 24 c).

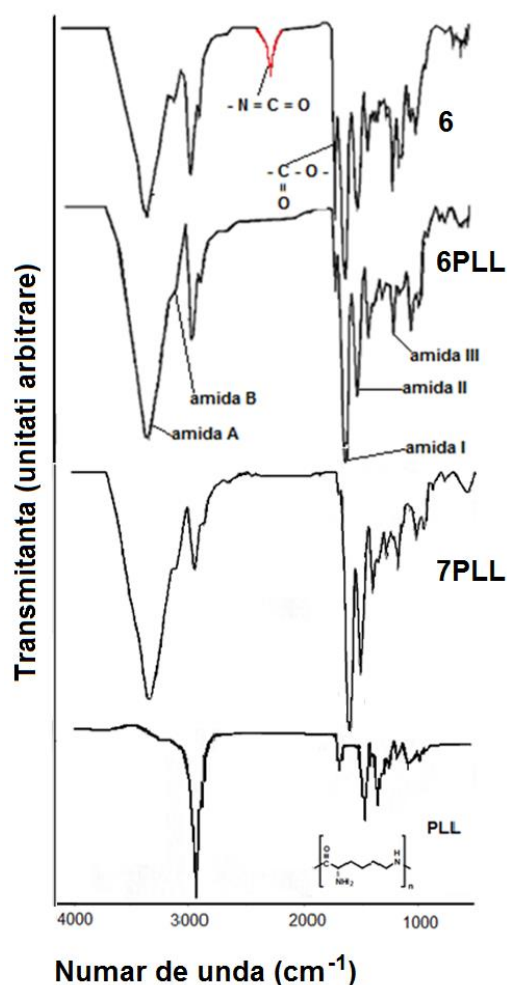


Figura 23. Spectre FT-IR pentru nanoparticulele grefate cu poli(L-lizina) (6_{PLL}, 7_{PLL}), comparativ cu intermediarii utilizati in reactie (nanoparticulele de plecare cu strat de suprafata pe baza de PCL-DI si poli(L-lizina) pura).

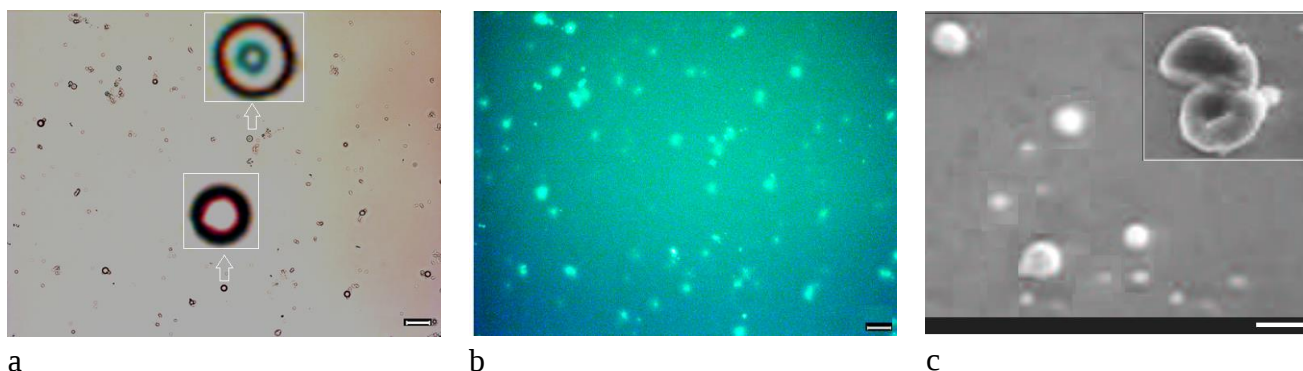


Figura 24. Microfotografii tipice pentru proba 7 functionalizata cu PLL-FITC (microscopie de fluorescenta in camp luminos (a) si intunecat (b)) sau (c) PLL; Scala: 10 μm .

Curbele de titrare DLS, prezentate in Figura 25, evidentiaza cresterea potentialului zeta pe tot domeniul de pH investigat pentru NP modificate cu PLL, fata de nanoparticulele de plecare, acoperite doar cu PCL-DI, confirmand modificarea de suprafata.

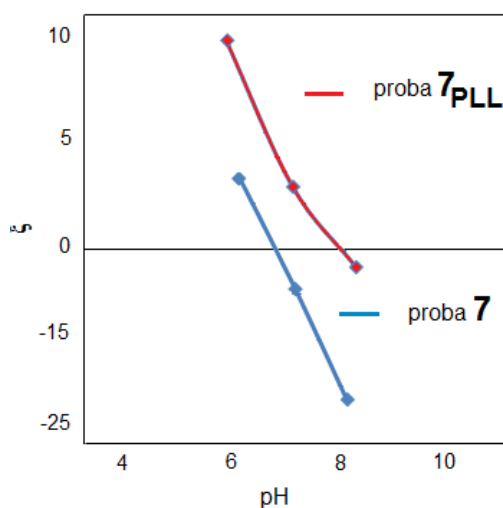


Figura 25. Reprezentare comparativa a variatiei potentialului zeta pentru nanoparticulele sintetizate inainte (proba 7) si dupa functionalizare superficiala cu PLL (proba 7_{PLL}).

Pentru functionalizarea cu polietilenimina s-a utilizat polietilenimina liniara cu grupe terminale aminice si hidroxilice (HO-PEI-NH₂), obtinuta prin hidroliza acida a poli(2-etil-2-oxazolinei) functionalizate corespunzator (Figura 26), cu grad de polimerizare numeric GP_n ~ 36 (M_n~1.6 kDa), pentru a evita efectele toxice specifice polietileniminei ramificate (BPEI) cu dimensiuni mari. Hidroliza s-a realizat printr-o alternativa modificata in baza datelor de literatura, iar cuplarea cu grupele izocianice de la suprafata nanoparticulelor s-a realizat la pH 6.5-7, urmata de purificare prin cicluri de centrifugare/spalare (cu apa bidistilata si solutie acida HCl 0,1M/apa). Investigatiile TEM, SEM, DLS si analiza spectrala (fotocolorimetrie) au confirmat realizarea cu succes a grefarii de LPEI la suprafata nanoparticulelor. S-a inregistrat atat o crestere a dimensiunilor (Tabelul 6), cat si cresterea potentialului zeta la 13,4 (date obtinute la pH~6,5 pentru proba 7_{PEI}). Analiza spectrofotometrica bazata pe formarea complexului cuproamoniacal in prezenta de Cu²⁺/acetat de potasiu (0,02 M, pH~5,5; λ =630nm) a evidentiat un continut de 52 mg PEI/g NP in cazul probei 7_{PEI} si 51,1 mgPEI/g NP in cazul probei 9_{PEI}.

Synthetic Scheme for the preparation of $\text{NH}_2\text{-PEtOz}$

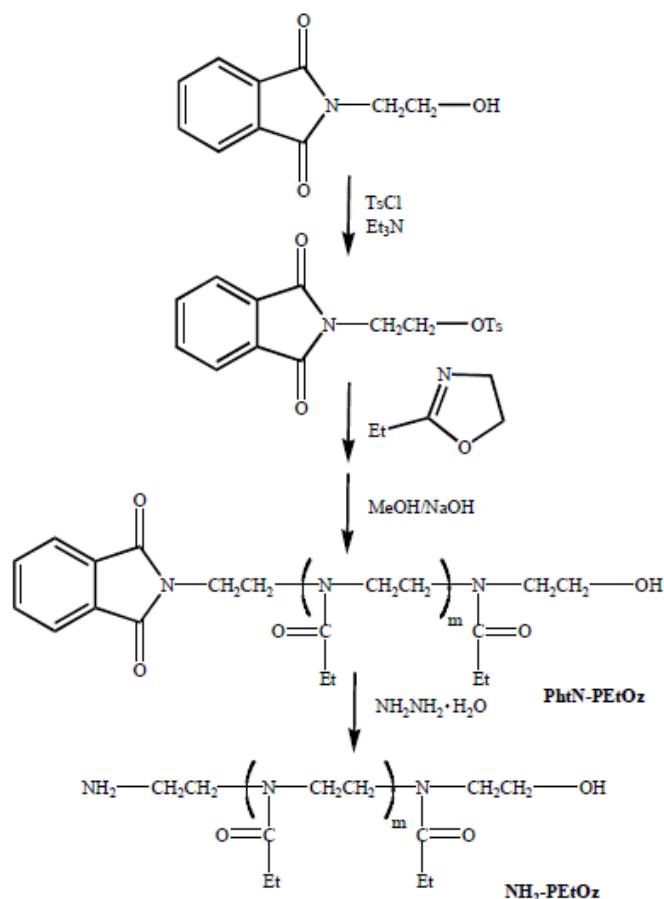


Figura 26. Schema de reactii pentru obtinerea $\text{H}_2\text{N-PEI-OH}$.

Nanoparticulele astfel obtinute, cu secvente policationice la suprafata, au fost testate in privinta capacitatii de complexare cu ADN (ADN din sperma de somon, 2000 perechi baze, $\sim 1.3 \times 10^3$ kDa). Testele pe sistem de electroforeza in gel de agaroză au evidentiat o capacitate optima de complexare la un raport N/P de 3,5 pentru proba 7_{PLL} (Figura 27a) si respectiv ≥ 6 pentru proba 7_{PEI} (Figura 27b). Pentru proba $7_{\text{PLL-FITC}}$ impachetarea a fost mai putin eficienta (Figura 27a).

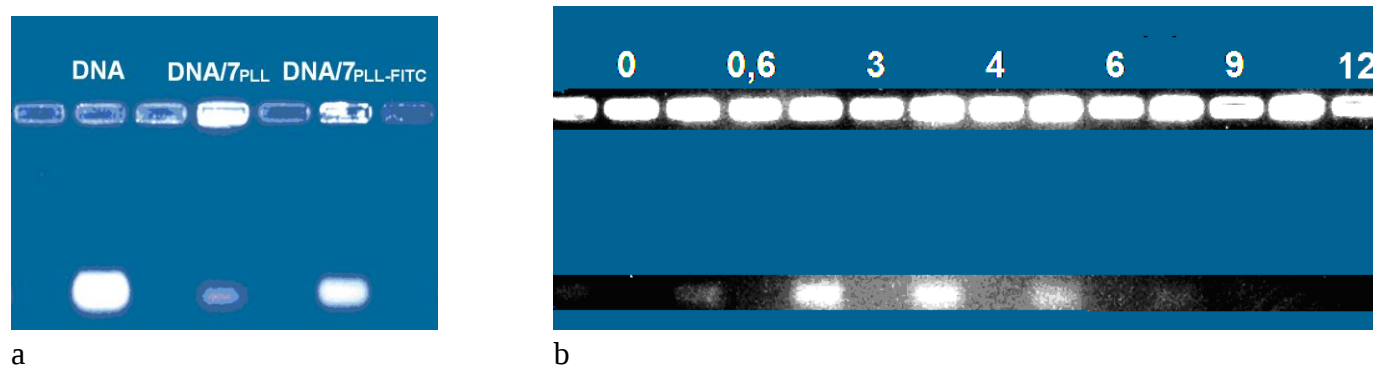


Figura 27. Testare a capacitatii de impachetare a ADN (electroforeza in gel de agaroză): a) proba 7_{PLL} (la $\text{N/P}=3,5$, $\text{pH}=7$) comparativ cu $7_{\text{PLL-FITC}}$; b) proba 7_{PEI} .

Atasarea derivatului hialuronic la suprafata particulelor de AteCol/PCL-DI este confirmata de: (i) o crestere mai mare a dimensiunilor fata de grefarea PLL si PEI (Tabele 5 si 6, Figura 28, date DLS); (ii) o diminuare a stabilitatii la actiunea fascicului electronic (deformare rapida in cursul analizei SEM, Figura 29); diminuare a potentialului zeta, fata de nanoparticulele de origine, de la 8,52 la 4,45.

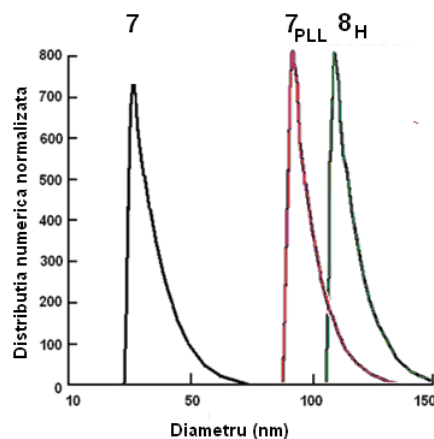


Figura 28. Reprezentare comparativa a modificarii dimensionale dupa functionalizarea de suprafata cu PLL sau DMSHA (date DLS). Probele : 8, 7_{PLL}, 8_H.



Figura 29. Microfotografie tipica pentru proba 8_H.

Spectrul FT-IR (Figura 30) evidentiaza o marire accentuata sau aparitia de noi semnale la 1411 (banda amida III) si 1040 – 1100 cm⁻¹ (inel eteric).

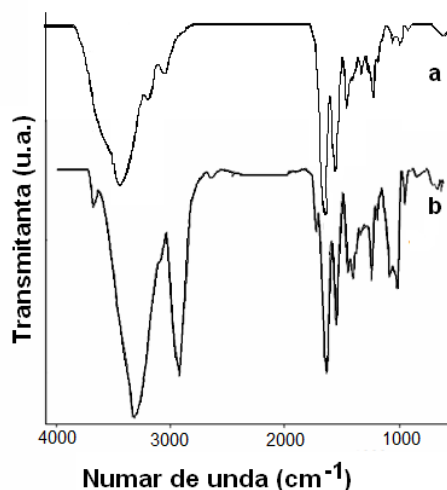


Figura 30. Spectre FT-IR pentru: a) AteCol si b) proba 8_H.

In conditiile de reactie utilizate (pH 6,5; temperatura camerei; in apa) se observa ca atasarea este mai eficienta in cazul aplicarii alternativei LbL (proba 8_H), in baza interactiunilor specifice dintre collagen si acidul hialuronic, comparativ cu cazul atasarii DMSHA in urma interactiunii grupelor izocianice (de la suprafata nanoparticulelor complet acoperite cu un strat PCL-DI) cu grupele hidroxicale din

glicozaminoglican (proba 6_H). De altfel, la testarea posibilitatii de aplicare in eliberarea de medicamente, utilizand albastru de metilen drept compus bioactiv model pentru proba 8_H s-a obtinut o incarcare de 7.4 mg albastru de metilen/g nanoparticula, cu 6,08 % eliberare dupa 2h de incubare la 37°C in PBS, in timp ce pentru 6_H incarcarea a fost doar de 0,35 mg albastru de metilen/g nanoparticula, iar dupa 2 h se elibereaza deja 74,3% din aceasta cantitate. Aceasta comportare poate fi corelata cu: (a) gradul mare de reticulare in peretele particulelor acoperite cu PCL-DI, ceea ce afecteaza includerea eficienta a principiului activ; (b) o interactiune eficienta intre derivatul de acid hialuronic si albastrul de metilen (in principal interactiuni electrostatice) care asigura o incarcare mai eficienta si controlul cineticii de eliberare.

II.4. Concluzii privind utilizarea collagenului in sisteme destinate transfectiei

S-au realizat nanoparticule multifunctionale cu dimensiuni si caracteristici functionale adecvate unei posibile aplicari atat in transferul genic cat si in eliberarea de medicamente.

a. Prin aplicarea unei alternative modificate a metodei dublei emulsii (cu indepartarea prin evaporare a solventului), urmata de modificare chimica de suprafata prin grefare sau aplicarea tehnicii de depunere strat-cu-strat, s-au preparat in conditii blande (temperatura camerei) nanoparticule multistrat biodegradabile, sferice, stabile, cu perete interior/miez poros pe baza de biopolimeri (atelocolagen si dimetilsilandioli hialuronat) si functionalitate diferita de suprafata, prin acoperire cu derivat functional reactiv de poli(ϵ -caprolactona), poli(L-lizina), polietilenimina, sau derivat al acidului hialuronic.

b. Caracteristicile dimensionale, topologia (nanocapsule multistrat sau nanosfere cu structura miez-manta) si chimia suprafetei pot fi controlate prin formulare si conditiile de reactie, prin selectia naturii, grosimii si numarului de straturi de suprafata depuse, in acord cu domeniul de aplicare vizat (eliberare de medicamente, transfer genic, inginerie tisulara, cosmetica). Principiile active pot fi incluse in interiorul particulei sau atasate la suprafata, ceea ce presupune posibila utilizare ca suport concomitent pentru material genic si alte principii bioactive, cu efect sinergetic.

c. Conditiiile de lucru au permis pastrarea nealterata a structurii native a proteinei in sistemele particulare multifunctionale finale.

d. S-a demonstrat capacitatea de impachetare a ADN de catre nanoparticulele grefate la suprafata cu policationiti (polietilenimina si poli(L-lizina)).

Directii de viitor in utilizarea collagenului in sisteme destinate transfectiei

- realizarea de (nano)compozite: matrice organica ternara AteCol/DMSHA/PCL si hidroxiapatita/fosfat tricalcic in baza derivatilor sintetizati in acest an (AteCol –SH, PCL diacrilat);
- inglobarea sistemelor non-virale de transfer genic pe baza de polimeri naturali si sintetici in matricea tridimensionala preformata sau in sistem injectabil;
- testarea eficientei in transfectie a sistemului complex vector non-viral pentru transfer genic/scaffold.

III. Obținerea de hidrogeluri autoorganizate pe baza de imino-chitozan

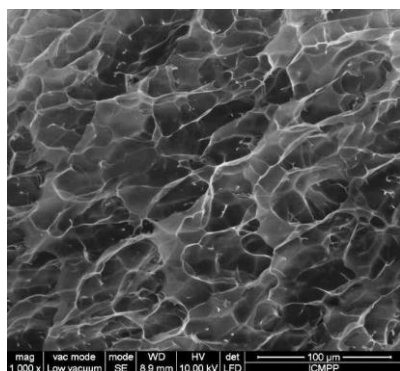
Chimia supramoleculară și dinamica constituțională oferă o abordare evolutivă în generarea de sisteme chimice prin sinergia între formarea de legături covalente reversibile la nivel molecular și inducerea de interacțiuni intermoleculare necovalente la nivel supramolecular.¹⁰⁵ Auto-asamblarea componentelor în arhitecturi bine definite, controlate de afinitățile constituționale, intruchipează fluxul de informații structurale de la nivel molecular față de dimensiunile nanometrice. Obținerea nanomaterialelor cu arhitecturi 2-D și 3-D aplicând reacții reversibile între componentele constitutive ale sistemului nanometric reprezintă o soluție viabilă și modernă pentru obținerea de nanosisteme.¹⁰⁶

În acest context, formarea de "hidrogeluri dinamice" biocompatibile prin aplicarea chimiei dinamice constituționale este un subiect de mare actualitate atât din punctul de vedere al aplicabilității în sfera biomedicală, cât și al abordărilor teoretice.¹⁰⁷

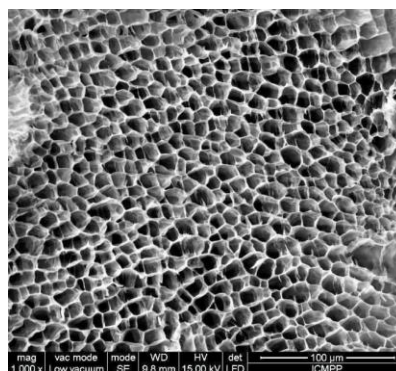
Dintre hidrogelurile raportate în literatură, cele pe baza de chitozan se bucură de o atenție deosebită datorită proprietăților intrinseci ale acestui polizaharid, respectiv: biocompatibilitate, activitate antimicrobiană, antitumorală, hemostatică, abilitate de a forma filme sau acoperiri protective, neutralizarea acizilor grași, capacitate de a accelera formarea țesutului osos etc., proprietăți ce pot fi îmbunătățite prin modificarea chimică a chitozanului prin reacții cu alți compusi și obținerea de noi proprietăți.^{108,109}

Modalitatea cea mai facilă de modificare chimică a chitozanului este reacția grupărilor sale aminice cu diverse aldehide, când se obțin unități iminice. Reacția este cu atât mai interesantă, cu cât studiile de literatură dedicate unor imine indică posibilitatea obținerii de materiale dinamice, datorită reversibilității formării acestei legături.

Pornind de la aceste informații, am considerat important să obținem hidrogeluri noi prin reacția de condensare acidă a grupărilor amina de pe lanțurile de chitozan cu aldehida cinamică, acordând o atenție deosebită efectelor provocate de reversibilitatea formării legăturii imine.¹¹⁰ Studii de spectroscopie RMN pe hidrogel au demonstrat că echilibrul reacției de condensare se deplasează lent spre formarea legăturii iminice, pe măsura ce unitățile imine formate ies din soluție prin autoansamblare. Reversibilitatea formării legăturii iminice s-a dovedit a fi instrumentul prin intermediul căruia hidrogelul se autoorganizează la nivel nanometric (demonstrat prin difracție de raze X la unghi larg) și micrometric (demonstrat prin microscopie electronică), evoluând de la starea de hidrogel cu pori de mărime diferită, care comunică între ei haotic (Figura 31a) la starea de hidrogel cu pori cu dimensiune apropiată, bine organizați, indicând o arhitectură canulară (Figura 31b).



a) G2



b) G2*

Figura 31. Microfotografii SEM ale hidrogelului chitosan-cinamaldehyda (a) proaspăt și (b) după o stocare de 5 zile.

Hidrogelurile au o capacitate de umflare ridicată, echilibrul de umflare masiv atingând valori de 41%. Un aspect important al acestor materiale este valoarea ridicată a capacității lor de revenire la forma

initiala dupa aplicarea unui stress mecanic, valoare calculata prin masuratori reologice ca fiind de aproximativ 80%.

IV. Obținerea multistraturilor hibride biomimetice prin recunoasterea multivalenta a Concanavalinei A de catre gliconanocapsule {Mo132}

Membranele biologice contin zone dense de carbohidrati care joaca un rol fundamental in procesele de recunoastere celulara, prin legarea multivalenta a lectinelor. Plecand de la premisa ca o crestere a densitatii locale de carbohidrati conduce la o imbunatatire a activitatii, au fost raportate numeroase sisteme artificiale multivalente continand diferite nanosisteme (fullerena, nanotuburi de carbon, nanoparticule si nanovesicule) generatoare de nanoplatforme multivalente de carbohidrati.^{111,112}

Tinand cont de acestea, ne-am orientat atentia spre obtinerea de noi arhitecturi multistrat prin depunerea succesiva strat cu strat a glico-nano-hibridelor pe baza de oxid de molibden {Mo132}/manozida $((\text{NH}_4)_{42-n}2_n1_a)$ sau glicozida $(\text{NH}_4)_{42-m}3_m1_a$ si Concanavalina A (ConA), bazata pe interactiunile multivalente glucid-lectina (Figura 32).¹¹³ Aceste arhitecturi pot fi preparate cu usurinta si cuantificate folosind microgravimetria cu cristale de cuarț (QCM), care detecteaza adsorbtia de masa la suprafata senzorilor pe baza efectului piezoelectric reciproc. Cresterea masei absorbite de materie este corelata cu o schimbare de frecventa (ΔF), o variatie de 1 Hz corespunzand unei modificari de masa de aproximativ 700 pg.

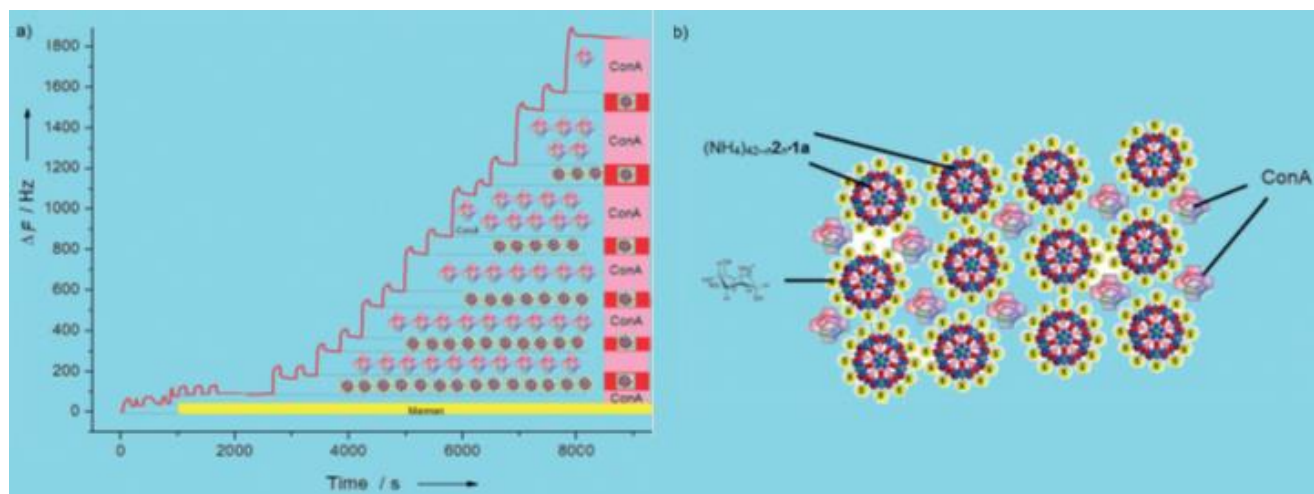


Figura 32. a) Monitorizarea QCM a arhitecturilor multistrat ConA/ $(\text{NH}_4)_{42-n}2_n1_a$; b) Reprezentarea schematica a "tesuturilor celulare anorganice" care interactioneaza prin interactiuni specifice glucid-lectina.

Glico-nano-capsulele obtinute in acest studiu interactioneaza specific cu lectinele si se auto-asambleaza intr-o arhitectura hibrida multistrat (Figura 32) doar in cazul in care carbohidratul multivalent prezent la exterior si situsurile de recunoastere a lectinei sunt compatibile. "Multistraturile hibride biomimetice" obtinute sunt stabile sub un debit de apa continuu si pot servi drept retele artificiale pentru o mai buna intelegere a diferitelor mecanisme biologice, de care pot beneficia in mod direct domeniul separarilor chimice, senzorilor sau dispozitivelor de stocare-livrare, inclusiv a acizilor nucleici.

Obiectivul 2. PROIECTAREA SI REALIZAREA UNOR SISTEME BIOMIMETICE DESTINATE TRANSFECTIEI

Terapia genica vizeaza corectarea efectelor induse de catre genele mutante, prin inlocuirea lor cu „exemplare” functionale, ori prin introducerea in genom a unor gene suplimentare, care sa compenseze, sa controleze ori sa corecteze efectele prezentei in celule a genelor ce se exprima aberant, ori malativ. Una dintre cele mai frecvent citate definitii ale terapiei genice precizeaza faptul ca scopul acesteia este „tratarea bolilor genetice si infectioase prin introducerea selectiva, in anumite celule, a unei cantitati suplimentare de purtatori ai informatiei genetice” (Figura 1).

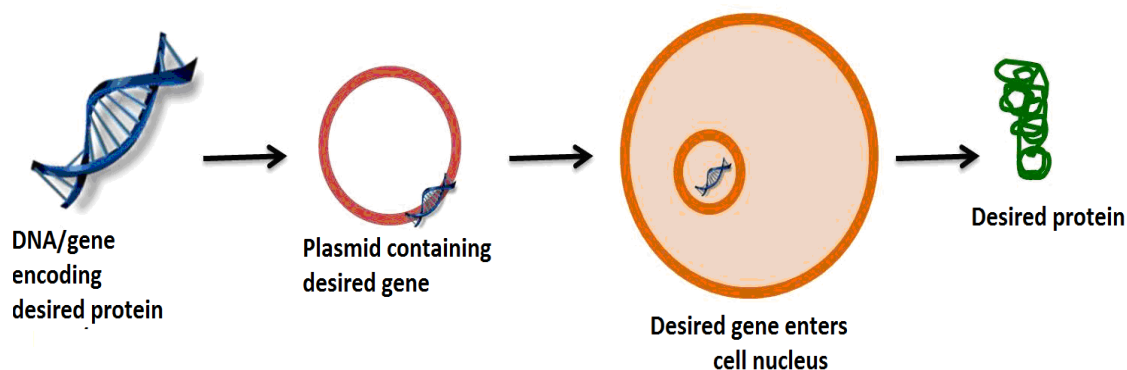


Figura 33. Schema de principiu pentru livrarea materialului genetic in celule tinta.

La originea multor afectiuni ale organismelor vii se regasesc gene imperfecte („defecte”), care determina evolutii anormale ori chiar aberante ale celulelor. Ele induc supraexprimarea unor proteine, sau determina biosinteza de proteine nefunctionale, fapt care se soldeaza cu devierea severa a metabolismului celular, tisular, ori chiar al organismului in ansamblul sau, deviere ce poate conduce la moartea celulelor afectate, ori, dimpotriva, la „functionarea” lor la parametrii supradimensionati si/sau la multiplicarea lor necontrolabila. Pentru a corecta consecintele activitatii genelor „defecte”, terapia genica propune doua cai pentru interventia in functionarea aberanta a celulelor, respectiv:

- (i) – introducerea unor gene suplimentare in zestrea genetica a celulelor afectate, gene care de regula sunt versiuni corect functionale ale celor „defecte”, dar care pot fi si distincte fata de acestea din urma, actionand complementar ori antagonic lor; in aceasta varianta de interventie, in nucleul celular se introduc tronsoane de ADN simplu sau dublu catenar ce poarta informatie genetica valida, ori plasmide ce au fost suplimentate cu tronsoane de ADN special inserate, purtatoare de informatie genetica;
- (ii) – suspendarea manifestarii genelor „defecte” prin suprimarea replicarii lor in celule, prin limitarea transcrierii lor, ori prin interventia asupra mecanismelor post-transcriptionale, respectiv asupra sistemelor de translatate a informatiei genetice in structuri proteice (asa numita tehnica a interferentei ARN, (iRNA), soldata cu moderarea exprimarii proteinelor codificate).

Avansul in domeniul nanotehnologiei depinde in principal de conceperea de noi nanomateriale. In acest context, a fost introdusa notiunea de biomimetism (creare de sisteme de inspiratie biologica), care se manifesta prin doua directii dominante de cercetare, respectiv (i) *mimarea structurala si functionala a entitatilor fiziologice ori patologice active*, in vederea studierii *ex-vivo* a mecanismelor viului si (ii) *proiectarea si transpunerea inginerasca a unor entitatii cu functionalitate strict controlata, cu performante similare celor specifice viului*, utile in diagnosticarea, monitorizarea si terapia la nivel celular.

Obiectivul proiectului se incadreaza in cea de-a doua directie mentionata, vizand contributii la dezvoltarea de componente nanodimensionale cu mare versatilitate, care tinde sa o mimeze pe cea a

sistemelor vii. In acest context, au fost dezvoltate cai diverse de a obtine nanosisteme cu functionalitate multipla (ex. sa poata fi dirijat catre o tinta, sa transporte mai multe principii active sau molecule ce actioneaza sub influenta unor stimuli externi generand efecte terapeutice etc.), respectiv: (i) rute chimice clasice (modificari chimice pe sisteme preformate); (ii) aplicarea metodelor specifice din chimia dinamica constitutională; (iii) utilizare de organisme vii ca "fabrici de nanoparticule" (iv) utilizarea electrosintezei organice/anorganice. Intr-o exprimare concisa, aceste cai uzeaza de urmatoarele principii.

- (i) Sinteza pe cale chimica a nanosistemelor cu aplicatii biomedicale implica reactiile din chimia clasica, cu formarea unor legaturi covalente stabile.
- (ii) Sinteza de nanosisteme prin chimia dinamica constitutională (chimie supramoleculara) vizeaza conducerea corerenta si reproductibila a auto-asamblarii componentelor de tip „bloc structural” (building block) in arhitecturi bine definite, controlate de afinitatile constitutionale intre elerespectivele arhitecturi se pot proiecta si sintetiza independent, multe dintre acestea reagsindu-se deja in „biblioteci”, sau „banci” de compusi.
- (iii) Utilizarea diferitelor organisme vii ca "fabrici de nanoparticule" implica procedee inalte ecologice si eficiente din punctul de vedere al randamentelor. Diverse entitati biologice, cum ar fi bacterii, ciuperci, diatomee, plante, actinomicete si virusuri sunt utilizate in acest scop. Noile cai biosintetice pot, spre exemplu, reduce sarurile metalelor la nanoparticule metalice (Au, Ag, Hg, Zn, Pt etc.). Natura a elaborat diverse procedee pentru sinteza de nano- si micro-materiale anorganice scalate.
- (iv) Reactiile electrochimice aduc contributii semnificative la sinteza organica si anorganica, si prezinta un potential semnificativ pentru a dezvolta sinteza chimica „verde”. De asemenea, ele furnizeaza fundamentul masurarii instrumentale a concentratiilor unui numar imens de specii chimice. Speciatia compusilor poate fi si ea studiata calitativ si cantitativ.

Pentru realizarea acestui obiectiv s-au proiectat, sintetizat, caracterizat si testat nanoparticule cu miez magnetizabil, fullerenă C60, sau nucleu aromatic, capabile sa transporte principii active, inclusiv material genetic. Nanoparticulele au fost sintetizate fie pe cale chimica, fie prin chimie dinamica constitutională.

A. Nanoparticule obtinute pe cale chimica

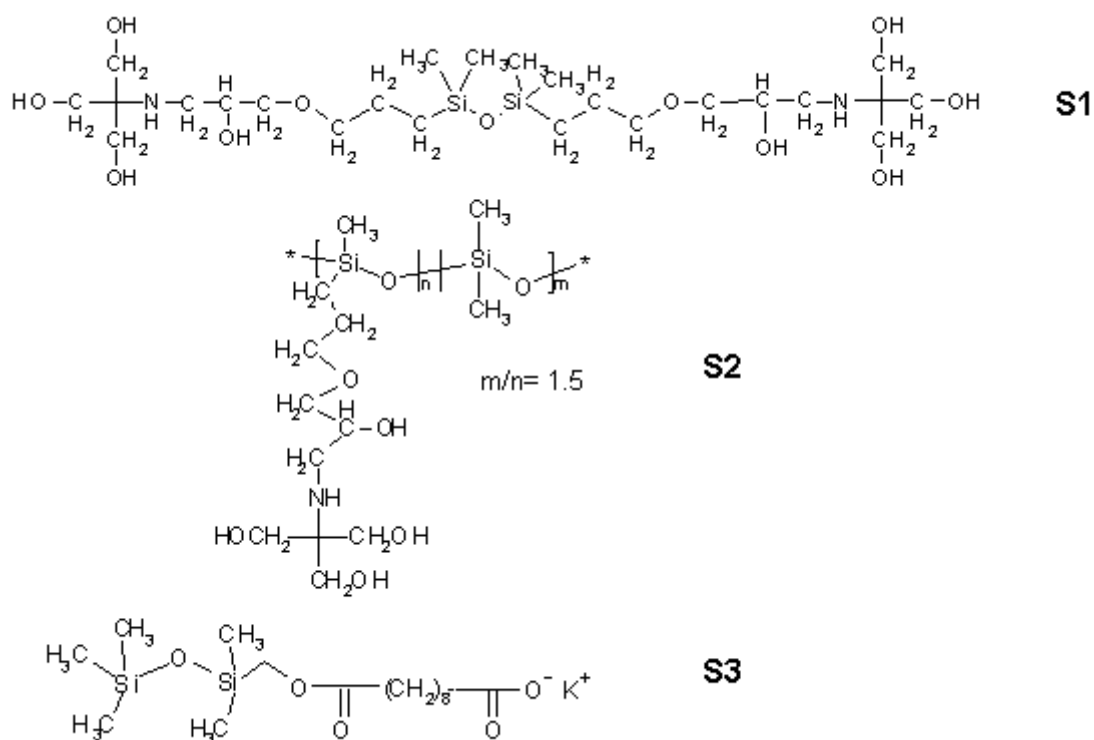
A.1. Nanoparticule magnetice dispersate in apa prin actiunea unor surfactanti siloxanici.

Nanoparticulele superparamagnetice de oxid de fier (SPION) sunt in prezent utilizate cu succes in aplicatii biomedicale, incluzand agenti de imbunatatire a contrastului in imagistica de rezonanta magnetica (MRI), sisteme de transport al medicamentelor, hipertermie magnetica, sau transfectie a celulelor asistata magnetic.^{114,115,116,117,118,119,120}

In general, sinteza propriu-zisa duce la particule de tip SPION cu invelis organic, hidrofoab, care pot fi dispersate doar in solventi nepolari sau cu polaritate moderata. Pentru aplicatii medicale, este necesar un invelis hidrofil, pentru asigurarea dispersiei in apa. De asemenea, este necesar sa se asigure biocompatibilitatea nanoparticulelor, ceea ce presupune folosirea unor polimeri biocompatibili sau naturali, ori apelul la materiale anorganice, precum silicea sau aurul.

In aceasta etapa a proiectului, pentru dispersarea in apa a unor nanoparticule superparamagnetice de Fe₃O₄ (magnetita) si respectiv FeCr₂O₄ (cromita), au fost folositi surfactanti avand in structura unitati siloxanice (Schema 4). Initial a fost validata biocompatibilitatea nanoparticulelor, prin teste MTT. Pentru surfactantii S1 si S3 s-a reprezentat absorbanta formazanului la 570 nm in functie de concentratie si s-a comparat cu o solutie martor, fara surfactant. In Figura 34 se observa ca viabilitatea celulara a fost peste

90% la concentratii mai mici de 1 g/L (concentratia limita folosita in mod curent pentru incapsulare), dar rezultate satisfacatoare au fost obtinute si la concentratii mai mari.



Schema 4. Structura chimica a surfactantilor folositi pentru incapsularea SPION.

Pentru incapsularea particulelor magnetice, acestea au fost folosite in forma in care s-au obtinut prin metoda descompunerii termice, adica avand un invelis semnificativ de material organic, anume acid oleic si dodecil-amina. Dupa dispersare intr-un solvent organic volatil, au fost introduse in solutia apoasa de surfactant siloxanic, concentratia acestuia fiind de aproximativ 10 ori mai mare decat valoarea CMC, respectiv 0.5-1 g/L. Solventul organic s-a indepartat, iar dispersia apoasa a fost analizata prin mai multe tehnici, pentru a evalua stabilitatea, forma si dimensiunile particulelor rezultate, precum si biocompatibilitatea lor.

Prin DLS s-au pus in evidenta particule tip miez-manta cu diametrul mediu de 100-200 nm, in timp ce particulele initiale, cu diametre de sub 10 nm, nu au mai fost detectate. Aceasta sugereaza faptul ca nanoparticulele de oxizi metalici au fost incapsulate in agregate mai mari, iar acestea se mentin stabile in faza apoasa.

In cazul magnetitei, cele mai bune rezultate au fost obtinute cu surfactantul polisiloxanic S2. Cu surfactantul S1, stabilitatea a fost de scurta durata, in timp ce cu S3 dispersia nu a fost stabila. Folosind metoda transferului spontan din solvent nemiscibil (hexan), s-a obtinut o dispersie apoasa cu o stabilitate remarcabila si in cazul surfactantului S3.

Imaginile TEM ale dispersiei apoase de nanoparticule de magnetita stabilizate cu S2 sunt prezentate in Figura 35, iar in Figura 36 este prezentata evolutia potentialului zeta.

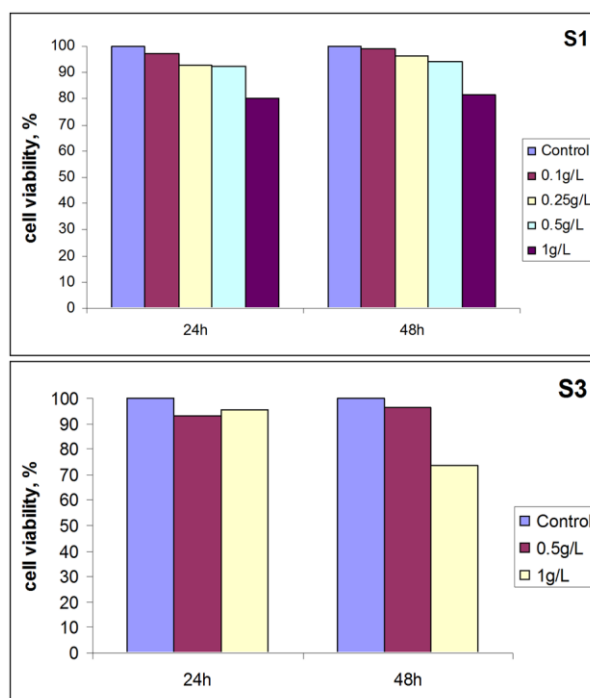


Figura 34. Viabilitatea celulara in prezenta surfactantilor siloxanici (test MTT).

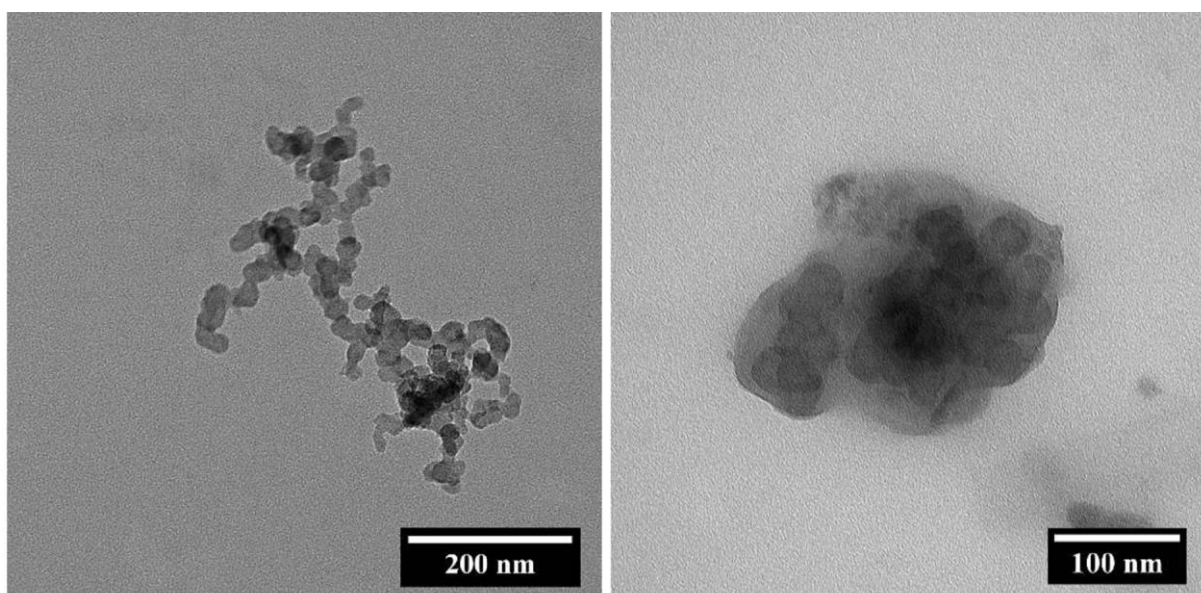


Figura 35. Imagini TEM ale al dispersiei apoase de magnetita cu surfactantul S2.

In cazul nanoparticulelor de cromita, cel mai bun rezultat a fost obtinut cu surfactantul S3. Dispersia a fost stabila timp indelungat si chiar dupa separare, redispersarea a fost posibila prin ultrasonare. In Figura 37 sunt prezentate imagini TEM si cryo-TEM ale acestei formule, precum si curba DLS. Se poate observa morfologia de tip compozit, in care nanoparticulele de oxid metalic sunt aglomerate in agregate mai mari, acoperite de un strat de surfactant. Dimensiunea acestor agregate este bine corelata cu rezultatul masuratorilor DLS.

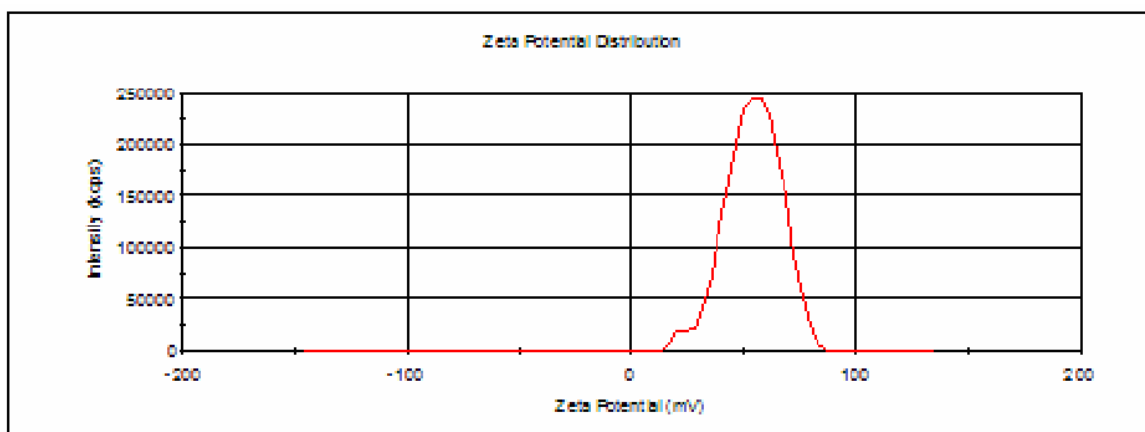


Figura 36. Potentialul Zeta al dispersiei apoase de magnetita cu surfactantul S2.

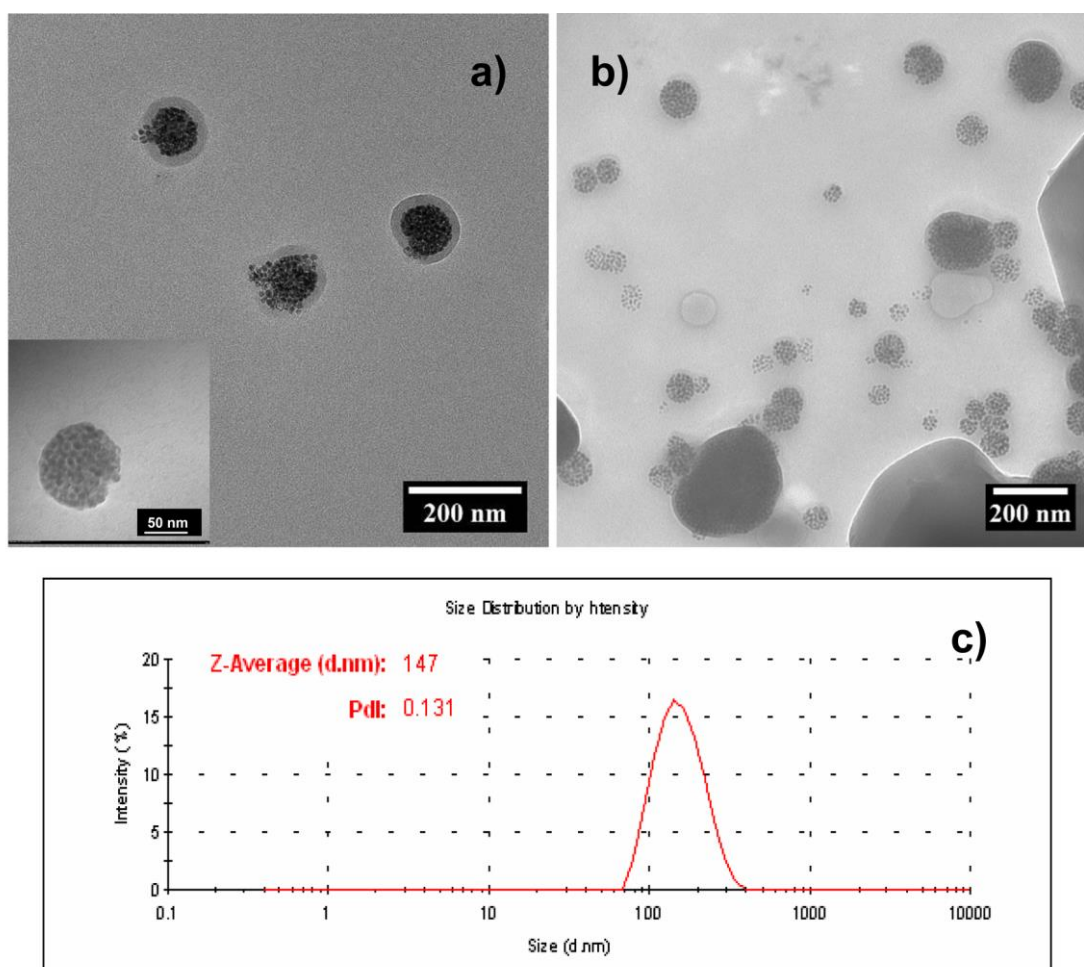


Figura 37. Imagini TEM (a) si cryo-TEM (b),
respectivi curba DLS pentru proba de cromita cu surfactantul S3 (c).

Biocompatibilitatea dispersiei de magnetita cu S1 este asigurata, Fig 38 indicand o viabilitate celulara de cca 90% pentru solutiile foarte diluate, dupa 24h, si de peste 70% dupa 48h. Trebuie mentionat faptul ca nanoparticulele de magnetita initiale au fost citotoxice, probabil din cauza dodecil-aminei prezente pe suprafata lor. Astfel, acoperirea cu un surfactant biocompatibil a crescut considerabil sansele pentru aplicatii biomedicale.

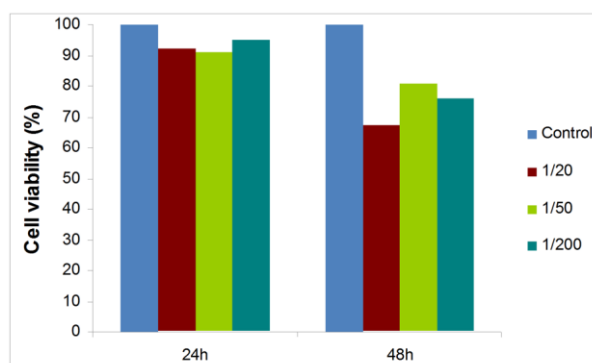


Figura 38. Citotoxicitatea dispersiilor apoase diluate de magnetita cu surfactant S1 (Exprimate in concentratii de surfactant, dilutiile din legenda sunt echivalente cu 0.17g/L, 0.03g/L si respectiv 0.008 g/L). (Teste MTT).

In continuare, pentru testarea abilitatii de transport a unor specii biologice active, s-a realizat incapsularea nanoparticulelor SPION si a unui medicament insolubil, hidrofob, in particule multifunctionale, utilizand doar o cantitate foarte mica de surfactant siloxanic. Ca medicament model s-a ales nistatina, a carei solubilizare micelara a fost investigata in etapa precedenta.

Stabilitatea coloidala a particulelor multifunctionale a fost modesta, dar rezultate bune s-au obtinut cu surfactantul polisiloxanic S2, dupa adaugare de tampon fosfat (pH 6.5) sau acid clorhidric (pH 1). In formula magnetita-nistatina-S2, diametrul mediu al particulelor masurate prin DLS a fost de circa 400 nm, iar valoarea absoluta a potentialului zeta a fost de 26.3mV, ceea ce confirma stabilitatea coloidala relativ buna. Imaginile TEM (Figura 39) arata vezicule de marime uniforma, continand particule mai mici in peretele lor. Acest aspect este asemanator cu observatiile precedente asupra morfologiei formulei nistatina-S2 (etapa precedenta), conform carora medicamentul este solubilizat prin interactiuni fizice, in stratul hidrofob al veziculelor de surfactant.

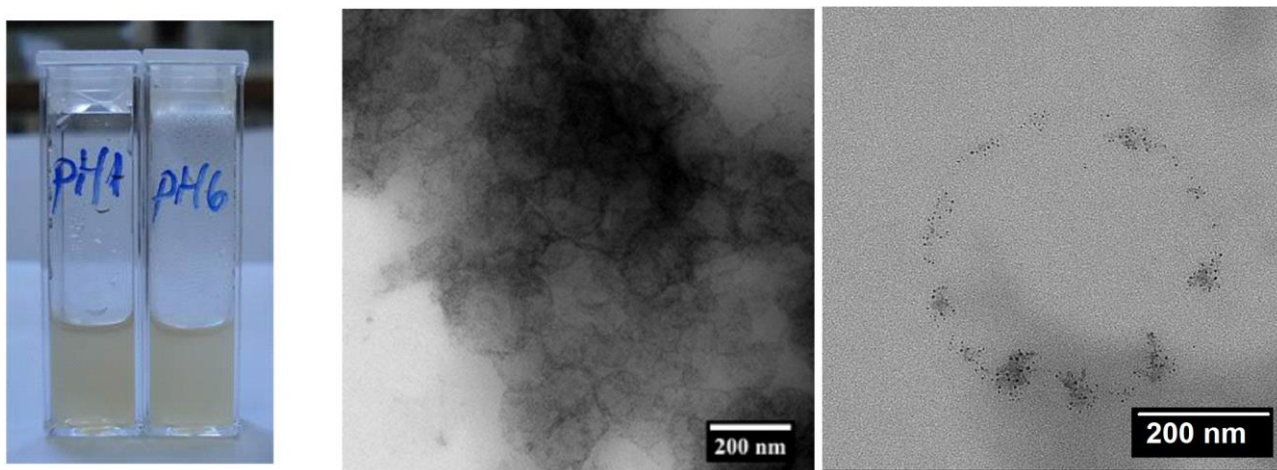


Figura 39. Dispersia apoasa de magnetita si nistatina cu surfactantul polisiloxanic S2, aspectul dupa 24h (stanga) si imagini TEM

Formula similara cu surfactantul S1, desi nu a fost la fel de stabila, a putut fi analizata prin TEM (in modul STEM) si EDX (Figura 40). Se observa ca elementele Fe din magnetita, Si din surfactant si N din nistatin si din surfactanti au fost detectate pe aceeasi linie, aratand coexistenta tuturor componentelor in particulele multifunctionale.

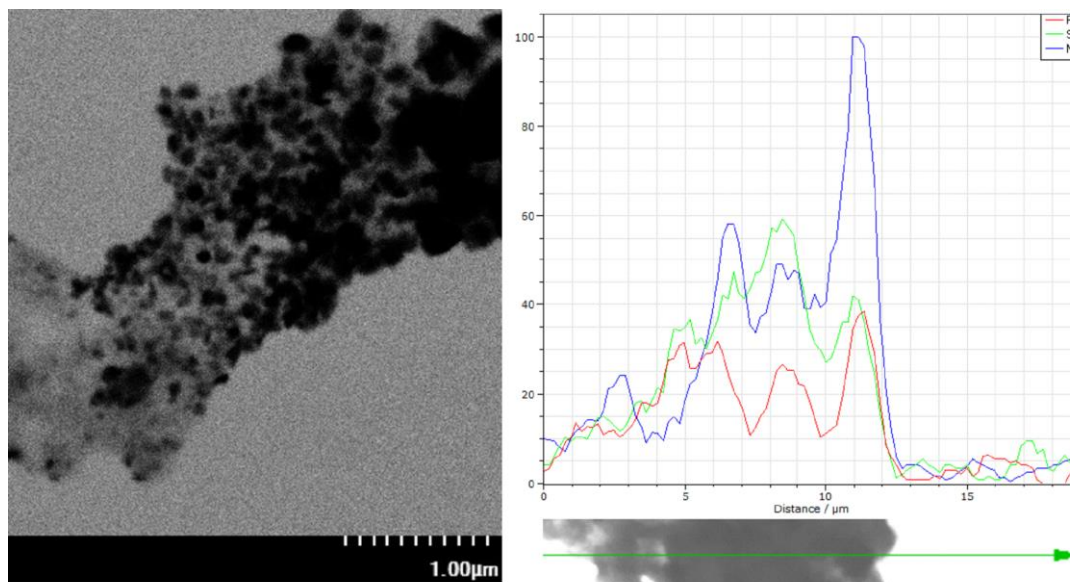


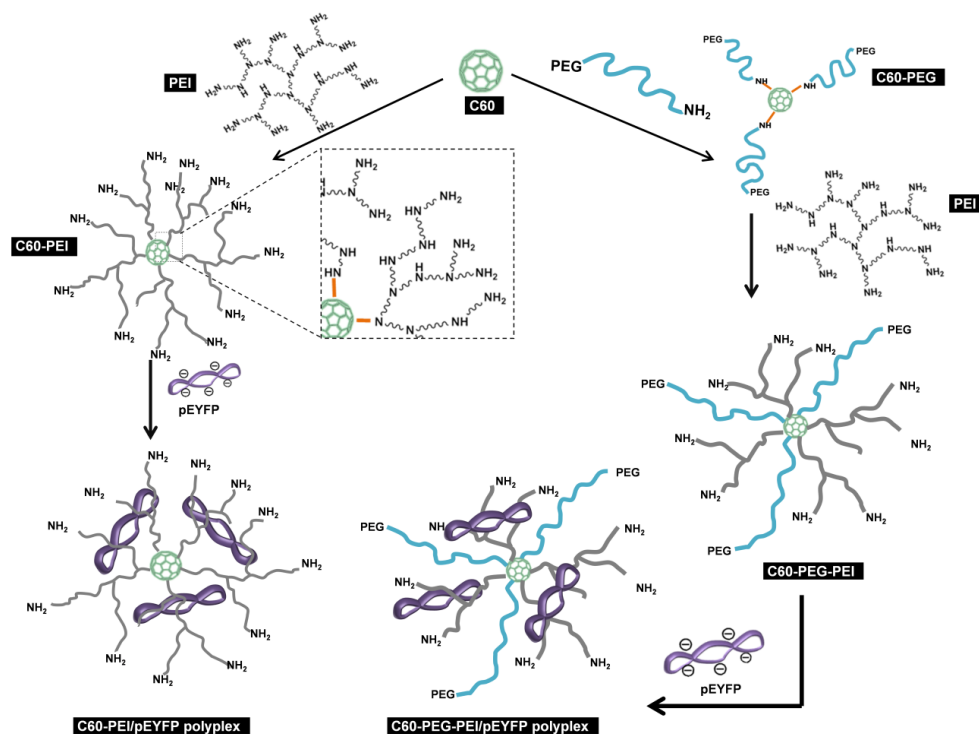
Figura 40. Formula magnetita-nistatina-S1 (imagine STEM si analiza EDX).

Asadar, investigatiile preliminare comparative asupra abilitatii unor oligomeri functionali polisiloxanici (sintetizati si evaluati ca surfactanti in etapa anterioara) de a genera particule multifunctionale au demonstrat asemenea posibilitatea incapsularii eficiente atat a unor nanoparticule magnetice (magnetita sau cromita), cat si a unui medicament, cu formare de particule complexe, multifunctionale, biocompatibile, cu dimensiuni sub 200 nm si respectiv 400 nm, folosind o cantitate foarte mica de derivat polisiloxanic.

Rezultatele obtinute asigura premisele pentru utilizarea unor astfel de sisteme in vederea incorporarii unor vectori non-virali destinati transferului genic, sau a unor agenti anti-tumorali alaturi de nanoparticulele magnetice, rezultand astfel complexe dirijabile spre tinte biologice utilizand campul magnetic.

A.2. Influenta PEG asupra capacitatii de transfectie a conjugatelor pe baza de fullereni si polietilenglicol (C60-PEG-PEI)

In aceasta etapa a fost studiat un carrier unitar avand fullerenul C_{60} drept entitate centrala si drept invelis polietilenimina ramificata (PEI, M_n 2000) - polimer cationic capabil sa condenseze material genetic si polietilenglicol (PEG, M_n 2000) – polimer ce asigura stabilitatea si protectia sistemului (Schema 5).¹²¹ Mentionam ca vectorul nonviral avand fullerenul C_{60} drept entitate centrala si polietilenimina ramificata (PEI, M_n 2000) drept invelis a fost discutat in etapa 2013. In prezenta etapa se va prezenta conjugatul pe baza de C_{60} , PEI si PEG, cu referiri comparative la conjugatul pe baza de C_{60} si PEI. Abilitatea conjugatului C60-PEG-PEI de a transporta tronsoane de ADN plasmidic (pEYFP) a fost demonstrata prin electroforeza pe gel de agaroz, pentru diverse rapoarte intre numarul de moli de grupari aminice ale carrier-ului si numarul de moli de grupari fosfat ale ADN-ului (N/P)^{122,123}, asa cum se prezinta in Figura 41d. Caracterizarea fizico-chimica a carrier-ului unitar s-a efectuat prin analiza 1H -RMN (Figura 41a) si XPS (Figura 41b). Din imaginile AFM (Figura 41c) se observa ca poliplecsii C60-PEG-PEI/pEYFP prezinta o morfologie globulara cu dimensiuni de aproximativ 50 nm la un raport N/P=50. Dimensiunea nanoparticulelor este functie de raportul N/P si variaza de la 50 nm la 120 nm, cand raportul N/P variaza de la 50 la 200.



Schema 5. Modul de preparare a poliplexsilor rezultati prin condensarea conjugatelor C60-PEI si C60-PEG-PEI cu ADN plasmidic.

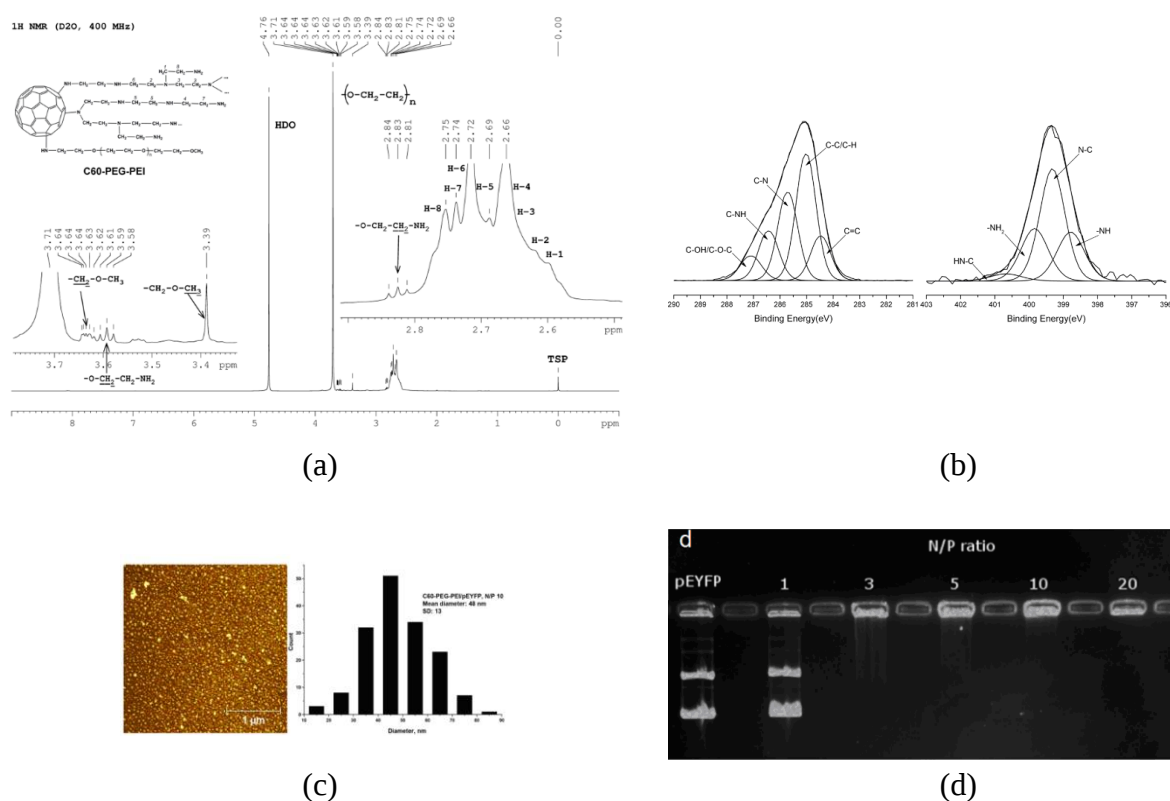


Figura 41. Rezultatele caracterizarii conjugatului C60-PEG- PEI.

Studiul *in vitro* s-a realizat pentru conjugatele C₆₀-PEG-PEI cu compozitia elementala 67,52 % C si 25,00 % N si 7,48 % O, prin comparare cu compusul model PEI, caracterizat prin compozitia elementala 62,01 % C si 37,99 % N, toate contributiile procentuale fiind determinate prin analiza XPS. Drept partener

de complexare s-a utilizat plasmida pEYFP-C1, care codifica o proteina fluorescenta la lungimile de unda de excitatie/emisie 513/527 nm. Cunoscandu-se ca 1 mg ADN plasmidic contine 3 μ mol de fosfor, s-au calculat diverse rapoarte N/P prin varierea cantitatii de carrier, pentru o cantitate constanta de ADN. Conjugatele C₆₀-PEG-PEI/ADN au fost incubate timp de 30 minute la temperatura ambianta, inaintea utilizarii, iar apoi au fost analizate prin electroforeza pe gel de 0.8 % agaroz continand SYBR[®] Green (pentru colorarea ADN) in tampon TAE (Tris-acetat - EDTA). Electroforeza a fost efectuata la o diferenta de potential de 60 V, timp de 30 minute. La final, gelurile au fost fotografiate sub expunere la UV (Figura 41d). Se observa ca vectorul C₆₀-PEG-PEI prezinta capacitate de incarcare a plasmidului pEYFP la rapoarte N/P mai mari de 5/1. Valorile de potential zeta (o masura a stabilitatii coloidale) indica faptul ca poliplexii prezinta valori pozitive indiferent de valoarea N/P. Asadar carrier-ul nanoparticulat sintetizat poate juca rolul de vector genetic non-viral.

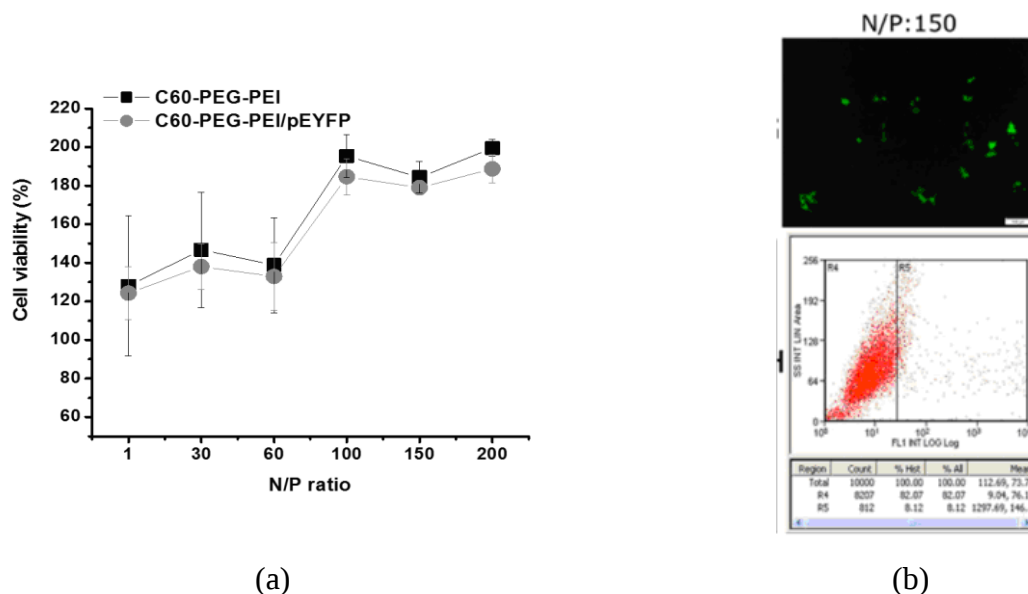


Figura 42. Caracterizarea comparativa a carrier-ului si a cargocomplexilor acestuia.

Citotoxicitatea cargocomplexilor incarcati sau nu cu ADN a fost testata asupra liniei celulare HEK 293T. Analizand rezultatele prezentate in Figura 42a se constata, in cazul incubarii in prezenta C₆₀-PEG-PEI si C₆₀-PEG-PEI/pADN, ca viabilitatea celulelor este mai mare de 100%, fapt pus pe seama prezentei PEG in structura conjugatului, acesta avand abilitatea de a stimula proliferarea celulara. In cazul compusului PEI se constata scaderea progresiva a viabilitatii pentru concentratii mai mari decat 0.55 μ g/mL, atingandu-se o valoare de circa 50 % in cazul concentratiilor de 2.2 μ g/mL si 3.3 μ g/mL. Asadar, complexarea PEI cu pADN determina cresterea viabilitatii celulare la valori peste cele ale probelor de control.

Expresia genei reporter purtate de plasmida pEYFP-C1 si respectiv exprimarea proteinei fluorescente YFP ca urmare a transfectarii aplicate liniei celulare HEK 293T a fost estimata prin tehnica microscopiei de fluorescenta, utilizand microscopul Olympus IX81. Au fost astfel obtinute imagini reprezentative pentru transfectarea cargocomplexilor C₆₀-PEG-PEI/pEYFP si pentru poliplexul PEI/pEYFP, la diferite rapoarte N/P. Eficienta de transfectie asupra celulelor HEK 293T atinge un maxim pentru raportul N/P de 150/1.

Eficienta transfectiei a fost, de asemenea, urmarita prin microscopie in fluorescenta si prin citometrie in flux (Figura 42b), determinand procentul celulelor YFP-pozitive in canalul FL1. Aceasta analiza cantitativa a confirmat rezultatele stabilite prin microscopia de fluorescenta, indicand ca, dupa transfectarea cu cargocomplexul C₆₀-PEG-PEI/pEYFP corespunzator raportului N/P de 150/1, 10 % din cele 8000 de celule analizate au exprimat proteina fluorescenta YFP.

Asadar, in urma studiilor legate de influenta PEG asupra capacitatii de transfectie a conjugatelor pe baza de fullerena si polietilenglicol (C60-PEG-PEI), se desprind urmatoarele concluzii:

- conjugatul C60-PEG-PEI se poate sintetiza printr-o metoda simpla si reproductibila, la rapoarte molare C60/PEG/PEI de 1/1/3.5, determinate prin ^1H -RMN si XPS; poliplexii prezinta morfologie sferica cu dimensiuni intre 50 si 120 nm, in functie de raportul molar N/P;
- electroforeza pe gel de agaroză a aratat C₆₀-PEG-PEI complexează total ADN plasmidic incepand de la valori ale raportului N/P de 3:1;
- viabilitatea celulelor HEK 293T nu este afectata de incubarea cu compusul C60-PEG-PEI si poliplexul C60-PEG-PEI/pEYFP, obtinandu-se valori mai mari de 100 % in raport cu proba de control, fapt pus pe seama prezentei PEG in compozitie.
- folosind doua metode de investigare, microscopia cu fluorescenta si citometria in flux, s-a stabilit faptul ca eficienta de transfectie asupra celulelor HEK 293T a cargocomplexilor C60-PEG-PEI/pEYFP creste odata cu cresterea raportului N/P.

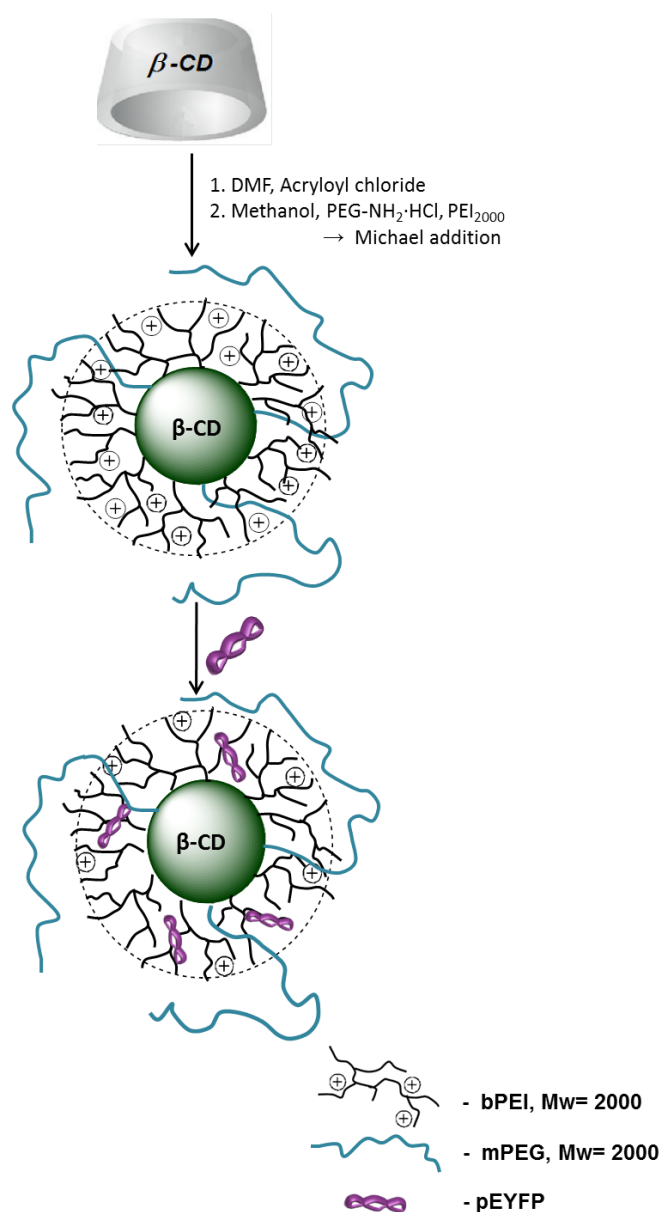
A.3. Nanoparticule pe baza de β -ciclodextrina modificata cu polietilenimina si polietilenglicol (β -CD-PEI-PEG), capabile a sustine transfectia ADN

Vectori non-virali cu structuri bine definite s-au sintetizat prin reactia gruparilor vinilice, legate de atomul de carbon C6 al β -CD, cu gruparile aminice din PEI ramificat ($M_w=2000$ g/mol) sau PEG, prin aditia Michael (Schema 6).

S-au obtinut conjugate cu structura dendrimerica β -CD-PEI-PEG in raport molar β -CD/PEG/PEI-PEG de 1/0.9/5.5 conform rezultatelor obtinute prin: ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HSQC, HPLC-MS, XPS (Figurile 42÷46). Abilitatea conjugatului de a transporta plasmida EYFP (capabila ca, dupa transfectarea cu succes, sa induca exprimarea unei proteine fosforescente), a fost demonstrata prin electroforeza pe gel de agaroză, pentru diverse rapoarte intre numarul de moli de grupari aminice ale carrier-ului si numarul de moli de grupari fosfat ale ADN-ului (N/P), asa cum se prezinta in Figura 47. (se observa ca la raport N/P mai mare de 10, conjugatele sunt capabile sa impacheteze plasmidul).

Rezultatele TEM (Figura 48) indica faptul ca dimensiunile carrier-ilor dupa complexarea cu ADN (pEYFP) sunt de ordinul nanometrilor, mai mici decat ale carrieri-lor necomplexati, acesta fiind un bun indiciu asupra capacitatii de incarcare cu plasmid, fapt echivalent cu o foarte buna impachetare a ADN-ului in cargocomplex. Asadar, carrier-ii nanoparticulati sintetizati pot juca, *in vitro*, rolul scontat, de vector genetic non-viral. De remarcat faptul ca dimensiunea poliplexilor variaza intre 3 si 12 nm, in functie raportul N/P.

Citotoxicitatea cargocomplexilor incarcati sau nu cu ADN a fost testata asupra liniei celulare HEK 293T. Analizand rezultatele prezentate in Figura 49a se constata, in cazul incubarii in prezenta β -CD-PEG-PEI si β -CD-PEG-PEI /pADN, ca viabilitatea celulelor este mai mare de 100 %, fapt datorat prezentei lanturilor de PEG care induc o proliferare sporita a celulelor in timpul experimentului. In cazul compusului PEI unitar (Figura 49b) se constata scaderea progresiva a viabilitatii pana la 70%.



Schema 6. Etapele de obtinere a poliplexului β -CD-PEI-PEG/pEYFP.

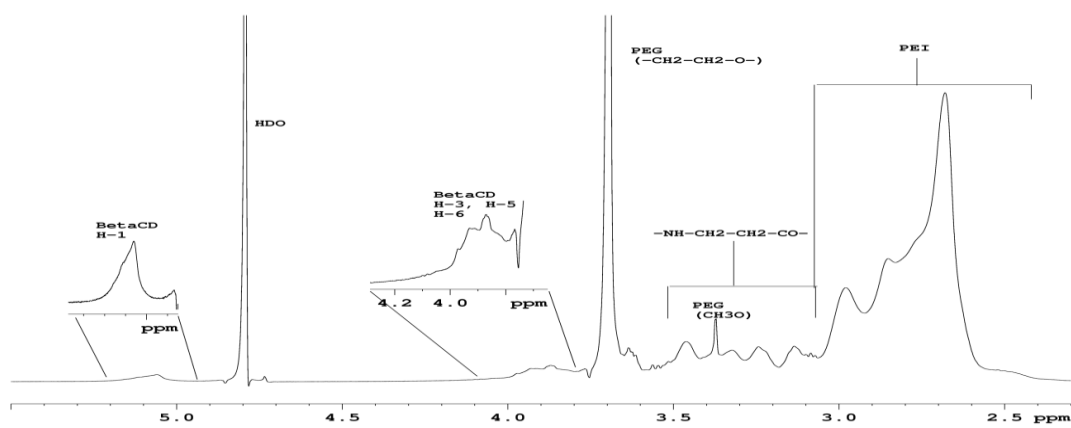


Figura 42. Spectrul ¹H-RMN al conjugatului β -CD-PEI-PEG.

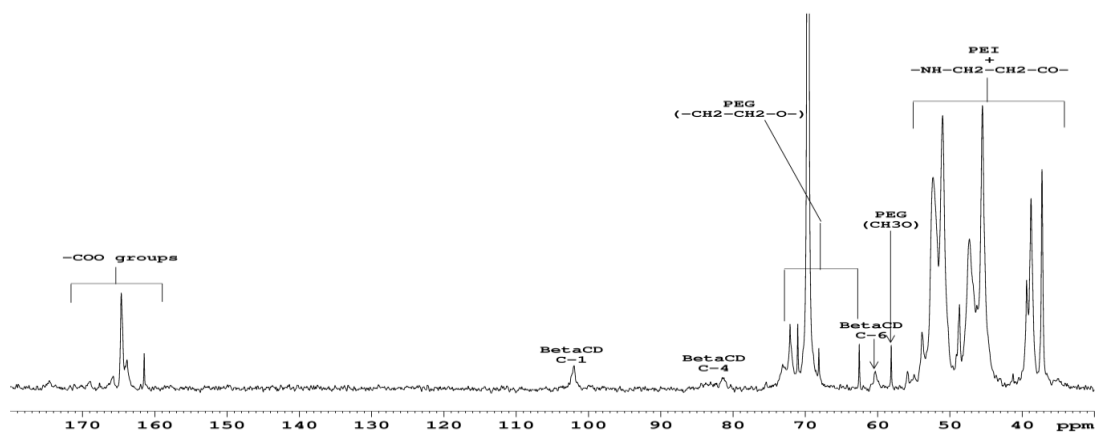


Figura 43. Spectrul ^{13}C -RMN al conjugatului β -CD-PEI-PEG.

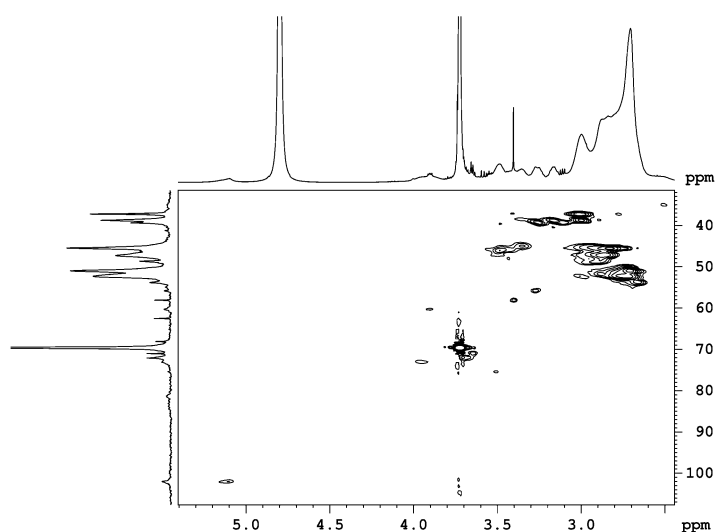


Figura 44. Spectrul 2D RMN al conjugatului β -CD-PEI-PEG.

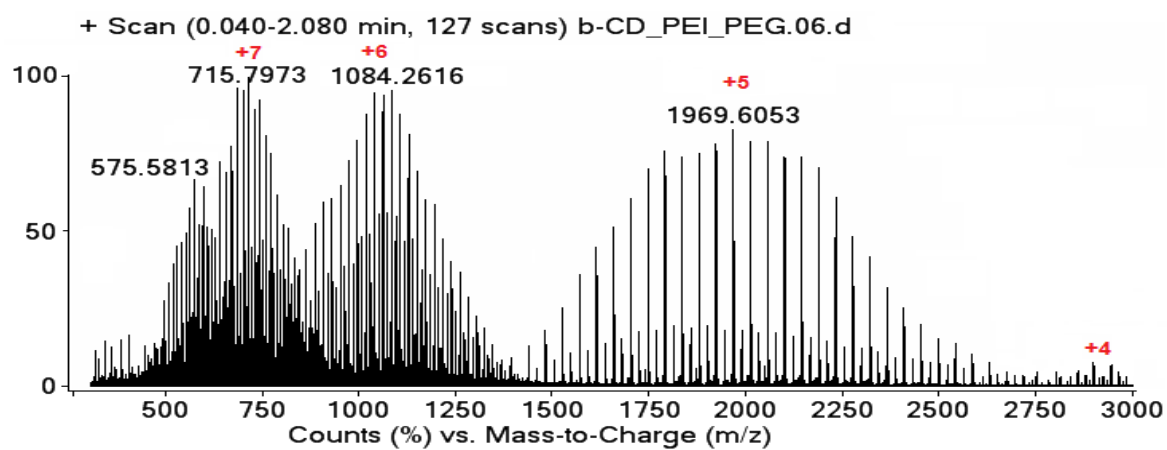


Figura 45. Spectrul MS al conjugatului β -CD-PEI-PEG.

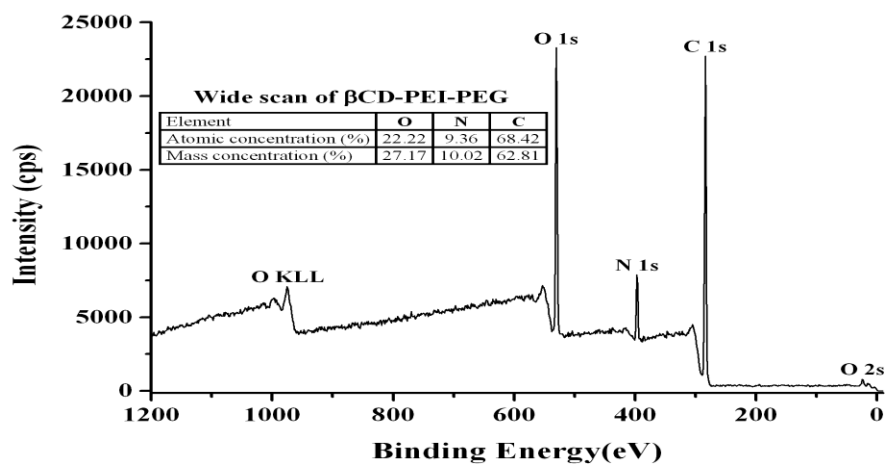


Figura 46. Spectrul XPS (wide scan) al conjugatului β -CD-PEI-PEG.

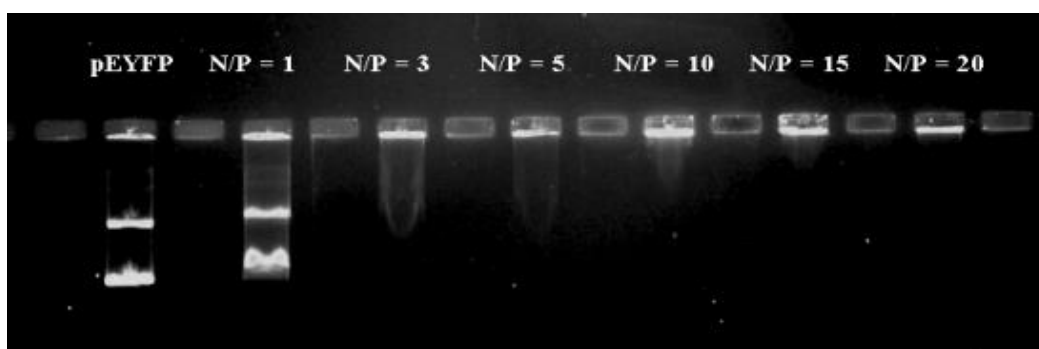
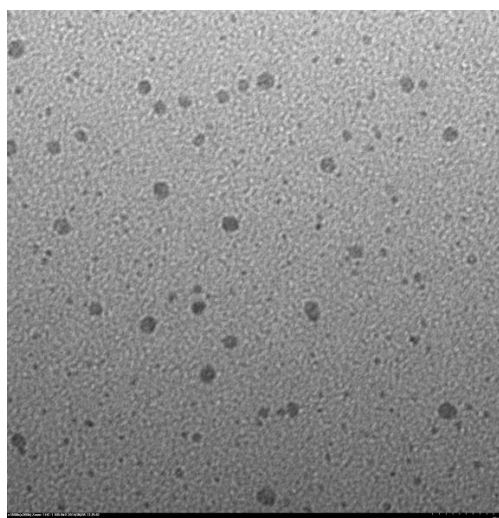
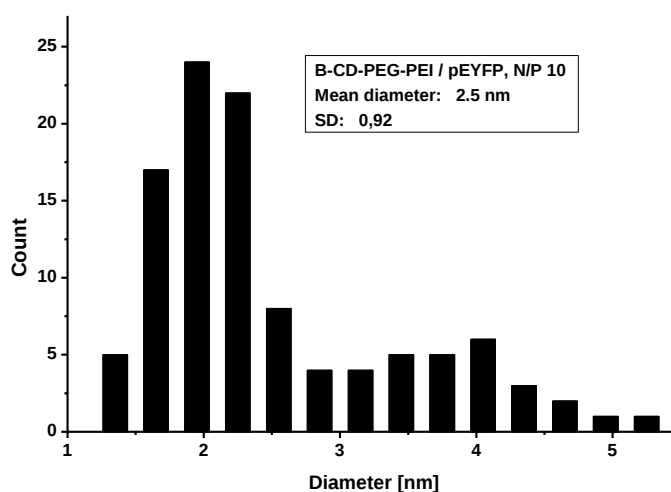


Figura 47. Migrarea in del de agaroza a poliplexilor β -CD-PEI-PEG/pEYFP.



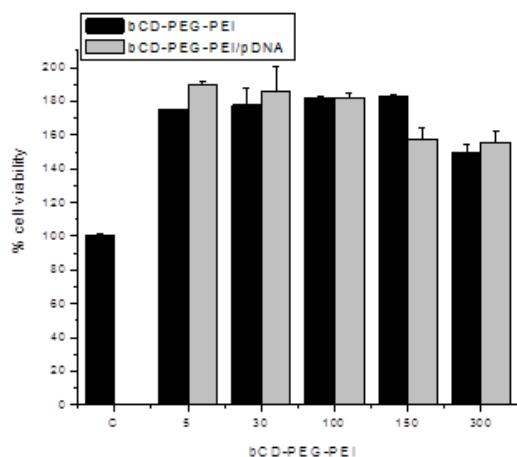
(a)



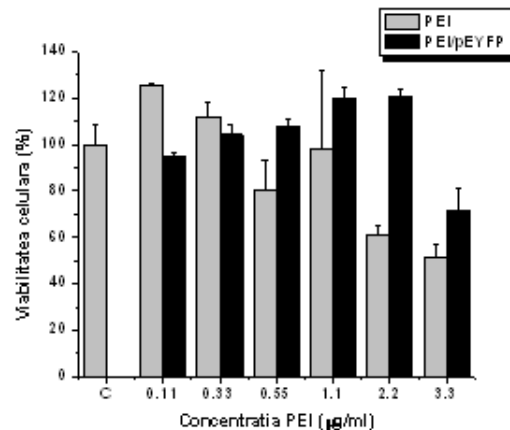
(b)

Figura 48. Caracterizarea TEM a poliplexilor β -CD-PEI-PEG/pEYFP.

Expresia genei reporter purtate de plasmida pEYFP-C1 si respectiv exprimarea proteinei fluorescente YFP ca urmare a transfectarii aplicate liniei celulare HEK 293T a fost estimata prin tehnica microscopiei de fluorescenta, utilizand microscopul Olympus IX81. Au fost astfel obtinute imagini reprezentative pentru transfectarea cargocomplexilor β -CD-PEG-PEI/pEYFP si pentru poliplexul PEI/pEYFP, la rapoartele N/P de 1:1, 10:1, 20:1 si 30:1. Figura 50a prezinta efectele transfectiei efectuate cu cargocomplexul β -CD-PEG-PEI /pEYFP. Eficienta de transfectie asupra celulelor HEK 293T atinge un maxim pentru raportul N/P de 50:1. Transfectarea mediata de poliplexul PEI/pEYFP conduce la exprimarea proteinei YFP in cantitati extrem de scazute (sub 10 celule transfectate per camp, in observarea la o marire de 400 de ori).

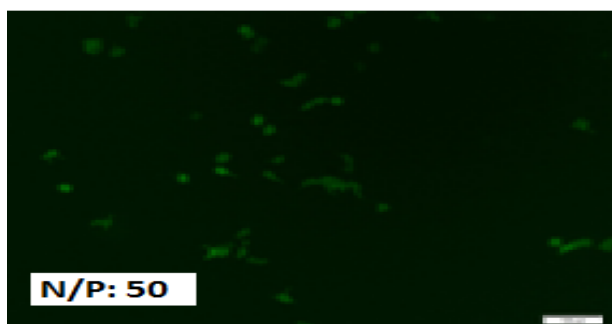


(a)

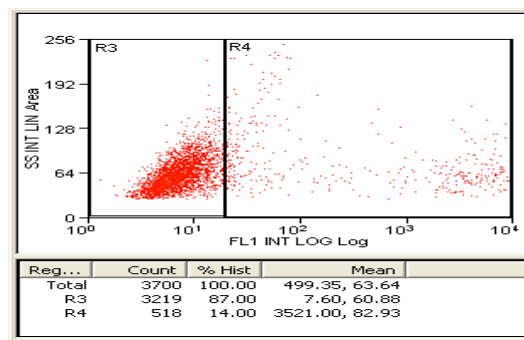


(b)

Figura 49. Citotoxicitatea compusilor β -CD-PEI-PEG si PEI, liberi sau complexati cu ADN plasmidic pEYFP, indusa asupra celulelor epiteliale HEK 293T, dupa 48 de ore.



(a)



(b)

Figura 50. Imagini obtinute prin microscopie de fluorescenta (a) si identificarea prin citometrie in flux a celulelor HEK 293T transfectate cu plasmida pEYFP incarcata pe carrier-ul β -CD-PEG-PEI, la un raport N/P de 50:1.

Eficienta in transfectie a fost, de asemenea, urmarita prin citometrie in flux, determinand procentul de celule fluorescent-pozitive (in virtutea exprimarii proteinei YFP) in canalul FL1 (Figura 50b). Aceasta analiza cantitativa a confirmat rezultatele stabilite prin microscopia de fluorescenta, indicand ca, dupa transfectarea cu cargocomplexul β -CD-PEG-PEI/pEYFP, 14 % din 8000 de celule analizate au exprimat proteina fluorescenta YFP, corespunzator raportului de incarcare cu plasmida, N/P de 50:1.¹²⁴

Drept concluzie a studiului, este evident ca:

- conjugatul β -CD-PEG-PEI se poate obtine printr-o metoda simpla si reproductibila, la rapoarte molare β -CD/PEG/PEI de 1/0.9/5.5, fapt confirmat prin analize RMN, XPS, ESI-MS;
- conjugatul β -CD/PEG/PEI este capabil sa impacheteze plasmidul EYFP la rapoarte molare N/P mai mari de 10/1; dimensiunea poliplexsilor este cuprinsa intre 3 si 12 nm, in functie de raportul molar N/P;
- pentru raportul molar N/P de 50/1, poliplexul prezinta o eficienta maxima de transfectie de 14 %;
- conjugatul si poliplexul prezinta o foarte buna citocompatibilitate.

B. Nanoparticule obtinute aplicand chimia dinamica constitutională.

Polimerii rezultati prin dinamica constitutională, numiti si “dinameri”, pot fi definiti ca entitati polimerice ale caror monomeri sunt legati prin legaturi reversibile si au, prin urmare, capacitatea de a-si modifica compozitia prin schimbul intramolecular al componentelor. Acestea din urma pot fi atat de natura moleculara (cand se formeaza legaturi covalente reversibile), cat si de natura supramoleculara (cand au loc interactiuni necovalente). Proprietatile dinamice le confera dinamerilor capacitatea de adaptare si evolutie sub influente externe de factura chimica (modificari ale parametrilor compozitionali ai solutiilor) sau fizica (variatii ale marimilor termodinamice). O astfel de auto-asamblare, spontana dar directionata, este de interes major pentru proiectarea structurilor supramoleculare, sinteza si ingineria de materiale cu proprietati noi.^{125,126}

Chimia supramoleculara este prin natura sa o chimie dinamica, avand in vedere labilitatea interactiunilor necovalente intre componentele moleculare ale unei entitati supramoleculare, care permite asocierea, disocierea si rearanjarea componentelor in speciile supramoleculare. Proprietatile dinamice sunt datorate existentei legaturilor covalente dinamice, astfel incat speciile moleculare nou formate vor avea capacitatea de a suferi procese de schimb dinamic si reorganizare.^{127,128}

In acest context, strategia combinatoriala dinamica este o metoda rapida de screening in vederea obtinerii unei librării mari de compusi cu proprietati dorite. Schimbări intermoleculare pot interveni între entitățile hidrofile și hidrofobe, iar prin efectul dinamic molecula se poate adapta la conformația ADN-ului, devenind tinta pentru ADN, și împreună pot penetra membrana celulară.¹²⁹

Complexele autoasamblate sunt constituite din entitati active legate de miez prin legaturi covalente reversibile si sunt capabile sa tinteasca membrana celulara. Miezul poate fi decorat suplimentar cu diverse grupari functionale, necesare pentru imbunatatirea proprietatilor de transfectie.

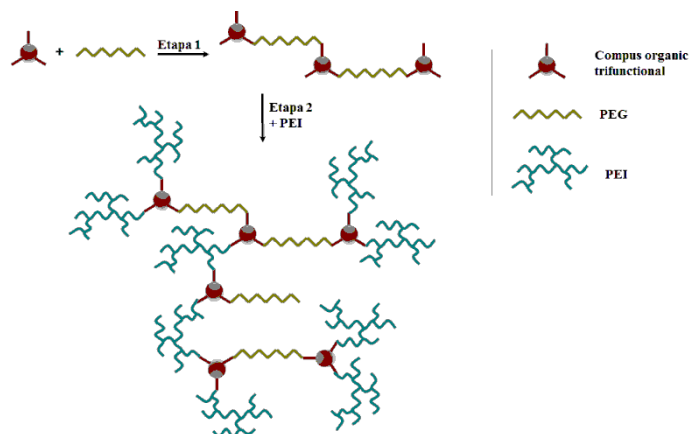
In aceasta etapa s-au obtinut dinameri plecand de la macromonomeri PEG liniar functionalizat cu grupari aminice si PEI ramificat (Mw 800 g/mol), ca si conector fiind folosita o trialdehida sau un lipid (squalena), acestea fiind responsabile pentru formarea conjugatelor.

B.1. Vectori utilizati in transfectie pe baza de compusi organici trifunctionali, PEG si PEI (T-PEG-PEI)

Arhitectura vectorilor sintetizati a pornit de la un miez organic trifunctional modificat cu PEI, compus ce leaga AND-ul formand poliplecsi, si cu PEG, utilizat pentru a mari stabilitatea vectorilor si a imbunatati biocompatibilitatea acestora (Schema 7).

Vectorii au fost sintetizati in 2 etape. In prima are loc reactia dintre compusul organic trifunctional si PEG (in acetoneitril, la temperatura camerei, timp de 72 de ore). Raportul dintre cei doi compusi a fost ales astfel incat sa ramana grupe functionale ale compusului trifunctional nereactionate. Gruparile nereactionate au fost modificate cu PEI in cea de-a doua etapa de sinteza (reactia are loc in apa, la temperatura camerei, timp de 72 de ore).

Structura vectorilor a fost confirmata prin spectroscopie ¹H-RMN, spectrele fiind prezentate in Figura 51.



Schema 7. Calea de obtinere a vectorilor pe baza de compus organic trifunctional, PEG si PEI (T-PEG-PEI).

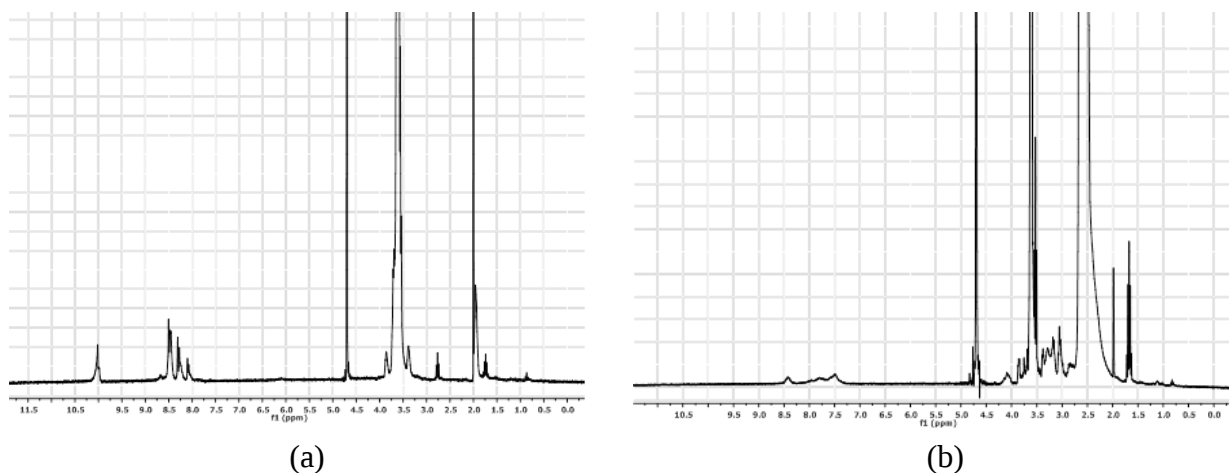


Figura 51. Spectrele RMN ale compusului T-PEG-PEI, la finalul celor doua etape ale sintezei.

Abilitatea de complexare a vectorului T-PEG-PEI cu ADN-ul plasmidic (pCS2+NLS-eGFP, 4830 perechi de baze) a fost investigata prin gel electroforeza la diferite rapoarte N/P (20, 10, 5, 3 si 1). Se observa ca la rapoarte N/P mai mari de 5 plasmidul a fost complet impachetat de conjugatul T-PEG-PEI (Figura 52).

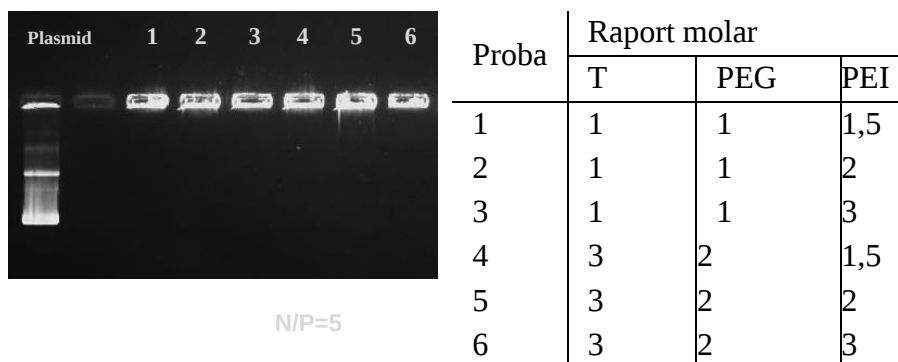


Figura 52. Rezultatele gel electroforezei pentru poliplexsii T-PEG-PEI in diferite rapoarte molare T/PEG/PEI complexati cu plasmid pCS2+NLS-eGFP, la raport N/P=5.

Studiile de morfologie a poliplexsilor formati au fost realizate prin microscopie electronica de transmisie (TEM) (Figura 53). In urma conjugarii plasmidului cu vectorul sintetizat se obtin aggregate sferice cu dimensiuni intre 39 si 126 nm, dependente de rapoartele molare PEG/PEI.

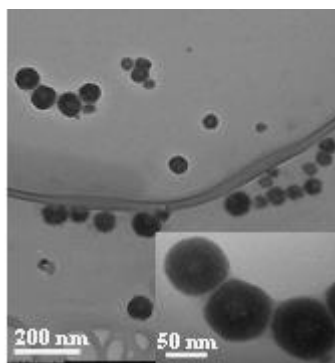


Figura 53. Micrografii TEM pentru poliplexul T-PEG-PEI/ pCS2+NLS-eGFP, la un raport molar T : PEG : PEI de 1:1:3 si pentru N/P=10.

Viabilitatea celulelor HeLa, cultivate in prezenta conjugatelor necomplexate si complexate cu ADN plasmidic pCS2+NLS-eGFP la diverse rapoarte N/P, a fost determinata folosind tehnica MTT. Viabilitatea a fost exprimata procentual, prin raportarea la viabilitatea celulelor cultivate in mediu de cultura normal, in absenta complexelor (considerata 100%). In cazul complexelor, concentratia ADN a fost mentinuta constanta la 1µg/mL, iar concentratia conjugatilor polimerici cu PEI a fost variata astfel incat sa se obtina raporturi N/P intre 20 si 200. In Figura 54 sunt prezentate rezultatele de viabilitate celulara in functie de valoarea raportului N/P si a raportului T/PEG/PEI. Se observa ca poliplexsii obtinuti nu prezinta citotoxicitate. Tinand cont ca dimensiunile lor sunt cuprinse intre 39 si 126 nm, se poate concluziona ca poliplexsii T-PEG-PEI pot fi utili in transfectie.

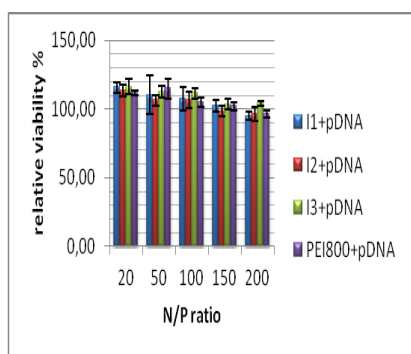


Figura 54. Viabilitatea celulara relativa pentru celule HeLa tratate cu poliplexsii T-PEG-PEI/pCS2+NLS-eGFP, la rapoarte molare T:PEG:PEI de 1:1:1 (I1); 1:1:3 (I2); 3:2:3 (I3)

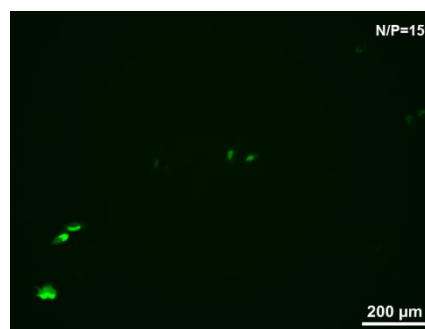


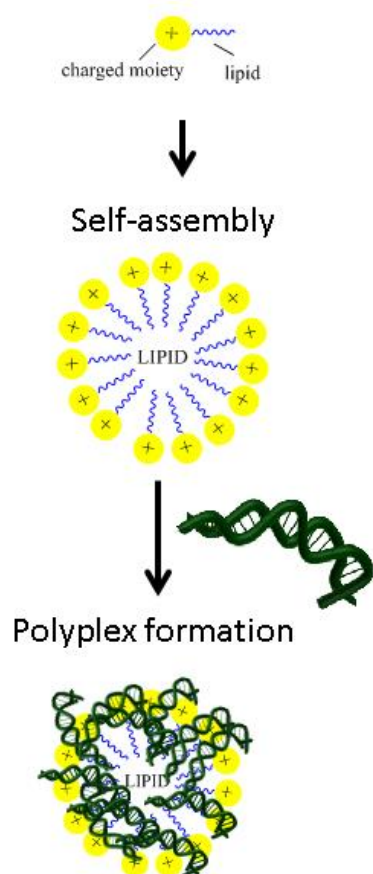
Figura 55. Celule HeLa transfectate cu poliplex T-PEG-PEI/pCS2+NLS-eGFP. T:PEG:PEI = 1:1:3 (I2), N/P=5.

Eficienta transfectiei *in vitro* a fost evaluata pe celule HeLa. Celulele HeLa au fost transfectate, in placi cu 96 de godeuri, cu conjugate si plasmid pCS2+NLS-eGFP. Concentratia de ADN per godeu a fost fixata la 400 ng. Celulele au fost monitorizate post-transfectie la 72 ore, utilizand un microscop Leica DMI 3000 cu filtru de fluorescenta GFP. Rezultatele prezentate in Figura 55 pentru poliplexul T-PEG-PEI/pCS2+NLS-eGFP cu raportul molar T:PEG:PEI=1:1:3 indica faptul ca transfectia celulelor HeLa a avut loc.

B.2. Vectori utilizati in transfectie pe baza de lipid (squalena) si PEI (S-PEI)

Experimentele au vizat legarea unui terpenoid (squalena) de un polimer cationic (PEI), in scopul de a crea un bioconjugat cu abilitati de auto-agregare, ce poate genera particule auto-asamblate, in mediu apos.

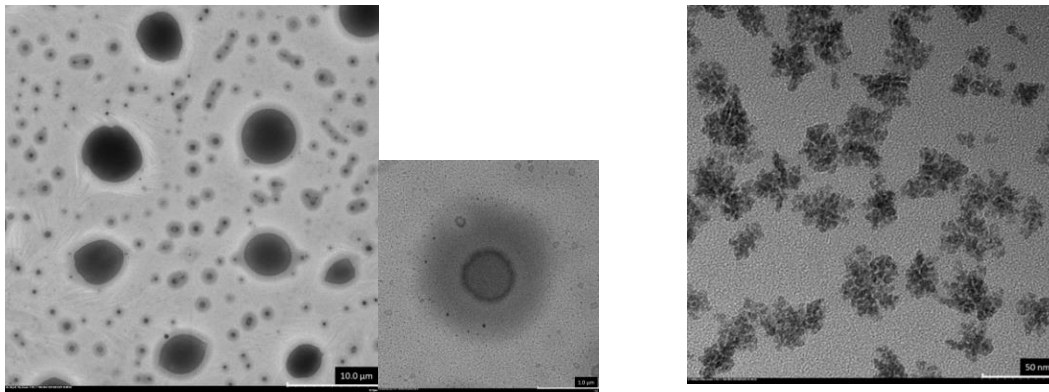
Arhitectura vectorilor sintetizati are la baza squalena functionalizata cu grupare aldehidica la unul dintre capete, capabila sa interactioneze cu gruparile aminice din PEI, generand legaturi covalente dinamice. Datorita hidrofobicitatii, squalena formeaza prin autoasamblare vectori cu miez hidrofo¹³⁰ si invelis hidrofil alcatuit din PEI. Un astfel de agregat poate leaga AND-ul, formand poliplexsi (Schema 8).



Schema 8. Formarea poliplexsilor de tip S-PEI/pADN.

Micrografiile TEM (Figura 56) indica obtinerea unei morfologii globulare a conjugatelor S-PEI, cu dimensiuni cuprinse intre 400 si 500 nm, care, dupa impachetarea AND-ului, genereaza poliplexsii supraagregati, in care entitatile constitutive au dimensiuni mult mai mici, de aproximativ 50 nm. Acest fapt demonstreaza ca bioconjugatele S-PEI prezinta o buna capacitate de compactare a pasmidului pCS2+NLS-eGFP.

Alcatuirea complexa a conjugatelor S-PEI cu ADN plasmidic este probata prin electroforeza in gel de agaroza. In Figura 57 se observa, pentru fiecare compus in parte, de la ce raport N/P poate acesta sa complexeze total ADN plasmidic si sa impiedice migrarea ADN in gel. Vectorul S-PEI este capabil sa condenseze plasmidul pentru rapoarte N/P mai mari de 3, ceea ce-l recomanda pentru a fi testat in ulterior in terapia genica.



(a) Bioconjugat S-PEI in apa, formeaza globule de aproximativ 400-500 nm.

Poliplex S-PEI/ pCS2+NLS-eGFP cu N/P 20; dimensiunea nanoparticulei de aprox. 50 nm. (b)

Figura 56. Micrografiile TEM ale complexului S-PEI (a) si respectiv ale poliplexului S-PEI/pCS2+NLS-eGFP (b).

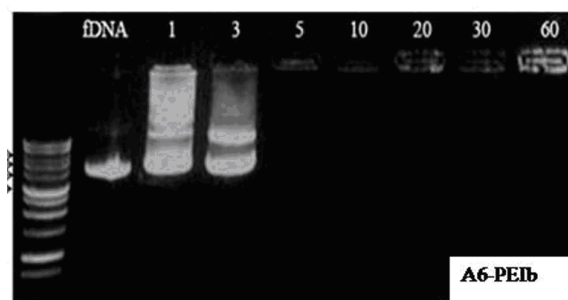


Figura 57. Separarea electroforetica pe gel de agaroza a poliplexsilor S-PEI/ pCS2+NLS-eGFP, la diferite rapoarte N/P.

Eficienta transfectiei *in vitro* a fost evaluata pe celule HeLa, transfectate, in placi cu 96 de godeuri, cu conjugate si plasmid pCS2+NLS-eGFP (care, odata transfectat, induce exprimarea in celule a unei proteine fluorescenta). Concentratia de ADN/godeu a fost constanta, de 400 ng. Celulele au fost monitorizate post-transfectie la 48 ore utilizand un microscop Leica DMI 3000, cu filtru de fluorescenta GFP. Nu s-a inregistrat tendinta de citotoxicitate.

Asadar, bioconjugatele pe baza de squalena si PEI sunt apte a complexa ionic si a transfecta plasmide pCS2+NLS-eGFP, sub forma unor nanoparticule cu dimensiuni de ordinul 50 nm. Acestea au abilitate de transfectie asupra celulelor HeLa la rapoarte N/P de circa 150.

Obiectivul 3. STUDIUL POSIBILITATILOR DE CARACTERIZARE PRIN TEHNICI ELECTROCHIMICE A COMPOZITIEI MEDIILOR IN CARE SE EFECTUEAZA TRANSFECTIA

Utilizarea *in vitro* a vectorilor genetici non-virali, adaugati fiind in mediile in care sunt cultivate celulele, impune controlul strict al compozitiei sistemului apos, astfel incat plajele fiziologice (sau cele particulare culturii celulare) sa nu fie afectate de dozarea polipeptidelor si a speciilor chimice adjuvante, ori insotitoare. In acest sens, unul dintre parametri ai caror valori sunt de acut interes este concentratia glucozei, de regula prescrisa odata cu mediul de cultura. Acest parametru poate suferi abateri atunci cand vectorii genetici non-virali sunt dozati, fie prin simpla dilutie, fie prin implicare in interactii fizico-chimice. Din acest motiv, supravegherea pe cale electrochimica a concentratiei glucozei in medii compozitional complexe si aglomerate macromolecular este esentiala. In cadrul fazei 2014, ca obiectiv suplimentar, s-a abordat si aceasta problematica. Bazele teoretice si realizarile experimentale in acest sens sunt prezentate in cele ce urmeaza.

Oxidarea electrochimica sensibila a glucozei utilizand nanoparticule Ni-Co electrodepuse pe materiale carbonice

Acest obiectiv si-a propus scaderea limitei de detectie electrochimica a glucozei prin modificarea suprafetei electrodului, realizata prin electrodepunerea nanoparticulelor metalice de Ni-Co cu diferite marimi si distributii pe diferite materiale carbonice (grafene, fullerene si nanotuburi de carbon). In acest context, materialele carbonice functioneaza totodata si ca suport pentru depunerea nanoparticulelor metalice, influentand densitatea si dimensiunea acestora (Figura 58), pornind de la ipoteza ca particulele metalice se ancoreaza in mod preferential la nivelul situsurilor de inalta energie de pe suprafata carbonului. Densitatea acestor situsuri pe materialul suport influenteaza numarul particulelor de Ni-Co rezultate. De asemenea, prezenta defectelor si a gruparilor functionale (grupari -OH) de pe suprafata nanotuburilor de carbon, face ca aceste materiale sa devina suporturi promitatoare pentru procesul de nucleatie si crestere a nanostructurilor Ni-Co.

Studiul experimental derulat demonstreaza modul in care conditiile si parametrii de operare influenteaza morfologia si compozitia nanoparticulelor Ni-Co rezultate, care se reflecta apoi in activitatea electrochimica si activitatea electrocatalitica de detectie a glucozei (subfigurile din linia de jos a Figura 15).

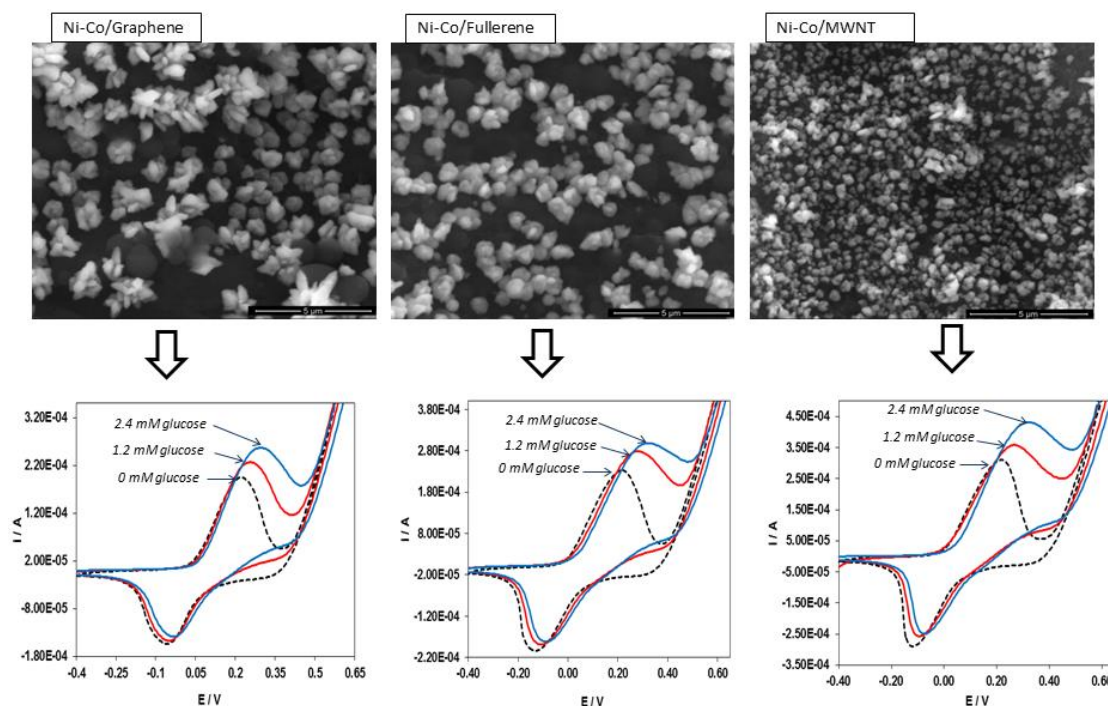


Figura 58. Morfologia si comportamentul electrochimic al depunerilor de Ni-Co pe electrozii destinati masurarii concentratiei de glucoza in mediile de cultura.

Rezultatele experimentale indica faptul ca electrozii modificati cu materialul compozit format din particule Ni-Co depuse electrochimic pe nanotuburile de carbon cu pereti multipli (MWNT) prezinta activitate electrocatalitica crescuta, atribuita cel mai probabil, densitatii mari de nanoparticule de Ni-Co depuse uniform pe nanotuburile de carbon care ofera o suprafata activa mare in comparatie cu grafenul si fullerena. Utilizand acesti electrozi (Ni-Co/MWNT) a fost posibila detectia electrochimica a glucozei, cu o sensibilitate ridicata de $1868 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, atingand o limita de detectie joasa, de $2.07 \mu\text{M}$ glucoza. Rezultatele obtinute ar putea avea un mare impact pentru dezvoltarea de noi senzori electrochimici pe baza de nanoparticule.¹³¹

Concluzii Generale

Au fost studiate, proiectate, obtinute si caracterizate sisteme de legare si transport la nanoscala a acizilor nucleici, apti a transfecta celule in cultura la rapoarte N/P favorabile. Randamentele de transfectie se situeaza la aceleasi valori, sau chiar usor peste cele raportate in literatura stiintifica. Sistemele ce au la baza (atelo)colagen, conjugate ale PEI si PEG cu ciclodextrina, fullerena C60 si squalena, precum si sistemele cu autoasamblare avute in vedere se dovedesc utile drept «unelte» in ingineria genica si medicina personalizata, prezentand functionalitate similara cu entitatile biologice pe care le mimeaza. De asemenea au fost obtinute rezultate notabile in sinteza si caracterizarea nanoparticulelor cu capacitate de raspuns la stimuli externi si in obtinerea si caracterizarea hidrogelurilor si a criogelurilor pe baza de atelocolagen si glicozamino-glicani, destinate realizarii substitutului matricei extracelulare. In etapa urmatoare de redulare a proiectului, aceste sisteme, precum si altele in curs de investigare, vor fi testate amplu, in vederea optimizarii caracteristicilor lor functionale, cu scopul cresterii randamentelor cu care asigura eliberarea de principii active si transfectarea in vitro si ex vivo a celulelor.

**Rezultatele științifice ale derulării etapei 2014
în cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028**

Sinoptic:

- lucrări științifice publicate: **21**;
- lucrări științifice acceptate pentru publicare: **3**;
- lucrări științifice trimise spre publicare: **3**;
- participări la manifestări științifice, prezentări orale și postere: **14**;
- cursuri / traininguri: **7**;
- actualizare pagina web: <http://www.intelcentru.ro/index-5-a.html>.

¹ <http://www.onlinetmd.com/top-ten-medical-device-technologies>

² G. David, Gh. Fundueanu, M. Pinteala, B. Minea, A. Dascalu, B. C. Simionescu, Polymer engineering for drug / gene delivery: from simple towards complex architectures and hybrid materials, *Pure Appl. Chem.* 86, Issue 11, (2014) 1621–1635.

³ F. N. Tebbe, R. L. Harlow, D. B. Chase, D. L. Thorn, G. C. Campbell Jr., J. C. Calabrese, N. Herron, R. J. Young Jr., E. Wasserman, Synthesis and Single-Crystal X-ray Structure of a Highly Symmetrical C₆₀ Derivative, C₆₀Br₂₄, *Science*, 1992, 822–825.

⁴ M. Pinteala, A. Dascalu, C. Ungureanu. Binding fullereneol C₆₀(OH)₂₄ to dsDNA, *International Journal of Nanomedicine*, 2009, 4, 193–199.

⁵ L.O. Husebo, B. Sitharaman, K. Furukawa, T. Kato, L.J. Wilson, Fullerenols Revisited as Stable Radical Anions, *Journal of American Chemical Society*, 2004, 126 (38), 12055–12064.

⁶ J. K. Oh, J. M. Park, Iron Oxide-based Superparamagnetic Polymeric Nanocomposites: Preparation and Biomedical Application, *Prog. Polym. Sci.* 36, 168–189 2011.

⁷ S. H. Yuk, K. S. Oh, S. H. Cho, B. S. Lee, S. Y. Kim, B. K. Kwak, K. Kim, I. C. Kwon, Glycol Chitosan/Heparin Immobilized Iron Oxide Nanoparticles with a Tumor-Targeting Characteristic for Magnetic Resonance Imaging, *Biomacromolecules* 12, 2335–2343, 2011.

⁸ N. Manolova, I. Rashkov, F. Beguin, H. van Damme, Amphiphilic derivatives of Fullerenes Formed by Polymer Modification, *J. Chem., Soc., Chem. Commun.*, 23 (1993), 1725–1727.

⁹ J. Shi, H. Zhang, L. Wang, L. Li, H. Wang, Z. Wang, Z. Li, C. Chen, L. Hou, C. Zhang, Z. Zhang, PEI-derivatized fullerene drug delivery using folate as a homing device targeting to tumor, *Biomaterials*, 34 (2013), 251–261.

¹⁰ M. Constantin, S. Bucatariu, V. Harabagiu, I. Popescu, P. Ascenzi, G. Fundueanu Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) pH/thermo-responsive porous hydrogels as self-regulated drug delivery system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 86–95, 2014.

¹¹ M. Constantin, S. Bucatariu, P. Ascenzi, B. C. Simionescu, G. Fundueanu Poly(NIPAAm-co-β-cyclodextrin) microgels with drug hosting and temperature-dependent delivery properties, *Reactive and Functional Polymers*, 84, 1–9, 2014.

¹² S. Bucatariu, G. Fundueanu, I. Prisacaru, M. Balan, I. Stoica, V. Harabagiu, M. Constantin Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) microgels as potential carrier for drug delivery, *Journal of Polymer Research*, 21, 580–591, 2014.

¹³ H. Hosseinkhani, T. Azzam, H. Kobayashi, Y. Hiraoka, H. Shimokawa, A. J. Domb, Y. Tabata, Combination of 3D tissue engineered scaffold and non-viral gene carrier enhance in vitro DNA expression of mesenchymal stem cells, *Biomaterials* 27 (2006) 4269–4278.

¹⁴ S. O'Rorke, M. Keeney, A. Pandit, Non-viral polyplexes: Scaffold mediated delivery for gene therapy, *Progr. Polym. Sci.* 35 (2010) 441–458.

¹⁵ H.-J. Park, F. Yang, S.-W. Cho, Nonviral delivery of genetic medicine for therapeutic angiogenesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 40–52.

¹⁶ L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, N. He, Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers, *Theranostics* 4 (2014) 240–255.-

¹⁷ L. De Laporte, J. Cruz Rea, L. D. Shea, Design of modular non-viral gene therapy vectors, *Biomaterials* 27 (2006) 947–954.

¹⁸ A. Martin-Herranz, A. Ahmad, H. M. Evans, K. Ewert, U. Schulze, C. R. Safinya, Surface functionalized cationic lipid-DNA complexes for gene delivery: PEGylated lamellar complexes exhibit distinct DNA interaction regimes, *Biophys. J.* 86 (2004) 1160–1168.

¹⁹ J. M. Dang, K. W. Leong, Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 487–499.

²⁰ Nitta SK, Numata K: Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1629–1654.

²¹ S. M. Dizaj, S. Jafari, A. Y. Khosroushahi, A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 252.

²² C. H. Lee, A. Singla, Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.* 221 (2001) 1–22.

²³ N. Kasoju, S. S. Ali, V. K. Dubey, U. Bora, Exploiting the Potential of Collagen as a Natural Biomaterial in Drug Delivery, *J. Proteins & Proteomics*, 1 (2010) 9–14

²⁴ A. Sano, M. Maeda, S. Nagahara, T. Ochiya, K. Honma, H. Itoh, T. Miyata, K. Fujioka Atelocollagen for protein and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55 (2003) 1651–1677.

²⁵ B. Rossler, J. Kreuter, D. Scherer, Collagen microparticles: preparation and properties. *J. Microencapsul.* 12 (1995) 49–57.

²⁶ P. K. Sehgal, A. Srinivasan, Collagen-coated microparticles in drug delivery, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, 6 (2009) 687–695.

²⁷ U. Shimanovich, G. J. L. Bernardes, T. P. J. Knowles, A. Cavaco-Paulo, Protein micro- and nano-capsules for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 1361–1371.

²⁸ P. Saccardo, A. Villaverde, N. González-Montalbán, Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 432–438.

²⁹ J. Sebag, Surgical anatomy of vitreous and the vitreo-retinal interface. In: *Clinical Ophthalmology*, W. Tasman and E. A. Jaeger (eds.), Philadelphia, PA: J. B. Lippincott (2007) vol. 6, chapter 51, pp. 1882–1960.

- ³⁰ J. T. Ochiya, Y. Takahama, S. Nagahara, Y. Sumita, A. Hisada, H. Itoh, New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat. Med.* 5 (1999) 707–710.
- ³¹ J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, S. Goldstein, Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat. Med.* 5 (1999) 753–759.
- ³² G. J. Angella, M. B. Sherwood, L. Balasubramanian, J. W. Doyle, M. F. Smith, G. van Setten, M. Goldstein, G. S. Schultz, Enhanced short-term plasmid transfection of filtration surgery tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000), 4158–4162.
- ³³ R. M. Capito, M. Spector Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering. *Gene Ther.* 14 (2007) 721–732.
- ³⁴ H. Cohen-Sacks, V. Elazar, J. Gao, A. Golomb, H. Adwan, N. Korchoy, Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices. *J. Control. Release* 95 (2004) 309–320.
- ³⁵ X. Jin, L. Mei, C. Song, L. Liu, X. Leng, H. Sun Immobilization of plasmid DNA on an anti-DNA antibody modified coronary stent for intravascular site-specific gene therapy. *J. Gene Med.* 10 (2008) 421–429.
- ³⁶ F. Scherer, U. Schillinger, U. Putz, A. Stemberger, C. Plank Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 4 (2002) 634–643.
- ³⁷ M. Murata, B.Z. Huang, T. Shibata, S. Imai, N. Nagai, M. Arisue, Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 28 (1999) 232–237.
- ³⁸ G. David, B. C. Simionescu, S. Maier, C. Balhui - Micro-/nanostructured polymeric materials: Poly(ϵ -caprolactone) crosslinked collagen sponges. – *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 6 (2011) 1575–1585.
- ³⁹ G. David, M. Cristea, C. Balhui, D. Timpu, F. Doroftei, B. C. Simionescu - Effect of Crosslinking Methods on Structure and Properties of Poly(ϵ -caprolactone) Stabilized Hydrogels Containing Biopolymers *Biomacromolecules* 13 (2012) 2263–2272.
- ⁴⁰ B. C. Simionescu, A. Neamtu, C. Balhui, M. Danciu, D. Ivanov, G. David Macroporous structures based on biodegradable polymers-candidates for biomedical application, *Biomed. Mater. Res. A.* 101 (2013) 2689–2698.
- ⁴¹ C. Balhui, G. David, M. Drobota, V. E. Musteata, Dielectric Characterization of Biopolymer /Poly(ϵ -Caprolactone) Hydrogels, *Int. J. Polym. Anal. Ch.* 19 (2014) 234–244.
- ⁴² R. Diaconescu, B. C. Simionescu, G. David, Control and prediction of degradation of biopolymer based hydrogels with poly(ϵ -caprolactone) subunits, *Int. J. Biol. Macromol.* 71 (2014) 147–154.
- ⁴³ V. Chak, D. Kumar, S. Visht. A Review on Collagen Based Drug Delivery Systems. *IJTP (International Journal of Pharmacy Teaching & Practices)* 4 (2013) 811–820.
- ⁴⁴ C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomed.-Nanotechnol.* 2 (2006) 8– 21.
- ⁴⁵ W. Lohcharoenkal, L. Wang, Y. C. Chen, Y. Rojanasakul, Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy, *BioMed Res. Int.* (2014) Article ID 180549, 12 pages
- ⁴⁶ D. R. Link, E. Grasland-Mongrain, A. Duri, F. Sarrazin, Z. Cheng, G. Cristobal, M. Marquez and D. A. Weitz, Electric Control of Droplets in Microfluidic Devices, *Angew. Chem., Int. Ed.* 45 (2006) 2556–2560.
- ⁴⁷ E. Rondeau, J. J. Cooper-White, Biopolymer microparticle and nanoparticle formation within a microfluidic device. *Langmuir* 24 (2008) 6937–6945.
- ⁴⁸ [47] K. K. Kim, D. W. Pack, Microspheres for Drug Delivery, in *BIOMEMS and Biomedical Nanotechnology*, vol. I. Biological and Biomedical Nanotechnology, M. Ferrari, A. P. Lee, J. Lee (eds), Springer e-books (2006) Chap. 2 pp 19–50/pp 28.
- ⁴⁹ E. Nogueira, A. Loureiro, P. Nogueira, J. Freitas, C. R. Almeida, J. Harmark, H. Hebert, A. Moreira, A. M. Carmo, A. Preto, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo, Liposome and protein based stealth nanoparticles, *Faraday Discuss.* 166 (2013) 417–429.
- ⁵⁰ M. Papi, V. Palmieri, G. Maulucci, G. Arcovito, E. Greco, G. Quintiliani, M. Fraziano, M. De Spirito, Controlled self assembly of collagen nanoparticle, *J. Nanopart. Res.* 13 (2011) 6141–6147.
- ⁵¹ V. Singh, F. Y. Xu, S. V. Sreenivasan, Nanoimprint lithography formation of functional nanoparticles using dual release layers, *US 2012/0114559 A1*, May 10, 2012.
- ⁵² B. P. Chan, C. M. Chan, K. F. So, Collagen-based microspheres and methods of preparation and uses thereof, *US 20080317866*, 12/25/2008.
- ⁵³ M. Matsusaki, M. Akashi, Functional multilayered capsules for targeting and local drug delivery, *Expert opin. drug del.* 6 (2009) 1207–1217.
- ⁵⁴ R. Suto and P. Srivastava, A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides, *Science* 269 (1995) 269 1585–1588.
- ⁵⁵ N. Sanvicens, M. Pilar Marco, Multifunctional nanoparticles –properties and prospects for their use in human medicine, *Trends Biotechnol.*, 26 (2008) 425–433.
- ⁵⁶ (a) L. Pastorino, E. Erokhina, V. Erokhin, Smart Nanoengineered Polymeric Capsules as Ideal Pharmaceutical Carriers, *Curr. Org. Chem.* 17 (2013) 58–64; (b) L. Pastorino, S. Erokhina, F. C. Soumetz, P. Bianchini, O. Konovalov, A. Diaspro, C. Ruggiero, V. Erokhin, Collagen containing microcapsules: smart containers for disease controlled therapy, *J. Colloid Interf. Sci.* 357 (2011) 56–62; (c) L. Pastorino, S. Erokhina, O. Konovalov, P. Bianchini, A. Diaspro, C. Ruggiero, Permeability Variation Study in Collagen-Based Polymeric Capsules, *BioNanoScience* 1 (2011) 192–197; (e) N. Habibi, L. Pastorino, O. H. Sandoval, C. Ruggiero, Polyelectrolyte based molecular carriers: The role of self-assembled proteins in permeability properties, *J. Biomater. Appl.* 28 (2013) 262–269.
- ⁵⁷ G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: Toward layered multicomposites. *Science* 277 (1997) 1232–1237.
- ⁵⁸ A. P. R. Johnston, C. Cortez, A. S. Angelatos, F. Caruso, Layer-by-layer engineered capsules and their applications, *Curr. Opin. Colloid In.* 11 (2006) 203–209.

- ⁵⁹ Lvov, Y. Polyion/protein nanostructures. In A. Hubbard (Ed.), *Encyclopedia of surface and colloid science*, Marcel Dekker, New York, (2002) 4162–4171.
- ⁶⁰ J. F. Leary, T. W. Prow, Molecular programming of nanoparticle systems for an ordered and controlled sequence of events for gene- drug delivery, US 2007/0190155 A1, 16 Aug 2007.
- ⁶¹ T. Kojima, S. Kojima, H. Yoshikawa, T. Kazumori, T. Kaneko, C. Kaise, Cosmetic base comprising collagen-modified liposome and skin cosmetic containing the same US 2011/0081402 A1, Apr 7, 2011.
- ⁶² E. Rondeau, J. J. Cooper-White, Formation of multilayered biopolymer microcapsules and microparticles in a multiphase microfluidic flow, *BIOMICROFLUIDICS* 6, 024125 (2012) 1–16.
- ⁶³ D. M. Suflet, I. Popescu, I. M. Pelin, M. T. Nistor, G. E. Hitruc, F. Doroftei, G. Fundueanu, Preparation and characterization of microcapsules based on phosphorylated curdlan and hydrolyzed collagen, *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 6 (2011) 653 – 661.
- ⁶⁴ N. Kamaly, G. Fredman, M. Subramanian, S. Gadde, A. Pesic, L. Cheung, Z. A. Fayad, R. Langer, I. Tabas, O. C. Farokhzad, Development and in vivo efficacy of targeted polymeric inflammation-resolving nanoparticles, *PNAS* 110 (2013) 6506–6511.
- ⁶⁵ W. B. Liechty, N. A. Peppas, Expert Opinion: Responsive Polymer Nanoparticles in Cancer Therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (2012) 241–246.
- ⁶⁶ S. Maier, V. Maier, I. Buciscanu, Novel procedure for large-scale purification of atelocollagen, by selective precipitation, *J.A.L.C.A.* 105 (2010) 1–8.
- ⁶⁷ a) G. M. Mrevlishvili, D. V. Svintradze, Complex between triple helix of collagen and double helix of DNA in aqueous solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 35 (2005) 243–245; b) R. M. Pidaparti, D. V. Svintradze, Y. Feng Shan, H. Yokota; Optimization of hydrogen bonds for combined DNA/collagen complex, *J. Theor. Biol.* 256 (2009) 149–156.
- ⁶⁸ S. Nimesh, *Gene therapy: Potential Applications of Nanotechnology*, 1st Edition, chap 11, Atelocollagen, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK (2013) p 225–235.
- ⁶⁹ H. Cohen-Sacks, V. Elazar, J. Gao, A. Golomb, H. Adwan, N. Korchov, R. J. Levy, M. R. Berger, G. Golomb, Delivery and expression of pDNA embedded in collagen matrices, *J. Control. Release* 95 (2004) 309– 320.
- ⁷⁰ T. Ochiya, S. Nagahara, A. Sano, H. Itoh, M. Terada, *Biomaterials for Gene Delivery: Atelocollagen-mediated Controlled Release of Molecular Medicines*, *Curr. Gene Ther.* 1 (2001) 31–52.
- ⁷¹ K. Honma, T. Ochiya, S. Nagahara, A. Sano, H. Yamamoto, K. Hirai, Y. Aso, M. Terada, Atelocollagen-Based Gene Transfer in Cells Allows High-Throughput Screening of Gene Functions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2002) 1075–1081.
- ⁷² J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet. Med.-Czech.* 53 (2008) 397–411.
- ⁷³ J. A. Burdick, G. D. Prestwich, Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Adv. Mater.* 23(2011) H41–56.
- ⁷⁴ M. Rinaudo, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polym. Int.* 57 (2008) 397–430.
- ⁷⁵ H. Zhao, T. Tanaka, Z. Darzynkiewicz, Protective effect of hyaluronate on oxidative DNA damage in WI-38 and A549 cells, *Int. J. Oncol.* 32 (2008) 1159–1167.
- ⁷⁶ W. Khan, H. Hosseinkhani, D. Ickowicz, P.-D. Hong, D.-S. Yu, A. J. Domb, Polysaccharide gene transfection agents, *Acta Biomater.* 8 (2012) 4224–4232.
- ⁷⁷ Yao J, Fan Y, Du R, Zhou J, Lu Y, Wang W. Amphoteric hyaluronic acid derivative for targeting gene delivery. *Biomaterials* 31 (2010) 9357–9365.
- ⁷⁸ M. de la Fuente, B. Seijo, M. J. Alonso, Novel hyaluronic acid–chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 49 (2008) 2016–2024.
- ⁷⁹ Y. Takei, A. Maruyama, A. Ferdous, Y. Nishimura, S. Kawano, K. Ikejima, et al. Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan–glycocalyx. *FASEB J* 18 (2004) 699–701.
- ⁸⁰ Y. H. Yun, D. J. Goetz, P. Yellen, W. Chen, Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials* 25 (2004) 147–157.
- ⁸¹ S. Mahor, E. Collin, B. C. Dash, A. Pandit, Controlled release of plasmid DNA from hyaluronan nanoparticles. *Curr. Drug Deliv.* 8 (2011) 354–362.
- ⁸² T. Segura, P. H. Chung, L. D. Shea, DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach, *Biomaterials* 26 (2005) 1575–1584.
- ⁸³ L. Lapcik, L. L. Lapcik, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabrechek, Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2663–2684.
- ⁸⁴ N. Barbani, L. Lazzeri, C. Cristallini, M. G. Cascone, G. Polacco, G. Pizzirani, Bioartificial materials based on blends of collagen and poly(acrylic acid) *J. Appl. Polym. Sci.* 72 (1999) 971–976.
- ⁸⁵ J. Zhang, B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.-C. Voegel, P. Lavalle, Natural polyelectrolyte films based on layer-by-layer deposition of collagen and hyaluronic acid, *Biomaterials* 26 (2005) 3353–3361.
- ⁸⁶ G. G. S. Grant, D. S. Koktysh, B. Yun, R. L. Matts, N. A. Kotov. Layer-by-layer assembly of collagen thin films: controlled thickness and biocompatibility. *Biomed. Microdevices* 3 (2001) 301–306.
- ⁸⁷ H. Lee, Y. Jeong, T. G. Park, Shell Cross-Linked Hyaluronic Acid/Polylysine Layer-by-Layer Polyelectrolyte Microcapsules Prepared by Removal of Reducible Hyaluronic Acid Microgel Cores, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3705–3711.
- ⁸⁸ F. Sousa, O. Kreft, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, V. Kokol, Biocatalytic response of multi-layer assembled collagen/hyaluronic acid nanoengineered capsules, *J. Microencapsul.* 14; 31 (2014):270–276.
- ⁸⁹ D. N. Nguyen, J. J. Green, J. M. Chan, R. Langer, D. G. Anderson, Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination, *Adv. Mater.* 21 (2009) 847–867.

- ⁹⁰ U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, A. Göpferich, Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 247–266.
- ⁹¹ C.-S. Cho, Design and Development of Degradable Polyethylenimines for Delivery of DNA and Small Interfering RNA: An Updated Review, *ISRN (International Scholarly Research Network) Materials Science* (2012) Article ID 798247, 24 pag.
- ⁹² M. Jager, Stephanie Schubert, Sofia Ochrimenko, Dagmar Fischer, Ulrich S. Schubert, Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4755–4767.
- ⁹³ M. Karimi, P. Avci, R. Mobasser, M. Hamblin, H. Naderi-Manesh, The novel albumin–chitosan core–shell nanoparticles for gene delivery: preparation, optimization and cell uptake investigation. *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1–14.
- ⁹⁴ A. Hornito, L. J. Weber, Skin penetrating property of drug dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and other vehicles, *Life Sci.* 3 (1964) 1389.
- ⁹⁵ C. Sanmartín–Suárez, R. Soto-Otero, I. Sánchez-Sellero, E. Méndez-Álvarez, Antioxidant properties of dimethylsulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants, *J. Pharmacol. Toxicol.* 63 (2011) 209–215.
- ⁹⁶ G. Kashino, Y. Liu, M. Suzuki, S.-I. Masunaga, Y. Kinashi, K. Ono, K. Tano, M. Watanabe An alternative mechanism for Radioprotection by Dimethyl Sulfoxide, Possible Facilitation of DNA Double Strand Break Repair *J. Radiat. Res.* 51, (2010) 733–740.
- ⁹⁷ M. Beljanski, The regulation of DNA replication and transcription, in chapter 5. Carcinogens in DNA replication and release of specific information, Demos Medical Publishing, 2013, p10–12.
- ⁹⁸ N. C. Santos, J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, C. Saldanha. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1035–1041.
- ⁹⁹ P. Windrum, T. C. Morris, M. B. Drake, D. Niederwieser, T. Ruutu, EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee, Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres, *Bone Marrow Transpl.* 36 (2005) 601–603.
- ¹⁰⁰ D. Fujimoto, K. Akiba, N. Nakamura, Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 (1977) 1124–1129.
- ¹⁰¹ B. G. Frushour, J. L. Koenig, Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* 14 (1975) 379–391.
- ¹⁰² H. G. Edwards, D. W. Farwell, J. M. Holder, E. E. Lawson, Fourier-transform Raman spectra of ivory. III. Identification of mammalian specimens. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 53A (1997) 2403–2409.
- ¹⁰³ K. J. Payne, A. Veis, Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers* 27 (1988) 1749–1760.
- ¹⁰⁴ D. I. Fan, B. Wu, Z. Xu, Q. Gu, Determination of hyaluronan by spectroscopic methods. *J. Wuhan Univ. Technol.- Mater. Sci. Ed.* 21 (2006) 32–34.
- ¹⁰⁵ a) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 151–160; b) Constitutional Dynamic Chemistry, *Top. Curr. Chem.* (Ed.: M. Barboiu) 2012, Springer, Berlin; c) M. Barboiu, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 5201–5206; d) F. Dumitru, Y. M. Legrand, A. van der Lee, M. Barboiu, *Chem. Commun.* 2009, 2667–2669.
- ¹⁰⁶ a) J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* 2013, 125, 2906–2921; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 2836–2850; b) M. Barboiu, *Chem. Commun.* 2010, 46, 7466–7476; c) E. Moulin, G. Cormos, N. Giuseppone, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 1031–1049; d) N. Giuseppone, *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 2178–2188; e) M. Barboiu, M. Ruben, G. Blasen, N. Kyritsakas, E. Chacko, M. Dutta, O. Radekovich, K. Lenton, D. J. R. Brook, J.-M. Lehn, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006, 784–789; f) E. Busseron, Y. Ruff, E. Moulin, N. Giuseppone, *Nanoscale* 2013, 5, 7098–7140.
- ¹⁰⁷ C. Arnal-H_rault, A. Pasc-Banu, M. Barboiu, M. Michau, A. van der Lee, *Angew. Chem.* 2007, 119, 4346–4350; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 4268–4272; b) C. Arnal-H_rault, M. Barboiu, A. Pasc, M. Michau, P. Perriat, A. van der Lee, *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 6792–6800; c) M. Michau, M. Barboiu, R. Caraballo, C. Arnal-H_rault, P. Perriat, A. van der Lee, A. Pasc, *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 1776–1783.
- ¹⁰⁸ S. Kumar, J. Koh, *Int. J. Biol. Macromol.* 2012, 51, 1167–1172.
- ¹⁰⁹ S. Lin-Gibson, H. J. Walls, S. B. Kennedy, E. R. Welsh, *Carbohydr. Polym.* 2003, 54, 193–199.
- ¹¹⁰ L. Marin, S. Moraru, M. C. Popescu, A. Nicolescu, C. Zgarden, B. C. Simionescu, M. Barboiu, Out-of-Water Constitutional Self-Organization of Chitosan–Cinnamaldehyde Dynagels, *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 4814–4821.
- ¹¹¹ J. F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Munoz, N. Martin, J. Rojo, M. Sanchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* 2010, 46, 3860–3862.
- ¹¹² M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J. F. Nierengarten, J. Taganna, J. Bouckaert, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* 2011, 47, 1321–1323;
- ¹¹³ M. Barboiu, Z. Mouline, M. Silion, E. Licsandru, B. C. Simionescu, E. Mahon, M. Pinteala, Multivalent Recognition of Concanavalin A by {Mo132} Glyconanocapsules—Toward Biomimetic Hybrid Multilayers, *Chem. Eur. J.* 2014, 20, 6678–6683.
- ¹¹⁴ C. Huang, K. G. Neoh, L. Wang, E. T. Kang, B. Shuter, Magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging: modulation of macrophage uptake by controlled PEGylation of the surface coating, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 8512–8520.
- ¹¹⁵ Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, A. B. Yu, Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 1027–1040.
- ¹¹⁶ S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, M. Mahmoudi, Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 166 (2011) 8–23.
- ¹¹⁷ M. Hofmann-Amttenbrink, B. von Rechenberg, H. Hofmann, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications, in: M. T. Chan. (Ed.), *Nanostructured Materials for Biomedical Applications*. Transworld Research Network, Kerala 2009, chapter 9, pp. 119–149.

- ¹¹⁸ D. Horák, B. Rittich, A. Španová, M. J. Beneš, Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics, *Polymer* 46 (2005) 245-1255.
- ¹¹⁹ A. Kumar Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.
- ¹²⁰ T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system, *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 483-496.
- ¹²¹ C. M. Uritu, C.D. VARGANICI, I. Ursu, A. Coroaba, A. Nicolescu, A.I. Dascalu, D. Peptanariu, D.Stan, C. A. Constantinescu, V. Simion, M. Calin, S. S. Maier, M. Pinteala, M. Barboiu, Hybrid Fullerene Conjugates as Vectors for DNA Cell-Delivery. Trimisa spre publicare ACS Nano ID: nn-2014-06698d
- ¹²² N. Manolova N, I. Rashkov, F. Beguin, H. van Damme, Amphiphilic derivatives of Fullerenes Formed by Polymer Modification, *J. Chem., Soc., Chem. Commun.*, 23 (1993), 1725-1727.
- ¹²³ B. Lu, X. Xu, X. Z. Zhang, S.X. Cheng, Low Molecular Weight Polyethylenimine Grafted N-Maleated Chitosan for Gene Delivery: Properties and In Vitro Transfection Studies, *Biomacromolecules*, 9 (2008), 2594-2600.
- ¹²⁴ R. Ardeleanu, M. Calin, S.S. Maier, C.M. Uritu, N. Marangoci, A. Fifere, M. Sillion, A. Nicolescu, L. Ursu, F. Doroftei, A. Coroaba, D. Peptanariu, D. Stan, C.A. Constantinescu, V. Simion, M. Pinteala. Transfection-capable PEGylated-cyclodextrin-containing polycationic nanovectors. A new synthesis pathway. Pentru trimis spre publicare Nanotechnology.
- ¹²⁵ W.G. Skene, J.M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 8270-8275.
- ¹²⁶ J. M. Lehn. *Prog. Polym. Sci.* 2005, 30, 814–831
- ¹²⁷ J. M. Lehn *Supramolecular chemistry: concepts and perspectives*. Weinheim: VCH; 1995.
- ¹²⁸ J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Voegtle, J. M. Lehn. *Comprehensive supramolecular chemistry*. Oxford: Pergamon; 1996.
- ¹²⁹ R. Catana, M. Barboiu, I. Moleavin, L. Clima, A. Rotaru, E.E. Ursu, M. Pinteala. Dynamic Constitutional Frameworks for DNA Biomimetic Recognition. Trimisa spre publicare *Chem. Commun.*
- ¹³⁰ Franco Dosio, L. Harivardhan Reddy, Annalisa Ferrero, Barbara Stella, Luigi Cattel, and Patrick Couvreur. Novel Nanoassemblies Composed of Squalenoyl-Paclitaxel Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation. *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 1349–1361.
- ¹³¹ A. Arvinte, F. Doroftei, M. Pinteala, Comparative electrodeposition of Ni-Co metal nanoparticles on carbon materials and their efficiency in electrochemical oxidation of glucose. Trimis spre publicare la RSC *Advances*.

RAPORT STIINTIFIC

pentru faza 2015, unica, a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028

Denumirea proiectului: **SISTEME DE INSPIRATIE BIOLOGICA PENTRU ENTITATI PROIECTATE STRUCTURAL SI FUNCTIONAL**

Coordonator: **INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARA „PETRU PONI” DIN IASI**

Director de proiect: **DR. MARIANA PINTEALA**

ADRESA WEB: http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/
http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/ro/index.html

Planul de realizare a proiectului pentru faza 2015 si angajamentele initiale privind diseminarea

Anul	Etapa	Obiective	Activitati	Rezultate livrate per etapa
2015	Unica	1. Realizarea de matrice macromoleculare biomimetice, active in transfectie	1.1. Realizarea si testarea de hidrogeluri structurate, apte a stoca si vehicula acizi nucleici	10 lucrari ISI 10 participari la manifestari stiintifice
		2. Evaluarea abilitatii de transfectie a sistemelor dezvoltate in cadrul proiectului	2.1. Determinarea capacitatii de complexare a acizilor nucleici cu vectorii non-virali	
			2.2. Testarea sistemelor de transfectie asupra culturilor celulare	
		3. Elaborarea unor protocoale de testare electrochimica a sistemelor la nanoscara, utile in transfectie	3.1. Cuantificarea electrochimica a prezentei acizilor nucleici in sistemele de transfectie	
		4. Realizarea de matrice macromoleculare biomimetice, active in transfectie (initiere obiectiv prevazut in etapa 2016)	4.1. Obtinerea si caracteriza-rea unor compozite biomimetice injectabile	
			4.1.1. Realizarea si caracteri-zarea de nanoparticule sensibile la pH / temperatura, pe baza de derivati de pullulan amfifili cationici	
			4.1.2. Sinteza si caracterizarea de copolimeri de N-izopropil-acrilamida si acid maleic, capabili de autoasamblare / disociere functie de pH si/sau temperatura, cu rol de nano-containere in aplicatii bio-medicale	

Preambul

În scopuri clinice, corectarea prin transfecție a unor abateri sau carente cu origine genetică ale funcționalității celulelor se practică în două variante:

- (i) – prin transferul către țesuturi a cargocomplexilor cu rol de vectori genici non-virali, sub medierea fluxului sanguin și apoi a transportului activ prin țesuturi;
- (ii) – prin transferul localizat, activat și temporizat într-o matrice gazdă a cargocomplexilor, implantată ori injectată, și țesuturile imediat învecinate.

Esențiale pentru prima variantă sunt proiectarea și sinteza carrierilor, urmată de „încarcarea” acestora cu acizii nucleici. În această variantă, carrierii și apoi cargo-compleksii utilizați trebuie să posede stabilitate în torrentul sanguin, să fie lipsiți de toxicitate locală și sistemică și să poată eluda mecanismele apărării imunitare.

În cazul celei de-a doua variante, cargocompleksii (alcatuiți din carrieri unitari, cu existența moleculară individuală, ce s-au atașat acizilor nucleici, „învelindu-i” pe aceștia din urmă în măsura suficientă pentru a le diminua sarcina negativă) sunt înglobați și reținuți fizic într-o matrice macromoleculară cu morfologie proprie. Odată stocați, cargocompleksii trebuie să rămână funcționali și mobili pe un orizont de timp suficient de lung, urmând să difuzeze din matrice după ce aceasta a fost implantată ori injectată într-un mediu tisular. Difuzia trebuie să se realizeze fără pierderea integrității cargocomplexilor (respectiv fără ca acizii nucleici să se lărgeze accidental, ori să fie cedati sub solicitările fizico-chimice ale mediului tisular), aceștia urmând să fie apoi preluați în mod selectiv de către celulele țintite.

Caracteristica critică a cargocomplexilor vehiculabili de către fluxul sanguin constă în abilitatea lor de a rămâne nedetecțati de către sistemul imunitar (respectiv să fie „invizibili” celulelor imunocompetente și „neatractivi” pentru anticorpi). Această caracteristică poate fi conferită prin „dotarea” carrierilor cu tronsoane moleculare imunoindiferente, alături de tronsoane implicate în recunoașterea receptorilor celulari specifici, dar și în penetrarea membranelor celulare.

Cargocompleksii transferabili prin medierea unor matrice macromoleculare trebuie să posede, în plus față de cei anterior menționați, abilitatea de a migra pasiv (doar sub forța motrice de factură fizico-chimică) prin medii aglomerate, ce nu pot fi prezumate ca fiind complet inerte. În acest scop, carrierii destinați realizării acestui tip de cargocompleksi trebuie dotați (prin proiectarea moleculei lor) cu domenii catenare amfifile (ionizabile pe o plajă largă a încărcării electrice) și amfipatice (afine diferentiat față de specii sau tronsoane moleculare cu hidrofilie antagonică).

Matricele macromoleculare destinate sistemelor implantabile / injectabile în țesuturi, sisteme care urmează să asigure efectele specifice transfecției, trebuie și ele proiectate astfel încât să fie compatibile atât cu cargocompleksii, cât și cu țesuturile vii, aflate în stare fiziologică, ori patologică. În acest sens, proiectarea ține cont de principiile ingineriei tisulare, cărora li se adaugă doar restricții privind cvasi-inertia matricelor în raport cu cargocompleksii.

Etapa 2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 este dedicată studiului și dezvoltării de sisteme destinate transfecției mediate de către matrice macromoleculare, implantate ori injectate în țesuturi. În acest sens, au fost obținuți și caracterizați carrieri cu amfipatie controlată, apti a se mentine activi în medii aglomerate macromoleculare. De asemenea, au fost realizate și caracterizate structuri și compozite macromoleculare (inclusiv mixte, anorganic-organice) utilizabile drept gaze temporare ale cargocomplexilor.

Obiectivul 1. REALIZAREA DE MATRICI MACROMOLECULARE BIOMIMETICE, ACTIVE IN TRANSFECTIE

Una dintre directiile de cercetare cele mai dinamice vizeaza realizarea de biocompozite mixte biomimetice, care sa combine caracteristicile biopolimerilor (biocompatibilitate, biodegradabilitate, bioactivitate) cu proprietatile de rezistenta si prelucrabilitate specifice polimerilor sintetici, in scopul realizarii de materiale regenerative complexe, asa cum sunt cele necesare medicinei personalizate [1]. Din aceasta categorie fac parte si sistemele de transfectie cu morfologie matriciala, care integreaza matrice biopolimerice tridimensionale si poliplecsi, cu sanse de aplicare la nivel clinic [2]. Principalele avantaje ale acestor sisteme sunt:

- abilitatea de a proteja cargocomplexii incarcati cu acizi nucleici, pe durata tranzitului prin sistemul circulator;
- posibilitatea de a controla viteza de eliberare a materialului genetic, precum si viteza de degradare a matricei suport;
- posibilitatea de proiectare optima, la scara moleculara, a matricelor;
- abilitatea de a evita unele dintre barierele intra- si extra-celulare in calea transfectiei, chiar in contextul renuntarii la o serie de etape de sinteza dedicate asigurarii invingerii respectivelor bariere, permitand astfel simplificarea si facilitarea fabricarii sistemelor de transfectie;
- posibilitatea de crestere a eficientei transfectiei prin metode simple, fapt care eficientizeaza transpunerea la nivel clinic a tehnicilor de transfectie;
- accelerarea etapelor premergatoare implementarii vectorilor non-virali la nivel clinic.

Adesea, aceste sisteme complexe de transfectie au la baza colagenul, un compus natural provenit din surse regenerabile, folosit pe scara larga in domeniul biomedical, atat in medicina regenerativa, cat si in industria farmaceutica. Sistemele complexe bazate pe matrice colagenice sunt folosite cu succes in regenerarea tesuturilor [3, 4]. In acest gen de aplicatii, matricea trebuie sa prezinte proprietati fizico-mecanice si biologice similare tesutului in care urmeaza a se integra. Cerintele minimale impuse, in acest sens, matricelor, sunt urmatoarele [5, 6]:

- sa promoveze interactiuni sinergetice intre material si tesutul biologic;
- sa asigure atasarea, diferentierea si multiplicarea celulara prin intermediul functionalizarii adecvate a suprafetelor si interfetelor;
- sa prezinte o morfologie adecvata (structura poroasa cu pori interconectati) pentru asigurarea fluxurilor metabolice (alimentarea cu nutrienti si eliminarea reziduurilor), permitand astfel proliferarea celulara;
- sa asigure o viteza de biodegradare cat mai apropiata de viteza de regenerare a tesutului biologic, pentru a nu genera goluri in tesut (atunci cand degradarea este prea rapida) si pentru a nu impiedica dezvoltarea normala a tesutului (atunci cand degradarea este prea lenta);
- sa determine efecte inflamatorii si/sau toxice minime, in limitele acceptabile dezvoltarii normale a tesutului.

Pentru a genera matricele in cauza, se pot utiliza structuri tridimensionale preformate, sau se poate apela la sisteme injectabile, cu abilitati de autoasamblare *in situ*, apte a se adapta dinamic la spatialitatea zonei in care transfectia urmeaza a se derula.

Combinarea strategiilor specifice ingineriei tisulare si transfectiei genice este posibila prin incorporarea vectorilor non-virali in matrice tridimensionale tip scaffold, pentru asigurarea eliberarii localizate si temporizate a principiilor active [1, 2]. Date recente evidentiaza superioritatea in transfectie a unor astfel de sisteme complexe, pe baza de lipide sau de gelatina, sub forma nanoparticulata, incorporate intr-o matrice de colagen si glicozaminoglicani, in regenerarea cartilajului articular [7].

În acest context, în cadrul etapei 2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028, s-a abordat realizarea componentelor intermediare destinate unui sistem complex de transfecție, respectiv:

- A. - obținerea de nano-hidroxiapatită funcționalizată, utilizabilă în scopul conferirii caracteristicilor impuse matricei tridimensionale (rezistența mecanică, viteza controlată de biodegradare), dar și pentru a facilita transfecția, *per se*, sau prin favorizarea reținerii cargocomplexilor încărcați cu acizi nucleici;
- B. - efectuarea de teste preliminare privind includerea nano-hidroxiapatitei funcționalizate în matrice tridimensionale biomimetice macroporoase hibride, pe baza de biomacromolecule și polimeri sintetici;
- C. - prepararea și caracterizarea unor nanocompozite acetat de celuloză/compusi anorganici nanoparticulați.

A. Obținerea nano-hidroxiapatitei funcționalizate

A1. Generalități

Fosfații de calciu sunt compusi minerali cu un rol esențial în sistemele biologice, majoritatea tesuturilor dure din organismul vertebratelor incluzând în compoziția lor mari cantități de astfel de minerale [8]. Dintre toate tipurile sintetizabile de fosfați de calciu, hidroxiapatita (HAp) este compusul cu structură cea mai apropiată de speciile minerale biologice (asa-numită bioapatită). Din acest motiv, hidroxiapatita asigură o bună bio-compatibilitate și un potențial ridicat în osteogeneză [9]. Ea este utilizată frecvent în regenerarea osoasă, pentru biocompatibilizarea protezelor metalice ori polimerice, pentru realizarea de materiale de uz stomatologic, dar și drept component în sisteme cu eliberare controlată a principiilor farmacologic-active, ori în sisteme complexe de inducere a transfecției [10]. Deși poate dobândi un comportament ideal *in vivo*, HAp are proprietăți mecanice slabe (rezistență scăzută la oboseală și la impact). Caracteristicile HAp pot fi valorificate însă atunci când aceasta este inclusă în materiale compozite, sau în sisteme cu funcționalitate complexă.

Există două clase de aplicații biomedicale în care fosfații de calciu joacă un rol de neocolit:

- acoperirea suprafețelor implanturilor metalice, pentru biocompatibilizarea lor suplimentară și centrul facilitării interacțiunii lor cu tesuturile vii;
- realizarea de compozități biodegradabile / bioerodabile / bioresorbabile, solide sau injectabile, destinate regenerării locale a tesuturilor osoase și/sau eliberării de principii active [10, 11].

În vederea creșterii performanțelor acestor clase de aplicații, dar și pentru extinderea gamei de utilizări, s-au dezvoltat tehnici de obținere a formelor nanoparticulate de HAp [12]. Structura, forma și proprietățile HAp pot fi modificate atât prin modificarea metodelor de obținere, cât și prin varierea parametrilor reacțiilor implicate (pH, temperatură, durată). Uzual, HAp se sintetizează prin metoda precipitării, metoda sol-gel, metoda hidrotermală, metoda în emulsie și metoda biomimetică. Metodele „umede” sunt cel mai frecvent utilizate, deoarece sunt cele mai simple, iar condițiile de reacție sunt ușor și exact controlabile. Metoda sol-gel furnizează particule de HAp cu cele mai bune performanțe la interfatarea lor cu osul. Dezavantajul său este necesitatea aplicării unei calcinări la final, la temperaturi de circa 900 °C, în vederea asigurării unei purități avansate a HAp [13]. Metoda hidrotermală permite, în schimb, cristalizarea HAp direct din soluție, la temperaturi și presiuni ridicate. Metoda precipitării umede este cea mai simplă și conduce la cantități mari de HAp. Ea nu necesită utilizarea de solvenți organici și permite lucrul cu o mare varietate de precursori. Câteva dintre reacțiile frecvent utilizate pentru precipitarea umedă sunt prezentate mai jos.

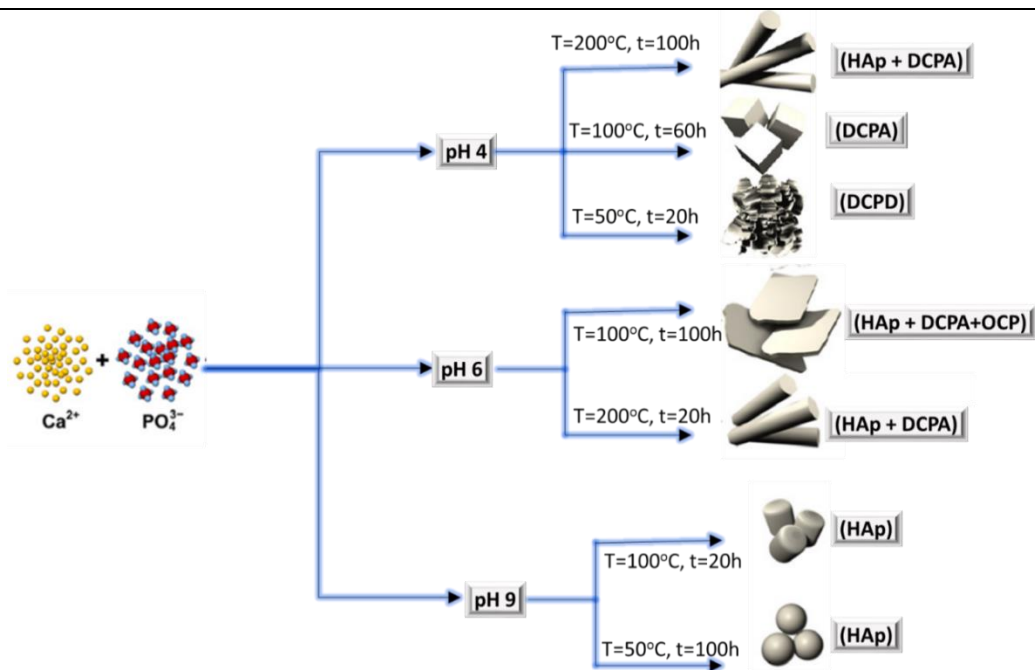
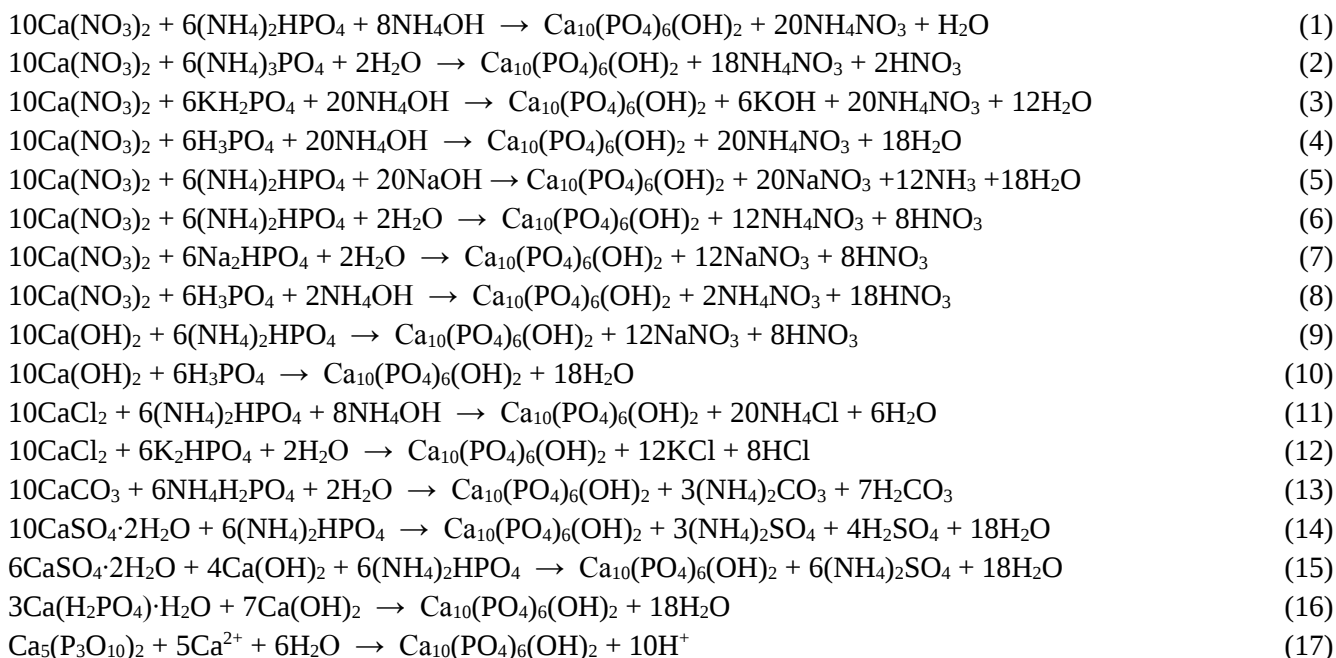


Figura 1. Varietati compositionale si morfologice ale particulelor de fosfati de calciu obtinuti prin metoda precipitarii umede, functie de conditiile de reactie [14].

Compozitia chimica si structura morfologica a fosfatilor de calciu sintetizati chimic depinde in mare masura de trei parametri ai proceselor de sinteza, respectiv de pH-ul la care are loc precipitarea, de temperatura de lucru (eventual sub presiune) si de durata de mentinere a mediului de reactie la temperatura de lucru [14 - 16].

Determinarea tipului de fosfat de calciu obtinut prin sinteza se poate realiza prin calculul raportului Ca/P, din date EDX, si prin analiza RDX, fiecare tip de fosfat de calciu avand un spectru RDX caracteristic. Figura 2 reunește difractogramele RDX caracteristice pentru hidroxiapatita (HAp), dicalciu fosfatul anhidru (DCPA), octacalcium fosfat (OCP) si dicalciu fosfatul dihidrat (DCPD).

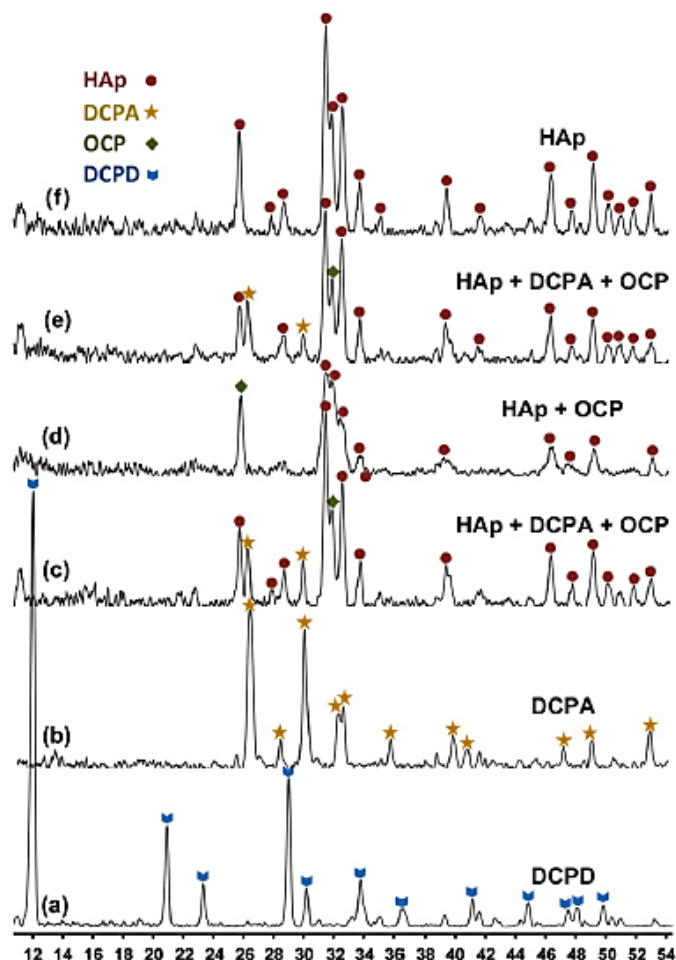


Figura 2. Difractogramele RDX ale HAp, DCPA, OCP si DCPD.

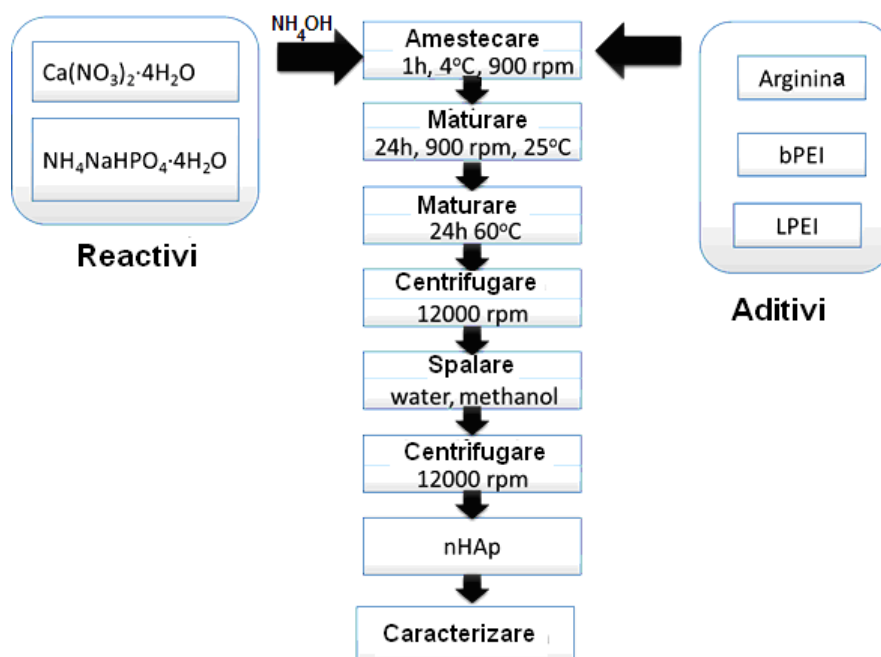
Analiza FT-IR poate furniza informatii utile pentru caracterizarea fosfatilor de calciu. Astfel, HAp si derivatii sai prezinta o serie de benzi de absorbtie caracteristice, respectiv: intervalul $950-1136\text{ cm}^{-1}$ pentru gruparea fosfat, PO_4^{3-} , intervalul $1400-1550\text{ cm}^{-1}$ pentru gruparea CO_3^{2-} . Prezenta benzilor specifice carbonatului denota substituirea partiala a gruparilor fosfat cu grupari carbonat. Varietatea carbonatata a HAp prezinta o biocompatibilitate sporita si este cel mai frecvent utilizata in aplicatii biomedicale.

A2. Sinteza hidroxiapatitei functionalizate

In vederea realizarii de matrice compozite mixte, anorganic-organice, destinate gazduirii cargocomplexsilor activi in transfectie, s-a elaborat un protocol pentru sinteza HAp sub forma nanoparticulata si functionalizata superficial cu compusi cationici activi in complexarea acizilor nucleici. S-a recurs la o varianta derivata din metoda precipitarii umede. Aceasta varianta prezinta o serie de avantaje, intre care:

- simplitate si reproductibilitate;
- conditii de reactie blande (temperatura relativ joasa, mediu apos);
- functionalizarea chimica superficiala facila, utilizind reactivi adecvati;
- controlul relativ eficient al dimensiunilor si morfologiei particulelor.

Schema 1 prezinta principiul variantei de sinteza a HAp elaborate in cadrul proiectului.



Schema 1. Varianța experimentală de preparare a hidroxiapatitei funcționalizate, prin metoda precipitării.

A3. Caracterizarea hidroxiapatitei funcționalizate

Morfologia particulelor de HAp sintetizate a fost investigată prin tehnica TEM, utilizând un sistem Hitachi 7700. Figura 3 prezintă rezultatele obținute pentru patru dintre probe. În lipsa compusilor cationici, dar și în prezența argininei, particulele de HAp au dobândit structuri aciculare, iar în sistemele cu PEI au rezultat nanoparticule cu morfologie planară, lungimea și raportul dimensiunilor scăzând drastic odată cu creșterea cantității de polimer adăugată, așa cum rezultă din datele reunite în Tabelul 1. Se constată faptul că în prezența compusilor care conțin grupări carboxilice, iminice și aminice primare, creșterea cristalelor este inhibată (fapt raportat deja în literatura de specialitate [17, 18]). Formarea nanoparticulelor de HAp și modificarea suprafeței acestora în prezența aditivilor adăuși în mediul de reacție a fost confirmată prin analiză EDX (microscop Quanta 200, echipat cu modul EDX) și FT-IR (Bruker Vertex70), precum și prin analiză DLS (înregistrându-se creșterea evidentă a potențialului zeta). Conform datelor EDX, raportul Ca/P este cuprins în intervalul 1,56 ÷ 1,63, ceea ce confirmă formarea hidroxiapatitei carbonatate (CDHA).

Tabelul 1. Caracteristicile nanoparticulelor de HAp obținute prin sinteză.

Proba	HAp	HAp _{Arginina}	HAp _{bPEI}	HAp _{LPEI-I}	HAp _{LPEI-II}
Lungimea cristalelor [nm]	72.8	71.3	45.9	45.5	32.2
Plaja lungimilor (min - max)	27.5-134	43.3-177.6	21.8-74.4	16.9-91.6	14.1-76.9
Latimea cristalelor [nm]	9.27	7.85	9.36	11.62	17.35
Raportul geometric lungime/latime	7.86	9.07	4.90	3.91	1.86
Raportul Ca/P	1.62	1.56	1.63	1.57	1.61
Potențialul zeta, ξ [V]	8.2	12.0	33.0	15.5	20.0
Ag _{DLS} [nm]	1660	1150	316	427	338

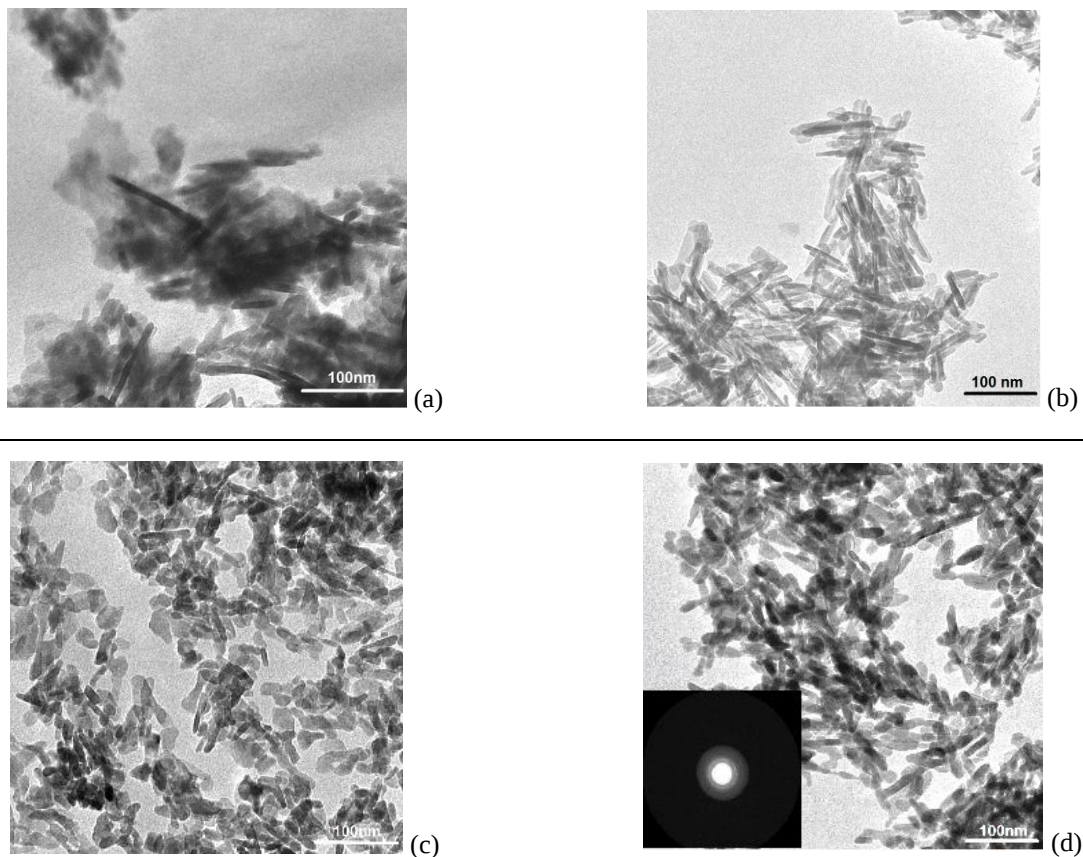


Figura 3. Microfotografii tipice TEM pentru probele de nHAp functionalizata sintetizate: (a) HAp0; (b) HApA; (c) HApbPEI; (d) HApLPEI. Scala: 100nm.

Dupa cum se observa analizand imaginile din Figura 3 si datele din Tabelul 1, tendinta de agregare si dimensiunile nanoparticulelor scad in ordinea $HAp0 > HApA > HApLPEI \geq HApbPEI$. Modificarea dimensiunilor si scaderea tendintei de agregare a nanocristalelor, in special dupa adaugarea de polimeri cationici, este confirmata si de datele DLS, reunite in Figura 4.

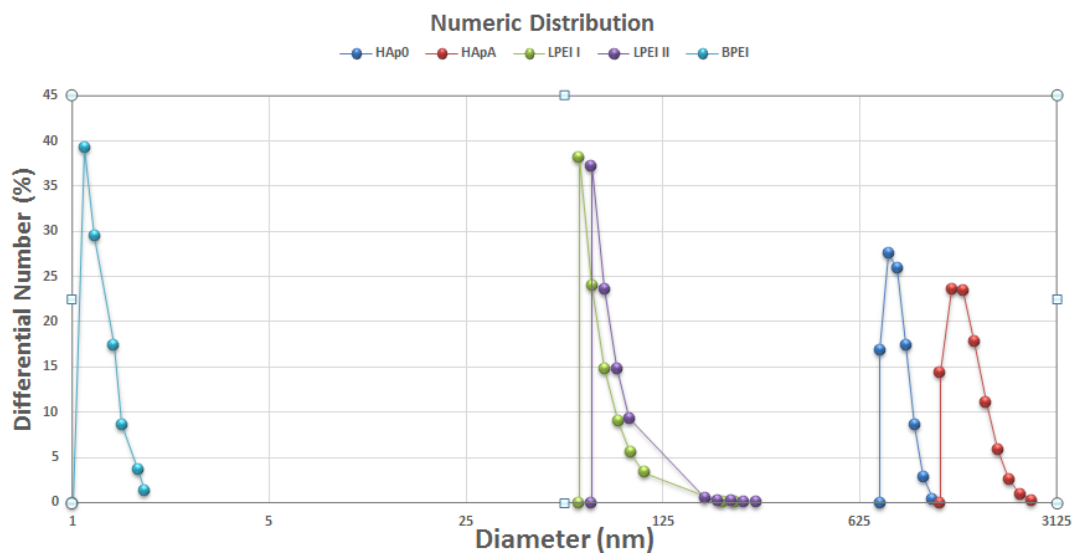


Figura 4. Distributia dimensionala pentru diferitele tipuri de nHAp sintetizate.

Pentru a evidenția modificările structurale intervenite ca urmare a prezentei argininei și polietileniminei în mediul în care a avut loc sinteza HAp, s-au trasat spectrele FTIR/ATR-FTIR. Figura 5 redă respectivele spectre obținute pentru agregatele de HAp și pentru nanoparticulele de hidroxiapatită modificată.

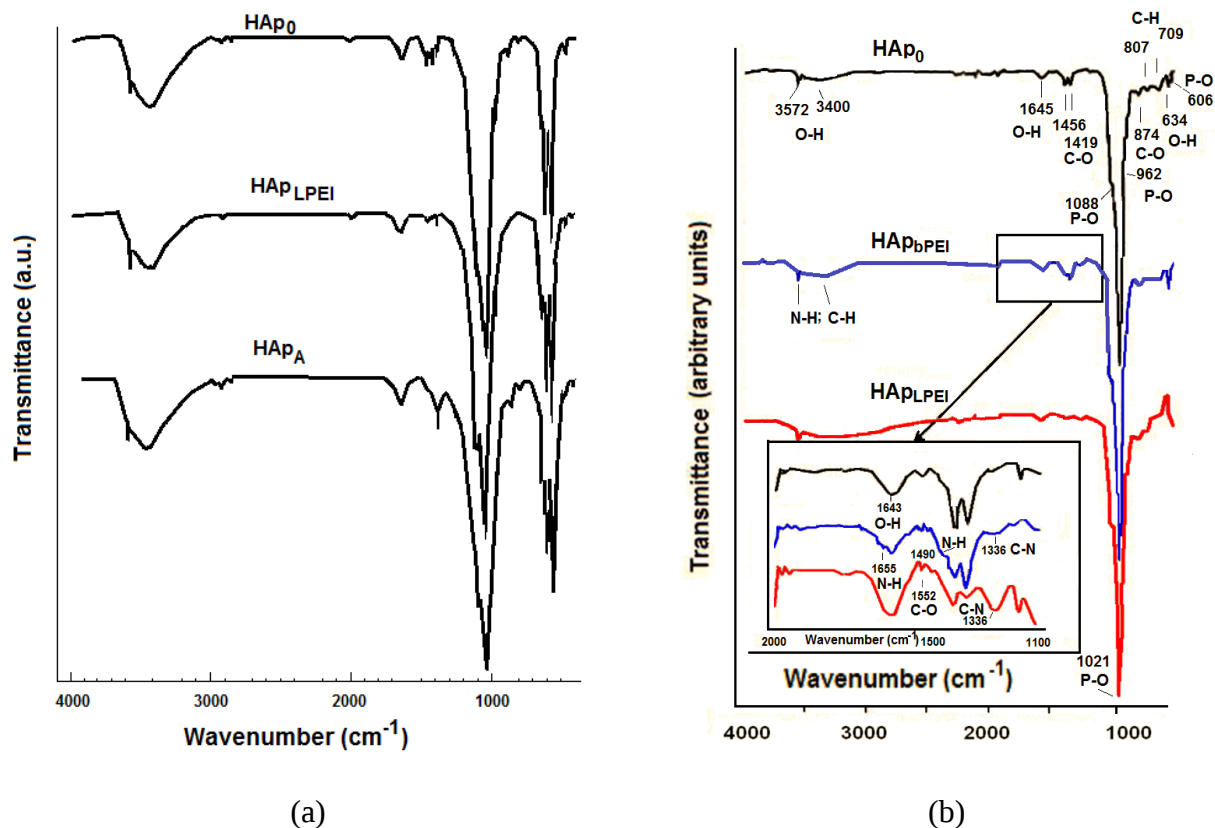


Figura 5. Spectrele în infraroșu tipice pentru nHAp funcționalizată:
(a) spectre FTIR (pastile KBr); (b) spectre ATR-FTIR.

Probele analizate prezintă spectre FTIR aproape identice (Figura 5.a), care evidențiază benzile de absorbție caracteristice HAp, situate la 3572.6 cm^{-1} și 634 cm^{-1} (asociate grupărilor OH din cristalele de HAp stoichiometrică), respectiv la $950\text{--}1136\text{ cm}^{-1}$ și 606 cm^{-1} (pentru grupările PO_4^{3-}) [19]. Spectrele relevă și benzile de absorbție ale CO_3^{2-} , datorate CO_2 din atmosferă, la lungimile de undă 1419 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} și 1550 cm^{-1} [20]. Spectrele ATR-FTIR evidențiază prezenta unor benzi de absorbție suplimentare în raport cu spectrul HAp₀, care pot fi atribuite stratului organic de la suprafața cristalelor (nanoparticulelor) (Figura 5.b). Astfel, banda largă din intervalul $3100\text{--}3650\text{ cm}^{-1}$ se datorează benzilor de vibrație ale grupărilor –N–H– iminice și aminice primare, dar și ale grupărilor –OH din și –CH₂– prezente în LPEI. Banda de la 1640 cm^{-1} este mai amplă și este scindată ca urmare a suprapunerii semnalelor grupărilor –NH₂ și –NH– ale PEI. Benzile de vibrație specifice –CNH– (794 cm^{-1}), și cele de deformare asociate grupărilor –NH– și –NH₂ ($650\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) ale PEI sunt evidente în cazul probelor sintetizate în prezența compusilor bazici, în comparație cu proba martor, HAp₀.

Atasarea compusilor organici la suprafața nanoparticulelor de HAp a fost cuantificată prin analiza spectrală a supernatantului rezultat la centrifugare, respectiv din spectrele ^1H -RMN (Bruker, Avance DRX 400) și UV-VIS (UV-6300PC, VWR double beam spectrophotometer). Cantitățile astfel determinate reprezintă circa 9%, 6,5%, 4,6% și 5% față de fracția anorganică, pentru HApA, HApbPEI, HApLPEI-I și HApLPEI-II, respectiv.

Cristalinitatea si compozitia de faza a produsilor de reactie s-a determinat prin difractometrie cu raze X (XRD, difractometru D8 Advance (Bruker), sursa cu lungimea de unda $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). In cazul CDHA, difractogramele obtinute (Figura 6.b) coincid in buna masura cu cele din literatura [21]. Diferenta evidenta pentru unghiul 2θ cu valoarea de aproximativ 42° poate fi atribuita interactiunii speciilor organice cu HAp, ceea ce confirma efectul aditivilor in controlul morfologiei nanoparticulelor de HAp.

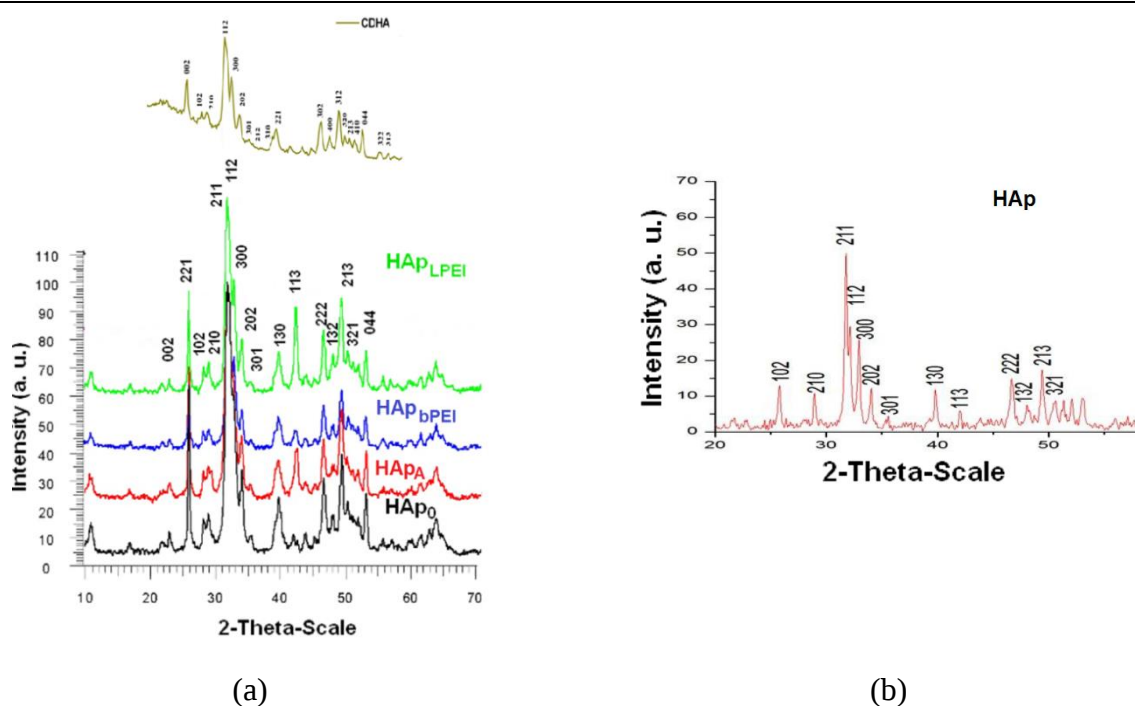


Figura 6. Compararea difractogramelor probelor sintetizate (a) cu cea a hidroxiapatitei carbonatata deficiente in Ca (CDHA [21]), respectiv cu cea a HAp cristaline [22] (b).

Testarea abilitatii hidroxiapatitei functionalizate cu compusi cationici de a se asocia cu ADN s-a realizat prin tehnica electroforetica. Rezultatele comparative in raport cu HAp nefunctionalizata sunt prezentate in Figura 7. Determinarea s-a efectuat pe gel de agaroz, utilizand ADN plasmidic (pCMV-Luc 10), la pH 7.4, pentru un raport N/P de 20. Capacitatea maxima de impachetare a pADN a fost estimata pentru proba nHApLPEI.

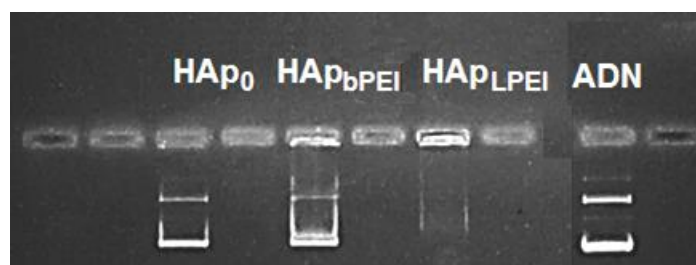


Figura 7. Evidentierea electroforetica a abilitatii de impachetare a pADN de catre hidroxiapatita functionalizata cu polietilenimina ramificata (bPEI) si liniara (LPEI).

B. Obținerea compozitelor ternare, biopolimer / polimer / hidroxiapatita

B1. Prepararea matricelor hibride de tipul compozitelor ternare

O serie de studii anterioare au evidențiat posibilitatea realizării de matrice biocompatibile, biomimetice, prin asocierea unei proteine (atelocolagenul) cu un polizaharid (dimetilsilandiolihiyaluronatul, un derivat al acidului hialuronic) și cu un polimer sintetic biocompatibil (poli(ϵ -caprolactona), sub forma derivatului bifuncțional reactiv al acesteia, diizocianat poli(ϵ -caprolactona), PCL-DI, cu rol de agent de reticulare și de control al duratei de degradare (Figura 8). Aceleași studii au demonstrat posibilitatea controlului caracteristicilor morfologice, al proprietăților mecanice, termice, dielectrice, al gradului de reticulare și al degradabilității matricelor hibride, prin formularea recepturilor și prin adaptarea protocoalelor de generare a structurii tridimensionale [23-26]. S-a constatat că rezistențele mecanice și rezistențele la degradare cresc odată cu gradul de reticulare (respectiv cu creșterea ponderii PCL-DI în recepturi), dar și cu creșterea fracției de derivat al acidului hialuronic, capabil a complexa componenta proteică. În aceeași serie, porozitatea matricelor scade însă. Formularea optimă în vederea eventualei utilizări pentru realizarea de substitute ale tesuturilor dure presupune asigurarea unui raport gravimetric procentual între AteCol : DMSHA : PCL-DI de minimum 10 : 1 : 1, iar, pentru aplicații în ingineria tisulară, metoda de preparare impune transformarea compozițiilor în criogeluri. Aceasta tehnica prezintă următoarele avantaje:

- posibilitatea obținerii de structuri tridimensionale elastice, macroporoase, cu pori interconectați;
- posibilitatea purificării prin îndepărtarea componentelor nereactionate, în cursul etapei de decongelare / spalare;
- prelucrabilitate superioară altor variante, amestecul preluând forma incintei în care se realizează congelarea, incinta care acționează drept matrită.

Ca urmare a studiilor preliminare anterior menționate, s-a optat pentru realizarea unei matrice hibride, organic – anorganice, de tip criogel, prin includerea în recepturi a nano-hidroxiapatitei funcționalizate superficial cu LPEI (25% masic în raport cu componenta proteică). Noile probe preparate s-au codificat astfel: CH10P10/HAp25-15. Pentru comparație, s-au realizat compoziții similare fără HApLPEI-I (CH10P10-15) și compoziții în care, pe lângă HApLPEI-I, s-a adăugat și 15% masic β -TCP (Sigma Aldrich), codificate respectiv: CH10P10/HAp25 și TCP15-15.

Argumentul includerii a două tipuri de fosfat de calciu în recepturi derivă din caracteristicile pe care acestea le conferă materialelor în care se regăsesc. Astfel, HAp induce friabilitate și resorbabilitate redusă, blocând sau întârziind formarea de țesut osos nou și remodelarea locală. În schimb, β -TCP asigură un spor de hidrofilie, biodegradabilitate și solubilitate marite, stabilind astfel un echilibru dinamic între resorbția matricei compozite și formarea de țesut osos nou. Activitatea de remodelare a osteoclastelor asupra substraturilor cu conținut de fosfați de calciu depinde de solubilitatea acestora [27]. Clinic, s-a constatat faptul că nici HAp și nici β -TCP nu pot fi utilizate individual, ca săruri anorganice, în regenerarea osoasă, deoarece induc complicații post-operatorii. În plus, β -TCP nu prezintă caracter osteoinductiv și osteogen, necesitând combinarea sa cu alți fosfați de calciu și/sau cu alte specii (macro)moleculare. Combinația HAp cu β -TCP este cunoscută sub denumirea de fosfat de calciu bifazic (BCP), material cu un caracter osteoinductiv, apt să asigure proprietăți mecanice adecvate aplicațiilor, dar și solubilitate controlată a substraturilor în care este inclus, funcție de fracția sa masică în compozite. Asocierea β -TCP și PCL asigură osteoconductivitate și proprietăți mecanice de excepție, dat fiind faptul că ioni de calciu și fosfat se pot asocia electrostatic la grupările $-C=O$ ale PCL [28].

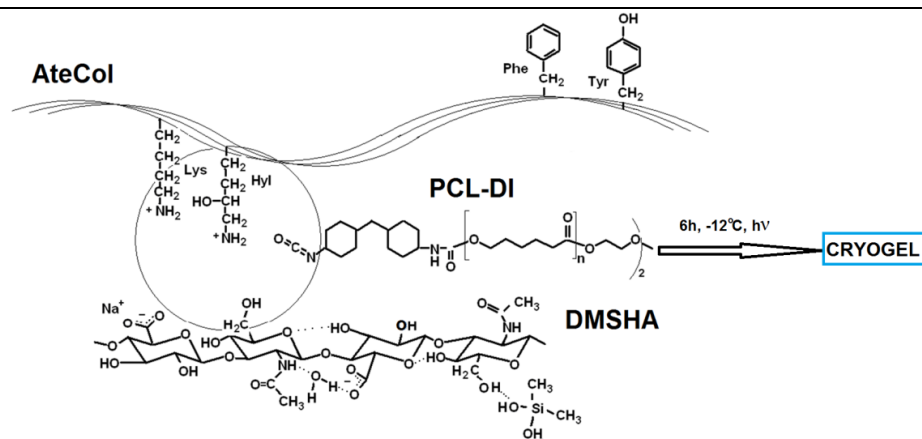


Figura 8. Principiul protocolului de obtinere a criogelurilor hibride atelocolagen / dimetil-silan-diol-hialuronat, reticulate cu di-izocianatul poly(ϵ -caprolactonei).

B2. Caracterizarea matricelor hibride de tipul compozitelor ternare

Deși toate probele obținute sunt stabile dimensional, s-a remarcat o mai bună integrare fizică a componentelor în cazul probei ce include doar HApLPEI-I, comparativ cu cea în care se regăsește, în plus, β -TCP. Acest fapt poate fi atribuit dimensiunii și uniformității sporite a nanoparticulelor anorganice, dar și interacțiunii LPEI cu celelalte componente, cu rol de agent de legare (data fiind compatibilitatea cunoscută a pROZO și a PEI cu majoritatea polimerilor, precum și abilitatea acestora de a interacționa cu compuşii polari anorganici). În schimb, β -TCP comercial (utilizat sub formă de aglomerate de dimensiuni micronice), poate facilita apariția de discontinuități în structura tridimensională și implicit o mai slabă coeziune a matricei hibride.

Integrarea particulelor anorganice în matricea organică a fost confirmată prin spectroscopie FTIR, prin difractometrie RDX și prin analiză DSC. Prezența fracției anorganice în compoziția criogelului macroporos a fost evidențiată prin analiză XPS, așa cum rezultă din datele reunite în Tabelul 2.

Tabelul 2. Compoziția elementală a criogelurilor preparate.

Elementul	Proba					
	CH10P10-15		CH10P10/HAp25-15		CH10P10/HAp25:TCP15-15	
	wt%	At%	wt%	At%	wt%	At%
C	66,6	71,9	46,5	58,2	50,4	61,4
N	12,4	11,5	9,7	10,4	9,1	9,5
O	20,0	16,2	25,2	23,7	25,1	23,0
P	--	--	6,1	3,0	4,9	2,3
Ca	--	--	12,6	4,7	10,5	3,9

În spectrele ATR-FTIR ale criogelurilor, alături de semnalele specifice polipeptidelor (benzile amida A, la 3307 cm^{-1} , amida B, la 3075 cm^{-1} , amida I, la aproximativ 1650 cm^{-1} și amida 2, la 1545 cm^{-1}) și de cele atribuite DMSHA (picurile de la 1020 cm^{-1} și 1084 cm^{-1} , banda ν a grupării C-O-C din inelele zaharidice ale HYAL), apar benzile specifice grupării fosfat din HAp, situate la $910\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$. Raportul absorbțiilor la 1240 și respectiv 1450 cm^{-1} (A_{1240} / A_{1450}), utilizat pentru a evalua conținutul de triplu helix specific collagenului nendenaturat [29] (caz în care are valori în plaja $1.01 \div 1.014$), se modifică de la 0.94 în AteCol, la 0.86 în CH10P10-15, 0.93 în CH10P10/HAp25-15 și respectiv 0.73 în CH10P10/HAp25-15, fapt care indică creșterea gradului de dezordine în respectivele probe. La aceeași concluzie conduce și

analiza spectrelor RDX (Figura 9), in care se observa mentinerea picului specific collagenului, de la $2\theta \sim 7.7^\circ$, dar diminuarea intensitatii acestuia in proba ce contine β -TCP. In plaja $15-28^\circ$ ale valorilor 2θ , picurile indica pozitia spatiilor intercatenare in triplul helix al collagenului [30, 31]. Peste acestea se suprapun semnalele provenite din componenta anorganica, unele prezentand mici deplasari, indiciu al interactiunii la interfata organic / anorganic. Semnalul de la 2θ aproximativ 42° se diminueaza, ceea ce confirma interactiunea preferentiala a LPEI, regasita la suprafata nanoparticulelor de HAp, cu biomacromoleculele imediat invecinate.

Gradul de dezordine indus de prezenta β -TCP in compozit este observabil si in microfotografiile SEM (Figura 10). Pentru proba CH10P10/HAp25:TCP15-15 sunt evidente diminuarea porilor, ingrosarea peretilor acestora si aparitia de aglomerari de componenta anorganica, prin comparatie cu probele CH10P10-15 si CH10P10/HAp25-15, cat si aglomerari de material anorganic. Dimensiunea porilor scade de la $140.4 \mu\text{m}$ pentru CH10P10-15, la $76.4 \mu\text{m}$ pentru CH10P10/HAp-25-15, respectiv $63,1\mu\text{m}$ pentru CH10P10/HAp25:TCP15-15.

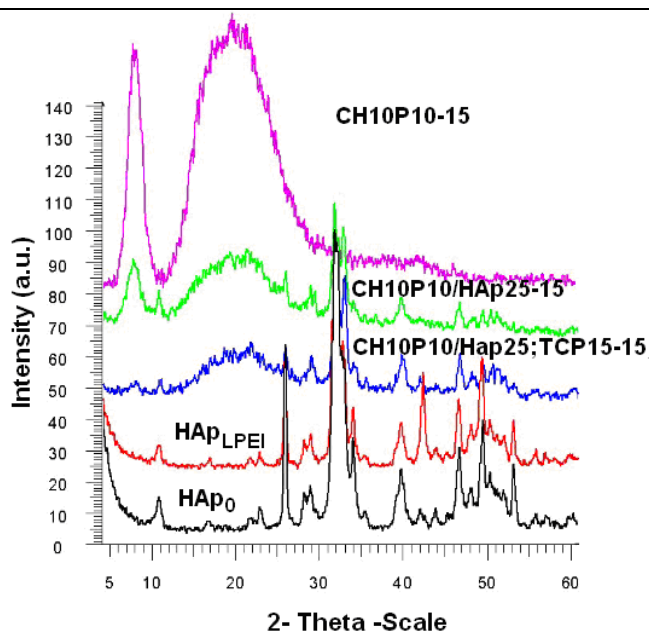
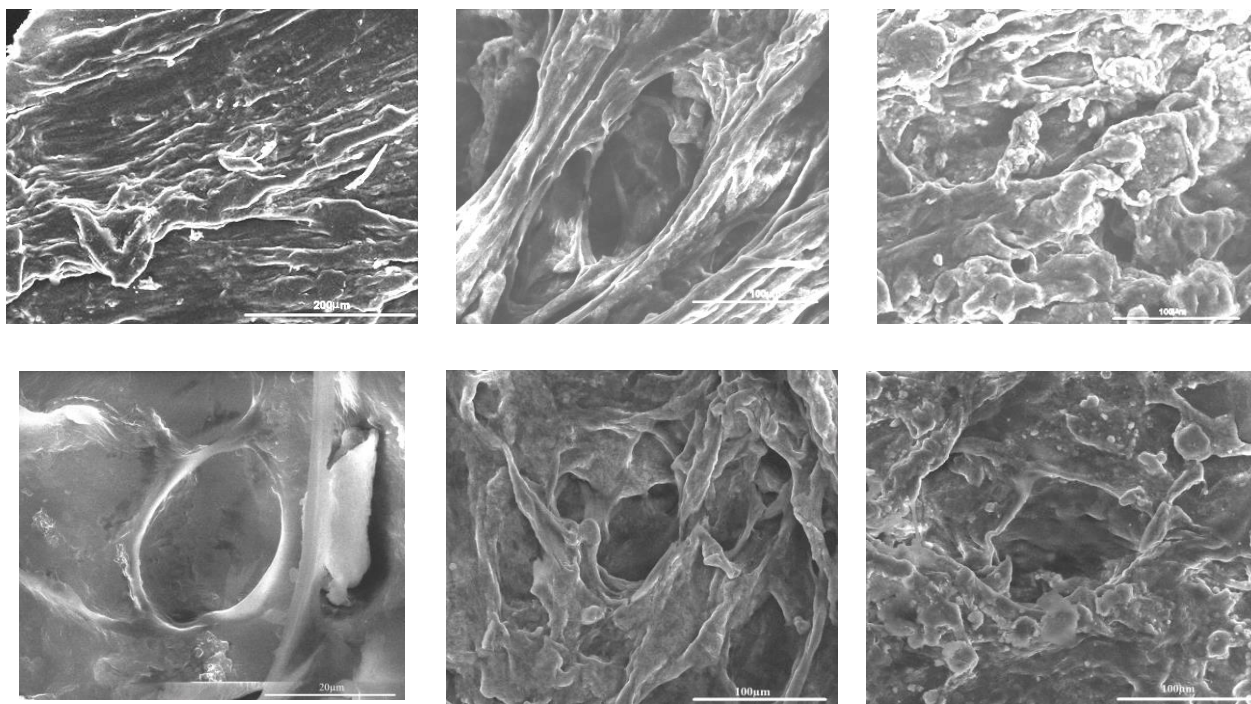


Figura 9. Difractogramele probelor de criogel hibrid obtinute.



CH10P10-15

CH10P10/HAp25-15

CH10P10/HAp25:TCP15-15

Figura 10. Microfotografii SEM tipice pentru probele de criogel analizate.

Curbele DSC (Figura 11) evidentiaza o crestere a valorii temperaturii de denaturare, T_d , (considerata ca fiind o masura a gradului de reticulare a formelor colagenice), odata cu adaugarea de componenta anorganica, fapt care atesta dezvoltarea de interactiuni la interfata anorganic / organic, fractia organica parand a induce un slab efect de reticulare fizica (prin interactiuni electrostatice).

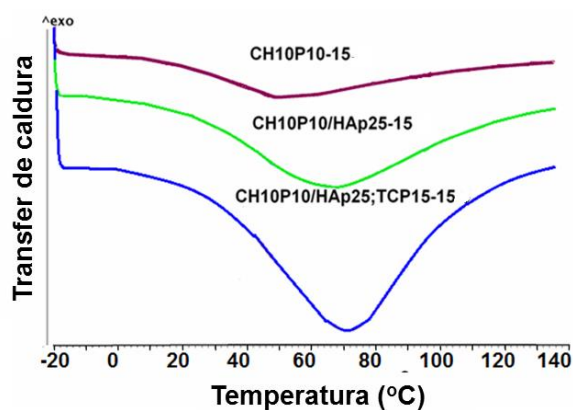


Figura 11. Curbe DSC trasate pentru probele de criogel hibrid obtinute.

Evaluarea capacitatii de umflare (Figura 12) si a degradarii in mediu umed (Figura 13) pun in evidenta o relativa crestere a stabilitatii compozitului odata cu cresterea fractiei anorganice, precum si efectul hidrofiliei crescute a β TCP, comparativ cu HAp.

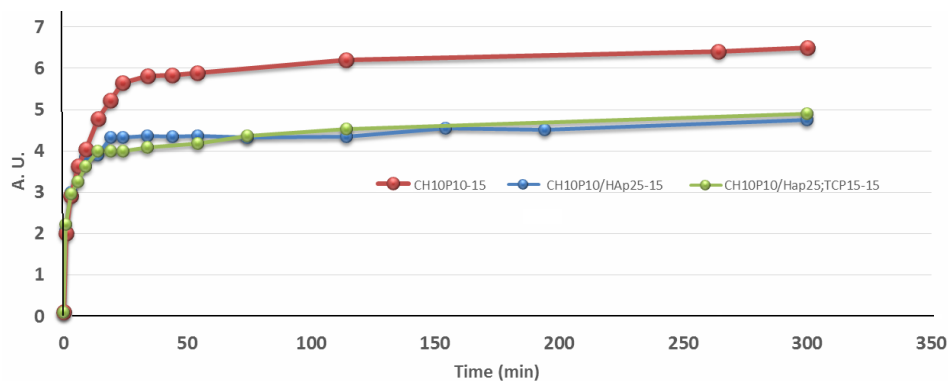


Figura 12. Comportarea la umflare in apa a structurilor macroporoase sintetizate.

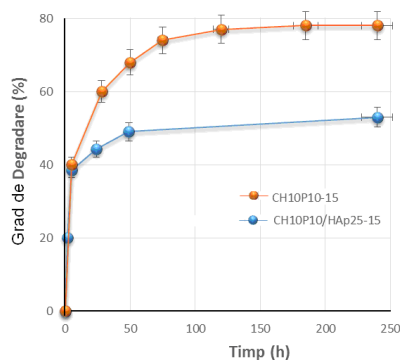


Figura 13. Comportarea la degradare in mediu umed a structurilor macroporoase sintetizate. Conditii: PBS 0.1M, 37°C.

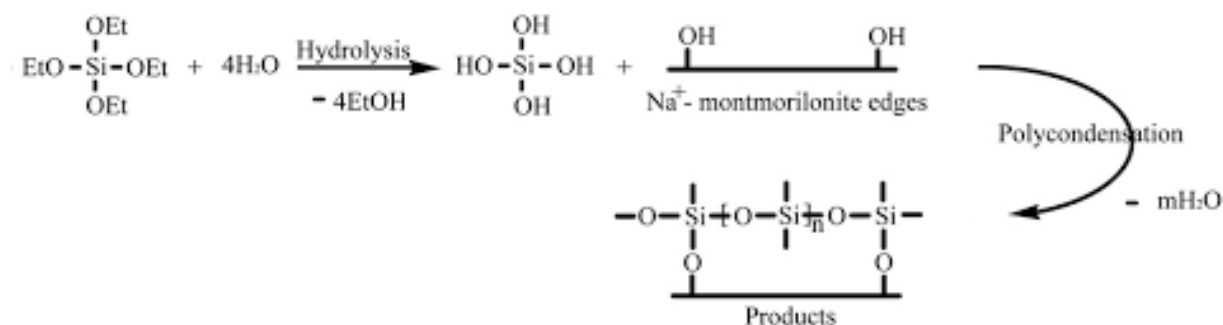
C. Compozite acetat de celuloza / nanofibre de argila si silice

Materialele hibride polimeri / compusi anorganici, in special cele din categoria nanomaterialelor, ofera o gama larga de aplicatii in domeniul biomedicinei si al eliberarii de medicamente. Recent a fost evidentiat avantajul utilizarii nanofibrelor de argila si silice (SiNWs), o clasa noua de nanofileri (materiale de umplere la scara nanometrica), cu structura interconectata 2D-1D, larg accesibile. SiNWs sunt formate, in general, din fibrile cu lungimi de peste 1 μm si diametre de aproximativ 20 nm, cu arhitectura 2D-1D interconectata [32, 33]. SiNWs pot fi obtinute si sub forma de straturi 2D de particule hibride, caracterizate printr-o suprafata specifica mare. Sinteza nanofibrelor poate fi condusa in conditii blande, fara adaos de agenti de templare. In pofida faptului ca metoda de sinteza si mecanismul de reactie sunt bine cunoscute [33], pana in prezent SiNWs au un numar redus de aplicatii. Ca material de umplere, microfibrilele SiNWs prezinta avantajul costului redus si al biocompatibilitatii [34]. In plus SiNWs au abilitatea de a asambla structuri supramoleculare pe baza de saruri ale aminoacizilor, comportament care este de asteptat sa se manifeste si in cazul proteinelor.

Studiul prezentat in cele ce urmeaza demonstreaza posibilitatea utilizarii SiNWs, similar nanofibrelor de silice (fara unitati 2D), ca material de ranforsare a compozitelor acetatului de celuloza (CA), oferind o perspectiva de utilizare a membranelor pe baza de CA si SiNWs in aplicatii biomedicale. Compozite hibride pe baza de acetat de celuloza (polimer artificial biodegradabil) si nano-hidroxiapatita au fost anterior realizate printr-o tehnica de nanomanufacturare intr-o singura etapa. Acestea au fost apoi evaluate in calitatea lor de matrice cu arhitecturi 3D biomimetice, in studii *in vitro* de regenerare osoasa, dovedindu-se eficiente in promovarea adeziunii si dezvoltarii osteoblastelor [35].

C.1. Prepararea membranelor hibride CA / nanofibre de argila si silice

Pentru obtinerea membranelor nanocompozite, s-a pornit de la o solutie de 12 % de acetat de celuloza in apa, care a fost maturata, static, 24 de ore, in vederea eliminarii bulelor de aer (spre a evita formarea de goluri in membranele finale). SiNWs au fost obtinute printr-un proces sol-gel, pornind de la tetraetil orthosilicat (Sigma-Aldrich), in prezenta montmorilonitului de sodiu, conform metodei din referinta [32]. Schema 2 prezinta principiul procesului de sinteza al SiNWs.



Schema 2. Varainta experimentală de preparare a SiNWs.

Ulterior preparării, SiNWs au fost dispersate în soluția de CA, prin ultrasonare, la diferite rapoarte de amestecare, respectiv de 1.25, 2.5 și 5 % masic. Nanocompozitele s-au obținut sub formă de membrane prin turnarea suspensiei pe un substrat din sticlă, urmată de imersare într-o baie de coagulare. După formare, membranele au fost spalate și stocate în apă deionizată, pentru prevenirea dezvoltării de microorganisme pe suprafața lor.

C.2. Caracterizarea membranelor hibride CA / nanofibre din argila și silice

Morfologia membranelor nanocompozite s-a investigat prin tehnica SEM (Figura 14), după ce au fost acoperite cu un strat subțire din aur. S-a constatat o scădere a dimensiunii și densității porilor în prezenta SiNWs, comparativ cu membranele ce conțin doar CA.

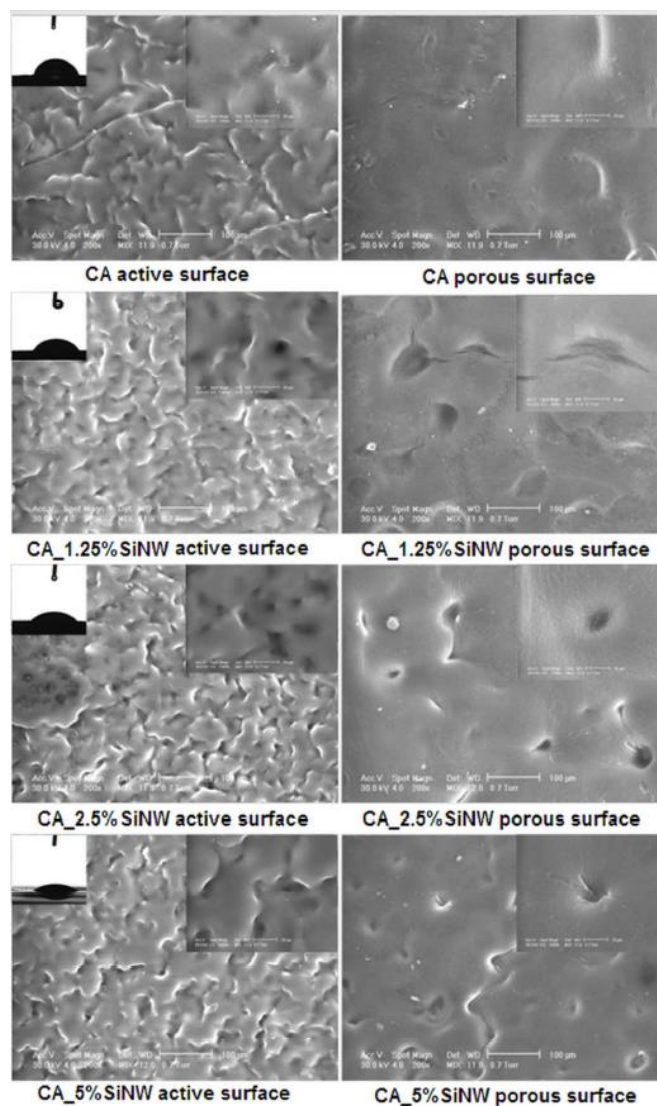


Figura 14. Imagini SEM tipice pentru membranele compozite obtinute prin turnare la diferite grade de incarcare cu SiNWs (0, 1.25, 2.5 si 5 % fata de CA).

În probele ce nu contin SiNWs, porii suprafetei active sunt dificil de vizualizat, intrucat porii initial mari si interconectati din membranele umede au colapsat in timpul uscarii (impuse in investigatiile SEM). Drept consecinta, dupa uscare, porii initial sferici sau cilindrici s-au transformat in pori de tip lamelar. Adaugarea SiNWs conduce la formarea de pori stabili dupa uscare, cu diametre de circa 10 ori mai mici comparativ cu cei din membrana de CA.

În vederea evaluarii hidrofiliei membranelor uscate, s-au realizat studii ale tensiunii superficiale, prin metoda determinarii unghiului de contact al apei, la temperatura camerei (Figura 14, inserturile din coltul stanga-sus al imaginilor SEM), utilizand un tensiometru pentru unghiuri de contact CAM 200/KSV Instruments. S-a constatat descresterea valorilor unghiului de contact odata cu cresterea continutului de material de umplere. Rezultatele se coreleaza cu observatiile de microscopie electronica. Cresterea densitatii porilor (evidentiata prin SEM) a influentat proprietatile suprafetelor membranelor si a determinat descresterea semnificativa a unghiului de contact pentru membranele nanocompozite [36]. Membranele care contin doar CA conduc la unghiuri de contact de circa 65°. În cazul membranelor compozite cu SiNWs, valorile unghiului de contact descresc, iar dinamica absorbtiei picaturii depinde de gradul de incarcare cu

SiNWs, o picatura de apa cu volumul de 6.5 μL fiind absorbita in aprox. 7.5 minute in cazul membranei CA, respectiv in doar doua minute, in membranele cu 5% SiNWs. Acest comportament confirma morfologia observata prin SEM. Proprietatile de suprafata confirma direct imbunatatirea proprietatilor de umectare si indirect cresterea densitatii porilor.

Comportamentul termic al membranelor obtinute (Figura 15) indica existenta unor interactiuni fizice intre umplutura (SiNWs) si matricea polimera (CA). Pierderea apei legate fizic nu a fost influentata semnificativ de continutul de SiNWs, fapt datorat absorbtiei apei in membranele poroase si nu umflarii matricei polimere. Temperatura de inceput a degradarii termice creste cu continutul de SiNWs, indicand o stabilizare evidenta in timpul degradarii CA.

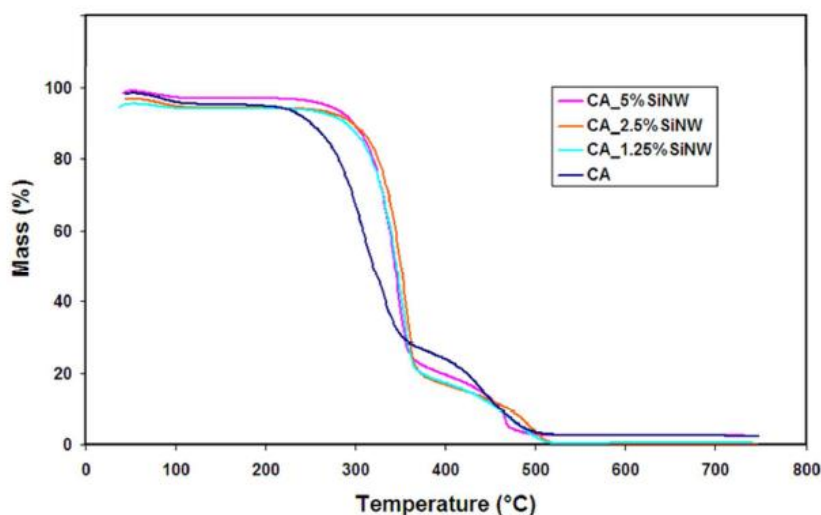


Figura 15. Stabilitatea termica evaluata prin analiza termogravimetrica (NETZSCH STA 449C Jupiter), pentru diferite grade de incarcare a membranelor CA cu SiNWs (0, 1.25, 2.5, 5 % masic, raportat la CA).

Interactiunile fizice intre fillerul SiNWs si matricea CA, observata prin analiza termogravimetrica (TGA), a fost confirmata de analiza spectrelor FTIR (Figura 16). Absorbtile IR au aratat o descrestere a intensitatii benzilor de vibratie din plaja 3100-3700 cm^{-1} si de la 1638 cm^{-1} , in raport cu probele ce contin doar CA, odata cu cresterea continutului de SiNWs. Banda de vibratie de la 3450 cm^{-1} a scazut in intensitate, iar pozitia sa s-a deplasat cu 30 cm^{-1} in cazul incarcarii cu 1.25 % SiNWs si nu s-a modificat, indiferent de continutul de filler. Deplasarea respectivei benzi indica o modificare a interactiunilor cu apa absorbita fizic, fara implicarea apei legate de catre compozitele SiNWs-CA.

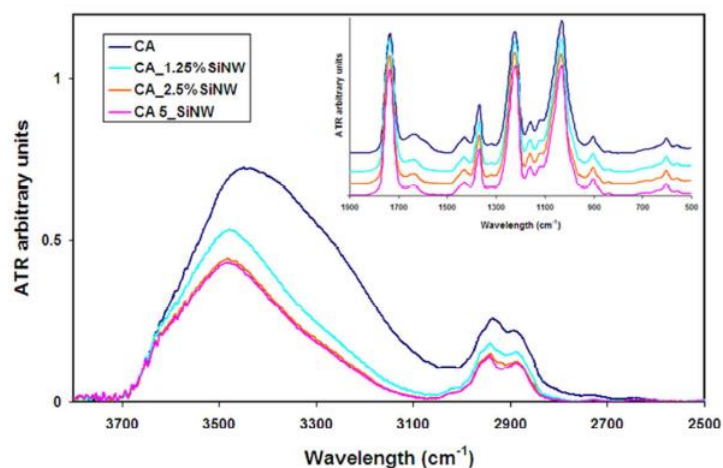


Figura 16. Spectrele FTIR pentru diferite grade de incarcare a membranelor CA cu SiNWs (0; 1,25; 2,5; 5 %).

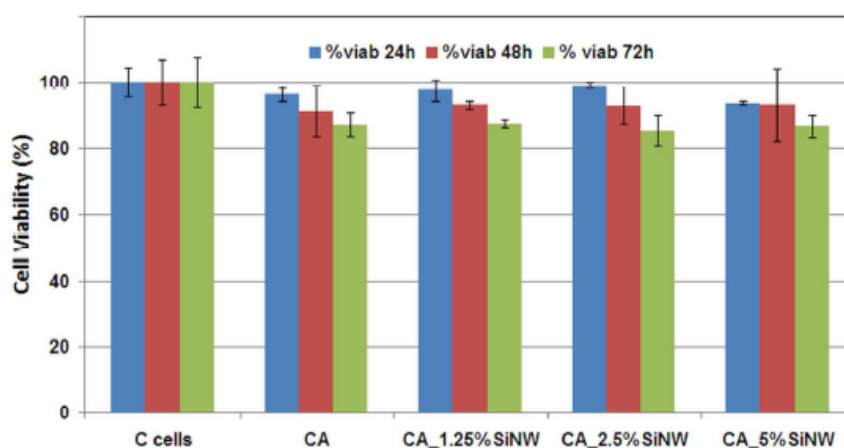


Figura 17. Evolutia viabilitatii celulare in prezenta membranelor compozite cu continut diferit de SiNWs in CA (control de crestere a celulelor: C cells; matricea CA: CA; 1.25%: CA_1.25% SiNWs; 2.5%: CA_2.5%SiNWs; 5%: CA_5%SiNWs).

In vederea evaluarii abilitatii matricelor compozite de a fi utilizate in aplicatii biomedicale, s-a testat citotoxicitatea acestora in raport cu fibroblaste in prima cultura din derma de sobolan (RDF R106-05, Rat Dermal Fibroblasts, Sigma-Aldrich) varietatea Sprague Dawley, precum si asupra fibroblastelor izolate din derma de iepure albinos (N-6067, Cell Biologics). Testele au fost efectuate in concordanta cu normele ISO 10993-5:2009 [37]. O serie separata de teste au fost realizate utilizand fibroblaste obtinute in laborator, in prima cultura. In acest scop, au fost prelevate probe din derma unui iepure albinos, iar dupa manipularile uzuale, tesutul a fost cultivat pana la obtinerea unui monostrat de celule in jurul fiecarui fragment tisular, la 37 °C, in atmosfera de 5% CO₂, reimprospatand mediului la fiecare trei zile. Pentru dezvoltarea ulterioara, celulele care au migrat din tesut au fost trecute pe o suprafata de 25 cm² a unui vas de cultura si cultivate pana la atingerea unei confluenta de 70-80%, in absenta si in prezenta probelor de compozit. Experimentele au fost realizare in triplu exemplar. Analizele MTT [bromură de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] s-au efectuat dupa 24, 48 si 72 ore de incubare a probelor cu celule. Absorbanta solutiei rezultate a fost cuantificata spectrofotometric la lungimea de unda de 570 nm, cu ajutorul unui cititor de

placi Tecan. Valorile absorbantelor rezultate în urma experimentelor au fost comparate cu absorbanta probei martor (cultura de celule realizată în absența probelor de compozit). Conform prescripțiilor ISO 10993-5:2009, probele care au asigurat o viabilitate celulară de peste 70% după 72 ore de incubare au fost considerate ca fiind ne-citotoxice. Figura 17 prezintă rezultatele testelor de citotoxicitate efectuate asupra fibroblastelor prelevate și cultivate în laborator.

D. Concluziile studiului privind realizarea de matrici macromoleculare biomimetice, active în transfecție

Etapa 2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 a inclus o primă secțiune vizând obținerea de matrice tridimensionale destinate dezvoltării de sisteme complexe de transfecție. S-au avut în vedere două direcții de studiu, respectiv:

- a) realizarea de matrice hibride de tip polimer natural / polimer sintetic / fracție anorganică, respectiv obținerea de criogeluri pe bază de AteCol –DMSHA/PCL și HAp funcționalizată, aceasta din urmă utilizată individual sau în combinație cu β TCP;
- b) realizarea de biocompozite polimer artificial biodegradabil / fracție anorganică, respectiv membrane din acetat de celuloză / montmorilonit-silice.

Pornind de la datele de literatură privitoare la avantajele utilizării criogelurilor (bio)compozite collagen-hidroxiapatită în ingineria tesuturilor dure [38] și având în vedere posibilitatea controlării caracteristicilor biocompozitelor AteCol–DMSHA/PCL prin condițiile de preparare (formulare, receptură, procedură) [1, 23-26], s-au elaborat protocoale pentru obținerea de matrice tridimensionale macroporoase pe bază de biopolimeri, polimeri sintetici și componentă anorganică, înzestrate cu următoarele caracteristici:

- prelucrabilitate și proprietăți mecanice superioare biopolimerilor componenți;
- coeziune superioară în cazul utilizării componentei anorganice sub formă de nanoparticule funcționalizate cu polietilenimina, care, pe de o parte acționează drept agent de cuplare, iar pe de altă asigură atât complexarea eficientă a ADN, cât și atașarea unor vectori genici non-virali;
- structură poroasă cu pori interconectați având dimensiuni controlabile prin receptura compoziției; o astfel de structură este adecvată atât facilitării transportului nutrienților către celule, cât și eliminării reziduurilor rezultate în urma activității celulare;
- biocompatibilitate demonstrată anterior pentru compozițiile AteCol – DMSHA / PCL;
- biodegradabilitate controlată prin conținutul de PCL, de componentă anorganică, prin raportul proteină / polizaharid și prin raportul HAp / TCP;
- capacitate redusă de umflare în apă, urmare a prezentei componentei anorganice, dar adecvată dezvoltării celulare;
- puritate suficientă, asigurată prin îndepărtarea reactanților neînglobați în rețea și a urmelor de solvent, înainte de etapa de liofilizare;
- funcționalitate adecvată atașării ulterioare a unor vectori genici non-virali, conferită de componente (polietilenimina, collagen, acid hialuronic).

De asemenea, în baza unor protocoale dezvoltate în cadrul proiectului, s-a demonstrat posibilitatea de realizare a unor membrane poroase hibride, acetat de celuloză / nanofibre din argilă și silice, a căror lipsă de citotoxicitate în raport cu fibroblastele a fost certificată.

Obiectivul 2. EVALUAREA ABILITATII DE TRANSFECTIE A SISTEMELOR DEZVOLTATE IN CADRUL PROIECTULUI

Terapia genica este o metoda utilizata pentru a introduce material genetic in celule cu scopul de a trata diverse maladii cu originea in alterarea mecanismelor intracelulare ce implica informatia genetica (cum sunt cancerul, infectiile virale si unele boli genetice). Aceasta tehnica terapeutica avansata impune utilizarea unor „unelte” specifice, inalt eficiente si non-toxice, apte a livra gene in celulele tinta [39]. Cele mai utilizate astfel de „unelte” sunt vectorii non-virali cationici, a caror compozitie, structura si morfologie poate fi precis proiectata, pentru a li se conferi proprietatile impuse [40-42]. Compusii cationici macromoleculari cei mai frecvent utilizati in testarile *in vitro* si *in vivo* sunt polietileniminele liniare (l-PEI) si ramificate (b-PEI), datorita densitatii mari de sarcini pozitive pe care le poarta, sarcini dobandite in directa relatie cu valoarea pH-ului mediului apos in care se regasesc. Raportul teoretic intre gruparile aminice primare, secundare si teritiare din b-PEI a fost determinat ca fiind 1 : 2 : 1 [43]. La pH fiziologic (aproximativ 7.4), gradul de protonare al PEI este de circa 50% [44]. Recent, literatura de specialitate a descris prepararea si performantele unui vector genic pe baza de PEI, cu mare capacitate de compactare a ADN-ului plasmidic, la pH 4 [45]. In teste preliminare de terapie genica, PEI a fost utilizat pentru compactarea si livrarea de ADN scurt dublu catenar (20-25 baze azotate), sau pentru introducerea in celule a unor oligonucleotide si molecule de si-ARN, demonstrandu-se insa ca exista mari diferente intre conformatiile poliplecsilor astfel rezultati, in comparatie cu cei care se formeaza in prezenta ADN-ului plasmidic, chiar in conditiile utilizarii aceleiasi varietati de PEI. Mai mult decat atat, s-a demonstrat si faptul ca pentru formarea poliplecsilor cu ADN scurt dublu catenar si cu si-ARN se poate utiliza doar PEI cu masa moleculara mica ($0.6 \div 2$ kDa), data fiind toxicitatea substantial redusa in raport cu cea a PEI cu masa moleculara inalta (25 sau 70 kDa) [46].

Avand in vedere considerentele mai sus prezentate, in cadrul etapei 2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028, s-au abordat doua directii de studiu, respectiv:

- (i) modelarea si optimizarea procesului de complexare a ADN-ului dublu catenar ce include 25 nucleotide, cu b-PEI avand masa moleculara medie de 2 kDa;
- (ii) elucidarea conformatiei poliplecsilor formati in urma complexarii ADNdc cu b-PEI, atunci cand b-PEI de 2 kDa a fost atasat la un ciclu siloxanic hidrofof, prin intermediul unui spatiator.

Aceste directii integreaza cele doua activitati regasite in planul de realizare al etapei 2015, intitulate:

2.1. Determinarea capacitatii de complexare a acizilor nucleici cu vectorii non-virali;

2.2. Testarea sistemelor de transfectie asupra culturilor celulare.

Toate sub-obiectivele respectivelor activitati sunt tratate sub o mai ampla filosofie a studiilor propuse prin planul de realizare, cu scopul de a dezvolta protocoale si tehnici de prelucrare a datelor care sa furnizeze un plus de cunoastere in satele investigate experimental.

2.1. Modelarea statistico-matematica si optimizarea formarii poliplecsilor prin co-precipitarea ADN dublu catenar cu polietilenimina

In vederea modelarii statistico-matematice a procesului de formare a poliplecsilor intre ADN-ul dublu catenar scurt (25 b) si polietilenimina cu masa moleculara medie de 2 kDa, s-a elaborat un plan experimental factorial central compus rotabil, cu doi factori, care a permis determinarea suprafetei de raspuns in coordonatele:

$$\text{eficienta de complexare} = f(\text{concentratie ADNdc, concentratie bPEI, pH}).$$

Modelul experimental astfel rezultat a fost utilizat pentru identificarea domeniului optimal pentru conducerea procesului de complexare a ADNdc cu 2 kDa bPEI, prin co-precipita-rea acestora in conditiile clasice ale prepararii poliplecsilor. Un astfel de demers experimental este larg utilizat pentru punerea la punct a protocoalelor aplicative [47].

Metodologia suprafetei de raspuns (RSM, Response Surface Method) reprezinta o tehnica statistico-matematica destinata modelarii proceselor complexe prin proiectarea experimentelor (DOE, Design of Experiments) si determinarea coeficientilor unor modele matematice polinomiale asociate planurilor experimentale, aplicand algoritmi de regresie multipla [48]. Proiectarea experimentelor permite investigarea influentei unui numar dat de factori experimentali (reglabili la valori precise) asupra unor variabile de raspuns masurate experimental (cu inalta precizie, de regula prin metode instrumentale). Planurile experimentale stabilite sunt apoi aplicate, iar datelor obtinute li se ajusteaza modele polinomiale cu diverse grade de complexitate, modele a caror adecvanta statistica este verificata cu minutiozitate. Dupa certificarea validitatii respectivelor modele, acestea pot fi utilizate drept functii obiectiv si functii restrictie in probleme de optimizare, carora li se aplica algoritmi de identificare a optimului, in conditii de neincalcare a restrictiilor. Principalele avantaje ale derularii experimentelor in baza unor planuri experimentale de tip DOE (proiectate) constau in:

- restrangerea semnificativa a numarului de experiente individuale in cadrul experimentului proiectat;
- punerea in evidenta a interactiilor intre factorii experimentali, in influenta pe care acestia o exercita asupra raspunsurilor masurate.

Unul dintre dezavantajele experimentelor planificate este insa imposibilitatea aplicarii modelelor statistico-matematiche obtinute pentru efectuarea de extrapolari, respectiv pentru predictia valorilor raspunsurilor experimentale inafara plajelor factorilor de influenta care au fost avute in vedere la proiectarea experimentelor.

Experimentele pentru determinarea cantitativa a complexarii ADNdc cu bPEI au avut in vedere trei factori: (i) concentratia ADNdc, (ii) concentratia bPEI si (iii) pH-ul initial al solutiei. Plajele de variatie a acestor factori au fost normate in intervalul [-1, 1], in vederea codificarii nivelurilor experimentale. Codificarea permite includerea in modelele statistico-matematiche a unor factori ce iau valori in plaje net diferite (inclusiv ca ordin de marime), utilizand aceeasi scala (adimensionala) pentru fiecare dintre ei [49].

Raspunsurile experimentale obtinute in urma aplicarii planului experimental au fost masurate electroforetic (pe gel de agaroz), determinand intensitatile benzilor specifice ale ADNdc, in prezenta si in absenta bPEI, la diferite rapoarte molare de amestecare si la diferite valori ale pH-ului. S-a utilizat, in acest scop, aplicatia software dedicata Gel Quant Express [50]. Figura 18 prezinta un exemplu de prelucrare a datelor electroforetice, in triplicat, pentru una dintre experientele din planul experimental, respectiv la un raport ADNdc / bPEI = 1.498 si la o valoare a pH-ului de 8 unitati.

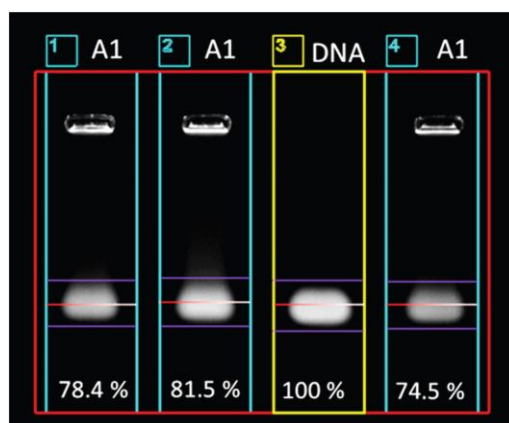


Figura 18. Rezultatul uneia dintre determinarile electroforetice, efectuate conform planului experimental ($ADNdc / bPEI = 1.498$ si $pH 8$).

Spoturile asociate benzilor de migrare 1, 2 si 4 corespund poliplexsilor formati, iar cel al benzii 3 corespunde ADNdc liber (utilizat ca etalon pentru intensitate 100 %).

Figura 19 include rezultatele testelor de migrare electroforetica a poliplexsilor preparati conform planului experimental. Utilizand aceste date s-au determinat (prin regresie multipla [51]) coeficientii polinoamelor asociate planului experimental, iar suprafetele de raspuns rezultate sunt prezentate in Figurile 20 si 21.

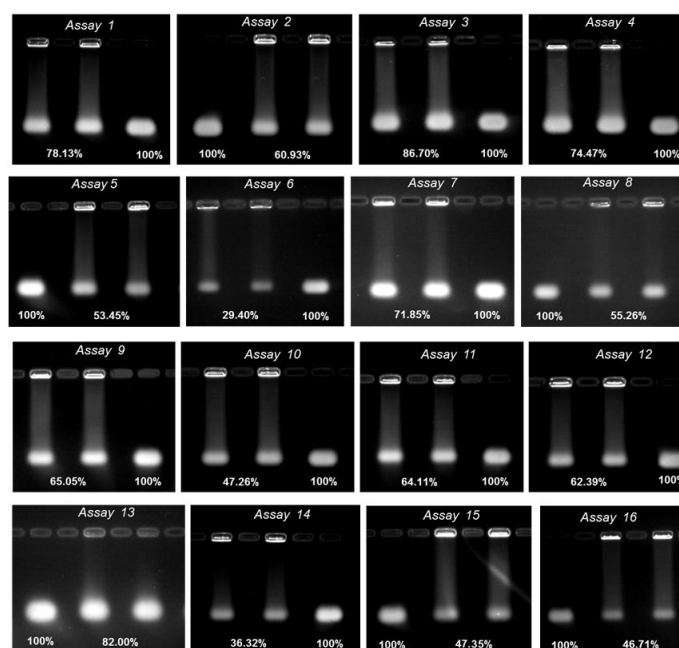


Figura 19. Rezultatele experimentale pentru cele 16 experiente incluse in planul experimental.

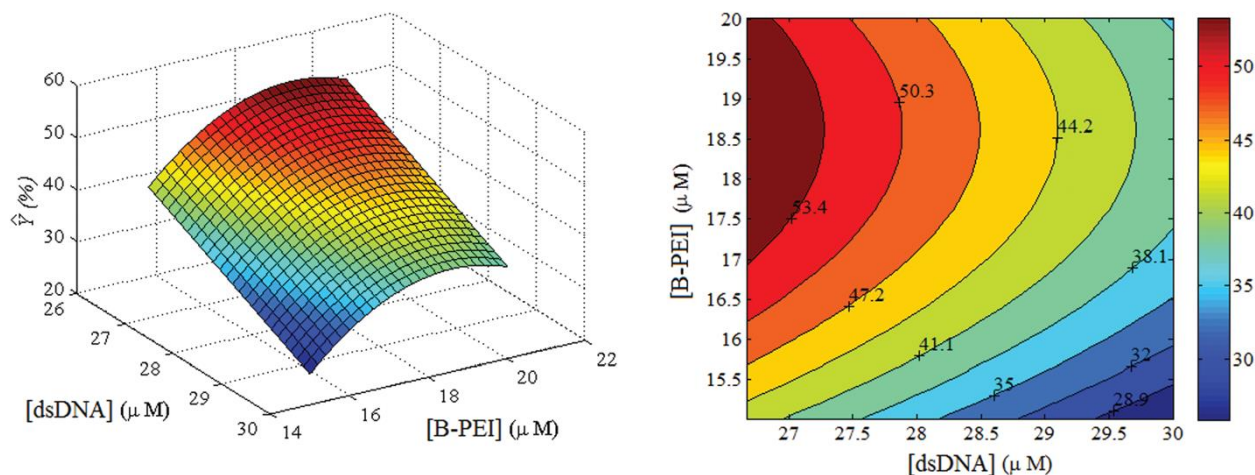


Figura 20. Suprafata de raspuns determinata statistico-matematic pentru dependenta capacitatii de complexare a ADNdc de catre bPEI, la diferite rapoarte de amestecare a acestora si la o aceeaasi valoare a pH-ului, de 7.0 unitati.

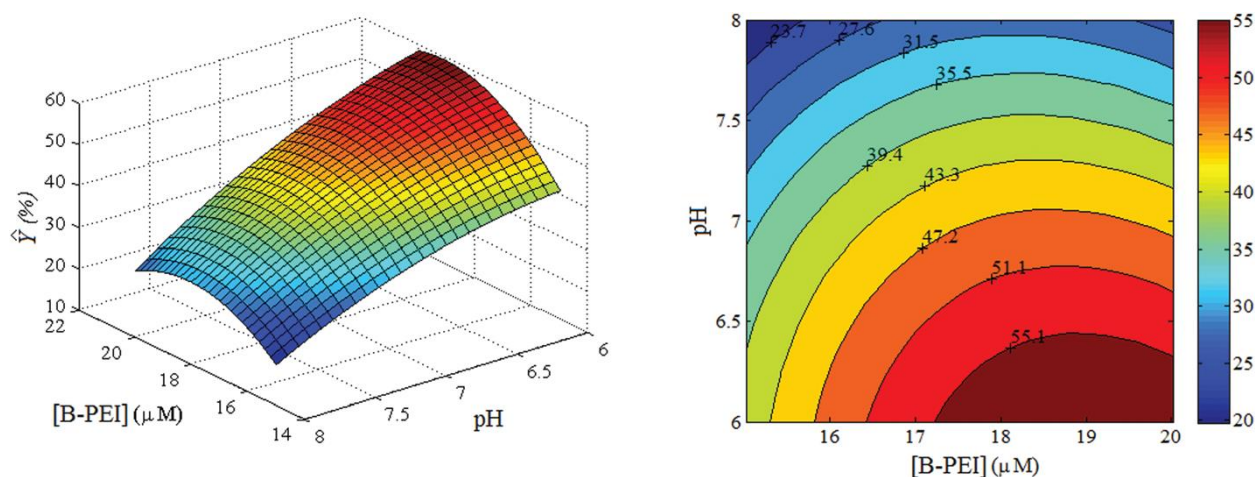


Figura 21. Suprafata de raspuns determinata statistico-matematic pentru dependenta capacitatii de complexare a ADNdc de catre bPEI, la diferite concentratii ale bPEI si la diverse valori ale pH-ului, in conditiile unei concentratii constante a ADNdc, de 28.33 μM.

Suprafata de raspuns redată în Figura 20 reflectă faptul că la concentrații mari ale ADNdc se obțin eficiențe de complexare scăzute, pe când creșterea concentrației bPEI până la 19 μM conduce la o îmbunătățire semnificativă a eficienței de complexare. Pentru valori mai mari ale concentrației bPEI (> 19 μM), efectul creșterii acestui factor asupra eficienței de complexare se atenuează. Dependenta redată grafic în Figura 21 indică faptul că eficiența de complexare a ADNdc de către bPEI crește pe măsura ce valoarea pH-ului de lucru scade de la 8 la 6. Așadar, capacitatea de complexare a ADNdc scut (25 b) crește odată cu creșterea fracției bPEI în amestec, dar și odată cu scăderea pH-ului, dat fiind faptul că gradul de protonare al bPEI sporește la valori acide ale pH-ului.

În baza concluziilor anterioare s-a procedat la optimizarea procesului de formare a poliplexilor prin interacția ADNdc (25 b) cu bPEI (2 KDa), pentru identificarea condițiilor ce asigură eficiențe de complexare apropiate de 100%. Problema de optimizare a fost soluționată aplicând algoritmul simplex [52], pus la

dispozitie de aplicatia software Scilab 5.4.1 (open-source). Solutia optima s-a obtinut pentru concentratiile de 26.33 μM ADNdc si 19.26 μM bPEI, lucrandu-se la valoarea de 5.8 a pH-ului, conditii in care raspunsul prezis de model pentru eficienta de complexare este de 70.52%, iar raspunsul experimental confirmat este de 70.79%. Valoarea experimentală a raspunsului (70.79%) este usor mai mare decat orice valoare a eficientei de complexare rezultata in experientele individuale ale planului experimental, ceea ce confirma faptul ca respectivele conditii sunt cele optime in domeniul de variatie al factorilor de influenta avut in vedere la proiectarea experimentului. In vederea cresterii eficientei de complexare la peste 90%, s-a recurs la interpolarea in rezultatelor experimentale in regiunile de variatie a factorilor neinvestigate prin experimentul proiectat (regiuni pentru care modelele statistico-matematice nu sunt valide implicit), apeland la metoda gradientului [52]. Conform acestei metode cautarea optimului se realizeaza in directia gradientului functiei obiectiv, ea putand fi aplicata chiar daca expresia matematica a raspunsului experimental nu este cunoscuta pentru o anumita regiune de experimentală, cu conditia ca sistemul experimental sa fie in continuare disponibil. In studiul de fata, metoda gradientului a fost aplicata pentru a extinde suprafata de raspuns modelata si pentru a imbunatati astfel eficienta de complexare intre DNAdc si bPEI [50]. Punctul de plecare pentru metodologia de extindere a suprafetei de raspuns pe directia gradientului a fost punctul optim anterior identificat aplicand metoda Nelder-Mead ($z_1 = 26.33 \mu\text{M}$ ADNdc, $z_2 = 19.26 \mu\text{M}$ bPEI, $z_3 = \text{pH } 5.8$). In noua problema de optimizare s-au inclus doar variabilele z_1 si z_2 , corespunzand concentratiilor ADNdc si bPEI, variabile z_3 fiind mentinuta constanta la valoarea optimului anterior identificat, respectiv la pH 5.8, pentru a evita posibila degradare a ADNdc la valori mai acide. Valorile eficacitatii de complexare (raspunsul notat cu Y) in planul experimental extins in mod dinamic au fost determinate prin electroforeza pe gel. S-a constatat ca pentru cresteri ce se incadreaza in intervalul $\Delta z_1 = (28.00 - 26.33) = 1.67 \mu\text{M}$, variatia raspunsului experimental a fost $\Delta Y = (63.31 - 70.79\%) = -7.48 \%$. Similar, pentru $\Delta z_2 = 2.51 \mu\text{M}$, variatia raspunsului a fost $\Delta Y = 29.12 \%$. Pe baza acestor valori, directiile gradientului au fost calculate utilizand ecuatia:

$$d_i^{(k)} = \frac{\left(\partial Y / \partial z_i^{(k)}\right)}{\sqrt{\sum_i \left(\partial Y / \partial z_i^{(k)}\right)^2}} \approx \frac{\left(\Delta Y / \Delta z_i^{(k)}\right)}{\sqrt{\sum_i \left(\Delta Y / \Delta z_i^{(k)}\right)^2}}.$$

Valorile obtinute prin calcul au fost: $d_1 = -0.36004$ si $d_2 = 0.93294$. Aplicand, in continuare, relatia gradientului extins:

$$z_i^{(k+1)} = z_i^{(k)} + \lambda^{(k)} d_i^{(k)} \quad \forall i=1, 2, \dots, n$$

si utilizand un pas de lungime fixa $\lambda = 3$, noile valori ale variabilelor z devin: $z_1 = 25.25 \mu\text{M}$ si $z_2 = 22.06 \mu\text{M}$, carora le corespund conditiile optime pentru o eficacitate sporita a formarii poliplexului (valori oferite de metoda gradientului):

$$z_1 = [\text{DNAdc}] = 25.25 \mu\text{M};$$

$$z_2 = [\text{bPEI}] = 22.06 \mu\text{M};$$

$$z_3 = \text{pH} = 5.8.$$

Eficienta de complexare confirmata experimental pentru aceste noi conditii optimale a fost $Y = 99.96\%$. Imaginea electroforetica prezentata in Figura 22 dovedeste faptul ca noile conditii experimentale asigura sporul scontat al eficacitatii de complexare.

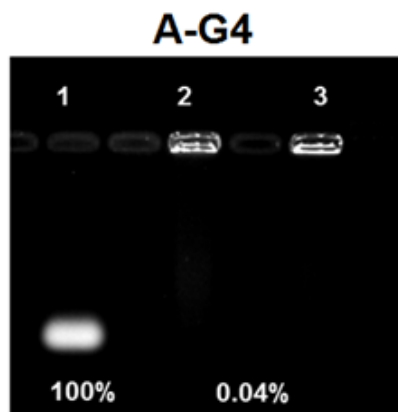


Figura 22. Confirmarea experimentală a noului optim al capacității de complexare a ADNdc (25 b) de către bPEI (2 kDa). Lucrând la un raport $[ADNdc] / [bPEI]$ de 1.145 și la pH 5.8, fracția de ADNdc nelegat este de doar 0,04%. Spotul corespunzător benzii de migrare 1 este dat de o concentrație de 25.55 pm ADNdc, ca martor pentru legare zero (respectiv pentru intensitate 100 % a fluorescenței).

2.2. Elucidarea conformației polipeptidelor formați în urma complexării ADNdc cu carrieri pe baza de polietilenimina

Mecanismul de formare al polipeptidelor s-a investigat prin calcule de dinamică moleculară, utilizând aplicația software YASARA. Simularea dinamică moleculară este un instrument de calcul destinat studiului structurii și funcțiilor biomacromoleculelor, precum și a interacțiunilor dintre acestea. Ea oferă detalii cu privire la deplasările atomice individuale ale macromoleculelor înconjurate de molecule de solvent.

În prezentul studiu, simulările s-au efectuat considerând un tronson de ADNdc cu 25 de nucleotide (strand 5'-CAAGCCCTTAACGAACCTTCAACGTA-3'; catena antisens 5'-TACGTTGAAGTTCGTTAAGGGCTTG-3'). Cele 50 de nucleotide ale catenelor DNAdS au sarcină -52 în stare complet deprotonată și o masă moleculară de 15.43 kDa. În structura modelată cu aplicația YASARA sunt incluse și două grupuri fosfat terminale, atașate în pozițiile 5' ale catenelor, grupuri care contribuie cu două sarcini negative (asociate la O1P și O3P) la valoarea de ansamblu a sarcinii ADNdc. Structura generică a tronsonului 5'-3' al catenei ADNdc este prezentată în Figura 23.

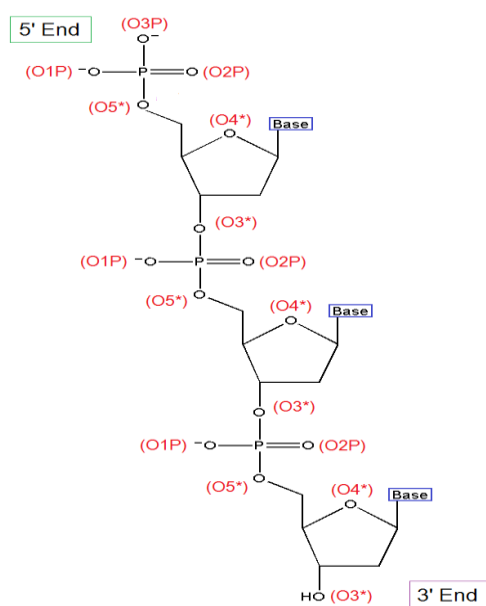


Figura 23. Structura generică a tronsonului terminal 5' al unei catene a ADNdc și modul de notare a atomilor de oxigen ai grupurilor fosfat.

Molecula bPEI a fost construită utilizând aplicația software HyperChem, iar conformația moleculei a fost optimizată la nivelul modelului semiempiric PM3P. Molecula include 32 grupuri aminice (16 grupuri în

catena principala si 16 in segmentele ramificate), respectiv 14 grupari de tip amina primara ($-\text{NH}_2$), 6 grupari de tip amina secundara ($-\text{NH}-$) si 12 grupari de tip amina terciara ($-\text{N}=$). Sarcina de ansamblu a moleculei este asadar +32, in stare complet protonata. Figura 24 prezinta structura si numerotarea atomilor de azot din molecula de bPEI, utilizata pentru modelarea dinamica moleculara.

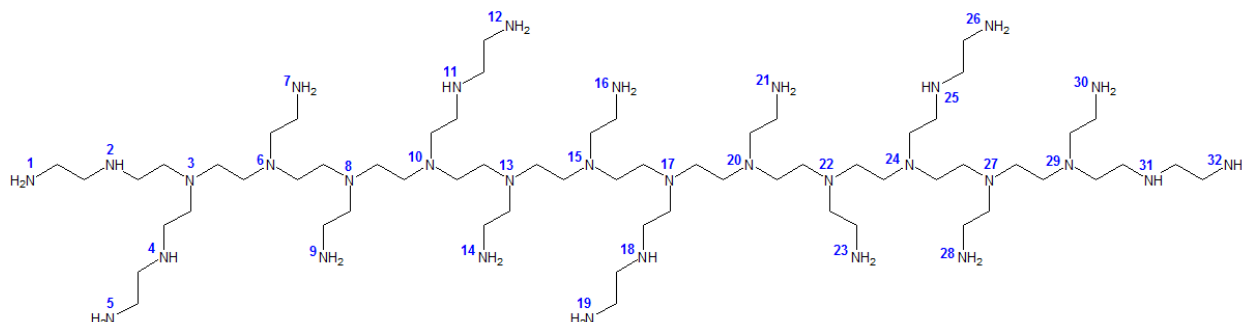


Figura 24. Structura moleculei de bPEI utilizata in calculele de dinamica moleculara.

In conformitate cu protocolul de simulare, macromoleculele (ADNdc si bPEI) au fost incluse in custi de solvatare cubice ($100 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA}$) continind 32373 molecule de apa, parametrizate TIP3P. Per ansamblu, sistemul molecular supus studiului de dinamica moleculara contine 99201 atomi, inclusiv contraionii Na^+ si Cl^- , in proportie de 0,9%. Celula de simulare a fost mai intai echilibrata prin minimizarea energiei, iar macromoleculele de DNAdc si bPEI anterior optimizate au fost considerate drept structuri initiale pentru studiile de dinamica moleculara. S-a considerat ca bPEI este complet protonata la pH 5.8.

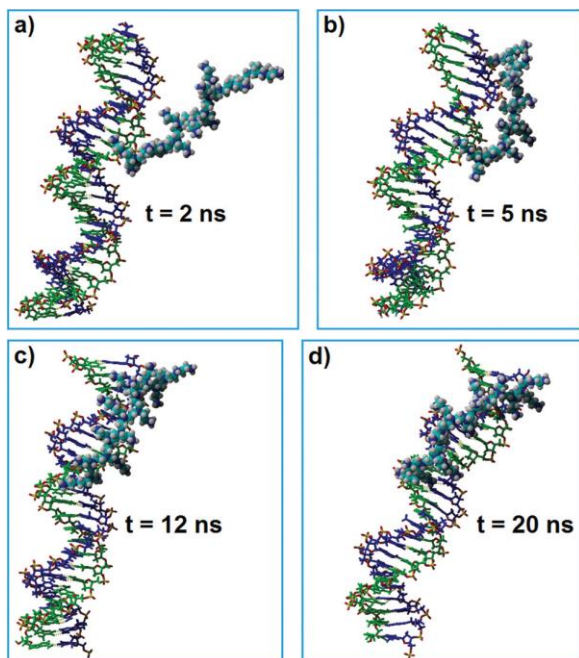


Figura 25. Instantanee de pe calea de reactie conform careia se deruleaza interactia intre ADNdc si bPEI, soldata cu formarea unui poliplex local la „suprafata” acidului nucleic. Pe intreaga cale de reactie, valoarea implicita a pH-ului a fost considerata ca fiind de 5,8 unitati. Timpii de simulare: (a) $t = 2 \text{ ns}$; (b) $t = 5 \text{ ns}$; (c) $t = 12 \text{ ns}$; (d) $t = 20 \text{ ns}$. Moleculele de apa de solvatare au fost omise, pentru claritatea imaginilor.

Figura 25 prezinta instantanee din cursul derularii interactiunilor intre ADNdc si bPEI, la diverse intervale de timp. Astfel, dupa 2 ns intervine o prima interactiune intre cele 2 macromolecule, observandu-se ca pot exista forme locale de poliplecsi. Dupa 5 ns se observa aparitia unei conformatii mai stabile dar incomplet organizata, mediata de legaturi de hidrogen intermoleculare, concomitent cu eliminarea unor molecule de apa. Pentru timpi mai mari decat 12 ns, structurile formate sunt bine definite, cu caracteristici

de poliplex optim, în virtutea interacțiunii grupurilor protonate ale bPEI cu grupurile fosfat ionizate ale ambelor lanțuri ale ADNdc. Se observă și o scădere a distanței între centrul geometric (COG), de la 40 Å la 25 Å, iar numărul de atomi ai moleculelor distincte, participanți la interacție, crește semnificativ (de la 0, pentru $t = 1$ ns, la 500, pentru $t > 12$ ns), fapt care conduce la formarea legăturilor de hidrogen între atomii de hidrogen ai grupurilor aminice ale bPEI și atomii de oxigen din catenle de ANDdc.

Rezultatele simulării prin dinamica moleculară au elucidat mecanismul molecular al complexării între ADNdc și bPEI, aducând informații necesare pentru proiectarea edificiilor moleculare ale vectorilor genici non-virali, pentru ca aceștia să devină capabili să împacheteze, transporte și elibereze gene în celulele țintite.

2.3. Studiul mecanismului de formare a poliplexurilor prin complexarea ADNdc cu carrieri amfipatici, pe baza de polietilenimina

Vectorul amfipatic conținând (în medie) 3.7 molecule de bPEI cu masă moleculară de 2 kDa atașate unui ciclu siloxanic a fost sintetizat conform reacțiilor prezentate în Schema 3. Figura 26 prezintă structura și conformația vectorului amfipatic D4-PEI.

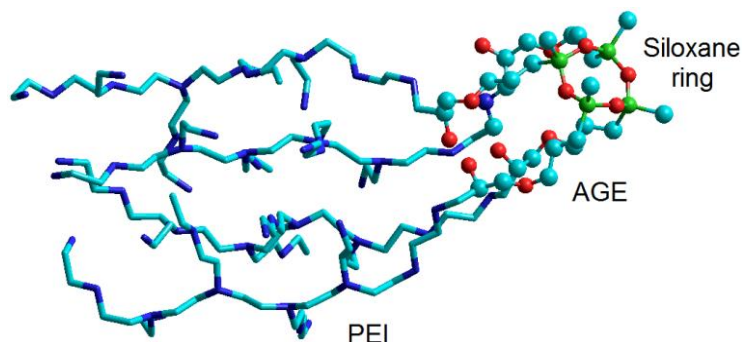
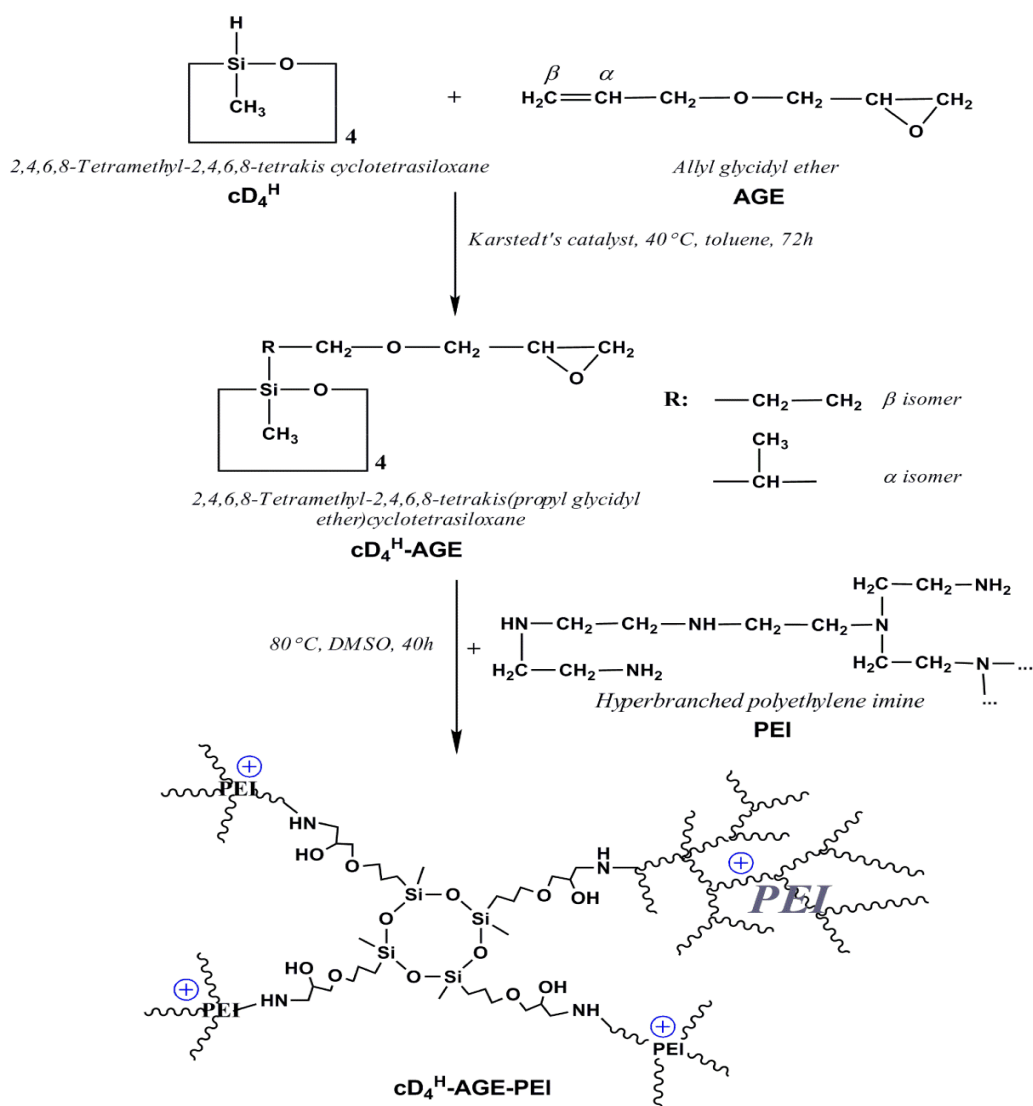


Figura 26. Structura moleculară optimizată a conjugatului cD4H-AGE-PEI, stabilită prin calcule semiempirice PM3.

Capacitatea de interacție ionică a conjugatului cD4H-AGE-PEI cu ADNdc (25 b), conformația poliplexului local rezultat și comportamentul dinamic al partenerilor în mediu apos, la pH fiziologic, au fost investigate prin tehnici ale chimiei computaționale.

Primul pas în determinarea conformației poliplexului D4-PEI/ADNdc a constat în optimizarea geometriei moleculare a conjugatului D4-PEI, prin calcule semiempirice cuantice PM3, *in vacuo*. Conform rezultatelor calculelor PM3 (a se vedea Figura 26), D4-PEI aparține grupului punctual de simetrie C₁, cu următoarele caracteristici: căldura de formare -1,029.2 kcal/mol, lungimea maximă 35.746 Å, zona accesibilă pentru solvent 2,480 Å² și un dipol momentului apreciabil, de 8,30 Debyes.

Dinamica interacțiunii între D4-PEI și ADNdc a fost pusă în evidență utilizând aplicația software YASARA, destinată studiului (bio)macromoleculelor organice. Conform protocolului de simulare, ADNdc și D4-PEI au fost solvate cu 32823 molecule de apă parametrizate TIP3P, în cutii de solvare cu dimensiunile de 100 Å x 100 Å x 100 Å. Figura 27 prezintă instantanee selectate la diverse intervale de timp, pe calea de reacție după care se dezvoltă interacția ADNdc (25 b) cu molecula policationică amfipatică D4-PEI.



Schema 3. Reactiile de obtinere a vectorului non-viral amfipatic cationic, D4-PEI.

La momentul initial ($t = 0$), ADN si carrier-ul sunt separate printr-o distanta de 30.5 Å între centrele lor geometrice (distanța COG). La timpul de simulare $t = 2$ ns, distanța COG intermoleculară se reduce până la 14.32 Å, ca urmare a interacțiunii electrostatice, fapt care conduce la formarea unor structuri locale poliplexice evidente. Pentru valori mai mari ai timpilor de simulare, structura poliplexului se stabilizează progresiv. Potrivit calcululelor de dinamica moleculară, energia potențială a sistemului începe să descrească din chiar din primele momente ale interacțiunii, ajungând la o valoare foarte mică după $t=10$ ns, când are loc stabilizarea poliplexului. Aceasta observație sugerează faptul că formarea poliplexului se derulează printr-un proces energetic favorabil. La timpi de simulare mai mari decât 4 ns, numărul de atomi intermoleculari ce participă în interacție variază între 500 și 611, conducând la formarea a mai mult de 8 legături de hidrogen intermoleculară (corespunzătoare unei energii totale mai mari decât 40 kcal/mol), care asigură o mai bună stabilitate a poliplexului. Legăturile de hidrogen se formează între grupările aminice ale lanțurilor bPEI și atomii de oxigen din catena ADNdc (în special cu O1P și O2P, iar sporadic cu O3*).

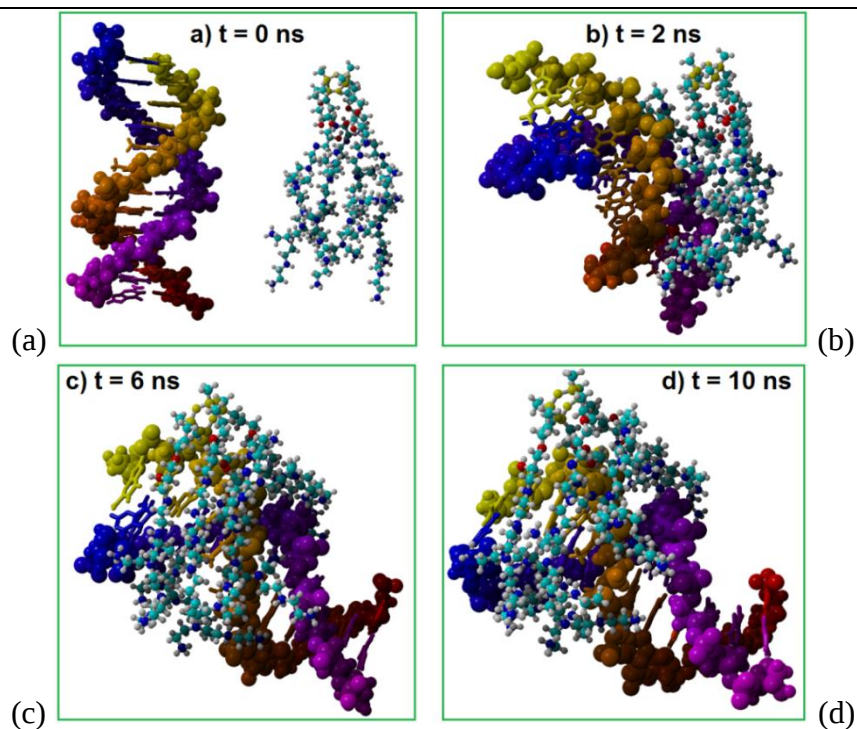


Figura 27. Instantanee selectate la diverse intervale de timp din calculul de dinamica moleculara, in cursul interactiei ADNdc cu carrierul amfipatic D4-PEI.

Din datele de simulare *in silico* [53] a rezultat faptul ca lanturile de bPEI sunt orientate inafara planului ciclului siloxanic, generandu-se astfel o structura amfipatica, hidrofila prin effectul cumulativ al lanturilor de PEI (care sunt capabile sa interactioneze cu acizii nucleici), respectiv local hidrofoaba in virtutea ciclului siloxanic (ce tinde sa se izoleze steric de domeniile ionice). Coeficientul de partitie al D4-PEI, in stare neionizata, in amestec 1-octanol / apa, cuantificat prin valoarea LogP, reprezinta o masura a amfipatiei carrierului dar si a capacitatii poliplexului de a traversa membranele lipidice. Valori pozitive ale LogP indica o solubilitate mai mare in faza non-apoasa, in timp ce cele negative indica o predilectie pentru medii apoase. Numai molecule amfifile avand volume moderate si valorile LogP in intervalul $-2 \div -4$ au capacitatea de a penetra membranele celulare, in virtutea unui mecanism de difuzie pasiva (care nu implica endocitoza, sau transportul vectorizat). Moleculele care au valori LogP negative mai mari sunt puternic respinse, iar cele cu valori pozitive ale LogP sunt sechestrate in straturile lipidice. Valoarea LogP determinata experimental pentru conjugatul D4-PEI este de -1.902 ± 0.06 , definind carrierul sintetizat drept o molecula cu hidrofilie moderata, ce are capacitatea de a penetra barierele membranelor lipidice prin mecanisme pasive. Avand in vedere numarul mare de grupari aminice protonabile ale PEI ramase libere dupa complexarea cu ADN, valoarea neasteptat de scazuta a LogP (care indica un raport de partitie de aproximativ 79 : 1 intre faza apoasa si non-apoasa, cand D4-PEI este in stare cvasi-protonata, la o valoare a pH de 10.8) poate fi asociata tendintei de segregare spatiala relativa a domeniilor hidrofile si hidrofoabe ale carrierului amfipatic, domenii care nu se impiedica steric reciproc. Aceasta ipoteza a fost confirmata si prin calcule de chimie cuantica.

Concluzia studiului de dinamica moleculara in cursul interactiei ADNdc cu carrierul amfipatic D4-PEI este aceea ca, prin structura sa chimica si prin conformatia sa spatiala, carrierul dezvoltat in cadrul proiectului reprezinta un vector genic cu certa eficienta in transfectie. Structura si functionalitatea sa pot fi inasa imbunatatite prin atasarea de tronsoane proteice cu rol in recunoasterea tintelor celulare (inclusiv anticorpi), dar si cu rol de facilitare a penetrarii membranelor (*cell penetrating peptides*).

2.4. Studiul posibilitatilor de realizare a unor vectori genici formati extemporaneu, prin autoasamblare dinamica in prezenta ADN

In etapele anterioare ale proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 s-au raportat, rezultatele sintezei de carrieri si ale generarii de poliplexsi recurand la vectori non-virali sintetizati in prealabil (Figura 28.a) [50, 54], rezultati prin asamblare supramoleculara (Figura 28.b) [55], sau rezultati in urma rearanjarilor prin mecanisme ale chimiei dinamice combinatoriale (Figura 28.c) [56].

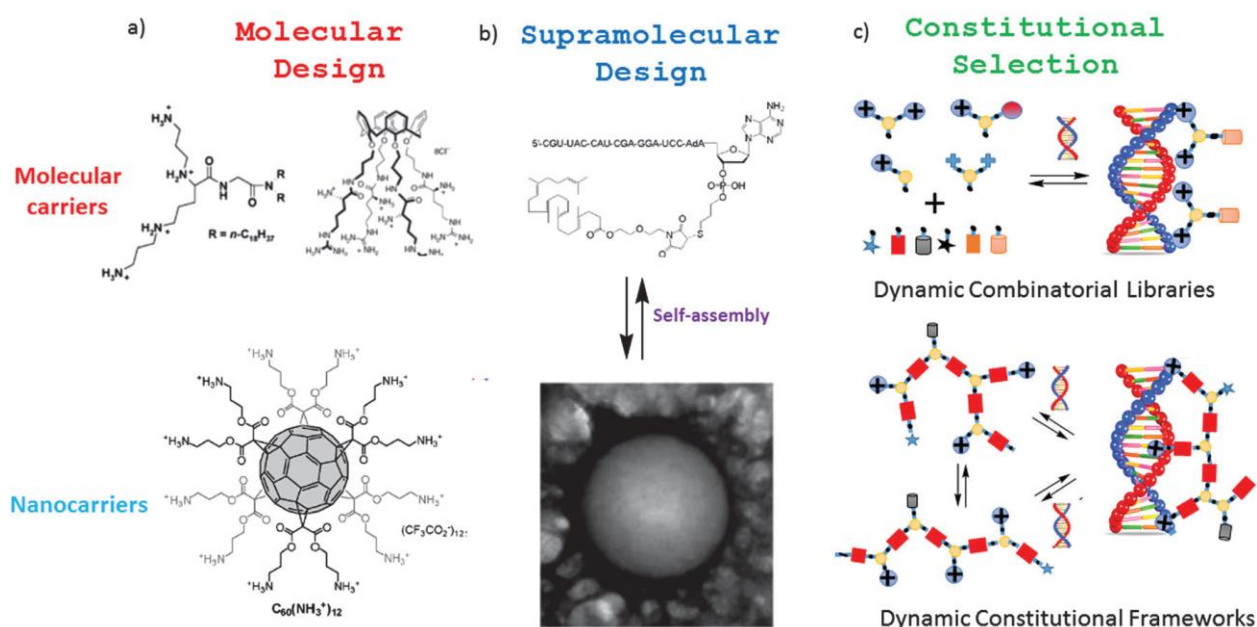
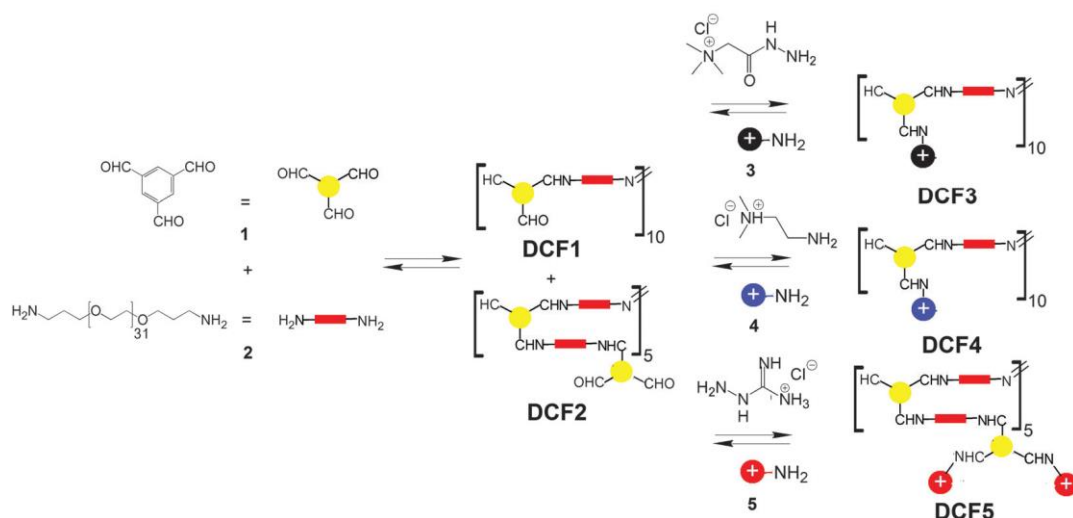


Figura 28. Variante de generare a cargocomplexsilor recurand la carrieri moleculari (a si b) si la nanosisteme cu autoasamblare (c).

In cadrul etapei 2015 a proiectului s-a studiat posibilitatea de formare a unor structuri poliplexe prin rearanjarea componentelor mic-moleculare aflate in sistem, in functie de natura acestora (structura lor chimica) si de conditiile de reactie (temperatura, concentratie, natura solventilor etc.).

In functie de natura si functionalitatea componentelor aflate in sistem, chimia dinamica constitutională creaza oportunitatea autoasamblării dinamice a acestora, la solicitarea partenerilor macromoleculari. Se pot obtine astfel combinatii liniare si/sau retele de componente interconectate (reticulate) reversibil prin conectori unitari (molecule de sine statatoare). Acestia din urma pot contine grupari functionale cu activitate sinergica in promovarea interactiilor cu acizii nucleici, dar si cu membranele celulare.

Prezentul studiu aplica noul concept DCFs (Dynamic Constitutional Frameworks) pentru recunoasterea ADN. In acest sens, s-au utilizat macromonomeri PEG liniari, trialdehide (cu rol de conector) si molecule ionizate pozitiv, pentru crearea unui sistem cu asamblare dinamica, apt a recunoaste particularitatile compositionale si conformationale ale acizilor nucleici. Schema 4 prezinta conceptul generarii prin asamblare dinamica a unor structuri covalente pozitiv ionizate, apte a interactiona electrostatic cu acizii nucleici.



Schema 4. Tehnica si etapele sintezei DCFs.

Combinarea PEG (dreptunghiul rosu) prin intermediul 1,3,5 benzen-trialehidei (cercul galben) conduce la formarea DCF1/DCF2 = 1/1 (mol : mol).

Interactia ulterioara cu un amestec de compusi cu grupari terminale incarcate pozitiv (reactiv Girard T, N,N-dimetil-etinen-amina protonata, sau cu clorhidrat de aminoguanidina) generaza sistemele DCF3 ÷ DFC5, capabile sa recunoasca ADN-ul.

Capacitatea sistemelor DCF1 ÷ DFC5 de a lega ADN a fost evaluata prin monitorizarea mobilitatii electroforetice a ADN-ului dublu catenar (din sperma de somon, cu circa 200 baze azotate) si plasmidic (plasmida EYFP), la electroforeza pe gel, din solutii apoase cu diferite rapoarte N/P, in prezenta respectivelor sisteme cationice. In acest scop s-au preparat solutii tamponate, la rapoartele N/P de 1, 3, 5, 10, 15 si 20, obtinute prin amestecarea ADN-ului cu cantitati adecvate de DCF1 : DCF2 (control negativ), DCF3, DCF4 si DCF5. Respectivetele solutii au fost apoi incarcate in godeurile gelului. Figura 29 reda rezultatul testului de migrare / complexare a ADN-ului in gelul de agaroz. Controlul negativ nu a relevat retentia ADNdc (Figura 29.a), in timp ce DCF3 si DCF4, in prezenta de ADNdc, au prezentat capacitate de legare diferita, functie de raportul N/P (Figura 29.b si 29.c), dar pentru nici un raport testat nu au prezentat capacitate totala de legare a ADN-ului. DCF5 a asigurat retinerea neta a ADNdc incepand cu raportul N/P = 3 (Figura 29.d, banda de migrare 3), demonstrand astfel interactiunea puternica intre fragmentul molecular de guanidiniu si ADNdc. Avand in vedere faptul ca sistemul DCF5 a prezentat cea mai buna actiune de complexare a ADN-ului dublu catenar, s-a decis testarea sa si in raport cu ADN-ul plasmidic (EYFP, 4500 bp). Si in acest caz, s-a constatat ca pentru rapoarte N/P mai mari de 1, sistemul DCF5 este capabil a complexa plasmida (Figura 29.e).

Studiul realizat in etapa 2015 a proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 a demonstrat faptul ca, chiar la rapoarte N/P mici, legarea ADNdc este mult mai eficace atunci cand in structura DCF se regasesc grupari guanidinice (la un raport impresionant de mic, inferior echimolaritatii, respectiv N/P < 1). Sistemele cu grupari amoniu (DCF3, DCF4) nu asigura complexari satisfacatoare. Structura DCF5 poate fi asimilita cu structura histonelor, care reprezinta modelul perfect de entitate moleculara capabila a impacheta ADN-ul. Simplitatea strategiei de sinteza propusa pentru realizarea sistemului DCF5 (cea care a fost capabila sa autogenereze retele constitutionale dinamice in prezenta ADN) reprezinta o alternativa viabila pentru aplicarea sistemelor dinamice in terapia genica.

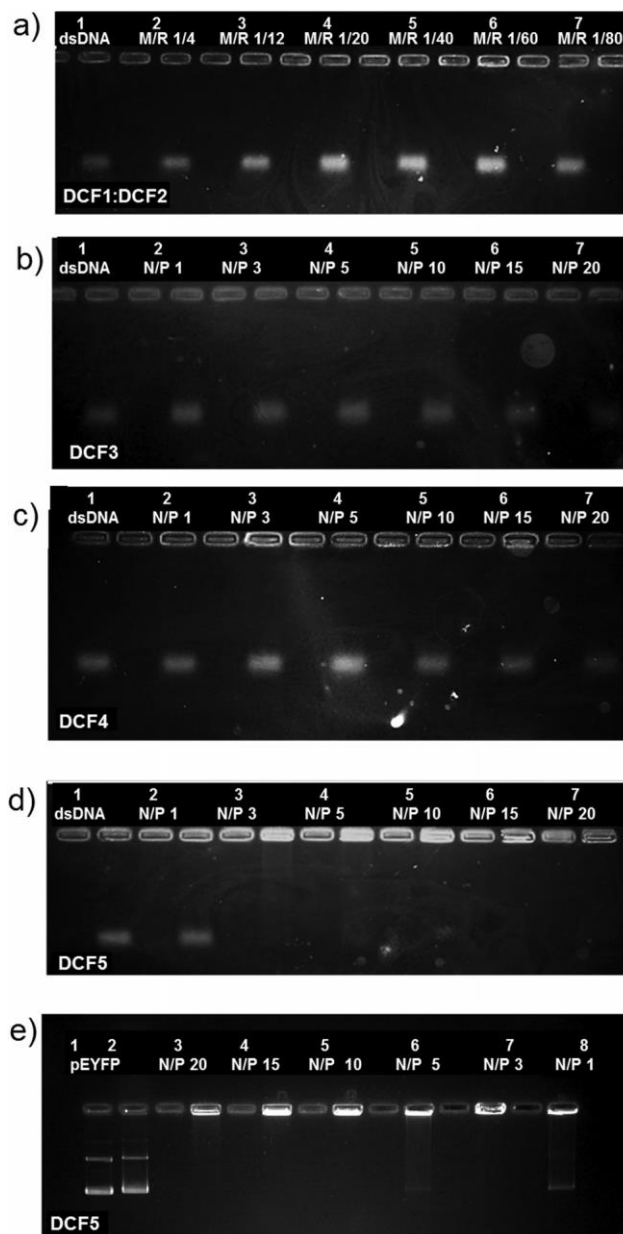


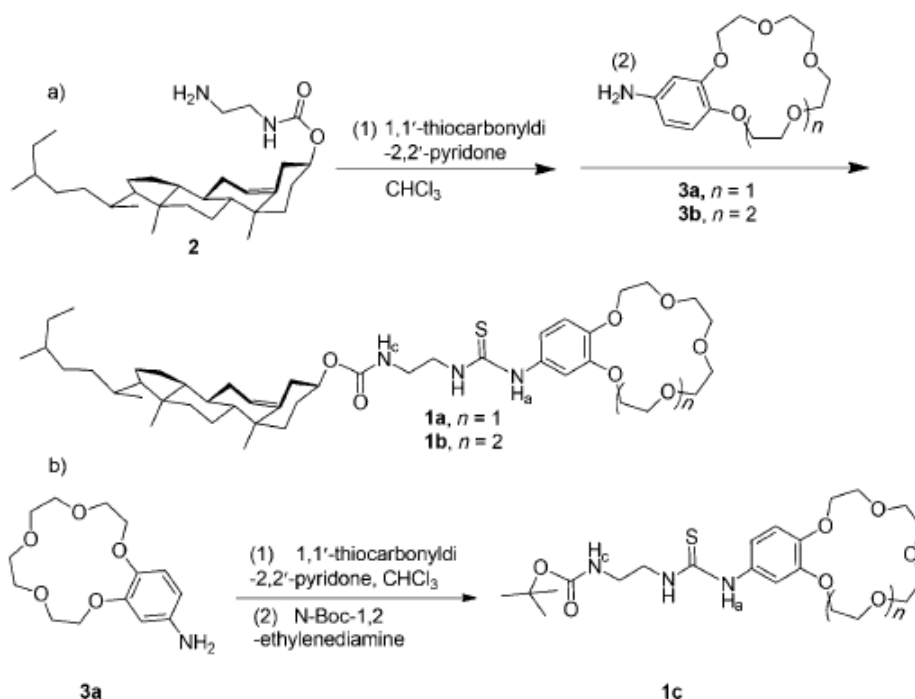
Figura 29. Cromatogramele obtinute la separarea electroforetica in gel a:
 (a) DCF1 : DCF2 (control negativ); (b) DCF3/ADNdc; (c) DCF4/ADNdc;
 (d) DCF5/ADNdc; (e) DCF5/pEYFP. Cantitatile de ADNdc si de pEYFP au fost mentinute
 constante in toate experimentele si utilizate drept referinta in banda 1.
 $DCF1 : DCF2 / DNAdc = 1/4, 1/12, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80$ (benzile 2 ÷ 7).
 In cazul $DCF3\div5$: $N/P = 1, 3, 5, 10, 15$ (benzile 2 ÷ 7).

2.5. Studiul sistemelor destinate facilitarii transfectiei mediate de vectorii genici non-virali, prin intermediul canalelor ionice

Canalele ionice artificiale selective pentru K^+ , pe baza colesterol si eter coroana, reprezinta unul dintre sistemele care mimeaza caile la care celulele apeleaza pentru asigurarea transportului transmembranar al compusilor mic-moleculari, inclusiv al contraionilor cu care biomacromoleculele se antureaza intracitoplasmatic. In procesele de echilibrare compositionala a citosolului, celulele transfectate necesita

importul unor electroliti din mediul extracelular, asa cum este si matricea ce gazduieste temporar cargocomplecsii transfectanti. Studiul unor sisteme artificiale destinate facilitarii transportului de masa prin membrane lipidice ofera informatii utile pentru proiectarea compositionala a matricelor gazda.

Schimbul de ioni prin membrana lipidica este o conditie prealabila pentru multe procese fiziologice [57, 58]. Canalele ionice naturale joaca un rol semnificativ in sprijinirea metabolismul celulelor vii, si disfunctia lor poate duce la o serie de boli, chiar la moarte . Intre canale ionice, canalul KCSA K^+ este foarte selectiv pentru cationii de K^+ . Abordari biomimetice au fost folosite pentru a dezvolta canale artificiale supramoleculare, cu speranta de a ajunge la selectivitatea ridicata similara canalului KCSA [59-67]. In studiul nostru [68] am proiectat si sintetizat o serie de compusi pe baza de eteri coroana si colesteryl-tioureido-etilamida, capabili sa se autoasambleze in canale ionice robuste, cu o selectivitate extrem de ridicata pentru K^+ , apropiata de cea a canalelor naturale. Schema 5 prezinta reactiile implicate in sinteza precursorilor.



Schema 5. Sinteza compusilor: a) colesteryl tioureidoetilamida-15-eter coroana-5 (1a), si colesteryl tioureidoetilamida-18-eter coroana-6 (1b); b) compusul de referinta tert-butiltioureidoetilamida-15-eter coroana-5 (1c).

Compusii sintetizati pe baza de tioureido-etilamida, eter coroana si colesterol formeaza, prin legaturi de hidrogen, asamblari de tip canal cu eterii coroana, aranjate foarte aproape una de alta si indreptate spre centrul canalului, generand astfel filtrele cu selectivitate ionica (Figura 30). Resturile de colesterol au, pe de o parte, scopul de a stabili canalele ionice, iar pe de alta, de a actiona in calitate de „brate” de ancorare, inducand difuzivitate scazuta si preorganizarea a macrociclurilor in straturile lipidice.

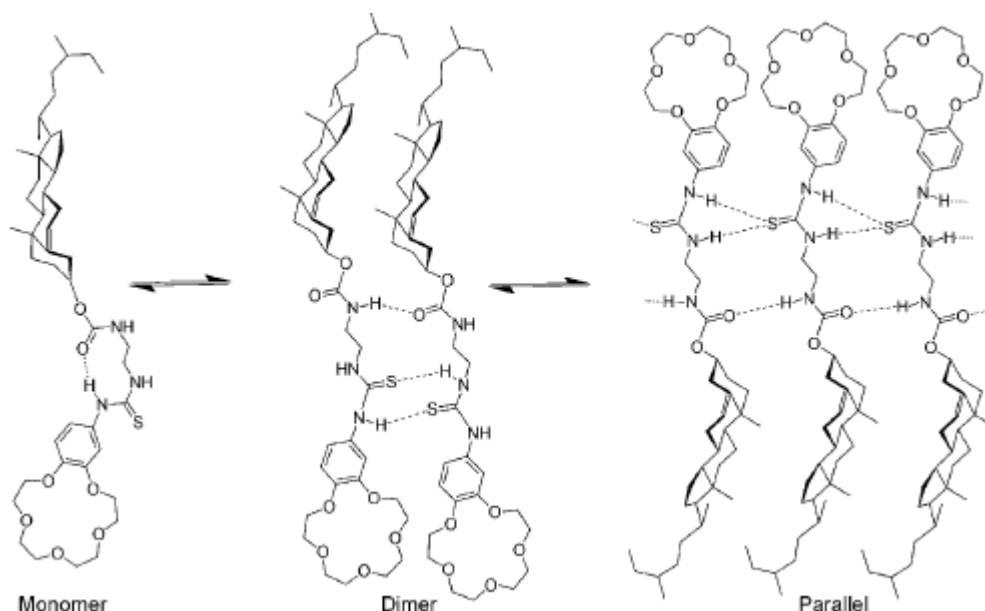


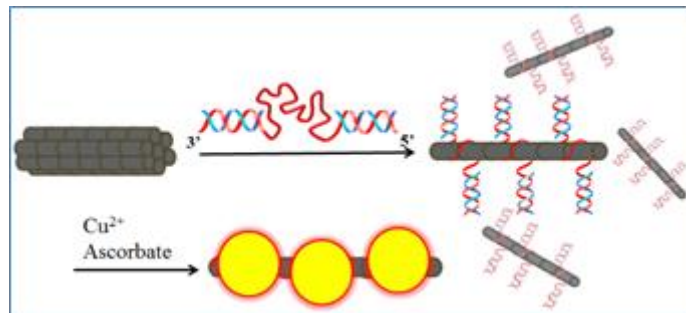
Figura 30. Echilibrele dependente de concentratie intre legaturile de hidrogen intramoleculare din structura monomerului si legaturile de hidrogen intermoleculare stabilite la nivelul dimerului si oligomerilor.

Rezultatele obtinute au aratat ca anumiți compusi sintetizati sunt complet inactivi fata de cationii de Li^+ , Na^+ si Cs^+ , dar extrem de activi fata de cationii de K^+ si slab activi fata de cationii de Rb^+ . Rezultatele obtinute conduc la concluzia ca selectivitatea ridicata a canalelor ionice artificiale pe baza de colesteriltioureido eter coroana pentru K^+ este similara cu cea a canalului KCSA K^+ . Experimentele de transport de ioni arata ca aceste structuri supramoleculare formeaza asamblari de tip membrana, cu evidenta conductibilitate cationica. Macrociclurile indreptate inspre partea hidrofila a canalului faciliteaza transportul cationilor, permitand controlul selectiv al transportului ionilor K^+ , fapt rareori observat in sisteme artificiale cu auto-asamblare.

2.6. Studiul sistemelor destinate facilitarii transfectiei mediate de vectorii genici non-virali, prin retinerea ADN liber in matricele gazda

In situatiile in care cargocomplecsii largheaza ADN-ul pe care il transporta, se impune ca in matricele gazda sa fie prezente sisteme capabile a captura local acizii nucleici. O astfel de actiune poate fi asigurata de nanotuburile de carbon „decorate” cu nanoparticule metalice. In acest sens, in cadrul etapei 2015 s-a derulat un studiu asupra asistarii asocierii ADN cu entitati nanoparticulate.

O serie de nanoparticule hibride, generate prin „decorarea” nanotuburilor de carbon (SWCNT) cu nanoparticule metalice, in special ale metalelor tranzitionale, au aplicatii in spectroscopia Raman de suprafata amplificata, in special in imagistica RAMAN a probelor biologice [69]. In studiul intreprins [70] a fost dezvoltata o metoda noua si facila pentru dispersarea, mediata de ADN, si decorarea SWNTs cu nanoparticule de cupru, in solutie tampon. Metoda exploateaza concentratiile scazute de Cu^{2+} si ascorbat de sodiu ca agent reductor. Metoda recurge la secvente ADN sintetice monocatenare pentru dispersarea necovalenta a SWNT si domenii de ADN dublu catenar, in calitate de substrat pentru cresterea nanoparticulelor de cupru. Schema 6 descrie tehnica de dispersare elaborata.



Schema 6. Dispersarea nanotuburilor de carbon de catre ADN ce contine regiuni de ADN monocatenar si domenii scurte de ADN dublu catenar, pentru formarea de nanoparticule de cupru in solutie.

In conditii experimentale blande, suprafata SWNT ramane in mare masura neperturbata, mentinand proprietatile specifice ale nanotuburilor de start. Imagistica TEM a demonstrat formarea de SWNTs decorate cu nanoparticule de cupru uniforme dimensional (diametrul echivalent mediu de 309 nm), obtinute aplicand strategia de dispersare propusa in Schema 6. Figura 31 prezinta alcatuirea si dimensiunile nanoparticulelor generate.

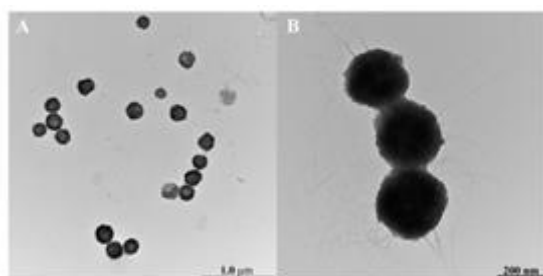


Figura 31. Imagini TEM ale nanoparticulelor hibride CuNP/SWNTs.
(A) Pozitionarea CuNPs de-a lungul unui sau mai multor SWCNT individuale.
(B) Zoom in imaginea unui hibrid CuNP/SWNTs care releva mai multe nanotuburi acoperite cu CuNPs.

Rezultatele obtinute probeaza faptul ca metoda propusa evita modificarea chimica a SWNTs, mentinand performantele mecanice si electronice ale nanotuburilor. Aplicarea hibrizilor SWNT-cupru in imagistica Raman a celulelor vii este, in prezent, in curs de investigare.

Obiectivul 3. ELABORAREA UNOR PROTOCOALE DE TESTARE ELECTROCHIMICA A SISTEMELOR LA NANOSCARA, UTILE IN TRANSFECTIE

Formarea structurilor autoasamblate de tip micelar, precum si atasarea AND-ului la suprafata micelilor pot fi evaluate prin tehnici electrochimice, evidentiind disparitia picurilor caracteristice anumitor grupari functionale ale precursorilor utilizati si/sau aparitia altora noi, specifice complexului format. In acest sens, in cadrul proiectului, s-au utilizat tehnici de voltametrie ciclica pentru a evalua formarea structurilor micelare avand la suprafata aminoguanidina legata de un compus organic trifunctional (benztrialehida). Primul impediment intampinat a fost solubilitatea scazuta a benztrialehidei in apa; pentru a-l depasi si pentru a conduce experimentele in solutii apoase, activitatea electrochimica a acestui compus a fost evaluata prin depunerea benztrialehidei, prin evaporare din acetonitril, pe suprafata electrodului de lucru. Masuratorile au fost apoi realizate in mediu acid (H_2SO_4 50 mM).

Figura 32 prezinta compararea voltamogramelor obtinute pentru benztrialehida si structurile micelare. Conversia electrochimica a gruparii carbonil la alcoolul primar corespunzator conduce, in mediu acid, la aparitia picului de reducere, la un potential de circa -1 V. Inexistenta acestui pic de reducere in cazul structurii micelare indica faptul ca structura nativa a benztrialehei a fost afectata prin atasarea aminoguanidinei.

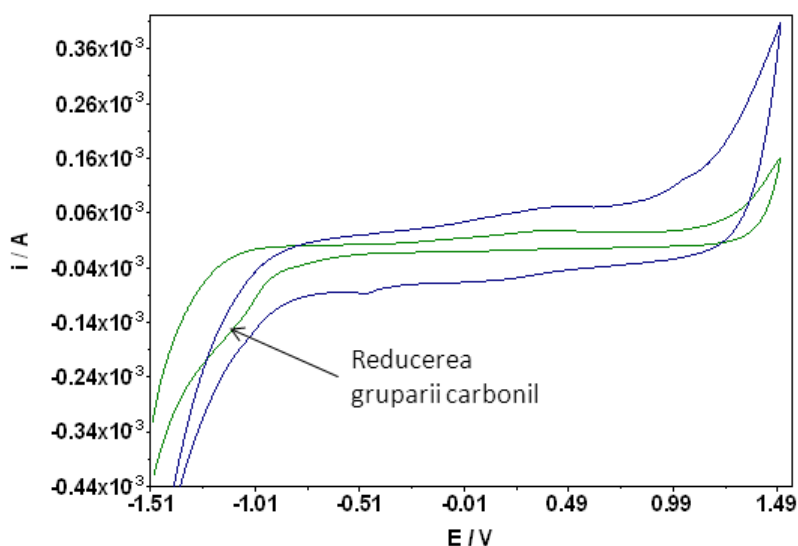


Figura 32. Voltametrie ciclica in H_2SO_4 50 mM pentru benztrialehida (linia verde) si structurile micelare (linia albastra).

Figura 33 ilustreaza comparativ comportamentul electrochimic al aminoguanidinei si pe cel al structurii micelare. Se constata ca picul de oxidare care apare la 1.17 V, caracteristic aminoguanidinei, nu se regaseste in voltamograma ciclica a micelilor, confirmand implicarea acesteia in legaturile amidice cu benztrialehida.

Curentul capacitiv crescut, observat in cazul micelilor prin comparatie cu al celor doi precursori individuali, indica marirea accentuata a suprafetei efective a electrodului, prin depunerea micelilor sub forma de film. Cresterea acestui curent odata cu numarul de scanari este prezentata in Figura 34, indicand obtinerea unei morfologii diferite prin acumularea respectivelor micle, incarcate pozitiv, la suprafata electrodului.

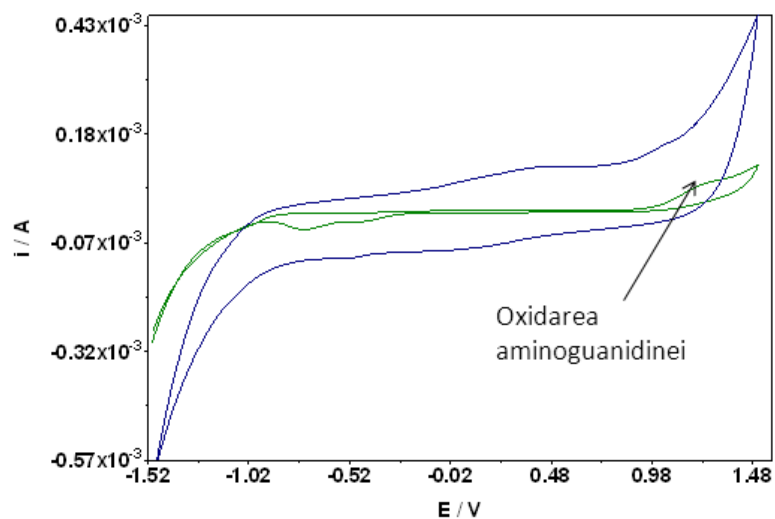


Figura 33. Voltametrie ciclica in H_2SO_4 50 mM pentru aminoguanidina (linia verde) si structurile micelare (linia albastra).

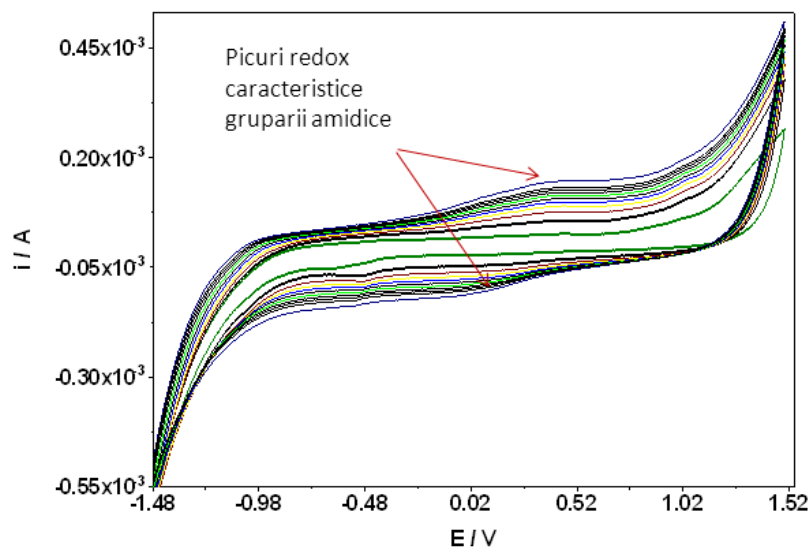


Figura 34. Stabilitatea electrochimica a micelilor in H_2SO_4 50 mM.

Obiectivul 4. REALIZAREA DE MATRICE MACROMOLECULARE BIOMIMETICE, ACTIVE IN TRANSFECTIE

În cadrul celui de-al patrulea obiectiv al etapei s-au inițiat studii preliminare privind activități aferente anului 2016. Astfel, au fost abordate două tematici legate de înzestrarea matricelor macromoleculare cu abilitatea de a răspunde unor stimuli (factori de influență uzuali) ce variază în plaje fiziologice.

4.1. Realizarea și caracterizarea de nanoparticule sensibile la pH / temperatură, pe baza de derivați de pullulan amfifili cationici

Polizaharidele solubile în apă au multiple aplicații, care derivă din proprietățile lor remarcabile, cum ar fi biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și lipsa de toxicitate. Recent, nanoparticulele polimerice pe baza de polizaharide naturale au intrat în etapa de testare clinică pentru vectorizarea (vehicularea spre celule tinta) și eliberarea controlată a speciilor farmacologice. În acest spirit, în cadrul etapei 2015 au fost concepuți și preparați derivați noi ai pullulanului, cu proprietăți amfifile și grupe cationice, cu lanțuri alchilice scurte și funcții cationice situate pe același lanț pendent. Au fost investigate proprietățile de autoasamblare ale derivaților de pullulan în soluție apoasă, cu scopul de a evalua capacitatea de a genera sisteme de nanoparticule cu abilități de vectorizare a speciilor biomacromoleculare, inclusiv a acizilor nucleici.

Pullulanul a fost modificat cu dimetilaminopropilamina, folosind carbonildimidazol ca agent de cuplare. Derivații de pullulan amfifili cu caracter cationic au fost caracterizați prin FTIR, ^1H și ^{13}C -RMN, analiză elementală și titrare conductometrică. Procesul de auto-asamblare ale polielectrolitilor amfifili a fost studiat prin fluorescență și măsurători de vâscozitate, în funcție de gradul de substituție (DS) a grupărilor –OH cu grupări alchilice cationice. S-a demonstrat că întotdeauna concentrația critică micelară (CCM) descrește cu creșterea gradului de substituție. De asemenea, directă proporționalitate între vâscozitate și concentrația polimerului este una dintre caracteristicile derivaților cu valori mici ale gradului de substituție. Creșterea continuității de grupări pendente induce agregarea în două etape, demonstrând coexistența legăturilor de hidrogen intermoleculare (atribuite grupărilor –NHCO– și –OH situate de-a lungul lanțului macromolecular al pullulanului) și interacțiunilor hidrofobe intra- și inter-moleculare între fragmentele hidrofobe de tipul –CH₂CH₂CH₂–. Rezultatele obținute demonstrează faptul că derivații de pullulan amfifili cationici pot îngloba molecule hidrofobe, ceea ce deschide posibilitatea utilizării lor în domeniul vectorizării și eliberării acizilor nucleici.

4.2. Sinteza și caracterizarea de copolimeri de N-izopropil-acrilamida și acid maleic, capabili de autoasamblare / disociere în funcție de pH și/sau temperatură, cu rol de nano-containere în aplicații bio-medicale

Într-o altă serie de experimente s-au conceput și preparați copolimeri de N-izopropilacrilamida și acid maleic, poli(NIPAAm-co-MA), care reprezintă o clasă promitoare de polimeri sensibili la două tipuri de stimuli externi. Polimerii sensibili la stimuli au un cert potențial în modularea caracteristicilor matricelor macromoleculare ce gazduiesc acizi nucleici. În particular, copolimerizarea NIPAAm cu MA conferă polimerului atât sensibilitate la pH (datorită grupărilor –COOH din structura MA), cât și la variații ale temperaturii (datorită unităților NIPAAm). În soluție apoasă, macromoleculele polimerului sensibil la stimuli trec din stare solubilă în stare insolubilă, în funcție de pH și temperatură. Astfel, macromoleculele liniare de poli(NIPAAm-co-MA), se autoasamblează / disociază după cum pH-ul și/sau temperatura se modifică, fapt care permite utilizarea lor drept nano-containere pentru aplicații biomedicale.

**Rezultatele științifice ale derularii etapei 2015
in cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028**

Sinoptic:

- lucrari stiintifice publicate: **19**;
- lucrari stiintifice acceptate pentru publicare: **4**;
- lucrari stiintifice publicate in periodice ale unor conferinte: **3**;
- lucrari stiintifice trimise spre publicare: **8**;
- participari la manifestari stiintifice: **22**;
- lucrari prezentate ca poster: **15**.
- sustinere teze de doctorat cu finantare partiala de la proiect:
 - Ioana Simionca – *Sinteza si caracterizarea unor materiale cu proprietati redox cu aplicatii in realizarea senzorilor electrochimici*
- actualizare pagina web: <http://www.intelcentru.ro/index-5-a.html>

Bibliografie 2015

1. G. David, Gh. Fundueanu, M. Pinteala, B. Minea, A. Dascalu, B. C. Simionescu, Polymer engineering for drug / gene delivery: from simple towards complex architectures and hybrid materials, *Pure Appl. Chem.*, **86** (11) 1621–1635, 2014.
2. S. O’Rorke, M. Keeney, A. Pandit, Non-viral polyplexes: Scaffold mediated delivery for gene therapy, *Progr. Polym. Sci.*, **35**, 441–458, 2010.
3. H. C. Lee, A. Singla, Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.*, 221, 1-22, 2001.
4. A. Mitra, C. H. Lee, K. Cheng, Biomedical Applications and Tissue Engineering of collagen, *Advanced Drug Delivery*, 23, 445-469, 2014.
5. E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens. Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nat. Mater.*, 8, 457-470, 2009.
6. B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *Int. J. Polym. Sci.*, ID 290602, 2011.
7. R.M. Capito, M. Spector, Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering, *Gene Ther.*, 14(9), 721-732, 2007.
8. M. Vallet-Regí, J.M. González-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Chem.*, 32, 1-31, 2004.
9. P. Zhang, Z. Hong, T. Yu, X. Chen, X. Jing, „In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly (L-lactide)”, *Biomaterials*, 30, 58–70, 2009.
10. S. V. Dorozhkin, Nanodimensional and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates, *Am. J. Biomed. Eng.*, 2(3), 48-97, 2012.
11. M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.*, 9, 7591-7621, 2013.
12. H. Zhou, J. Lee, Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomater.*, 7, 2769-2781, 2011.
13. P. Li, K. de Groot, Better bioactive ceramics through sol-gel process, *J. Sol-gel Sci. Technol.*, 2, 797-801, 1994.
14. M. N. Salimi, R. H. Bridson, L. M. Grover, G. A. Leeke, Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles, *Powder Technol.*, 218, 109-118, 2012.
15. R. K. Roeder, G. L. Converse, H. Leng, W. Yue, Kinetic Effects on Hydroxyapatite Whiskers Synthesized by the Chelate decomposition Method, *J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [7], 2096-2104, 2006.

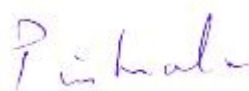
16. V. M. Rusu, C. H. Nga, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M. G. Peter, Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials, *Biomaterials*, 26, 5414-5426, 2005.
17. M. Okada, T. Furuzono, Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 13, 064103, 2012.
18. M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, 9, 7591-7621, 2013.
19. W. E. Klee, G. Engel, Infrared spectra of the phosphate ions in various apatites, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 32, 1837-1843, 1970.
20. A. Ślósarczy, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz, FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, *J. Mol. Struct.*, 744, 653-656, 2005.
21. T. S. S. Kumar, K. Madhumathi, Y. Rubaiya, M. Doble, Dual mode antibacterial activity of ion substituted calcium phosphate nanocarriers for bone infections, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3, 59, 2015.
22. A. Chandrasekar, S. Sagadevan, A. Dakshnamoorthy, Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique, *Int. J. Phys. Sci.*, 8(32), 1639-1645, 2013.
23. David G, Cristea M, Balhui C, Timpu D, Doroftei F, Simionescu B. C., Effect of cross-linking methods on structure and properties of poly(ϵ -caprolactone) stabilized hydrogels containing biopolymers, *Biomacromolecules*, 13, 2263-2272, 2012.
24. B. C. Simionescu, A. Neamtu, C. Balhui, M. Danciu, D. Ivanov, G. David, Macroporous structures based on biodegradable polymers—candidates for biomedical application, *J. Biomed. Mater. Res.*, 101A, 2689-2698, 2013.
25. R. Diaconescu, B. C. Simionescu, G. David, Control and prediction of degradation of biopolymer based hydrogels with poly(ϵ -caprolactone) subunits, *Int. J. of Biol. Macromolec.*, 71, 147-154, 2014.
26. C. Balhui, G. David, M. Drobeta, V. E. Musteata, Dielectric Characterization of Biopolymer/Poly(ϵ -Caprolactone) Hydrogels, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 19 (3), 234-244, 2014.
27. S. Yamada, D. Heymann, J.-M. Bouler, G. Daculsi, Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios, *Biomaterials*, 18 (15), 1037-1041, 1997.
28. L. Bin, L. Deng-xing, Current Application of β -tricalcium Phosphate Composites in Orthopaedics, *Orthopaedic Surgery*, 4, 139-144, 2012.
29. Yu. A. Lazarev, A. V. Lazareva, Infrared spectra and structure of synthetic polytripeptides, *Biopolymers*, 17, 1197-1214, 1978.
30. D.O. Ellis, S. McGavin, The structure of collagen - an X-ray study, *J. Ultrastruct. Res.*, 32:191-211, 1970.
31. N.F. Mohd Nasir, M.G. Raha, N.A. Kadri, S.I. Sahidan, M. Rampado, C.A. Azlan, The Study of Morphological Structure, Phase Structure and Molecular Structure of Collagen-PEO 600K Blends for Tissue Engineering Application, *Am. J. Biochem. & Biotech.*, 2 (5), 175-179, 2006.
32. W. Bi, R. Song, X. Meng, Z. Jiang, S. Li, T. Tang, In situ synthesis of silica gel nanowire/Na⁺-montmorillonite nanocomposites by the sol-gel route, *Nanotechnology*, 18, article id. 115620, 7 pag., 2007.
33. M. C. Corobea, I. Capek, R. Ianchis, D. Donescu, R. Somoghi, M. Ghiurea, C. L. Nistor, V. Purcar, L. O. Cinteza, C. Radovici, G. Prodan, Silica nanowires obtained on clay mineral layers and their influence on mini-emulsion polymerisation, *Appl. Clay Sci.*, 95, 232-242, 2014.
34. A. J. Mieszawska, N. Fourligas, I. Georgakoudi, N. M. Ouhib, D. J. Belton, C. C. Perry, D. L. Kaplan, Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration, *Biomaterials*, 31, 8902-8910, 2010.
35. P. Gouma, R. Xue, C.P. Goldbeck, P. Perrotta, C. Balázs, Nano-hydroxyapatite - Cellulose acetate composites for growing of bone cells, *Mater. Sci. Eng. C*, 32, 607-612, 2012.
36. S. I. Voicu, A. Dobrica, S. Sava, A. Ivan, L. Naftanaila, Cationic surfactants-controlled geometry and dimensions of polymeric membrane pores, *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, 14, 923-928, 2012.
37. ISO 10993-5:2009(E), Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.
38. S. C. Rodrigues, C. L. Salgado, A. Sahu, M. P. Garcia, M. H. Fernandes, F. J. Monteiro, Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res.*, A101, 1080-1094, 2013.
39. R. M. Blaese, K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. W. Chiang, P. Tolstoshev, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L.

- Muul, R. A. Morgan, W. F. Anderson, T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA– SCID: Initial Trial Results After 4 Years, *Science*, 1995, 270, 475-480.
40. M. E. Davis, Non-viral gene delivery systems, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, 128-131.
 41. K. Wang, X. Yan, Y. Cui, Q. He, J. Li, Synthesis and in vitro behavior of multivalent cationic lipopeptide for DNA delivery and release in HeLa cells, *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18, 1735-1738.
 42. X. Yan, J. Blacklock, J. Li, H. Mohwald, One-pot synthesis of polypeptide-gold nanoconjugates for in vitro gene transfection, *ACS Nano*, 2012, 6, 111-117.
 43. A. von Harpe, H. Petersen, Y. X. Li, T. Kissel, Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery, *J. Controlled Release*, 2000, 69, 309-322.
 44. G. J. M. Koper, R. C. van Duijvenbode, D. D. P. W. Stam, U. Steuerle, A. Borkovec, Synthesis and protonation behavior of comblike poly(ethyleneimine), *Macromolecules*, 2003, 36, 2500-2507.
 45. Y. Fukumoto, Y. Obata, K. Ishibashi, N. Tamura, I. Kikuchi, K. Aoyama, Y. Hattori, K. Tsuda, Y. Nakayama, N. Yamaguchi, Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine, *Cytotechnology*, 2010, 62, 73-82.
 46. M. Wagner, A. C. Rinkenauer, A. Schallon, U. S. Schubert, Opposites attract: influence of the molar mass of branched poly(ethylene imine) on biophysical characteristics of siRNA-based polyplexes, *RSC Adv.*, 2013, 3, 12774-12785.
 47. Z. Y. Wang, J. Li, S. Cheong, U. Bhaskar, O. Akihiro, F. M. Zhang, J. S. Dordick, R. J. Linhardt, Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin, *J. Biotechnol.*, 2011, 156, 188-196.
 48. D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, New York, 2001.
 49. A. Witek-Krowiak, K. Chojnacka, D. Podstawczyk, A. Dawiec, K. Pokomeda, Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process, *Bioresour. Technol.*, 2014, 160, 150-160.
 50. L. Clima, L. Ursu, C. Cojocaru, A. Rotaru, M. Barboiu, M. Pinteala, Experimental design, modeling and optimization of polyplex formation between DNA oligonucleotides and branched polyethylenimine, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9445-9456.
 51. M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 2008, 76, 965-977.
 52. A. Karimi, P. Siarry, Global Simplex Optimization - A simple and efficient metaheuristic for continuous optimization, *Eng. Appl. Artif. Intel.*, 2012, 25, 48-55.
 53. C.M. Uritu, M. Calin, S. S. Maier, C. Cojocaru, A. Nicolescu, D. Peptanariu, D. Stan, M. Barboiu, M. Pinteala, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 2433-2446.
 54. C. M. Uritu, C. D. Varganici, L. Ursu, A. Coroaba, A. Nicolescu, A. I. Dascalu, D. Peptanariu, D. Stan, C. A. Constantinescu, V. Simion, M. Calin, S. S. Maier, M. Pinteala, M. Barboiu, Hybrid fullerene conjugates as vectors for DNA cell delivery, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 2433-2446.
 55. L. Clima, D. Peptanariu, M. Pinteala, A. Salic, M. Barboiu, DyNAVectors: dynamic constitutional vectors for adaptive DNA transfection, *Chem. Commun.*, DOI: 10.1039/x0xx00000x.
 56. I.-A. Turin-Moleavin, F. Doroftei, A. Coroaba, D. Peptanariu, M. Pinteala, A. Salic, M. Barboiu, Dynamic constitutional frameworks (DCF) as nanovectors for cellular delivery of DNA, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9005-9011.
 57. S. M. Hurtley, Crossing the bilayer, *Science*, 2005, 310, 1451-1451.
 58. S. W. Kowalczyk, T. R. Blosser, C. Dekker, Biomimetic nanopores: learning from and about nature, *Trends Biotechnol.*, 2011, 29, 607-614.
 59. F. M. Ashcroft, From molecule to malady, *Nature*, 2006, 440, 440-447.
 60. R. S. Kass, The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease, *J. Clin. Invest.*, 2005, 115, 1986-1989.
 61. P. Ball, Life's lessons in design, *Nature*, 2001, 409, 413-416.
 62. B. Bhushan, Biomimetics: Lessons from nature – An overview, *Philos. Trans. R. Soc. A*, 2009, 367, 1445-1486.

63. N. Busschaert, P. A. Gale, Small molecule lipid bilayer anion transporters for biological applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 1374-1382.
64. N. Busschaert, P. A. Gale, Niedermolekulare transmembranäre Anionentransporter für biologische Anwendungen, *Angew. Chem.*, 2013, 125, 1414-1422.
65. P. A. Gale, From anion receptors to transporters, *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44, 216-226.
66. N. Sakai, S. Matile, Synthetic Ion Channels, *Langmuir*, 2013, 29, 9031-9040.
67. P. Xin, P. Zhu, P. Su, J. L. Hou, Z. T. Li, Hydrogen-Bonded Helical Hydrazide Oligomers and Polymer That Mimic the Ion Transport of Gramicidin A, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 13078-13081.
68. Z. Sun, M. Barboiu, Y.M. Legrand, E. Petit, A. Rotaru, Highly Selective Artificial Cholesteryl Crown Ether K⁺-Channels, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 1-6.
69. X. Wang, C. Wang, L. Cheng, S. Lee, Z. Liu, Noble metal coated single-walled carbon nanotubes for applications in surface enhanced Raman scattering imaging and photothermal therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 7414-7422.
70. E.L. Ursu, L. Clima, C. Hejesen, A. Rotaru, M. Pinteala, DNA-mediated copper nanoparticle formation on dispersed single-walled carbon nanotubes, *Helvetica Chimica Acta*, 2015, 98, 1141-1146.

3.12.2015

Director proiect,



Dr. Mariana Pinteala