



UEFiscdi

Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni

RAPORT ȘTIINȚIFIC

PN-III-P4-ID-PCE-2020-1523, Contract Nr. PCE 161 / 2021

Vectori moleculari versatili, destinați transportului și eliberării de gene și medicamente, în lupta împotriva cancerului

Acronim: TM-Vector

Etapa II (ianuarie – decembrie 2022)

Etapa II (ianuarie 2022 – decembrie 2022)

Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unei biblioteci de vectori nonvirali de generație II pentru testarea *in vitro/in vivo*.

Livrabile: Raport de cercetare. Protocoale de sinteză și caracterizare. Doua lucrări științifice. Participări la conferințe și simpozioane. Actualizare pagina web.

REZUMAT:

Etapa 2022 a proiectului TM-vector a fost dedicată rafinării și diversificării proiectării, sintezei și caracterizării componentelor aplicabile pentru generarea nanoplatformelor cu miez de aur:

- (i) Nanoparticule cu miez de aur decorat cu PEG, PEI și funcționalizate cu grupări glucozaminice de generație II;
- (ii) Evaluarea preliminară *in vitro* a vectorilor nonvirali de generație II (**Da**: AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA și **Db**: AuNPs-PEG-epoxy-PEI-GA);
- (iii) Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorii nonvirali de generație II sintetizați;
- (iv) Confirmarea *in vivo* a funcționalității vectorilor nonvirali de generație I (sintetizați în etapa 2021, AuPEI-CD) și de generație II (sintetizați în etapa 2022);
- (v) Testarea *in vitro* a unor compuși terurici ce mimenză, în condiții specifice *in vivo* și *in vitro*, activitatea unor antioxidanți endogeni. Se are în vedere, într-o altă etapă a proiectului, ca aceștia să stea la baza asamblărilor de nanoplatforme funcționale cu activitate sinergică: de inhibare a anhidrazei carbonice și de generatori de radicalilor liberi activi în apoptoza celulelor tumorale.

Informațiile obținute în urma testărilor *in vivo* pe șoareci BALB/c de 12 săptămâni au arătat că vectorii nonvirali de generație I (AuPEI-CD, sintetizați în etapa 2021) sunt nontoxici, nu induc modificări ale parametrilor evaluați la doza repetată de 500 mg/kg, dovedindu-se a fi foarte sigur pentru sănătatea animalelor utilizate în studiu, oferind un motiv întemeiat pentru o abordare clinic-terapeutică ulterioară.

Din studiile *in vivo* pe șoareci BALB/c de 12 săptămâni a rezultat că vectorii de generație II (Da și Db, sintetizați în etapa 2022) au indus modificări patologice, de stadiu incipient, la nivelul ficatului și rinichiului. Toate animalele au supraviețuit experimentului, iar recuperarea lor s-a realizat într-un timp foarte scurt. Din aceste motive sunt încă necesare studii pentru a elucida profilul toxicologic al vectorilor nonvirali din generația II.

Rezultatele obținute au asigurat diseminarea pe calea a două conferințe plenary, șase comunicări la manifestări naționale și internaționale și prin publicarea a 4 lucrări științifice în jurnale cotate ISI.

Detaliile activității derulate în cadrul etapei 2022 sunt rezumate în tabelul de mai jos.

Planul de realizare al proiectului TM-vector. Etapa 2022

<p>Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unei biblioteci de vectori nonvirali de generație II pentru testarea <i>in vitro/in vivo</i> <i>Livrabile: Raport de cercetare. Protocoale de sinteză și caracterizare. Doua lucrări științifice. Participări la conferințe și simpozioane. Actualizare pagina web</i></p>	<p>A.2.1. Proiectarea și prepararea vectorilor nonvirali de generație II <i>A.2.1.1. Conjugarea NPs de aur cu PEG adecvat funcționalizat de diferite mase moleculare (Au-S-PEGi-X, ex. X: -COOH);</i> <i>A.2.1.2. Conjugarea Au-S-PEGi-X cu polimer cationic (CP) funcționalizat cu glucoamină (GA)(Au-S-PEGi-CP-GP);</i> <i>A.2.1.3. Încărcarea conjugatelor Au-S-PEGi-CP-GP cu un plasmid sau alte molecule active biologic (poliplecsii Au-PEGi-CP-GP-Plasmid/GP).</i></p>	<p>-3 lucrari ISI -2 conferinte key note speaker -6 comunicari orale și postere -pagina WEB -Raport ce include și protocoale de lucru.</p>
	<p>A.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a NPs de aur de generație II <i>A.2.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a monomerilor, și intermediarilor de reacție prin metode avansate: NMR, ATR-FT-IR, Raman, ESI-MS, MALDI-Tof/MS.</i> <i>A.2.2.2. Caracterizarea vectorilor nonvirali în stare uscată: ATR-FTIR, NIR, Raman, XPS, XRD, SEM/EDX, micro-ATR-FTIR, TG/DSC, SEM, TEM, AFM, fluorescences</i> <i>A.2.2.3. Caracterizarea vectorilor nonvirali în stare umedă: UV-vis, DLS, fluorimetry, micro-ATR-FTIR, Cryo-TEM, Raman-AFM.</i> <i>A.2.2.4. Investigarea la scara nanometrică a vectorilor nonvirali <i>in vitro</i> în fluide biologice simulate</i> <i>A.2.2.5. Investigarea capacității de a genera radicali liberi în condiții <i>in vitro</i> a compușilor unimerici pe bază de telur (Te-AC)</i></p>	
	<p>A.2.3. Evaluarea preliminară <i>in vitro</i> a vectorilor nonvirali <i>A.2.3.1. Evaluarea capacității de transfecție a poliplecsilor de tip Au-PEGi-CP-Plasmid/moleculă de țintă</i> <i>A.2.3.2. Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorul nonviral sintetizat</i></p>	
	<p>A.2.4. Confirmarea funcționalității vectorilor nonvirali sintetizați prin teste <i>in vivo</i> <i>A.2.4.1. Testarea <i>in vivo</i> a funcționalității sistemelor complexe ce au demonstrat proprietăți promitatoare după testările <i>in vitro</i>.</i></p>	
	<p>A.2.5. Managementul administrativ și administrarea resurselor alocate. - Monitorizarea progresului științific, tehnic și preclinic; acțiuni corective atunci când este necesar. Răspunsuri rapide și adecvate la risc prin implementarea, monitorizarea și ajustarea periodică a planului de urgență al</p>	

	proiectului. - Protecția datelor și aplicarea principiilor RRI (responsible research and innovation). - Activități de exploatare a rezultatelor (publicare lucrări științifice, participare la conferințe naționale și internaționale, actualizarea continuă a web site –ului dedicat proiectului TM-vectors).	
--	--	--

A.2.1.1.-A2.1.3 și A.2.2.1.-A.2.2.2.3 Proiectarea, prepararea și caracterizarea vectorilor nonvirali de generație II

Abrevieri: polimer cationic (CP), ciclodextrină (CD), polietilenimină ramificată (PEI), glicozamină (GA), nanoparticule de aur (AuNPs), nanoparticule de aur funcționalizate cu PEI și ciclodextrine (AuPEI-CD, compusul A în testele *in vivo*); nanoparticulele de aur funcționalizate cu PEG, PEI și GA (Da: AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA și Db: AuNPs-PEG-epoxy-PEI-GA)

În etapa 2021 a proiectului s-au optimizat condițiile de sinteză pentru prepararea sistemelor Au-PEI-CD de generație I, demonstrându-se că AuNP obținute *in situ* cu bPEI sunt stabile chimic și fizic în condiții fiziologice și reprezintă candidați ideali pentru aplicațiile bio-medicale, în special în transfecția ADN-ului. AuNP încărcate pozitiv reprezintă materiale promițătoare pentru aplicații terapeutice, datorită suprafețelor lor cationice care favorizează adsorbția celulară.¹ Pe de altă parte, bPEI prezintă stabilitate chimică bună și poate funcționa, concomitent, drept agent reducător și stabilizator al ionilor de aur.^{1,2} Distribuția dimensiunilor a fost între 2 și 13 nm în imagini STEM, cu o valoare medie de 5.73 nm, respectiv între 2 și 11 nm și o valoare medie de 5.305 nm, prin imagistică TEM. Nanoparticulele astfel obținute au prezentat toate caracteristicile specifice nanoparticulelor de aur raportate în literatura de specialitate^{3,4} și confirmă rezultatele măsurătorilor realizate prin tehnica DLS.

În etapa 2022 a proiectului au fost sintetizați vectori nonvirali de generație II, pe bază de nanoparticule de aur decorate cu PEG și PEI și funcționalizate cu unități glicozaminice pentru a fi testate în terapia genică. Nanoparticulele de aur au fost sintetizate prin metoda Turkevich⁵ modificată. Pe scurt, la 100 mL H₂O mQ se adaugă clorură aurică trihidratată (HAuCl₄ · 3H₂O) (12,5 mg, 0,0313 mmol) într-un balon de 250 mL plasat pe baie de ulei preîncălzită la 85 ° C, sub agitare viguroasă (700 rpm). După 30 min. a fost adăugată o soluție apoasă de citrat de sodiu (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O, 50 mg în 50 mL H₂O mQ), iar amestecul de reacție a fost menținut la aceeași temperatură, sub agitare viguroasă, încă 30 min. La final, amestecul de reacție a fost agitat timp de 12 ore, la temperatura camerei, ferit de lumină. A rezultat o soluție de culoare roșu rubiniu, care s-a purificat prin centrifugare și filtrare pe filtru Amicon de 10000 kDa, iar apoi s-a dispersat în apă ultrapură, sterilă.

Decorarea AuNPs cu PEG, PEI și GA s-a realizat prin două protocoale de sinteză diferite, rezultând doi vectori nonvirali cu miez de aur decorați cu segmente polimerice pe bază de PEG și PEI, după cum urmează (Schema 1): (i) PEG de masă moleculară 1000 Da (PEG_{1k}), PEI ramificat de masă moleculară de 2000 Da (PEI_{2k}), PEG de masă moleculară 1000 Da funcționalizat cu unități glicozaminice (PEG_{1k}-GA) (Schema 1.A.); (ii) PEG de masă moleculară 2000 Da (PEG_{2k}), PEG de masă moleculară 1000 Da (PEG_{1k}), PEI ramificat de masă moleculară de 2000 Da (PEI_{2k}), PEG de masă moleculară 1000 Da funcționalizat cu unități glicozaminice (PEG_{1k}-GA) (Schema 1.B.).

A doua variantă (Schema 1.B.) a implicat reacția grupărilor sulfhidril (SH) ale polietilenoxidului cu masă moleculară de aproximativ 2000 Da, funcționalizat în poziția α cu grupare –SH și în poziția ω cu grupare aminică (-NH₂) (HS-PEG_{2k}-NH₂). Reacția a avut loc la temperatura camerei, prin agitare timp de 24 ore a 4 mL dispersie apoasă de AuNPs cu HS-PEG_{2k}-NH₂ (MW:2000, 6,4 · 10⁻⁶ mmol, 12,8 μL). După 24 de ore, se adaugă polietilenglicol (0,143 · 10⁻³ mmol, 63 μL) α,ω-funcționalizat cu grupări glicidice (PEG_{1k}-epoxy_GA), în prezență de alcool etilic, iar reacția decurge în aceleași condiții pentru încă 24 de ore. Peste acest amestec a fost adăgat PEI_{1k} pentru a se realiza cuplarea prin reacția grupărilor epoxidice nereacționate cu grupările aminice din PEI. În ultima etapă s-a adăugat PEG_{1k} funcționalizat în poziția α

cu grupări glicidileter și în poziția ω cu grupări glucozaminice. Reacția a decurs în aceleași condiții de reacție timp de 72 ore. Amestecul de reacție a fost filtrat prin filtre AMICON 10000 Da.

Prima variantă (Schema 1.A.) a rezultat în același mod. HS-PEG_{1k}-epoxi (MW:1000, $4,8 \cdot 10^{-6}$ mmol, 4,8 μ L) a fost adăugată în 3 mL dispersie nanoparticule de aur sub agitare, timp de 24h. Peste acest amestec de reacție a fost adăugat PEI_{2k} (0,156 mg, 312 μ L) pentru a se realiza cuplarea prin reacția grupărilor aminice cu grupările epoxidice, în prezență de etanol drept catalizator, iar funcționalizarea cu grupări glucozaminice s-a realizat prin adăugarea peste amestecul de reacție a PEG_{1k} funcționalizat cu grupări glicidileterice și glucozaminice.



Schema 1. Prepararea vectorilor nonvirali de generație II.

Structura chimică a fost demonstrată prin spectroscopie FTIR, prezentând picurile caracteristice fiecărui vector studiat. În vederea analizei UV-VIS, toate probele au fost diluate de 20 de ori. Efectul legării polimerilor a fost monitorizat cantitativ prin spectroscopie UV-VIS (Figurile 1 și 2). Spectrele au păstrat rezonanța plasmonului de suprafață între 520 și 528 nm în toate etapele de reacție, în cazul ambilor vectori, deoarece acest domeniu este specific nanoparticulelor de aur. Adăugarea succesivă a straturilor polimerice induce o deplasare batocromă. Culoarea roșu-rubiniu s-a păstrat în toate etapele de reacție (Figura 3).

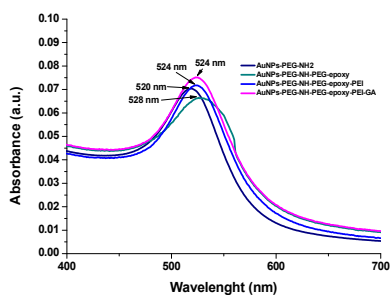


Figura 1. Spectrele UV-VIS corespunzătoare AuNPs-PEG-NH₂, AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy, AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI, AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA (Schema 1.B.)

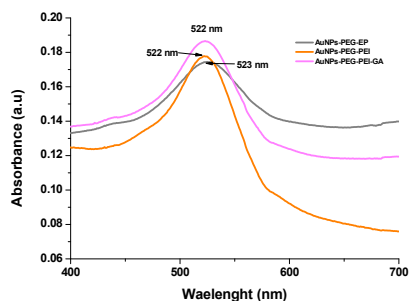


Figura 2. Spectrele UV-VIS corespunzătoare AuNPs-PEG-epoxy, AuNPs-PEG-PEI, AuNPs-PEG-PEI-GA (Schema 1.A.)

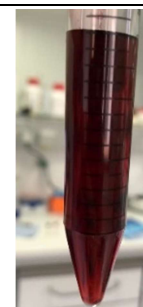
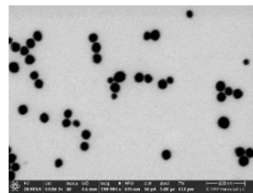


Figura 3. Aspectul dispersiilor apoase ce conțin vectorii nonvirali.

Histogramele DLS au evidențiat ansambluri uniforme cu o tendință clară de creștere a diametrului hidrodinamic odată cu creșterea lungimii lanțului lateral atașat nanoparticulelor de aur. În cazul vectorului Da: AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA, diametrul hidrodinamic în prima etapă a fost de 324 nm, cu un potențial zeta de 19,2 mV, confirmând stabilitatea nanoparticulelor. În ultima etapă valoarea a crescut la 707 nm, iar potențialul zeta a scăzut până la 2,69 mV. Vectorul Db: AuNPs-PEG-epoxy-PEI-GA a avut inițial dimensiunea de 242 nm, cu un potențial zeta de -21,5 mV, iar în ultima etapă, vectorul ajunge la o dimensiune hidrodinamică de 801 nm, cu un potențial de 2,12 mV.



A

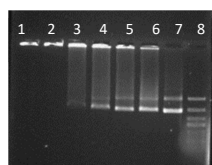


B

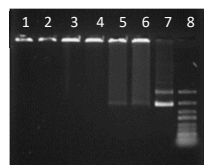
Figure 4. Imagini STEM: (A) Da (AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA) (Schema 1.B.); (B) Db (AuNPs-PEG-PEI-GA) (Schema 1.A.).

Imaginile STEM (Figura 4) pun în evidență o morfologie sferică a ambelor sisteme sintetizate, cu mențiunea că, așa cum era de așteptat, vectorul obținut conform Schemei 1.B. prezintă un diametru de circa 27 ± 3 nm, ușor mai mare decât al vectorului obținut conform Schemei 1.A. (26 ± 3 nm).

A.2.2.4. și A.2.3.1. Evaluarea preliminară *in vitro* a vectorilor nonvirali de generație II din Schema 1 (Da: AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA și Db: AuNPs-PEG-epoxy-PEI-GA)



A



B

Figura 5. Mobilitatea electroforetică a poliplecșilor obținuți prin complexarea pCS2+MT-Luc de către: (A) AuNPs-PEG-NH-PEG-PEI-PEG-GA; (B) AuNPs-PEG-epoxy-PEI-PEG-GA, la diferite concentrații.

Capacitatea vectorilor de a se lega la acizii nucleici a fost testată prin electroforeză pe gel de agaroză în soluții de fluid biologic simulat de diferite concentrații. Așa cum rezultă din Figura 5, cei doi vectori formează poliplecși cu plasmidul pCS2+MT-Luc (5991 bp) prin complexarea plasmidului la valori diferite ale concentrației vectorilor.

Vectorul Da: AuNPs-PEG-NH-PEG-PEI-PEG-GA complexează total plasmidul la o concentrație a vectorului de $8 \cdot 10^{-9}$ M, în timp ce vectorul Db: AuNPs-PEG-epoxy-PEI-PEG-GA, asigură o împachetare totală a plasmidului la concentrația de $8 \cdot 10^{-11}$ M (concentrația plasmidului: $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

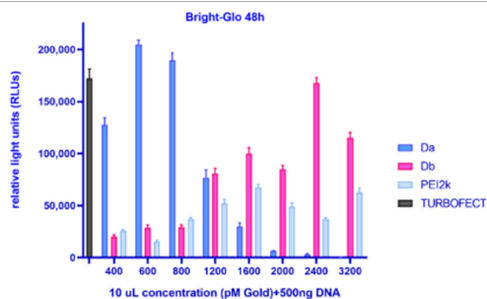


Figura 6. Eficiența transfecției la 48 ore a poliplecșilor pe bază de Da și Db pe linia celulară HeLa.

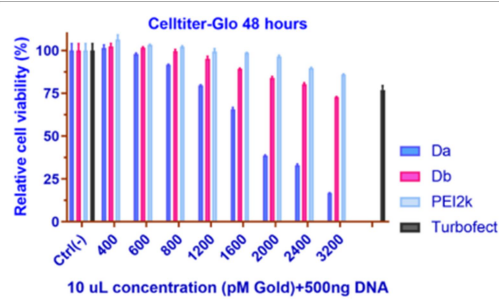


Figura 7. Citotoxicitatea la 48 ore a poliplecșilor pe bază de Da și Db pe linia celulară HeLa.

A.2.3.2. Proiectarea unei terapii pentru tratarea cancerului cu pro-medicament încărcat în vectorii nonvirali de generație II

Vectorii nonvirali Da (AuNPs-PEG-NH-PEG-epoxy-PEI-GA) și Db (AuNPs-PEG-epoxy-PEI-GA) dețin pe suprafața nanoparticulelor grupări aminice capabile să interacționeze cu grupările carboxilice din structura metotrexatului (MTX). Peste dispersiile apoase ale vectorilor s-a adăgat o soluție de MTX activată cu EDC, DIEA, DMSO și MTX, iar suspensia rezultată a fost menținută sub agitare, la temperatura camerei, timp de 24 ore, în întuneric. Dispersia rezultată a fost filtrată pe filtru centrifugal Amicon Ultra (0,5 mL; 100k KDa). Sistemele rezultate au fost notate cu Da-MTX și Db-MTX. Acestea au

fost caracterizate structural prin FTIR, morfologic prin DLS și STEM, iar concentrația de MTX a fost determinată prin spectroscopie UV-VIS, în baza unei curbe de calibrare pentru MTX.

Vectorii nonvirali Da-MTX și Db-MTX pot condensa plasmid, prin prezența lanțurilor de PEI, iar prin atașarea MTX la suprafața lor prin legături esterice se eliberează principiul activ cu refacerea structurii inițiale sub acțiunea enzimatică, obținându-se un dublu effect therapeutic: livrarea de gene și de principii active către celulele țintite, prin intermediul grupărilor glucozaminice.

Evaluarea preliminară *in vitro* a biocompatibilității și citotoxicității celor două sisteme asupra fibroblastelor gingivale umane (HGF), a arătat faptul că nanosistemele sunt biocompatibile, deoarece nu afectează viabilitatea fibroblastelor la concentrațiile testate (Figura 8). Testarea s-a realizat în același mod și pe linia celulară de cancer mamar MCF-7 (Figura 9), observându-se o tendință descrescătoare în ceea ce privește viabilitatea celulelor canceroase pentru Da-MTX și Db-MTX, în timp ce MTX liber la aceleași concentrații, nu a prezentat o eficiență similară celor două sisteme.

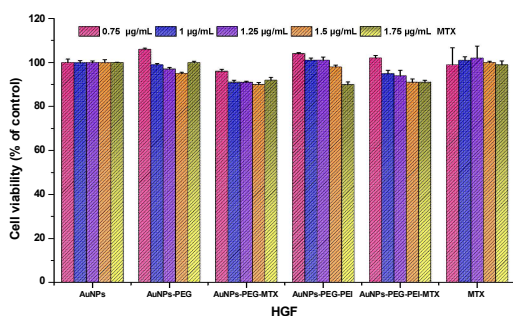


Figura 8. Citotoxicitatea nanoparticulelor asupra fibroblastelor gingivale umane.

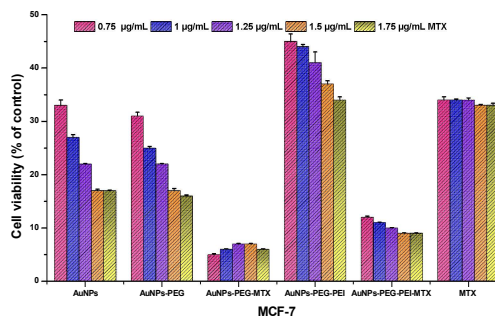


Figura 9. Citotoxicitatea nanoparticulelor asupra liniei celulare maligne MCF-7.

A.2.4.1. Confirmarea *in vivo* a funcționalității vectorilor nonvirali de generație I (sintetizați în etapa 2021, AuPEI-CD, notați în continuare A) și de generație II (sintetizați în etapa 2022, notați cu Da și Db) s-a realizat asupra unor șoareci BALB/c (femele în vârstă de 12 săptămâni), achiziționați de la Institutul Național de Cercetare Medico-Militară Cantacuzino - București, biobaza Pantelimon. Pentru a limita numărul de animale utilizate în experiment a fost adoptată metoda lui Dixon și Mood⁶, care urmărește administrarea secvențială de doze unice la câte un șoarece până când au supraviețuit dozei 50% dintre șoareci. Fiecare animal a fost monitorizat continuu, timp de 4 ore, pentru a înregistra modificările de comportament, toxicitatea și mortalitatea, apoi intermitent pe o perioadă de 48 de ore și cu intermitențe mai mari pentru următoarele 7 zile. **Toxicitatea la doză repetată** a fost efectuată pe un număr de 30 de șoareci, grupați în 3 loturi, corespunzător fiecărei sistem testat. Administrarea soluțiilor a fost efectuată intravenos, în venele caudale, într-un volum final de 0,2 mL soluție tampon (PBS - phosphate-buffered saline), pH ~ 7.4. Dozele testate au fost de 500 mg/kg corp pentru AuPEI-CD, 200 mg/kg corp pentru Db, respectiv 100 mg/kg corp pentru Da. Șoarecii au fost monitorizați pe tot parcursul experimentului, înregistrându-se modificările comportamentale, greutatea corporală, observații zilnice detaliate ce vizează potențiale semne de toxicitate. La final șoarecilor li s-a efectuat examenul necropsic și examenul histopatologic.

Examenul hematologic / analizele hematologice. Determinările parametrilor hematologici s-a efectuat cu analizatorul automat ABAXIS USA vetscan HM2. Parametrii analizați au fost: globulele albe (WBC), limfocitele (LYM), monocitele (MON), neutrofilele (NEU), eozinofilele (EOS), bazofilele (BAS), globulele roșii (RBC), hemoglobina (HGB), hematocritul (HCT), volumul corpuscular mediu (MCV), hemoglobina corpusculară medie (MCH), concentrația medie a hemoglobinei corpusculare (MCHC), distribuția celulelor roșii (RDW), numărul de trombocite (PLT), valoarea critică a trombocitelor (PCT), volumul mediu al trombocitelor (MPV), trombocitul de distribuție (PDW).

Examenul biochimic. Parametrii analizați au fost: fosfataza alcalină (ALP), alanin aminotransferaza (ALT), azotul ureic din sânge (BUN), creatinina (CREA), glucoza (GLU), proteinele totale (T-PRO) și colesterolul (CHOL).

Examenul imunologic. Pentru determinarea citokinelor IL-6, TNF α și INF γ , sângele a fost recoltat în vacutainere fără anticoagulant, cu gel separator (Vacutest Kima, clot activator). După 60 de minute de repaus la temperatura camerei, proba a fost centrifugată la 5000 de rotații timp de 5 minute, separând serul. Citokinele au fost detectate prin tehnica multiplex ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) iar interpretarea datelor a fost efectuată cu ajutorul sistemului de achiziție Bio-Plex Manager™ MP Software –Bio-Plex Data Pro™ Software 1.2.

Examenul necropsic și histopatologic. La examenul necropsic s-au urmărit, comparativ cu grupul de control, aspectul macroscopic al țesuturilor și organelor, apreciindu-se: volumul, culoarea, forma, consistența, suprafața și aspectul suprafeței secțiunii. Probele de țesut recoltate au fost fixate în formaldehidă 8 %, incluse la parafină, secționare apoi la 5 microni, colorate tricromic Masson și examinate la microscop (Leica DM 750). Imaginile au fost preluate cu o camera Leica 5mpx HD, utilizând softul Leica Application Suite (LAS) versiunea 2019. Examenul histopatologic a fost efectuat pe probe de țesut recoltate din ficat, rinichi, pulmoni și splină.

Etică. Studiul s-a realizat conform directivei UE 63/2010 și cu acordul Comitetului de Etică din cadrul instituției.

Statistică. Datele sunt prezentate ca Media \pm DS urmate de Tukey's multiple comparisons test. O probabilitate de 95% ($p < 0,05$) a fost considerată semnificativă.

Toxicitate. Evaluarea *toxicității acute (DL₅₀)* pentru cei trei compuși, după administrarea secvențială de doze unice, 50% dintre animale au supraviețuit la dozele de 2050 mg/kg la AuPEI-CD, 300 mg/kg pentru sistemul Db și 95 mg/șoarece pentru sistemul Da. Pe perioada de monitorizare (7 zile), animalele care au supraviețuit din gupurile Db (B) și Da (C) au fost înregistrate simptome ale toxicității, respectiv eritrodistezie, piloerecție, oboseală, depresie, apetit inconstant și suferință caracterizată prin ataxie, deplasare greoaie și tremor. La șoarecii din gupul AuPEI-CD nu au fost înregistrate modificări de comportament sau alte semne clinice de toxicitate. La determinarea *toxicității la doze repetate* pe cale intravenoasă (500 mg/kg) pentru **vectorul AuPEI-CD** nu au fost observate modificări comportamentale, diferențe în greutatea corporală a șoarecilor sau alte semne de toxicitate întârziată. Șoarecii și-au păstrat interesul pentru hrană și apă pe parcursul celor 7 zile de monitorizare. Nu au fost înregistrate cazuri de mortalitate, dar au fost prezente unele semne clinice anormale (anxietate, oboseală accentuată, reacții întârziate și tremor) la animalele din grupurile B și C. Datele sunt prezentate în Tabelul 1.

Analizele hematologice. Sunt prezentate în Tabelele 2 și 3. Evoluția parametrilor hematologici este prezentată în Tabelele 2 și 3. Parametrii evaluați nu au prezentat modificări semnificative care să atribuie acestor complecși un efect inductor inflamator. Mai mult, valorile medii ale indicilor hematologici și cei ai plachetogramei ne indică faptul că deși au fost înregistrate diferențe minore față de debutul experimentului, aceste valori s-au încadrat în intervalul fiziologic al acestei linii de șoareci (BALB/c).

Tabelele 4 și 5 reunesc analizele biochimice și respectiv imunologice (determinarea citokinelor) efectuate asupra sângelui șoarecilor incluși în experiment.

Examenul histopatologic. Pentru nanoparticulele Db (grupul de șoareci B) și Da (grupul de șoareci C), examenul histopatologic pune în evidență modificări de toxicitate cu evoluție subacută, dar cu modificări morfologice reversibile, manifestate prin degenerare hepatică moderată și degenerarea epitelului urinar cu prezența unui infiltrat inflamator monocitar în interstițiul renal. Nu există dovezi de atrofie, congestie sau alte modificări de formă, volum și culoare.

Tabelul 1. Evaluarea comparativă a AUGNPs a toxicității clinice la șoareci în fiecare zi de evaluare (respectiv zilele 1, 3, 7) și rezultatele examenului histopatologic

Zile de administrare	Grupuri experimentale	SNC și sistemul somato-motor				Apetit pentru furaj/apă	Semne ale neurotoxicității	Stare generală	Necropsie/examen histopatologic			
		Comportament	Reacții la stimuli diferiți	Reflexe cerebrale și spinale	Tonusul muscular				Ficat	Rimichi	Pulmont	Splina
1	A	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
	B	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
	C	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
3	A	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
	B	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
	C	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	-	-	-	-
7	A	Nemodificat	Normal	Normal	Normal	Prezent	Absente	Bună	Nu	Nu	Nu	Nu
	B	Anxietate	Normal	Inerție	Slăbiciune	Inconstant	Tremor	Poziție anormală	Degenerare hepatică difuză moderată. Activarea celulelor Kupffer.	Degenerarea epiteliului urinar. Infiltrat inflamator monocitar în interstițiul renal. Nefrită interstițială limfoplasmocitară NR	Nu	Nu
	C	Anxietate	Pasivitate	Inerție	Slăbiciune	Inconstant	Tremor	Oboseală	Degenerescența hepatică focală centrolobulara severă	Degenerarea epiteliului urinar. Infiltrat inflamator monocitar în interstițiul renal. Nefrita interstițială limfoplasmocitară	Nu	Nu

Tabelul 2. Evoluția indicilor hematologici și ai plachetogramei.

LOT		RBC (10*12/l)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MC H (pg)	MCH C (g/dl)	RDW (%)	PLT (10*9/l)	MPV (fl)	PDW (Fl)
A	D	8.65 ±0.11	13.83 ±0.76	42.57 ± 2.38	48.63 ± 2.21	13.75 ±1.77	32.43 ± 0.63	14.32 ± 0.45	583.00 ±0.17	5.01 ±0.21	6.33 ± 1.3 2
	S	8.27 ± 0.16	14.56 ±0.37	44.32 ±1.29	47.61 ±1.92	14.57 ± 1.1 2	31.74 ±1.56	16.34 ±0.23	597.0 0 ±0.45	5.38 ±0.66	6.01 ±1.22
B	D	9.14±0. 34	15.18 ±0.24	41.43 ±3.76	49.11 ±1.28	13.49 ±1.88	33.00 ±0.48	19.54 ±0.72	688.0 0 ±0.72	5.41 ±0.18	6.07 ±0.14
	S	8.82 ±0.13	14.84 ±0.59	44.13 ±2.34	48.73 ±2.18	15.08 ±0.63	31.87 ±1.59	19.13 ±0.63	583 ±0.32	5.03 ±0.15	6.43 ±0.91
C	D	9.22 ±0.16	16.32 ±0.47	45.56 ±1.86	46.81 ±2.34	14.33 ±1.41	31.28 ±1.46	19.41 ±0.23	693 ±0.32	6.00 ±0.08	6.24 ±1.15
	S	9.17±0. 55	17.86 ±0.78	46.67 ±1.15	48.36 ±1.45	14.73 ±1.76	30.31 ±2.14	18.74 ±0.18	793 ±0.19	5.67 ±0.26	6.31 ±1.28

Tabelul 3. Evoluția indicilor leucogramei.

LOT		WBC (10*9/l)	NEU (10* 9/l)	LIMF (10*9/ l)	MON O (10*9/l)	EOS (10* 9/l)	BASO (10*9/ l)	NEU (%)	LIMF (%)	MONO (%)	EOS (%)	BASO (%)
A	D	6.28 ± 2.38	1.16 ± 0.62	7.17 ± 0.25	1.38 ± 0.38	0.48 ± 0.18	0.06 ± 0.01	12.82 ±1.38	84.86 ±2.14	3.51 ±2.26	1.38 ± 0.48	0.08 ± 0.02
	S	7.13± 1.81	1.38 ± 0.14	7.42 ± 0.58	1.23 ± 0.21	0.31 ± 0.10	0.04 ± 0.00	11.34 ±2.32	86.73 ±1.37	2.78 ±1.64	1.46 ± 0.32	0.06 ± 0.01
B	D	7.45 ± 1.14	2.34 ± 0.22	6.38 ± 0.67	0.87 ± 0.61	0.25 ± 0.12	0.08 ± 0.03	16.02 ±1.87	71.36 ±2.39	2.42 ±1.92	1.19 ± 0.87	0.05 ± 0.02
	S	7.83 ± 2.43	2.10 ± 0.12	7.88 ± 0.67	1.26 ± 0.32	0.36 ± 0.22	0.06 ± 0.02	15.52 ±2.31	79.18 ±2.42	3.95 ±1.71	1.39 ± 0.43	0.04 ± 0.00
C	D	6.59 ± 2.54	2.56 ± 0.23	7.78 ± 0.45	1.16 ± 0.18	0.28 ± 0.11	0.05 ± 0.03	13.88 ±2.38	70.56 ±1.97	4.75 ±1.44	1.26 ± 0.58	0.06 ± 0.03
	S	8.23 ± 2.17	2.78 ± 0.64	7.59 ± 1.11	1.32 ± 0.65	0. 34± 0.18	0.05 ± 0.00	15.76 ±2.15	89.43 ±2.37	4.75 ±1.83	1.87 ± 0.61	0.07 ± 0.02

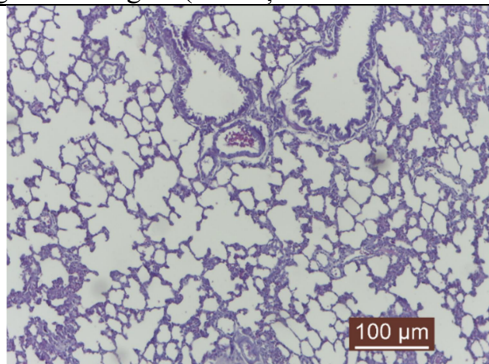
Tabelul 4. Evoluția parametrilor biochimici la soareci BALBc.

LOT		BUN (mg/dl)	GLU (mg/dl)	ALK (U/L)	T-PRO (g/dl)	ALT (U/L)	CREA T (mg/dl)	CHL (mg/dL)
A	D	43.74± 1.32	107.6 4±1.3 0	148.5 1±1.3 4	5.64±0. 81	39.50 ± 1.20	0.46±0. 07	87.74 ± 30.33
	S	40.38± 1.72	154.3 1±1.2 3	145.3 9±2.2 4	5.88±0. 36	48.46±1. 68	0.52±0. 04	88.32 ± 25.17
B	D	49.21± 1.54	128.4 7±1.3 9	145.5 2±1.4 2	5.62±0. 76	46.37 ± 1.51	0.55±0. 15	90.15 ± 17.66
	S	47.14± 2.12	189.4 1±2.2 3	248.3 2±1.4 2	6.13±0. 45	127.34 ± 1.26	0.71±0. 08	97.13 ± 13.33
C	D	44.65± 1.58	135.6 7±1.8 3	181.3 ±2.37	5.87±0. 54	49.86 ± 1.83	0.51±0. 06	81.14 ± 26.34
	S	48.81± 1.24	204.2 7±1.7 6	278.5 6±2.. 42	6.18±0. 59	182.34 ± 1.12	0.77±0. 16	87.53 ± 20.93

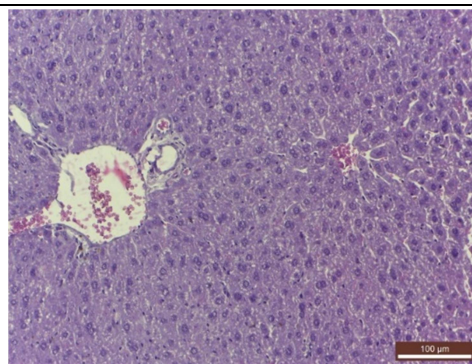
Tabelul 5. Evoluția IL6, TNFα și IFNγ la soarecii C57BL6.

LOT		IL6 (pg/μl)	TNFα (pg/μl)	IFNγ (pg/μl)
A	D	3.46±0.98	36.28±2.45	10.30±1.56
	S	3.79±1.12	38.52±1.77*	11.26±1.18*
B	D	3.26±0.88	31.47±3.18	11.14±1.39
	S	4.10±0.16	38.14±2.31*	13.28±1.17*
C	D	2.91±0.85	40.72±1.47	8.58±1.84
	S	4.62±2.15	54.15±5.24*	12.72±1.65

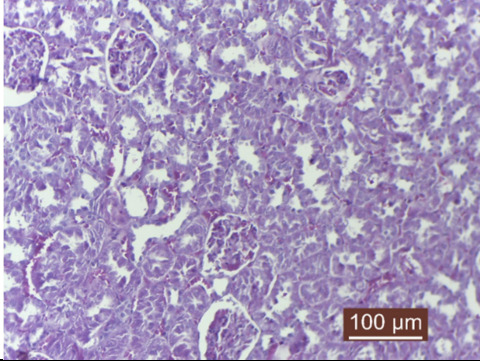
Imagini histologice (colorație tricromică Masson)



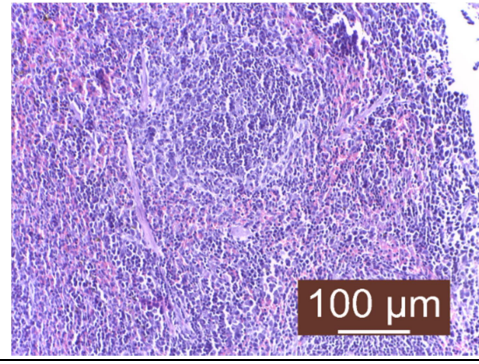
Lot A. Pulmon – aspect normal



LOT A. Ficac – aspect normal

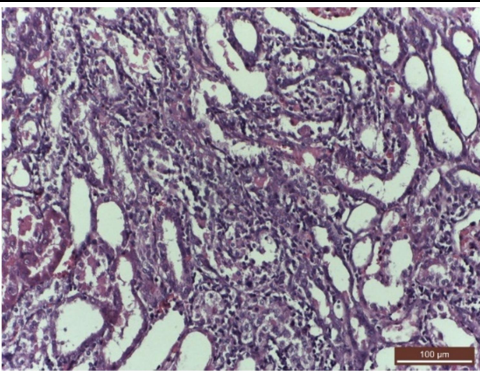


LOT A. Rinichi -aspect normal

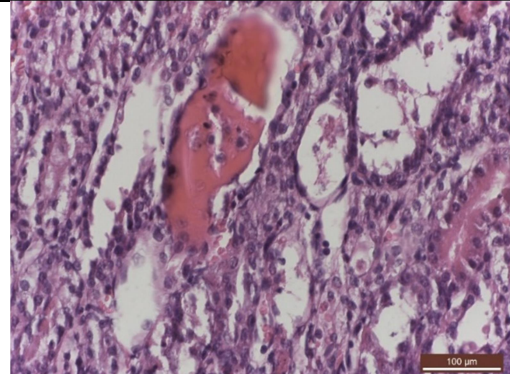


LOT A. Splina -aspect normal

Leziuni degenerative și inflamatorii



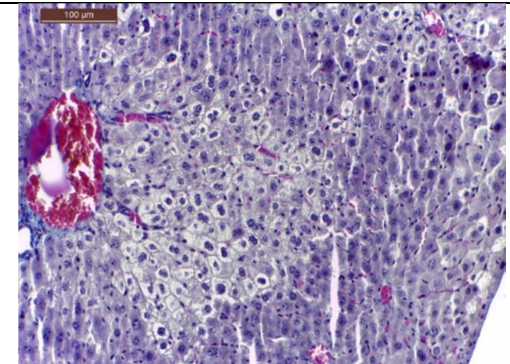
LOT B. Rinichi - Degenerarea epiteliului urinar.
Infiltrat inflamator monocitar în interstițiul renal.
Nefrita interstițială limfo-plasmocitară.



LOT C. Rinichi - Degenerarea epiteliului urinar.
Infiltrat inflamator monocitar în interstițiul renal.
Nefrită interstițială limfo-plasmocitară



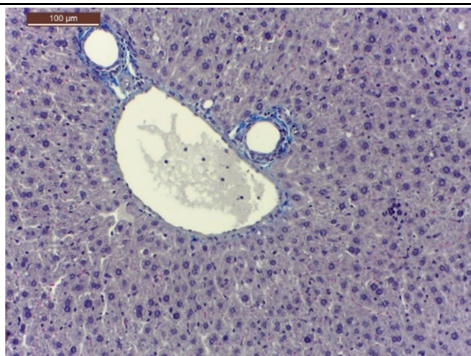
LOT C. Ficat - Degenerare hepatică severă



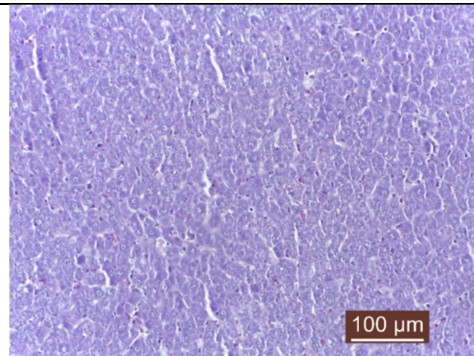
LOT C. Ficat - Degenerare hepatică severă
focalizată centrolobular

În acest studiu, a fost demonstrată nontoxicitatea vectorului **A** (AuPEI-CD), dar și toxicitatea de stadiu incipient a vectorilor **B** (**Db**) și **C** (**Da**) la șoarecii BALB/c de 12 săptămâni. Vectorul nonviral **A** (AuPEI-CD) nu induce modificări ale parametrilor evaluați la doza repetată de 500 mg/kg, dovedindu-se a fi foarte sigur pentru sănătatea animalelor utilizate în studiu. Vectorii **B** (**Db**) și **C** (**Da**) au indus modificări patologice, de stadiu incipient, la nivelul ficatului și rinichiului. Toate animalele au supraviețuit experimentului, iar recuperarea lor s-a realizat într-un timp foarte scurt.

Datele obținute pentru complexul A (AuPEI-CD) oferă un motiv întemeiat pentru o abordare clinic-terapeutică, dar pentru vectorii B și C sunt încă necesare studii pentru a elucida profilul lor toxicologic.



LOT B. Ficat - Degenerare hepatică moderată.
Activarea celulelor Kupffer



LOT B. Ficat - Degenerare hepatică difuză moderată

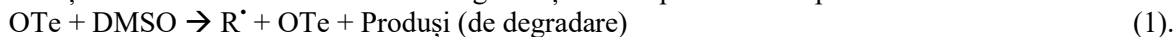
A.2.2.5. Caracterizarea unor combinații complexe pe bază de telur, ca potențiali furnizori de radicali liberi în țesutul tumoral

Se are în vedere ca într-o etapă ulterioară a proiectului (2023) compușii unimerici pe bază de telur să stea la baza asamblării de nanoplatforme funcționale cu activitate sinergică, de inhibare a anhidrazelor carbonice și de generatori de radicalilor liberi, apoptotic-activi asupra celulelor tumorale.

În anumite condiții, compușii organotelurici pot avea o activitate oxidantă, putând contribui la generarea de specii de oxigen reactive (*reactive oxygen species*, ROS). Conform Fuqiang Fan et al. telurul sub formă de nanoparticule induce apoptoza, la concentrații suficient de ridicare.⁷ Mecanismul activității oxidante este corelat cu terapia prin iradiere cu radiații gamma. În acest context, ne propunem să punem în evidență faptul că speciile organotelurice promovează formarea radicalilor liberi, recurgând la spectroscopia de rezonanță electronică de spin (RES), prin care se pot analiza radicalii liberi în mod direct, sau prin intermediul unor captatori de radicali.

În prezentul studiu compușii organotelurici (OTe) sunt considerați promotori de radicali liberi, ce pot fi identificați în soluții de dimetil sulfoxid (DMSO), prin spectroscopie RES. Spectrul RES al radicalilor liberi stabili generați de OTe poate fi înregistrat în mod direct. De cele mai multe ori însă, radicalii liberi au o viață mai scurtă decât timpul de înregistrare. În astfel de cazuri se înregistrează spectrul radicalilor de tipul aducților formați în urma reacției radicalilor liberi cu molecule capcană (SpinTrap).

Reacțiile de formare a radicalilor liberi generați de compușii OTe se pot scrie astfel:



Drept agenți SpinTrap vor fi utilizați 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide (DMPO) și alpha-phenyl N-tertiary-butyl nitron (PBN). Vor fi analizate patru situații, după cum urmează:

I. Compușii OTe în DMSO.

II. Compușii OTe în DMSO în prezența radiațiilor electromagnetice din domeniul UV-Vis.

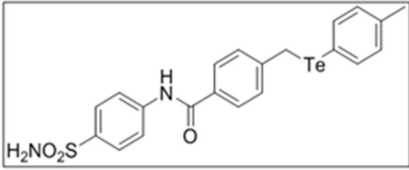
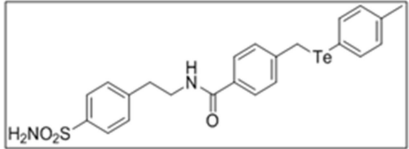
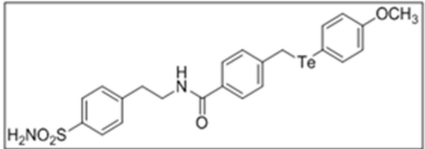
III. Compușii OTe în DMSO în prezența apei oxigenate.

IV. Compușii OTe în DMSO în prezența radiațiilor UV-Vis și a apei oxigenate.

A fost preparată o soluție în DMSO amestecând a 40 μL soluție OTe (10 mM), 30 μL spin trap (1.66 M) și 20 μL DMSO. Atunci când s-a studiat influența apei oxigenate, ultima porție de 20 μL DMSO a fost substituită cu un volum identic de apă oxigenată (30%). Soluția astfel preparată a fost injectată într-un tub capilar de cuarț cu volumul de 50 μL, diametrul intern de 1 mm și lungimea de 125 mm. Proba a fost introdusă în cavitatea de rezonanță a spectrometrului RES (EMXplus X-band EPR spectrometer - Bruker, Germany) care operează la 9.8 GHz. Cei patru compuși cu telur utilizați sunt reuniți în Tabelul 6.

Intensitatea semnalului RES a fost măsurată ca înălțimea de la vârf la vârf a liniei adecvate a spectrului RES a aducțiilor cu spin ai radicalilor liberi cu DMPO și PBN (R-DMPO^{*}, R-PBN^{*}). Pentru studiul generării radicalilor prin iradiere UV-Vis a fost utilizată o lampă cu puterea de 100 W, care emite în intervalul larg 200 – 2000 nm.

Tabelul 6. Structura și abrevierile compușilor organotelurici studiați.

Compound Structure	Name	M.W.
	Te258	508,06
	Te261	536,12
	Te264	552,12

Generarea radicalilor liberi în DMSO și în prezența apei oxigenate.

Compușii OTe dizolvați în DMSO produc cantități mici de radicali liberi în prezența unui oxidant ca apa oxigenată, așa cum se observă în Figura 10. În acest tip de experiment, disocierea homolitică a apei oxigenate ar putea face ca reacția de substituție să aibă o influență majoră în stabilirea raportului final dintre radicalii liberi.

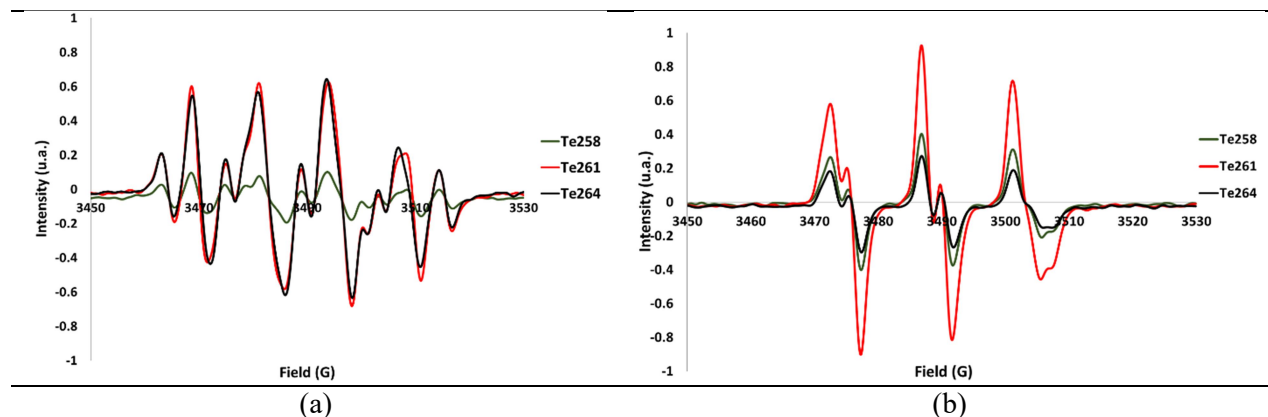


Figura 10. Spectrele ESR ale radicalilor generați de compușii OTe în sistemul DMSO/H₂O₂ în prezența DMPO (a) și respectiv PBN (b).

Ordinea valorilor intensității semnalelor din spectrele înregistrate în prezența apei oxigenate (Figurile 10a, 10b) în sistemul DMPO/H₂O₂ este Te261≈Te264>>Te258, în timp ce în sistemul PBN/H₂O₂ este Te261>>Te258>T264.

Generarea radicalilor liberi ai compușilor OTe în prezența apei oxigenate și sub influența radiațiilor UV-Vis

Spectrele radicalilor formați prin iradiere UV-Vis în prezența apei oxigenate (Figura 11e) sunt complet diferite de spectrele înregistrate în absența apei oxigenate, ceea ce înseamnă că natura radicalilor este diferită. Probabil că în prezența apei oxigenate apar fenomene de oxidare a DMSO, dar și a unor compuși OTe care conduc la formarea unor radicali noi. Abundența radicalilor formați în prezența apei oxigenate este net superioară celei din eșantioanele iradiate fără apă oxigenată.

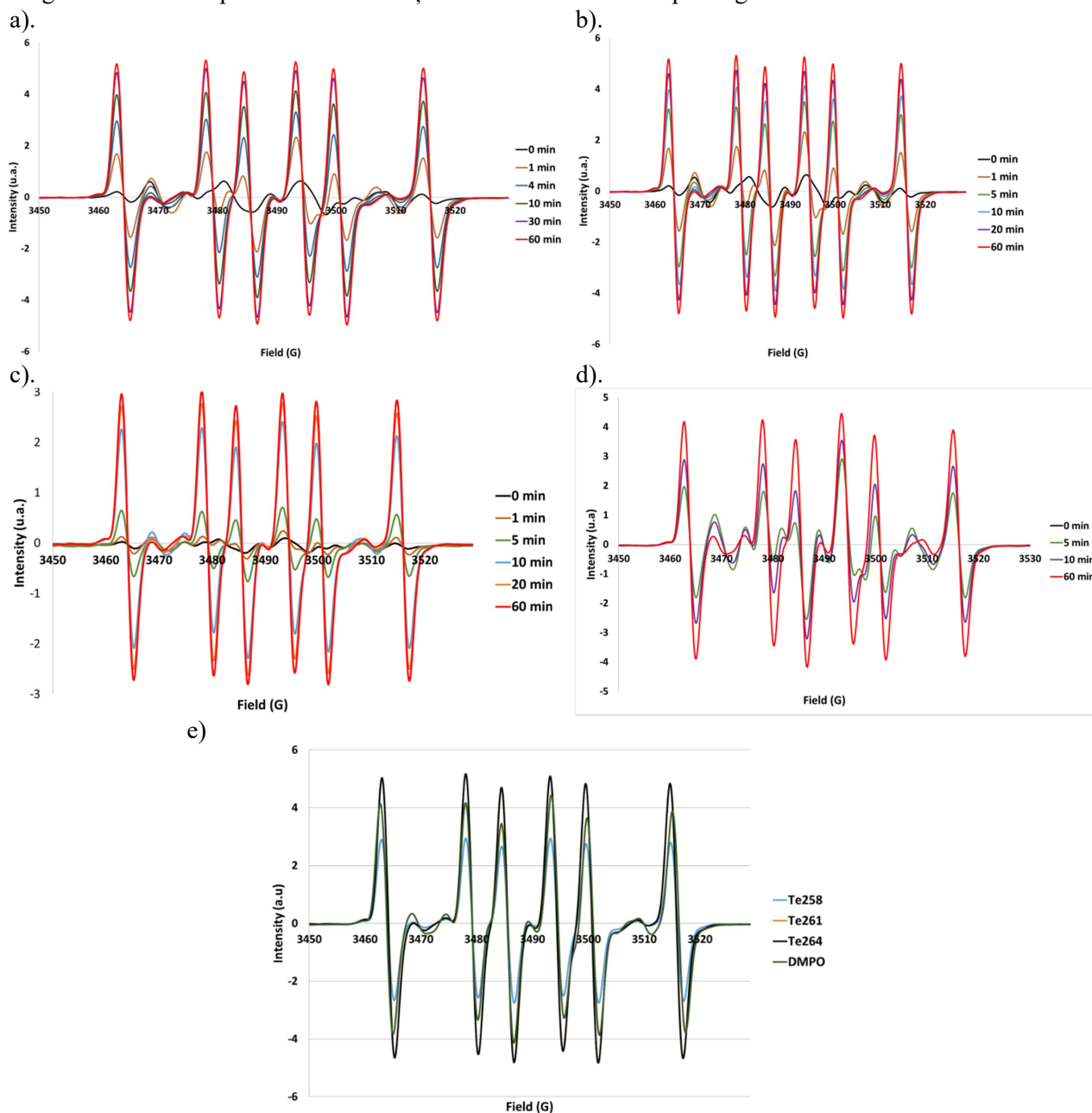


Figura 11. Spectrele ESR ale radicalilor formați de DMPO în prezența compușilor Te261 (a), Te264 (b), Te258 (c) și în absența compușilor OTe (d) în DMSO în timpul iradierii cu radiație electromagnetică din domeniul UV-Vis în prezența apei oxigenate. Spectrele ESR ale compușilor OTe după 40 minute de iradiere cu radiații UV-Vis (e).

În concluzie, radicalii liberi produși cu contribuția compușilor organotelurici au fost puși în evidență cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță electronică de spin (RES), recurgând la doi captatori de radicali, numite molecule „spin trap”, DMPO și PBN, capabili să se transforme în radicali metastabili prin reacție cu radicalii instabili. Profilul spectrelor RES ale radicalilor formați este particular speciei de radical liber necunoscut care reacționează cu moleculele spin trap, astfel încât nu este posibilă doar semnalarea prezenței radicalilor liberi, ca în cazul spectroscopiei optice, ci și identificarea variației compoziției de radicali liberi în timp sau în funcție de alte substanțe adăugate în sistem. În studiul de față a fost pusă în evidență generarea de radicali liberi, fără identificarea speciilor radicalice prin simularea spectrelor, subiect care va fi dezvoltat în etapa 2023 a proiectului.

DISEMINAREA REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE OBTINUTE

În etapa 2022 a proiectului TM-Vector au fost publicate în 4 lucrări ISI, care au tratat sinteza și caracterizarea intermediarilor de reacție și a AuNPs de generație I (AuPEI-CD) și caracterizarea compușilor mic moleculari pe baza de telur. De asemenea, au fost prezentate două conferințe și șase comunicări orale/postere la manifestări științifice naționale și internaționale.

Lucrari ISI

1. Petreni A, Iacobescu A, Simionescu N, Petrovici AR, Angeli A, Fifere A, Pinteala M, Supuran CT. Carbonic Anhydrase inhibitors bearing organotelluride moieties as novel agents for antitumor therapy. Eur J Med Chem. 2022 Oct 3;244:114811. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114811.
2. Dimofte A, Simionescu N, Petrovici A-R, Spiridon I. Probiotic Properties of Weissella confusa PP29 on Hibiscus sabdariffa L. Media. Fermentation. 2022; 8(10):553. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100553>.
3. Condurache M-I, Petrovici A-R, Simionescu N, Profire B-S, Confederat L-G, Bujor A, Miron A, Profire L. Simultaneous Determination of Glibenclamide and Silymarin Released from Chitosan Microparticles by HPLC-ESI-MS Technique: Method Development and Validation. Pharmaceutics. 2022; 14(10):2164. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102164>.

Participări la simpozioane / conferințe

1. Keynote speaker: Mariana Pinteala, Non-Viral Vectors-Based Polycations as Polyplexes for Gene Therapy. Design and Characterization. International Chemistry Conference, June 27-29, 2022, CEST.
2. Keynote speaker: Lilia Clima, Cationic Polymers Enclosed in Supramolecular Architectures Aimed for Nucleic Acid Delivery International Chemistry Conference, June 27-29, 2022, CEST.
3. Adina Arvinte, Multimetallic Nanostructures for Electrochemical Sensing Applications, 19th International Conference on Nanosciences and Nanotechnologies (NANOTEXNOLOGY 2022), Thessaloniki, Grecia, 5 – 8 iulie 2022
4. B.F. Craciun, D. Peptanariu, M. Pinteala. Novel PEI-β-CD functionalized gold nanoparticles as non-viral vectors for *in vitro* targeting of MCF-7 tumoral cells. XXXVIth National Chemistry Conference (CNCHIM-2022), Calimanesti – Caciulata, Valcea, Romania, 04-07 October 2022; Oral presentation
5. D. I. Bostiog, N. Simionescu, M. Pinteala. Multi-shell gold nanoparticles functionalized with methotrexate for targeted therapy of breast cancer; 14th International Conference on Physics of Advanced Material (IPCAM-14), Dubrovnik, Croatia; 8-15 September 2022. Oral presentation.

6. D. I. Bostiog, B. F. Craciun, E. L. Ursu, D. Peptanariu, M. Pinteala. Investigations on the layer by layer multi-shell gold nanoparticles functionalization for the development of effective non-viral gene vectors; 7th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN), Mugla, Turcia; 22-28 April 2022. Poster
7. D. I. Bostiog, C.M. Al-Matarneh, D. Peptanariu, M. Pinteala. Investigations on the layer by layer multi-shell gold nanoparticles functionalization for the development of effective non-viral gene vectors; Ediția a XXXVI-a a Conferinței Naționale de Chimie, CNChim-2022, Călimănești-Căciulata, România; 4-8 October 2022. Poster
8. D. Bejan, S. Shova, I. Rosca, A.I. Sandu, N.L. Marangoci; “Synthesis, structures and characterization of novel N-heterocyclic ligands”; Ediția a XXXVI-a a Conferinței Naționale de Chimie, CNChim-2022, Călimănești-Căciulata, România; 4-8 October 2022. Poster

Director proiect,

Dr. Mariana Pinteală

Bibliografie

¹ Sun, X.; Dong, S.; Wang, E., One-step synthesis and characterization of polyelectrolyte-protected gold nanoparticles through a thermal process. *Polymer* **2004**, *45* (7), 2181-2184.

² Note, C.; Kosmella, S.; Koetz, J., Poly(ethyleneimine) as reducing and stabilizing agent for the formation of gold nanoparticles in w/o microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *290* (1), 150-156.

³ Lee, S. H.; Bae, K. H.; Kim, S. H.; Lee, K. R.; Park, T. G., Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *International journal of pharmaceutics* **2008**, *364* (1), 94-101.

⁴ Cavuslar, O.; Celaloglu, C.; Duman, F. D.; Konca, Y. U.; Yagci, M. B.; Yagci Acar, H., pH and molecular weight dependence of auric acid reduction by polyethylenimine and the gene transfection efficiency of cationic gold nanoparticles thereof. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42* (12), 10078-10083.

⁵ Turkevich, J.; Cooper Stevenson, P.; Hillier, J.; A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **11** (1951): 55-75.

⁶ Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. <https://www.oecd.org/env/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure-9789264071049-en.htm>

⁷ Fan, F.; Gao, S.; Ji, S.; Fu, Y.; Zhang, P.; Xu, H. Gamma radiation responsive side-chain tellurium-containing polymer for cancer therapy. *Mater. Chem. Front.*, **2**, 2109—2115, 2018, doi:10.1039/c8qm00321a.