

PLATFORME TERANOSTICE ANTITUMORALE PE BAZĂ DE CARBON DOTS ȘI MATRICE POLIMERICE

Cod proiect: PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083

Contract finanțare: 37PCCDI/2018

Director proiect: Acad. Bogdan C. Simionescu

Raport de activitate științifică Etapa III (2020)

(a) Rezumat

Activitățile etapei 2020, aferente celor 3 proiecte componente, au fost îndeplinite în totalitate. În cadrul **P1** au fost preparate și investigate nanostructuri Carbon Dots dopate cu Mn(II). Acest tip de nanostructuri prezintă activitate antitumorală excelentă. De asemenea, pot fi utilizate ca agent de contrast RMN. Astfel, a fost îndeplinit obiectivul general al proiectului privind obținerea de platforme teranostice antitumorale și investigare RMN. Activitatea superioară a nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn(II) a fost evidențiată prin studii comparative raportate la activitatea antitumorală/ contrast RMN a unor nanostructuri de Carbon Dots dopate cu Gd(III) și Fe(III). Analizele de viabilitate celulară au arătat o toxicitate mai scăzută a compușilor complexați cu Mn(II) în comparație cu cei pe bază de Carbon Dots dopați cu Gd(III) sau Fe(III). În această etapă, au fost conduse studii preliminare în ceea ce privește investigarea *in vivo* a activității antitumorale concluziile fiind prezentate succint în prezentul raport.

În cadrul proiectului component **P2** au fost realizate mai multe tipuri de materiale aplicate pentru încapsularea de Carbon Dots cu activitatea antitumorală în vederea utilizării lor ca tratament împotriva cancerului. De asemenea, a fost obținut un biocompozit cu matrice polimerică și nanostructuri tip Carbon Dots, care prezintă proprietăți mucoadezive, în vederea administrării inhalatorii pentru testarea eficacității împotriva cancerului pulmonar. S-au preparat nanoparticulele de argint (AgNPs) cu lignosulfonat de sodiu (NaLS), în mediu apos, ce urmează a fi utilizate în etapa următoare pentru obținerea de nanocompozite AgNP/Carbon

În ceea ce privește proiectul component **P3**, au fost efectuate studii privind: (i) configurarea și realizarea instalației pilot de sinteză a carbon dots (CDs) pe baza rezultatelor/concluziilor obținute în activitățile anterioare; (ii) stabilirea reproductibilității procesului de obținere a CDs; (iii) identificarea potențialilor beneficiari ai procedurii de sinteză la scară pilot a nanostructurilor de tip carbon dots; (iv) identificarea și structurarea potențialelor oferte de servicii în domeniul sintezei și caracterizării de carbon dots.

(b) Descriere științifică și tehnică

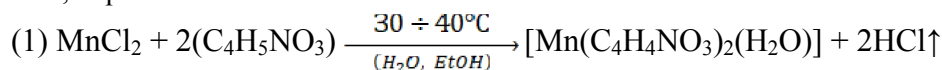
Proiect component: 1 (P1)

Caracterizarea morfo-structurală a nanostructurilor tip Carbon Dots dopate cu Mn(II) și evaluarea acestora ca agenți de contrast

În această etapă au fost preparate și investigate nanostructuri Carbon Dots dopate cu Mn(II). După cum va fi detaliat mai jos acest tip de Carbon Dots prezintă activitate antitumorală excelentă și pot fi utilizați cu rezultate foarte bune ca agent de contrast RMN. În acest fel, a fost atins obiectivul general al proiectului privind obținerea unor platforme

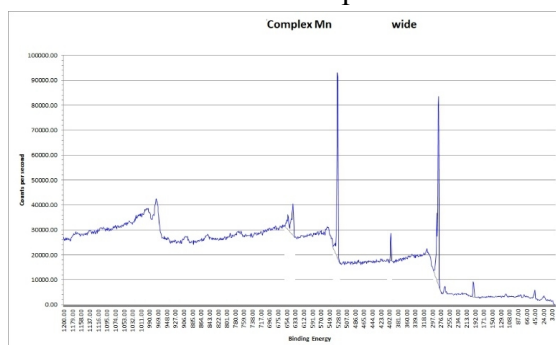
teranostice antitumorale si investigare RMN. Au fost investigate privind activitatea antitumorală/ contrast RMN si nanostructurile Carbon Dots dopate cu Gd(III) si Fe(III) dar, cu rezultate mai puțin adecvate comparativ cu Carbon Dots dopati cu Mn(II). Investigarea morfo-structurala a Carbon Dots dopate cu Gd(III) si Fe(III) a fost detaliata in Raportul stiintific aferent etapei 2 (2019).

Ca urmare, în aceasta etapa, au fost efectuate studii privind sinteza si caracterizarea nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn(II). Obținerea acestora implica, într-o prima etapa prepararea unui complex Mn(II)-N-Hidroxifitalimida care apoi este procesat pirolitic in conditii controlate de temperatura si durata a procesului de expunere termica. Procesul de complexare decurge la temperatura de 30-40°C într-un mediu de reactie compus dintr-un amestec de apa si etanol, dupa cum urmeaza:



Complexul este preparat prin dizolvarea sub agitare a cantităților corespunzătoare de MnCl₂ și N-Hidroxifitalimidă obținerii unui raport de combinare de 1/2, într-un amestec de apă/etanol (60/40% volumetric). Complexul Mn(II)-N-Hidroxifitalimidă obținut este procesat termic printr-un procedeu de piroliză parțială în atmosferă protectoare de N₂ la temperatura de 235-240°C. Durata de expunere termică a precursorului este de cca. 6 min. fiind esențială pentru obținerea unor nanostructuri de tip Carbon Dots cu configurația fizico-chimică favorabilă aplicării ca agent de contrast RMN și tratament anti-tumoral. După finalizarea fazei de piroliză, produsul rezultat este inundat brusc cu apă distilată la temperatura de cca. 6°C. Dispersia rezultata este centrifugata pentru selecția dimensională, supernatantul cu aspect limpede colectat conținând nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺. Dispersia apoasă rezultată este înghețată la cca. -25°C și apoi liofilizată, obținându-se nanostructuri de tip „Carbon Dots” dopate cu Mn²⁺ în stare uscată sub forma unei pulberi fine cu aspect galben-marونی. În vederea administrării, pulberea rezultată se re-dispersează în apă la concentrația necesară pentru obținerea efectului terapeutic sau conform cerințelor specifice investigării RMN.

Investigarea morfo-structurala a fost efectuată prin tehnici XPS si DLS. Pentru evidentiarea diferentelor structurale dintr-un complex Mn(II)-N-hidroxifitalimida utilizat ca precursor si nanostructurile de tip Carbon Dots dopate cu Mn(II) rezultate, au fost comparate datele obtinute la investigarea XPS efectuată in cele doua cazuri. In Figura 1 este prezentat spectrul XPS general înregistrat in cazul complexului Mn(II)-N-Hidroxifitalimida si concentratiile atomice/masa a speciilor atomice constituente.



	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
Mn 2p	2.71	10.22
O 1s	25.05	27.49
N 1s	3.79	3.64
C 1s	67.06	55.26
Cl 2p	1.40	3.40

Figura 1. Spectrul XPS general înregistrat pentru complexul Mn(NHF)₂ utilizat ca precursor la prepararea nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn²⁺ si concentratiile atomice/masa elementale

In Figura 2 sunt prezentate spectrele de inalta rezolutie (C1s, O1s, N1s, Mn2p) inregistrate pentru complexul Mn(II)-N-Hidroxiptalimida iar in Tabelul 1 concentratiile diverselor grupe functionale prezente in structura acestuia.

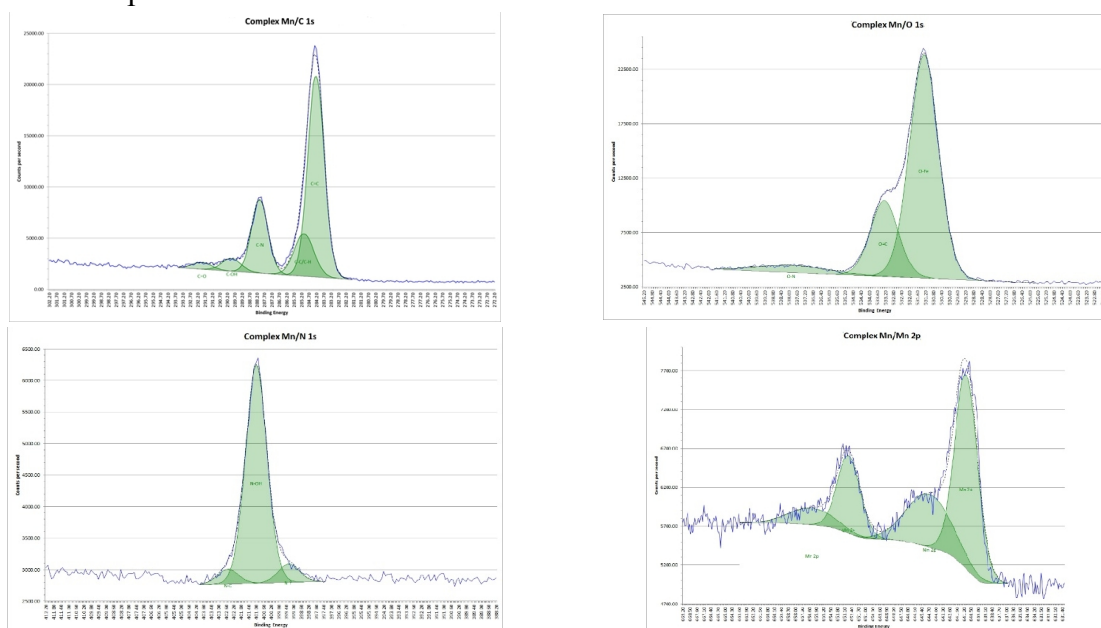
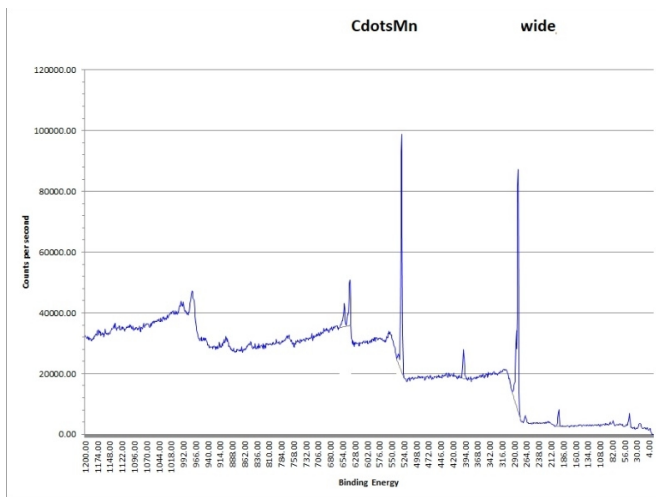


Figura 2. Spectrele de inalta rezolutie C1s, O1s, N1s, Mn2p inregistrate pentru complexul Mn(NHF)₂ utilizat ca precursor la prepararea nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn²⁺

Tabel 1. Concentratiile grupelor functionale prezente in structura Mn(II)-N-Hidroxiptalimida

C1s			O1s		
	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]		Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
C=C	57.65	57.65	O-Mn	70.92	70.92
C-C/C-H	14.60	14.60	O=C	23.33	23.33
C-N	21.05	21.05	O-N	5.74	5.74
C-OH	4.35	4.35	-	-	-
C=O	2.35	2.35	-	-	-
N1s			Mn2p		
	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]		Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
N-OH	86.70	86.70	Mn2+	66.24	66.24
N-C	5.89	5.89	Mn2p	33.76	33.76
N-X	7.41	7.41	-	-	-

In Figura 3 este prezentat spectrul XPS general inregistrat in cazul nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn(II) si concentratiile atomice/masa a speciilor atomice constituente.



	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
Mn 2p	2.50	9.52
O 1s	23.79	26.42
N 1s	4.77	4.63
C 1s	67.74	56.47
Cl 2p	1.20	2.95

Figura 3. Spectrul XPS general inregistrat pentru nanostructurile Carbon Dots dopate cu Mn^{2+} si concentratiile atomice/masa elementale

In Figura 4 sunt prezentate spectrele de inalta rezolutie (C1s, O1s, N1s, Mn2p) inregistrate in cazul nanostructurilor Carbon Dots dopate cu Mn(II) si concentratiile atomice/masa ale speciilor atomice constituente.

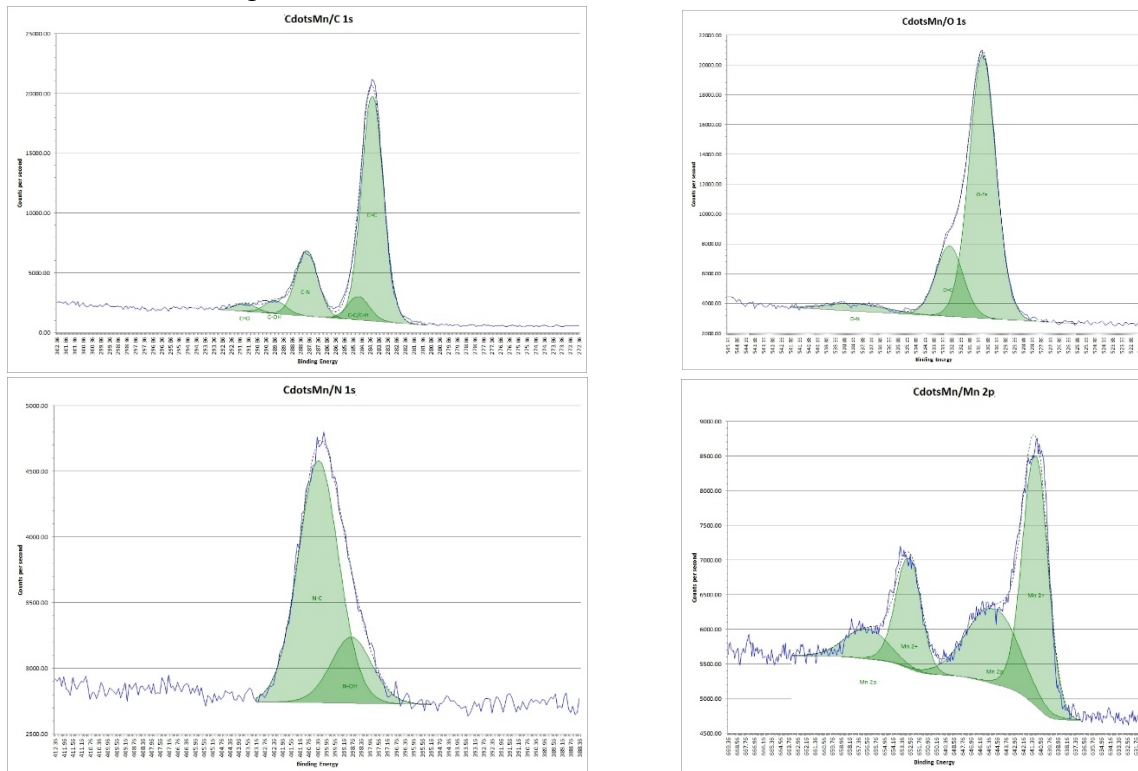


Figura 4. Spectrele de inalta rezolutie C1s, O1s, N1s, Mn2p inregistrate pentru nanostructurile tip Carbon Dots dopate cu Mn^{2+}

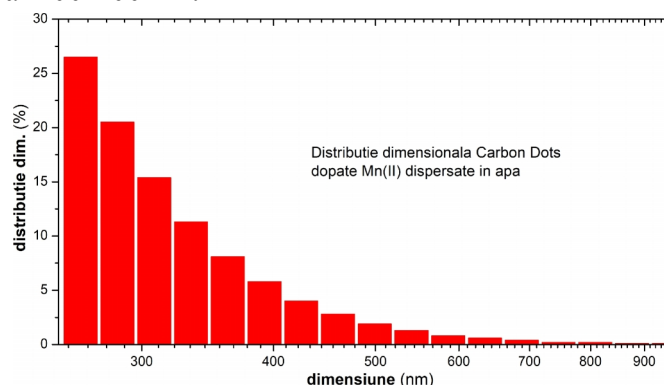
Investigarea XPS a evidentiat modificarile structurale survenite ca urmare a procesarii pirolitice a complexului. Astfel, se remarca cresterea continutului de carbon si a grupelor functionale specifice ca urmare a formarii miezului grafitic. Apar de asemenea modificari importante ale concentratiilor altor grupe functionale (N-OH de ex.) ca urmare a destructurarii survenite in urma expunerii termice, a reconfigurarii acestora pe suprafata miezului grafitic.

Tabel 2. Concentratiile grupelor functionale prezente in Carbon Dots dopate cu Mn(II)

C1s			O1s		
	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]		Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
C=C	67.29	67.29	O-Mn	74.96	74.96
C-C/C-H	7.02	7.02	O=C	20.22	20.22
C-N	19.47	19.47	O-N	4.82	4.82
C-OH	3.85	3.85	-	-	-
C=O	2.37	2.37	-	-	-
N1s			Mn2p		
	Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]		Atomic conc. [%]	Mass conc. [%]
N-OH	21.47	21.47	Mn2+	63.56	63.56
N-C	78.53	78.53	Mn2p	36.44	36.44

In

Figura 5 este prezentata distributia dimensionala inregistrata prin DLS pentru Carbon Dots dopati cu Mn(II) dispersati in apa. Nanostructurile prezinta aceeasi tendinta de aglomerare observata si in cazul nanostructurilor Carbon Dots nedopate si se datoreaza organizarii acestora in clustere ca urmare a interactiunilor survenite intre diversele grupe functionale localizate la suprafata miezului grafitic. Procentul cel mai ridicat al clusterelor se situeaza in intervalul dimensional 200-400 nm.

**Figura 5.** Distributia dimensionala inregistrata pentru Carbon Dots dopati cu Mn(II)

Evaluarea *in vitro* pe linii celulare selectate a platformelor teranostice pe bază de nanostructuri Carbon Dots dopate cu Gd³⁺, Fe³⁺ și Mn²⁺

S-au testat *in vitro* pe linii celulare nanostructuri pe baza de Carbon Dots-NHF-Gd³⁺, Carbon Dots-NHF-Mn²⁺ și Carbon Dots-NHF-Fe³⁺. Analizele de viabilitate celulara au aratat ca, compusii pe baza de Carbon Dots- Gd³⁺ și Fe³⁺ au o toxicitate ridicata la nivelul celulelor mamare normale (Fig. 1. A_3,4) fata de compusii complexati cu Mn²⁺ (Fig. 1 A_2). In acelasi timp, actiunea antitumorală a compusului Carbon-Dots-Mn²⁺ este semnificativ crescuta (Fig. 1 B_2) fata de cea a compusilor pe baza de Gd³⁺ și Fe³⁺ (Fig. 1 B_3,4). Evaluarea efectului antitumoral *in vitro* pe linii celulare mamare a fost urmata de evaluarea imagistica prin tehnica de rezonanta magnetica (MRI). Design-ul experimentului a avut în vedere evaluarea potențialului de îmbunătățire al semnalului MRI atât în secvențe de tip T1 cât și T2, utilizând diferite concentrații de nanoparticule, dispersate într-un gel de agaroză 1% preparată în soluție tampon fosfat 0.01M, la un pH de 7.4. Au fost testate un număr de 4 compuși, după cum urmează: (1) Carbon-dots necomplexati, considerată probă de control negativ – Control (-), (2) Carbon-dots complexati cu Gd³⁺, considerată probă control pozitiv - Control (+), (3) Carbon-dots complexate cu Fe³⁺ și (4) Carbon-dots complexati cu

Mn²⁺. Scanarea MRI s-a efectuat cu ajutorul instrumentului nanoScan (Mediso, Ungaria) pentru achizitii duale PET-MRI, generând un câmp magnetic de 1 Tesla. Eficacitatea compușilor testați pentru îmbunătățirea semnalului MRI a fost realizată prin determinarea timpilor de relaxare T1 și T2 (longitudinali și transversali), urmărind scurtarea acestor timpi.

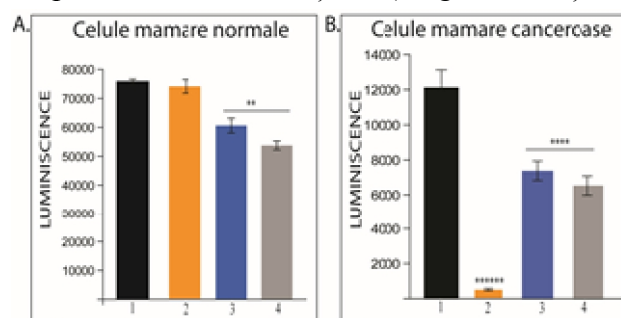


Fig. 1 A. Celule mamare normale; B. Celule mamare canceroase; 1. Control; 2. C-Dots_Mn2+, 3. C-Dots_Gd3+, 4. C-Dots_Fe3+.

Pentru determinarea timpului de relaxare T1 s-au înregistrat secvențe de tip gradient echo (T1 GRE), iar pentru T2 secvențe tip multi-echo 2D spin echo standard (T2 SE). Pentru determinarea timpului de relaxare T1 s-a utilizat metoda de estimare în două puncte. Unde: I_1 , I_2 – intensitatea semnalului; TR – timpul de repetiție (167 ms); θ_1 și θ_2 – unghiuri de flip (FA - de 10° și 60°).

Alți parametri de lucru: TE = 3.8 ms, NSA=2, grosime slice = 1,5 mm, gap = 0,5 mm. Regiunea de interes (ROI) circulară, cu diametrul de 10 mm, s-a poziționat în zona centrală a fiecărei probe, pentru care soft-ul instrumentului a generat o valoare medie a intensității semnalului. Pentru determinarea timpului de relaxare T2, parametrii de lucru au fost următorii: TR= 400 ms, TE= 20, 40, 80, 120 ms, NSA = 2, grosime slice = 4 mm, gap = 1 mm. Datele au fost extrase similar ca la T1, cu ROI de 10 mm. Valorile calculate pentru timpii de relaxare longitudinală(T1) și transversală(T2) obținute prin scanarea MRI a probelor Fe3+ și Mn2+, în comparație cu probele de control Control (-),Control (+) se pot observa în Tabel 1.

Tabel 1.

Compus	T1						T2					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Contr (-) (1)	1679,69	1690,17	1636,16	1680,02	1656,76	1676,61	101,77	109,34	115,43	101,11	107,61	102,59
Contr (+) (2)	1720,66	1472,4	1459,21	1245,63	1217,01	1218,37	98,5	95,3	91,4	93,3	94,8	92,2
CDots-Fe(III) (3)	1515,06	1612,69	1489,10	1507,28	1509,18	1448,14	114,5	103,9	100,49	102,92	101,76	96,49
CDots-Mn(II) (4)	1519,41	1446,74	1079,98	943,81	959,98	959,27	101,54	96,35	88,73	85,91	83,55	84,88

Din datele obținute se observă capacitatea compusului Mn²⁺ de a scurta atât T1 cât și T2, cu creșterea concentrațiilor de la C1 (0.005 mg/mL) la C6 (0,03 mg/mL). Compusul pe baza de Gd³⁺ și Fe³⁺ au o acțiune mai discretă și aceasta variază mai puțin cu concentrația, în condițiile de lucru testate. În 2020 am realizat în procent de 100% testarea *in vitro* a eficienței antitumorale a Carbon Dots-NHF-Gd³⁺, Carbon Dots-NHF-Mn²⁺ și Carbon Dots-NHF-Fe³⁺ și a capacității de folosire a acestora ca agenți de contrast. Datele experimentale demonstrează proprietățile superioare ale CD-NHF-Mn²⁺ atât ca agent de contrast cât și din punctul de vedere al toxicității scăzute comparativ cu compusul pe baza de Gd³⁺ propus inițial.

Din cauza întârzierii finanțării, a stării de urgență și a faptului că unele instituții au fost implicate în principal în testarea COVID lucrarea va fi trimisă spre publicare la începutul anului 2021. În plus, pentru că lucrarea ce va conține rezultatele *in vitro* să aibă un impact cât mai bun, considerăm că lucrarea trebuie să includă și datele experimentale *in vivo*, ce demonstrează utilizarea teranostică a CD complexați.

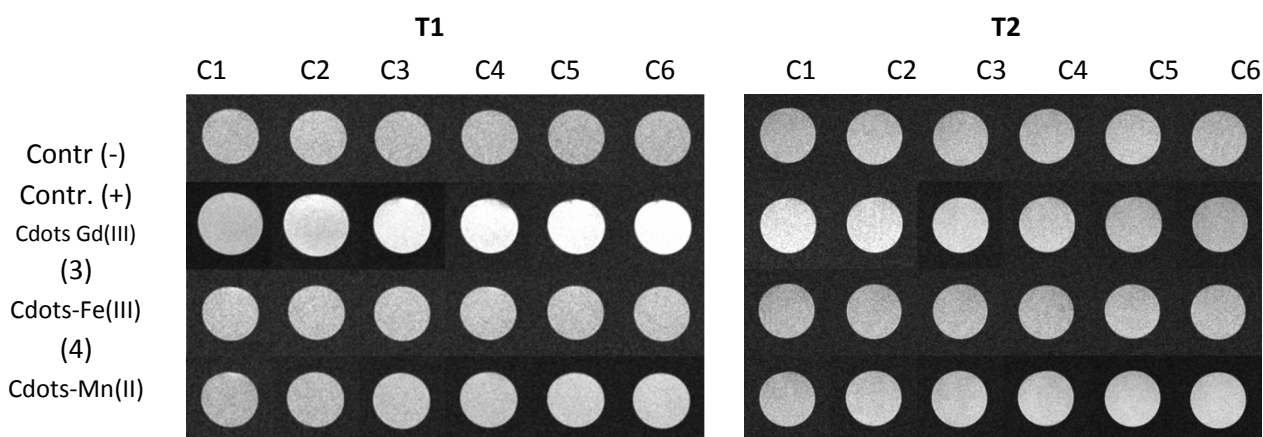


Figura 2. Datele imagistice la scanarea MRI a probelor Fe³⁺, Mn³⁺, Control (-) și Control (+), obținute în aceleași condiții și prin aceleași secțiuni.

Investigarea *in vivo* a activității antitumorale a formulărilor pe bază de complecși Carbon Dots - Gd³⁺ pe model animal cu tumori induse (studii preliminare)

Datorita faptului ca structurile complexate cu Mn sunt mai puțin toxici, au activitate antitumorală ridicată și au proprietăți superioare ca și agent de contrast, s-au înlocuit complecșii Carbon Dots – Gd³⁺ cu cei cu Mn. În această etapă din cadrul activității am evaluat efectul CD-NHF-Mn²⁺ *in vivo* pe model animal cu tumori mamare induse (Fig. 3). Pentru a evalua influența CD-NHF-Mn²⁺ în evoluția tumorii și diseminarea metastazelor, celulele canceroase mamare murine s-au injectat ortotopic (în glanda mamara) în soareci din specia Balb/c. Modelul animal ales este frecvent utilizat în studiul cancerului mamar deoarece redă complexitatea interacțiilor tuturor sistemelor (hormonal, imunitar, nervos etc). În acest studiu s-a indus modelul mamar tumoral prin injectarea celulelor liniei murine triplu negativ 4T1 în glanda mamara (1 milion celule/soarece). Linia de celule de cancer mamar murin (4T1) este extrem de invazivă și metastazează la nivelul ganglionilor limfatici, plămânilor, creierului, ficatului, osului, ovarului similar cancerului uman de sân triplu negativ în stadiul IV. La 2 săptămâni după injectare când tumorile primare sunt vizibile s-a început administrarea CD-NHF-Mn²⁺. Animalele au fost împărțite în: **1.** grupul cu model tumoral indus dar fără nici un tratament adițional în vederea evaluării dezvoltării tumorale (tumora primară și metastaze) și injectați cu Gadovist pentru a putea fi scanati prin tehnica RMN **2.** grupul cu model tumoral indus și 20% CD-NHF-Mn²⁺ per volum sanguin (administrat prin injectare intraperitoneală); Tratamentul cu 20% CD-NHF-Mn²⁺ a redus rata de creștere a tumorilor primare (cercurile albe) (Fig. 3B N=7 soareci/grup).

Gliomul reprezintă unul dintre cele mai frecvente tipuri de tumori cerebrale primare umane și este responsabil de majoritatea deceselor cauzate de acest tip de cancer. În funcție de malignitatea lor, gliomele sunt împărțite în patru grade (OMS I-IV), mai puțin agresive fiind astrocitomul (gradul I - 5-10 ani media de supraviețuire) și cele mai maligne fiind glioblastomul (GMB, OMS gradul IV - 1,5 ani media de supraviețuire). Tratamentul standard, care constă în intervenții chirurgicale combinate cu radioterapie și chimioterapie, este încă inefficient pentru faptul că GMB se caracterizează printr-un grad ridicat de heterogenitate intra-tumorală, proliferare microvasculară puternică și proprietăți infiltrante. Studiile moleculare au clasificat GBM în patru subtipuri, cum ar fi proneural (PN), neuronal (NL),

clasic (CL) și mezenchimal (MES), unde subtipul MES este cel mai agresiv și puternic asociat cu un prognostic slab în comparație cu subtipul PN. Mai mult, la pacienții care urmează radioterapie și chimioterapie se produce o conversie de la PN la MES.

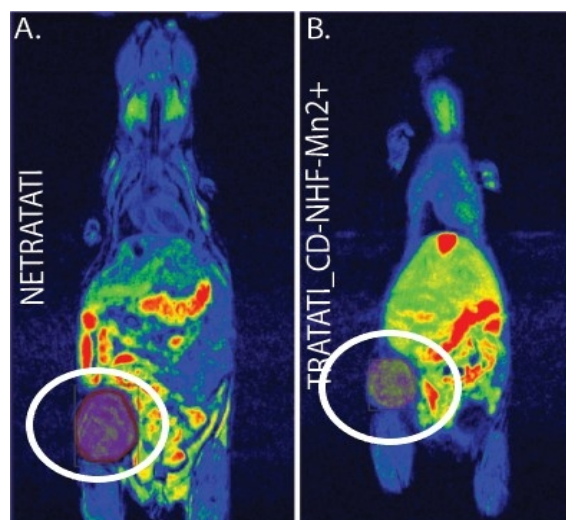


Figura. 3 A. Soareci netratati si injectati cu Gadovist (agent de contrast comercial);
B. Soareci tratati cu CD-NHF-Mn²⁺

Nanostructurile, cum ar fi cele pe baza de carbon (C-Dots), sunt utilizate ca sisteme de eliberare a medicamentelor pentru a îmbunătăți solubilitatea și acumularea diferitelor medicamente la locul tumoral, reduce efectele secundare ale medicamentului și îmbunătățesc toleranța la medicament. Mai mult, structurile de carbon sunt capabile să pătrundă prin bariera hematoencefalica (BBB). Întrucât rezultatele noastre anterioare au aratat că structurile de carbon preparate din N-hidroxitftalimidă (CD-NHF) nu afectează celulele tumorale cerebrale, în studiul de față am extins investigația folosind diferite combinații terapeutice. Rezultatele noastre anterioare au arătat că tratamentul cu CD-NHF (5%, 50μg/ml) nu afectează în mod semnificativ viabilitatea liniei celulare U87 (Figura 4A, B_2). În studiul actual, ne propunem să sensibilizăm celulele de gliom U87 la tratamentul CD-NHF prin inhibarea unor cai moleculare cheie. Unul dintre inhibitori, K252A, este un inhibitor pan-Trk, precum și semnalizarea lor ulterioara, inclusiv PI3/Akt și Ca²⁺/protein kinaza II calmodulin-dependentă (CaMKII). Al doilea inhibitor, AktVIII, deși poate inhiba toate cele 3 izoforme Akt, este mai specific pentru Akt1 și Akt2 și poate inhiba, de asemenea, Ca²⁺/protein kinaza dependentă de calmodulină Iα (CaMKIα). Luând în considerare toxicitățile asociate inhibiției PI3K/Akt/mTOR și noile date care demonstrează metastazarea crescută indusă de nanoparticule prin inducerea scurgerilor endoteliale, am testat concentrația redusă atât a CD-NHF, cât și a inhibitorilor. Pentru a evalua în mod eficient rolul AKT-urilor și inhibitorilor TrkB în celulele de cancer cerebral s-a evaluat mai întâi efectul acestora la nivelul viabilității (Figura 4).

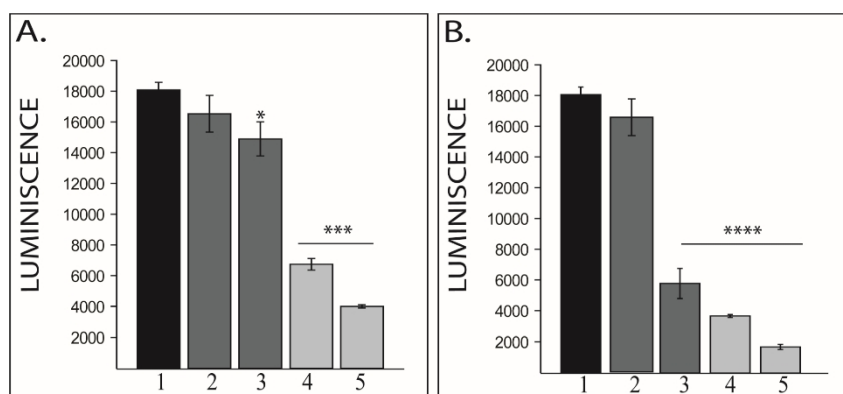


Fig. 4 Efectul inhibitorilor CD-NHF, K252A (A) și CD-NHF, AKT VIII (B) inhibitorilor în viabilitatea celulelor U87. A.1. Control (netratat), 2. CD-NHF 5%, 3. K252A (5 nM), 4. K252A+1% CD-NHF, 5. K252A+5% CD-NHF; B.1. Control (netratat), 2. CD-NHF 5%, 3. AKT VIII (1.7 μM), 4. AKT VIII+1% CD-NHF, 5. AKTV III+5% CD-NHF; * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

Așa cum era de așteptat și în conformitate cu datele noastre anterioare, tratamentul cu 5% CD-NHF (50 μg/ml) nu afectează în mod semnificativ viabilitatea celulară (Fig. 4_A, B_2) relativ la grupul de control (Fig. 4_A, B_1). Inhibitorii K252A și AKT VIII singuri afectează semnificativ viabilitatea celulelor canceroase de gliom (Fig. 4_A, B_3), AktVIII prezentând un efect mai pronunțat față de K252A. Mai mult, concentrația testată de inhibitori împreună cu 1% sau 5% CD-NHF reduc și mai mult viabilitatea celulelor cancerului cerebral într-o manieră dependentă de doza CD-NHF (Figura 4A, B_4,5). Împreună, aceste date indică faptul că terapia combinată a avut un efect semnificativ mai mare asupra viabilității celulelor U87 (celule tumorale cerebrale) în cultura 2D. Pentru următoarele seturi de experimente am testat doar 1% CD-NHF (10 μg/ml) pentru a respecta ipoteza principală. Faptul că celulele invazive de glioblastom reprezintă o cauză majoră a recurenței și mortalității tumorale cauzate de acest tip de cancer, am evaluat efectul terapiei combinate asupra invazivității celulelor canceroase U87 (Figura 5). Prezența 1% CD-NHF (Figura 5A, B_2) sau K252A (Figura 5A, B_3) nu afectează în mod semnificativ migrația și invazia celulelor U87 (Figura 5A, B_1). Al doilea inhibitor testat, AktVIII (Figura 5A, B_4) afectează semnificativ atât migrația, cât și invazia celulelor U87 și acest lucru poate fi corelat cu o inhibare mai pronunțată a viabilității celulare relativ la tratamentul cu K252A. Mai mult, tratamentele combinate (CD-NHF și un inhibitor) au inhibat puternic migrația și invazia pentru ambii inhibitori testați (Figura 5A, B_5,6). Efectul tratamentelor combinate asupra migrației și invaziei completează efectul lor asupra viabilității celulare. Expresia markerului vimentină (Figura 5C), un marker al EMT (tranzitiei epitelial mezenchimala), susține, de asemenea, datele privind migrația și invazia, demonstrând reglarea descendentă a markerului EMT în aceleași grupuri tratate în care migrația și invazia s-au dovedit a fi afectate semnificativ.

Viabilitatea/proliferarea celulelor și invazivitatea pot fi investigate în același timp într-un sistem de cultură celulară de nivel superior, sistemul de cultură 3D. Celulele sunt cultivate într-un matrigel care le permite să formeze sferoizi. Mărimea sferoidilor reflectă viabilitatea/proliferarea celulară în timp ce proiecțiile invazive se corelează cu invazivitatea. Investigația Brightfield a sferoizilor formați (Figura 6) susține în continuare eficiența tratamentului combinat atât prin reducerea dimensiunii sferoizilor, cât și prin afectarea proiecțiilor invazive.

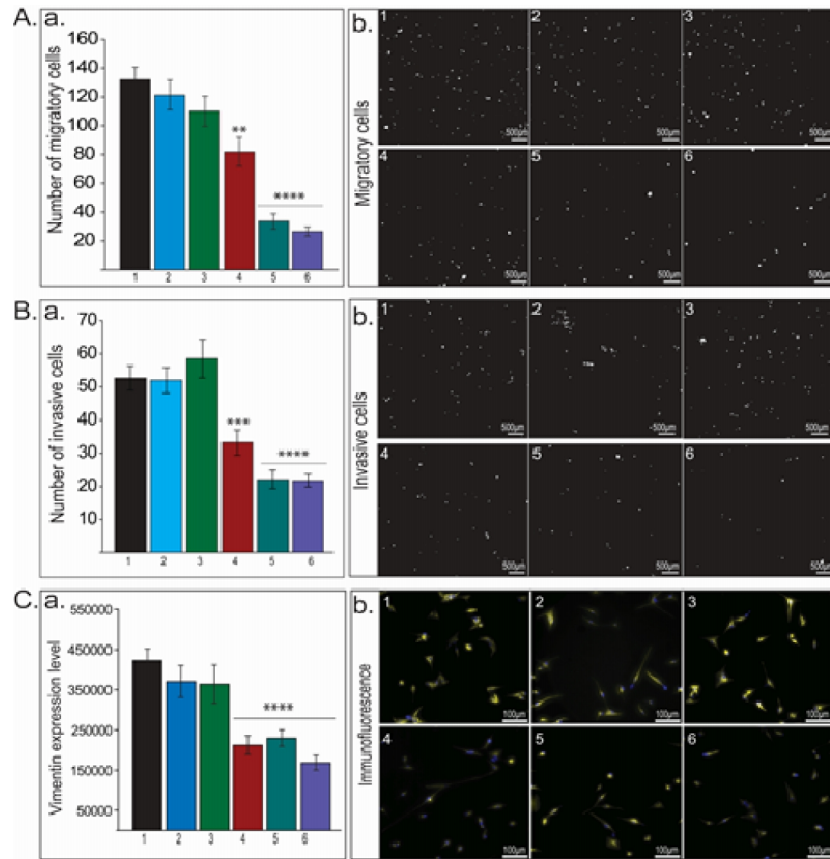


Figura 5. Efectul CD-NHF și inhibitorilor K252A și AKT VIII în migrarea și invazia celulelor U87. A. Migrarea celulară. a. Cuantificarea celulelor migratoare; b. Imagini reprezentative ale celulelor migratoare. B. Invazia celulară. a. Cuantificarea celulelor invazive; b. Imagini reprezentative ale celulelor invazive; C. Nivelul de expresie a markerului Vimentin în culturile 2D. a. Cuantificarea expresiei de vimentin. b. Imagini reprezentative ale expresiei de vimentin. 1. Control (netratat), 2. CD-NHF 1%, 3. K252A (5 nM), 4. AKTVIII (1.7 μM), 5. K252A+1% CD-NHF, 6. AKTVIII+1% CD-NHF

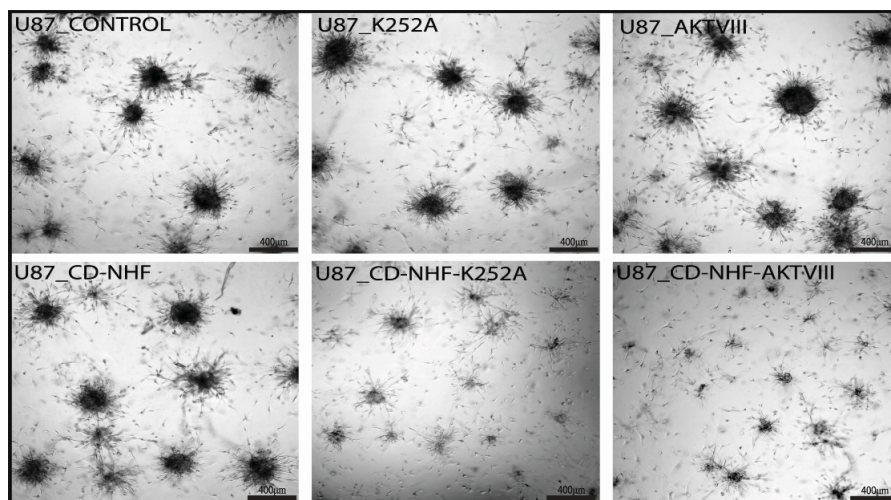


Figura 6. Efectul CD-NHF și inhibitorilor K252A și AKT VIII în sistemul 3D matrigel al celulelor U87

Expresia receptorului TrkB și p75NTR. Conform instrucțiunilor producătorului K252A, 5 nM este concentrația nominală suficientă pentru a bloca activitatea receptorilor CaMKII și

TrkA, dar parțial păstrează receptorii TrkB și TrkC. Pentru a demonstra că concentrația de 5nM K252A nu inhibă activitatea tuturor receptorilor Trk, am evaluat nivelul de fosforilare TrkB (Figura 7A). Datele de imunofluorescență demonstrează că nu există nicio variație semnificativă a fosforilării TrkB între grupurile tratate.

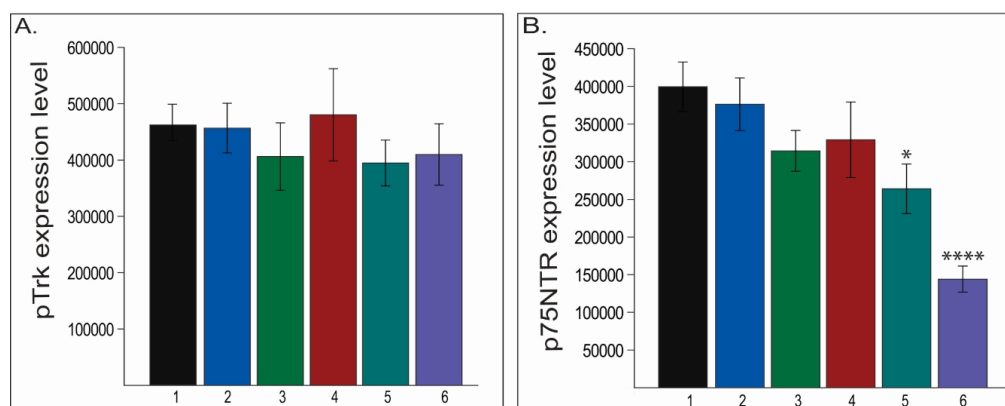


Figura 7. Evaluarea fosforilării TrkB și a nivelurilor de expresie p75NTR. A. Fosforilarea TrkB . B. p75NTR. 1. Control (netratat), 2. CD-NHF 1%, 3. K252A (5 nM), 4. AKTVIII (1.7 μ M), 5. K252A+1% CD-NHF, 6. AKTVIII+1% CD-NHF. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0005$

Un alt receptor, p75NTR, care este un regulator important al invaziei gliomului și care se poate lega cu agoniști Trk cu afinitate scăzută, a fost investigat în continuare (Figura 7B) datorită rolului său complex (pro-apoptotic vs supraviețuirea și migrarea celulei). Spre surprinderea noastră, deși nu am vizat direct p75NTR, tratamentele combinate îi afectează semnificativ expresia (Figura 7B_5,6), din nou mai proeminent în grupul CD-NHF-AKTVIII. Aceste rezultate se pot datora interacțiunilor dintre receptorii Trk și p75NTR sau ca o consecință a supraviețuirii celulare scăzute în ansamblu. În gliom, p75NTR joacă un rol central în reglarea invaziei și exprimarea scăzută a p75NTR în grupurile de tratamente combinate este corelată cu migrarea afectată și invazia pe care am raportat-o. Migrația, invazia și vimentina sunt scăzute și în AKTVIII fără a fi însoțite de o pierdere semnificativă a expresiei p75NTR. Acest lucru indică faptul că p75NTR nu este singura moleculă implicată în aceste procese. Mai important, într-un alt tip de cancer, p75NTR este o caracteristică a populației stem de cancer mitotic care mărește chimiorezistența. Dacă acest lucru apare și în celulele U87, afectarea expresiei p75NTR poate fi asociată cu chimiorezistență scăzută.

Efectele terapiei combinate asupra căilor de semnalizare Trk. Receptorii Trk activează mai multe cascade moleculare, inclusiv PI3K/Akt, MAPK/ERK și calea PLC γ . În plus față de inhibarea K252A/Trk, calea PI3K/Akt poate fi inhibată direct de AKTVIII. Concentrațiile de lucru utilizate de K252A nu inhibă toate cele trei tipuri de receptori Trk, în timp ce inhibitorul AKTVIII a inhibat doar subtipul Akt1/Akt2 fără a inhiba izoforma Akt3. Datele noastre (Figura 8A) demonstrează un nivel semnificativ de fosforilare scăzut al pan-pAkt nu numai în grupurile tratate cu K252A (Figura 8A_3) și AKTVIII (Figura 8A_4), ci și în grupul tratat cu CD-NHF (Figura 8A_2) relativ la grupul de control (Figura 8A_1). Mai mult, scăderea nivelurilor de fosforilare este chiar mai mare prin tratamentele combinate (Figura 8A_5,6).

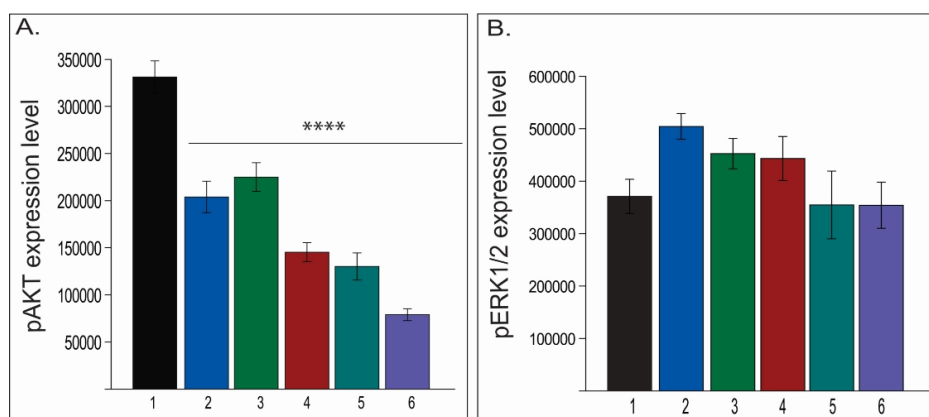


Figura 8. Evaluarea fosforilării AKT și pERK1/2. A. Fosforilarea AKT . B. Fosforilarea ERK. 1. Control (netratat), 2. CD-NHF 1%, 3. K252A (5 nM), 4. AKTVIII (1.7 μM), 5. K252A+1% CD-NHF, 6. AKTVIII+1% CD-NHF. ****p< 0.0005.

Calea MAPK / ERK (Figura 8B) evaluată prin măsurarea nivelurilor de fosforilare a ERK1/2 nu a ajustat semnificativ nivelurile de expresie între grupurile tratate, sugerând că CD-NHF nu interferează puternic cu această cale moleculară. Datele noastre indică o creștere nesemnificativă a nivelurilor de fosforilare ERK1/2 în grupurile CD-NHF, K252A și AKTVIII, sugerând că această cale poate fi activată parțial în compensarea inhibării cailor PI3K / Akt. Acest lucru poate explica de ce nu am observat o scădere a viabilității celulare pe grupul tratat cu CD-NHF. La concentrația testată de K252A, axa PLC/CaMKII ar trebui inhibată, deoarece CaMKII reprezintă ținta principală a K252A. În gliom, CaMKII poate contribui la proliferarea celulară și reprimarea semnalizării PLC / CaMKII prin K252A poate explica scăderea viabilității celulare observată în grupul tratat cu K252A, deși pAKT și pERK1/2 au un model similar cu cel din grupul CD-NHF. **Alte cai de semnalizare sub PI3K/Akt.** P70S6Kinaza reprezintă un alt membru cheie al cascadei moleculare PI3K/Akt /mTOR și joacă un rol cheie în sinteza proteinelor, supraviețuirea celulară și creșterea celulară. Datele noastre experimentale (Figura 9A) au identificat o scădere semnificativă statistic a fosforilării p70S6 kinazei în CD-NHF (Figura 9A_2) și o reducere semnificativă atât în grupurile tratate cu K252A (Figura 9A_3), cât și AKTVIII (Figura 9A_4). În plus, fosforilarea scăzută a fost găsită chiar mai mare în grupurile de tratament combinate (Figura 9A_5,6) comparativ cu grupul de control (Figura 9A_1) și grupurile de tratament singular. Scăderea fosforilării kinazei p70S6 se corelează cu afectarea viabilității celulare și susține, din nou, eficiența tratamentelor combinate.

Ulterior, a fost investigată Bcl-2 (Figura 9B), o moleculă pro-supraviețuire aparținând familiei Bcl, reprezentând o altă moleculă din cascada moleculară PI3K/Akt. Colorarea cu imunofluorescență a arătat că nivelurile de expresie ale Bcl-2 sunt semnificativ mai mici în toate grupurile tratate (Figura 9B_2-6) relativ la grupul martor netratat (Figura 9B_1). Această afectare a avut o magnitudine mai mare în grupul CD-NHF-AKTVIII. Axa Akt/Bcl-2 este afectată semnificativ în grupul tratat cu CD-NHF, așa cum s-a demonstrat prin evaluarea atât a fosforilării Akt, cât și a nivelului de expresie Bcl-2, însă viabilitatea celulară nu este afectată. Acest lucru se poate datora faptului că inhibarea axei Akt/Bcl-2 nu a avut amploarea necesară pentru a reduce eficient semnalele pro-supraviețuire sau datorită semnalelor pro-supraviețuire din alte căi moleculare care pot compensa afectarea Akt/Bcl-2 axă în grupul tratat cu CD-NHF.

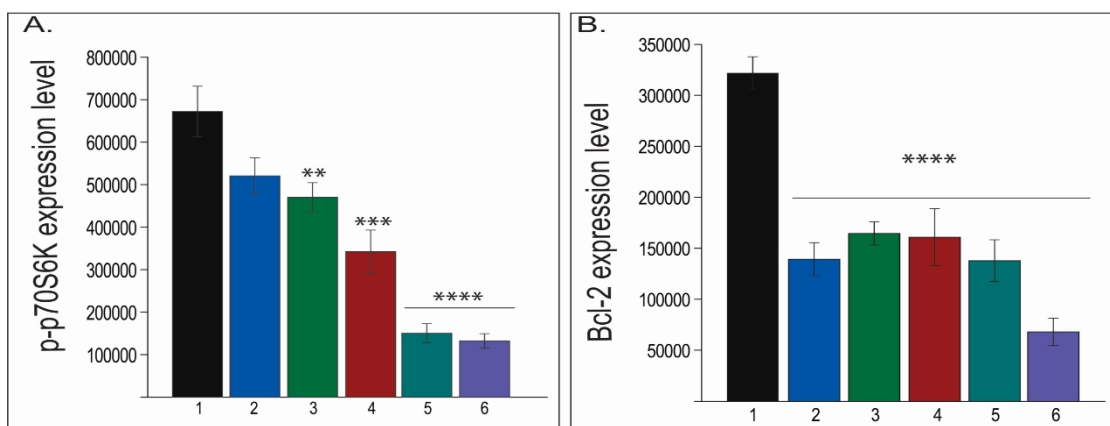


Figura 9. Evaluarea fosforilării p70S6K și Bcl-2. A. Fosforilarea p70S6K. B. Fosforilarea Bcl-2. 1. Control (netratat), 2. CD-NHF 1%, 3. K252A (5 nM), 4. AKTVIII (1.7 μM), 5. K252A+1% CD-NHF, 6. AKTVIII+1% CD-NHF. **p< 0.05, ***p< 0.005, ****p< 0.0005

O altă clasă de molecule care sunt activate de tirozin kinaze, inclusiv Trks, este reprezentată de membrii familiei STAT. STAT3, membru al familiei STAT, joacă un rol critic în proliferarea, supraviețuirea și invazia celulelor tumorale. Mai mult, s-a raportat că axa STAT3/Slug îmbunătățește proprietățile asemănătoare tulpinii cancerului în glioblastomul radiorezistent. În aceste condiții, am investigat apoi nivelurile de expresie ale STAT3 (Figura 10A) și Slug (Figura 10B). Datele noastre demonstrează o afectare semnificativă a nivelurilor de expresie ale STAT3 în toate grupurile (Figura 10A_2-6) relativ la grupul de control (Figura 10A_1), afectarea având, din nou, o magnitudine mai mare în grupurile AKTVIII și CD-NHF-AKTVIII (Figura 10A_5,6). Expresia de slug, deși scăzută în toate grupurile tratate este semnificativă statistic numai în grupurile de tratamente combinate (Figura 10B_5,6). Și mai mult, STAT3 devine activat ca răspuns la diferiți stimuli, pe lângă tirozin kinaze. Interleukina 6 (IL-6), o citokină pro-inflamatorie, mediază semnale pro-supraviețuire în celulele stem ale gliomului prin STAT3. Datele noastre arată o afectare semnificativă a nivelurilor de IL-6 în toate grupurile tratate în comparație cu grupul de control netratat (Figura 10C).

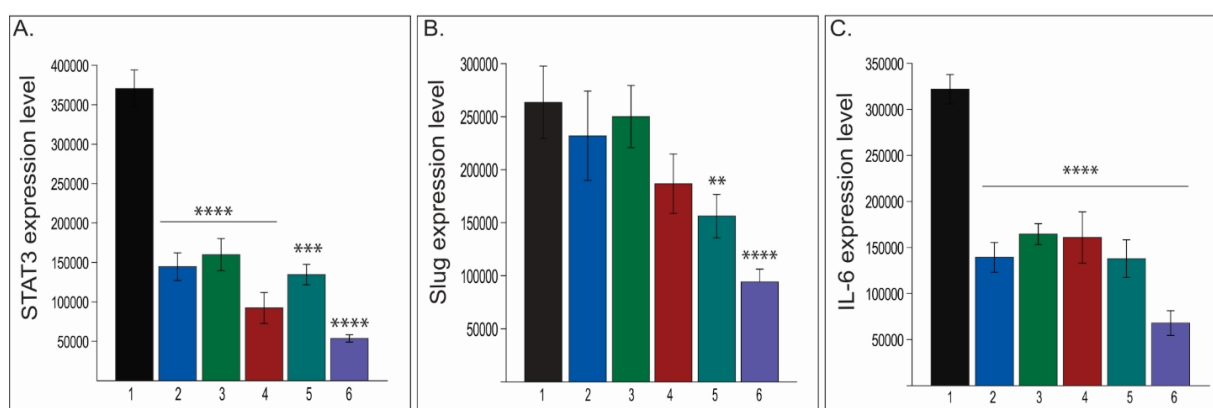


Figura 10. Evaluarea fosforilării STAT3, Slug și IL-6. A. STAT3. B. Slug. C. IL-6. 1. Control (netratat), 2. CD-NHF 1%, 3. K252A (5 nM), 4. AKTVIII (1.7 μM), 5. K252A+1% CD-NHF, 6. AKTVIII+1% CD-NHF. **p< 0.05, ***p< 0.005, ****p< 0.0005

În acest moment nu avem date despre mecanismul exact al acțiunii CD-NHF. Se pare că interacționează cu diverse molecule în aval sau în amonte de receptori, mai degrabă decât interacționând direct cu receptori. Se poate lega de molecule astfel încât să împiedice să

exercite pe deplin interacțiunile cu partenerii lor. Neurotrofinele și IL-6 mediază efectele lor din aval prin activarea căilor moleculare similare: căile PI3K/Akt, MAPK și JAK/STAT. Nu am măsurat nivelurile neurotrofinelor, cu toate acestea fosforilarea TrkB și nivelurile de expresie ale p75NTR nu au variat semnificativ în grupul CD-NHF, relativ la grupul martor netratat. Pe de altă parte, expresia IL-6 a fost scăzută de către CD-NHF. CD-NHF semnificativ interacționează cu axa AKT/ Bcl-2 și cu axa Jak/STAT3. Inhibarea parțială a Trks sau a PI3K/Akt potențează efectele CD-NHF pe aceste căi, după cum se relevă prin deteriorarea ulterioară a nivelurilor de expresie ale țintelor menționate și prin scăderea fosforilării p70S6K și Slug. Proprietățile antitumorale prezentate de CD-NHF au fost potențate de doze reduse de inhibitori K252A sau AKTVIII pentru a evita efectele secundare. Mai important, această potențare a fost semnificativă chiar și la o concentrație redusă de CD-NHF. Deși nu cunoaștem mecanismul exact al acțiunii CD-NHF, demonstrăm o nouă strategie pentru tratarea gliomului.

Proiect component: 2 (P2)

Obținerea de biocompozite nanoparticulate având carbon dots în compoziție

În această etapă au fost realizate mai multe tipuri de materiale care pot fi utilizate pentru încapsularea de carbon dots cu activitatea antitumorală în vederea utilizării lor ca tratament împotriva cancerului.

Sistemele de tip lipozomi – carbon dots cu și fără doxorubicină au fost dezvoltate în etapa anterioară cu observația că aceștia au necesitat o optimizare a proprietăților de stabilitate dimensională în timpul etapei de extrudere dar mai ales de purificare, când formulările pe bază de lipozomi au demonstrat o oarecare tendință de aglomerare ceea ce ar fi făcut dificilă administrarea acestora. Introducerea unor etape de ultrasonicare după extruderea suspensiilor inițiale de lipozomi dar și după purificarea acestora prin dializă pare că au îmbunătățit morfologia acestora, după cum demonstrează și imaginile de microscopie electronică de transmisie (Figura 11).

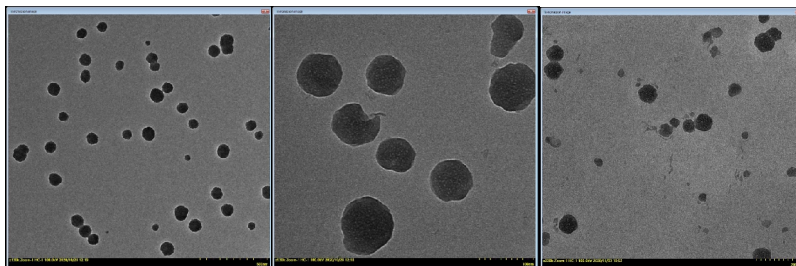


Figura 11. Imagini de microscopie electronică de transmisie a lipozomilor pe bază de PC și CHOL ce au Carbon Dots în compoziție

Este important de menționat faptul că structurile lipidice, în ciuda potențialului lor aplicativ uriaș, sunt extrem de dificil de analizat prin tehnici de microscopie electronică fiind încadrate în categoria structurilor moi, ceea ce a făcut ca aceste studii să necesite repetarea de multe ori a sintezelor tuturor probelor. Acum când suntem siguri că aceste aspecte legate de tendința de aglomerare a lipozomilor au fost rezolvate, urmează și testarea in vivo a formulărilor lipozomale analizate.

O altă direcție abordată a fost realizarea unui biocompozit cu matrice polimerică cu carbon Dots care să aibă proprietăți mucoadezive în vederea administrării inhalatorii pentru testarea eficacității împotriva cancerului pulmonar. Polimerul la care ne-am oprit este chitosanul extrem de cunoscut pentru proprietățile sale de biocompatibilitate și biodegradabilitate. Chitosanul a fost modificat chimic prin tiolare, această modificare

aducând două beneficii importante și anume: pe de o parte grupele tiolice introduse îmbunătățesc mucoadezivitatea polimerului, acesta fiind un aspect esențial în cazul administrării inhalatorii, iar pe de altă parte solubilitatea chitosanului a fost net îmbunătățită, fiind binecunoscut faptul că acesta este în mod normal solubil doar în pH acid. În urma tiolării chitosanului acesta nu a mai necesitat adăugarea de acid pentru solubilizare ceea ce a confirmat inițial că reacția de tiolare a avut loc.

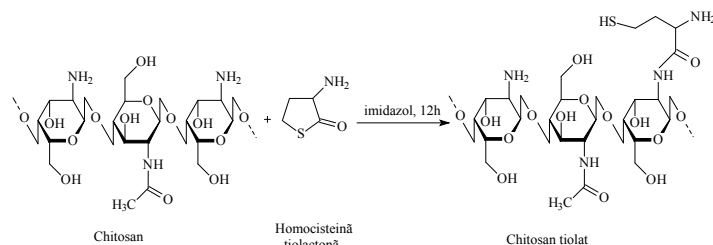


Figura 12. Sinteza chitosanului tiolat prin reacția cu homocisteina tiolactonă

Proprietățile mucoadezive cu abilitatea de a extinde timpul de staționare a medicamentelor pe diferitele tipuri de mucoasă reprezintă un avantaj în distribuirea medicamentelor care permite o îmbunătățire a nivelului de absorbție a medicamentelor. Formarea legăturilor disulfidice inter și/sau intra-moleculare sub pH fiziologic dovedește proprietăți mai bune de gelifiere înăuntrul matricii polimerice în cazul chitosanului tiolat. Pentru diferite direcții: livrarea de medicamente nazal sau intestinal, chitosanul tiolat a arătat o creștere a permeabilității medicamentelor determinată de deschiderea joncțiunilor strânse. Acest aspect împreună cu proprietățile mucoadezive demonstrează o permeabilitate foarte bună, având un efect îmbunătățit.

Chitosanul a fost tiolat utilizând homocisteina tiolactonă (HT). Pe scurt, 100 ml de 1% (g / v) de chitosan în acid lactic 1% (v / v) s-a adăugat la o soluție apoasă de imidazol (0,68 g în 2,5 ml apă), urmată de adăugarea cu ajutorul pâlniei de picurare a HT (0,5g în 100 ml apă). Soluția se barbotează cu argon. Se agită la temperatura camerei timp de 12 ore. Apoi se precipită în acetonă, se resolubilizează în apă pentru a se dializa timp de o zi, înainte de a fi liofilizat la -30 °C și 0,01 mbar. Produsul uscat se depozitează la 4 °C, și la întuneric.

Cantitatea de grupe tiolice immobilizate pe chitosan au fost determinate spectrofotometric la UV-Vis utilizând reactivul Ellman: 5, 5'-ditiobis (acid 2-nitrobenzoic). Curba de calibrare a reactivului ce conține grupe tiolice este stabilită în acord cu același protocol și la o absorbantă specifică de 412 nm. După realizarea curbei de calibrare a reactivului ce conține grupe tiolice, aceasta va fi utilizată pentru a determina cantitatea de grupe tiolice, incluzând și cantitatea de legături disulfidice. Derivatul de chitosan tiolat cu homocisteina tiolactonă în raport masic de 1:0,5, a prezentat o cantitate de grupe tiol de 0,02289 mol SH/ mol chitosan, ceea ce denotă că acesta va fi mai mucoadeziv decât chitosanul simplu.

Spectrele în infraroșu ale transformatei Fourier (FTIR) ale probelor de chitosan și chitosan tiolat, au confirmat calitativ tiolarea chitosanului. Prezența unor noi benzi de absorbție caracteristice la 1256 cm⁻¹ și 2499,65 cm⁻¹ ce corespund grupelor disulfură și respectiv tiol dovedesc faptul că modificarea a avut loc cu succes.

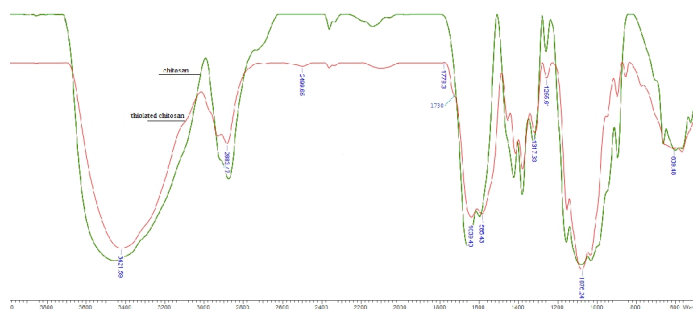


Figura 13. Spectrele în infraroșu ale transformatei Fourier (FTIR) ale probelor de chitosan (verde) și chitosan tiolat (roșu)

Chitosanul și derivații lui tiolați au fost analizați, de asemenea, și cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară. S-a utilizat deuteriu a solvent, chitosanul tiolat fiind solubil în apă. Noul vârf al protonilor de metilen la 2.65-2.92 ppm în spectrul chitosanului modificat și alte vârfuri detectate la 2.25-2.43 ppm pentru grupele tiolice au indicat succesul funcționalizării.

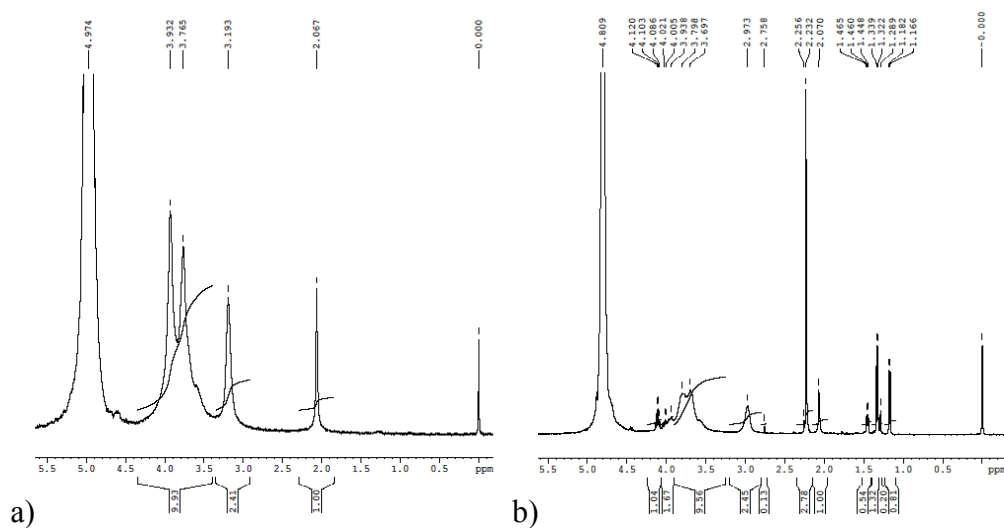


Figura 14. Spectrele RMN reprezentative pentru (a) chitosan, (b) chitosan tiolat.

Tot în această etapă s-a demarat obținerea de micro și nanoparticule pe bază de chitosan tiolat și ciclodextrină prin metoda reticulării covalente în emulsie utilizând o metodă dezvoltată în cadrul grupului CO. Obținerea micro/nanoparticulelor necesită o optimizare a parametrilor intrucât s-au întâmpinat dificultăți la separare, respectiv îndepărtarea surfactanților.

Sinteza de nanoparticule de argint (AgNPs)

În aceasta etapa a proiectului s-au preparat o serie de nanoparticulele de argint (AgNPs) cu lignosulfonat de sodiu (NaLS) în mediu apos, ce urmează a fi utilizate în etapa următoare pentru obținerea de nanocompozite AgNP/Carbon Dots folosind metode simple, netoxice și ecologice și evaluarea acestora din punct de vedere aplicativ în bioimagistică. Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNPs) s-a realizat într-o singură etapă folosind lignosulfonat de sodiu și AgNO_3 fără utilizarea de aditivi suplimentari, alcali, surfactanți sau stabilizatori. Pentru a optimiza și evalua efectele condițiilor de reacție asupra formării nanoparticulelor de Ag, sinteza a fost urmărită pentru două temperaturi de reacție: 25°C (pentru o zi) și 70°C (pentru 2 ore). Astfel, au fost preparate soluții stoc de NaLS de concentrație 2 mg/mL și AgNO_3 de concentrație 0,1 M, folosind ca solvent apă deionizată ultrapură. Pentru a obține concentrații finale de 1,6 mg/mL NaLS și 1,6 mM AgNO_3 , amestecurile de reacție au fost diluate cu apă deionizată și incubate sub agitare (600 rpm) fie 24 ore la temperatura camerei,

fie 2 ore la 70 ° C. Soluțiile coloidale rezultate au fost menținute timp de 2 săptămâni la temperatura camerei sub agitare ocazională pentru a evalua evoluția pe termen scurt a AgNPs formate. Efectul concentrației fiecărui component de reacție asupra formării nanoparticulelor de Ag, a fost evaluat în condiții de agitare (600 rpm) și temperatura, reacționând amestecuri având aceeași concentrație de AgNO₃ (1,6 mM) și cantități variate de NaLS de la 0 la 16 mg/mL ; respectiv conținut fix de NaLS 1,6 mg/mL și concentrații diferite de AgNO₃ (0-20 mM).

Toate soluțiile au culoare galben pal până la maro închis, în funcție de concentrația inițială a reactanților. Toate reacțiile au fost efectuate în trei exemplare, cu soluții proaspăt preparate.

AgNP rezultate au dimensiuni cuprinse între 20 și 40 nm, cu mici variații datorate temperaturii, rapoartelor inițiale dintre componente și concentrațiilor acestora. Sinteza este mult mai rapidă și AgNPs cu polidispersitate mai mică au fost obținute atunci când temperatura de reacție este crescută la 70°C. Prin urmare, se poate presupune că NaLS este un factorul cheie pentru reglarea dimensiunii nanoparticulelor și utilizarea sa poate oferi nanoparticule de dimensiuni adecvate într-o gamă largă de condiții experimentale. Rezultatele obținute la caracterizarea extensivă a nanoparticulelor AgNPs/NaLS demonstrează că metoda propusă este eficientă, iar evaluarea generală a procesului de sinteză și a produselor rezultate oferă informații importante din punct de vedere aplicativ.

Investigarea proprietăților antioxidante ale Carbon Dots

În ultima perioadă, au fost raportate o serie de studii în care Carbon Dots pot fi buni agenți antioxidanți în eliminarea radicalilor liberi. CDots ar putea acționa ca antioxidanți și prooxidanți datorită rolurilor lor de donori sau acceptori de electroni.

Diferitele grupuri funcționale (carbonil, imide) existente pe suprafața CDots au un rol important în obținerea proprietăților vizate. În acest sens, s-a investigat posibilă activitate antioxidantă a CDots sintetizați prin piroliza N-hidroxifthalimidei (NHF) folosind atât măsurători electrochimice cât și de absorbție UV-vis utilizând metoda radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH•). Testul bazat pe DPPH• este o metodă frecvent utilizată pentru a evalua activitatea antioxidantă. La reacția cu antioxidanții într-o soluție, culoarea violetă a unei soluții de DPPH• se schimbă în galben deschis odată cu conversia sa în complexul DPPH-H. Această evoluție a reacției poate fi monitorizată prin măsurarea modificărilor de absorbție la 517 nm sau concentrația DPPH nereacționată poate fi evaluată prin voltametrie ciclică, chiar ca funcție a concentrației de CDots.

Timpul de piroliza poate influența tipurile de grupuri funcționale de pe suprafața CDots. Au fost sintetizate 4 tipuri de probe cu timpi diferiți de piroliza: 10 min, 20 min, 30 min și 40 min. Probele au fost notate astfel: A10 pentru timpul de piroliza de 10 min, A20 pentru timpul de piroliza de 20 min, A30 pentru timpul de piroliza de 30 min și A40 pentru timpul de piroliza de 40 min. Au fost analizate cele 4 tipuri de probe la diferite concentrații.

Măsurătorile UV-Vis au fost efectuate pe un aparat Lambda 35 (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, SUA). Experimentele de voltametrie ciclică au fost efectuate cu ajutorul unui sistem electrochimic AutoLab PGSTAT 302N (Eco Chemie Utrecht, Olanda) și a unor sisteme cu trei electrozi cu configurația plană a electrodului imprimat (SPE), fabricat și achiziționat de la DropSens, Asturias, Spania. Electrozii de lucru (4 mm diametru) și contraelectrozii sunt realizați din carbon și referința este un electrod argintiu.

Analiza UV-Vis

Pentru a evalua activitatea antioxidantă a CDots, s-a utilizat metoda radicalului DPPH. Pe scurt, a fost preparată o soluție stoc de 2 mg/ml de CDots în metanol și apoi diluată pentru a obține concentrații diferite (1÷1000 μg/ml). Volumele corespunzătoare ale soluțiilor diluate au fost amestecate cu un volum egal de soluție DPPH metanolică (0,05 mg/ml); soluțiile rezultate au fost incubate la întuneric la temperatura camerei (25 °C) timp de 2 ore. După incubare, absorbția a fost citită la 517 nm. Procentajele de inhibiție au fost calculate utilizând ecuația (1):

$$\text{Inh}\% = \frac{A_C - A_S}{A_C} * 100 \quad (1)$$

unde A_C este absorbanta la 517 nm a probei de control (DPPH) și A_S absorbanta la 517 nm pentru proba cu antioxidanți ce conțin CDots și DPPH. Trasând concentrația Inh% față de concentrația DPPH, poate fi determinată valoarea IC_{50} , desemnând concentrația probei necesară pentru a elimina 50% din radicalii liberi DPPH [S. Soren et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177:148–161,2015]. Toate măsurătorile au fost făcute în triplicat.

DPPH este un radical organic stabil utilizat pe scară largă ca substrat pentru a evalua activitatea antioxidantă a nanoparticulelor datorită beneficiilor sale, precum procedura simplă și sensibilitate ridicată. DPPH poate lega radicalii de hidrogen proveniți din specii antioxidante pentru a forma un complex stabil H-DPPH, proces care este însoțit de o schimbare de culoare (de la un violet profund la o culoare galben pal). Reducerea absorbantei de la lungimea de undă de 517 nm este proporțională cu decolorarea rezultată [Zhang W., Zheng Z., Wei J. Studiu electrochimic al DPPH Radical Scavenging pentru evaluarea capacității antioxidante a nanodoturilor de carbon. *J. Phys. Chem. C.* 2017,121: 18635–18642, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b05353].

Spectrele UV-Vis ale mediilor care conțin CDots (0,25 mg/ml) prezintă degradarea vârfului caracteristic de radical liber al soluțiilor de DPPH (0,05 mg/ml) de la 517 nm (Fig 16). Absorbția puternică inițială a DPPH scade treptat pe măsura ce electronul impar se asociază în prezența radicalilor liberi. Astfel, activitatea antioxidantă a CDots ar putea fi cuantificată prin scăderea concentrației de DPPH (Fig 17).

S-a constatat că o acțiune antioxidantă, deși redusă (până la 10%), ar putea fi evidențiată chiar și pentru concentrații scăzute de CDots (până la 0,01563 mg/ml). Această activitate este crescută prin creșterea concentrației CDots și este îmbunătățită atunci când antioxidantul este sintetizat în timpul proceselor pirolitice mai lungi (Fig. 18) probabil datorită diferenței de polaritate între probe sau datorită grupărilor funcționale ca potențiali donatori de hidrogen. Prin urmare, rezultatele au arătat activități de 71,2, 77,9, 87,2 și 89,6% la CDots obținute prin procese pirolitice de 10, 20, 30 și respectiv 40 de minute (Fig. 19). Valorile corespunzătoare ale concentrației inhibitoare semi-maxime (IC_{50}) (0,99, 0,86, 0,73, respectiv 0,60 mg/ml) și puterea antiradicală derivată ($ARP = 1 / IC_{50}$) (1,01, 1,16, 1,37, respectiv 1,67) au fost, de asemenea, determinate pentru probele de CDots.

Investigarea activității antimicrobiene ale compusilor pe baza de Carbon Dots

Screeningul activității antimicrobiene a compusilor pe baza de CDots (coduri: 10', 20', 30' și 40') a fost determinat prin testul difuziei în agar utilizând următoarele tulpini de referință (bacteriene și fungice): *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Salmonella enterica* ATCC14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031, *Candida albicans*

ATCC10231, *Penicillium chrysogenum* ATCC10106 si *Cladosporium cladosporioides* ATCC16022.

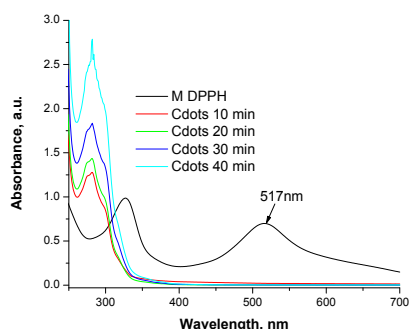


Figura 16. Spectrele de absorbtie UV-vis ale DPPH (0,05 mg/mL) si ale solutiilor de Cdots (0,25 mg/mL).

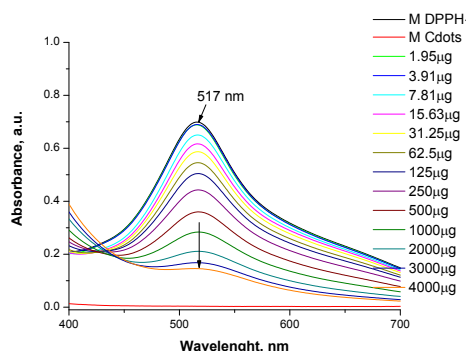


Figura 17. Influenta concentratiei de Cdots (timp de piroliza = 40 de minute) asupra activitatii antioxidante.

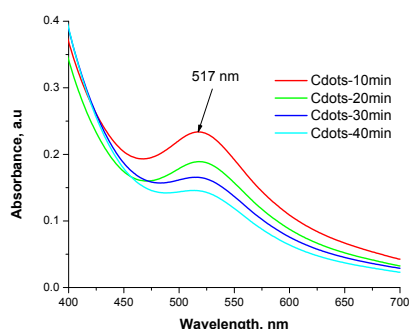


Figura 18. Activitatea antioxidanta a probelor de Cdots pentru 4 mg/ml.

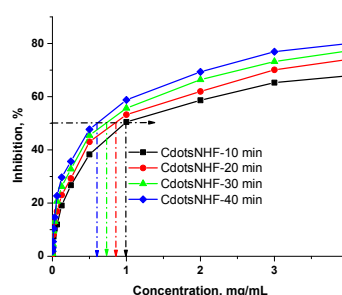


Figura 19. Activitate antioxidanta impotriva DPPH pentru: Cdots -10 min, Cdots -20min, Cdots -30 min si Cdots -40 min

Toate microorganismele au fost depozitate la -80°C in 20% glicerol. Tulpinile bacteriene au fost reimprospatate pe mediul Mueller-Hinton agar la $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, tulpina de drojdie (*C. albicans*) a fost reimprospatata pe mediul Sabouraud Dextrose agar la $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ si tulpinile fungice au fost reimprospatate pe Potato Dextrose agar (*C. cladosporioides*) si Malt Extract agar (*P. chrysogenum*) la $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Suspensiile microbiene au fost preparate cu aceste culturi in solutie sterila pentru a obtine turbiditate optica comparabila cu cea a standardelor 0,5 McFarland. Volumele de 0,3 ml din fiecare inocul au fost insamantate pe medii adecvate in conformitate cu inoculul, iar probele de testat au fost adaugate dupa uscarea suprafetei mediului. Discurile de hartie sterilizate au fost plasate pe placile cu mediile insamantate. O alicota (15 μl) din concentratiile testate au fost adaugate pe discuri sterile. Pentru a evalua proprietatile antimicrobiene, inhibitia cresterii a fost masurata in conditii standard dupa 24 de ore de incubare la $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pentru tulpinile bacteriene si de drojdie si dupa 120 de ore de incubare la $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pentru tulpinile fungice. Toate testele au fost efectuate in trei exemplare pentru a verifica rezultatele. Dupa incubare, diametrele zonelor de inhibare au fost masurate utilizand software-ul Image J. Probele analizate nu au prezentat activitate antimicrobiana (antibacteriana si antifungica) dupa 24-120 ore de incubare (Figura 20, Tabelul 1).

Tabelul 1. Activitatea antimicrobiana a probelor pe baza de Carbon Dots (mm)

Tulpina bacteriana/fungica	Activitate antimicrobiana (mm)				Figura 20. Activitatea antibacteriana a probelor pe baza de CDots impotriva tulpinii (a) <i>S. Aureus</i> , (b) <i>E.coli</i> , (c) <i>E. Faecalis</i> , (d) <i>S. Enterica</i> , (e) <i>P. Aeruginosa</i> , (f) <i>K. Pneumoniae</i> , (g) <i>C. Albicans</i> , (h) <i>P. Chrysogenum</i> , (i) <i>C. cladosporioides</i> .
	10'	20'	30'	40'	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	-	-	-	-	
<i>Salmonella enterica</i> ATCC14028	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	-	-	-	-	
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	-	-	-	-	
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC10106	-	-	-	-	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC16022	-	-	-	-	

Studiul combinat in silico si experimental al formarii poliplexului dintre dsADN si vectorii non-virali tip squalena-PEG-PEI

Avand in vedere obiectivul de a realiza pe viitor noi materiale compozite care sa incorporeze CDots precum si legarea acestora de diferiti compusi, este necesar determinarea interactiunilor ce pot aparea intre toate componentele sistemelor pentru a vedea daca aceste interactiuni duc la inactivarea CDots.

Carbon Dots sunt compusi ce prezinta o multitudine de grupe functionale pe suprafata lor, aceste grupari putand interactiona usor cu o gama larga de materiale. Pentru a verifica viabilitatea diferitelor materiale de a fi utilizate ca matrici suport in materiale compozite cu CDots, putem realiza simulari de dinamica moleculara. Simularile de dinamica moleculara pot oferi informatii, inainte de realizarea experimentală a materialelor compozite, asupra interactiunilor ce apar intre CDots si matrice, si pot fi utilizate pentru a tria materialele.

Pentru a testa capacitatea simularilor de dinamica moleculara de a explica la nivel atomistic interactiunile ce apar intre diferite componente ale unui sistem, s-a simulat un vector non-viral bazat pe Squalena, PEG si PEI. Acest vector a fost ales deoarece o serie studii experimentale au aratat ca lungimea lantului macromolecular de PEG din structura sa influenteaza eficienta impachetarii ADN-ului sau ARN-ului, asta desi PEG este un polimer inert cu sarcina 0 ce nu ar trebui sa interactioneze cu alte componente. Cu toate acestea, nu sunt cunoscute studii sistematice privind influenta masei moleculare de PEG din structura vectorului non-viral asupra eficientei de impachetare a materialului genetic pe de o parte si pe de alta parte asupra mecanismului atomistic a modului de intreactiune. Aceste studii lipsesc deoarece obtinerea unor date structurale prin metode experimentale este foarte dificil.

Au fost simulate structurile vectorilor non-virali (Sq-PEG-PEI) prezentate in figura 6 si au primit coduri in functie de masa moleculara a PEG-ului, dupa cum urmeza: VECTOR 500 (SqPEG-PEI in care masa moleculara a PEG-ului este de 500 Da), VECTOR 1500 (Sq-PEG-PEI in care masa moleculara a PEG-ului este de 1500 Da) si VECTOR 3000 (Sq-PEG-PEI in

care masa moleculara a PEG-ului este de 3000 Da), iar numarul corespunzator de unitati PEG repetate (n) este de 11, 31, respectiv 62. Structurile de pornire si configuratiile vectorilor au fost construite folosind software-ul Avogadro. Pe baza valorilor pK, la pH = 7.4 gradul de pronotare al PEI este de 50% (10 grupari aminice din totalul de 20 sunt protonate), oferind o incarcare neta de +10. Fragmentul de dsADN simulat cuprinde 25 de perechi de baze, cu secventa 5- CAAGCCCTTAACGAACTTCAACGTA-3 si a fost creat folosind software-ul Ambertools18. Sarcina totala a moleculei de dsADN este de -48 (numarul de grupari fosfat). Parametrizarea vectorului a fost realizata prin aplicarea metodologiei campului de forta GAFF. Sarcinile atomice partiale ale vectorului au fost calculate utilizand metodologia RESP ce a fost adaptata si perfectionata in lucrarea L. Epure si colab. Campul de forta Amber FF14SB DNA.bsc1 a fost utilizat in parametrizarea dsADN-ului, iar pentru descrierea ionului s-au utilizat parametrii ionsjc_tip3p. Pentru a simula mai bine conditiile „reale” ale complexarii vectorilor cu dsADN, a fost implementat un protocol de simulare in doua etape: „agregarea” urmata de „complexare”. Agregarea se refera la procesul de micelizare a vectorilor, iar complexarea la formarea polipepsilor dintre vectori si ADN.

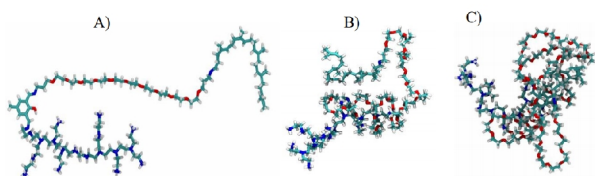


Figura 21. Conformatiile de pornire ale celor trei vectori folositi pentru simularile de agregare. A) conformatia extinsa a VECTOR 500. B) si C) conformatiile pre-colapsate ale VECTOR 1500, respectiv VECTOR 3000. Codificarea coloristica a atomilor de polimer este urmatoarea: azuriu pentru C; rosu pentru O; albastru pentru N; alb pentru H.

Codificarea coloristica a atomilor de polimer este urmatoarea: azuriu pentru C; rosu pentru O; albastru pentru N; alb pentru H.

Figura 22 prezinta instantanee reprezentative ale configuratiilor initiale si finale ale fiecarui sistem vector si ADN, impreuna cu insertii care detaliaza interactiunile dintre PEI si ADN.

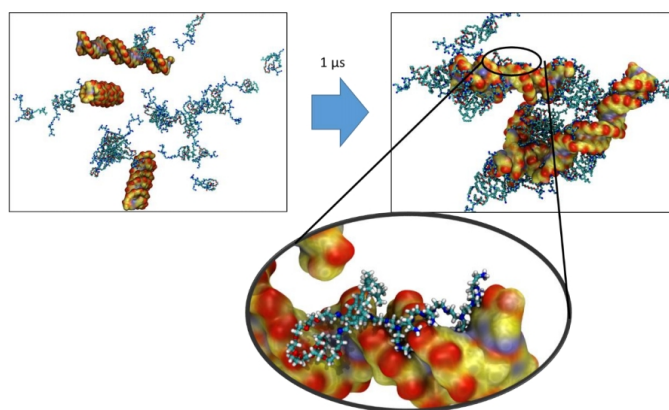


Figura 22. Interactiunea VECTOR 500 cu ADN-ul 25 ba. Atomii de carbon sunt colorati in azuriu in cazul vectorului, iar in galben pentru molecula de ADN. Pentru toate moleculele, atomii de azot sunt in albastru, atomii de oxigen sunt in rosu, iar atomii de hidrogen in alb.

Simularea polipepsilor studiatii ne permite sa explicam rezultatele analizelor de electroforeza pe gel de aragoza, care indica faptul ca lungimea fragmentului PEG joaca un rol crucial in capacitatea sistemelor de a lega dsADN. De fapt, experimentele arata ca atunci cand este implicat un segment PEG mai scurt, legarea dsADN-ului are loc la rapoarte N/P foarte mici. Conform simularilor noastre, VECTOR 500 este capabil sa interactioneze mai puternic cu ADNul in comparatie cu vectorii mai mari, in principal datorita prezentei PEI in stratul exterior in cantitate mai mare. Acest lucru ii permite sa formeze mai multe legaturi de hidrogen cu dsADNul si, prin urmare, sa-l lege la un raport N/P foarte scazut. Pentru vectorii mai mari, legarea completa are loc la un raport N/P mai mare, fapt care este bine explicat prin simulari si care 46 indica modul in care PEG protejeaza sarcinile de pe lantul PEI, actionand, de asemenea, ca o bariera de distantare fizica intre PEI si ADN.

Intelegerea fenomenului de ecranare este importanta pentru proiectarea rationala a sistemelor de vectori pentru impachetarea si transportul acizilor nucleici, care necesita un echilibru adecvat intre raportul rezonabil N/P si solubilitatea in apa. Intr-adevar, un lant PEG mai lung imbunatateste solubilitatea in apa, dar duce si la o crestere a raportului N/P, ceea ce, la randul sau, duce la cresterea toxicitatii vectorului. Studiul nostru evidentiaza faptul ca, in cazul vectorilor complecsi, care includ blocuri componente multiple si chimic distincte, procesul de formare al polipecsilor nu poate fi studiat prin modelarea separata a interactiunilor dintre componente din cauza interactiunilor inerente intre toate blocurile componente, determinand in final mecanismul particular de legare.

Protocoalele de simulare utilizate in simularea vectorului vor fi utilizate pentru studierea mecanismelor de interactiune dintre CDots si matricea materialului compozit.

Proiect component: 3 (P3)

In cadrul etapei a III-a a proiectului, INCDFT-IFT Iasi a fost implicat intr-o serie de activitati privind:

- (i) configurarea si realizarea instalatiei pilot de sinteza a carbon dots (CDs) pe baza rezultatelor/concluziilor obtinute in activitatile anterioare;
- (ii) stabilirea reproductibilitatii procesului de obtinere a CDs;
- (iii) identificarea potentialilor beneficiari ai procedului de sinteza la scara pilot a nanostructurilor de tip carbon dots;
- (iv) identificarea si structurarea potentialelor oferte de servicii in domeniul sintezei si caracterizarii de carbon dots.

Toate activitatile specifice etapei aferente anului 2020 au fost indeplinite cu succes.

In cadrul activitatilor desfasurate in cadrul proiectului component P3, INCDFT-IFT Iasi a proiectat, realizat si testat o instalatie pilot automatizata pentru sinteza nanostructurilor de tip CDs. Verificarea regimului de functionare a instalatiei in relatie cu proprietatile fizice ale CDs obtinute cu ajutorul acestuia a vizat in principal:

- (a) domeniul de temperatura in care instalatia poate opera in parametri optimi, testele indicand faptul ca instalatia pilot poate suporta temperaturi de lucru suficient de inalte pentru obtinerea de CDs corespunzatori, inclusiv la scara pilot;
- (b) evaluarea gradului de fiabilitate in conditii de utilizare extensiva; in urma monitorizarii echipamentului pentru temperaturi de pana la 400°C nu s-a observat o supraincalzire critica a componentelor electronice ale instalatiei sau disfunctionalitati in procesul automatizat de operare si control;
- (c) evaluarea influentei timpului de tratament termic asupra masei de produs final, testele efectuate pe n-hidroxisuccinimida la 180°C aratand ca procesul este inalt reproductibil;
- (d) evaluarea randamentului de obtinere a CDs imidici; coroborat cu masuratorile masice, s-a putut observa ca randamentul de obtinere a CDs imidici prezinta o dependenta liniara de timpul de combustie, crescand proportional cu acesta, dependenta confirmata partial si de masuratorile de fluorescenta;
- (e) evaluarea gradului de fluorescenta al CDs obtinuti; spectrele de fluorescenta au aratat o crestere initiala a intensitatii fluorescentei odata cu cresterea timpului de combustie, urmata de o saturare a nivelului de fluorescenta pentru timpi de combustie mai crescuti (> 90 min).

In concluzie, in cadrul proiectului component Pr. 3, INCDFT-IFT Iasi a indeplinit cu succes unul dintre cele mai importante obiective ale proiectului, si anume: realizarea si testatarea unei instalatii pilot automatizata pentru sinteza nanostructurilor de tip CDs. O cerere de

brevet va fi depusa in acest sens, dupa efectuarea de teste suplimentare necesare pentru optimizarea tuturor parametrilor de lucru. Ulterior, INCDFIT-IFT Iasi va introduce in oferta proprie de servicii realizarea de CDs cu actiune antitumorală, obtinuti din precursori imidici, impreuna cu serviciile de caracterizare fizica si cele de evaluare *in vitro* a potentialului antitumoral al CDs.

Utilizarea de CDs imidici ca platforme teranostice oncologice presupune sinteza acestora in conditii de reproductibilitate crescuta, fiind necesar ca procesul pirolitic sa fie bine controlat, astfel incat sa conduca la obtinerea de nanostructuri cu caracteristici fizico-chimice comparabile de la o sarja la alta. Procesul de sinteza a CDs este bazat pe descompunerea termica a precursorilor imidici la diferite temperaturi, putand fi complet automatizat. In acest scop, a fost proiectata, realizata si testata o instalatie pilot de obtinere a CDs imidici (Fig. 23), procesul de automatizare fiind computerizat. Etapele procesului de sinteza sunt prezentate in Fig. 24.

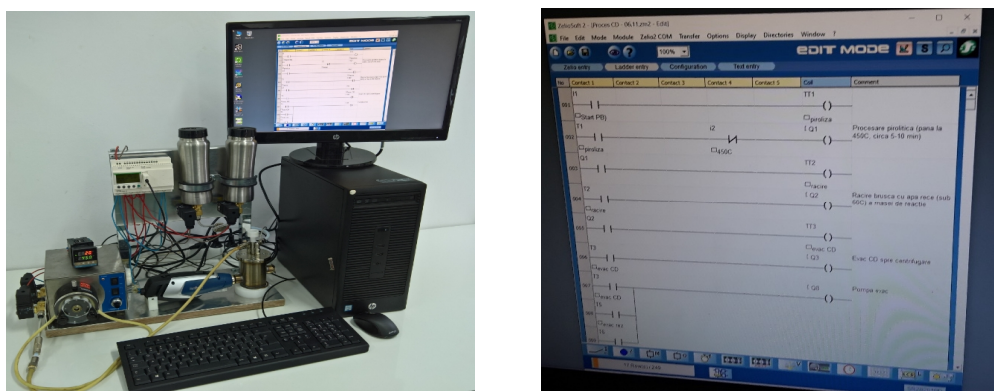


Figura 23. Vedere de ansamblu a instalatiei de obtinere a CD imidici (stanga). Secventa din programul de control realizat cu Zelio Soft 2 (dreapta).

Solutia tehnica aleasa in urma evaluarilor experimentale a mai multor materiale cu rezistenta crescuta la socuri termice, a unor componente electronice specifice procesului de automatizare si a mai multor solutii constructive a condus la utilizarea unei minireactor de piroliza confectionat din otel inoxidabil (Fig. 3), care sa reziste atat la temperaturile ridicate la care se desfasoara secventa principala a procesului pirolitic, cat si in etapa de racire brusca a masei de reactie, atunci cand socul termic poate afecta structura incintei. Astfel, mini-reactorul a permis utilizarea unei domenii largite de temperaturi, indiferent de etapa de lucru. De asemenea, incinta de reactie a fost prevazuta cu o serie de elemente de injectie si evacuare a lichidelor si suspensiilor rezultate in procesul de combustie. In urma evaluarilor experimentale, s-a optat pentru incalzirea si racirea cu flux de aer, utilizandu-se o termosufanta Steinel HL3479, cu parametrii de temperatura si cei ai debitului de aer controlati digital. Controlul temperaturii din incinta mini-reactorului este realizat si prin intermediul unui PID Temperature Controller de tip Rex C100 si a unui termocuplu de tip K in gama 0÷600°C. Introducerea brusca a agentului de racire peste precursorii supusi procesului de combustie, evacuarea suspensiei de CDs obtinute si eliminarea reziduurilor rezultate in proces prin introducerea si evacuarea unor solvent (de ex., cloroform), precum si curatarea mini-reactorului, se realizeaza automat cu ajutorul unei pompe peristaltice de tip VL 500 digit integrate in proces.

Introducerea secventiala automata in mini-reactor a diferitelor lichide de lucru pe parcursul procesului de sinteza, precum si evacuarea suspensiilor de nanoparticule rezultate in proces sunt efectuate cu ajutorul unor micro-electrovalve SIRAI, model ZC10A. Toate

sistemele si dispozitivele sunt controlate de catre un programator electronic Schneider, model SR B201BD si de un PC prin intermediul unui software specializat, Zelio Soft 2 (Fig. 23).

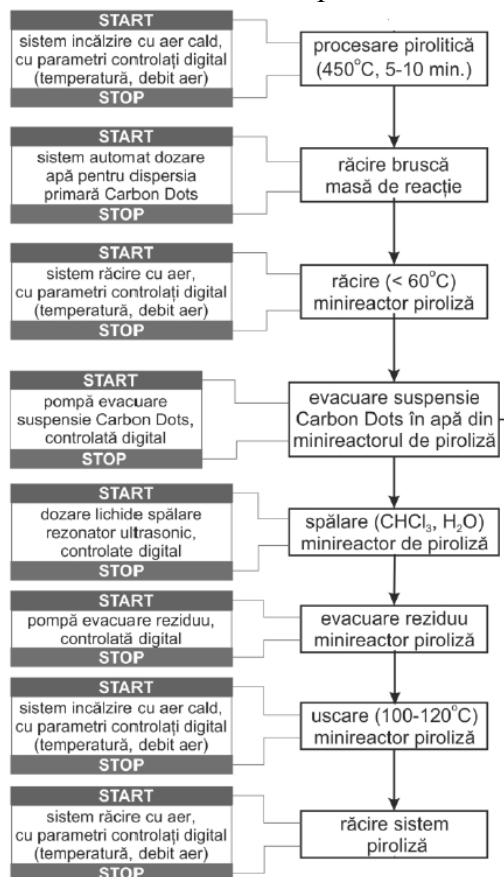


Figura 24. Etapele procesului de sinteza a CDs imidici. După evacuarea suspensiei de CDs din minireactorul de piroliza, aceasta urmează un proces de centrifugare (circa 10000÷12000 g) și ulterior de liofilizare, produsul final obținându-se sub forma de pulbere

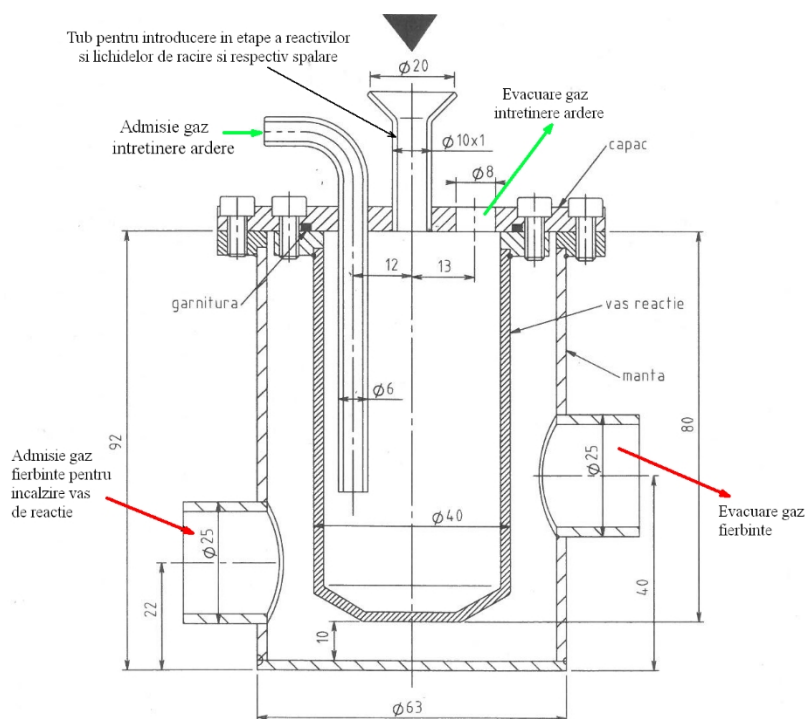


Figura 25. Schita minireactorului de piroliza. Acesta este prevăzut cu tuburi de admisie și evacuare a gazelor de încălzire și, respectiv, de întreținere a proceselor de ardere a precursorilor organici. În partea superioară, reactorul este prevăzut cu un tub tip palnie prin care sunt introdusi precursorii imidici. Colectarea suspensiei de CDs, precum și a lichidelor de spălare din interiorul minireactorului se face cu ajutorul pompei peristaltice.

Verificarea functionalitatii instalatiei

Dat fiind ca în procesul de obținere a produsilor biologic activi se produc gaze de ardere potențial toxice, testarea instalatiei s-a realizat într-un spațiu bine ventilat, utilizându-se inclusiv doi compusi imidici ca precursori ai CDs. Instalatiea pilot a fost testată pentru:

- Verificarea domeniului de temperatură în care aceasta poate opera în parametri optimi. Testele au arătat ca temperatura maximă care poate fi atinsă și menținută în minireactorul de piroliza cu actuala configurație a echipamentului, în condiții de siguranță, este de circa 400°C, temperatura minimă ajungând la 45-50°C după adăugarea rapidă a apei de răcire. Ținând cont ca temperatura maximă utilizată pentru obținerea de CDs este de cel mult 300°C, instalatiea proiectată și realizată la INCDFIT-IFT Iași oferă posibilitatea utilizării unui domeniu de temperaturi potrivit pentru obținerea de CDs cu caracteristici fizice și activitate biologică optimă, inclusiv la scara pilot.
- Evaluarea gradului de fiabilitate. Fiabilitatea instalatiei pilot a fost testată în condiții de utilizare extensivă pentru diferite regimuri de temperatură (între 180°C și 300°C) și pentru perioade de timp cuprinse între 45 min. și 5 ore de funcționare continuă. În urma

monitorizării instalației nu s-a observat o supraîncălzire critică a sistemelor electronice modulare ale echipamentului sau disfuncționalități în procesul automatizat de operare și control; temperatura de echilibru, stabilită după circa 30 min., s-a menținut constantă pe toată durata fiecărei testări.

- (c) Evaluarea influenței timpului de tratament termic asupra masei de produs final. Testele efectuate pe n-hidroxisuccinimida la 180°C au arătat că masa finală a produsului imidic, m , scade direct proporțional cu timpul de tratament termic aplicat, t (Fig. 26). Procesul este **înalt reproductibil**, deviațiile standard obținute în urma repetării de trei ori a experimentelor fiind foarte scăzute (Fig. 26).

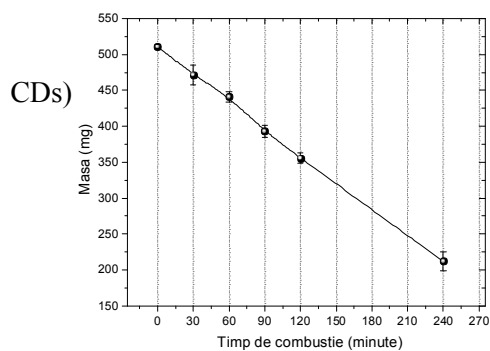


Figura 26. Dependenta masei de produs (continand in functie de timpul de combustie utilizat)

Dependenta liniară a $m(t)$ arată că formarea de CDs nu ar fi împiedicată de procesul de transformare termică continuă a n-hidroxisuccinimidei și nici de atmosfera gazoasă rezultată în procesul de combustie fără flacără.

- (d) Evaluarea randamentului de obținere a CDs imidici. Procesul de evaluare calitativă și cantitativă a avut la bază măsurători spectrofotometrice (Fig. 27) corelate cu măsurători masice ale produsilor de reacție rezultati din combustia la 180°C a n-hidroxisuccinimidei. Măsurătorile spectrofotometrice au fost realizate în intervalul 280 nm – 600 nm. Fig. 27b arată o dependență aproximativ liniară a absorbantei (OD – optical density) în funcție de timpul de combustie. Coroborat cu măsurătorile masice (Fig. 26), se poate concluziona că randamentul de obținere a CDs imidici ar putea prezenta o dependență liniară de timpul de combustie, crescând proporțional cu acesta, lucru confirmat parțial și de măsurătorile de fluorescență.

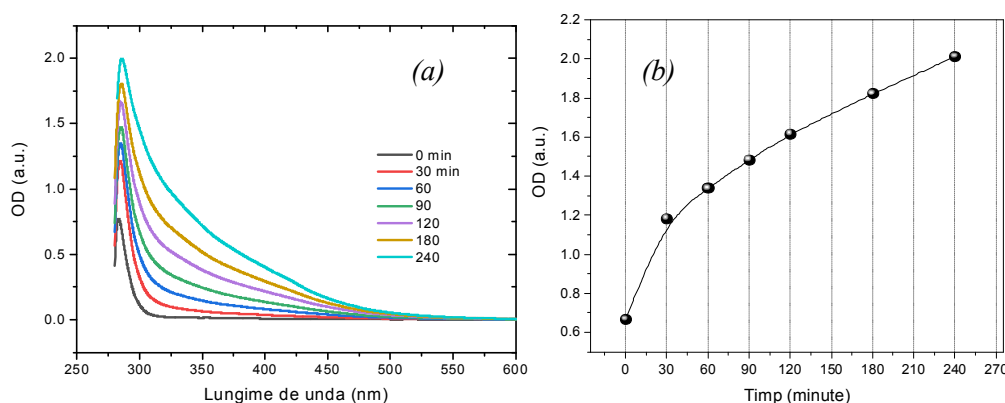


Figura 27. Spectrul de absorbție (a) al produsilor de reacție și dependența absorbantei maxime (citita la 284 nm) în funcție de timpul de combustie (b)

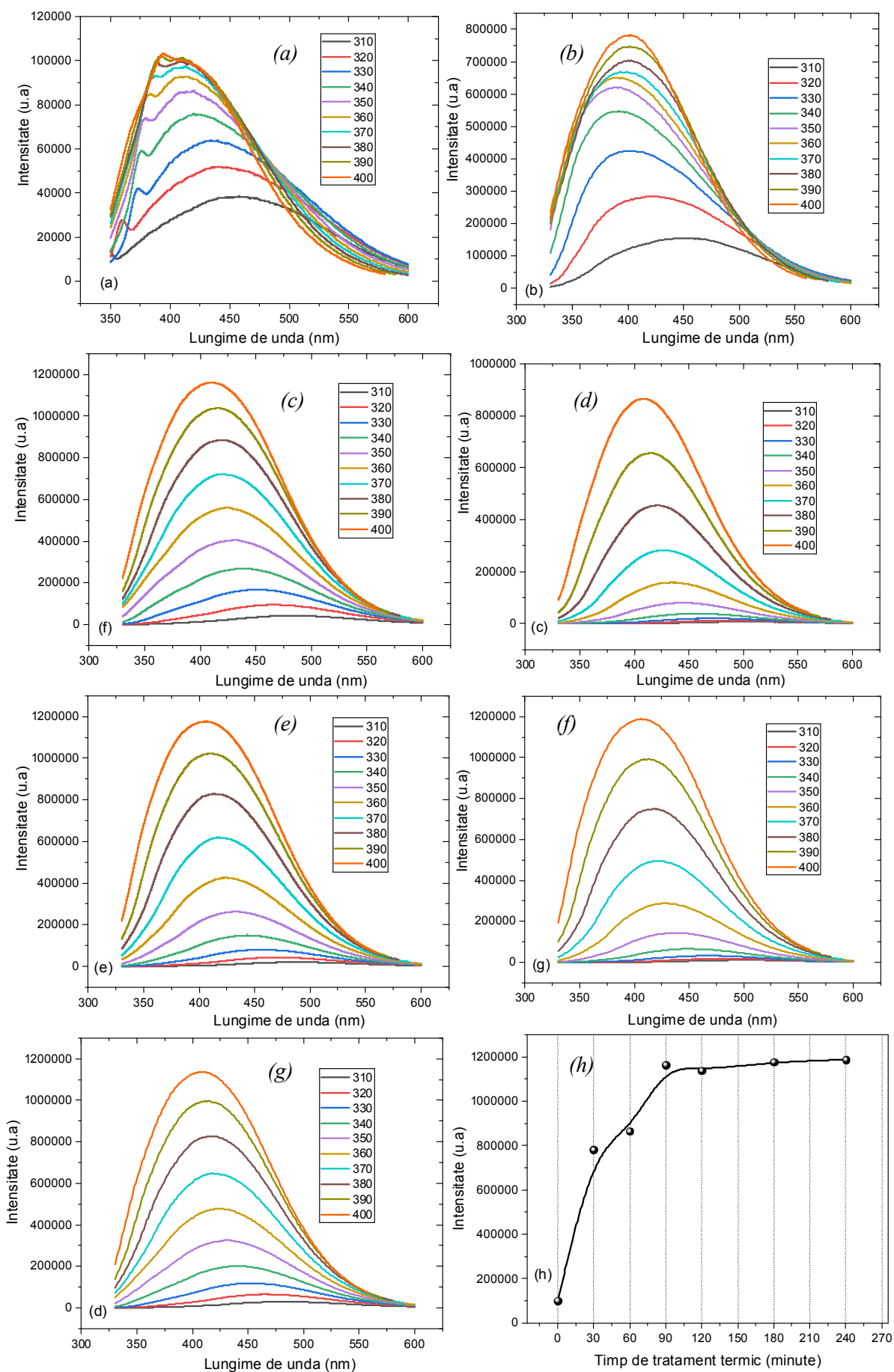


Figura 28. Spectrele de emisie inregistrate in domeniul de excitatie 320–420 nm (pasi de 10 nm) pentru CDs dispersate in apa; (a) reprezinta proba de control (precursorul imidic netratat termic), iar (b)-(g) reprezinta probele tratate termic la 180°C timp de 30, 60, 90, 120, 180 si, respectiv, 240 min.

In (h) este reprezentata dependenta intensitatii maxime de emisie, I , a probelor in functie de timpul de tratament termic, t , pentru o lungime de unda a radiatiei de excitatie de 400 nm.

- (e) Evaluarea spectrului de fluorescenta. In Fig. 28 sunt prezentate spectrele de emisie inregistrate in domeniul de excitatie 310-400 nm (in pasi de 1 nm) pentru cele sapte probe. CDs prezinta emisie caracteristica dependenta de excitatie, maximul intensitatii de emisie fiind cuprins intr-un domeniu (400 si 408 nm) situat in regiunea violeta a spectrului vizibil. In Fig. 6-h, curba $I(t)$ se satureaza incepand cu proba tratata termic timp de 90 min. Prin urmare, este posibil ca acest timp sa fie cel mai potrivit pentru obtinerea de CDs, in special daca se tine cont si de faptul ca randamentul de obtinere a CDs pentru acest timp de tratament este de 77 % comparativ, de ex., cu 42% pentru un timp de tratament de 240 min.

Propuneri tematice de colaborare ulterioara intre parteneri, in conformitate cu cerintele proiectului

Expertiza INCDFT-IFT Iasi in prepararea, caracterizarea si testarea *in vivo* a unor tipuri de nanoparticule magnetice biocompatibile pentru aplicatii biomedicale se poate conjuga cu expertiza celorlalti parteneri ai consortiuului pentru explorarea si, ulterior, exploatarea comuna a unor teme de cercetare cu potential inovator in domeniul oncologic. Obtinerea de CDs cu proprietati magnetice va conduce la cresterea valentelor teranostice ale noilor compusi rezultati, permitand astfel, nu numai o monitorizare in timp real a distributiei compusilor antitumorali in vivo (de ex., prin RMN), ci si aplicarea unui proces de hipertermie magnetica, utilizand campuri magnetice alternative aplicate zonal, avand ca rezultat o amplificare sinergica semnificativa a procesului de distrugere tumoral initiat si controlat prin intermediul noilor compusi sintetizati. In plus, functionalizarile de suprafata cu polimeri, inclusiv termosensibili, pentru eliberarea controlata a unor produse antitumorali conventionali adsorbiti impreuna cu CDs la nivelul polimerului, va conduce la realizarea de compusi multifunctionali cu un spectru larg de actiune antitumoral. In mod concret, dat fiind ca la incheierea proiectului instalatia pilot de preparare a CDs va fi complet operationala, iar procesul de obtinere al CDs va fi optimizat la cel mai inalt nivel, subiectul unei colaborari cu tematica mai sus mentionata va fi unul pe care partenerii consortiuului il vor concretiza intr-un proiect national sau international. Extinderea consortiuului prin includerea a inca unui spital, alaturi de IRO, pentru efectuarea de teste clinice pe pacienti oncologici, dar si a unui operator economic pentru transferul tehnologiei si, eventual, a brevetelor de inventie va creste sansele de implementare in practica oncologica a acestor compusi. Anvergura deschisa de un viitor proiect, care va presupune si un grad ridicat de inovare, va fi validata prin prisma rezultatelor obtinute la finalul proiectului curent.

Valoarea argumentativa solida pentru succesul asumat al unei viitoare colaborari a consortiuului, intr-un format care va putea fi extins, va fi si rezultatul faptului ca INCDFT-IFT Iasi, ca beneficiar al procedurii de sinteza la scara pilot a nanostructurilor de tip carbon dots, va avea adaugata in oferta de servicii a institutului si realizarea de CDs cu actiune antitumoral, obtinuti din precursori imidici, impreuna cu serviciile de caracterizare fizica si cele de evaluare *in vitro* a potentialului antitumoral al acestora.

INCDFT-IFT Iasi a realizat cu succes toate activitatile in care a fost implicat in cadrul acestei etape a proiectului. Activitatile desfasurate au condus la **indeplinirea obiectivului final** al acestui proiect, si anume configurarea si realizarea instalatiei pilot de sinteza a carbon dots pe

baza rezultatelor/concluziilor obtinute in etapele anterioare. Instalatia proiectata si realizata de INCDFE-IFT Iasi pentru sinteza CDs imidici fluorescenti, utilizabili ca platforme teranostice antitumorale, a fost testata in cadrul INCDFE-IFT Iasi, rezultatele conducand la urmatoarele concluzii:

- (a) instalatia pilot automatizata poate suporta temperaturi de lucru suficient de inalte pentru obtinerea corespunzatoare de CDs, inclusiv la scara pilot;
- (b) instalatia pilot este fiabila in conditii de utilizare extensiva, fara disfunctionalitati in procesul automatizat de operare si control;
- (c) procesul de obtinere a CDs cu ajutorul instalatiei automatizate este inalt reproductibil;
- (d) coroborat cu masuratorile masice, s-a putut concluziona ca randamentul de obtinere a CDs imidici cu instalatia pilot prezinta o dependenta liniara de timpul de combustie, crescand proportional cu acesta, dependenta confirmata partial si de masuratorile de fluorescenta;
- (e) CDs obtinuti cu instalatia pilot sunt puternic fluorescenti, insa numai dupa ce au fost tratati termic cel putin 90 de min. la 180°C.

In final, putem concluziona faptul ca **transferul integral al tehnologiei de obtinere a CDs la INCDFE-IFT Iasi in vederea cresterii si diversificarii competentelor institutului in domeniul nanomaterialelor cu aplicatii biomedicale a fost realizat cu succes**. Imbunatatirea tehnologiei va fi continuata in ultimul an al proiectului. In plus, tinand cont de rezultatele obtinute, continuarea colaborarii cu partenerii din proiect, si in particular cu Institutul Regional de Oncologie Iasi (partenerul P2 al proiectului) pentru validarea rezultatelor pe pacienti oncologici, precum si extinderea consortului, inclusiv prin includerea unui operator economic (de ex., Antibiotice Iasi), reprezinta un obiectiv important pe termen lung legat de potentialul de inovare generat de proiect.

(c) Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obținute în cadrul Etapei III a proiectului au fost valorificate prin redactarea și trimiterea spre publicare a **6** lucrări, înregistrarea unui brevet de invenție internațional (EPO), respectiv prezentarea a **4** comunicări la manifestări științifice.

Lucrări ISI publicate sau acceptate pentru publicare:

„NHF-derived carbon dots: prevalidation approach in breast cancer treatment” Crina Elena Tiron, Gabriel Luta, Mihail Butura, Florin Zugun-Eloae, Corneliu S. Stan, Adina Coroaba, Elena-Laura Ursu, Gabriela Dumitrita Stanciu & Adrian Tiron Scientific Reports 2020; 10: 12662. doi.org/10.1038/s41598-020-69670-z

„Flash-cooling assisted sol-gel self-ignited synthesis of magnetic carbon dots-based heterostructure with antitumor properties” Adrian Borhan, Dumitru-Daniel Herea et al., , Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Application, 2020, 117, 111288, DOI:10.1

„Eco-friendly O/W emulsions with potential application in skin care products” A. Danila, S.-A. Ibanescu, C. Zaharia, E. I. Muresan, A. Popescu, M. Danu, V. Rotaru, , Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, acceptata 016/j.msec.2020.111288

„Dynamic rheological behavior of chitosan/collagen mixtures” Sorin Ibanescu, Marcel Danu, Bogdana Simionescu, Constanta Ibanescu, , Revista de Chimie, 71 (5), 2020, 193-200, doi.org/ 10.37358/RC.20.5.8127

Lucrări ISI trimise spre publicare

1. **„Enhancing anti-tumoral potential of CD-NHF by modulating PI3K/Akt axis in U87 *ex vivo* glioma model”** Gabriel Luta, Mihail Butura, Adrian Tiron, Florin Zugun-Eloae, Crina Tiron – Pharmaceutics – Manuscrip ID pharmaceutics-1026181 – in evaluare

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

3. **„Spectroscopic assessment of silver nanoparticles obtained by sodium lignosulfonate assisted synthesis”** L. Ignat, A. Coroaba, M.-E. Ignat,. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy – in evaluare

4. **„Macromolecular chemistry toolbox for the preparation of cyclodextrin based crosslinked networks”** Blaj, V. Harabagiu, C. Peptu, Progress in Polymer Science – in evaluare

5. **„Carbon Dots and doxorubicin liposomal formulations with enhanced antitumoral effect”** Corina-Lenuta Savin, Iolanda Fusteș Dămoc, CrinaTiron, Corneliu S. Stan, Lungoci Lacramioara, Constanța Ibănescu, Maria Letizia Manca, Maria Manconi, Catalina A. Peptu, Nanomaterials

6. **„The influence of the pyrolysis time on the antioxidant activity of some NHF-derived carbon dots”** A. Coroaba, M Ignat, O. Carp, A. Arvinte, BF Craciun, CS Stan, M Secula, M Pinteala – in evaluare,

Propunere brevet invenție internațional înregistrat:

Manganese-Dopped Nanostructured Carbon Dots with Applications in Antitumoral Treatments and Medical Imaging/ EP20464012/15.102020; Corneliu S. Stan, Marius S. Secula

Lucrări comunicate la manifestări științifice

1. Potentarea proprietatilor antitumorale ale CD-NHF de catre inhibitorii K252A, AktVIII in linia celulara de gliom U87. Autori: G. Luta, M. Butura, A. Tiron, F.E. Zugun, C.E.Tiron, CONFER, 19-22 Noiembrie 2020, TRANSCEND IRO-Iași
2. Cai moleculare modulate de catre CD-NHF si inhibitorii K252A, AktVIII in linia celulara de gliom U87. Autori: M. Butura, G. Luta, A. Tiron, F.E. Zugun, C.E.Tiron, CONFER, 19-22 Noiembrie 2020, TRANSCEND IRO-Iași
3. Thiolated chitosan for biomedical applications, I. Fusteș-Dămoc, C. A. Peptu, C. Peptu, T. Măluțan, 5th International Conference on Chemical Engineering - "Innovative Materials and Processes for a Sustainable Development", 28-30 Octombrie, 2020, Iași, România.
- 4 Carbon Dots loaded liposomes for antitumoral applications, I. Fusteș-Dămoc, C.-L. Savin, C. Tiron, C. S. Stan, C. Ibănescu, B. C. Simionescu, C. A. Peptu, International Congress of „Apollonia” University, Edition XXX, 27 Februarie – 1 Martie 2020, IAȘI, ROMANIA

(d) Prezentarea structurii ofertei de servicii de cercetare și tehnologice cu indicarea link-ului din platforma Erris

<https://eeris.eu/index.php?&sm=module.org.erris.app.infra&ddpN=3245192760&we=a5ba74f6d75889ea8c62a266f3e019f6&wf=dGFCall&wtok=07672c4ea5c3a538be9749564d864338857cbf0b&wtkps=JY3bDolwEET/Zd8h0Bvt+jWFLqYRCrZcFOO/C/VtMjlxqLAT0KOkLyDW0JZIfBtfSo7mHejwya1WKKoKTEfmIpLEkRqPYpjVLurC1WHF+lr2SD40Ef795xGxVQ2IuzLY0i5ZQg9byore25Np7Uj0RG1gnOShfGiPbiTmynHBTCOL1oHKK95Ji9Km081zmK7h9fw==&wchk=a9d65026ad134b6c7d6d4e9ae61b2a35548210f8>

(e) Locuri de muncă susținute prin program, inclusiv resursa umană nou angajată

Derularea proiectului a permis angajarea cu normă întreagă a unui număr de 11 noi cercetători care lucrează cu normă întreagă în cadrul proiectului dintre care 3 cercetători au fost nominalizați în echipa proiectului din faza de propunere, iar 8 cercetători au ocupat pozițiile vacante prevăzute în contractul de cercetare.

(f) Prezentarea valorificării/ îmbunătățirii competențelor/ resurselor existente la nivelul consorțului (cecuri)

Partenerii P1, P2 și P3 au avut prevăzute sume pentru valorificarea competențelor în domeniul lor de activitate. În acest sens, sumele au fost utilizate prin cecuri de tip A1, ținând cont de faptul că toate instituțiile din consorțiu sunt din Iași. Au fost astfel realizate o serie de analize în conformitate cu obiectivele proiectului și cu contractele încheiate între instituțiile implicate.

Director proiect

Academician Bogdan C. Simionescu

