

UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI „CRISTOFOR SIMIONESCU”,
Titlul proiectului de cercetare: *Depășirea barierei hematoencefalice cu noi particule funcționalizate pe bază de biopolimeri conținând două medicamente antitumorale co-încapsulate*
Cod proiect: PN-III-P1-1.1-PD-2021-0553
Contract finanțare: 61/2022
Director proiect: Dr. Ing. Camelia Elena Tincu

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

- *Obiectivele prevăzute/realizate;*

În cadrul cererii de finanțare au fost prevăzute următoarele obiective:

Obiectivul principal al proiectului este realizarea unui sistem de eliberare capabil să depășească bariera hematoencefalică pentru a trata glioblastomul uman, constând din nanoparticule pe bază de albumină serică umană modificată cu o peptidă (protamina de masă moleculară mică) și reticulate cu grupări carbonil provenite din gelan oxidat sau pectină oxidată care au co-încapsula două medicamente temozolomida și curcumina. Pentru realizarea obiectivului principal au trebuit realizate câteva obiective specifice (S.O.):

1. Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a precursorilor și a nanoparticulelor funcționalizate și reticulate care conțin sau nu medicamente încapsulate.-Realizat 100%
2. Studii cinetice de eliberare in vitro a medicamentelor din nanoparticule, testarea ex vivo a sistemelor nanoparticulate, evaluarea caracteristicilor de biomaterial a nanoparticulelor (citotoxicitate, hemocompatibilitate, activitate microbiologică) și evaluarea medicamentului încapsulat în nanoparticule la temperatură, pH și lumină-Realizat 100%
3. Evidențierea caracterului protector al matricii polimere pentru medicamentele încorporate la complexare cu ioni metalici-Realizat 100%

În cadrul etapei 1 (2022) a proiectului intitulată “ *Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a precursorilor și a nanoparticulelor funcționalizate și reticulate care conțin sau nu medicamente încapsulate*” au fost prevăzute un număr de 7 activități de cercetare științifică. Toate activitățile au fost îndeplinite, astfel încât obiectivele propuse pentru anul 2022 ca și indicatorii de proiect au fost realizați. O scurtă descriere a principalelor activități desfășurate în această etapă este prezentată în cele ce urmează.

Prima **activitate 1.1** realizată se referă la modificarea albuminei serice umane (HSA) cu protamina de masă moleculară joasă (LMWP), o peptidă utilizată pentru a îmbunătăți coeficientul de difuzie al albuminei spre creier. Eliberarea medicamentelor în tumorile canceroase poate fi îmbunătățită prin strategia de direcționare mediată de HSA și depășirea barierei hematoencefalice mediată de LMWP. Pentru obținerea LMWP, sulfatul de protamină din somon a fost scindat proteolitic în prezența termolizinei. Spectrele FT-IR și ¹H-RMN confirmă faptul că protamina a fost scindată proteolitic în prezența termolizinei. Activitatea 1.1. prezintă metoda de obținere a LMWP și a albuminei modificate cu LMWP. Pentru modificarea HSA cu peptida LMWP, gruparea-SH din HSA a fost activată mai întâi cu succimidil-4-(N-maleidometil)-ciclohexan-1-carboxilat (SMCC) iar apoi HSA activată a fost funcționalizată cu LMWP. Compușii obținuți au fost caracterizați prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și prin rezonanță magnetică nucleară (RMN). Au fost dozate grupele aminice libere din HSA, din sulfatul de protamină și din LMWP utilizând testul cu ninhidrina. De asemenea utilizând testul cu ninhidrină a fost determinat numărul de grupe aminice libere din albumină, $6.31 \pm 0.7 \times 10^{-4}$. Testul a fost efectuat și pentru fracțiile de protamină modifica colectate din coloana

cromatografică și s-a observat că numărul de moli grupe aminice libere crește de la o fracție la alta fiind un indiciu clar că LMWP a fost obținută. În cadrul **activității 1.2.** sunt prezentate informații cu privire la sinteza și caracterizarea gelanului oxidat (GO) și a pectinei oxidate (PO) în prezența periodatului de sodiu pentru a obține grupe aldehydice. A fost determinată cinetica reacției de oxidare iar concentrația grupelor aldehydice din produșii obținuți în urma oxidării a fost determinată cantitativ prin titrare indirectă cu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Gradul de oxidare al polizaharidelor oxidate crește în timp până la 72 h pentru gelanul oxidat și 24 h pentru pectina oxidată valoarea sa rămâne constantă după aceste durate de oxidare.. Masa moleculară a GO și PO a fost determinată prin metoda vâscozimetrică iar structura compușilor sintetizați a fost analizată prin spectroscopie FT-IR și RMN demonstrând astfel că reacția de oxidare a avut loc cu formarea de grupe aldehydice. Masa moleculară a gelanului scade odată cu creșterea gradului de oxidare și a duratei de oxidare. În cadrul **activității 1.3** este prezentată sinteza nanoparticulelor pe bază de HSA și HSA modificată cu LMWP reticulate cu grupe aldehydice provenite din polizaharidele oxidate (utilizând diferite rapoarte molare) conținând telozolomida (TMZ) și curcumina co-încapsulate printr-o metodă pe bază de ultrasonicare și precipitare. Pentru obținerea nanoparticulelor au fost utilizate diferite rapoarte molare între grupele aminice din HSA și cele aldehydice din polizaharidele oxidate (gelan sau pectină) **Activitatea 1.4.** prezintă o altă metoda de obținere a nanoparticulelor pe bază de HSA și HSA modificată cu LMWP reticulate cu grupe aldehydice provenite din polizaharidele oxidate prin autoasamblare conținând două medicamente co-încapsulate curcumina și temozolomida. În **activitatea 1.5** nanoparticulele obținute au fost caracterizate prin evaluarea diametrului mediu (difracție cu fascicul laser), din punct de vedere morfologic (microscopia electronică de baleiaj) și structural prin spectroscopie FT-IR. Dimensiunea nanoparticulelor în majoritatea cazurilor este până în 200 nm având astfel posibilitatea să depășească bariera hematoencefalică. În **activitatea 1.6** a fost evaluată capacitatea nanoparticulelor de a încapsula a medicamentele. Nanoparticulele obținute au capacitatea de a include temozolomida și curcumina și s-a observat că eficiența de imobilizare este mai mare pentru curcumină dar există posibilitatea să fie o consecință a faptului că temozolomida poate forma conjugate polimer-medicament prin interacțiunea grupei aminice din structura sa cu grupele aldehydice din polizaharidele oxidate În **activitatea 1.7** sunt prezentate unele studii preliminare obținerii nanoparticulelor. S-a considerat necesar ca anterior obținerii nanoparticulelor de HSA reticulate cu polizaharide oxidate să se efectueze mai întâi un studiu sistematic privind obținerea hidrogelurilor de acest tip pentru a determina gradul de umflare și indicele de conversie a grupelor aminice în baze Schiff. S-a observat că gradul de umflare a hidrogelurilor depinde de hidrofilicitatea probelor și de pH. Gradul de umflare crește odată cu creșterea cantității de gelan oxidat în matricea polimeră și valori maxime ale gradului de umflare au fost obținute la pH=7.4. De asemenea s-a observat că valoarea indicelui de conversie a grupelor aminice în baze Schiff crește odată cu creșterea cantității de gelan oxidat din probe.

În cadrul etapei II (2023) a proiectului au fost prevăzute un număr de 11 activități de cercetare științifică. Toate activitățile au fost îndeplinite, astfel încât obiectivele propuse pentru anul 2023 ca și indicatorii de proiect au fost realizați într-un procent de 100%. Activitatea 2.1. a prevăzut caracterizarea celor două tipuri de nanoparticule (NP) de albumină serică umană (HSA) obținute prin nanoprecipitare și autoasamblare. Așa cum am menționat anterior nanoparticulele au fost caracterizate prin difracție laser, spectroscopie FT-IR, grad de conversie, microscopie electronică de baleiaj, eficiență de imobilizare și grad de umflare. În **cadrul activității 2.2.** a fost studiată cinetica de eliberare a medicamentelor co-încapsulate în nanoparticule și acest studiu a fost efectuat la pH=7.4 și pH=4 și cantitatea de medicament eliberată a fost determinată spectrofotometric și s-a demonstrat că eliberarea medicamentului are loc controlat și susținut. Eficiența de eliberare a fost mai mare la pH=7.4 pentru curcumină și la pH=4 pentru TMZ și crește atunci când gradul de reticulare scade. În **cadrul activității 2.3.** apoptoza celulară indusă de medicamentele co-încapsulate în nanoparticule a fost determinată prin citometrie în flux pentru cele două tipuri nanoparticule cu medicamente încapsulate. Nanoparticulele au fost testate pe linia tumorală de gliom C6 și pe linia de celule normale V79-4 și s-a observat că NP obținute prin nanoprecipitare induc un puternic mecanism apoptotic celulelor C6 în timp ce pentru cele obținute prin autoasamblare s-a observat un potențial efect sinergic. În **cadrul Act 2.4** permeabilitatea nanoparticulelor prin bariera hematoencefalică a fost evaluată utilizând testul de permeabilitate cu membrană artificială (PAMPA) iar

rezultatele au arătat că medicamentele co-încapsulate în nanoparticulele de albumină funcționalizată au capacitatea de a depăși bariera hematoencefalică. În cadrul **activității 2.5.** a fost evaluată activitatea antioxidantă a curcuminei utilizând testul cu DPPH. Activitatea antioxidantă pentru curcumina liberă și imobilizată în NP a fost determinată utilizând testul cu DPPH și s-a stabilit că activitatea antioxidantă a curcuminei nu este afectată de imobilizare, valoarea IC50 pentru curcumina încapsulată în nanoparticule de HSA expuse la lumină UVA la 365 nm este mai mică decât la curcumina liberă neiradiată UV demonstrând astfel rolul protectiv al matricii polimere. În cadrul **activității 2.6.** a fost evaluată citotoxicitatea nanoparticulelor pe două linii celulare. Citotoxicitatea a fost determinată utilizând testul cu MTT pe linia tumorală de gliom C6 și pe linia de celule normale V79-4. Tratamentul celulelor tumorale sau normale cu nanoparticule de HSA, obținute prin autoasamblare sau nanoprecipitare, reticulate cu pectină oxidată sau gelan oxidat, cu sau fără principii active co-încapsulate, a determinat un efect citotoxic diferențiat ca intensitate prin utilizarea testului cu MTT. Astfel, în cazul celulelor tumorale C6, impactul citotoxic a fost mult mai pronunțat comparativ cu celulele normale V79-4, dovedind inducerea unui răspuns selectiv care constituie un avantaj pentru folosirea acestor vectori în terapia anticancer. În cadrul **activității 2.7 s-a evaluat** activitatea microbiologică care a fost realizată pe culturi bacteriene de *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 și *Escherichia coli* ATCC 25922. Rezultatele au arătat că medicamentele încapsulate în nanoparticule (50μg/ml) nu au activitate antibacteriană. În cadrul **activității 2.8** testul de hemoliza a fost efectuat pentru nanoparticule de HSA funcționalizate fără medicamente încapsulate iar rezultatele au arătat că toate nanoparticulele au o bună hemocompatibilitate. În cadrul **activității 2.9.** stabilitatea nanoparticulelor la temperatură a fost evaluată. Analiza termogravimetrică a fost efectuată cu un analizor TA Instrument Q600. Rezultatele arată că stabilitatea nanoparticulelor scade odată cu creșterea temperaturii iar nanoparticulele preparate prin nanoprecipitare sunt mai stabile stabile. În cadrul **activității 2.10.** stabilitatea curcuminei libere și a celei încapsulate la degradare în soluții de pH diferit (3, 6.8, 7.4 și 9) a fost evaluată iar în **activitatea 2.11** degradarea la lumină și aer pe o perioadă de 30 de zile a fost evaluată spectrofotometric. Rezultatele au arătat că matricea polimeră protejează curcumina de factorii degradativi iar $t_{1/2}$ la degradare este mai mare de 15 h indiferent de valoarea pH-ului iar procentul de degradare la lumină al curcuminei încapsulate a fost mai mic comparativ cu al curcuminei libere.

În cadrul etapei III (2024) a proiectului intitulată “*Evidențierea caracterului protector al matricii polimere pentru medicamentele încorporate la complexare cu ioni metalici*” au fost prevăzute două activități. Toate activitățile au fost îndeplinite, astfel încât obiectivele propuse pentru anul 2023 ca și indicatorii de proiect au fost realizați într-un procent de 100%. **Activitatea 3.1.** prezintă studiul stabilității la complexare cu ioni metalici a medicamentelor încapsulate. Au fost utilizați ioni de Cu^{2+} și Zn^{2+} proveniți de la sulfat de cupru și sulfat de zinc. Complecșii curcumină/ioni metalici dizolvați în DMSO au o absorbție maximă la lungimi de undă inferioare, 429 nm și 433 nm pentru cei cu ioni de Cu^{2+} și respectiv cu ioni de Zn^{2+} . Variația vârfului de absorbție a curcuminei libere și aspectul umerilor în diferitele complexe depinde de natura implicării ionilor metalici. S-a încercat obținerea de complexe metalice cu TMZ dar s-a observat că TMZ nu formează complexe metalice cu ionii de Zn^{2+} iar banda de absorbție de la 331 nm specifică temozolomidei pentru complexe metalice cu ioni de Cu^{2+} scade mult în intensitate și nu putem avea rezultate concludente. Rezultatele au arătat că nanoparticulele reticulate cu ioni de Cu^{2+} nu formează complexe metalice și lungimea la undă la care absorbanța este maximă a fost de 435 nm, dar apare un umăr la lungimea de undă de 457 nm la toate probele analizate ceea ce înseamnă că există unele interacțiuni cu ionii de Cu^{2+} . Totuși apare o deplasare a lungimii de undă unde absorbanța este maximă la probele reticulate cu ioni de Zn^{2+} la 428 nm care poate fi datorată interacțiunii ionului metalic cu grupele carbonilice din polizaharidele oxidate care nu au reacționat cu grupele aminice din albumină. Analiza statistică a datelor a fost utilizată pe toată durata de desfășurare a proiectului (**Activitatea 3.2.**).

- **Indicatori de realizat:**

- Publicarea a 3 articole în reviste ISI cu factor mare de impact, în regim open access-realizat 100%
- Participarea cu lucrări științifice la 4 conferințe internaționale-realizat 100%
- Redactarea rapoartelor de cercetare anuale și a raportului final de cercetare 100%
- 1 pagină web-realizat 100%

- **Indicatori realizați:**

- Publicarea a 3 articole în reviste ISI cu factor mare de impact, în regim open access
- Participarea cu lucrări științifice la 5 conferințe internaționale-realizat 100%
- Redactarea rapoartelor de cercetare anuale și a raportului final de cercetare 100%
- 1 pagină web a proiectului-realizat 100%

Diseminarea rezultatelor:

- **Participări la conferințe:**

- **Comunicare orală:**

1. **Camelia Elena Iurciuc (Tincu)**, Christine Jérôme, Marcel Popa, Carmen Gafițanu, Eliza Grațielă Popa, Lăcrămioara Ochiuz, Biocompatible hydrogels films with the inclusion complex of β -cyclodextrin/curcumin immobilized for biomedical applications, International Conference on Natural Products in Drug Discovery and Development – Advances and Perspectives, PSE Meeting 2022, September 19 – 22, 2022, Iași, Romania
2. Camelia Elena Tincu (Iurciuc), Oana-Maria Darabă, Leonard Ionuț Atanase, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz, β -cyclodextrin/curcumin complex immobilized in the albumin-based hydrogel films cross-linked with oxidized gellan for biomedical applications, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, *Pregătim viitorul promovând excelența*, Ediția a XXXIII-a, 2 - 5 Martie 2023, IAȘI, ROMANIA

- **Prezentări poster**

3. Camelia Elena Tincu (Iurciuc), Silvia Vasiliu, Ștefania Racoviță, Leonard Ionuț Atanase, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz, New drug release system based on functionalized albumin cross-linked with oxidized polysaccharides for the potential treatment of brain tumors, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, *Pregătim viitorul promovând excelența*, Ediția a XXXIII-a, 2 - 5 Martie 2023, IAȘI, ROMANIA
4. Camelia Elena Tincu (Iurciuc), Silvia Vasiliu, Ștefania Racoviță, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz, Nanoparticles based on Functionalized Albumin Cross-linked with Oxidized Polysaccharides Used for Drug Delivery in Brain Tumors Therapy, 3rd International Conference on Bioengineering and Polymer Science, Bucharest, ROMANIA - June 7-10, 2023
5. Camelia Elena Tincu (Iurciuc), Silvia Vasiliu, Ștefania Racoviță, Gabriela Vochița, Daniela Gherghel, Leonard Ionuț Atanase, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz, Development of a drug delivery nanosystem composed of functionalized human serum albumin cross-linked with oxidized polysaccharides for treating brain tumors, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, *Pregătim viitorul promovând excelența*, Ediția a XXXIV-a, 29 februarie - 3 martie 2024, IAȘI, ROMANIA

- **Articole publicate:**

1. Tincu (Iurciuc), Camelia Elena, Brahim Bouhadiba, Leonard Ionut Atanase, Corneliu Sergiu Stan, Marcel Popa, and Lăcrămioara Ochiuz. 2023. "An Accessible Method to Improve the Stability and Reusability of Porcine Pancreatic α -Amylase via Immobilization in Gellan-Based Hydrogel Particles Obtained by Ionic Cross-Linking with Mg^{2+} Ions" *Molecules* 28, no. 12: 4695. <https://doi.org/10.3390/molecules28124695>
2. Tincu (Iurciuc), Camelia-Elena, Călin Vasile Andrițoiu, Marcel Popa, and Lăcrămioara Ochiuz. 2023. "Recent Advancements and Strategies for Overcoming the Blood–Brain Barrier Using

Albumin-Based Drug Delivery Systems to Treat Brain Cancer, with a Focus on Glioblastoma" *Polymers* 15, no. 19: 3969. <https://doi.org/10.3390/polym15193969>

3. Trimiterea spre publicare a articolului intitulat "Albumin-Based Hydrogel Films Covalently Cross-Linked With Oxidized Gellan With Encapsulated Curcumin For Biomedical Applications", Autori: Camelia Elena Tincu (Iurciuc), Oana-Maria Darabă, Christine Jerome, Marcel Popa, Lăcrămioara Ochiuz la revista *Polymers*. (Manuscript ID: polymers-2956947)