**ACADEMIA ROMÂNĂ**

**Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iaşi**

# Sisteme complexe supramoleculare pentru aplicații biomedicale

## *Rezumatul tezei de doctorat*

**Coordonator științific**

**Dr. Mariana Pinteală**

**Doctorand**

**Gabriela Pricope (căs. Gavril)**

**Iași, 2020**

**Academia Română**

**Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni" Iaşi**

Nr. 914 / 20 ii 2020

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **16 martie 2020**, ora **11:00**, în sala de conferinţe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni" Iaşi, va avea loc susţinerea publică a tezei de doctorat **„Sisteme complexe supramoleculare pentru aplicatii biomedicale", autor Gabriela Pricope (căs. Gavril)**, în vederea conferirii titlului ştiinţific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componenţă:

**PREŞEDINTE: Acad. Bogdan C. Simionescu**

**CONDUCĂTOR ŞTIINŢIFIC: Dr. Mariana Pinteală**
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni" din Iaşi

**REFERENŢI: Prof. Dr. Ionel Mangalagiu**
Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iaşi

**Prof. Dr. Geta David**
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi" din Iaşi

**Dr. Habil. Luminita Marin**
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni" din Iaşi

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea şi desfăşurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor ştiinţifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile şi observaţiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participaţi la susţinerea publică a tezei de doctorat.

Director,
Dr. Anton Airinei

ACADEMIA ROMÂNĂ INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" IAŞI

## *Mulțumiri*

*Pe parcursul studiilor de doctorat și implicit în perioada elaborarea acestei lucrări m-am bucurat de colaborarea unor specialişti, cărora doresc să le mulţumesc.*

*Îi multumesc coordonatorului ştiintific al acestei teze, doamna* ***Dr. Mariana Pinteală****, pentru acceptarea mea ca doctorand și pentru îndrumarea oferită, atât în realizarea acestei teze, cât și în dezvoltarea activității mele științifice.*

*Întreaga activitate de cercetare din perioada doctoratului nu ar fi putut fi posibilă fără sprijinul a două persoane deosebite care și-au depășit atribuțiile profesionale și mi-au oferit tot sprijinul de care am avut nevoie, atât din punct de vedere științific cât și moral. Le voi fi mereu recunoscătoare colegilor și îndrumătorilor mei* ***Dr. Alexandru Rotaru și Dr. Lilia Clima****.*

*Mulțumirile mele se întreaptă și către* ***colegii din cadrul Centrului de Cercetări avansate pentru Bionanconjugate și Biopolimeri (IntelCentru)****, îndeosebi colegilor alături de care am lucrat îndeaproape:* ***Drd. Bogdan Crăciun, Dr. Laura Ursu și Dr. Dragoș Peptanariu****, pentru bunăvoința lor și pentru crearea unui mediu de lucru plăcut.*

*Mulțumiri tuturor colectivelor cu care am avut onoarea de a colabora.*

*Mulțumiri comisiei pentru amabilitatea de a evalua conținutul științific al acestei teze de doctorat.*

*Mulţumesc conducerii* ***Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”*** *din Iaşi pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei de doctorat.*

*Mulțumiri* ***Academiei Române****, pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.*

*Mulțumiri următoarelor proiecte pentru sprijinul financiar acordat:*

- *“SupraChem Lab”, Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs.*
- *“Platforme dinamice constituţionale pentru livrare ţintită de principii active (DynaCoPlat)”, PN-III-P1-1.1-TE-2016-1180.*
- *“Mimarea mecanismelor viului prin abordari ale chimiei supramoleculare, in cinci dimensiuni (5D-nanoP)”, PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050.*
- *“Platforme teranostice antitumorale pe bază de carbon dots și matrice polimerice (TERADOT)”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083 contract nr. 37/PCCDI/2018.*
- *“Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlata de compusi farmacologici din celulele incapsulate dupa manipulare genetica sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697, contract nr. 13/PCCDI/2018.*

*Nu în ultimul rând doresc să mulțumesc* ***familiei*** *mele pentru înțelegerea și sprijinul moral accordat în această perioadă.*

# Cuprins

**LISTA DE ABREVIERI** ..... **1**

**INTRODUCERE** ..... **4**

**PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ** ..... **8**

**CAPITULUL I. STRUCTURI SUPRAMOLECULARE CU APLICAȚII BIOMEDICALE** ..... **8**

I.1. CONSIDERAȚII GENERALE DESPRE CHIMIA SUPRAMOLECULARĂ ..... 8

I.2. SISTEME COMPLEXE SUPRAMOLECULARE OBȚINUTE PRIN PROCESUL DE AUTO-ASAMBLARE ..... 10

*I.2.1. Hidrogeluri supramoleculare* ..... *13*

I.2.1.1. Introducere ..... 13

I.2.1.2. Metode de obținere ale hidrogelurilor supramoleculare ..... 14

I.2.1.3. Metode și tehnici de caracterizare ale hidrogelurilor supramoleculare ..... 17

I.2.1.4. Aplicaţii ale hidrogelurilor supramoleculare ..... 20

*I.2.2. Vectori non-virali pentru terapia genică* ..... *23*

I.2.2.1. Introducere ..... 23

I.2.2.2. Strategii de împachetare ale materialului genetic ..... 24

I.2.2.3. Transportul în citoplasmă şi pătrunderea în nucleu a materialului genetic ..... 25

Penetratrea membranei celulare ..... 25

Pătrunderea în nucleu a materialului genetic ..... 28

I.2.2.4. Strategii de eliberare a ADN-ului intracelular ..... 28

I.2.2.5. Biocompatibilitatea şi citotoxicitatea vectorilor non-virali ..... 30

I.2.2.6. Sisteme utilizate ca vectori non-virali ..... 31

I.3. SISTEME SUPRAMOLECULARE OBȚINUTE PRIN CHIMIA GAZDĂ-OASPETE ..... 35

*I.3.1. Complecşi de incluziune ai ciclodextrinelor* ..... *35*

I.3.1.1. Introducere ..... 35

I.3.1.2. Metode de formare ale complecșilor de incluziune ..... 38

I.3.1.3. Caracterizarea complecșilor de incluziune ..... 40

I.3.1.4. Domenii de aplicabilitate ..... 42

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE ..... 43

**PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE** ..... **54**

**CAPITOLUL II. HIDROGELURI SUPRAMOLECULARE OBȚINUTE PRIN AUTOASAMBLAREA GUANOZINEI** ..... **54**

**II.1. INFLUENȚA IONILOR METALICI ÎN OBȚINEREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE CVARTEȚI DE GUANOZINĂ ..... 54**

II.1.1. INTRODUCERE ..... 54

II.1.2. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE CVARTEȚI DE GUANOZINĂ . 55

II.1.3. TESTĂRI BIOLOGICE ..... 64

II.1.4. CONCLUZII ..... 66

II.1.5. PARTE EXPERIMENTALĂ ..... 67

**II.2. INFLUENȚA NANOTUBURILOR DE CARBON ÎN CONSOLIDAREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE CVARTEȚI DE GUANOZINĂ ..... 71**

II.2.1. INTRODUCERE ..... 71

II.2.2. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR SUPAMOLECULARE CONSOLIDATE CU SWNT ..... 72

II.2.3. TESTĂRI BIOLOGICE ..... 77

II.2.4. CONCLUZII ..... 82

II.2.5. PARTE EXPERIMENTALĂ ..... 83

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE ..... 86

**CAPITOLUL III. STUDII *IN VITRO* ALE VECTORILOR NON-VIRALI UTILIZAȚI ÎN TERAPIA GENICĂ ..... 89**

III.1. INTRODUCERE ..... 89

III.2. OBȚINERE, CARACTERIZARE FIZICO-CHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ ALE VECTORILOR NON-VIRALI PE BAZĂ DE TRIALDEHIDĂ, SCUALENĂ PEG-ILATĂ, PEG ȘI PEI 2 KDA ÎN PREZENȚA SAU ABSENȚA SPERMINEI ..... 91

III.3. CONCLUZII ..... 101

III.4. PARTE EXPERIMENTALĂ ..... 102

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE ..... 105

**CAPITOLUL IV. COMPLECȘI DE INCLUZIUNE PE BAZĂ DE CICLODEXTRINĂ ..... 109**

IV.1. INTRODUCERE ..... 109

IV.2. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA COMPLECȘILOR DE INCLUZIUNE A SĂRII INDOLIZINIL-PIRIDINIU:B-CD ..... 110

IV.3. TESTĂRI BIOLOGICE ..... 117

IV.4. CONCLUZII ..... 123

IV.5. PARTE EXPERIMENTALĂ ..... 123

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE ..... 125

**CAPITOLUL V. CONCLUZII GENERALE.....128**

**BIBLIOGRAFIE .....135**

# Listă de abrevieri

AD - adamantin
AFM - microscopie de forță atomică
BDBA - acid benzen-1,4-diboronic
b-PEI – polietilenimină ramificată
CD - Ciclodextrină
CDC - chimia dinamică constituțională
DC - dicroism circular
DFC - dinamer
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO - dimetilsulfoxid
dsADN – ADN dublu catenar
DSC - Calorimetrie prin scanare diferenţială
DSPEG - polietilenglicol ditiolat
D-SPM - dextran-spermină
Eb - energie de legare
echiv. - echivalent
EDTA - acid etilendiaminotetraacetic
EPR – permeabilitate și retenție îmbunătățită
ESI-MS - spectrometrie de masă cu ionizare de tip electrospray
FBS - ser bovin fetal
G - guanozină
G' - modulul de elasticitate/înmagazinare
G" - modul de pierdere/vâscozitate
G* - modulul complex
G4 - cvartet de guanozină
GAG - glicozaminoglicani
GB - guanozină-borat
GFP - proteină fluorescentă verde
GR - testul de excludere a coloranților Gel Red
Gu - guanidinium
HeLa – linie celulară canceroasă de col uterin
IR - spectroscopie în infraroșu
Kd - constantă de disociere
Kr - constanta ratei de recombinare
Ks - constanta de stabilitate (sau echilibru)
LCST - temperatura critică inferioară de solubilizare 2 EI – polietilenimină liniară
LVR - regim viscoelastic liniar
M - masă moleculară
MCF-7 – linie celulară tumorală mamară
MEM – mediu minim esențial
MOFs - arhitecturi metalo-organice
MTT / MTS - metoda reducerii sării de tetrazoliu din MTT: bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu sau din MTS: 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu
N/P – raport azot/fosfor
NHDF – linie celulară de fibroblaști dermici umani
NLS – segment de localizare nucleară
NPC - complex de pori nucleari
PAMAM - poliamidoamină
PBS – soluție tampon fosfat salin
pDMAEMA - poli(2-dimetilaminoetilmetacrilat)
PEG - polietilenglicol
PEG(NH2)2 - bis (3-aminopropil) poli (etilen glicol) cu masa moleculară de 1500 Da
PEI - polietilenimină

PEI 2000 - polietilenimină ramificată cu masa moleculară de 2 kDa
PEI-g-PEG PEI grefat cu PEG
pHPMA - poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamidă)
PLL - poli(L-lizină)
PPE - polifosfoester
PPI - polipropilenimină
PSA - antigenul specific prostatic
PVP - poli(N-vinilpirolidonă)
PXRD - Difracția cu raze X în pulbere
RLU - unități de lumină relativă
RMN - spectroscopie rezonanță magnetică nucleară
ROS - specii reactive de oxigen
S.D. - deviație standard
SEM - microscopie electronică de baleiaj
siRNA - ARN interferent
SQ - scualenă
SQPEGNH2 - derivatul de scualenă PEG-ilat cu o grupare aminică terminală 3 SWNT - nanotuburi de carbon cu un singur perete
T - trialdehidă
TA - 1,3,5-benzentrialdehidă
TAE - soluție tampon tris-acetat EDTA
TEM - microscopie electronică de transmisie
TETA - trietilentetraamină
Tgel - temperatura de gelifiere
UV-VIS - spectroscopia în domeniul ultraviolet și vizibil
α-CD, β-CD, γ-CD - α-, β-, γ-ciclodextrină

# INTRODUCERE

Odată cu decernarea Premiului Nobel în domeniul chimiei supramoleculară grupului francez format din cercetătorii Donald Cram, Jean Marie Lehn și Charles Pedersen în anul 1987, a existat o continuă preocupare pentru inovarea domeniului. Asistăm astfel la dezvoltarea unui nou domeniu al chimiei prin tranziția de la moleculă la supramoleculă, prin utilizarea moleculelor în formarea unui ansamblu supramolecular cu proprietăți total diferite de proprietățile moleculelor inițiale. Chimia supramoleculară, sau "chimia dincolo de moleculă" are drept scop proiectarea și implementarea unor sisteme chimice funcționale create prin intermediul interacțiunilor intermoleculare sau prin formarea legăturilor covalente dinamice[1]. Dezvoltarea domeniului a stat la baza evoluției a numeroase domenii aflate la interfața cu biologia și fizica, permitându-se, în același timp, definirea sau perfecționarea terminologiei, cât și dezvoltarea de tehnologii specifice, devenind un domeniu vast, multidisciplinar și interdisciplinar[2].

Chimia supramoleculară prezintă o caracteristică esențială reprezentată de capacitatea de a genera o multitudine de combinații prin procesul de schimb și selecție a componentelor moleculare cu scopul de a forma entități cu caracteristici optime din punct de vedere termodinamic și cinetic. În acest context, s-a impus schimbarea paradigmei, trecându-se de la "chimia constitutională statică" (chimia covalentă) la "chimia dinamică constituțională " (CDC), înglobând astfel atât chimia covalentă dinamică (ce implică legături covalente dinamice) cât și chimia non-covalentă (bazată pe interacțiunile intermoleculare de natură fizică). Îmbinarea caracterului dinamic în chimia moleculară a dat naștere la dezvoltarea unui domeniu independent în care entitatea moleculară conține legături covalente care se pot forma și rupe în mod reversibil, pentru a permite o modificare continuă a constituției prin reorganizarea și interschimbarea componentelor[3].

Contribuțiile semnificative aduse în domeniul auto-asamblării au facilitat înțelegerea principiilor din spatele interacțiunilor intermoleculare și, prin urmare, au condus la dezvoltarea de noi materiale funcționale.

În acest context, în cadrul prezentei teze de doctorat intitulată **“Sisteme complexe supramoleculare pentru aplicații biomedicale”** s-a urmărit obținerea unor sisteme supramoleculare noi utilizate pentru regenerarea tisulară (hidrogeluri supramoleculare), pentru livrarea de gene terapeutice în celule canceroase (vectori non-virali) și pentru marcarea fluorescentă a celulelor sau pentru etichetarea specifică a unor componente celulare (complecși de incluziune ai β-CD).

**Prima parte** a tezei de doctorat (Capitolul I) reprezintă un studiu de literatură axat în principal pe obținerea, caracterizarea și aplicațiile hidrogelurilor supramoleculare (subcapitolul I.2.1.), a vectorilor non-virali (subcapitolul I.2.2.) și a complecșilor de incluziune pe bază de ciclodextrine (subcapitolul I.3.1.).

**Partea a doua** a tezei de doctorat (Capitolele II-IV ) conține contribuțiile personale aduse în obținerea, caracterizarea fizico-chimică și biologică a unor construcții supramoleculare cu diferite arhitecturi destinate diferitelor aplicații: **(a)** hidrogeluri pe bază de acid benzen-1,4-diboronic și guanozină (responsabilă pentru formarea G-cvartetului, asigurând formarea structurilor 3D), candidați pentru creșterea celulelor (Capitolul II); **(b)** vectori non-virali pe bază de trialdehidă și polietilenimină ramificată, capabili să transfecteze celule canceroase (Capitolul III); **(c)** complecși de incluziune ai β-ciclodextrinei (β-CD) cu indolizinil-piridiniu ca agent fluorescent de marcare al celulelor sau pentru etichetarea specifică a unor componente celulare (Capitolul IV). Fiecare capitol debutează cu o scurtă introducere urmată de metodele de obținere utilizate, caracterizarea fizico-chimică și biologică a sistemelor proiectate. Fiecare capitol se încheie cu partea experimentală urmată de secțiunea de bibliografie corespunzătoare fiecărui capitol.

**Capitolul II** cuprinde studiul unor hidrogeluri supramoleculare cu arhitectură tridimensională (3D) asigurată de prezența cvartetului de guanozină5. Au fost obținute hidrogeluri dinamice pe bază de acid benzen-1,4-diboronic (BDBA) și guanozină în prezență de KOH, când se formează structurile 2D, etapă urmată de adăugarea în sistem a cationilor bivalenți (cu rol de a stabiliza cvartetul de guanozină) rezultând structurile 3D. Sistemele au fost caracterizate prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN) și dicroism circular, precum și prin difracție cu raze X în pulbere (PXRD). În urma acestor investigații s-a confirmat că structura hidrogelului este guvernată atât de natura cationului bivalent utilizat, responsabil pentru stabilizarea internă a cvartetului de guanozină, cât și de reticularea externă a grupărilor boronat. Particularitățile morfologice au fost evidențiate prin microscopie de forță atomică (AFM) și microscopie electronică de baleiaj (SEM).

Într-un studiu similar, am investigat posibilitatea de introducere a nanotuburilor de carbon cu un singur perete (SWNT) în matricea hidrogelurilor pe bază de guanozină și acid benzen-1,4-diboronic. Am explorat efectul nanotuburilor de carbon asupra proprietăților generale ale hidrogelurilor obținute, incluzând capacitatea de reținere a apei și citotoxicitatea în comparație cu hidrogelul original. De asemenea, studiile de reologie au confirmat comportamentul de gel la scară macroscopică și au furnizat informații asupra proprietăților mecanice.

**Capitolul III** prezintă sinteza și caracterizarea unor sisteme dinamice de transfecție bazate pe trialdehidă (T) și polietilenimină ramificată (PEI)7. În formarea acestor sisteme, trialdehida are rol de centru trifuncțional, iar grupările aldehidice (CHO) sunt capabile de legarea covalentă dinamică a grupărilor aminice din PEI, rezultând grupări reversibile de tip imină (N=C). Având la bază aceste două componente esențiale (T, PEI) și aplicând strategia chimiei dinamice constituţionale, în funcție de condițiile existente în sistemul de reacție (ex. raportul molar CHO/NH2, masa moleculară a PEI, prezența sau absența altor parteneri în sistem, etc.) se pot genera spontan diferite arhitecturi prin autoasamblare, conducând la obținerea unor biblioteci de compuși, capabili să complexeze ADN-ul

plasmidic (pCS2 + MT-Luc), prezentând o bună abilitate în transfecție pe celule HeLa. Mai mult, prin amestecarea diferitelor structuri, componente ale bibliotecilor, s-au obținut structuri complexe ca vectori reorganizați necitotoxici capabili să împacheteze ADN-ului plasmidic (pCS2 + MT-Luc) cu bună capacitate de transfecție pe celule HeLa. Acest studiu a avut în vedere evidențierea efectului înlocuirii polimerului cationic PEI cu spermină și a polietilenglicolului (PEG) asupra abilității în transfecția ADN-ului plasmidic. În ambele studii s-au urmărit evidențierea aspectelor morfologice ale vectorilor, precum și eficiența transfecției și citotoxicitatea acestora.

**Capitolul IV** descrie prepararea și caracterizarea unui complex de incluziune gazdă-oaspete format între compusul fluorescent bromură de indolizinil-piridiniu și β-ciclodextrină8. Complexul de incluziune format a fost investigat prin spectrometrie de masă cu ionizare de tip electrospray (ESI-MS), microscopie electronică de transmisie (TEM), iar reprezentarea grafică a curbei Job a fost realizată cu ajutorul datelor de fluorescență. Structura complexului de incluziune a fost confirmată prin studii de modelare moleculară. Studiile demonstrează formarea speciilor gazdă-oaspete în rapoartele molare de 1 : 1 și 2 : 1. Compușii de incluziune obținuți sunt fluorescenți, cu solubilitate mare în apă și sunt necitotoxici și sensibili la pH motiv pentru care au fost propuși ca agenți fluorescenți pentru marcarea organelelor acide din celule, ca metodă alternativă de înlocuire a compușilor comerciali ce prezintă citotoxicitate crescută și solubilitate scăzută în soluții apoase utilizați pentru marcarea celulelor sau pentru etichetarea specifică a unor componente celulare.

Teza se încheie cu o serie de concluzii generale desprinse în urma studiilor prezentate și în final o listă de activități de diseminare a rezultatelor obținute pe parcursul studiilor de doctorat. Diseminarea rezultatelor obținute a fost realizată în 3 publicaţii în jurnale recunoscute ISI, și au fost prezentate la 8 manifestari naționale și internaționale. Teza de doctorat conține 147 de pagini, 4 tabele, 4 scheme, 51 de figuri și 336 referințe bibliografice.

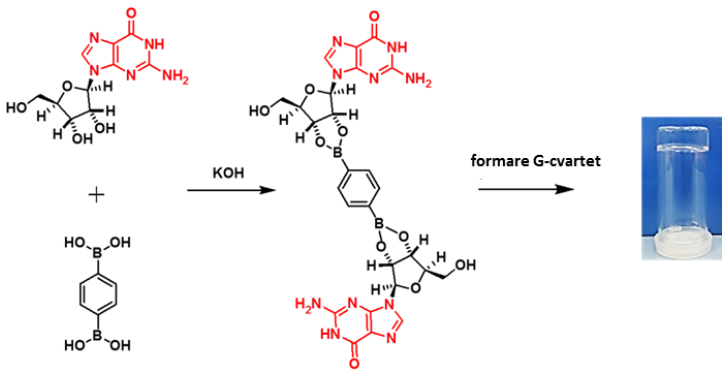
# CONTRIBUȚII PERSONALE

## Capitolul II. Hidrogeluri supramoleculare obținute prin autoasamblarea guanozinei

Capitolul II a avut drept obiectiv **s**inteza și caracterizarea hidrogelurilor pe bază de guanozină, acid benzen-1,4-diboronic reticulate prin intermediul cationilor mono-, divalenți în vederea obținerii de suporturi pentru cresteri celulare. Studiul influenței nanotuburilor de carbon în consolidarea hidrogelurilor pe bază de cvarteți de guanozină.

## II.1. Influența ionilor metalici în obținerea hidrogelurilor pe bază de cvarteți de guanozină

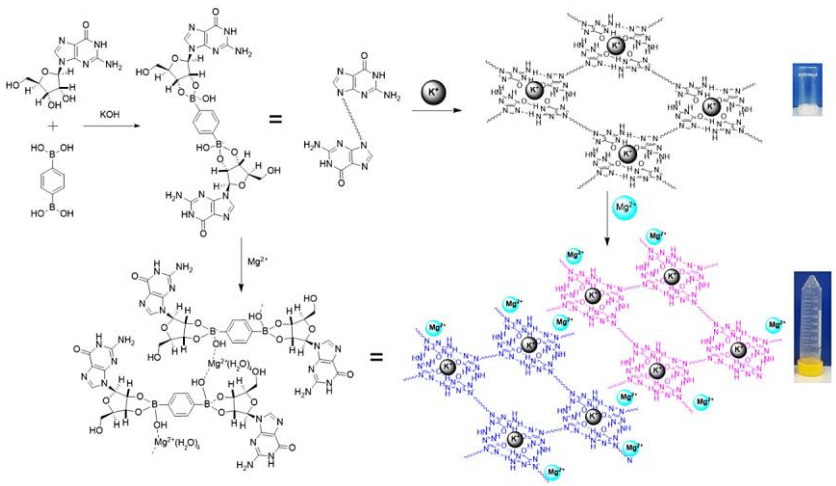
Au fost preparate hidrogeluri transparente obținute prin reacția dintre G, BDBA[16,17] și KOH în raport de 1/0,5/1 echivalenți (echiv.). După răcirea la temperatura camerei s-a observat formarea unui gel transparent (G-BDBA-K) care și-a susținut propria greutate la inversarea flaconului (Schema II.1.2.1.).




**Schema II.1.2.1.** Reacția de formare a hidrogelurilor pe bază de guanozină și acid benzen-1,4-diboronic în prezență de KOH[4].

Acest hidrogel G-BDBA-K a arătat o capacitate relativ mică de reținere a apei, fiind stabil până la adăgarea a 3 mL de apă distilată, colapsând când cantitatea de apă adăgată a fost de 4 mL. Prin schimbarea cationului de $K^+$ (cation de stabilizare) cu $Ba^{2+}$ (prin adăugarea unei cantități echivalente de $Ba(OH)_2$ în loc de KOH), s-a observat formarea unui hidrogel transparent G-BDBA-Ba cu o capacitate de retenție a apei de 10 mL. La cantități mai mici de 10 mL de apă, se obține un hidrogel stabil dar opalescent.

Hidrogelul BDBA-K poate fi modificat prin legarea selectivă a planurilor de G4 (preformate cu ajutorul ionilor de $K^+$) cu cationi de $Mg^{2+}$ (Schema II.1.2.2). Adăugarea ionilor de $Mg^{2+}$, ca reticulator extern, a oferit hidrogelurilor BDBA-Mg o proprietate impresionantă de reținere a apei (Figura II.1.2.2. dreapta**)**, recomandând aceste geluri ca materiale biocompatibile optime pentru creșterea celulară și ingineria tisulară. Cationii bivalenți de $Mg^{2+}$ nu sunt capabili să stabilizeze G4 din cauza dimensiunii, dar vor interacționa cu grupările hidroxilice de la gruparile boronice libere (nereacționate în prima etapă cu $K^+$).




**Schema II.1.2.2.** Schemă de reacție pentru obținerea hidrogelurilor G-BDBA-K stabilizate cu ioni de $K^+$ și a hidrogelurilor G-BDBA-K-Mg stabilizate cu ioni de $K^+$ (stabilizare internă a G4) și ioni de $Mg^{2+}$ (stabilizare externă)[4].

Datele obţinute prin difracția cu raze X în pulbere (PXRD) și spectroscopia de dicroism circular (DC) confirmă obţinerea structurilor G4.

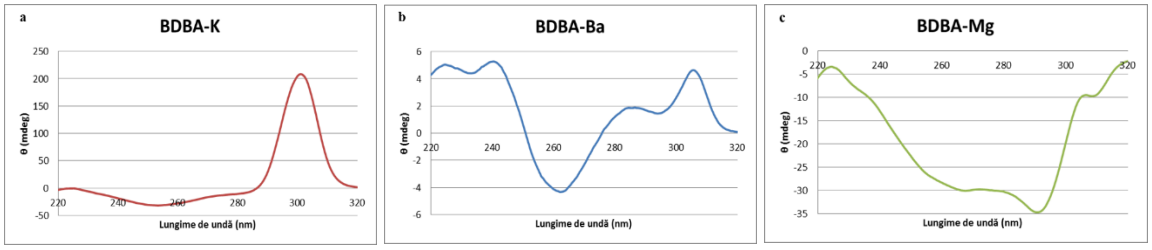



**Figura II.1.2.7.** (a,b,c) Spectre de dicroism circular pentru hidrogelurile BDBA-K, BDBA-Ba și BDBA-Mg[4].

Studiile reologice efectuate pe hidrogelurile G-BDBA-K, G-BDBA-Ba și G-BDBA-K-Mg au arătat că prezintă o reologie solidă, fiind mai puternice în ordinea: G-BDBA-Ba (G' ~ 1970 Pa) > G-BDBA-K (G' ~ 475 Pa) > G-BDBA-K-Mg (G' ~ 10 Pa).

Rezultatele AFM, susținute de datele spectroscopiei CD și de datele de reologie, sugerează că $Mg^{2+}$ servește drept element de legătură între cvartetele de guanozină. Studiile morfologice AFM evidențiază diferitele comportamente ale ionilor metalici cu matricea organică, prezentând diferențe nu numai între cationii mono și divalenți, ci și între cationii divalenți de $Ba^{2+}$ și $Mg^{2+}$.

Testele de viabilitate a celulelor, realizate pe linia celulară NHDF, au arătat că hidrogelurile G-BDBA-K, G-BDBA-Ba, și G-BDBA-K-Mg au susținut creșterea celulelor pe suprafața lor. Testele au demonstrat o viabilitate excelentă a celulelor cultivate pe aceste hidrogeluri după un interval de 24 de ore (Figura II.1.3.3.) de până la 73% (42% pentru G-BDBA-K, 47% pentru G-BDBA-Ba și 73% pentru hidrogelul G-BDBA-K-Mg).

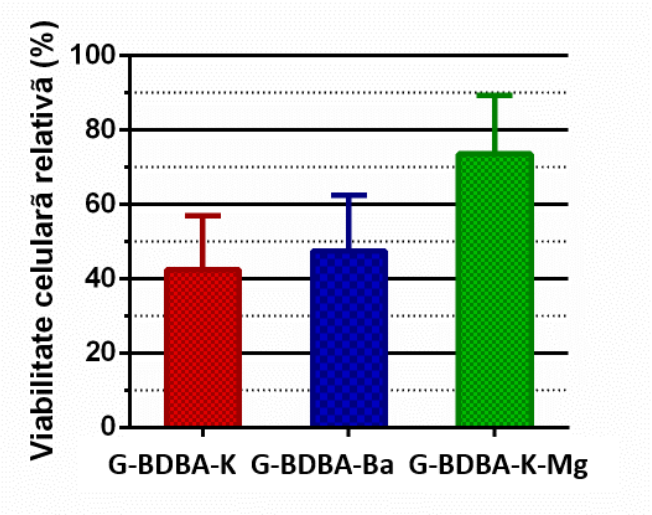



**Figura II.1.3.3.** Viabilitatea celulară obținută prin test MTS pentru hidrogelurile G-BDBA-K, G-BDBA-Ba și G-BDBA-K-Mg[4].

Aceaste rezultate recomandă hidrogelul G-BDBA-K-Mg ca fiind cel mai bun candidat pentru utilizarea ca suport pentru creșterea celulelor. În cazul hidrogelului G-BDBA-K este necesară o ajustare a pH-ului cu soluție tampon (TAE), în timp ce hidrogelurile G-BDBA-Ba și G-BDBA-K-Mg pot fi utilizate ca suport pentru creșterea celulară imediat după preparare.

## II.2. Influența nanotuburilor de carbon în consolidarea hidrogelurilor pe bază de cvarteți de guanozină

Au fost dezvoltate cu succes hidrogeluri compozite supramoleculare G-BDBA-K-SWNT cu diferite concentrații de SWNT. Hidrogelul G-BDBA-K a fost obținut folosind condițiile raportate anterior[4] iar cantitatea necesară de SWNT a fost introdusă prin adăugarea de cantități corespunzătoare de soluție stoc SWNT-Li (echivalentă cu introducerea a 0,1 mg, 0,3 mg, 0,5 mg, 0,7 mg și 1 mg de SWNT pulbere/ 2 mL G-BDBA-K), notate cu G-BDBA-K-SWNT.

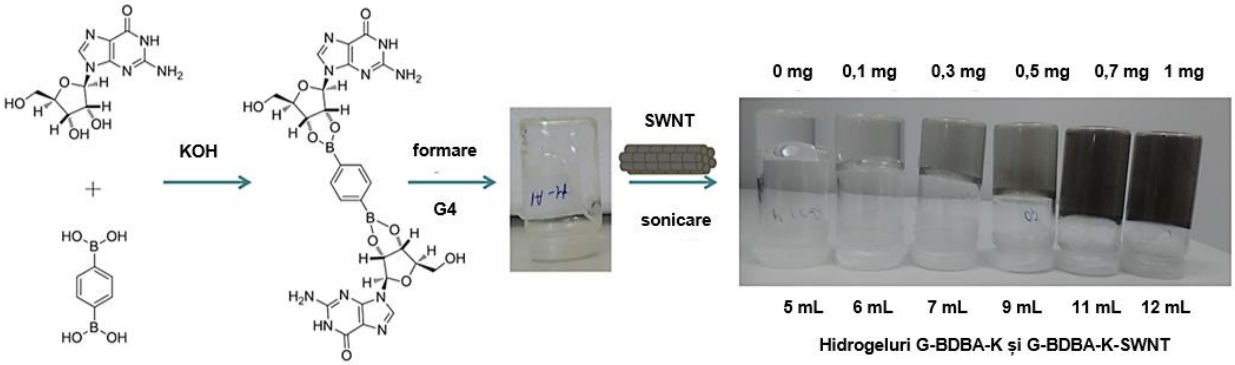



**Figura II.2.2.1.** Capacitatea de reținere a apei a hidrogelurilor G-BDBA-K și G-BDBA-K-SWNT/ 2 mL G-BDBA-K.

Acestea au prezentat proprietăți mecanice și de retenție a apei superioare comparativ cu hidrogelul martor G-BDBA-K.

Implicarea SWNT-urilor în formarea ansamblurilor supramoleculare pe bază de G si BDBA și influența lor asupra interacțiunilor interne de stivuire π-π între grupurile succesive de cvartete de guanozină (G4) a fost confirmată prin studiile de difracție cu raze X în pulbere (PXRD) (Figura II.2.2.3).

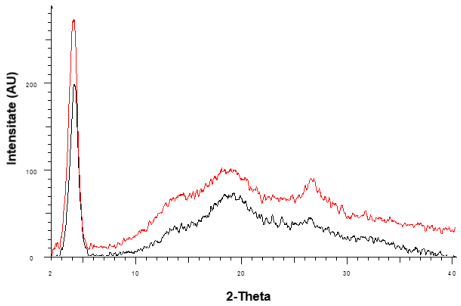


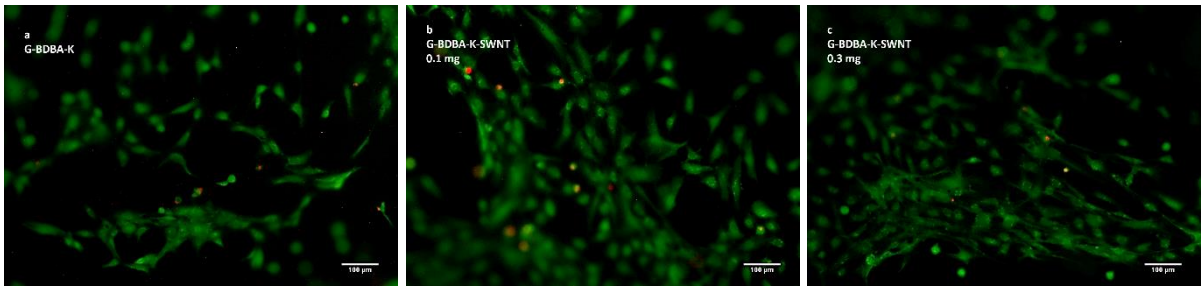

**Figura II.2.2.3.** Difractograma PXRD a hidrogelului liofilizat G-BDBA-K (negru) și a hidrogelului liofilizat G-BDBA-K-SWNT (roșu) cu conținut de 1 mg SWNT.

Încorporarea uniformă a SWNT-urilor dispersate în structura hidrogelului a fost analizată prin măsurători Raman ale hidrogelului G-BDBA-K, ca referință, și ale hidrogelurilor G-BDBA-K-SWNT cu cantități diferite de SWNT.

Datele reologice obținute demonstrează că hidrogelurile G-BDBA-K-SWNT cu conținut de SWNT mai mare de 0,9 mg prezintă proprietăți viscoelastice superioare. Introducerea SWNT-urilor în matricea G-BDBA-K joacă un rol crucial în definirea structurii și a proprietăților mecanice ale acestor hidrogeluri.

Rezultatele favorabile ale citotoxicității pentru toate nanocompozitele investigate și rezultatele caracterizării care arată o creștere a dimensiunii porilor după adăugarea SWNT-urilor în matricea G-BDBA-K, au recomandat aceste materiale ideale pentru a fi utilizate ca suporturi pentru creștere celulară.

Aderarea cu succes a celulelor NHDF la suprafețele compozitelor studiate a fost pusă în evidență prin marcare diferențiată: colorație comercială diferențială de tip viu/mort și un colorant fluorescent dezvolat în cadrul grupului de cercetare: complex de incluziune a sării de indolizinil-piridiniu/beta-ciclodextrină.



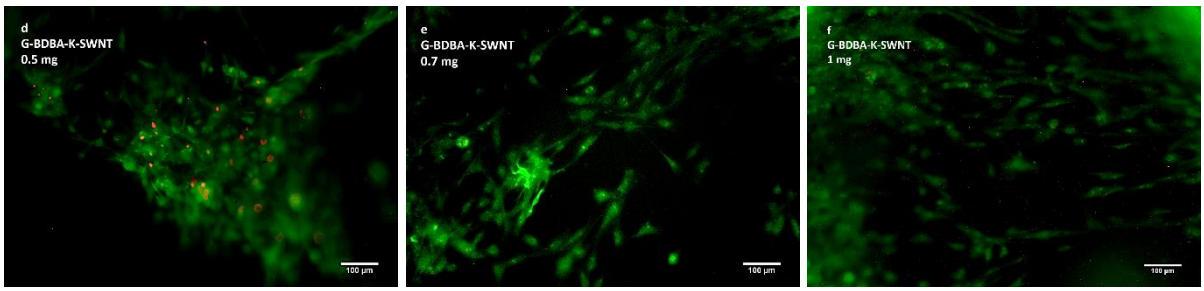



**Figura II.2.3.3.** Imaginile de microscopie de fluorescență a celulelor NHDF incubate timp de 24 de ore și colorate utilizând colorația diferențială de tip viu/mort pe hidrogelurile (a) G-BDBA-K, (b-f) G-BDBA-K-SWNT la diferite cantități de SWNT aflate la capacitatea maximă de retenție a apei.

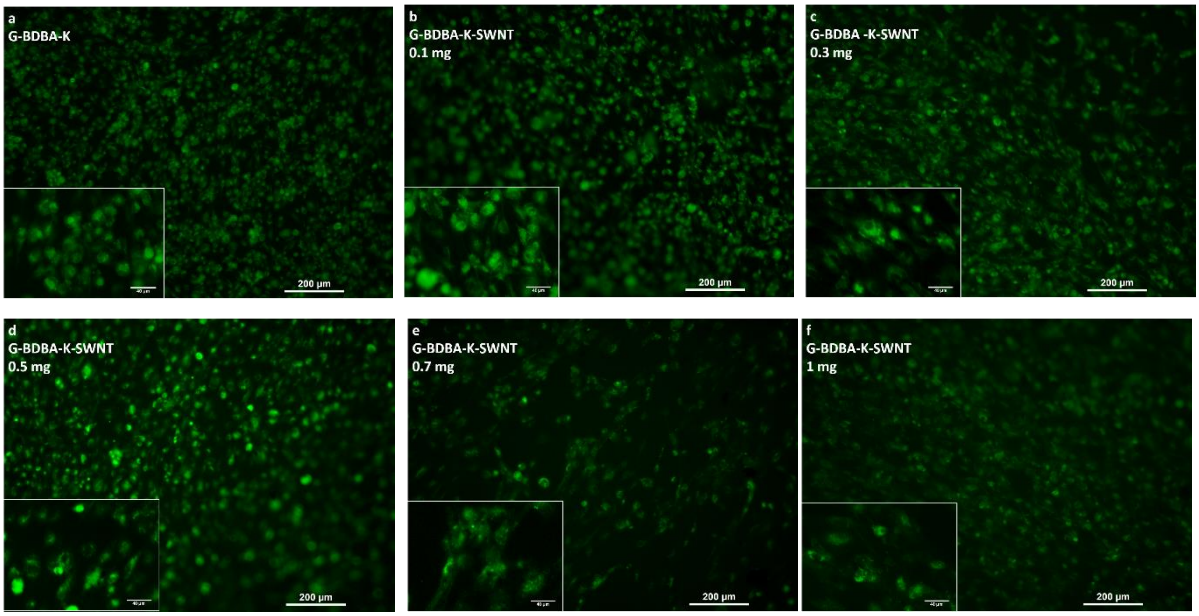



**Figura II.2.3.4.** Imagini de microscopie fluorescentă a celulelor NHDF însămânțate pe (a) BDBA și (b-f) BDBA-SWNTs după 4 ore de la incubare, colorate cu IPSCD.

Rezultatele promițătoare obținute în ceea ce privește citotoxicitatea și ale proprietăților de susținere a celulelor, împreună cu proprietățile particulare ale hidrogelurilor supramoleculare, fac din hidrogelul compozit G-BDBA-K- SWNT un material interesant pentru aplicațiile biomedicale în domeniul ingineriei tisulare.

## Capitolul III. Studii *in vitro* ale vectorilor non-virali utilizați în terapia genică

Capitolul III a avut drept obiectiv sinteza și caracterizarea unor biblioteci de compuși pe bază de 1,3,5-benztrialdehidă (TA), scualenă PEG-ilată (SQPEGNH2), bis (3-aminopropil) poli (etilen glicol) 1500 Da (PEG(NH2)2), PEI ramificat cu masă moleculară de 2 000 Da (PEI 2000) în prezența sau absența sperminei, în vederea obținerii de compuși supramoleculari cu abilități superioare în împachetarea și livrarea ADN-ului în celule HeLa.

Vectorii non-virali au fost obținuți prin strategii ale chimiei dinamice constituționale, permitând obținerea de DFC-uri adaptativi și reorganizați capabili să împacheteze ADN-ul, iar poliplecșii rezultați să producă transfecția celulelor HeLa.

Constituirea **bibliotecilor de vectori non-virali** s-a bazat pe următoarele componente reactive: (i) 1,3,5-benztrialdehidă (TA), centru/nucleu trifuncțional capabil de legarea covalentă reversibilă de tip amino-carbonil / imină a unor componente aflate în sistemul de reacție; (ii) derivatul de scualenă PEG-ilat cu o grupare aminică terminală ($SQPEGNH_2$)[5], responsabil pentru auto-asamblare în structuri hidrofob-hidrofile în medii apoase; (iii) bis (3-aminopropil) poli (etilen glicol) 1500 Da ($PEG(NH_2)_2$), responsabil pentru creșterea biocompatibilității și stabilității în mediile fiziologice[6-8]; (iv) poli(etilen imină) ramificată cu masa moleculară de 2 kDa (PEI 2000), polimer cationic responsabil să complexeze ADN-ul[9-11]; (v) spermina, cu rol în fiziologia celulară, exprimarea genelor, sintezei acidului nucleic și a proteinelor, reglarea canalelor ionice și asigurarea protecției împotriva daunelor oxidative[12,13] (Tabelul III.2.1.).

**Tabel III.2.1.** Compoziția chimică a DFC-urilor sintetizate[14].

| **Compus** | $SQPEGNH_2$ | TA | $PEG(NH_2)_2$ | Spermină | PEI 2000 |
|---|---|---|---|---|---|
| **S1** | 0.25 | 1 | 1.375 | 0.75 | - |
| **S2** | 0.5 | 1 | 1.25 | 0.5 | - |
| **S3** | 1 | 1 | - | 1 | - |
| **S4** | 1 | 1 | - | 0.5 | - |
| **P1** | 1 | 1 | - | - | 3 |
| **PS1 (P1+S1) (1:1)** | 0.6 | 1 | 0.7 | 0.375 | 1.5 |
| **PS2 (P1+S2) (1:1)** | 0.75 | 1 | 0.6 | 0.25 | 1.5 |
| **PS3 (P1+S3) (1:1)** | 1 | 1 | - | 0.5 | 1.5 |
| **PS4 (P1+S4) (1:1)** | 1 | 1 | - | 0.25 | 1.5 |

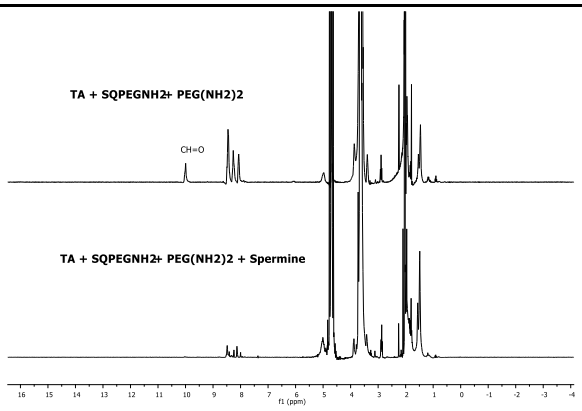



**Figura III.2.1.** Spectrele $^1$H-NMR în $D_2O$ pentru Monitorizarea formării compusului S2 prin $^1$H NMR în $D_2O$[14].

Când au fost amestecate diferite DFC-uri din seria S1÷S4 şi P1 au rezultat structuri compoziţionale şi morfologice diferite datorită efectelor de reasociere şi rearanjare a componentelor.

S-a demonstrat că prezenţa scualenei afectează auto-asamblarea acestora, dovedită prin analiza TEM.

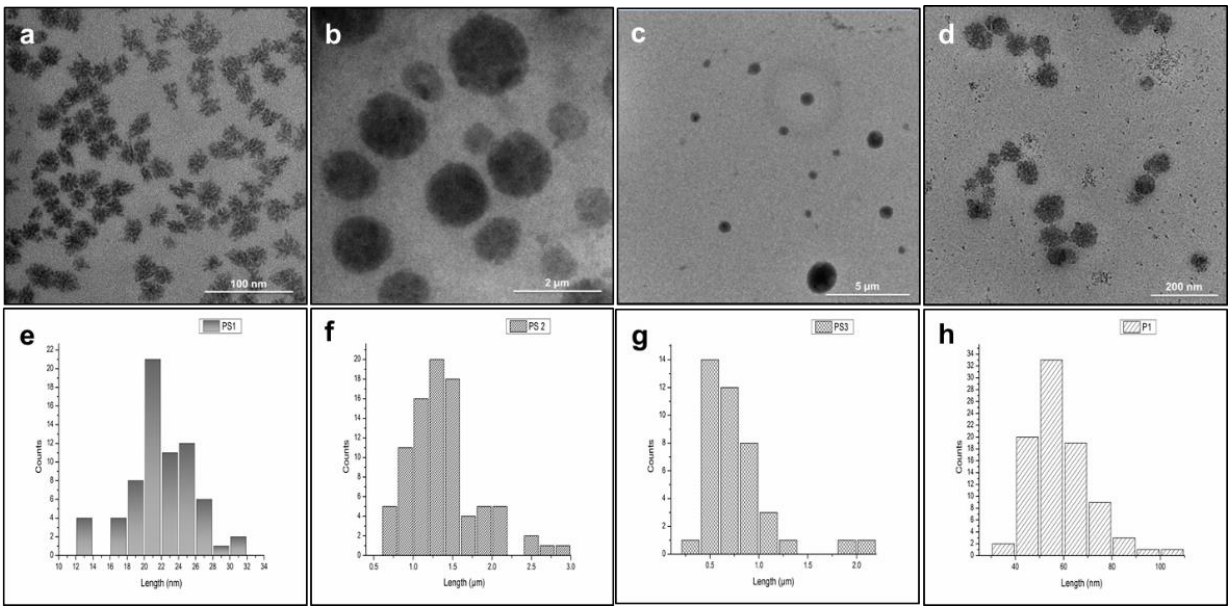



**Figura III.2.2**. Imagini TEM a compuşilor: a) **PS1**; b) **PS2**; c) **PS3**; d) **P1** şi distribuţia particulelor în funcţie de dimensiunea lor (e-h).[14]

Interacţiunea compuşilor cu ADN-ul a fost evidenţiată prin electroforeză pe gel de aragoză, arătând astfel că deşi spermina din structura DCF-urilor prezintă o capacitate foarte mică de legare a ADN-ului, prezenţa sa în seria hibridă de compuşi PS pare să nu perturbe capacitatea lor de legare.

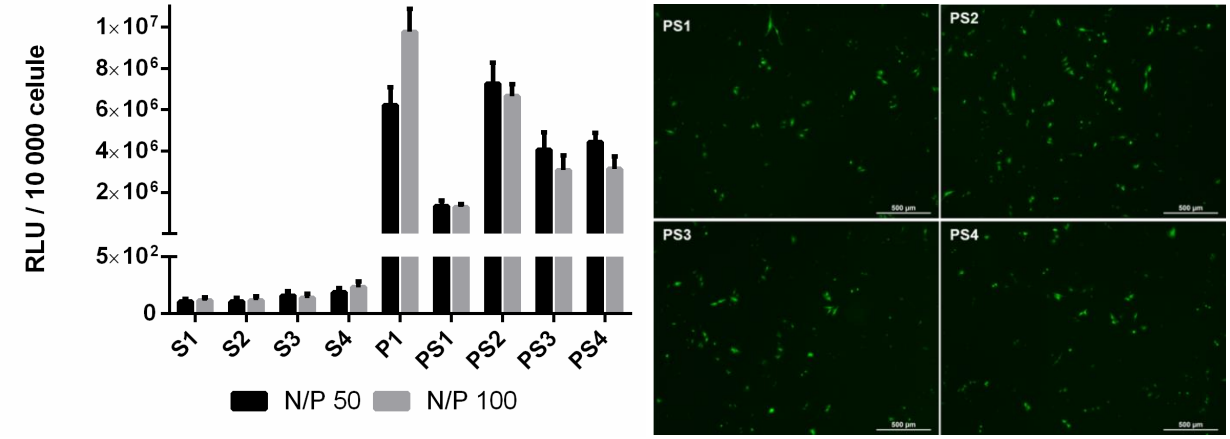



**Figura III.2.4.** Datele privind experimentele de transfectie pe celule HeLa ale compusilor S1-S4, P1 si PS1-PS4: a) Eficienţa în transfecţie determinată prin testul bazat pe luciferază la rapoarte N/P de 50 şi 100; b) Imagini obţinute prin microscopia de fluorescenţă ilustrând expresia GFP-ului utilizând pCS2+NLS-eGFP la raportul N/P de 50.[14]

Studiile *in vitro* pe celule HeLa au oferit informaţii esenţiale asupra viabilităţii şi eficienţei de transfecţie a compuşilor din biblioteca PS. Din această bibliotecă compusul PS2 este recomandat ca fiind

agentul de transfecție optim al ADN-ului, ceea ce a oferit o perspectivă asupra importanței prezenței PEG-ului și PEI-ului în compoziția DCF-urilor.

Pentru a înțelege influența raportului de PEI în compoziția DCF-urilor asupra unor factori cruciali precum proprietatea de auto-asamblare, capacitatea de legare a ADN-ul, citotoxicitatea și eficiența în transfecție, s-a dezvoltat biblioteca F1÷F7 constituită din TA, SQPEGNH2, PEG(NH2)2 și PEI 2000, cu raportul molar dintre TA și SQPEGNH2 de 1:1 și cu conținut variabil de PEG(NH2)2 și PEI 2000.

**Tabel III.2.2.** Compoziția chimică a DCF-urilor pe bază de TA, $SQPEGNH_2$, $PEG(NH_2)_2$ și PEI 2000[15].

| | **$SQPEGNH_2$** | **TA** | **$PEG(NH_2)_2$** | **PEI 2000** |
|---|---|---|---|---|
| **F1** | 1 | 1 | 0 | 1.5 (42%) |
| **F2** | 1 | 1 | 0 | 2 (50%) |
| **F3** | 1 | 1 | 0 | 2.5 (55%) |
| **F4** | 1 | 1 | 0 | 3 (60%) |
| **F5** | 1 | 1 | 0 | 3.5 (63%) |
| **F6** | 1 | 1 | 1 | 1.5 (33 %) |
| **F7** | 1 | 1 | 1 | 2 (40%) |

Proprietățile de împachetare ale ADN-ului au depins în mod direct de conținutul de PEI utilizat în formarea vectorilor finali. S-a observat prin intermediul analizelor de excludere a colorantului GR că la un conținut crescut de PEI și rapoarte N/P scăzute există o interacțiune mai puternică vector-ADN.

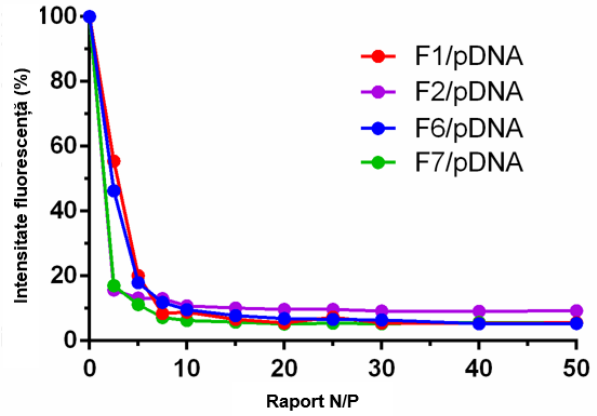



**Figura III.2.7.** Intensitatea de fluorescență a Gel Red în dependență cu raportul N/P al poliplecșilor investigați[15].

Poliplecșii F/ADN au devenit citotoxici la un raport N/P=50, atunci când PEI se găsește în concentrație de 63% în compoziția DCF-ului. Creșterea raportului N/P la 100 a dus la creșterea citotoxicității în celulele HeLa, iar prezența PEG-ului nu a condus la o îmbunătățire semnificativă a viabilității celulare.

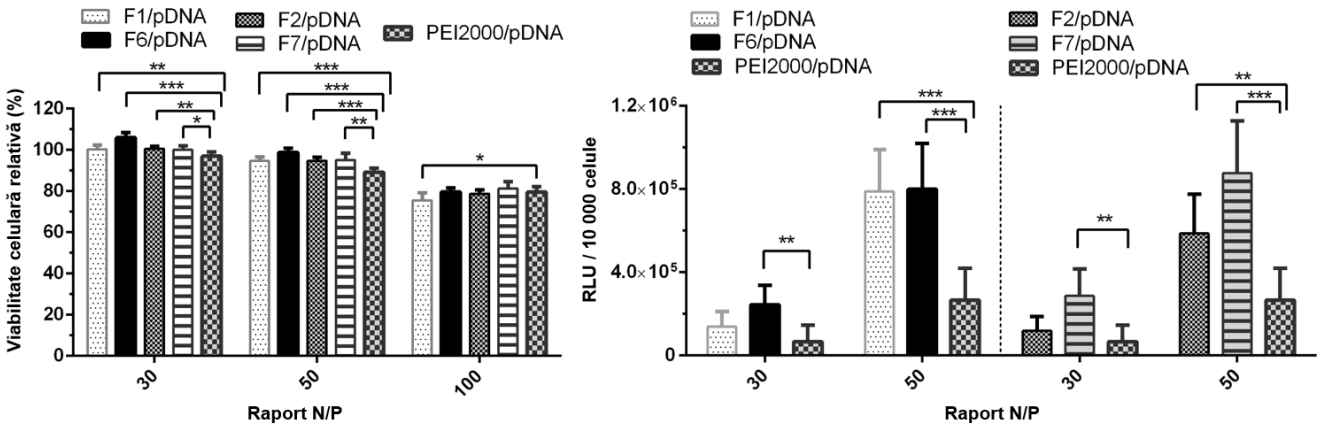


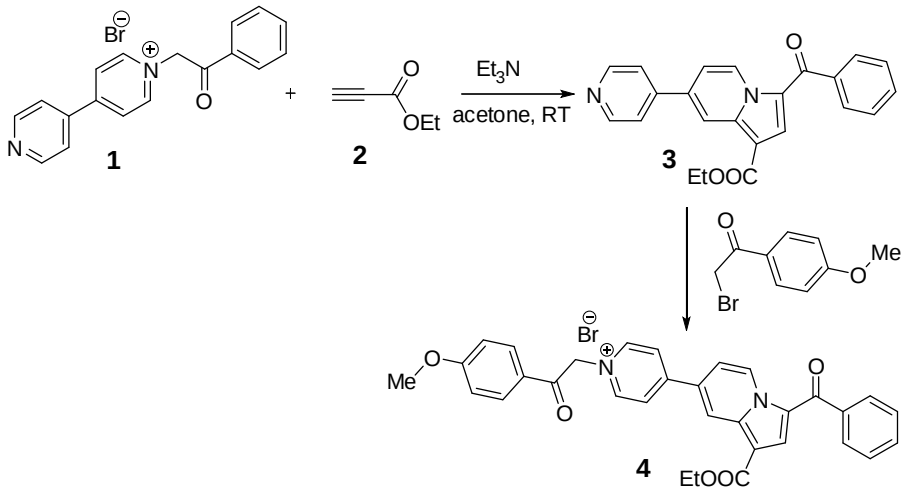

**Figura III.2.9.** Graficele viabilitatii celulare relative și eficienței de transfecție (unități de lumină relativă (RLU)/10 000 celule însămânțate) pe celule Hela tratate cu poliplecși la rapoarte N/P 30, 50 și / sau 100. Rezultatele sunt prezentate ca o valoare medie ± deviație standard (S.D.), n = 5-7. * p <0,05, ** p <0,01 și *** p <0,001 conform testului student t.[15]

În general, DCF-urile studiate au prezentat o transfecție semnificativ mai mare în comparație cu PEI 2000 utilizat ca referință la raportul N/P=50, indiferent de concentrația de PEI din compoziția DCF-urilor, în timp ce capacitatea de transfecție scade considerabil odată cu creșterea raportului N/P de la 50 la 100. Prezența PEG-ului induce o diferență subtilă, îmbunătățind capacitatea de transfecție la rapoartele N/P de 30 și 50. Rezultatele obținute sugerează că o compoziție optimă a vectorului este atunci cand PEI-ul se găsește într-o concentrație de 42% (F1), fiind vectorul cel mai eficient în transfecția ADN-ului la raportul N/P=50, în timp ce prezența PEG-ului în concentrație de 23% favorizează eficiența de transfecție a ADN-ului în celulele HeLa.

## Capitolul IV. Complecși de incluziune pe bază de ciclodextrină

**Capitolul IV** a avut drept obiectiv **s**inteza și caracterizarea unui complex de incluziune pe bază de β-ciclodextrină (β–CD) și un derivat fluorescent: bromură de indolizinil-piridiniu pentru marcarea fluorescentă a celulelor sau pentru etichetarea specifică a unor componente celulare.

Sarea fluorescentă indolizinil-piridiniu 4 (Schema IV.2.1) a fost concepută ca un potențial colorant sensibil la pH și a fost sintetizată conform unui protocol stabilit de către cercetătorii Monica Sardaru și Ramona Danac de la Universitatea „Al. I. Cuza”, Iași, care au publicat protocoalele de sinteză pentru compușii 1 și 3 (Schema IV.2.1)[16,17].




**Schema IV.2.1.** Sinteza sării de indolizinil-piridiniu 4[16,17].

Pentru a obține o mai bună solubilitate în apă a compusului 4 și pentru a îi extinde aplicațiile ca agent de colorare celulară am propus formarea unui ansamblu supramolecular de tip gazdă-oaspete pe bază de compusul 4 și β-CD.

Complexul de incluziune format a fost investigat prin experimente ESI-MS, analiză TEM, reprezentarea grafică a curbei Job cu ajutorul spectrelor de fluorescentă și prin studii de modelare moleculară, studii care demonstrează formarea speciilor oaspete-gazdă în rapoartele molare de 1:1 și 1:2.

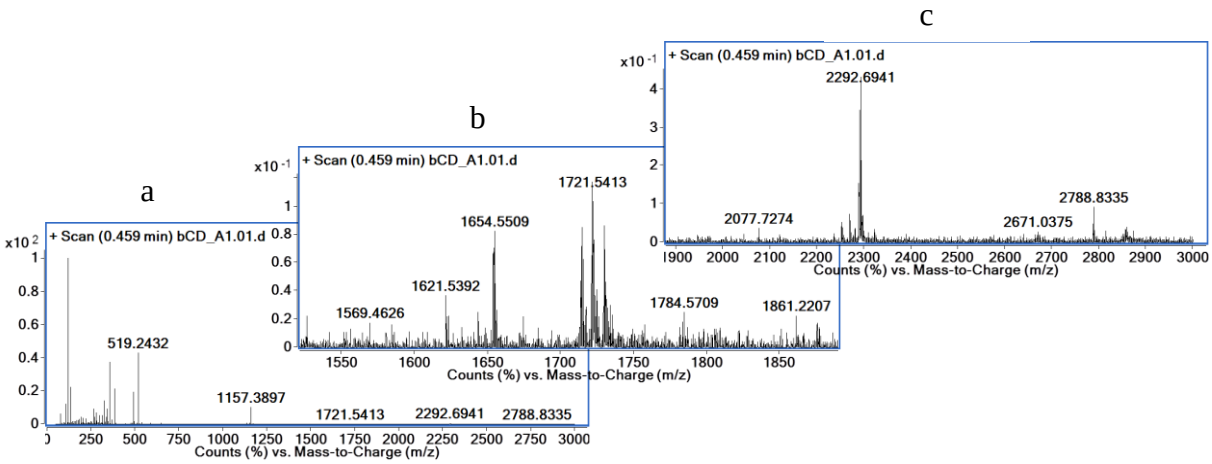



**Figura IV.2.1.** Spectrele ESI-MS ale amestecului de reacție 4:β-CD în raport molar de 1:1,5, prezentând semnalele corespunzătoare $M^+$ -Br (519,2432), CD + $Na^+$ (1157,3897), formării complexului de incluziune 4:β-CD în raport molar de 1:1 (1654 - $M^+$ -Br + CD) și de 1:2 (2788 - $M^+$ -Br + 2CD)[18].

Intensitățile maxime ale spectrelor de fluorescență corespunzătoare compușilor 4 și 4:β-CD la valorile de pH investigate sunt poziționate între 520 și 540 nm, cu o oarecare deplasare a maximului și a intensității în cazul compusului 4 odată cu scăderea pH-ului.

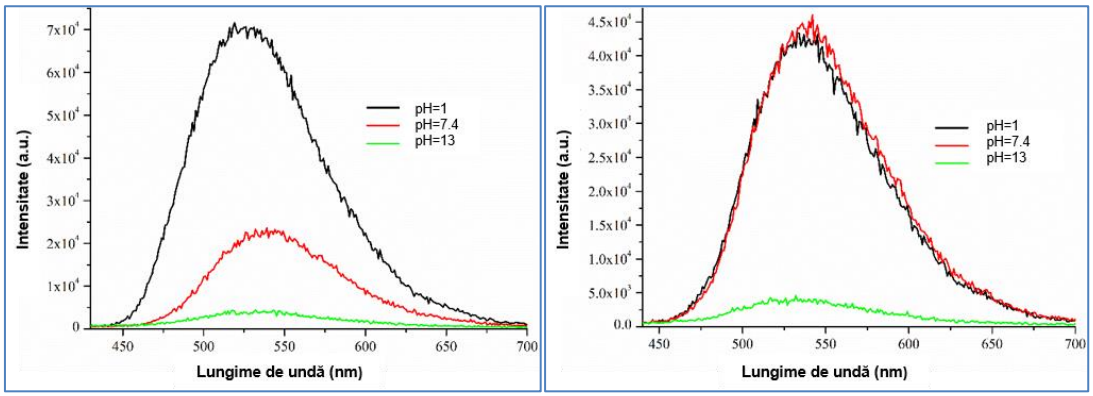



**Figura IV.2.6.** Spectrele de emisie de fluorescență ale compușilor 4 (stânga) și 4:β-CD (dreapta) la pH = 1, 7,4 și 13; λex: 415 nm[18].

Compusul 4_CD a prezentat, de asemenea, o intensitate de emisie scăzută la pH = 13, dar surprinzător, intensitatea semnalului la pH=7,4 a fost aproape egală cu intensitatea obținută pentru soluția 4:β-CD la pH=1 cu aceleași maxime la 538 nm (Figura IV.2.6. - dreapta). Am speculat astfel că aceste diferențe în intensitățile semnalelor la diferite valori ale pH-ului ar putea fi rezultatul efectului steric cauzat/apărut în compusului 4 după încapsulare în ciclodextrină.

Primul pas spre realizarea experimentelor de colorare a celulelor a fost reprezentat de verificarea citotoxicității compusului 4 și a complexul său de incluziune 4:β-CD care au fost investigate folosind două tipuri de liniile celulare: HeLa (linie de celule canceroase) și NHDF (linie de celule normale).

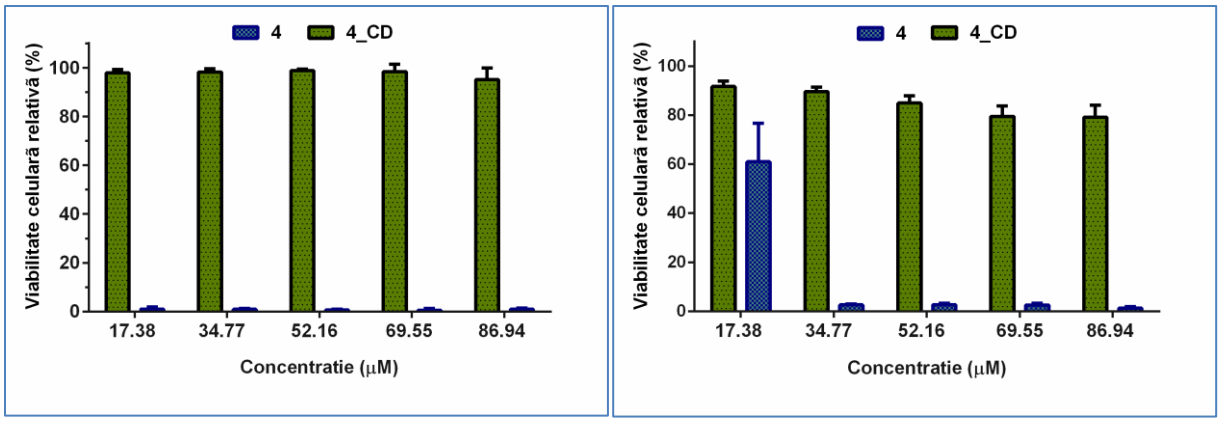



**Figura IV.3.1.** Rezultatele studiului viabilității celulare *in vitro* (testul MTS) pentru compușii 4 și 4:β-CD pe liniile celulare HeLa (stânga) și NHDF (dreapta)[18].

Rezultatele obținute au indicat în mod clar capacitatea a 4:β-CD de a pătrunde prin membranele ambelor linii celulare investigate, prezentând o distribuție similară a compusului 4:β-CD la 15 minute de la incubare la toate concentrațiile investigate, indicând în primul rând localizarea extranucleară uniformă a acestuia (Figura IV.3.2. –stânga).

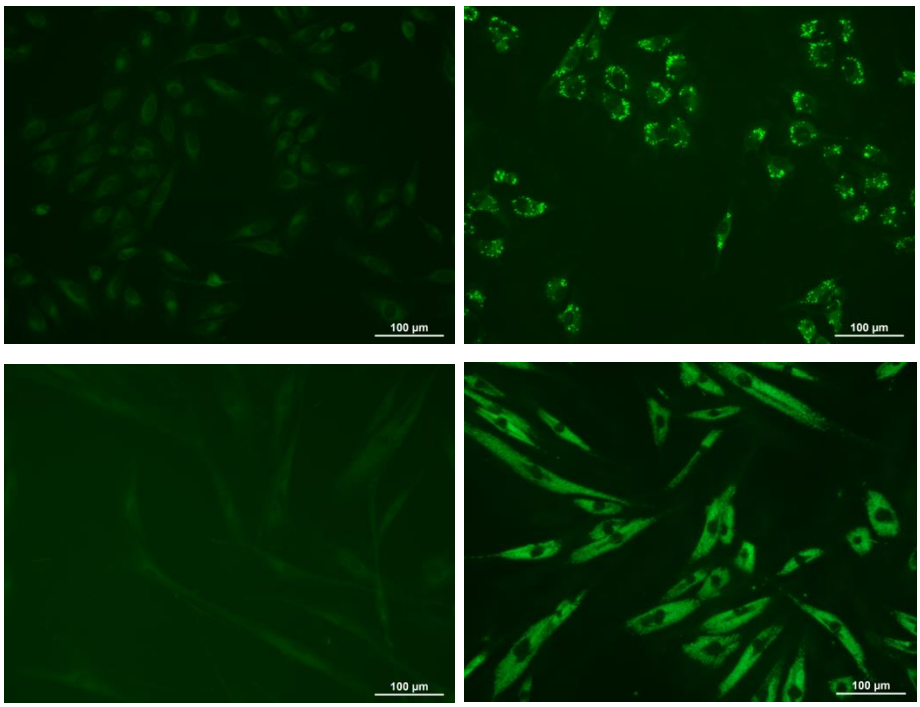



**Figura IV.3.2.** Pătrunderea compusului **4:β-CD** în liniile celulare HeLa (sus) și NHDF (în jos) după 15 minute (stânga) și 24 ore (dreapta) de incubare[18].

Acumulările mari și localizate de 4:β-CD în celulele HeLa a indicat o interacțiune specifică a colorantului cu anumite componente celulare. Luând în considerare natura compusului 4:β-CD și proprietatea sa de a poseda o intensitate fluorescentă mai mare la un pH mai mic, presupunem că acumularea colorantului are loc preferențial în organelele acide ale celulei.

Pentru a verifica această ipoteză, a fost realizată o colorație dublă cu LysoTracker Red DND-99, un agent comercial utilizat pentru a colora organelele acide celulare[19,20].

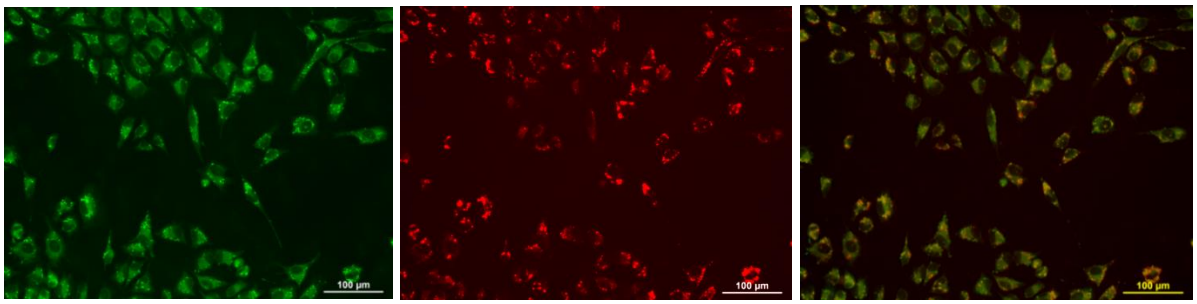



**Figura IV.3.7.** Acumularea și distribuția celulară în celulele HeLa a coloranților: stânga - 4:β-CD după 24 de ore de tratament (filtru GFP); mijloc - adăugarea ulterioară de LysoTracker DND-99 după tratamentul de 30 de minute (filtru N2.1); dreapta - imagine suprapusă a imaginilor obținute cu filtrele GFP și N2.1[18].

Rezultatele obținute au susținut teoria/ipoteza privind acumulările specifice a compusului în cadrul organelelor acide ale celulei.

# CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată **“Sisteme complexe supramoleculare pentru aplicații biomedicale”** este structurată pe două direcții ale chimiei supramoleculare: autoasamblarea și chimia gazdă-oaspete.

Astfel, prima parte a tezei (**Capitolul I**) reprezintă un studiu de literatură cu privire la aceste două direcții, focusat în principal pe sisteme de tipul hidrogelurilor supramoleculare, a vectorilor non-virali pentru terapia genică și pe complecși de incluziune ai ciclodextrinelor.

În partea a doua a tezei (**Capitolele II – IV**) sunt descrise contribuțiile personale aduse în domeniile anterior menționate. Toate capitolele cuprinse în cea de-a doua parte debutează cu o scurtă introducere, metodele de obținere și caracterizare a sistemelor propuse, testările biologice ale acestora, concluzii, date privind partea experimentală și bibliografia utilizată.

Teza se încheie cu o serie de concluzii generale (**Capitolul V**).

Din studiile întreprinse s-au deprins următoarele concluzii:

**1.** Au fost sintetizate hidrogeluri G-BDBA bazate pe guanozină și acid benzen-1,4-diboronic cu proprietăți fizice diferite datorate prezenței diferiților cationi.

 Studiile de spectroscopie RMN și dicroism circular, precum și datele de microscopie AFM au arătat că structura hidrogelului supramolecular este guvernată atât de cationii utilizați pentru stabilizarea internă a unităților de G4, cât și de reticularea externă a grupărilor boronat.

 Particularitățile compoziției fiecărui hidrogel determină cantitatea de molecule de apă pe care fiecare hidrogel poate să o încorporeze, fiind capabilă să susțină o cantitate de apă de cincisprezece ori mai mare dacă se utilizează ca reticulator ionii de Mg2+. Această proprietate interesantă face ca aceste hidrogeluri să fie candidații perfecți pentru creșterea celulară.

 Testele de viabilitate a celulelor realizate pe linia celulară NHDF au arătat că hidrogelurile au susținut creșterea celulelor pe suprafața lor. În cazul hidrogelului G-BDBA-K este necesară o ajustare a pH-ului fiziologic cu tampon TAE, în timp ce hidrogelurile G-BDBA-Ba și G-BDBA-K-Mg pot fi utilizate ca suport pentru creșterea celulară imediat după preparare.

**2.** Au fost dezvoltate hidrogeluri compozite supramoleculare G-BDBA-K-SWNT cu proprietăți mecanice și de retenție a apei superioare comparativ cu hidrogelul de pornire G-BDBA-K.

 Încorporarea cu succes a nanotuburilor de carbon cu pereți unici (SWNT) în matricea G-BDBA-K a fost investigată prin tehnici microscopie electronica de baleiaj (SEM), difracție de raze X în pulbere

(PXRD) și spectroscopie Raman, în timp ce proprietățile mecanice ale hidrogelurilor au fost investigate în detaliu și comparate prin studii reologice.

 Rezultatele favorabile ale citotoxicității pentru toate nanocompozitele investigate și rezultatele caracterizării care arată o creștere a dimensiunii porilor după adăugarea SWNT-urilor la G-BDBA-K, au făcut aceste materiale ideale pentru aplicațiile de creștere celulară.

**3.** Au fost sintetizate trei biblioteci de compuși pentru transfecția ADN-ului.

 Prima bibliotecă de compuși urmărește determinarea proporțiile optime de SQPEGNH2 din compoziția vectorului pentru a obține cea mai mare eficiență de transfecție și o viabilitate celulară cât mai bună. De asemenea s-a urmărit influența sperminei și a PEI-ului asupra capacității de împachetare și livrare a ADN-ului.

 A doua bibliotecă de compuși s-a obținut prin amestecarea în diferite proporții a compușilor din prima bibliotecă, urmărindu-se analiza capacității de asamblare și re-asamblare a componentelor constitutive aflate în diverse rapoarte molare și implicit a capacității de împachetare și livrare a ADN-ului a vectorilor rezultați.

i. Analiza TEM a demonstrat că cantitatea de scualenă prezentată în DCF-uri afectează în mod pozitiv capacitatea de autoasamblare a acestora.

ii. Studiile de retardare a mobilității electroforetice a ADN-ului în gel de agaroză au arătat că deși spermina din structura DCF-urilor prezintă o capacitate foarte mică de legare a ADN-ului, prezența sa în seria hibridă de compuși PS pare să nu perturbe capacitatea lor de legare.

iii. A fost identificat compusul PS2 ca fiind agentul de transfecție de ADN optim din biblioteca dezvoltată, ceea ce a oferit o perspectivă asupra importanței prezenței PEG-ului și PEI-ului în compoziția DCF-urilor.

iv. S-a demonstrat că reorganizarea componentelor în cadrul DCF-urilor are loc într-adevăr datorită dinamicității sistemelor obținute.

 A treia bibliotecă de compuși (F1 – F7) este constituită din TA, SQPEGNH2, PEG(NH2)2 și PEI 2000, păstrându-se constant raportul molar dintre TA și SQPEGNH2 de 1:1, variindu-se conținutul de PEG(NH2)2 și PEI 2000 în vederea determinării compoziției optime a vectorilor rezultați pentru a asigura o citoxicitate scazută, o bună abilitate in condensarea ADN-ului și o bună capacitate de transfecție.

i. Proprietățile de împachetare ale ADN-ului au depins în mod direct de conținutul de PEI utilizat în formarea vectorilor finali. S-a observat prin intermediul analizelor de excludere a colorantului GR că la un conținut crescut de PEI și rapoarte N/P scăzute există o interacțiune mai puternică vector-ADN. Poliplecșii F/ADN au devenit citotoxici la un raport N/P=50, atunci când PEI se găsește în concentrație de 63% în compoziția DCF-ului. Creșterea raportului N/P la 100 a dus la creșterea citotoxicității în celulele HeLa, iar prezența PEG-ului nu a condus la o îmbunătățire semnificativă a viabilității celulare.

ii. În general, DCF-urile studiate au prezentat transfecție semnificativ mai mare în comparație cu PEI 2000 ca referință la raportul N/P=50, indiferent de concentrația de PEI din compoziția DCF-urilor, în timp ce capacitatea de transfecție scade considerabil odată cu creșterea raportului N/P de la 50 la 100. Prezența PEG-ului induce o diferență subtilă, îmbunătățind capacitatea de transfecție la rapoartele N/P de 30 și 50. Rezultatele obținute sugerează că o compoziție optimă a vectorului este atunci când PEI-ul se gasește într-o concentrație de 42% (F1), fiind vectorul cel mai eficient în transfecția ADN-ului la raportul N/P=50, în timp ce prezența PEG-ului în concentratie de 23% favorizează eficiența de transfecție a ADN-ului în celulele HeLa.

**4.** S-a obținut un complex de incluziune gazdă-oaspete între sarea fluorescentă de indolizinil-piridiniu și β-ciclodextrină.

 Complexul de incluziune format a fost investigat prin experimente ESI-MS, analiză TEM, reprezentarea grafică a curbei Job și prin studii de modelare moleculară, studii care demonstrează formarea speciilor gazdă-oaspete în rapoartele 1:1 și 2:1.

 Un număr de caracteristici interesante ale complecșilor de incluziune a sării indolizinil-piridiniu/β-CD, precum absența citotoxicității, permeabilitatea celulară, fluorescența intracelulară de lungă durată și acumularea selectivă în organelele acide, au identificat acești compuși drept candidați remarcabili pentru marcarea intracelulară a organelelor acide (lizozomi sau mitocondrii). Spre deosebire de agentul comercial Lysotracker, în cazul compusului 4:β-CD nu am observat o scădere a semnalului fluorescent în intervalul investigat (48 de ore), acest lucru sugerând o stabilitate intracelulară excelentă a colorantului.

 Creșterea în timp a intensității fluorescenței cât și tendința de acumulare lentă a complecșilor de incluziune în organelele acide ar putea fi exploatate în elaborarea unor teste pentru investigarea și evaluarea morfologiei lizozomilor în celule. În plus, similaritatea structurală a sistemelor propuse cu cea a altor agenți de colorare raportați în literatură, agenți ce conțin un fragment de sare cuaternară

de piridiniu ar putea sugera, de asemenea, acumularea sistemelor investigate în interiorul mitocondriilor.

## DISEMINAREA REZULTATELOR

Rezultatele originale prezentate în teză au fost publicate sub formă de articole științifice în reviste internaționale și naționale cotate ISI.

**Lucrări publicate în reviste cotate ISI**

1. Novel cyclodextrin-based pH-sensitive supramolecular host-guest assembly for staining acidic cellular organelles, **G. Pricope**, M. Sardaru, E. L. Ursu, C. Cojocaru, L. Clima, N. Marangoci, R. Danac, I. Mangalagiu, M. Pinteala, A. Rotaru, *Polymer Chemistry*, 9, 968-975 (**2018**). (**ISI: 4.92)**.

2. Dynamic Self-Organizing systems for DNA delivery; **G. Pricope**, M. Pinteala, L. Clima; Rev. Roum. Chim., 63(7-8), 613-619, (**2018**) (**ISI: 0.37**).

3. G-Quartet Hydrogels for Effective Cell Growth Applications, A. Rotaru, **G. Pricope**, T. Planck, L. Clima, E. L. Ursu, M. Pinteala, J. Davis, M. Barboiu, *Chem. Commun.*, 53, 12668- 12671 (**2017**) (**ISI: 6.31**).

**Lucrări publicate în reviste cotate ISI (rezultate care nu sunt incluse în teză)**

1. Biocompatible chitosan based hydrogels with antitumor activity for local cancer therapy, A. M. Olaru, L. Tartau, S. Morariu, **G. Pricope**, M. Pinteala, L. Marin, *Carbohydrate Polymers*, 179, 59-70 (**2018**) (**ISI: 5.15**).

2. Optimization of Polyplex Formation between DNA Oligonucleotide and Poly(L-Lysine): Experimental Study and Modeling Approach, T. Vasiliu, C. Cojocaru, A. Rotaru, **G. Pricope**, M. Pinteala, L. Clima, *Int. J. Mol. Sci., 18*, 1291, (**2017**) (**ISI: 3.22**).

**3.** Polyvinyl alcohol boric acid – a promising tool for the development of sustained release drug delivery systems, D. Ailincai, **G. Gavril**, L. Marin, Materials Science & Engineering C, 110316, (**2019**) (**ISI: 4,95**).

**Capitole în cărți**

1. Polymer-based engineered systems for gene/drug delivery applications; A, Rotaru, L. Clima, R. D. Rusu, N. L. Marangoci, **G. Pricope**, B. C. Simionescu and M. Pinteala; In the book by Duca Ghe si Macaev F, Compounds and Materials for Drug Development and Biomedical Applications, Editura Academiei Romane, Muxeul Brailei « Carol I » Editura Istros, Bucuresti-Braila, 2018, 273-290.

**Lucrari trimise spre publicare**

1. Single-Walled Carbon Nanotubes – G-quadruplex Hydrogel Nanocomposite Matrixes for Cell Support Applications, E. L. Ursu, **G. Gavril**, S. Morariu, M. Pinteala, M. Barboiu, A. Rotaru, Materials Science & Engineering C.

**Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:**

- "SupraChem Lab", Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs.
- "Platforme dinamice constituţionale pentru livrare ţintită de principii active (DynaCoPlat)", PN-III-P1-1.1-TE-2016-1180.
- "Mimarea mecanismelor viului prin abordări ale chimiei supramoleculare, în cinci dimensiuni (5D-nanoP)", PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0050.
- "Platforme teranostice antitumorale pe bază de carbon dots și matrici polimerice (TERADOT)", PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083 contract nr. 37/PCCDI/2018.
- "Terapii inteligente pentru boli non-comunicabile, bazate pe eliberarea controlată de compuși farmacologici din celulele încapsulate după manipulare genetică sau bionanoparticule vectorizate (INTERA)", PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0697, contract nr. 13/PCCDI/2018.

**Mobilități în timpul tezei de doctorat**

1. La Universitatea din Reims Champagne Ardenne,Institutul de Chimie Moleculară din Reims, Franța, în cadrul Proiectului Erasmus + "Joint innovative training and teaching/learning program in enhancing development and transfer knowledge of application of ionizing radiation in materials processing".

2. La Universitatea de Tehnologe din Kaunas, Lituania, în cadrul Proiectului Erasmus + "Joint innovative training and teaching/learning program in enhancing development and transfer knowledge of application of ionizing radiation in materials processing".

**Participări la sesiuni ştiinţifice naţionale şi internaţionale**

**Comunicări orale**

1. Supramolecular host-guest assembly for fluorescence cell imaging, **G. Pricope**, L. Ursu, B. Craciun, M. Pinteala, A. Rotaru, "Cristofor I. Simionescu Symposium, Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science", Bucuresti, Romania, **2018**.

2. β-CD/indolizinyl-pyridinium salt inclusion complex as fluorescent cell staining agent, **G. Pricope (Gavril)**, M. Pinteala, 11th Edition of symposium with international participation - New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection, Institutul de chimie Timisoara al Academiei Romane, Timisoara, **2018**.

3. G-Quartet hydrogels for biomedical applications, **G. Gavril**, L. Ursu, A. Rotaru, M. Pinteala, First Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology – Balkan Fungus 2018, Timisoara, Romania, **2018**.

4. Pectin aerogels: structure-properties correlations and use for drug controlled-release, S. Groult, **G. Pricope**, D. Peptanariu, D. Ciolacu, T. Budtova; The 4th International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, Nice, France, **2018**.

5. Structural and Morphological Characterization of Cellulose-Based Hydrogels; D. Rusu, **G. Gavril**, D. Peptanariu, T. Budtova, D. Ciolacu; 4th International Conference on Chemical Engineering, Iași, Romania, 2018.

6. S. Groult, **G. Pricope**, D. Peptanariu, D. Ciolacu, T. Budtova, Bio-aerogels for controlled release, Polysaccharides as sweet spot for innovation, Leuven, Belgium, **2018**.

7. Cyclodextrin inclusion complex of indolizinyl-pyridinium salt for fluorescence cell imaging, **G. Pricope**, M. Serdaru, L. Ursu, M. Pinteala and A. Rotaru, 4th French- Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iași, Romania, **2017**.

**Prezentări de postere**

1. Cyclodextrin inclusion complex of indolizinyl-pyridinium salt as pH-sensitive fluorescent dye for cell staining, **G. Pricope**, M. Sardaru, L. Ursu, M. Pinteala, A. Rotaru, 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Poiana Brasov, Romania, **2017**.

2. Single-walled carbon nanotubes hybrid hydrogels for biomedical applications, E. L. Ursu, **G. Pricope**, A. Rotaru, 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Poiana Brasov, Romania, **2017**.

3. Supramolecular architectures for drug delivery systems, A. Arvinte, **G. Pricope**, B.F. Craciun, L. Lungoci; A bridge between EpiChemBio and MuTaLig COST Actions, COST actions joint meeting, Porto, Portugal, **2017**.

4. Sinteza şi citotoxicitatea unor noi hidrogeluri pe bază de chitosan şi 2-hidroxi-5-nitro-benzaldehidă; A.-M. Olaru, S. Morariu, **G. Pricope**, M. Pinteală, L. Marin, *Zilele Academice Ieşene,*

*A XXVI-a Sesiune de Comunicări Ştiintifice a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni" Iaşi*, Iaşi, Academia Română, Filiala Iaşi, **2017**.

5. Flexible guanosine-based hydrogels for biomedical applications, **G. Pricope**, D. Peptanariu, A. Rotaru, M. Pinteala, M. Barboiu; *12th International Conference on Colloid and Surface Chemistry ( ICCSC)***,** Iasi, Romania, **2016.**

## Bibliografie selectivă


1. Lehn, J. -M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chem Soc Rev* **2007**, 36, 151-160.

2. Lehn, J.-M. Constitutional dynamic chemistry: Bridge from supramolecular chemistry to adaptive chemistry. *Topics in Current Chemistry* **2012**, 322, 1-32.

3.Lehn, J.-M. Supramolecular chemistry: Where from? Where to? *Chem Soc Rev* **2017**, 46, 2378-2379.

4. Rotaru, A.; Pricope, G.; Plank, T. N.; Clima, L.; Ursu, E. L.; Pinteala, M.; Davis, J. T.; Barboiu, M. G-quartet hydrogels for effective cell growth applications. *Chem Commun (Camb)* **2017**, 53, 12668-12671.

5. Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. Dynavectors: Dynamic constitutional vectors for adaptive DNA transfection. *Chem Commun (Camb)* **2015**, 51, 17529-17531.

6. Webster, R.; Elliott, V.; Park, B. K.; Walker, D.; Hankin, M.; Taupin, P. In Pegylated protein drugs: Basic science and clinical applications; Veronese, F. M., (Ed.), Birkhäuser Basel: Basel, **2009**, pp 127-146.

7. Park, T. G.; Jeong, J. H.; Kim, S. W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **2006**, 58, 467-486.

8. Liu, G.; Li, Y.; Yang, L.; Wei, Y.; Wang, X.; Wang, Z.; Tao, L. Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives. *RSC Advances* **2017**, 7, 18252-18259.

9. Thomas, M.; Klibanov, A. M. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, 62, 27-34.

10. Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* **2014**, 15, 541-555.

11. Clima, L.; Ursu, E. L.; Cojocaru, C.; Rotaru, A.; Barboiu, M.; Pinteala, M. Experimental design, modeling and optimization of polyplex formation between DNA oligonucleotides and branched polyethylenimine. *Org Biomol Chem* **2015**, 13, 9445-9456.

12. Pegg, A. E. The function of spermine. *IUBMB Life* **2014**, 66, 8-18.

13. Wang, S. Y.; Lee, A. Y.; Lai, Y. H.; Chen, J. J.; Wu, W. L.; Yuann, J. M.; Su, W. L.; Chuang, S. M.; Hou, M. H. Spermine attenuates the action of the DNA intercalator, actinomycin d, on DNA binding and the inhibition of transcription and DNA replication. *PLoS One* **2012**, 7, e47101.

14. Pricope, G.; Pinteala, M.; Clima, L. Dynamic self-organazing systems for DNA delivery. *Rev Roum Chim* **2018**, 63, 613–619.

15.Craciun, B. F.; Gavril, G.; Peptanariu, D.; Ursu, L.E.; Clima, L.; Pinteala, M. Synergistic effect of low molecular weight polyethylenimine and polyethylene glycol components in dynamic nonviral vector structure, toxicity, and transfection efficiency. *Molecules* **2019**, 24, 1460.

16. Rotaru, A; Druta, I.; Avram, E.; Danac, R. Synthesis and properties of fluorescent 1,3-substituted mono and biindolizines. *Arkivoc* **2009**, xiii, 287-299.

17. Marangoci, N.-L.; Popovici, L.; Ursu, E.-L.; Danac, R.; Clima, L.; Cojocaru, C.; Coroaba, A.; Neamtu, A.; Mangalagiu, I.; Pinteala, M.; Rotaru, A.Pyridyl-indolizine derivatives as DNA binders and ph-sensitive fluorescent dyes. *Tetrahedron* **2016**, 72, 8215-8222.

18. Pricope, G.; Ursu, E. L.; Sardaru, M.; Cojocaru, C.; Clima, L.; Marangoci, N.; Danac, R.; Mangalagiu, I. I.; Simionescu, B. C.; Pinteala, M.; Rotaru, A. Novel cyclodextrin-based ph-sensitive supramolecular host–guest assembly for staining acidic cellular organelles. *Polymer Chemistry* **2018**, 9, 968-975.

19.Goldshmidt, O.; Nadav, L.; Aingorn, H.; Irit, C.; Feinstein, N.; Ilan, N.; Zamir, E.; Geiger, B.; Vlodavsky, I.; Katz, B. Z. Human heparanase is localized within lysosomes in a stable form. *Exp Cell Res* **2002**, 281, 50-62.

20. Raben, N.; Shea, L.; Hill, V.; Plotz, P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods Enzymol* **2009**, 453, 417-449.