

RAPORTARE STIINTIFICA SI TEHNICA SUMATIVA

PROIECT INTERA-1

Incapsularea celulelor eucariote manipulate genetic pentru eliberarea controlată a unor produsi farmacologici activi

Faza II 2019

Parteneri implicati:

CO: Institutul de Biologie și Patologie Celulară „N. Simionescu”, Bucuresti

P1: Universitatea Politehnica din Bucuresti

P2: Institutul De Chimie Macromoleculara “Petru Poni”, Iași

Etapa 2019 – Obținerea celulelor manipulate genetic incapsulate in matrici

Activitatea 2.1. Caracterizarea microcapsulelor polimerice si microfibrelor

Au fost obtinute si caracterizate urmatoarele tipuri de microcapsule și microfibre:

1. **Microcapsule polimerice din alginat** de sodiu obținute prin „electrospinning”. Conform rezultatelor spectroscopiei FTIR, se poate observa faptul că microcapsulele polimerice prezintă benzile de adsorbție caracteristice grupărilor funcționale carboxil și hidroxil. Din analiza microgرافیilor obținute pentru microcapsulele polimerice se poate observa faptul că particulele prezintă o formă cvasi-sferică, cu tendințe de aglomerare (Figura 1). Se observă faptul că nici concentrația și nici timpul de reticulare nu modifică morfologia particulelor, microcapsulele având aceleași forme și dimensiuni care pot depăși 1000 μm.

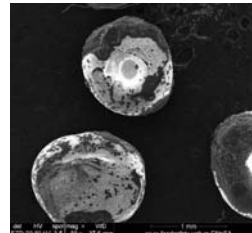


Figura 1 Analiza SEM a microcapsulelor polimerice de alginat obtinute prin electrospinning.

2. **Microfibre polimerice.** Pentru obținerea microfibrelor polimerice s-a folosit ca biomaterial, alginatul de sodiu, un copolimer natural binar, neramificat, cu proprietăți gelifiante în prezența ionilor polivalenți datorită efectului cooperativ creat de legăturile electrostatice dintre acești ioni. Microfibrele polimerice au fost caracterizate prin microscopie electronică de baleiaj, spectroscopie FTIR, analiza termică și cinetica de adsorbție. Conform rezultatelor spectroscopiei FTIR se poate observa faptul că microfibrele polimerice prezintă benzile de adsorbție caracteristice grupărilor funcționale carboxil și hidroxil. Se observă vibrația de întindere asociată grupării C-H de la 3339,70 cm⁻¹. De remarcat și vibrația de întindere a grupării carboxil care apare la 1597,03 cm⁻¹ și 1427,02 cm⁻¹. Benzile de la 1076,21 cm⁻¹ și 1011,73 cm⁻¹, cât și cele de la 819,42 cm⁻¹ sunt atribuite vibrației grupării C-O datorate deformării C-C-H și C-O-H.

Conform microgرافیilor obținute din analiza SEM a microfibrelor polimerice (Figura 2) se observă faptul că particulele prezintă o formă fibrilară, de mici dimensiuni, ce prezintă mici protuberanțe.

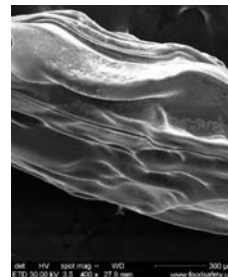
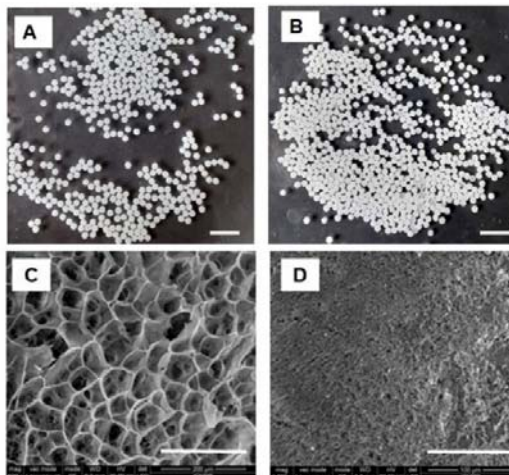


Figura 2. Analiza SEM a microfibrelor polimerice.

3. Microcapsule de chitosan cu dublă reticulare: ionică cu tripolifosfat de sodiu (NaTPP) și covalentă cu pullulan cu grupe aldehidice (Pul-CHO) (Figura 3).

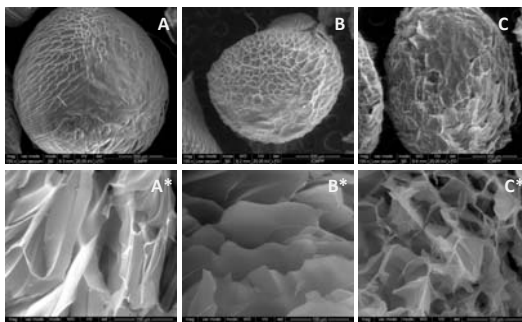
Figura 3. Microfotografii obținute cu microscopul optic (A și B) și electronic (SEM) (C și D) ale microcapsulelor de chitosan reticulate ionic cu NaTPP (panelurile A și C) și dublu reticulate cu NaTPP și Pul-CHO (B și D). Barele corespund la 10 mm în reprezentările A și B și 200 μm respectiv 100 μm în panelurile C și D.



Ambele tipuri de microcapsule prezintă o formă rotundă și o distribuție restrânsă a dimensiunilor. Diametrul mediu al microcapsulelor obținute prin reticularea ionică ($d = 2,48 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$) este puțin mai mic decât cel obținut prin reticulare dublă ($d = 2,64 \pm 0,2 \text{ mm}$).

4. Microcapsule de pectina. Au fost determinate spectrele în infrarosu (FT-ATR).. Microfotografiile SEM (Figura 4) pun în evidență o formă sferică și o structură poroasă a microcapsulelor

Figura 4. Imagini SEM ale microcapsulelor de PDE-Fe la suprafață (A,B,C) și în secțiune (A*,B*,C*). Microcapsulele au fost obținute prin picurare în soluție FeCl₃ de concentrație 0,1 M (A,A*), 0,25 M (B, B*), și 0,5 M (C, C*).



Activitatea 2.2: Evaluarea funcționalității celulelor incapsulate în matrici polimerice

Au fost realizate următoarele studii de determinare a permeabilității microcapsulelor :

1. Cinetica eliberării unor macromolecule (de ex. FITC-dextran) în mediul biologic.

Asa cum reiese din **Figura 5** FITC-Dextran 4000 este eliberat treptat atât din microcapsulele reticulate ionic cât și dublu reticulate (ionic și covalent)

Figura 5 Studii de eliberare a FITC-Dextranului cu masa moleculară de 4000 g/mol

2. Cinetica secreției IL-10 din celulele incapsulate în alginat. Determinarea IL-10 a fost realizată prin tehnica ELISA (Figura 6).

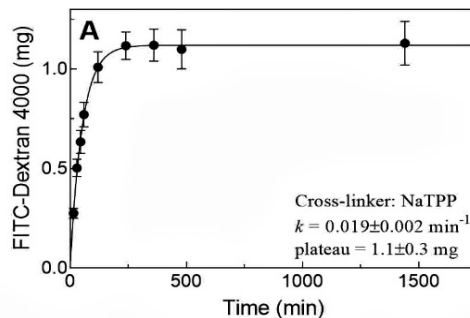
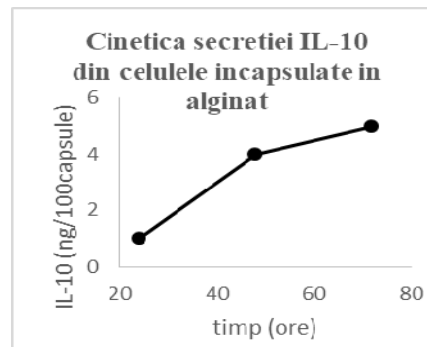


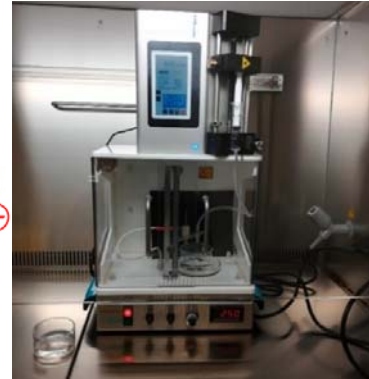
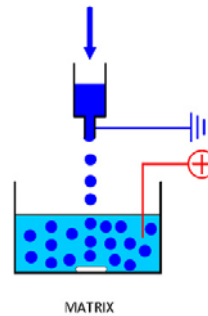
Figura 6. Secreția de IL-10 din celule incapsulate, măsurată în timp. Mediul în care s-a secretat IL-10 din celule incapsulate a fost colectat la 24, 48 și 96 de ore în vederea detecției, folosind metoda ELISA.



Activitatea 2.3. Încapsularea celulelor eucariote modificate în micro-vezicule; optimizarea procesului de obtinere

A fost achiziționat un aparat de încapsulare electrostatic Var V1 LIN-0180 de la Nisco (Figura 7) și a fost optimizat procedeele folosind alginat purificat de partenerii UPB și ICMPP. Acest aparat este proiectat pentru producerea și cercetarea de microcapsule sferice de alginat, cu dimensiuni cuprinse între 200 și 2400 μm. Principiul acestei metode constă în aplicarea unei tensiuni la nivelul acului care alimentează soluția de alginat și clorura de calciu electro-conductoare. Tensiunea obligă picăturile să cadă de pe vârful acului înainte de a crește prea mult în dimensiuni, apoi reticulează în clorura de calciu. S-a confirmat faptul că tensiunea ridicată nu afectează celulele încapsulate, proteinele etc. Aparatul de încapsulare este dotat cu o unitate de alimentare (0-10 kV), suport de susținere autoclavabil pentru ac, dar și un geam de protecție electric. Alginatul (sau alți polimeri folosiți) este introdus într-o seringă care este conectată la o pompă. Un magnet pentru agitare este introdus în clorura de calciu, astfel încât microveziculele nou formate să nu intre în contact unele cu celelalte. Acele folosite sunt fabricate din oțel inoxidabil și au diferite diametre.

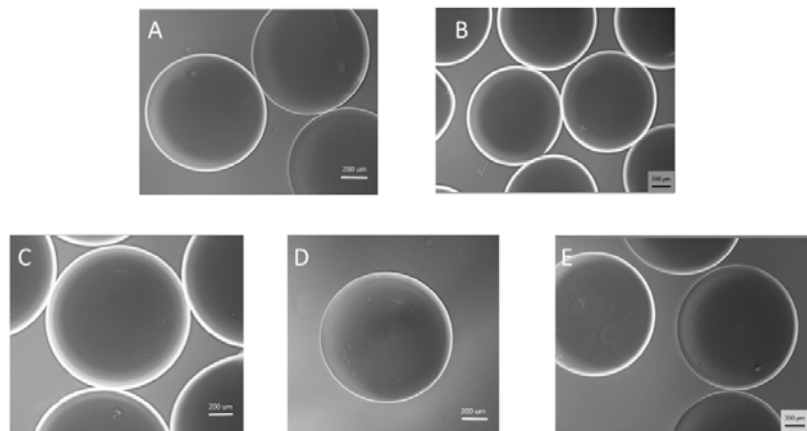
Figura 7. Principiul aparatului de încapsulare Nisco și aparatul achiziționat în cadrul proiectului.



În **Figura 8** sunt redate câteva exemple de capsule care conțin celule, obținute variind diferiți parametri, obținute cu aparatul Nisco, în **Figura 9** sunt ilustrate capsulele la nivel microscopic, iar în figura 10 sunt arătate celulele încapsulate prin microscopie de fluorescență, folosind gena reporter GFP.

Figura 8. Vizualizarea microcapsulelor de alginat la microscopul în contrast de fază.

A. Microvezicule obținute cu o concentrație de 2% de alginat, diametrul acului de 0.35 mm, voltajul 3.3 kV, flow rate de 20 ml/h, distanța de la ac la baia de gelificare de 3 cm și concentrația clorurii de calciu de 50 mM; **B.** Microcapsule realizate cu o concentrație de 2% de alginat, diametrul acului de



0.35 mm, voltajul 2.9 kV, flow rate de 20 ml/h, distanța de la ac la baia de gelificare de 3 cm și concentrația clorurii de calciu 50 mM; **C.** Microvezicule obținute cu o concentrație de 2% de alginat, diametrul acului 0.35, voltajul 2.5 kV, flow rate 15 ml/h, distanța de la ac la clorura de calciu 3 cm și concentrația clorurii de calciu 50 mM; **D.** Microcapsule obținute cu o concentrație de 2% alginat, diametrul acului de 0.35 mm, voltajul 2.7 kV, flow rate de 15 ml/h, distanța de la ac la baia de gelificare de 3 cm și concentrația clorurii de calciu de 50 mM; **E.** Microvezicule obținute cu o concentrație de 2% de alginat, diametrul acului de 0.35 mm, voltajul 3 kV, flow rate de 15 ml/h, distanța de la ac la baia de gelificare de 3 cm și concentrația clorurii de calciu 50 mM.

Figura 9. Vizualizarea capsulelor de alginat cu celule. Microveziculele cu celule au fost obtinute cu urmatoarii parametrii: concentratia finala alginat-celule 2%, diametrul acului 0.35 mm, voltajul 2.7 kV, flow rate 15 ml/h, distanta de la ac la baia de gelificare 3 cm si concentratia clorurii de calciu 50 mM.

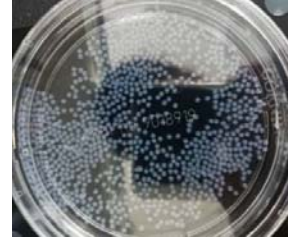
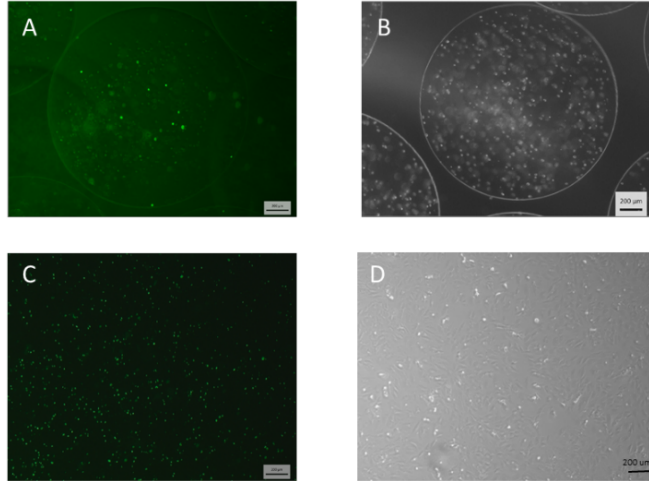


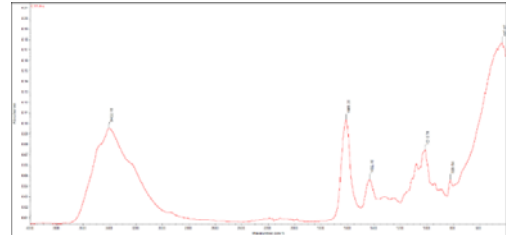
Figura 10. Vizualizarea celulelor cu potential de secretie/celulelor incluse in alginat la microscopul in contrast de faza. **A.** Celule HEK 293 cu potential de secretie, care exprima proteina reporter GFP, incapsulate in alginat. **B.** Celule HEK care secreta IL-10 incapsulate in alginat. **C.** Celule HEK transfectate cu plasmida pCDNA-IL10-GFP. **D.** Celule transfectate cu pCDNA-IL10.



Activitatea 2.4 Caracterizarea fizico-chimică și morfologică a micro-veziculelor încărcate cu celule eucariote.

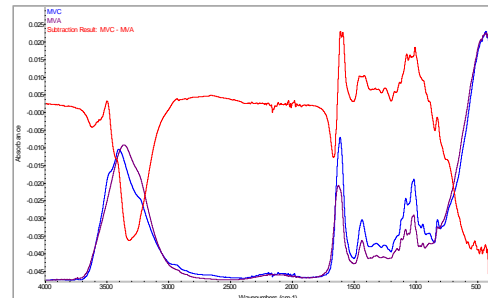
Microveziculele polimerice au fost caracterizate prin microscopie electronică de baleiaj, spectroscopie FTIR, analiza termică și cinetica de absorbție. Conform rezultatelor spectroscopiei FTIR (Figura 11) se observa faptul că microveziculele polimerice prezintă benzile de adsorbție caracteristice grupărilor funcționale carboxil și hidroxil. Se observă vibrația de întindere asociată grupării C-H de la $3402,18\text{cm}^{-1}$. De remarcat și vibrația de întindere a grupării carboxil care apare la $1609,29\text{cm}^{-1}$ și $1432,16\text{cm}^{-1}$. Benzile de la 1048cm^{-1} și $1010,78\text{cm}^{-1}$, cât și cele de la $820,54\text{cm}^{-1}$ sunt atribuite vibrației grupării C-O datorate deformării C-C-H și C-O-H.

Figura 11. Analiza FTIR a microveziculelor polimerice.



Încărcarea microveziculelor cu celule a fost monitorizată prin FTIR. Prin scăderea spectrelor aferente probelor încărcate cu celule și respectiv a probei martor se obține spectrul din Figura 12. Se poate observa că, în ciuda unui conținut scăzut de celule (raportat la masa globală de microvezicule, spectrul obținut prin scădere scoate în evidență benzi caracteristice proteinelor din celule (mai ales benzile caracteristice amidei I-III: $1620, 1600, 1450, 1420, 1240\text{cm}^{-1}$).

Figura 12. Spectrul FTIR obținut prin scăderea spectrelor probelor încărcate cu celule respectiv martor.

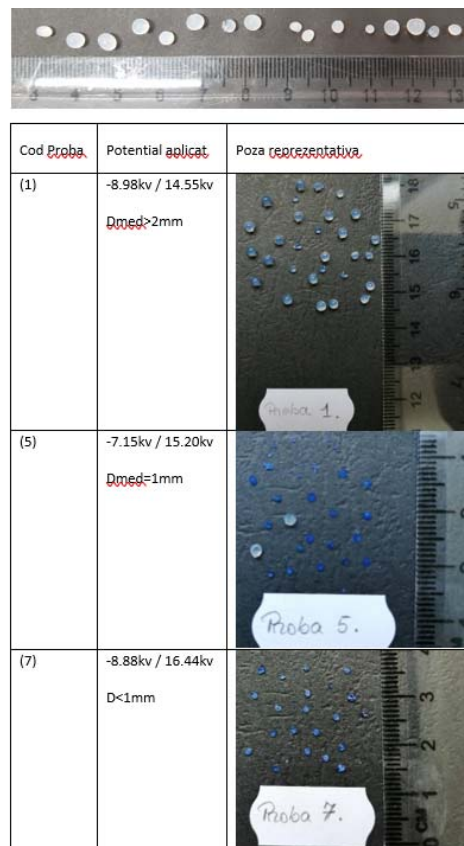


Activitatea 2.5. Optimizarea procesului de eliberare a compușilor de secreție prin designul avansat al membranei ce încapsulează celulele

În cadrul optimizării proceselor de obținere a microveziculelor polimerice încapsulate cu celule eucariote s-au avut în vedere caracteristici legate de dimensiunea particulelor, scopul fiind acela de a obține particule cu dimensiuni foarte mici, dar totodată trebuie să fie capabile să poată încapsula și celule eucariote. Pentru a se putea obține particule foarte mici s-a folosit metoda de „electrospraying”, care oferă posibilitatea de a obține particule cu dimensiuni mici, suprafață specifică mare și porozitate controlată. Porozitatea este de foarte mare interes, datorită faptului că în interiorul matricilor polimerice sunt încapsulate celule modificate genetic care secreta substanțe biologice active eliberate prin porii microcapsulelor și microveziculelor.

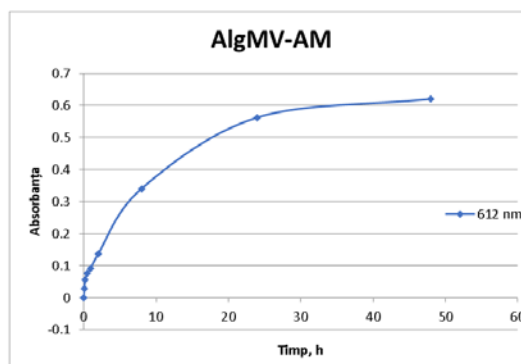
Au fost obținute mai multe sorturi de micro și macrocapsule/vezicule în funcție de condițiile de „electrospraying” (Figura 13).

Figura 13. Imagini reprezentative aferente microsferelor obținute în absența și în prezența câmpului electric.



Pentru a putea obține membrane care încapsulează celule și care permit o eliberare controlată și de lungă durată, trebuie să se țină cont de concentrația agentului de reticulare. În cazul de față, s-a folosit clorura de calciu în concentrații variabile, observându-se faptul că atunci când avem o concentrație mare a clorurii de calciu, adică reticulare puternică, implicit vom avea o eliberare lentă. În cazul unor sisteme de microvezicule încărcate cu albastru de metilen (molecula model) eliberarea asigurată este lentă, gradul de eliberare fiind dependent de caracteristicile microveziculelor. De exemplu, în Figura 14 se prezintă profilul de eliberare a albastrului de metilen din microcapsulele obținute fără câmp electric, viteza de eliberare fiind lentă și asigurând o eliberare prelungită, de cel puțin câteva zile.

Figura 14. Eliberarea unor molecule model din microvesiculele de alginat.



Activitatea 2.6 - Activitati de diseminare

D 1.1. Lucrari

1. G. Fundueanu, M. Constantin, S. Bucatariu, A. Nicolescu, P. Ascenzi, L.G. Moise, L. Tudor, V.G. Trusca, A.V. Gafencu, D. Ficai, A. Ficai, E. Andronescu, **Simple and dual cross-linked chitosan millicapsules as a particulate support for cell culture**, *Int. J. Biol. Macromol.* 2019 (acceptata pentru publicat) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.045> (Factor de impact: 4.78).
2. Trusca VG, Fuior EV, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV, The Opposite Effect of c-Jun Transcription Factor on Apolipoprotein E Gene Regulation in Hepatocytes and Macrophages, *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 23;20(6). pii: E1471. doi: 10.3390/ijms20061471. PubMed PMID: 30909560; International Journal of Molecular Sciences – (Factor de Impact: 4.3)

D1.2. Conferinte

- G. Fundueanu, **Self-regulated drug delivery systems**, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 2019), 4-7 September 2019, Constanta, Romania.

- “21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering”–RICCCE 21, unde au fost prezentate numeroase lucrari, printre care “Alginate beads loaded with cells and biologic active agents”, Angela Spoială, Cornelia-Ioana Ilie, Denisa Ficai, Anton Ficai, Laura Moise, Violeta Trușcă, Roxana Doina Trușcă, Bogdan-Ștefan Vasile, Ovidiu Oprea, Anca Violeta Gafencu, Ecaterina Andronescu.
- ”5th World Congress on New Technologies (NewTech'19) - Lisbon, Portugal – August 18-20, 2019 - Drug Delivery Platforms for Cardiovascular Applications based on Alginate-based Hollow Structures - Angela Spoiala, Cornelia Ioana Ilie, Laura Moise, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trușcă, Bogdan Ștefan Vasile, Denisa Ficai, Manuela Calin, Anca Violeta Gafencu, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu.
- Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Anca V. Gafencu, “Interleukin-10 signal sequence cloned in front of the luciferase drives the reporter protein secretion”, Simpozion aniversar IBPC “Nicolae Simionescu”- “O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului”, 19-20 septembrie 2019, - **Poster**.
- Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, “*The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells*”, Simpozion aniversar IBPC “Nicolae Simionescu”- “O calatorie fascinanta de 40 de ani pentru descoperirea secretelor celulei in beneficiul sanatatii omului”, 19-20 septembrie 2019, **Poster**.
- Lavinia E. Tudor, Laura G. Moise, Violeta G. Trusca, Gheorghe Fundueanu, Sanda Bucatariu, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The secretory potential of interleukin-10 by the encapsulated endothelial cells, “Al 11-lea Congres National cu Participare Internaționala si a 37-a Sesiune Științifică Anuala a Societății Romane de Biologie Celulara”, Constanta, Romania- **Poster**.
- Laura G. Moise, Lavinia E. Tudor, Violeta G. Trusca, Maya Simionescu, Anca V. Gafencu, The addition of the signal sequence of interleukin-10 to the luciferase drives the reporter protein secretion, “Al 11-lea Congres National cu Participare Internaționala si a 37-a Sesiune Științifică Anuala a Societății Romane de Biologie Celulara”, Constanta, Romania- **Poster**.

D1.3. Un serviciu ERRIS - Ionic polysaccharide-based microcapsules as matrix for cell encapsulation.

D1.4. CURSURI

Scoala de vara “Nanoparticule inteligente pentru livrarea directionată de compuși bioactivi: preparare, caracterizare si aplicații”. Cursanti: Gheorghe Fundueanu-Constantin; Mihail Lupei

BREVETE

- Denisa Ficai, Andreea Iliev, Anton Ficai, Violeta Georgeta Trușcă, Anca Violeta Gafencu, Sanda-Maria Bucătariu, Gheorghe Fundeanu-Constantin, Maya Simionescu, Ecaterina Andronescu - Vezicule și tuburi polimerice și tehnologie de obținere a acestora. A 01054/ 05.12.2018 înregistrat la OSIM.

Activitățile de diseminare și exploatare a rezultatelor au fost puse în valoare prin recunoașterea internațională obținută la saloanele de invenții interne și internaționale. Cererea de brevet sus-menționată a premiată de Juriul Internațional al saloanelor si de delegațiile unor state *după cum urmează*:

În cadrul Expoziției Internaționale Specializate -INFOINVENT 20-23 noiembrie 2019, Chișinău s-au acordat următoarele premii:

- Medalia de Aur acordată de Universitatea Tehnică a Moldovei
- Diplomă de Excelență & Trofeul Group Mechatron acordată de Mecatronică & Cyber - MixMecatronică pentru Viitor
- Medalia de Aur acordată de Agenția de Stat
- Diplomă de Excelență acordată de Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

În cadrul celei de-a „11th Edition European Exhibition of Creativity and Innovation” - EUROINVENT 16-18 mai 2019, Iași s-au acordat următoarele premii:

- Diploma of Gold Medal acordată de Ministerul Cercetării și Inovării
- Diplomă Prize acordată de către „Alexandru Ioan Cuza” University of Iași
- Gold Medal acordată de „Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy Bucharest
- Excellence Award & Gold Medal acordate de către Asociația Română de PTERIDOLOGIE
- Excellence Award & Gold Medal acordate de către National Institute for Research & Development in Chemistry and Petrochemistry -ICECHIM
- Special Prize acordat de către Romanian Association for Alternative Technologies A.R.T.A Sibiu

IDEA-EXPO 2019 IDEA, Novelty, Innovation, Art and Crafts International Exhibition and Fair, 06-07 April 2019, Szolnok, Hungary acordă premiul: Diploma Invention -Creation

• Una dintre lucrările prezentate la conferințe a fost de asemenea distinsă la INSPCNN 2018 cu premiul Best Presentation Award: “20th International Conference on Synthetic polymer Chemistry, Nanoscience and Nanotechnology- INSPCNN 2018”- Certificate of Best Presentation Award for the paper “Synthesis and Characterization of Some Alginate Hollow Fibres Using Co-Axial Needles”, Anton Fikai, Ioana Lavinia Ardelean, Roxana Doina Trușcă, Bogdan Stefan Vasile, Denisa Fikai, Ecaterina Andronescu.

Concluzii

În cadrul acestei etape au fost îndeplinite activitățile cu privire la optimizarea metodelor de sinteză ale microcapsulelor și microfibrilor polimerice prin procedeul de electrospinning și în câmp electric, cât și caracterizările lor prin microscopie electronică de baleiaj, spectroscopie FTIR, cât și cinetica de absorbție și analiza termică și analiza eliberării compusilor. În cadrul microveziculelor, a fost optimizat procesul de obținere prin intermediul spinneretilor coaxiali, prin încapsularea de celule eucariote modificate genetic, cât și optimizarea încapsulării în câmp electric. Capsulele au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și morfologic. Dimensiunea microsferelor este în special controlată de potențialul aplicat, iar porozitatea de concentrația gelului de alginat utilizat în obținerea microsferelor. Procesul de eliberare a compușilor activi a fost realizat inițial pe o moleculă model (albastru de metilen) care este ușor de monitorizat și conferă premisele ca sistemele dezvoltate să poată fi utilizați în eliberarea de compuși de secreție celulele eucariote încapsulate în microsferă, profilul de eliberare fiind dependent de caracteristicile sistemului. De asemenea, a fost determinată secreția de IL-10 din celulele transfectate încapsulate. Capsulele obținute vor fi testate *in vivo* în etapa următoare.

S-au atins toți indicatorii de realizare:

- un studiu fizico-chimic privind caracterizarea microcapsulelor polimerice și microfibrilor
- un studiu al cineticii secreției din celulele încapsulate
- Studiul secreției peptidelor active din celulele încapsulate
- S-a elaborat și optimizat tehnologia obținerii microveziculelor
- Studiul proprietăților fizico-chimice, caracterizarea fizico-chimică și morfologică a micro-veziculelor încărcate cu celule eucariote

Activitățile de diseminare au fost îndeplinite prin două lucrări științifice (una acceptată și una publicată), 7 participări la conferințe, elaborarea unei cereri de brevet care a fost bine primită de comunitatea academică, dovada fiind premiile obținute la saloanele de invenții la care s-a participat.