



Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară
„Petru Poni” Iași
Centrul de Cercetări Avansate pentru
Bionanoconjugate și Biopolimeri - Intelcentru



Nanoconjugate cu nucleu de fulerenă C_{60} și dimensiuni subcelulare pentru aplicații biomedicale

Rezumat teză de doctorat

**Conducător științific
Acad. Bogdan C. Simionescu**

**Doctorand
Ioan Andrei Dascălu**

IAȘI – 2016



Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași



Nr. 391 / 29 I 2016

Domnului/Doamnei.....

Vă facem cunoscut că în ziua de **15 februarie 2016**, ora **12:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **“Nanoconjugate cu nucleu de fulerena C₆₀ și dimensiuni subcelulare pentru aplicații biomedicale”**, autor biochimist **Ioan Andrei Dascălu**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

PREȘEDINTE **C.S. I Dr. Valeria Harabagiu**, Secretar Științific al Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

CONDUCĂTOR
ȘTIINȚIFIC **Acad. Bogdan C. Simionescu**, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

REFERENȚI **C.S. I Dr. Mariana Pinteală**, Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” din Iași

Prof. dr. Elena Bîcu, Universitatea "Al. I. Cuza" Iași, Facultatea de Chimie

Conf. dr. Camelia Mihăilescu, Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica în scris aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,
Anton Airinei
Dr. Anton Airinei

Mulțumesc conducătorului științific, domnul Acad. Bogdan C. Simionescu pentru îndrumarea excepțională, răbdare, și sfaturile oferite pe tot parcursul elaborării acestei teze, precum și în formarea mea ca om și cercetător.

Doresc să îmi exprim recunoștința față de doamna Dr. Mariana Pinteală pentru instruirea științifică, îndrumarea excepțională, răbdarea, sprijinul personal și încrederea acordată.

Mulțumesc Academiei Române pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.

Mulțumesc Ministerului Educației Naționale și Cercetării Științifice - CNCSIS-UEFISCDI pentru sprijinul financiar prin intermediul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028 - Sisteme de Inspirație Biologică pentru Entități Proiectate Structural și Funcțional.

Mulumiri tuturor colegilor din Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași și din Centrul de Cercetări Avansate pentru Bionanoconjugate și Biopolimeri, pentru sprijinul profesional și moral acordat pe tot parcursul stagiului doctoral. Mulțumesc în special colegilor Dr. Rodinel Ardeleanu, Dr. Mihaela Silion, Dr. Cristina Uritu, Drd. Alina Nicolescu, Dr. Cristian Varganici, Dr. Adina Coroabă, , Dr. Laura Ursu, , pentru disponibilitatea lor și ajutorul acordat.

Aș dori să mulțumesc domnului Dr. Cezar Ungurenașu pentru inițierea în chimia fullerenei și sfaturile oferite în perioada colaborării.

În mod deosebit aș vrea să mulțumesc familiei, care mi-a fost alături și m-a încurajat constant și necondiționat pe tot parcursul elaborării tezei de doctorat.

CUPRINS

Introducere	5
Lista abrevierilor	9
Partea I. Date de literatură	
<hr/>	
Capitolul I. Studiu de literatură	13
I.1. Fulereana C₆₀	13
I.1.1 Structura fullerenei C ₆₀	13
I.1.2 Proprietățile fizice ale fullerenei C ₆₀	16
I.1.3 Proprietățile chimice ale fullerenei C ₆₀	17
I.1.3.1. Adiții nucleofile.....	17
I.1.3.1.1. Adiția nucleofililor pe bază de carbon.....	18
I.1.3.1.2. Adiția aminelor.....	22
I.1.3.2. Oxidarea și reacția cu agenți electrofili.....	25
I.1.3.3. Halogenarea fullerenei.....	27
I.1.3.4. Reacții de cicloadiție.....	34
I.2. Nanoconjugate	36
I.2.1. Proiectarea bioconjugatelor.....	36
I.2.1.1. Bariere <i>in vivo</i>	36
I.2.1.2. Considerații fizico-chimice.....	38
I.2.1.3. Morfologia bioconjugatelor.....	38
I.2.1.4. Dirijarea nanoconjugatelor <i>in vivo</i>	40
I.2.1.5. Încărcarea și eliberarea principiului activ.....	42
I.2.1.6. Toxicitatea.....	44
I.2.2. Aplicațiile bioconjugatelor.....	44
I.2.2.1. Vectori non-virali în transfecția de gene terapeutice.....	44
I.2.2.1.1. Vectori polimerici.....	46
I.2.2.1.2. Vectori lipidici	47
I.2.2.1.3. Vectori cu nucleu de fulerenă C ₆₀	49
Partea a II a. Contribuții originale	
<hr/>	
Capitolul II. Marker fluorescent pentru cuantificarea ADNdc pe bază de C₆₀	57
II.1. Introducere	57
II.2. Rezultate originale	58
II.2.1. Sinteza bromurii de fulerenă C ₆₀ Br ₂₄	58
II.2.2. Caracterizarea bromurii de fulerenă C ₆₀ Br ₂₄ prin spectroscopie FT-IR și ATG.....	62
II.2.3. Sinteza fulerenolului C ₆₀ (OH) ₂₄ - marker pentru cuantificarea acizilor nucleici dublu catenari.....	63
II.2.3. Caracterizarea fulerenolului C ₆₀ (OH) ₂₄	66
II.2.3.1. Spectroscopia FT-IR.....	66
II.2.3.2. Spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray (ESI-MS)	66
II.2.3.2.1. Nomenclatură și mecanisme de ionizare	67
II.2.3.2.2. Ionizarea fulerenolului în modul negativ.....	68
II.2.3.2.2.1. Fulerenol în apă.....	69

II.2.3.2.2.2. Fulerenol în soluție apoasă de amoniac.....	73
II.2.3.2.3. Ionizarea fulerenolului în modul pozitiv.....	74
II.2.4. Testarea capacității de marker fluorescent a derivatului C ₆₀ (OH) ₂₄ pentru cuantificarea acizilor nucleici dublu catenari prin spectroscopie de fluorescență.....	77
2.3. Concluzii.....	87
<hr/>	
Capitolul III. Vectori non-virali utilizați în transfecția ADN.....	91
<hr/>	
III.1. Noțiuni introductive.....	91
III.2. Sinteza conjugatului C₆₀-PEG-PEI.....	93
III.3. Caracterizarea structurală a conjugatului C₆₀-PEG-PEI.....	94
III.3.1. Caracterizarea conjugatului C ₆₀ -PEG-PEI prin spectroscopie ¹ H și ¹³ C RMN..	94
III.3.2. Caracterizarea conjugatului C ₆₀ -PEG-PEI prin spectroscopie XPS.....	98
III.3.3. Caracterizarea conjugatului C ₆₀ -PEG-PEI prin spectroscopie FT-IR.....	101
III.3.4. Caracterizarea conjugatului C ₆₀ -PEG-PEI prin analiză termogravimetrică.....	103
III.3.5. Caracterizarea conjugatului C ₆₀ -PEG-PEI prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC).....	104
III.4. Prepararea și caracterizarea poliplexului C₆₀-PEG-PEI/acid nucleic dublu catenar (C₆₀-PEG-PEI/ADNdc).....	105
III.4.1. Evaluarea poliplexului C ₆₀ -PEG-PEI prin măsurători de potențial zeta.....	106
III.4.2. Evaluarea dimensională și morfologică a poliplexurilor prin microscopie de forță atomică.....	108
III.5. Capacitatea conjugatului C₆₀-PEG-PEI de legare a ADNdc.....	109
III.6. Citotoxicitatea conjugatului C₆₀-PEG-PEI și a poliplexului plasmidic pEYFP.....	110
III.7. Eficiența transfecției poliplexurilor bazați pe conjugatul C₆₀-PEG-PEI.....	113
III.8. Concluzii.....	117
<hr/>	
Capitolul IV. Partea experimentală.....	121
<hr/>	
IV.1. Materiale.....	121
IV.1.1. Reactivi.....	121
IV.1.2. Culturi celulare.....	122
IV.1.3. Solvenți.....	123
IV.2. Sinteza produșilor.....	123
IV.3. Echipamente utilizate pentru caracterizarea produșilor sintetizați.....	126
IV.4. Metode de testare biologică.....	133
<hr/>	
Capitolul V. Concluzii generale.....	137
<hr/>	
Lista de publicații.....	141

Introducere

Odată cu descoperirea fulerenelor (unul dintre primele nanomateriale de carbon) și depășirea factorului critic în punerea la punct a unor tehnologii care să permită producția la scară mare (în mai 2003, s-a început producția fulerenei C_{60} în tone, cu preț rezonabil) a început utilizarea într-o gamă largă de domenii și implicit dezvoltarea unui număr mare de transformări chimice care să permită sinteza unui număr impresionant de derivați. În chimia organică, fulerenele sunt considerate elemente constructive versatile (cu reactivitate semnificativ diferită de cea a moleculelor aromatice planare) capabile să introducă proprietăți chimice, geometrice, electronice și foto-fizice noi.

Utilizarea derivaților de fulerenă în aplicații biomedicale este un domeniu insuficient exploatat în comparație cu sistemele terapeutice bazate pe nanotuburi de carbon, polimeri sau lipidele cationice. Încercările de utilizare a fulerenelor în aplicațiile menționate anterior au demonstrat eficiență similară cu a agenților disponibili comercial. În continuare, sunt necesare studii care să faciliteze înțelegerea mecanismelor de acțiune, posibilele efecte dăunătoare și „soarta” derivaților fulerenici după administrarea moleculei cu activitate biologică.

Teza de doctorat intitulată "**Nanoconjugate cu nucleu de fulerenă C_{60} și dimensiuni subcelulare pentru aplicații biomedicale**" abordează două direcții distincte care utilizează derivații de fulerenă C_{60} solubili în apă: (A) primul domeniu urmărește dezvoltarea unui derivat de fulerenă cu structură unitară în vederea utilizării acestuia ca marker fluorescent capabil să cuantifice acizii nucleici dublu catenari din soluții apoase și (B) al doilea domeniu abordat în această teză constă în dezvoltarea unei structuri bazate pe fulerenă, care să aibă capacitatea de transfecție a acizilor nucleici.

Terapia genică este o abordare medicală relativ nouă a unor afecțiuni transmise genetic sau datorate unor mutații genetice, având ca scop remedierea afecțiunii prin introducerea în celulele vizate (ținte) a unei gene terapeutice. În acest cadru este necesară dezvoltarea unui vector capabil să împacheteze, să transporte, să protejeze și să elibereze informația genetică în nucleul celulei, fără a induce un efect citotoxic. În dezvoltarea unui astfel de vector trebuie să se țină cont de interacțiile necesare complexării acidului nucleic (interacții ionice, legături de hidrogen, van der Waals) și de barierele celulare pe care sistemul terapeutic trebuie să le depășească (circulația sangvină, interacțiile nespecifice, internalizarea în celulă, evadarea din compartimentele celulare, etc).

Teza a fost structurată în două părți, prima parte cuprinde date de literatură (**Capitolul I**), iar partea a doua prezintă rezultatele proprii (**Capitolele II și III**). Teza de doctorat se încheie cu Partea experimentală (**Capitolul IV**) și Concluzii generale (**Capitolul V**). Fiecare capitol este însoțit de bibliografia specifică.

În cadrul **Capitolului I** este prezentat un studiu de literatură care cuprinde aspecte legate de structura fulerenei C_{60} , proprietățile fizice ale acesteia precum și posibilitățile de funcționalizare ale acestui compus. De asemenea, este cuprinsă și o introducere în domeniul bioconjugatelor constând în condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un bioconjugat precum și barierele biologice pe care trebuie să le depășească. Capitolul se încheie cu o introducere în terapia genică.

Partea de **contribuții originale** cuprinde descrierea tehnicilor de sinteză utilizate în timpul elaborării tezei de doctorat, alături de metodele de caracterizare structurală, morfologică și funcțională ale produșilor sintetizați.

În **Capitolul II** este descrisă sinteza fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$, un derivat de fulerenă C_{60} solubil în apă, și evaluarea drept marker fluorescent în cuantificarea acizilor nucleici dublu catenari. În vederea obținerii unui compus cu un grad de funcționalitate reproductibil, cu structură controlată, a fost sintetizată inițial bromura de fulerenă, $C_{60}Br_{24}$. Structura derivatului a fost pusă în evidență prin spectroscopie FT-IR și analiză termogravimetrică. În etapa următoare derivatul bromurat a fost supus reacției de hidroliză alcalină în vederea înlocuirii celor 24 atomi de Br cu grupări OH. Structura fulerenolului a fost confirmată prin spectroscopia FT-IR și analiza elementală prin XPS. În acest capitol este prezentat și un studiu amplu al $C_{60}(OH)_{24}$ prin spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray (ESI-MS) cuplată cu cromatografia HPLC. ESI-MS confirmă gradul de funcționalizare și descrie comportamentul complex al derivatului în condițiile de ionizare prin electrospray. Capacitatea de marker fluorescent a $C_{60}(OH)_{24}$ a fost evaluată prin spectroscopie de fluorescență în absența/prezența ADN-ului. Prin aceste studii s-a observat că fluorescența $C_{60}(OH)_{24}$ este puternic potențată în prezența ADNdc datorită acțiunii $C_{60}(OH)_{24}$ asupra ADN în absența intercalărilor când fulerenolul $C_{60}(OH)_{24}$ se leagă de grupările fosfat din exteriorul catenei de ADNdc nativ, iar prin intermediul bazelor azotate se leagă la nivelul concavităților majore din sarea de sodiu a ADNdc. Fulerenolul, datorită afinității de legare a ADN-ului și a sensibilității ridicate, poate fi considerat marker fluorescent pentru cuantificarea acizilor nucleici fără a fi necesară utilizarea unui sistem tampon.

Capitolul III prezintă sinteza unui transportor de ADN cu nucleu de fulerenă C_{60} , pe care sunt grefate lanțuri ramificate de polietilenimină de masă moleculară mică (2 kDa) (cu rol de împachetare a ADN-ului anionic) și polietilen glicol (2 kDa) (cu rol de îmbunătățire a citocompatibilității și stabilității poliplecșilor în fluidele biologice). Structura vectorului non-viral a fost elucidată prin tehnici de caracterizare complementare precum spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară 1H RMN și ^{13}C RMN, analiză termogravimetrică ATG și spectroscopie de fotoelectroni cu raze X, XPS. Morfologia, dimensiunea și valorile potențialului zeta în apă au fost determinate prin difuzia dinamică a luminii DLS și microscopie de forță atomică AFM. A fost testată abilitatea conjugatului de complexare a ADN-ului dublu catenar utilizând două tipuri de ADN de lungimi diferite (200 bp și 4700 bp), iar poliplecșii obținuți au fost supuși electroforezei pe gel de agaroză pentru stabilirea eficienței de împachetare a acizilor nucleici. Raportul compozițional N/P (raportul dintre numărul de atomi de N aparținând nanovectorului și numărul atomilor de P din ADNdc) influențează dimensiunea și stabilitatea coloidală a particulelor rezultate. Conjugatul C_{60} -PEG-PEI și poliplexul C_{60} -PEG-PEI/pEYFP au exprimat un efect de proliferare în testările de viabilitate celulară pe culturi de celule HEK 293T. Poliplexul C_{60} -PEG-PEI/pEYFP prezintă o eficiență de transfecție de aproximativ 6%, eficiență relativ mică dar comparabilă cu controlul pozitiv. Eficiența în transfecție relativ mică ar putea fi compensată de beneficiile PEG-lării, caz în care citocompatibilitatea este mult îmbunătățită.

Partea experimentală (*Capitolul IV*) descrie reactivii și solvenții utilizați, metodele de sinteză utilizate pentru obținerea produșilor și a intermediarilor de reacție, cât și tehnicile și instrumentele folosite la caracterizarea acestora.

Fiecare capitol cuprinde concluzii și bibliografia aferentă. Teza se încheie cu un capitol de concluzii generale (*Capitolul V*), urmat de lista lucrărilor publicate.

Listă de abrevieri

C₆₀: fulerena C₆₀;

C₆₀Br₂₄: fulerena C₆₀ bromurată cu 24 atomi de Br;

C₆₀OH₂₄: fulerena C₆₀ cu 24 grupări OH;

FeBr₃: bromura ferică;

PEI: polietileimina ramificată (2 kDa);

mPEG-NH₂: α-(2-aminoetil)- ω'-metilpolietilen glicol;

pEYFP: ADN plasmidic ce codifică o proteină fluorescentă (Enhanced Yellow-green Fluorescent Protein);

ADNdc: ADN dublu catenar;

u.a.: unități arbitrare;

TAE: soluție tampon tris-acetat-EDTA;

N/P: raportul dintre numărul de atomi de N și cel de P;

SN₂: substituție nucleofilă de ordinul II;

FT-IR: spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier;

RMN: spectroscopie prin rezonanță magnetică nucleară;

UV-Vis: domeniul ultraviolet - vizibil;

AFM: microscopie de forță atomică;

XPS: spectroscopie fotoelectronică de raze X;

HPLC-ESI-MS: cromatografie de lichide de înaltă rezoluție cuplată cu spectrometrie de masă cu ionizare prin electrospray;

DLS: difuzia dinamică a luminii;

ATG: analiză termogravimetrică;

DTG: derivata curbei termogravimetrice;

DSC: calorimetrie cu scanare diferențială;

T_g: temperatura de tranziție sticloasă;

IMF: intensitatea medie de fluorescență;

bp: perechi de baze azotate.

Capitolul II. Marker fluorescent pentru cuantificarea ADNdc pe bază de C₆₀

Obiectivul științific al acestui studiu este sinteza și caracterizarea unui marker fluorescent pe bază de fulerenă C₆₀ modificată, capabil să cuantifice ADN-ul din soluții apoase foarte diluate în absența unui sistem tampon pentru menținerea pH-ului într-un interval fiziologic.

II.2.1. Sinteza bromurii de fulerenă C₆₀Br₂₄

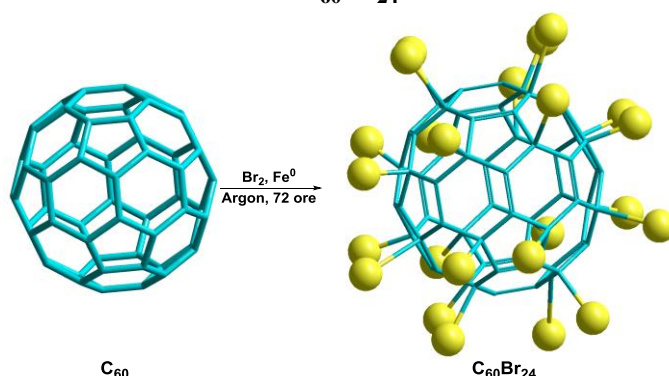


Figura II.1. Reprezentare schematică a reacției de bromurare a C₆₀.

Catalizatorul FeBr₃ creat *in situ*, polarizează moleculele de Br₂, iar ionii de halogen rezultați sunt capabili să adăuneze treptat la atomii de carbon sp² din pozițiile 1,4 și ulterior la cei din pozițiile 1,3 ai ciclurilor hexagonale din structura C₆₀¹ (Figura II.3.).

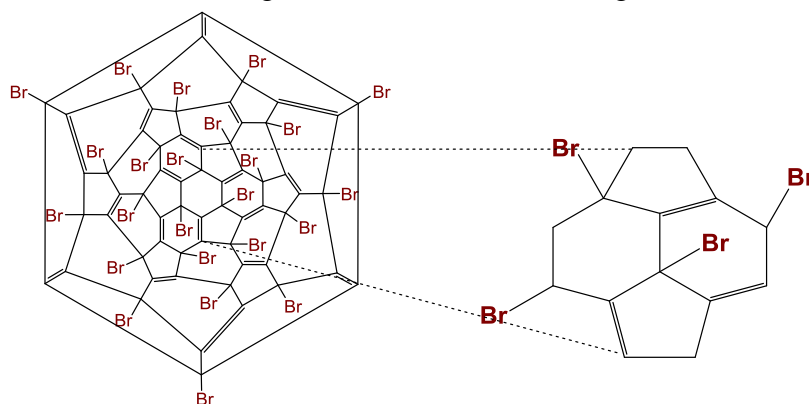


Figura II.3. Diagrama Schlegell C₆₀Br₂₄ cu vedere în detaliu a unui fragment din moleculă.

II.2.2. Caracterizarea bromurii de fulerenă C₆₀Br₂₄ prin spectroscopie FT-IR și ATG

Analiza prin spectroscopie de absorbție în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) prezintă benzile de la 605 și 545 cm⁻¹ specifice legăturilor C-Br nou formate (Figura II.5.). Spectrul vibrațional al moleculei de C₆₀Br₂₄ indică o structură înalt simetrică ce conține un centru de inversiune.

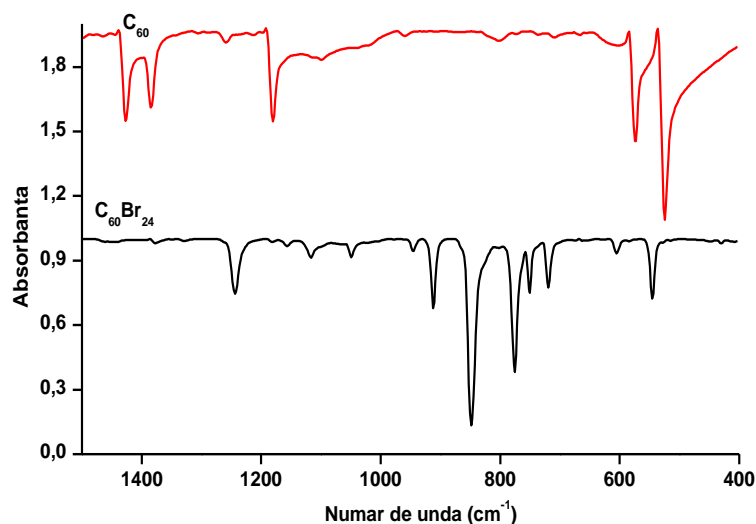


Figura II.5. Spectrele FT-IR pentru compușii C_{60} și $C_{60}Br_{24}$.

Adiția celor 24 de atomi de brom pe suprafața fullerenei C_{60} a putut fi pusă în evidență prin analiza termogravimetrică (Figura II.6.). Curbele ATG și DTA indică o pierdere de masă majoră de 72.77 % într-o singură etapă la 150 °C, atribuită eliminării totale a atomilor de brom, în timp ce descompunerea sferei de carbon începe la 778.32 °C.

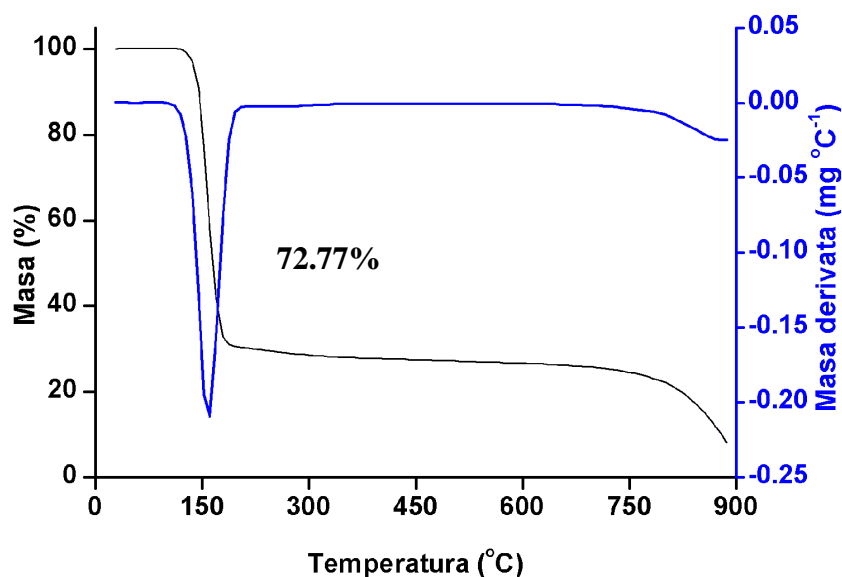


Figura II.6. Spectrul ATG-DTG al $C_{60}Br_{24}$.

Pierderea integrală a atomilor de brom într-o singură etapă sugerează o distribuție simetrică a atomilor de halogen pe suprafața sferei de carbon,² fapt ce confirmă și observațiile extrase din spectrul FT-IR. Pierderea de masă de 72.77 %, determinată din curbele ATG specifică degradării legăturii C-Br de la 150 °C, a făcut posibilă determinarea gradului de substituție al derivatului bromurat după ecuația (1). Aplicând ecuația (1) a rezultat un număr de atomi de Br “n” de 24 unități pentru un raport procentual de 0.7277, confirmându-se structura compusului sintetizat $C_{60}Br_{24}$.

$$n = X \frac{M_{C_{60}Br_{24}}}{A_{Br}} \quad (1)$$

unde:

“n” reprezintă numărul de atomi de brom atașați pe fulerenă;

“x” reprezintă raportul procentual al pierderii de masă extras din curba ATG;

$MC_{60}Br_{24}$ reprezintă masa moleculară a bromurii de fulerenă $C_{60}Br_{24}$ (2638.2 g/mol);

A_{Br} reprezintă masa atomică a bromului (79.9 g/mol).

II.2.3. Sinteza fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$

În cadrul prezentei teze de doctorat, fulerenolul pur $C_{60}(OH)_{24}$ (Figura II.7.) a fost preparat prin metoda hidrolizei alcaline³ modificată a derivatului bromurat de fulerenă $C_{60}Br_{24}$, urmată de demetalizarea produsului intermediar ($C_{60}(OK)_8(OH)_{16}$) cu rășini schimbătoare de ioni și purificare avansată prin dializă.

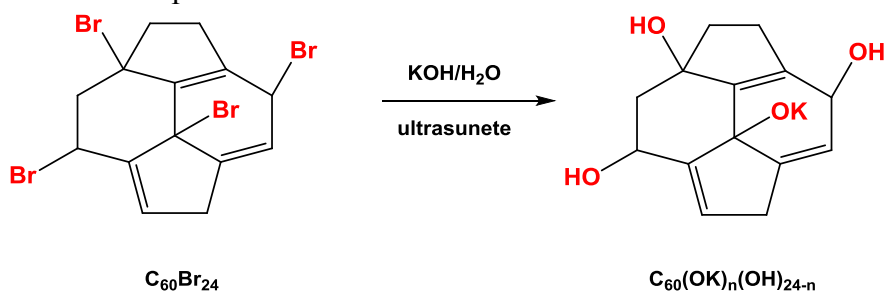


Figura II.7. Reprezentare schematică a reacției de hidroliză alcalină într-o secțiune din molecula bromurii de fulerenă.

II.2.3. Caracterizarea fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$

II.2.3.1. Spectroscopia FT-IR

Spectrul FT-IR al fulerenolului (Figura II.8.) indică prezența benzilor de absorbție atribuite grupărilor hidroxilice (C-OH) de la 3415 cm^{-1} și 1384 cm^{-1} . Banda de absorbție atribuită legături C-O este prezentă la 1047 cm^{-1} în timp ce banda atribuită legăturilor duble apare la 1618 cm^{-1} .

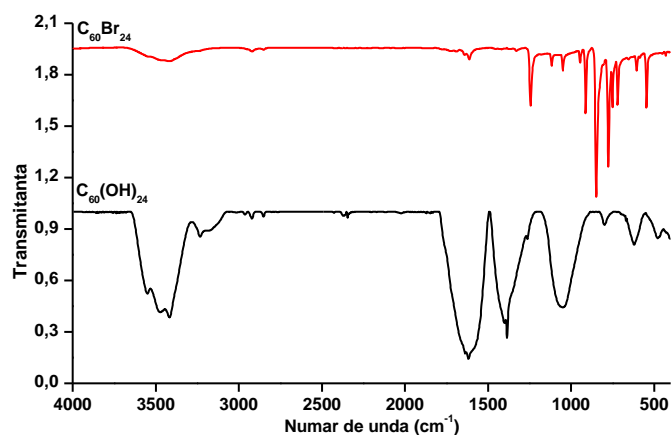
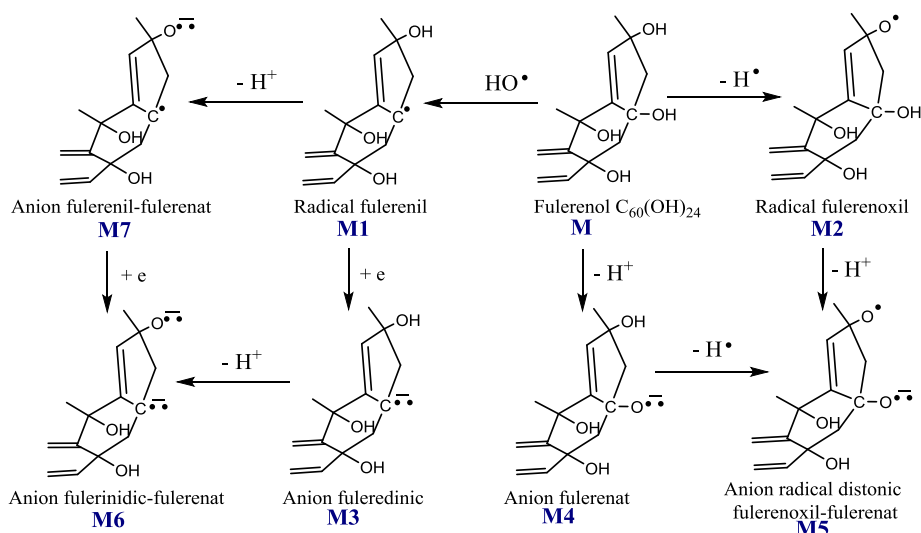


Figura II.8. Spectrele FT-IR ale derivaților $C_{60}Br_{24}$ și $C_{60}(OH)_{24}$.

II.2.3.2. Spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray (ESI-MS)

Fulerenolii sunt vizibili în ambele moduri de ionizare la un voltaj al capilarei de 4.5kV și al fragmentorului de 400V.⁴ Mecanismele de formare a anionilor fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ și a anionilor radicali distonici observați sunt indicate în Schema II.1.



Schema II.1. Reprezentare schematică a mecanismului propus pentru formarea anionilor de fulerenol și a anionilor radical distonici observați în spectrele (-)ESI-MS a soluțiilor de $C_{60}OH_{24}$ în apă.

II.2.3.2.2. Ionizarea fulerenolului în modul negativ

II.2.3.2.2.1. Fulerenol în apă

În intervalul m/z 600-1500 Da ionul cel mai abundent de la m/z 1127 Da corespunde ionului molecular $[M - H]^-$ generat prin deprotonarea fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$.

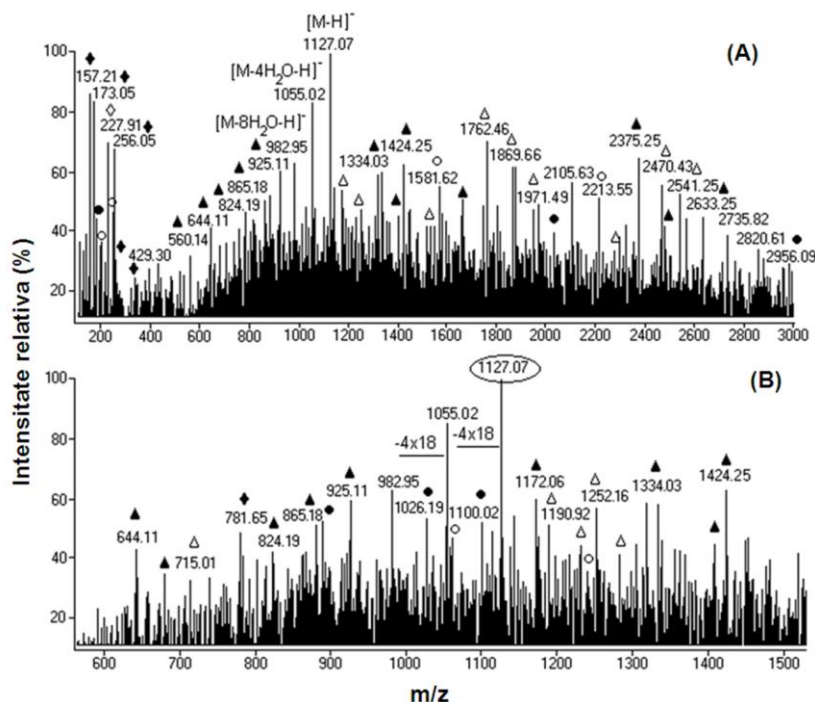
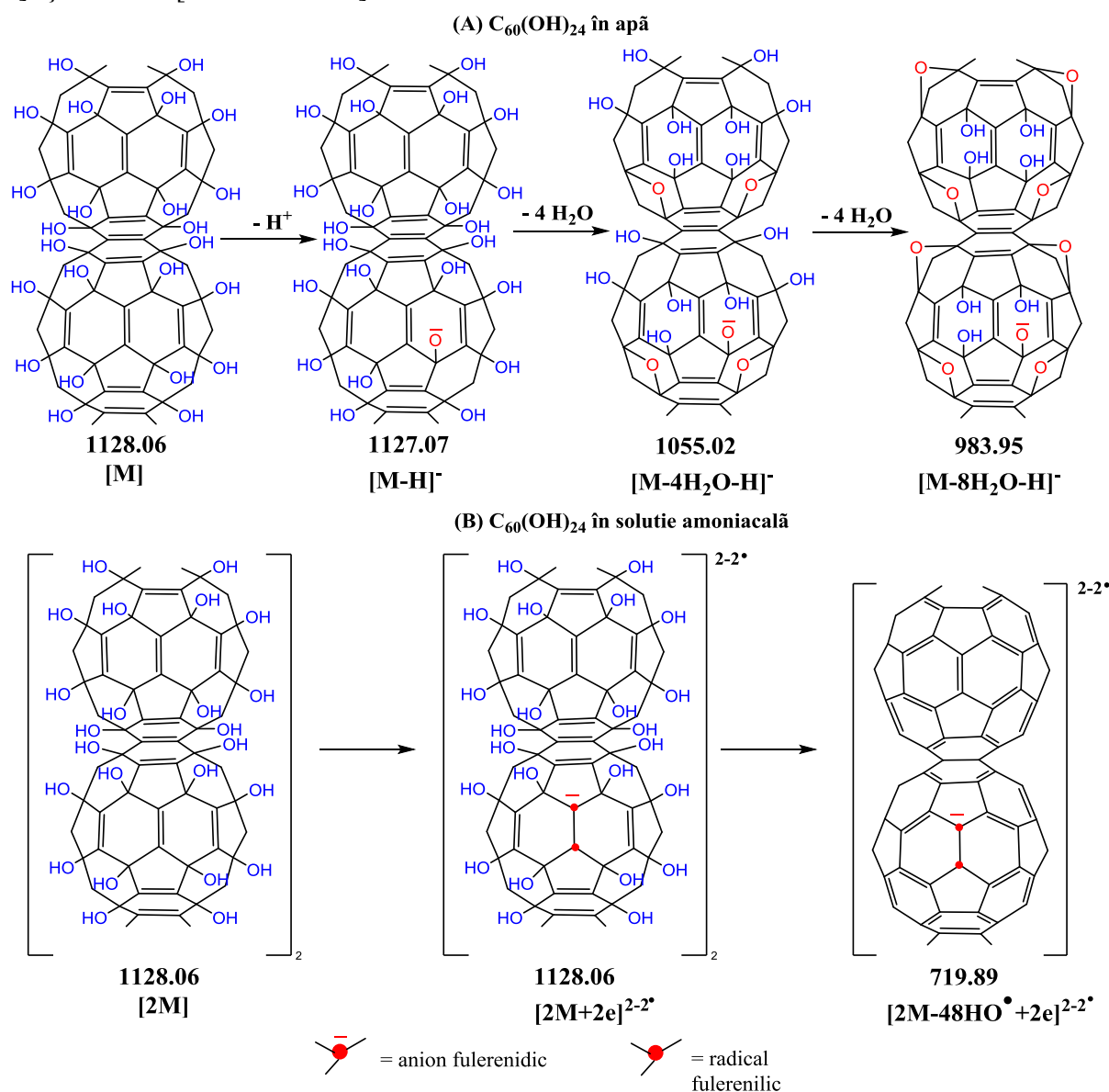


Figura II.9. Spectrul (-) ESI-MS al unei soluții 0.5×10^{-5} de $C_{60}(OH)_{24}$ în apă: (A) spectrul integral și (B) domeniu m/z 600–1500. (●) $[M(n) - nH_2O - xH]^{x-}$, (▲) $[M(n) + nH_2O(m) - xH]^{x-}$, (◆) $[M(n) - H_2O(m) - yHO^\bullet + ye - xH]^{(x+y)-}$, (○) $[M(n) - mH_2O - yH^\bullet - xH]^{x-y-}$, (Δ) $[M(n) + H_2O(m) - yH^\bullet - xH]^{x-y+-}$, (◇) $[M - mH_2O - yHO^\bullet - zH^\bullet - xH]^{x-(y+z)-}$.

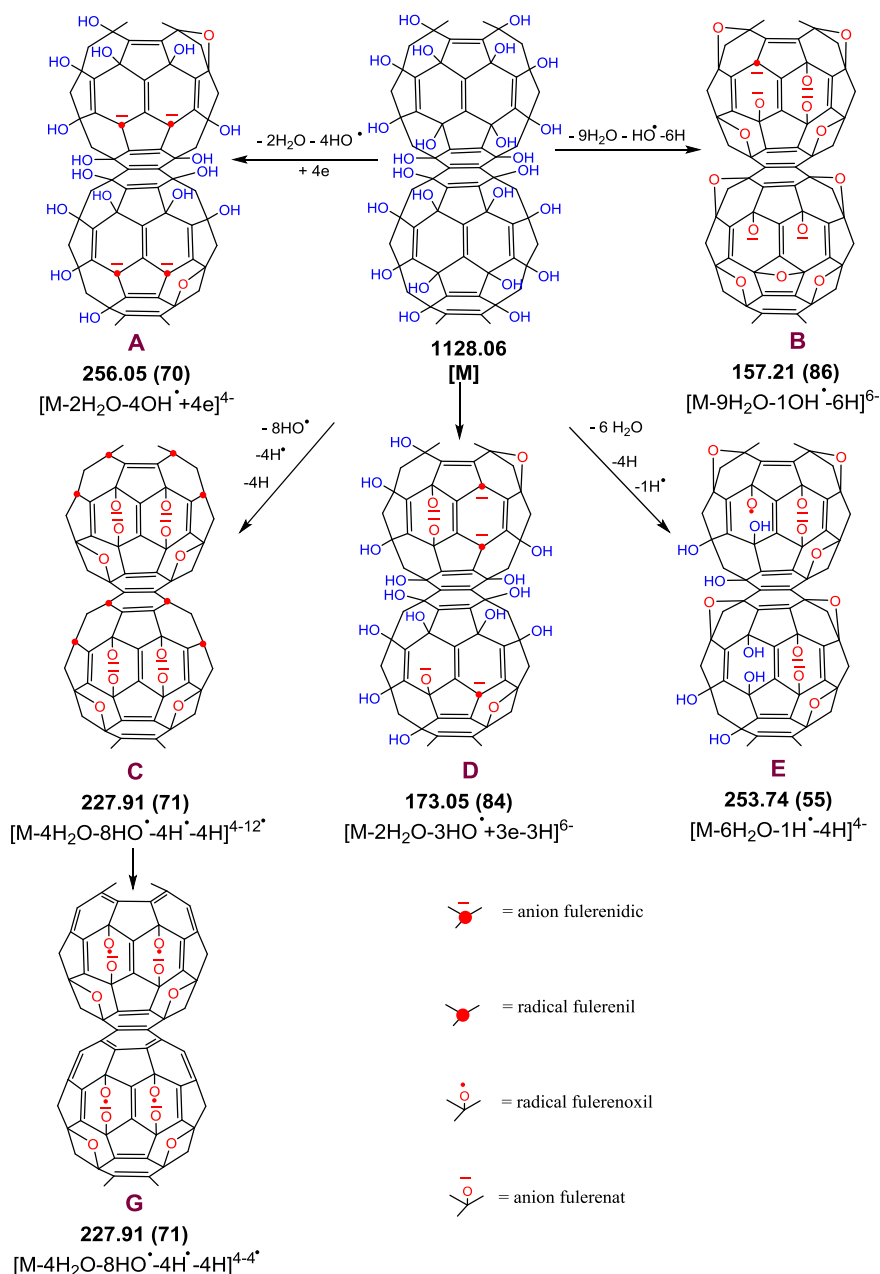
În Schema II.2.(A), sunt prezentate structurile intermediarilor ce suferă pierderi consecutive a câte 18 unități masice din molecula deprotonată $[M - H]^-$ corespunzătoare valorii

m/z de 1127 Da prin prezență de ioni cu o singură sarcină la valorile m/z de 1055 [M – 4H₂O – H]⁻ și m/z 983 [M – 8H₂O – H]⁻.



Schema II.2. Exemple de structuri propuse pentru principalele molecule deprotonate și ionii moleculari distonici observați în spectrul (-)ESI-MS al C₆₀(OH)₂₄ în apă (A) și soluție amoniacală apoasă (B).

Formarea ionilor [M – 4H₂O – H]⁻ și [M – 8H₂O – H]⁻ poate fi explicată prin mecanismele prezentate în Schema II.1. și indicate grafic în Schema II.3. Se poate presupune că în condițiile sursei de ionizare, radicalii de tip M1-fulerenil și M2-fulerenoxil sunt formați prin scindarea legăturilor C–OH și O–H. Pe măsură ce sunt generați radicalii M1 fulerenil, conținând un total de mai puțin de opt electroni impari cu distribuție aleatorie, aceștia captează electroni liberi prezenți în faza gazoasă, generând carbanioni tip fulerenid M3.



Schema II.3. Mecanismul de ionizare (-)ESI-MS propus pentru C₆₀(OH)₂₄ în apă.

II.2.3.2.2.2. Fulerenol în soluție apoasă de amoniac

Pentru a îmbunătăți procesul de ionizare a fulerenolului au fost utilizate mici cantități de soluție apoasă de amoniac. În aceste condiții au fost observați ioni cu sarcini duble corespunzător speciilor dimere doar atunci când s-a aplicat un voltaj de 4.5 kV pentru capilară și de 400 V pentru fragmentor (Figura II.10.).

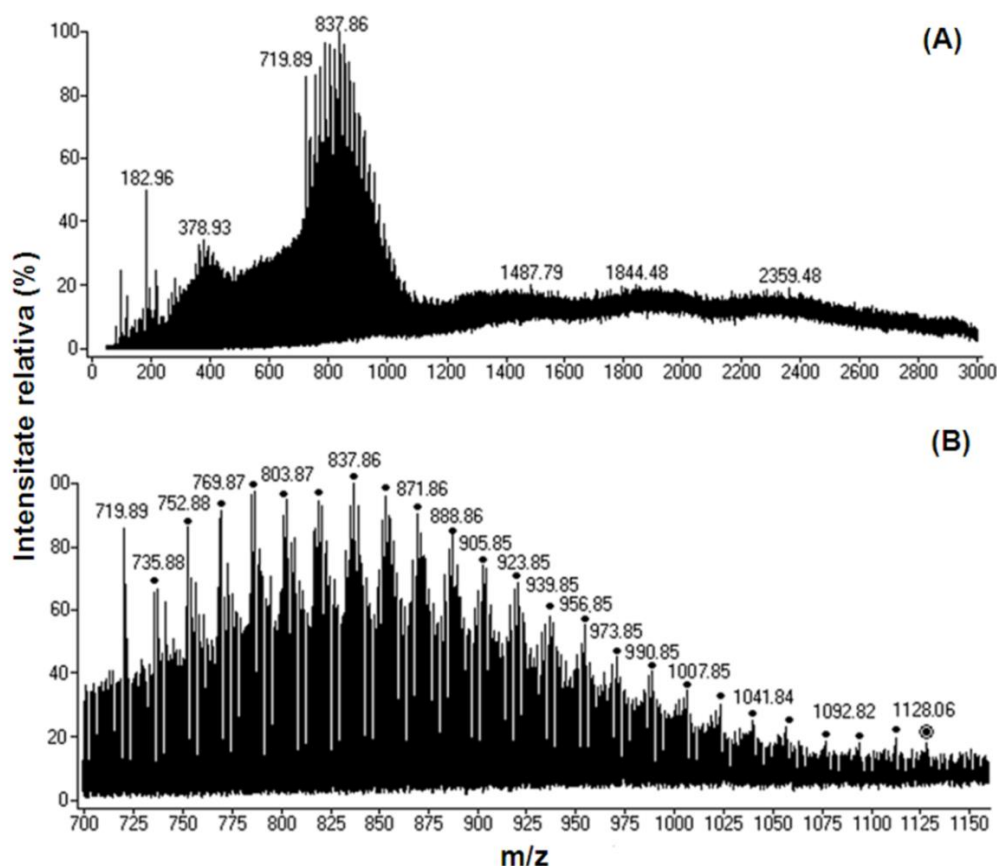
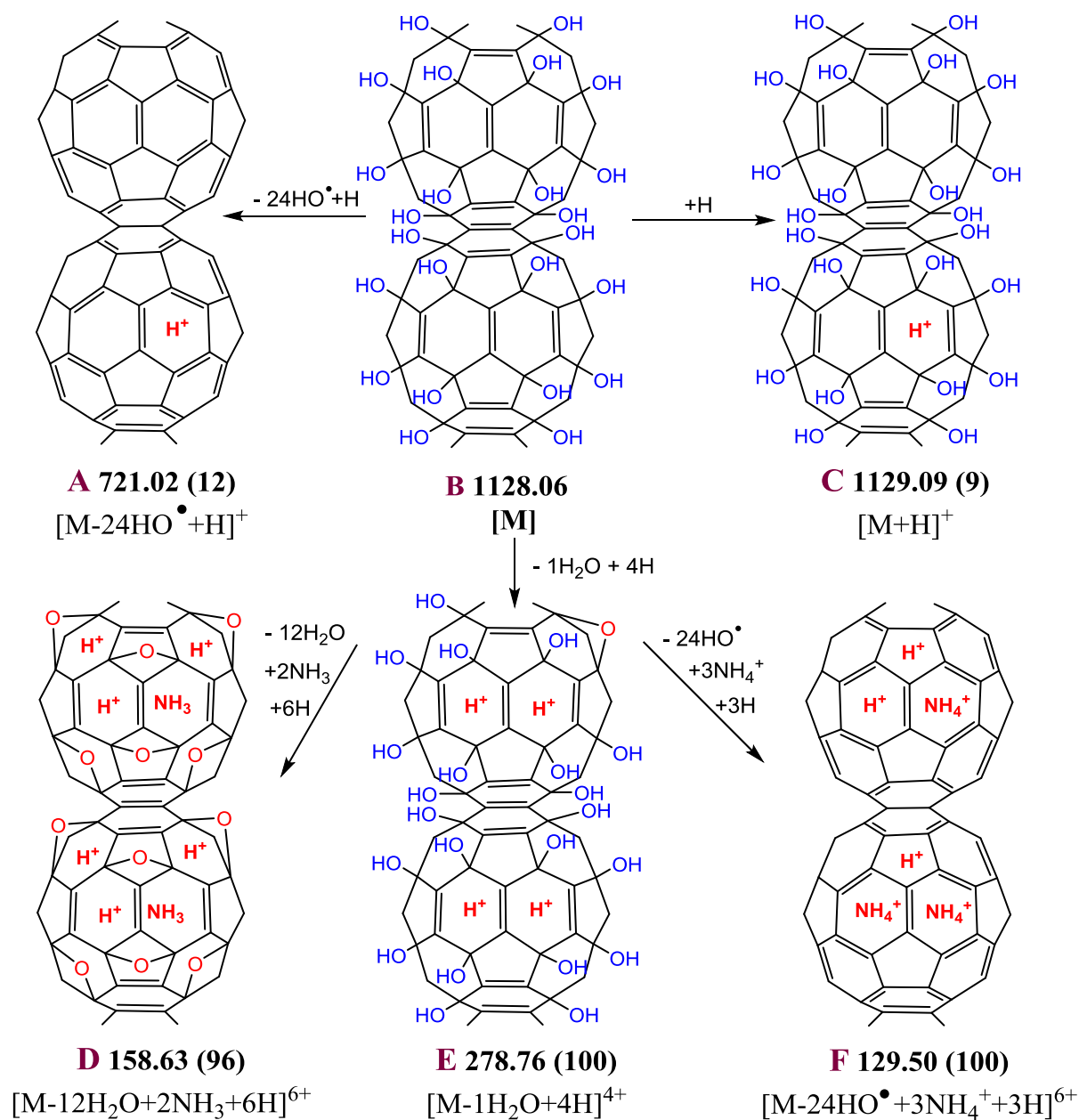


Figura II.10. Spectrul (-)ESI-MS al unei soluții apoase de $C_{60}(OH)_{24}$ 0.5×10^{-5} în amoniac: (A) spectrul integral și (B) domeniul m/z 700-1200.

Pierderi consecutive de unități masice cu m/z 17 sunt atribuite pierderii de radicali nOH ($n = 2-48$), urmate de rehibridizarea și redistribuirea de electroni de la anionul radical fulerenil, explicându-se în acest fel formarea unui anion molecular final $[2M - 48OH + 2e]^{2-}$, observat la valoarea m/z de 720 și indicat în Schema II.2. În condiții ESI, inițial este generat un radical carbanion distonic $[(C_{60}(OH)_{24}^{\bullet})^{2-}]^{\bullet}$ din H_2N^- produs prin ionizarea amoniacului, care ulterior suferă pierderi consecutive de radical OH și redistribuire electronică până când este obținută întreaga reconstrucție a structurii electronice a fulerenei C_{60} .

II.2.3.2.3. Ionizarea fulerenolului în modul pozitiv

Spectrele de masă în modul de ionizare pozitiv ale fulerenolului în soluție apoasă de amoniac au fost semnificativ diferite de spectrele înregistrate în modul de ionizare negativ. În timp ce picul predominant de bază observat pentru $C_{60}(OH)_{24}$ în modul negativ a fost $[M - H]^-$, cele observate în mod pozitiv au fost $[M - 12H_2O + 2NH_3 + 6H]^{6+}$ (96%) și $[M - H_2O + 4H]^{4+}$ (100%) (D și E în Schema II.4.) cu $10 \mu L$ 2×10^{-2} M soluție apoasă de amoniac și $[M - 24HO + 3NH_4^+ + 3H]^{6+}$ (100%) (F în Schema II.4.) cu $10 \mu L$ 3×10^{-1} M.



Schema II.4. Mecanismul de ionizare (+)ESI-MS propus pentru C₆₀(OH)₂₄ în soluție amoniacală.

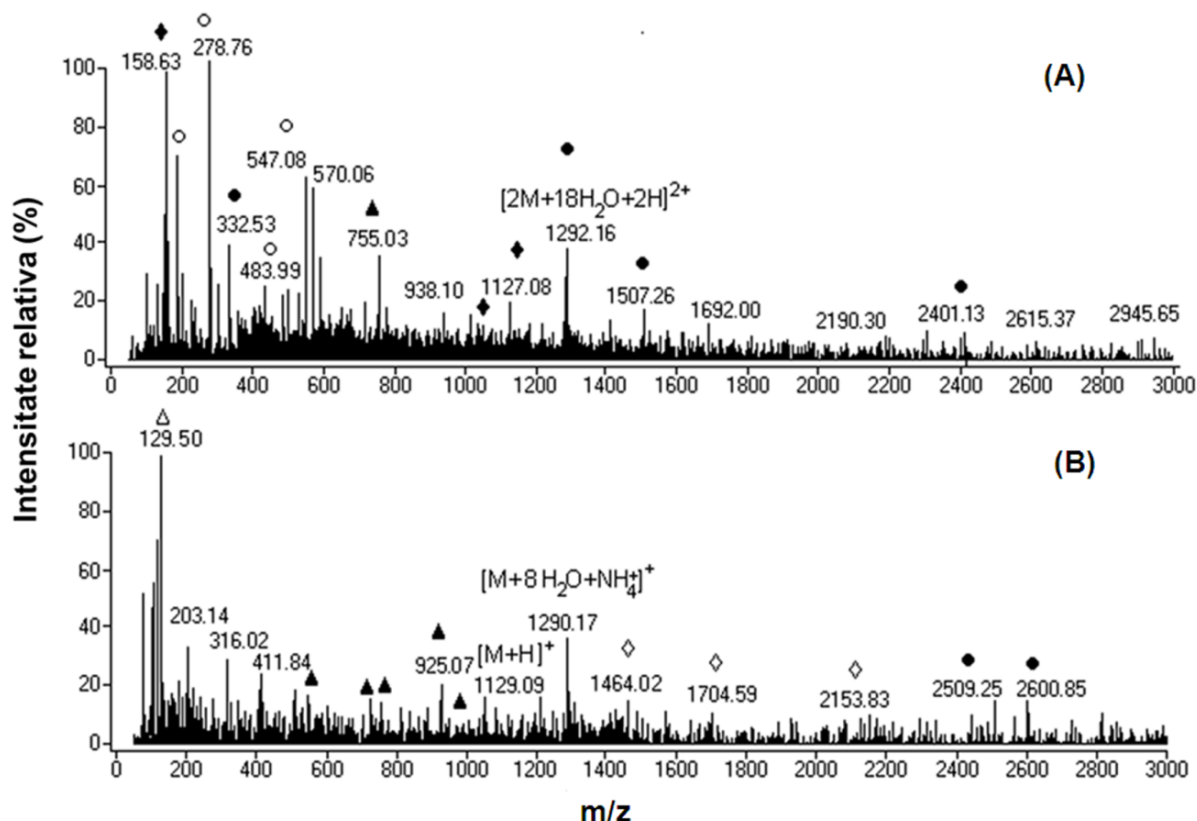


Figura II.11. Spectrele (+)ESI-MS ale soluțiilor de $C_{60}(OH)_{24}$ în (a) 3×10^{-1} M și (b) 2×10^{-2} M soluții amoniacale apoase. (●) $[M(n) + H_2O(m) + xH]^x+$, (▲) $[M(n) - OH(m) + xH]^x+$, (◆) $[M(n) - H_2O(m) + nNH_3 + xH]^x+$, (○) $[M(n) - H_2O(m) + xH]^x+$, (△) $[M(n) - OH(m) + yNH_4^+ + xH]^{(x+y)+}$, (◇) $[M(n) + H_2O(m) + nNH_3 + xH]^x+$.

II.2.4. Testarea capacității de marker fluorescent a derivatului $C_{60}(OH)_{24}$ pentru cuantificarea acizilor nucleici dublu catenari prin spectroscopie de fluorescență

Profilul curbei de emisie a fulerenolului la diferite concentrații constituie baza înțelegerii perturbațiilor ulterioare asupra norului electronic al fulerenolului în prezența ADNdc. În acest sens, s-au înregistrat spectrele de emisie ale fulerenolului și ale ADNdc de somon în apă la diferite concentrații și diferite lungimi de undă de excitație (λ_{ex}). Pentru a acoperi un interval larg de concentrații de fulerenol ($1 \times 10^{-9} \div 4.5 \times 10^{-5}$ mol·L⁻¹), lungimile de undă de excitație (λ_{ex}) și de emisie (λ_{em}) luate în considerare pentru măsurătorile de fluorescență din cadrul acestui studiu au fost $\lambda_{ex} = 420$ nm, respectiv $\lambda_{em} = 469$ nm când picul specific fulerenolului (469 nm) nu se suprapune peste picul specific ADN-ului (492 nm) (Figura II.16).⁵

În Figura II.14.(A), sunt prezentate spectrele de emisie ale complexelor ADN-fulerenol, $\lambda_{ex} = 420$ nm, în care concentrația de ADNdc a fost menținută constantă, iar concentrația de fulerenol a fost crescătoare, păstrându-se intervalele de concentrație optime, determinate anterior. Creșterea concentrației de fulerenol determină o creștere puternică a intensității de fluorescență, specifică fulerenolului, de la 50 u.a. la 500 u.a., fără a se produce vreo deplasare perceptibilă a maximumului de emisie de la 469 nm.

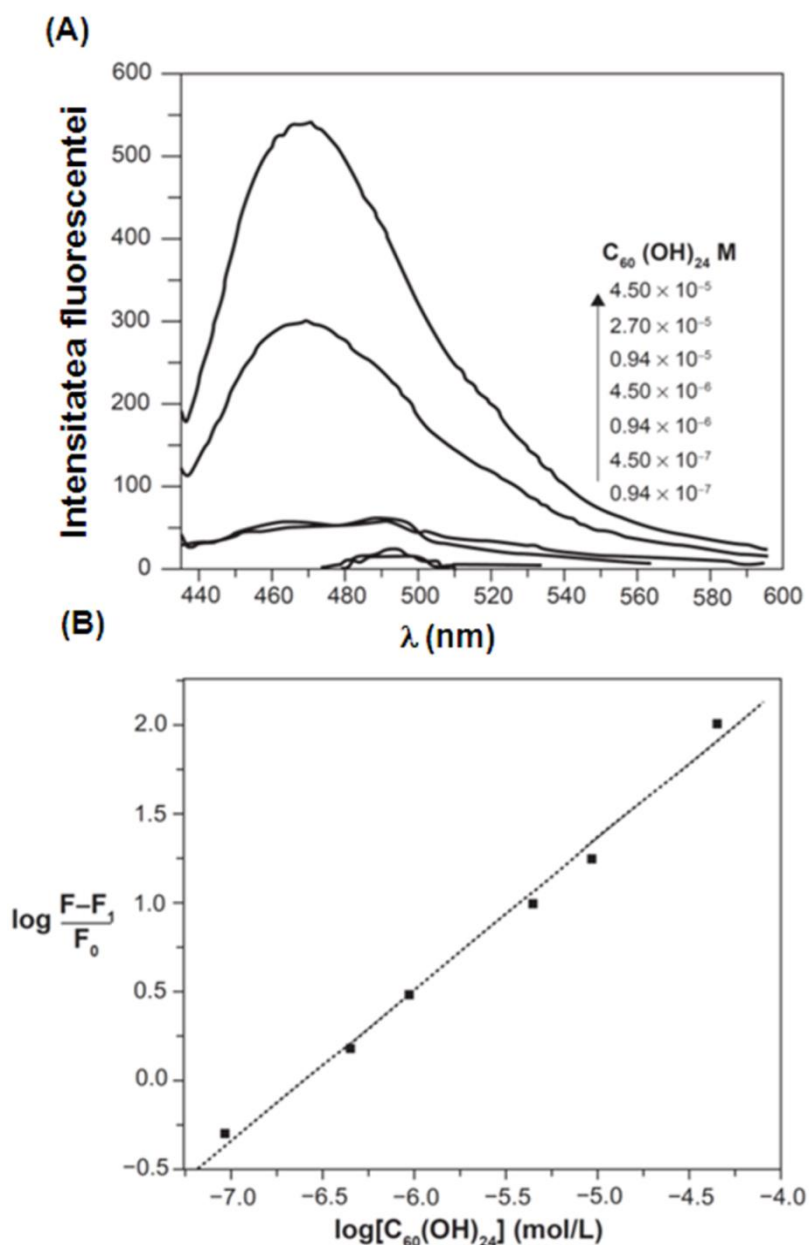
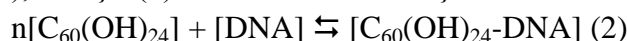


Figura II.14. Datele de fluorescență ale $C_{60}(\text{OH})_{24}$ în prezență de ADNdc. (A) Spectrele de emisie de fluorescență ale fulerenolului în prezență de ADNdc pentru $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm, în funcție de concentrația de fulerenol: (A) $[\text{ADNdc}] = 6.31 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B) Reprezentarea grafică $\log[C_{60}(\text{OH})_{24}]$ vs. $\log(\text{variația intensității de fluorescență a complexului } C_{60}(\text{OH})_{24} - \text{ADNdc})$; $[C_{60}(\text{OH})_{24}]$ în intervalul $0,94 \times 10^{-7} \div 4.5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ și $[\text{ADNdc}] = 6,31 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; abaterea medie standard: 0,17%.

În vederea determinării abilității de legare a ADN-ului de către fulerenol, se reprezintă grafic (Figura II.14.(B).), ecuația (7) care derivă din ecuația de echilibru (2):



$$K = \frac{[C_{60}(\text{OH})_{24}\text{-DNA}]}{[C_{60}(\text{OH})_{24}]^n [\text{DNA}]} \quad (3)$$

$$[C_{60}(\text{OH})_{24}\text{-DNA}] = K[C_{60}(\text{OH})_{24}]^n [\text{DNA}] \quad (4)$$

$$\log [C_{60}(\text{OH})_{24}\text{-DNA}] = \log K + n \log [C_{60}(\text{OH})_{24}] + \log [\text{DNA}] \quad (5)$$

$$\log \frac{[C_{60}(\text{OH})_{24}\text{-DNA}]}{[\text{DNA}]} = \log K + n \log [C_{60}(\text{OH})_{24}] \quad (6)$$

$$\log (F-F_1/F_0) = \log K + n \log [C_{60}(\text{OH})_{24}] \quad (7)$$

unde:

F_1 - reprezintă intensitatea de fluorescență a fulerenolului în absența ADN-ului;

F_0 - reprezintă intensitatea de fluorescență a ADN-ului în absența fulerenolului la $\lambda_{\text{em}} = 467$ nm și $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm;

F - reprezintă intensitatea de fluorescență a complexului ADN-fulerenol la $\lambda_{\text{em}} = 467$ pentru diferite concentrații de fulerenol (Figura II.14.(A).);

n - numărul de molecule de fulerenol asociate cu o pereche de baze azotate din molecula de ADN.

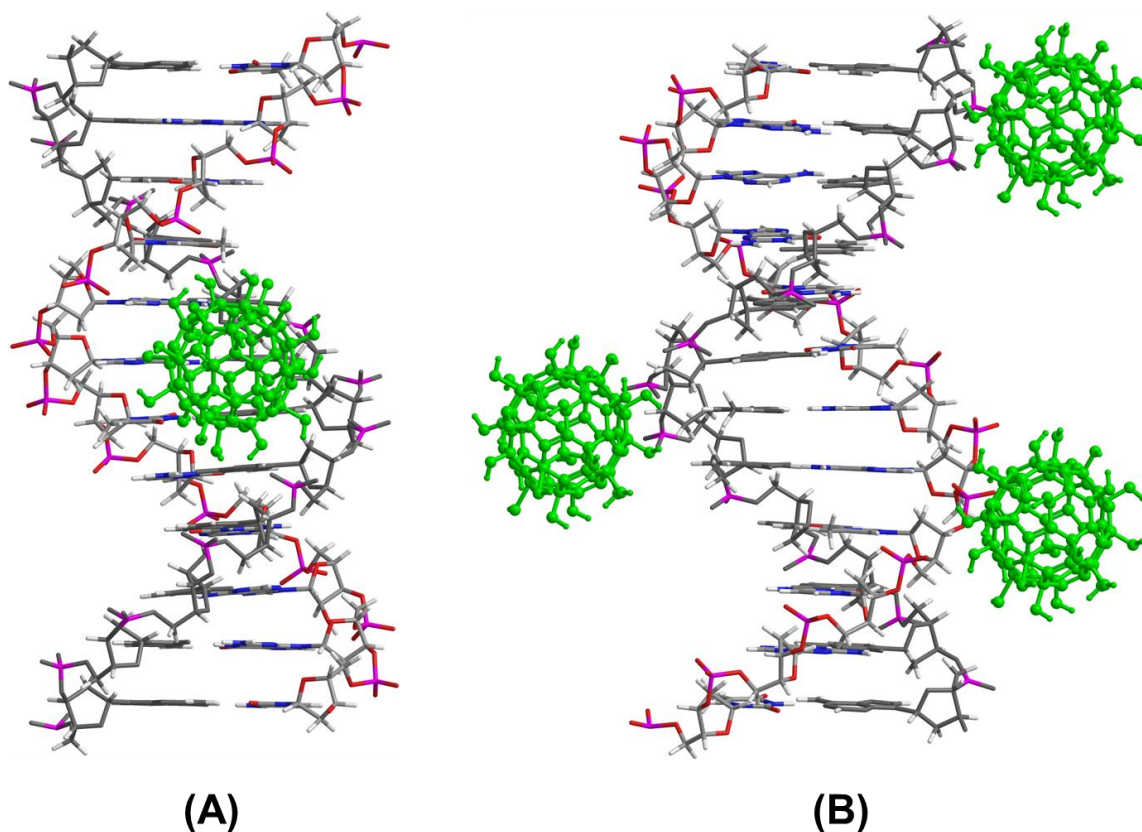
Din reprezentarea grafică $\log(F-F_1)/F_0$ funcție de $\log[C_{60}(\text{OH})_{24}]$ conform ecuației (7) rezultă graficul din Figura II.14.(B). care respectă o variație liniară cu panta dreptei pozitive. Din acest grafic prin intersecția dreptei cu axa Y rezultă valoarea $\log K$, iar panta dreptei reprezintă valoarea n ; au fost estimate valorile: $K = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 0.8 \pm 0.2$.

În ceea ce privește natura interacțiunilor dintre fulerenol și ADN, pot fi luate în considerație doar interacțiunile de tip legături de hidrogen. Legăturile de hidrogen joacă un rol⁶ principal în cazul interacțiunilor dintre fulerenol și proteine. Prin urmare, cea mai probabilă este legarea fulerenolului la nivelul concavității majore din structura ADNdc prin intermediul legăturilor de hidrogen stabilite între grupările hidroxilice ale fulerenolului și grupările aminice libere sau implicate în legături de hidrogen aparținând bazelor azotate din ADNdc.

Din graficul liniar reprezentat în Figura II.14.(B). corespunzător ecuației (2), valoarea lui n (numărul de molecule de fulerenol/pereche de baze azotate) a fost estimată a fi de 0.8 ± 0.2 . Această valoare sugerează faptul că o singură moleculă de fulerenol este asociată cu o pereche de baze azotate din ADN.

Fulerenolul $C_{60}(\text{OH})_{24}$ este caracterizat de o structură tridimensională globulară al cărui diametru este de 9.8 Å și în consecință nu poate pătrunde în concavitățile minore (6Å) a ADN-ului dublu catenar. Concavitățile majore a ADN-ului este de 12 Å și poate acomoda perfect molecula de fulerenol. Ținând cont de aceste considerente s-a propus modelul prezentat în Schema II.5.(A).

În urma interacției fulerenolului cu sarea de sodiu a ADN (Figura II.16.), intensitatea fluorescenței fulerenolului scade ceea ce sugerează că doar în absența formării legăturilor de hidrogen $\text{P-OH}_{\text{ADN}}\text{-OH}_{\text{fulerenol}}$, $C_{60}(\text{OH})_{24}$ se leagă de bazele azotate la nivelul concavității majore, conform aceluiași model fără intercalări, ceea ce modifică semnificativ structura spațială locală. În condițiile experimentale date, putem presupune că modul principal de legare al fulerenolului de molecula de ADNdc nativ este realizată prin intermediul legăturilor de hidrogen stabilite cu grupările fosfat, în afara helixului catenei de ADN (Schema II.5.(B).).



Schema II.5. Legarea fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ la ADNdc: (A) Legarea fulerenolului la nivelul concavității majore al moleculei de ADN sare de sodiu; (B) Legarea fulerenolului în exteriorul catenei de ADNdc.

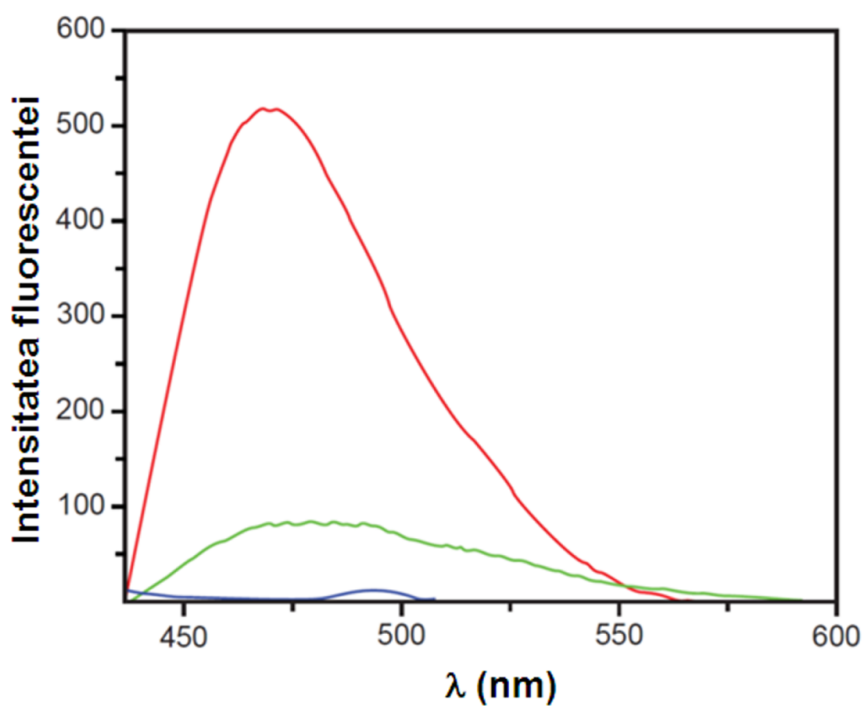


Figura II.16. Spectrele de emisie ale $C_{60}(OH)_{24}$ (linia roșie), ADNdc sare de sodiu (linia albastră) și complexul $C_{60}(OH)_{24}$ -ADNdc-sare de sodiu (linia verde), $\lambda_{ex}=420$ nm.

Capitolul III. Vectori non-virali utilizați în transfecția ADN

III.2. Sinteza conjugatului C₆₀-PEG-PEI

Conjugatul C₆₀-PEG-PEI a fost sintetizat prin reacția de adiție a aminelor alifactice la legăturile duble din fulerena C₆₀.^{7,8} În prima etapă a fost realizată conjugarea moleculelor C₆₀ cu molecule de PEG cu funcțiuni aminice terminale (CH₃O-PEG-NH₂·HCl), în raport molar 1/1, urmată de conjugarea polietileniminei, la temperatura camerei în solvenți nepolari fără a exclude lumina ambientală⁹ (Figura III.2.).

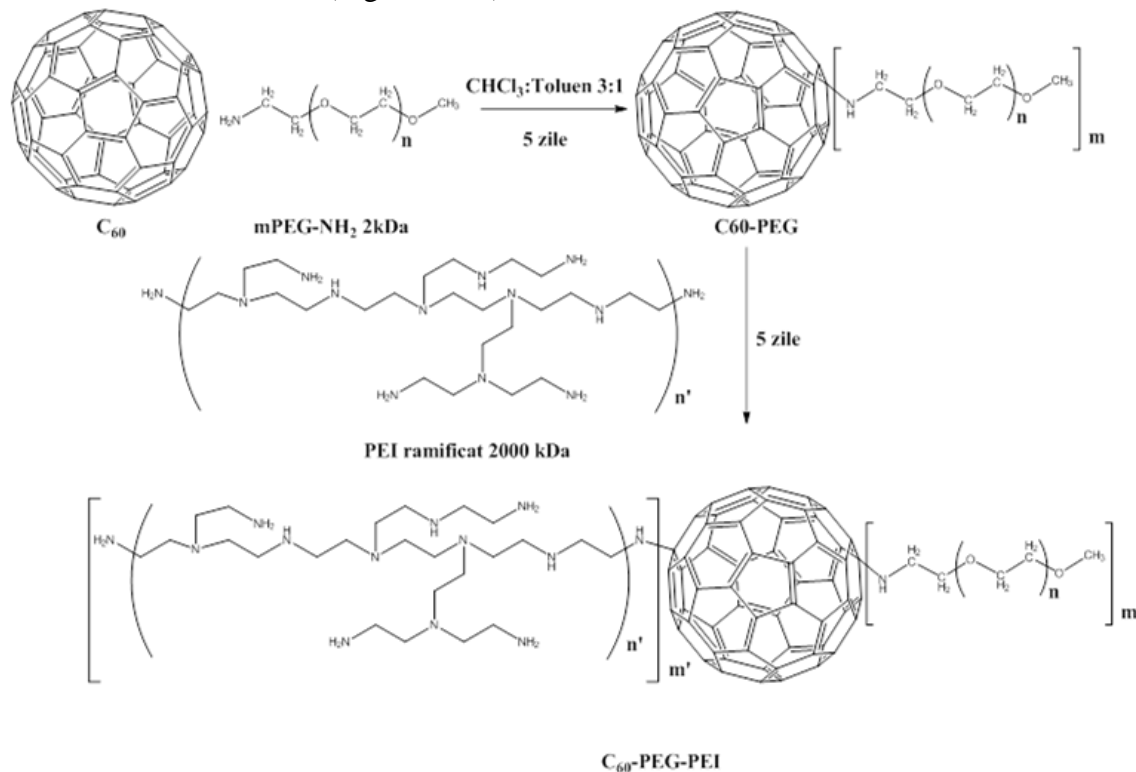


Figura III.2. Reprezentare schematică a sintezei conjugatului C₆₀-PEG-PEI.

III.3. Caracterizarea structurală a conjugatului C₆₀-PEG-PEI

III.3.1. Caracterizarea conjugatului C₆₀-PEG-PEI prin spectroscopie ¹H și ¹³C RMN

Spectrul ¹H RMN al C₆₀-PEG-PEI (Figura III.5.) este foarte asemănător cu cel corespunzător precursorilor PEI și PEG. Protonii corespunzători segmentului de PEI (N-CH₂-CH₂), sunt practic neschimbați. Semnalele corespunzătoare protonilor din lanțul de PEG prezintă deplasări chimice diferite în funcție de poziția acestora: semnalele corespunzătoare protonilor grupărilor O-CH₂-CH₂-O din lanțul principal (3.71 ppm) și cele atribuite grupărilor terminale CH₃O- (3.39 ppm) par neschimbate în urma adăției, în timp ce protonii din grupările terminale de tipul O-CH₂-CH₂-NH-C₆₀ sunt deplasate spre câmpuri mai înalte cu câte 0.2 respectiv 0.4 ppm.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz)

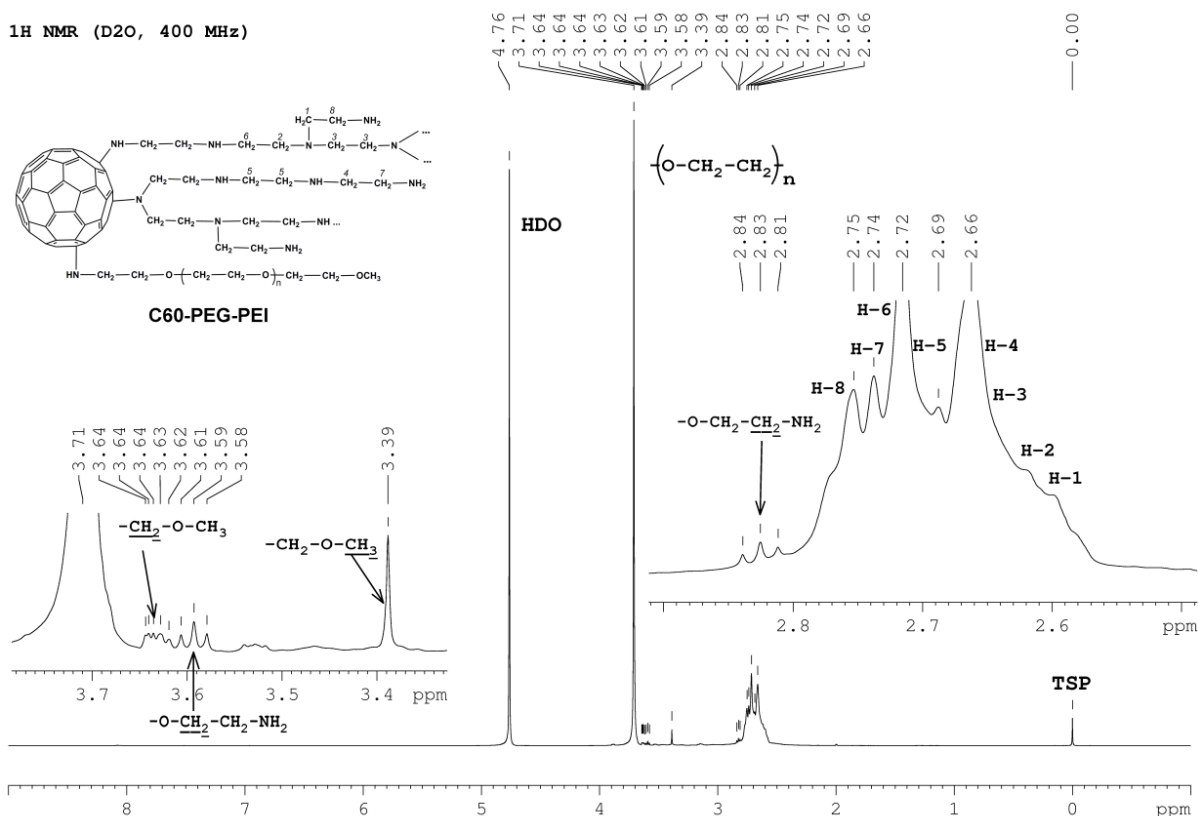


Figura III.5. Spectrul ¹H RMN al conjugatului C₆₀-PEG-PEI.

În spectrul ¹³C RMN al conjugatului C₆₀-PEG-PEI este vizibilă regiunea caracteristică fullerenei sub forma unui semnal foarte larg în intervalul 130-160 ppm atribuită atomilor de carbon sp² (Figura III.8.). Lărgirea semnalelor atomilor de carbon sp² (specifiți C₆₀) poate fi atribuită schimbării simetriei fullerenei ca urmare a adăugării precursorilor PEI și PEG. Semnalele specifice atomilor de carbon din secvențele O-CH₂-CH₂-O din lanțul principal (72.3 ppm) și din grupările terminale CH₃O- (60.9 ppm) din PEG sunt neschimbate, în timp ce semnalele atribuite atomilor de carbon din secvențele terminale -O-CH₂-CH₂-NH-C₆₀ sunt deplasate semnificativ către câmpuri mai joase cu 5.4 respectiv 0.6 ppm. Observațiile privind deplasările fie a protonilor (din spectrul ¹H RMN) fie a atomilor de carbon (din spectrul ¹³C RMN) din secvențele terminale pot fi atribuite conversiei grupărilor aminice primare în amine secundare și indirect confirmă grefarea moleculelor de PEG și PEI pe suprafața fullerenei C₆₀.

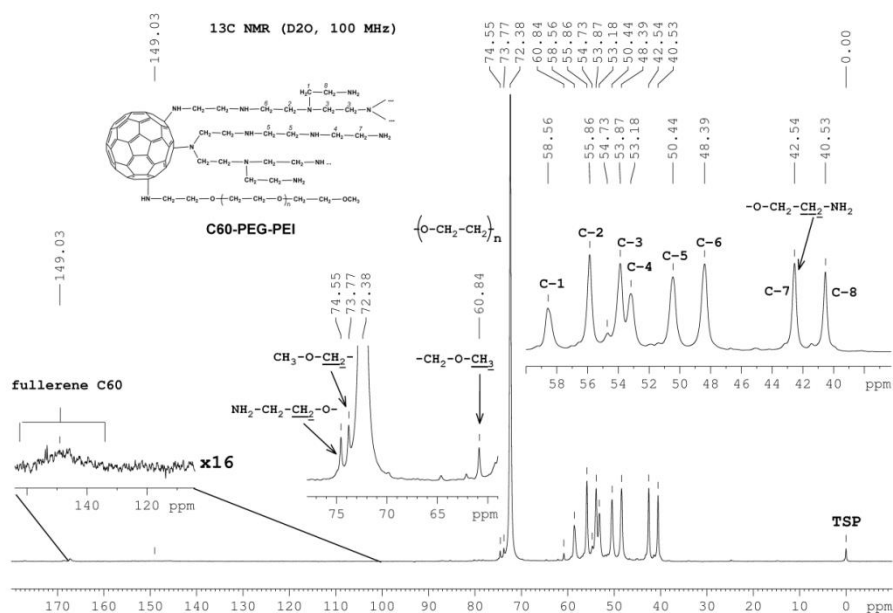


Figura III.8. Spectrul ^{13}C RMN al conjugatului C_{60} -PEG-PEI.

III.3.2. Caracterizarea conjugatului C_{60} -PEG-PEI prin spectroscopie XPS

Spectrele XPS de largă scanare ale C_{60} -PEG-PEI, PEI și PEG prezintă picurile caracteristice C 1s la 285 eV, N 1s la 398 eV și O 1s la 540 eV în concentrații diferite, în funcție de compusul analizat (Figura III.9., Tabel III.1.). Compozițiile elementale determinate din spectrele integrale ale PEG, PEI și C_{60} -PEG-PEI (Tabel III.1.) au permis estimarea raportului molar al componentilor din conjugatul C_{60} -PEG-PEI, putându-se concluziona că la o moleculă de C_{60} sunt atașate 2.5 molecule de PEI și 0.9 molecule de PEG.

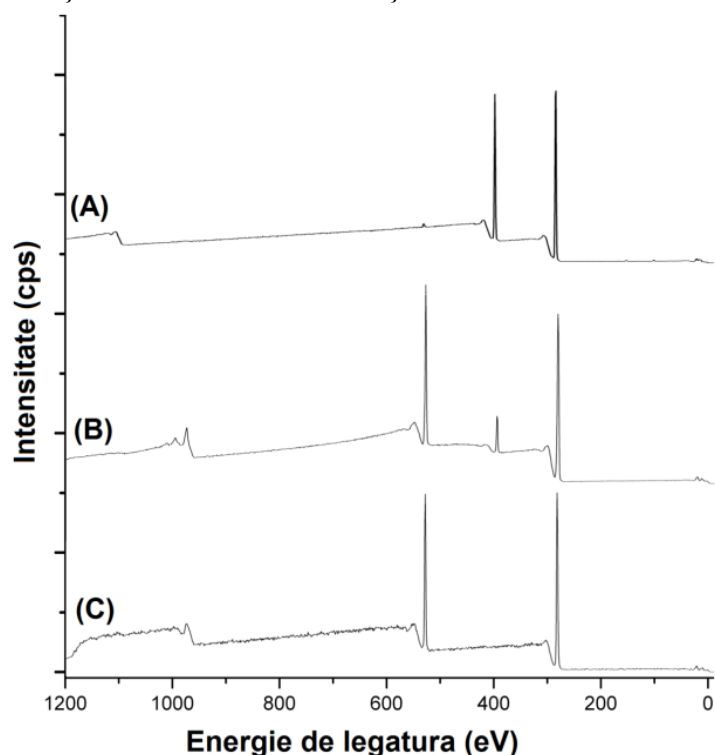


Figura III.9. Spectrele XPS de scanare largă: (A) PEI; (B) C_{60} -PEG-PEI; (C) mPEG-NH₂.

Tabel III.1. Compoziția elementală obținută din spectrele XPS de scanare largă

Codul probei	Procente gravimetrice (%)		
	C	N	O
PEI	62.01	37.99	-
C ₆₀ -PEG-PEI	67.52	25.00	7.48
PEG	68.74	0.80	30.46

III.3.3. Caracterizarea conjugatului C₆₀-PEG-PEI prin spectroscopie FT-IR

Spectrul FT-IR al conjugatului C₆₀-PEG-PEI a evidențiat atașarea lanțurilor de PEG și PEI prin prezența benzilor caracteristice precursorilor polimerici, în timp ce benzile caracteristice C₆₀ nu pot fi indentificate din cauza suprapunerii peste picurile provenite din PEG și PEI. În spectrul conjugatului C₆₀-PEG-PEI sunt prezente benzile specifice grupărilor aminice secundare la 3354 și 3286 cm⁻¹. Banda atribuită grupărilor aminice primare este deplasată de la 1659 cm⁻¹ în PEI la 1663 cm⁻¹ în spectrul conjugatului. De asemenea, spectrul FT-IR al C₆₀-PEG-PEI conține și banda specifică grupărilor metilenice de la 2885 cm⁻¹, datorată grupărilor metilenice din lanțurile de PEG și PEI cât și benzile specifice legăturilor eterice (-C-O-C-) la 1280 și 1143 cm⁻¹. Deconvoluția spectrelor FT-IR ale amestecului fizic PEI/PEG=2.5/1 și C₆₀-PEG-PEI din regiunea 1740-1500 cm⁻¹ (Figura III.12.), specifică pentru amina primară (1600 cm⁻¹) și secundară (1500 cm⁻¹), a permis calcularea raportului integralelor acestora pentru fiecare probă (PEI/PEG=2.5/1 și C₆₀-PEG-PEI ca fiind 0.64, respectiv 0.55 unități), demonstrându-se că reacția fullerenei cu PEI are loc în special prin intermediul grupărilor aminice primare. Rezultatele sunt în concordanță cu estimările compoziționale calculate prin XPS.

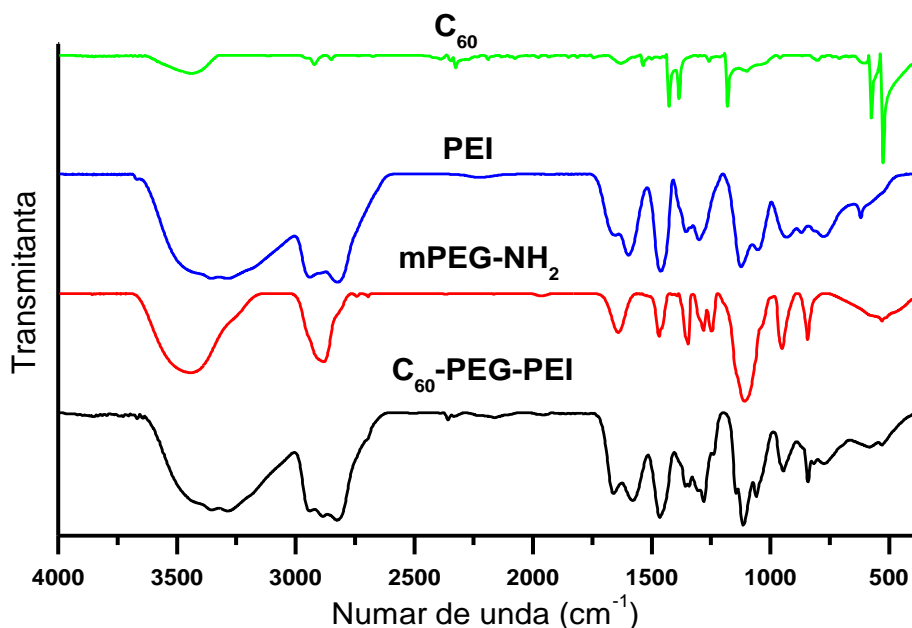


Figura III.11. Spectrele FT-IR ale precursorilor C₆₀, PEI și PEG și conjugatului și C₆₀-PEG-PEI

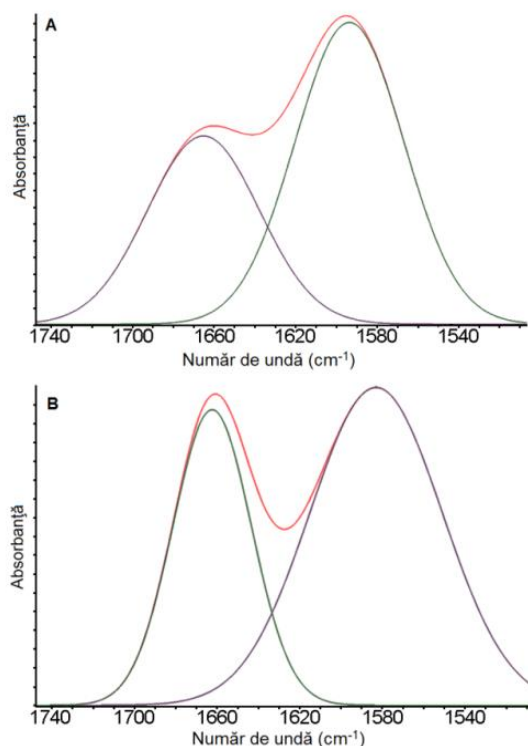


Figura III.12. Deconvoluția benzilor de absorbție specifice aminei primare și secundare din spectrele FT-IR pentru: (A) amestec fizic PEI și PEG în raport molar 2.5/1; (B) conjugatul C₆₀-PEG-PEI.

III.3.4. Caracterizarea conjugatului C₆₀-PEG-PEI prin analiză termogravimetrică

În cazul conjugatului C₆₀-PEG-PEI, prima etapă de descompunere termică observată este compusă din două trepte, ușor suprapuse, în domeniul de temperatură 93-174 °C caracterizate de pierderi de masă de 4% și respectiv 6%. Aceste stagii au fost atribuite eliminării urmelor de solvent și respectiv pierderii de amoniac din structura polietileniminei. Atașarea precursorilor PEI și PEG pe suprafața moleculei de fulerenă a fost reflectată printr-o scădere a stabilității termice a conjugatului C₆₀-PEG-PEI până la o temperatură de 285 °C față de 300 °C, observată în cazul mPEG-NH₂. Alte diferențe în modalitatea de degradare a polietileniminei pure cât și cea corespunzătoare conjugatului constau într-o creștere a stabilității termice în raport cu cea corespunzătoare PEI pur (285 °C pentru C₆₀-PEG-PEI față de 270 °C pentru PEI). Conjugatul C₆₀-PEG-PEI a prezentat o pierdere de masă inițială de 50% în intervalul de temperatură 285-372 °C, valoare dublă față de pierderea caracteristică PEI pur în intervalul 270-345 °C (25%). A doua pierdere de masă, de 35%, a fost observată pentru C₆₀-PEG-PEI în intervalul 372-430 °C, aproximativ jumătate din pierderea de masă a PEI pur în intervalul 350-420 °C (65%).

Compoziția conjugatului determinată din pierderile în greutate, confirmă faptul că la o moleculă de C₆₀ corespund în medie 2.5 molecule de PEI și 1 moleculă de PEG.

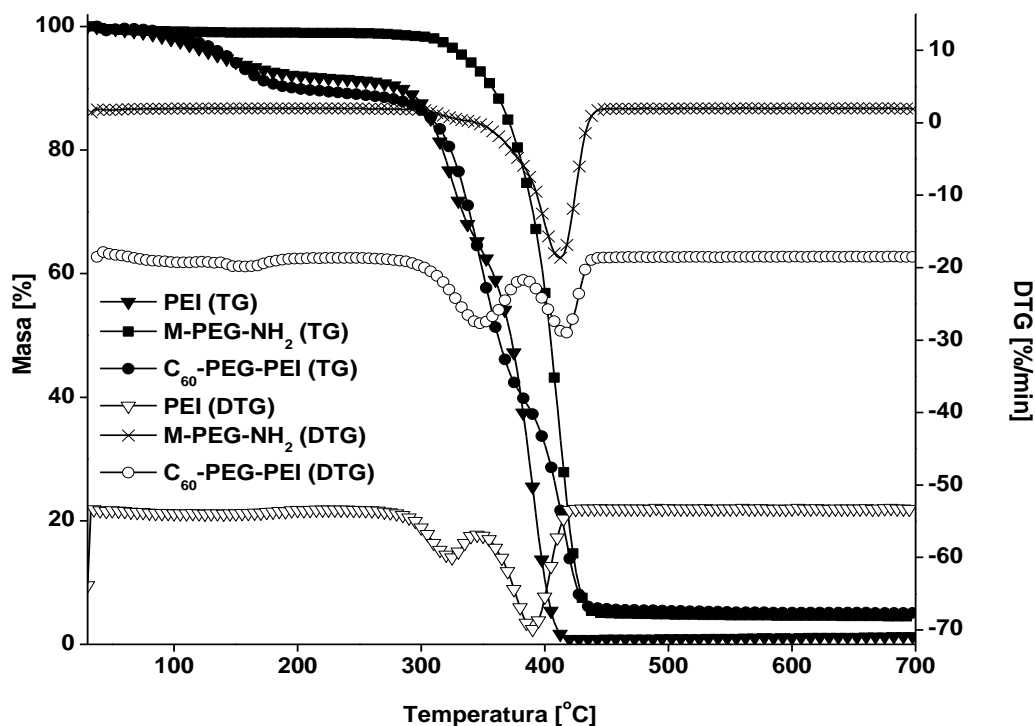


Figura III.13. Caracterizarea termică comparativă pentru precursorii PEI și PEG, și pentru conjugatul sintetizat C₆₀-PEG-PEI.

III.4. Prepararea și caracterizarea poliplexului C₆₀-PEG-PEI/acid nucleic dublu catenar (C₆₀-PEG-PEI/ADNdc)

În vederea evaluării capacității de complexare a conjugatului C₆₀-PEG-PEI și a precursorului PEI au fost preparați poliplexși de tipul C₆₀-PEG-PEI/ADN sau PEI/ADN prin amestecarea vectorului non-viral sau a PEI necomplexat cu două tipuri de ADNdc (~200 bp și ~4700 bp). În prepararea poliplexșilor a fost luată în considerare compoziția calculată ca raport molar N/P, unde *N* reprezintă conținutul de azot din conjugat, iar *P* este conținutul de fosfor din acidul nucleic.

III.4.1. Evaluarea poliplexului C₆₀-PEG-PEI prin măsurători de potențial zeta

În Figura III.15. sunt prezentate măsurătorile de potențial zeta ale poliplexului C₆₀-PEG-PEI/ADNdc (~200 sau ~4700 bp) la diferite rapoarte N/P. Poliplexșii formați au încărcare globală negativă atunci când raportul N/P este cuprins în intervalul 3-10 unități, concluzionând că nu toate sarcinile negative ale ADN-ului au fost neutralizate de PEI. În cazul poliplexșilor cu N/P > 10, s-a observat o neutralizare a sarcinilor negative ale ADN-ului. Odată cu creșterea raportului N/P este evidentă o neutralizare totală a sarcinilor negative din ADN, iar valorile potențialului zeta devin pozitive și crescătoare până se atinge un platou (între 15-20 mV). Valorile de potențial nu sunt influențate de tăria ionică a sistemului în mod dramatic (Figura III.15.).

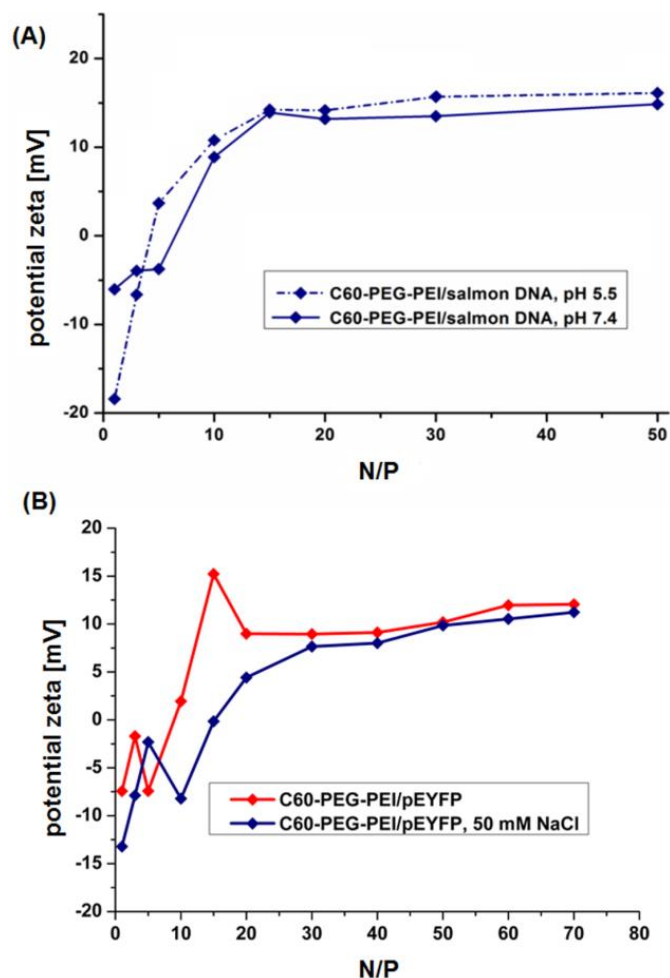


Figura III.15. Variația potențialului zeta în funcție de raportul N/P și tăria ionică ale poliplexșilor (A) C₆₀-PEG-PEI/ADNdc din spermă de somon; (B) C₆₀-PEG-PEI/pEYFP ADN.

III.4.2. Evaluarea dimensională și morfologică a poliplexșilor prin microscopie de forță atomică

Imaginile AFM (Figura III.16.) indică o structură mult mai compactă a poliplexșilor în comparație cu conjugatul C₆₀-PEG-PEI individual, acesta având tendința de a se auto-asambla în agregate puternic hidratate în mediu apos, în nanoparticule de formă sferică cu un diametru mediu de 79 nm. Particulele de poliplex C₆₀-PEG-PEI/pEYFP corespunzătoare raportului N/P = 10 au prezentat morfologie sferică cu diametrul mediu de 48 nm. Diametrul mediu al poliplexului este mai mic decât cel al conjugatului liber, demonstrându-se o capacitate bună de împachetare a plasmidului EYFP de către conjugatul C₆₀-PEG-PEI.

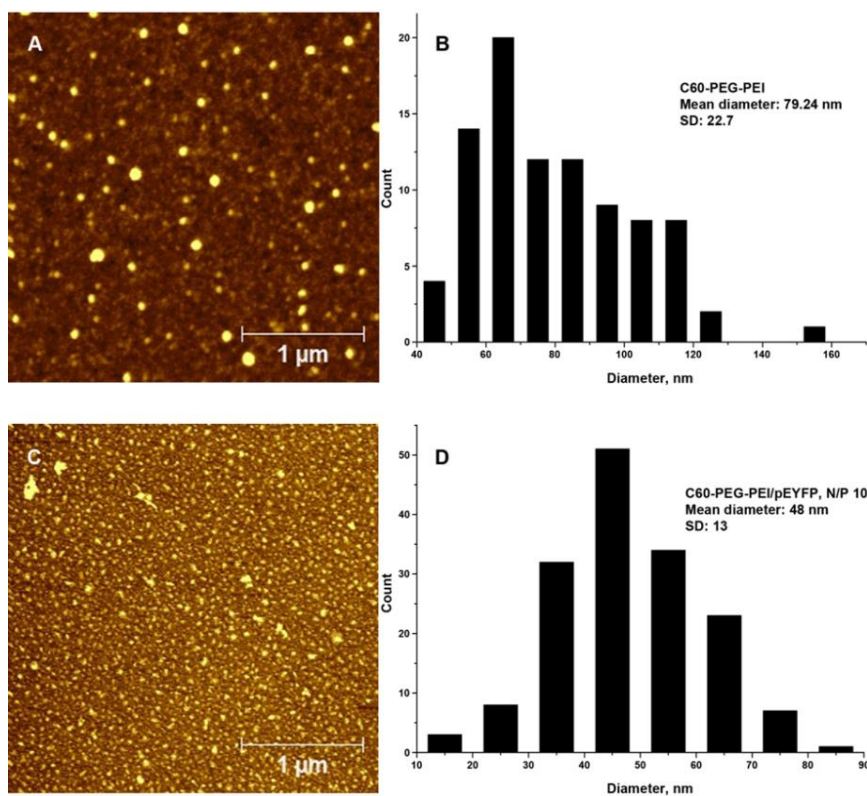


Figura III.16. Imaginile AFM și distribuția diametrelor particulelor pentru: (A, B) conjugatul C₆₀-PEG-PEI; (C, D) poliplexul C₆₀-PEG-PEI/pEYFP la un raport N/P = 10.

III.5. Capacitatea de împachetare a ADNc de către conjugatul C₆₀-PEG-PEI prin electroforeză

În Figura III.17. sunt prezentate benzile electroforetice corespunzătoare ADNc liber, poliplexșilor C₆₀-PEG-PEI/ADNc (din spermă de somon) și ale C₆₀-PEG-PEI/pEYFP la diferite rapoarte N/P.

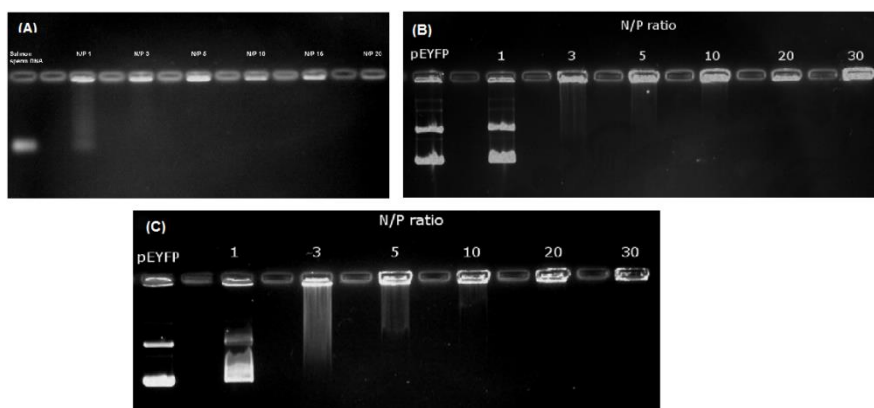


Figura III.17. Electroforeza pe gel de agaroză a poliplexșilor C₆₀-PEG-PEI/ADNc somon (A), C₆₀-PEG-PEI/pEYFP (B) și PEI/pEYFP la diferite valori N/P (C).

Testul de migrare efectuat pentru poliplexșii plasmidului EYFP descrie o comportare complexă: particularitățile structurii secundare a pEYFP sunt puse în evidență de către migrarea spot-urilor multiple de forme topologic-distincte. În comparație cu pEYFP liber, migrarea plasmidului este complet blocată în cazul poliplexului C₆₀-PEG-PEI/pEYFP la valori

N/P mai mari decât 10. În cazul ADN-ului liniar din spermă de somon, migrarea poliplexului este practic blocată pentru N/P=3. Împachetarea eficientă a plasmidului EYFP de către conjugatul C₆₀-PEG-PEI are loc la un raport N/P mare datorită prezenței lanțurilor neutre de PEG, care reduc capacitatea PEI de a complexa acizii nucleici. Electroforeza în gel de agaroză pentru conjugății investigați indică o complexare totală a ADN plasmidic de la valori ale raportului N/P începând cu 10 pentru C₆₀-PEG-PEI și cu 20 pentru PEI liber.

III.6. Citotoxicitatea conjugatului C₆₀-PEG-PEI și a poliplexului C₆₀-PEG-PEI /pEYFP

În cazul conjugatului C₆₀-PEG-PEI a fost observată o creștere a proliferării celulare comparativ cu probele de control, indiferent de valoarea N/P. Efectul de proliferare celulară a fost atribuit prezenței lanțurilor de PEG. Creșterea proliferării este proporțională cu creșterea raportului N/P, fiind dublă pentru N/P=200. În cazul PEI (2 kDa) necomplexat sau complexat cu pEYFP, nu s-a observat nici un efect negativ asupra viabilității celulare până la un raport N/P de 10. La valori N/P mai mari de 10, polietilenimina liberă induce o scădere a viabilității celulare cu aproximativ 20%, în timp ce poliplecșii PEI/pEYFP rămân cito-compatibili.

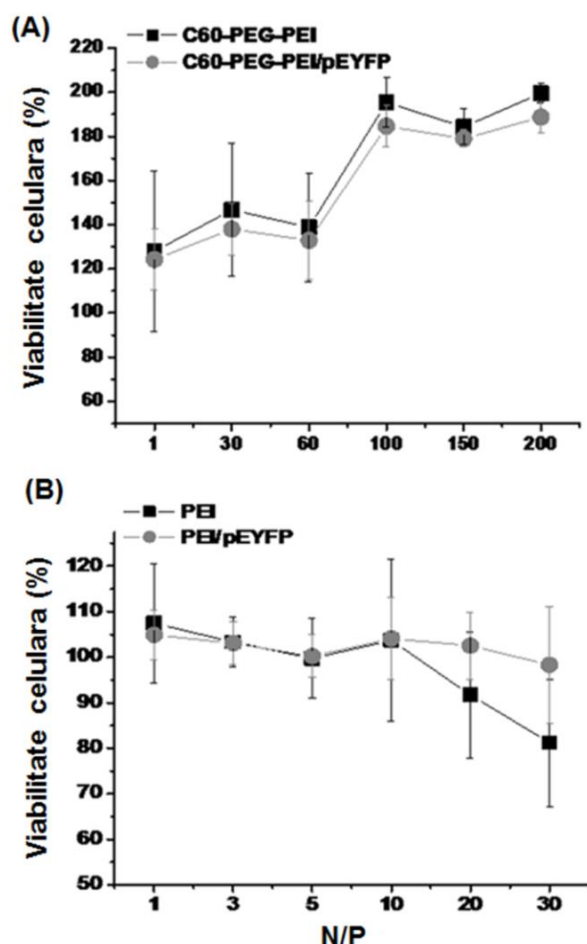


Figura III.18. Viabilitatea celulelor HEK 293T incubate timp de 48 h în prezența conjugatelor C₆₀-PEG-PEI și PEI și a poliplecșilor C₆₀-PEG-PEI/pEYFP și PEI/pEYFP la diferite rapoarte N/P.

III.7. Eficiența transfecției poliplecșilor bazati pe conjugatul C₆₀-PEG-PEI

Eficiența de transfecție genică *in vitro* a poliplexului C₆₀-PEG-PEI/pEYFP a fost urmărită cu ajutorul plasmidului pEYFP-C1, care codifică o proteină fluorescentă (excitație/emisie: 513/527 nm) ce poate fi vizualizată prin microscopie de fluorescență (calitativ) și prin citometrie de flux (cantitativ). Drept control pozitiv a fost folosit un produs comercial de transfecție SuperFect® de la Qiagen. Imagini reprezentative de microscopie de fluorescență pentru transfecția celulară folosind diferite rapoarte N/P ale poliplexului C₆₀-PEG-PEI/pEYFP sunt prezentate în Figura III.19.

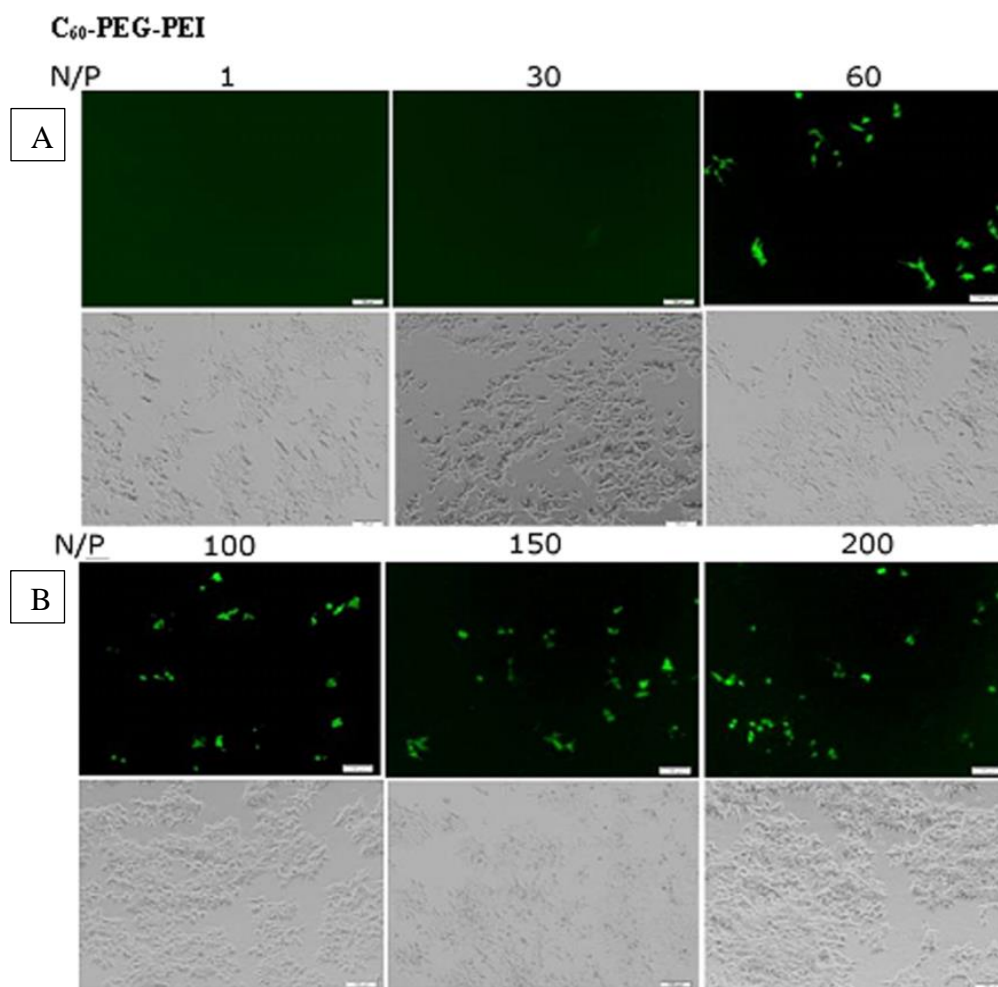


Figura III.19. Imagini de microscopie de fluorescență (A) și de contrast de fază pentru același câmp (B) ce prezintă exprimarea proteinei fluorescente EYFP în celule HEK 293T transfectate cu plasmidul pEYFP din poliplecșii C₆₀-PEG-PEI/pEYFP cu diferite rapoarte N/P; Scala: 200 μm.

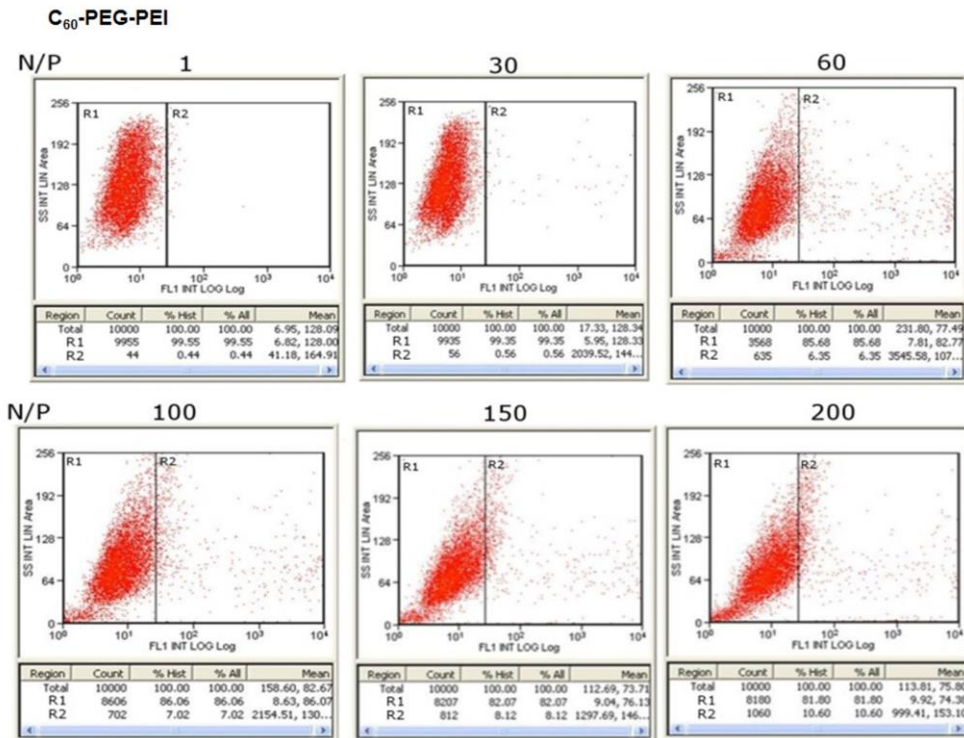


Figura III.20. Analiza cu ajutorul citometriei în flux a celulelor HEK 293T transfectate cu plasmidul pEYFP din poliplecşii C₆₀-PEG-PEI/pEYFP la diferite rapoarte N/P. Sunt prezentate dot ploturi SSC versus FL1; în poarta R1 sunt celulele EYFP-negative, iar în poarta R2 celulele EYFP-pozitive. Pentru fiecare dot plot se poate observa procentajul de celule EYFP-pozitive (% hist) în poarta R2 și intensitatea medie a fluorescenței celulelor (mean).

Eficiența de transfecție a fost, de asemenea, urmărită cu ajutorul citometriei în flux prin determinarea procentului de celule pozitive pentru proteina YFP în canalul FL1 (Figura III.20.). Această analiză cantitativă a confirmat rezultatele obținute cu ajutorul microscopiei de fluorescență.

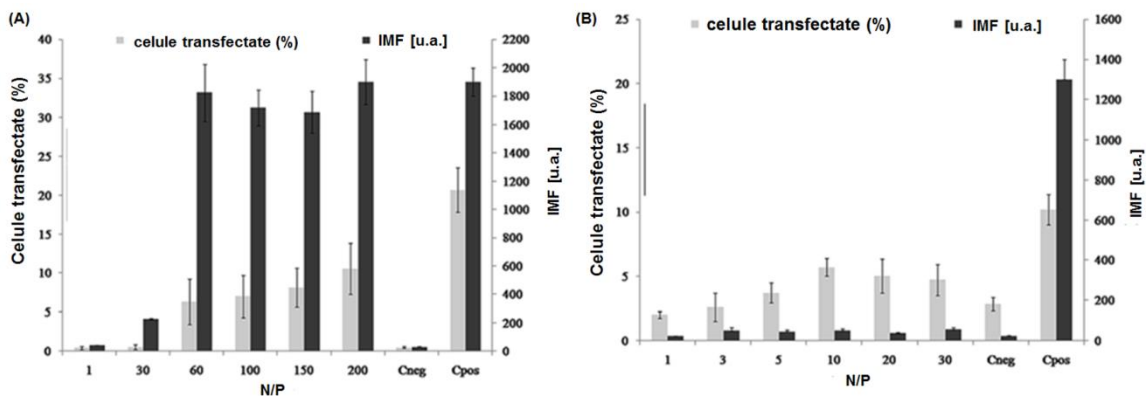


Figura III.21. Eficiența de transfecție exprimată prin intensitatea medie a fluorescenței IMF a poliplecşilor C₆₀-PEG-PEI/pEYFP (A) și respectiv PEI/pEYFP (B) la diferite valori N/P.

Utilizarea poliplecşilor PEI/pEYFP a dus la randamente de transfecție modeste indiferent de valoarea raportului N/P (Figura III.21.). Compararea valorilor IMF, relevă faptul că poliplexul C₆₀-PEG-PEI/pEYFP este de 40 de ori mai eficient în transfecția plasmidului față de PEI/pEYFP.

În cazul poliplecşilor C_{60} -PEG-PEI/pEYFP, s-au obţinut randamente de transfecţie rezonabile pentru rapoarte N/P mai mari de 60 (procentul de celule transfectate a fost de 6.3% la N/P = 60 şi 10.6% la N/P = 200) (Figurile III.20. şi III.21.). Eficienţa scăzută a transfecţiei C_{60} -PEG-PEI/pEYFP la valori N/P mai mici de 60 de unităţi poate fi explicată prin prezenţa lanţurilor PEG în structura vectorului, care ar împiedica împachetarea corespunzătoare a plasmidului prin acoperirea suprafeţei conjugatului înainte de a se produce împachetarea acestuia cu plasmid^{10,11}. Trebuie remarcat faptul că dimensiunea (Figura III.22.) şi potenţialul zeta (Figura III.15.) măsurate pentru poliplecşii C_{60} -PEG-PEI/pEYFP cu valori N/P mai mari de 60, sunt în jurul valorii de 50-100 nm, şi respectiv 10-20 mV, observându-se totuşi o tendinţă de aglomerare a particulelor, ceea ce conduce la o polidispersitate dimensională mare a nanoparticulelor pe de o parte, iar pe de altă parte s-a demonstrat că particulele cu dimensiuni mai mari de 200 nm, şi concertat cu existenţa PEG-ilării, nu au capacitatea de a fi transfectate, motiv pentru care şi procentul de celule transfectate este mai mic^{12,10}. Influenţa negativă a prezenţei lanţurilor de PEG asupra abilităţii de complexare a acizilor nucleici, este depăşită de beneficiile PEG-ilării vizibile în aplicaţiile *in vivo* legate de reducerea citotoxicităţii (conjugatul C_{60} -PEG-PEI a determinat o proliferare celulară de 200%), reducerea interacţiilor cu proteinele, activarea redusă a sistemului reticuloendotelial şi timp de circulaţie îmbunătăţit.

Capitolul V. Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată "**Nanoconjugate cu nucleu de fulerenă C_{60} şi dimensiuni subcelulare pentru aplicaţii biomedicale**" are **144** pagini împărţite în **5** capitole care includ **4** Tabele, **75** Figuri, **5** Scheme şi **380** indicaţii bibliografice. Teza este structurată în două părţi: **Partea I** rezumă informaţiile din literatură, cuprinzând aspecte legate de structura fulerenei C_{60} , proprietăţile fizice ale acesteia precum şi posibilităţile de funcţionalizare a acestui compus. De asemenea, este cuprinsă şi o introducere în domeniul bioconjugatelor constând în condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească un bioconjugat precum şi barierele biologice pe care trebuie să le depăşească. Capitolul se încheie cu o introducere în terapia genică (**Capitolul I**).

Partea a II-a care conţine contribuţiile proprii urmăreşte dezvoltarea unui derivat de fulerenă cu structură unitară în vederea utilizării acestuia drept marker fluorescent capabil să cuantifice acizii nucleici dublu catenari din soluţii apoase (**Capitolul II**) şi dezvoltarea unei structuri bazate pe fulerenă, care să aibă abilitatea de complexare, protejare şi eliberare a acizilor nucleici în transfecţia de gene (**Capitolul III**) şi se încheie cu **Capitolul IV** - Partea Experimentală alături de **Capitolul V** - Concluziile generale.

Studiile proprii efectuate în cadrul tezei de doctorat s-au concentrat în următoarele direcţii:

❖ S-a realizat bromurarea fulerenei C_{60} exploatând proprietatea de acid Lewis a $FeBr_3$ formată *in situ* în amestecul de reacţie, prin reacţia bromului lichid cu pilitură de fier. Bromura ferică a activat (polarizat) molecula de Br_2 care a reacţionat preponderent cu atomii de carbon din poziţiile 1,4 din hexaciclurile moleculei de C_{60} .

❖ S-a caracterizat prin FT-IR şi ATG derivatul bromurat de fulerenă şi s-a demonstrat că la suprafaţa moleculei de C_{60} au fost adionaţi 24 atomi de brom ($C_{60}Br_{24}$).

❖ S-a sintetizat compusul hidroxilat prin substituția atomilor de brom din $C_{60}Br_{24}$ cu grupări hidroxilice, prin reacția $C_{60}Br_{24}$ din soluție apoasă cu KOH, în mediu inert, urmată de conversia funcțiilor alcoxidice O^-K^+ în funcțiuni hidroxilice ($C_{\text{fulerenă}}-OH$) cu ajutorul rășinii schimbătoare de ioni.

❖ Structura chimică a compusului hidroxilat a fost pusă în evidență prin FT-IR.

❖ S-a demonstrat că ESI-MS este o metodă adecvată pentru studiul fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ în apă pură și în soluție apoasă de amoniac, în modurile de ionizare pozitiv și negativ și sub valori optime ale voltajului capilare și fragmentorului. Picurile observate în modul de ionizare pozitiv pentru $C_{60}(OH)_{24}$ au fost atribuite ionilor cu sarcini multiple $[M - H_2O + 4H]^{4+}$ la m/z 279 (100%) și $[M - 12H_2O + 2NH_3 + 6H]^{6+}$ la m/z 158 (96%), în timp ce picul de bază predominant observat pentru $C_{60}(OH)_{24}$ în modul de ionizare negativ a fost $[M - H]^-$ la m/z 1127.

❖ În modul de ionizare negativ, fulerenolul $C_{60}(OH)_{24}$ pierde H_2O și radicali OH^\bullet și H^\bullet , generând specii ionice conținând radicali mai stabili de fulerenoxil și/sau radicali mai puțin stabili de fulerenil. Afinitatea radicalilor mai puțin stabili de fulerenil pentru electroni liberi cu formarea de sarcini carbanionice de fulerenid pe sfera de C_{60} a urmărit un tipar atipic, caracterizat de scindarea legăturilor $C_{\text{fulerenă}}-OH$, cu formare de radicali fulerenil, care pot capta electroni liberi cu generarea de sarcini negative, în timp ce radicalii fulerenoxil produși prin scindarea legăturii O-H sunt mult mai stabili împotriva radicalilor liberi.

❖ Pe lângă simpla scindare de legături, ionii de fulerenol (conținând cel puțin opt radicali fulerenil) suferă o rearanjare în fază gazoasă neanticipată care implică reconstrucția parțială (în modul negativ în apă pură) sau totală (în modul pozitiv și negativ în soluție apoasă de amoniac) a legăturilor π din molecula de C_{60} prin rehibridizare și redistribuire a electronilor impari ai radicalilor de fulerenil pentru a forma anioni sau cationi C_{60} .

❖ Fulerenolul $C_{60}(OH)_{24}$ se leagă de grupările fosfat din exteriorul catenei de ADNc nativ și prin intermediul bazelor azotate la nivelul concavităților majore din sarea de sodiu a ADNc. Fluorescența fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ este puternic potențată de către ADNc datorită interacției acestuia cu molecula de ADN fără intercalări. Datorită afinității de legare a ADN-ului ($K = 10^5 M^{-1}$) și sensibilității ridicate ($1.2 \times 10^{-9} g/mL$), există perspective bune în ceea ce privește utilizarea $C_{60}(OH)_{24}$ ca și marker fluorescent versatil de cuantificare a ADN. Pe lângă înalta sensibilitate, metoda elaborată este caracterizată de simplitate întrucât nu este necesară utilizarea unui sistem tampon, rapiditate și lipsa toxicității.

❖ A fost proiectat un transportor de ADN pe bază de fulerenă C_{60} , PEI ramificat (2 kDa) și PEG (2 kDa), prezența lanțurilor de PEI cationice asigură împachetarea ADN anionic, iar prezența lanțurilor de PEG asigură creșterea cito-compatibilității și a stabilității poliplecșilor în fluidele biologice.

❖ A fost utilizată o cale simplă și reproductibilă de sinteză, efectuată în solvenți anhidri nepolari, la temperatura camerei și în prezența luminii pentru obținerea conjugatului C_{60} -PEG-PEI al cărui raport compozițional C_{60} :PEG:PEI a fost de 1:0.9:2.5, determinat prin 1H RMN, ^{13}C RMN, ATG și XPS. Morfologia, dimensiunea și valorile potențialului zeta în apă au fost determinate prin DLS și AFM.

❖ Conjugatul este capabil să acționeze ca vector de gene, prin formarea poliplecșilor stabili cu ADNc liniar sau plasmidic (au fost testați ADN din spermă de somon de 200 bp, și ADN plasmidic pEYFP-C de 4700 bp).

❖ În funcție de tipul și cantitatea de ADN asociat, poliplecșii au dimensiuni de particule variind între 50 și 200 nm.

❖ În funcție de raportul N/P, poliplexul C₆₀-PEG-PEI/pEYFP prezintă o eficiență de transfecție de peste 6%. Eficiența relativ mică în transfecție a conjugatului C₆₀-PEG-PEI este compensată de avantajele PEG-lării, caz în care este mărită stabilitatea poliplexului în fluidele biologice și cito-compatibilitatea este mult îmbunătățită.

❖ Conjugatul C₆₀-PEG-PEI este la fel de performant ca și controlul pozitiv în ceea ce privește expresia genei reporter EYFP în cultura de celule și, mai important, prezintă o mai bună cito-compatibilitate, determinând o proliferare puternică a celulelor de până la 200%.

❖ Aceste rezultate pot oferi o perspectivă nouă în dezvoltarea vectorilor adaptivi multifuncționali cu diverse funcționalități pentru complexarea optimă a ADN-ului, penetrarea membranelor celulare, eliberarea controlată a ADN-ului și abilitatea de evitare a opsonizării.

Activitatea științifică

Contribuții în cadrul tematicii tezei de doctorat

Articole în publicații indexate ISI

1. C.M. Uritu, C.D. Varganici, L. Ursu, A. Coroabă, A. Nicolescu, **A.I. Dascălu**, D. Peptanariu, D. Stan, C.A. Constantinescu, V. Simion, M. Călin, S.S. Maier, M. Bărboiu, M. Pinteală, Hybrid fullerene conjugates as vectors for DNA cell-delivery, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 2433-2446. (*I.F.* = 4.726).
2. G. David, G. Fundueanu, M. Pinteală, B. Minea, **A. Dascălu**, B.C. Simionescu, Polymer engineering for drug/gene delivery: from simple towards complex architectures and hybrid materials, *Pure Appl. Chem.*, 2014, 86(11), 1621-1635. (*I.F.* = 2.492).
3. M. Sillion, **A. Dascălu**, M. Pinteală, B.C. Simionescu, C. Ungurenașu, A study on electrospray mass spectrometry of fullereneol C₆₀(OH)₂₄, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, 9, 1285-1295. (*I.F.* = 2.762).
4. M. Pinteală, **A. Dascălu**, C. Ungurenașu, Binding fullereneol C₆₀(OH)₂₄ to dsDNA, *Int. J. Nanomed.*, 2009, 4, 193-199. (*I.F.* = 4.383).

Participări la conferințe naționale/internaționale

- comunicări

1. C.M. Uritu, **A.I. Dascălu**, D. Peptanariu, S.S. Maier, B.C. Simionescu, M. Pinteală, Non-viral vectors for gene therapy, 3^{eme} Colloque Franco-Roumain de Chimie Medicinale, 30-31 octombrie 2014, Iași, România.
2. M. Pinteală, **A. Dascălu**, C. Ungurenașu, Binding fullereneol C₆₀(OH)₂₄ to dsDNA, *Third Cristofor I. Simionescu Symposium Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science*, 8-9 iunie 2010, Iași, România.

- postere

1. C.M. Uritu, C.D. Varganici, A. Coroaba, **A.I. Dascălu**, D. Peptanariu, M. Calin, F. Doroftei, M.D. Bărboiu, M. Pinteală, Des nanoparticules a base de fullerene C₆₀ fonctionnalisées par polyethylenimine et PEG pour delivrance d'ADN, 8^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA, 15-18 septembre 2014, Montpellier, Franța.
2. **A. Dascălu**, M. Silion, C. Ungurenașu, Determinarea compoziției și structurii fulerenolului C₆₀(OH)₂₄ prin HPLC ESI-MS, Zilele Academice Iașene, A XXIV-a Sesiune de Comunicări Științifice a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, Progrese în Știința Compușilor Organici și Macromoleculari, 3-5 octombrie 2013, Iași.
3. M. Silion, **A. Dascălu**, C. Varganici, M. Pinteală, C. Ungurenașu, Structural study of polyhydroxylated fullerenes C₆₀(OH)₂₄ by HPLC-ESI-MS; *International Conference of Applied Science, Chemistry and Chemical Engineering*, 24-27 aprilie 2012, Bacău.

Membru în proiecte de cercetare

1. Sisteme de Inspirație Biologică pentru Entități Proiectate Structural și Funcțional, Cod: PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028, Contractul de finanțare nr. 4/2012, coordonator proiect: Dr. Mariana Pinteală.
2. SupraChem Lab, Laboratory of Supramolecular Chemistry for Adaptive Delivery Systems, ERA Chair initiative, Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs, Project no. 667387, coordonator proiect: Dr. Mariana Pinteală.
3. Sinteza și funcționalizarea particulelor magnetice pentru separarea enzimelor, REALCAT-PPIMC, PN-II-CT-RO-FR-2014-2-0050, 2015-2016, coordonator proiect: Dr. Mariana Pinteală.
4. Functional DNA Nanostructures-Gold Nanoparticles For Targeted Gene Therapy Purposes (DNANANOGOLD), Proiect: PN-II-RU-TE-2014-4-1444, coordonator proiect: Dr. Alexandru Rotaru.
5. Bionanoconjugates Formation by Laser Ablation in Liquid, PN-II-RU-TE-2011-3-0174, coordonator: Dr. Claudia Miheșan.
6. Evaluarea potențialului românesc de cercetare în domeniul chimiei și elaborarea strategiei naționale de cooperare internațională, Director proiect: Acad. Bogdan C. Simionescu.

Stagii de formare profesională

1. Stagiul de cercetare în cadrul Proiectului de Cooperare Bilaterală Modul III Brâncuși 787/30.06.2004 la „Institut Charles VIOLLETTE” Université Lille 1, 1-9 noiembrie 2015, Lille, Franța.
2. Workshop „Kratos Analytical XPS European Users Meeting” Kratos Analytical Ltd, 24-29 iunie 2012, Manchester, U.K.
3. Stagiul de cercetare în cadrul Proiectului de Cooperare Bilaterală Modul III Brâncuși nr. 315/14.05.2009CEMEF - Sophia Antipolis, 19.11-09.12.2010, Franța

Alte contribuții conexe temei de doctorat

Articole în publicații indexate ISI

1. A. Durdureanu-Angheluță, C. Miheșan, F. Doroftei, **A. Dascălu**, L. Ursu, M. Velegrakis, M. Pinteală, Formation by Laser Ablation In Liquid (LAL) and Characterization of Citric Acid-Coated Iron Oxide Nanoparticles, *Rev. Roum. Chim.*, 2014, 59(2), 151-159. (I.F.=0.311)
2. A. Durdureanu-Angheluță, **A. Dascălu**, A. Fifere, A. Coroabă, L. Pricop, H. Chiriac, V. Tura, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Progress in the synthesis and characterization of magnetite nanoparticles with amino groups on the surface, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2012, 324, 1679-1689. (I.F.=1.970)
3. M. Sillion, **A. Dascălu**, B.C. Simionescu, M. Pinteală, C. Ungurenașu, Synthesis and anti-HIV activity of β -cyclodextrin-C6-sulfate/3-azido-3'-deoxythymidine inclusion complex, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 2011, 49(7), 1730-1733. (I.F.=3.113)
4. A. Durdureanu-Angheluță, L. Pricop, I. Stoica, C.A. Peptu, **A. Dascălu**, N. Marangoci, F. Doroftei, H. Chiriac, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Synthesis and characterization of magnetite particles covered with alpha-trietoxysilil-polydimethylsiloxane, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2010, 322(19), 2956-2968. (I.F.=1.970)
5. L. Pricop, A. Durdureanu-Angheluță, M. Spulber, I. Stoica, A. Fifere, N.L. Marangoci, **A.I. Dascălu**, R. Țigoianu, V. Harabagiu, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Synthesis and micellization of polydimethylsiloxane-carboxy-terminated poly(ethylene oxide) graft copolymer in aqueous and organic media and its application for the synthesis of core-shell magnetite particles, *e-Polymers*, 2010, 10(1), 1043-1061. (I.F.=0.569)

Articole în publicații neindexate ISI

A. Dascălu, R. Ardeleanu, B.C. Simionescu, New Possibilities for the Synthesis of Reactive Functional Aminopolysilanes Using Azide Pathway, *Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy*, 2014, Tome XXXVII.

Lucrări în extenso în volume de manifestări științifice

1. A. Durdureanu-Angheluță, **A. Dascălu**, L. Pricop, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Particules magnetiques "core-shell" solubles dans l'eau, precursors pour l'eliberation controllee des medicaments, Conference Proceedings, P51, 232-235, X^{ème} Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța.
2. A. Durdureanu-Angheluță, L. Pricop, **A. Dascălu**, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Influence de la chaine polymerique sur la taille des particules magnetiques, Conference Proceedings, P52, 236-238, X^{ème} Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța.

Participări la conferințe naționale/internaționale

- comunicări

1. C. Miheșan, F. Doroftei, **A. Dascălu**, L. Ursu, A. Angheluță, M. Velegrakis, M. Pinteală, Formation des nanoparticules métalliques par ablation induite par LASER en milieu liquide (LAL), 8^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, 15-18 septembre 2014, Montpellier, Franța.

- postere

1. A. Durdureanu-Angheluță, **A. Dascălu**, L. Pricop, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Particules magnetiques “core-shell“ solubles dans l’eau, precursors pour l’eliberation controllee des medicaments, X^{ème} Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța.
2. A. Durdureanu-Angheluță, L. Pricop, **A. Dascălu**, M. Pinteală, B.C. Simionescu, Influence de la chaine polymerique sur la taille des particules magnetiques, X^{ème} Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța.

Bibliografie selectivă

-
- ¹ Tebbe F.N., Harlow R.L., Chase D.B., Thorn D.L., Creston Campbell G.Jr., Calabrese J.C., Herron N., Young Jr. J.R., Wasserman E., *Science*, 256, 822, 1992.
 - ² Djordjević A., Vojinović-Miloradov M., Petranović N., Devečerski A., Lazar D., Ribar B., *Fullerene Science and Technology*, 6(4), 689, 1998.
 - ³ Troshin P.A., Astakova A.S., Lyubovskaya R.N. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 13, 1, 2005.
 - ⁴ Pinteala M., **Dascalu A.**, Ungurenasu C., *Int. J. Nanomed.*, 4, 193, 2009.
 - ⁵ Sillion M., **Dascalu A.**, Pinteala M., Simionescu B.C., Ungurenasu C., *Beilstein J. Org. Chem.* 9, 1285, 2013.
 - ⁶ Bingshe X., Xuguang L., Xiaoqin Y., Jinli Q., Weijun J. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 675, W7.4.1, 2001.
 - ⁷ Tzirakis D.M., Orfanopoulos M., *Chem Rev.* 113, 5262, 2013.
 - ⁸ Miller G.P., *C. R. Chim.* 9, 952, 2006.
 - ⁹ Uritu C.M., Varganici C.D., Ursu L., Coroaba A., Nicolescu A., **Dascalu A.I.**, Peptanariu D., Stan D., Constantinescu C.A., Simion V., Calin M., Maier S.S., Barboiu M., Pinteala M. *J. Mater. Chem. B*, 3, 2433, 2015.
 - ¹⁰ Sung S.-J., Min S.H., Cho K.Y, Lee S., Min Y.-J., Yeom Y.I., Park J.-K., *Biol. Pharm. Bull.* 26, 492, 2003.
 - ¹¹ Zhang X., Pan S.-R., Hu H.-M., Wu G.-F., Feng M., Zhang W., Luo X., *J. Biomed. Mater. Res. A* 84, 795, 2008.
 - ¹² Neu M., Fischer D., Kissel T., *J. Gene Med.*, 7, 992, 2005.