

# RAPORTARE STIINTIFICA GEMNS 2018

## Proiect EURO NANO MED II

**Nanoparticule magnetice, incapsulate in grafene multi-funcționale, ca detectori autonavigabili, termal-inteligenți pentru integrin-receptori, utilizabili în tratamentul anti-cancer ghidat prin imagistică de rezonanță magnetică.**

### Acronim GEMNS

#### RST - Raport științific și tehnic, Partener 7 (ID-57)

##### 1. Obiective anul 2018;

##### 2. Rezumatul etapelor 2015 (WP1), 2016 (WP4) și 2017

**GEMNS** – este un dispozitiv molecular, construit dintr-un nucleu magnetic (Fe sau Co) acoperit de straturi de grafena, care poate produce efect theranostic. Peste grafena se depun straturi de polimeri, functionalizati, care leaga covalent grafena și o imunoglobina iar enzima (glucoxidaza GOx) va fi legata non-covalent. Prin schimbarea polarității campului magnetic exterior, sistemul se incalzeste și elibereaza enzima, care transforma gulcoza in produși de reacție și apa oxigenata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, care probabil va modifica proprietatile celulei canceroase, devenind mai sensibila la diversele terapii anti-cancer.

Etapa **WP1 (2015)**. (**T1.2a**) Au fost realizate modele ale enzimei GOx (cu evidentierea a doua situsuri de legare intensa, denumite LIG1 (in interiorul enzimei) și LIG2 (pe suprafata enzimei), prin studii de andocare moleculara); Complexii enzima-polimer au fost studiatii prin Dinamica moleculara, care a permis evaluarea cantitativa a interactiunilor enzima-polimer, la nivelul diferitilor aminoacizi din structura enzimei (Grad de realizare 100%).

**T1.2b**. Au fost generate structuri polimere PEI (polietilenimina) de diferite dimensiuni moleculare și forme (liniar, ramificat și dendrimer) pentru aflarea optimului (forma/marime) in interactiunea polimerului cu enzima (Grad de realizare 100%).

Etapa **WP4 (2016)**. (**T1.3** din 2015). Modelarea interactiunilor enzima-polimer-GEMNS functie de temperatura. Studiile au fost efectuate pe doua tipuri de polimeri: 1. Poly(ethylenimine) (PEI: C14N8 (liniar și trei izomeri ramificati), C18N10 (linear și trei izomeri ramificati)) și 2. Poly(amidoamine) (PAMAM - G0, G1, G1.5, G2, G3). Au fost definite capacitatea lor de legare a grafenei, imunoglobinei și enzimei in complexul numit GEMNS. Activitatea GOx a fost studiata in trei domenii de temperatura: normal (26-27 °C), eutermic (36-37 °C) și hyperthermic (42-46 °C). A fost efectuat un studiu de Dinamica Moleculara pe trei domenii de interes (27°C, pH 6.5); (37°C, pH 7.4) și respectiv (46°C, pH 7.4). Au fost studiate schimbarile conformationale ale aminoacizilor din buznarul de legare al FAD/GOx care determina schimbari in structura și stabilitatea/activitatea FAD și in cele din urma ale GOx.

A fost generata “in silico” o unitate functionala ce compune GEMNS (o sfera grafenica cu miez magnetic, invelita cu straturi de polimeri (PEI/PAMAM) functionalizati, care se leaga covalent de grafena și de o imunoglobina Ig (printr-o punte disulfidica) și non-covalent de enzima GOx) (Grad de realizare 100%).

Coroborarea datelor cu date experimentale ale altor grupuri, parteneri GEMNS; Calculele de Dinamica Moleculara au evidentiat **aceleasi dimensiuni ale structurii globale GEMNS** ca cele obtinute **experimental de Grupul de la Varsovia**.

Au fost efectuate calcule de chimie cuantica si topologie moleculara pe polimerul PEI si alti polimeri utilizati ca drug-carriers, in chimia medicinala; a fost studiata in detaliu **structura elicoidala a unor astfel de polimeri**.

Etapa **WP4 (2016)** (T4.5a.) Predictia toxicitatii theranostice a GEMNS prin strategii QSAR. Toxicitatea componentelor GEMNS a fost urmarita prin studierea „spatiului proprietatilor QSAR/QSPR”, in principal a proprietatilor topologice a macromoleculor aditionale (non-enzimatice). Predictia proprietatilor fizice si metabolitilor a fost facuta cu procedurile reunite QSAR & vHTTS (virtual High Throuput Toxicity Screening) care utilizeaza caracteristicile fragmentale ale macromoleculor pentru a prezice toxicitati globale. Studiile au aratat ca PEI si PAMAM nu prezinta reactivitate chimica in organism si nici proprietati genotoxice si citotoxice. Au fost studiatii si sase dendrimeri sintetizati in laboratorul nostrum, care au aratat toxicitati de 1000 ori mai mari in comparativ cu PAMAM/PEI. (Grad de realizare 100%).

### **3 GEMNS – Raport Stiintific si tehnic 2017**

**T4.5b. Studii QSAR.** In absenta unor studii experimentale clare de toxicitate a polimerilor, din cauza distributiei topologice a caracteristicilor structurale locale, se impune evaluarea teoretica a toxicitatii polimerilor liberi si functionalizati. Toxicitatea polimerilor va fi cu atat mai mare cu cat ei sunt implicati in interactiuni cu aminoacizii situsurilor de legare ale enzimelor implicate in procesele de interes in proiectul GEMNS. Descrierea topologiei locale s-a realizat cu programul original “TopoCluj”, care permite si o evaluare a similaritatii secventelor primare si secundare ale proteinelor. Bazele de date utilizate au fost PubChem si PubMed. In etapele de reducerea datelor au fost folosite programele: MLR, PCA, PLS si NNA. Studiile au oferit informatii si despre dispersia ori agregarea structurilor GEMNS functionalizate.

Datele experimentale, colectate de partenerii de Proiect GEMNS (care ar putea rafina/confirma rezultatele teoretice) au inceput sa soseasca abia in momentul cand raportul pe anul 2017 era deja scris. **Dificultatile aparute la dispersarea diverselor structuri GEMNS functionalizate au fost cauza solicitarii, prin Consortiu, de prelungire a proiectului pana in noiembrie 2018.**

(Grad de realizare 80%).

### **4. Rezultate obtinute de noi (Partener P7)**

#### **4.1. Studii de interactiune polimer nanoparticule**

Studiile incepute in 2017 privind agregarea proteinelor au fost continuate in 2018 cu stabilirea unui model mathematic de interactiune polimer protein. Modelul trteaza polimerii studiatii in 2017 si interactiunea lor cu 1ATU.

Pe scurt, "coroana proteica " este o structură multi-strat, în contact cu interfața protein-nanomaterial. Partea "tare" a acestei structuri, formată din recunoașterea suprafeței nanomaterialelor, cu afinitate ridicată pentru adsorbția suprafeței și schimbarea lentă, și o parte dinamică secundară a timpului scurt al schimbării proteinelor și legat în mod reversibil la "medicament". Consecința proceselor de creare a "coroanei proteice " va fi o caracteristică unică a nano-sistemului și a proteinei, care determină afinitatea de legare la nivelul adsorbției, interacțiunile de tip proteine-proteine, nanomaterial-proteina, proteina-apă , nanomateriale bazate pe forțele van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni electrostatice, hidrofobe și  $\pi$ - $\pi$ . Primele trei forțe, menționate mai sus, s-au păstrat frecvent în crearea și stabilizarea complexelor proteice cu nanomateriale de carbon. Interacțiunile de proteine cu suprafețele polimerice nanomateriale

depind de dimensiune, compoziție (secvența de aminoacizi, flexibilitatea conformatională a încărcăturii de suprafață), punctul izoelectric, concentrația soluției și stabilitatea structurală [1]. Proteinele cu stabilitate internă scăzută sunt ușor adsorbite pe suprafețe de toate tipurile, chiar dacă există repulsii electrostatice, totuși, proteinele intrinseci stabile suferă adsorbție substanțială pe suprafețele hidrofile numai în prezența interacțiunilor electrostatice. În general, cu atât mai puternică este legătura cu suprafața moleculelor mari de nanomateriale, suprafața de contact mai mare și structura flexibilă, cu complementaritate înaltă a suprafeței de adsorbție [2]. Majoritatea substraturilor biologice își pierd funcția biologică atunci când sunt denaturate. De exemplu, enzimele își pierd activitatea pentru că substraturile nu mai se leagă la locul activ și deoarece reziduurile de aminoacizi implicate în stabilizarea stărilor de tranziție ale substraturilor nu mai sunt poziționate pentru a face acest lucru. Procesul de denaturare și pierderea asociată a activității pot fi măsurate utilizând tehnici precum interferometria dublă de polarizare, CD, QCM-D și MP-SPR. Denaturarea proteinei implică structura cuaternară, terțiară și secundară. În structura cuaternară, proteinele denaturate sunt disociate și dispunerea particulară a subunităților proteice este întreruptă. Dacă structura terțiară este implicată, interacțiunile covalente dintre lanțurile laterale ale aminoacidului sunt perturbate și interacțiunile dipol-dipol dintre aminoacizii polari și interacțiunile Van der Waals între lanțurile de aminoacizi nepolare sunt, de asemenea, rupte. În structura secundară, proteinele denaturate pierd toate pattern-urile periodice repetate, cum ar fi helixul alfa și structura beta, și este adoptată o configurație aleatorie a bobinei. Pentru a calcula interacțiunea dintre proteine și un strat dendrimer (de exemplu, PAMAM), procesul a fost solicitat să imite și să amplifice nanostructurile de proteine ale interacțiunilor. A fost calculat un sistem de proteine și diferite PAMAM-uri. A fost utilizată o procedură de distorsionare a proteinei de la lavajul structurii cuaternare în structura secundară. La sfârșitul acestor calcule s-au obținut șiruri de proteine. Proteina 1ATU a fost selectată. Dendrimerii utilizați au fost după cum urmează. PAMAM generații: 0; 1; 1,5; 2 și 3; ZAC dendrimer, C: 16; 20; 22; 24; 28. Această procedură a validat procesul selectat, apoi proteina a fost supusă procesului liber (orb) (nu în prezența stratului dendrimer), iar 1ATU a fost caracterizat și fără distorsiuni.

Pentru fiecare șir de proteine, trei funcții logaritmice (tabelul 1) sunt unificate, integrate și reprezentate pe un grafic 3D. Un exemplu este dat în cazul șirului de proteine brute PAMAMG0; următoarea ecuație a fost utilizată pentru a construi graficul (adică, variatorul):

$$\int [(2.372 \log(x) + 71.411 U(0.01076 \log(x) + 28.956 U(2.8141 \log(x) + 29.356))] dx.$$

Fir proteina	Ecuatia coordonata X	Ecuatia coordonata Y	Ecuatia coordonata Z
PAMAM G0	$Y=2.372\ln(x)+71.411$	$Y=0.01076\ln(x)+28.956$	$Y=2.8141\ln(x)+29.356$
PAMAM G1	$Y=-13.61\ln(x)+205.03$	$Y=8.4966\ln(x)-30.464$	$Y=4.9574\ln(x)+109.78$
PAMAM G 1.5	$Y=-13.61\ln(x)+156.03$	$Y=8.4966\ln(x)-29.864$	$Y=4.9574\ln(x)-1.22$
PAMAM G 2	$Y=-13.61\ln(x)+237.03$	$Y=8.4966\ln(x)-29.33$	$Y=4.9574\ln(x)+107.78$
PAMAM G3	$Y=-13.61\ln(x)+154.03$	$Y=8.4966\ln(x)-30.813$	$Y=4.9574\ln(x)+100.78$
ZAC C16	$Y=-13.61\ln(x)+202.03$	$Y=8.4966\ln(x)-29.707$	$Y=4.9574\ln(x)+121.78$

ZAC C20	$Y=-13.6\ln(x)+140.92$	$Y=8.3794\ln(x)-29.03$	$Y=4.9681\ln(x)+104.72$
ZAC 22	$Y=-13.38\ln(x)+178.2$	$Y=8.26\ln(x)-27.706$	$Y=4.7894\ln(x)+18.08$
ZAC 24	$Y=-13.6\ln(x)+161.97$	$Y=8.4689\ln(x)-29.49$	$Y=4.9577\ln(x)+64.778$
ZAC 28	$Y=-13.61\ln(x)+203.03$	$Y=8.4966\ln(x)-29.666$	$Y=4.9574\ln(x)+114.78$
1ATU free	$Y=30.216\ln(x)-240.55$	$Y=32.874\ln(x)-325.16$	$Y=49.357\ln(x)-326.08$
1ATU 3D	$Y=2.9252\ln(x)-49.617$	$Y=-0.773\ln(x)-89.669$	$Y=-5.266\ln(x)+56.193$

Rezultatele colecțiilor bazate pe șnururi proteice sunt prezentate în figura 8 pentru 1ATU liber, 1ATUG0 și 1 ATU G1 și respectiv 1atu 3D

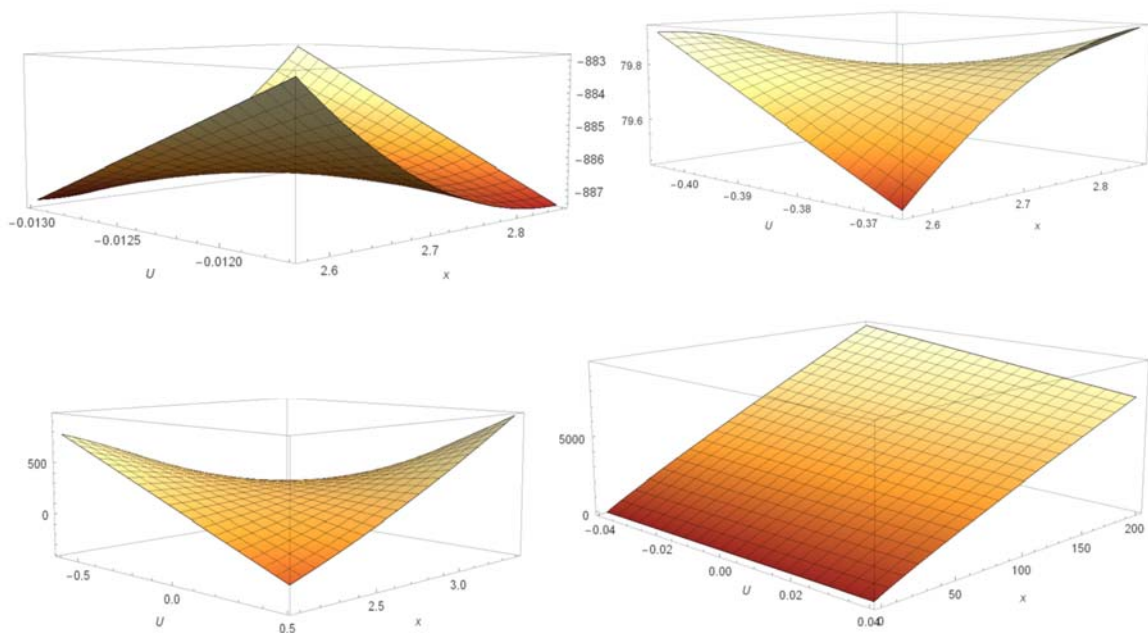


Figura 8. Manifold-uri obținute utilizând șirul de coordonate 1ATU: (de la stânga la dreapta) 1ATU șir gratuit, 1ATU G0 (sus); 1ATU G1, 1ATU 3D (fund).

Corzile de proteine, rezultate din interacțiunea cu dendrimeriile, prezintă o topologie distinctă. Reprezentarea lor a avut aproximativ aceeași morfologie (aceeași curbură, unghi, orientare). Există diferențe în funcție de tipul de dendrimer folosit. Atunci când proteina este denaturată computațional, fără gradientul stratului dendrimer, există o îndoire opusă în comparație cu sistemul proteic dendrimer. Reprezentarea grafică, plasând coordonatele funcției logaritmice integrate pentru 3D 1ATU, fără a fi denaturată, prezintă o formă relativ plată, cu unele regiuni mici pliate care corespund regiunilor funcționale de proteine.

### Concluzii

Straturile de polimeri au un efect cuantificabil asupra proteinelor și favorizează reacții diferite. Acest efect este demonstrat de variația coordonatelor topologice. Variația proprietăților topologice determină variații ale proprietăților biochimice care favorizează diferite tipuri de reacții. În cazul 1ATU, PAMAM G1.5 a demonstrat cea mai mică interacțiune cu proteina și cele mai scăzute efecte toxice. Această proprietate se reflectă în analiza

numărării clusterului de secvențe de proteine și a analizei biochimice a G1.5, care nu au arătat reacții potențiale de legare și biochimice la proteine. Potențialul Zeta a sugerat o soluție coloidală mai puțin stabilă de proteină 1ATU. Analiza proteinelor în lot efectuată aici este o metodă fezabilă de explorare a interacțiunii sistemelor proteice polimerice. Metoda dinamică moleculară mică a demonstrat rolul buclei P în legarea ligandului.

Structura proteinei este influențată de mediul de imobilizare. Tehnica utilizată este adecvată pentru calcularea interacțiunilor proteice cu medii diferite (nanostructuri de carbon, dendrime, etc.).

Prin operarea unor modificări mici în structura proteinei (receptorului), spațiul de bioactivitate a ligandului poate fi accesat. Atunci când întreaga proteină este denaturată, adică redusă la structura sa primară și secundară, spațiul de bioactivitate nu poate fi abordat. Astfel, spațiul de bioactivitate poate fi accesat numai de o structură cu arhitectură terțiară și cuaternară.

## **4.2. Studii de mutagenicitate**

Scopul studiului este de a evalua toxicitatea polietileniminei ramificate (PEI) pe baza modelelor QSAR și a studiilor alternative de citotoxicitate.

Au fost efectuate teste de citotoxicitate QSAR utilizând celulele limfomului uman uterin (U937) și celulele epiteliale alveolare umane (A549), celulele cancerului pulmonar Lewis (LLC), precum și embrionii de peste zebră (Danio rerio). S-au aplicat dinamica moleculară, citometria fluxului de impedanță, testele în timp real și testul albastru de trypan.

Atât celulele U937 cât și cele A549 s-au dovedit a fi mai sensibile datorită expunerilor PEI comparativ cu cele ale celulelor LLC și embrionilor de zebră. Parametrii de calcul ai PEI, cum ar fi coeficientul de partiție, suprafața totală accesibilă a solventului, indicele interacțiunii coeziunii în solide și globularitatea au fost corelate cu proprietățile citotoxice ale acetui polimer .

Au fost prelucrate date experimentale privind viabilitatea liniilor celulare în prezența concentrațiilor crescătoare de BPEI de 25 kDa. Celulele carcinomului pulmonar Lewis (LL / 2, LLC) au fost cultivate în DMEM suplimentat cu 10% FBS inactivat termic, 100 U / ml penicilină și 100 pg / ml streptomycină. Incubarea a fost efectuată la 37 ° C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO<sub>2</sub>. Pentru a efectua experimentele, celulele s-au însămânțat în plăci sterile de 24 de godeuri (NUNC) la o densitate de 4 x 10<sup>4</sup> celule pe godeu și s-au crescut la circa. 80% din confluență. Apoi, mediul de cultură a fost înlocuit cu glucoză înaltă proaspătă DMEM și celulele au fost expuse la concentrații definite de PEI de 25 kDa (0-100 pg / ml) timp de 24 de ore sau lăsate netratate (control). Analiza NRU a fost efectuată pentru a evalua citotoxicitatea PEI în celulele LLC [12]. Au fost investigate celulele limfomului uman uman (H937) și celulele epiteliale umane alveolare (A549). Celulele limfomului uman UH3737 au fost însămânțate pe două plăci identice cu 6 godeuri la o densitate de 1 x 10<sup>5</sup> celule / cm<sup>2</sup> și au fost lăsate să se prolifereze timp de 24 de ore înainte de expunerea la PEI. S-au utilizat șase concentrații de PEI (0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5 și respectiv 15 ug / cm<sup>2</sup>), iar impactul biologic a fost evaluat utilizând citometria fluxului de impedanță (Ampha Z30, Amphasys AG, Elveția) și un test clasic de viabilitate test).

Cele trei straturi de acoperire au fost folosite pentru a se asemena mediului in vivo. Ulterior, atașarea și proliferarea celulelor au fost monitorizate și înregistrate la intervale de 15 min la trei frecvențe diferite (10, 25 și respectiv 50 kHz) utilizând un analizor de celule în timp real fără etichetă (xCELLigence, ACEA Biosciences, USA). După 24 ore, celulele au fost expuse la PEI la șase concentrații (0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5 și respectiv 15 ug / cm<sup>2</sup>) și monitorizate la fiecare 15 minute pentru o perioadă suplimentară de 24 ore pentru a măsura modificările induse de PEI în celulă număr. Schimbarea măsurată a impedanței electrice este dată ca parametru unic, numit index de

celule (CI) de software-ul instrumentului. Atașarea, răspândirea și proliferarea celulelor au ca rezultat o valoare a CI mai mare, în timp ce moartea celulară este asociată cu detașarea celulară, ceea ce scade valoarea CI. Fiecare analiză s-a efectuat în două exemplare pe aceeași placă E și s-au repetat experimente individuale de cel puțin trei ori. Pentru toate testele celulare s-au efectuat șapte citiri. Datele sunt date ca medie  $\pm$  SD de la trei experimente independente.

În studiile de embriotoxicitate, embrionii de zebură (*Danio rerio*) din tulpina AB au fost păstrați în condiții standard de laborator de 28,5 ° C pe o perioadă de lumină de 14 ore / 10 ore de lumină întunecată în așa numita apă zebură. După reproducerea de 10 perechi (bărbat și femele, raport 1: 1), embrionii au fost colectați și puși în scenă așa cum a fost descris de Kimmel și colab. [13]. Embrionii zebrafish bine dezvoltați în etapa celulară 8-32 au fost selectați sub microscop de disecție și expuși la PEI ramificat de 25 kDa (0-100 pg / ml) timp de 24 de ore. Embrionii tratați cu apă ultrapură au fost serviți ca martori. Pentru embriotoxicitate s-au efectuat atât testele de viabilitate (%) cât și malformația (%). A fost discutată corelația dintre viabilitate (%) - malformații (%) și viabilitate LL / 2 LLC1 (%) față de viabilitatea *Danio rerio* (%). Imaginile au fost extrase din embrionul *Danio* care evaluează coagularea în prezența PEI 25kDa.

### 4.3. Metode computaționale

Pentru a evalua computațional datele experimentale, au fost construite modele QSAR. Având în vedere că doar o moleculă la concentrații crescătoare a fost explorată, s-au generat conformații moleculare distincte pentru unele valori de concentrație [3]. Conformațiile au fost calculate folosind dinamica moleculară. Stările termodinamice au fost simulate folosind câmpul de forță MMFF94 (software Tinker) [4]. Taxele și minimizarea energiei au fost efectuate utilizând același câmp de forță și software. Parametrizarea parametrilor a fost utilizată după cum urmează: intervalul pasului = 1 fs, temperatura țintă 310K, numărul de cadre pe secundă = 1, rata de răcire la căldură = 1 kcal / atom / ps. Parametrii enumerați mai sus au fost păstrați constanți pentru toate stările termodinamice. Au fost generate stări corespunzătoare concentrațiilor de pg / ml de la 0 la 100 cu o etapă de 10 pg / ml. Un factor crescut de 100 a fost utilizat pentru sensibilizarea metodei. Energia sterică pentru fiecare conformație a fost extrasă. Proprietățile de tip propriu-zis au fost calculate pentru fiecare conformație PEI folosind software-ul Schrodinger [5]. Modele QSAR care utilizează regresie liniară multiplă (MLR) au fost construite. Variabilele dependente luate în considerare au fost următoarele: viabilitatea carcinomului celulelor pulmonare (%), viabilitatea *Danio rerio* (%), malformațiile *Danio rerio* (%), viabilitatea U937 a celulelor limfomului histiocitar uman și, respectiv, viabilitatea celulelor alveolare epiteliale umane (%). Pentru fiecare linie celulară s-au utilizat 11 structuri corespunzătoare a 11 citiri experimentale (valori observate sau valori extrapolate). În ceea ce privește conformările simulate folosind dinamica moleculară, pentru primele două linii celulare, conformațiile au fost calculate la concentrațiile de 0,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100  $\mu$ g / ml; pentru ultimele două linii celulare s-au utilizat conformații la concentrații de concentrație 0, 0,05, 0,15, 0,5,1, 1,5,3, 5,10, 12,5, 15 pg / cm<sup>3</sup> (1 ml = 1 cm<sup>3</sup>).

Descriptorii care au evaluat farmacocinetica și proprietățile asemănătoare medicamentului au fost calculați utilizând modulul QikProp inclus în pachetul software Schrodinger [6]. ADME și proprietățile de tip droguri au fost estimate pe baza următorilor descriptori: #stars (adică numărul de valori descriptorilor care nu se încadrează în intervalul de 95% dintre valorile similare pentru medicamentele cunoscute), MW, dipol, IP, EA, SASA, FOSA, FISA, PISA, WPSA, PSA, volum, #rotor, donator HB, acceptor HB, glob, QPpolrz, QPlogPC16, QPlogPoct, QPlogPw, QPlogPo / w, logS, QPlogKhsa, QPlogBB și #metabol. Alte descriptori utilizați sunt: # amino (numărul grupărilor aminice neconjugate (0-1)); #amid (număr de grupări amidă și guanidină (0)); #acid (numărul grupurilor de acid carboxilic (0-1)); #amid (număr de grupări amidice conjugate (0-1)); #rotor (numărul de ne-împiedicat, nu alchenă, amidă, inel mic, legături rotative (0-15)); #rtvFG (numărul grupurilor funcționale reactive) [7]. Prezența acestor

grupuri poate conduce la fals pozitive în testele HTS și la reacțiile de descompunere, reactivitate sau toxicitate in vivo (0-2), activitatea SNC (sistemul nervos central), în intervalul -2 (inactiv) la +2 activă) greutate moleculară (130,0-725,0); momentul dipol (1,0-12,5), SASA (suprafața totală accesibilă solventului) în angstromi pătrați utilizând o sondă cu o rază de 1,4 Å (300,0-1000,0); FOSA (componenta hidrofobă a SASA), (0,0 - 750,0); FISA (componenta hidrofilă a SASA, calculată pe N, O, H pe heteroatomi), (7,0 - 330,0); PISA  $\pi$  (numărul de atomi de carbon și hidrogeni atașați), (0,0 - 450,0); WPSA (componenta slab polară a halogenurilor SASA, P și S), (0,0 - 175,0); volum (volum total accesibil solventului, în angstromuri cubice, utilizând o sondă cu o rază de 1,4 Å), (500,0 - 2000,0); donatorul HB (numărul estimat de legături de hidrogen, donat de substanța dizolvată în apă molecule într-o soluție apoasă; valorile sunt medii pentru un număr de configurații, astfel încât acestea pot fi non-întreg), (0,0 - 6,0); acceptor HB (număr estimat de legături de hidrogen, acceptat de solut dintr-o soluție apoasă; valorile sunt medii pe un număr de configurații, deci pot fi non-întreg), (2,0 - 20,0);  $dip^2 / V +$  (pătrat al momentului dipolului împărțit la volumul molecular, acesta fiind termenul cheie în ecuația Kirkwood-Onsager pentru energia liberă de solvare a unui dipol cu volumul V), (0,0 - 0,13);  $ACxDN^0.5 / SA$  (indicele interacțiunii coeziunii în substanțele solide), (0,0 - 0,05); glob (descriptorul globularității), (0,75 - 0,95); QPpolrz (polarizabilitatea estimată, în angstromuri cubice), (13,0 - 70,0); QPlogPC16 (coeficientul prezis de hexadecan / gaz), (4,0 - 18,0); QPlogPoct  $\neq$  (coeficientul de partiție octanol / gaz prezis), (8,0 - 35,0); QPlogPw (coeficientul de partiție presupus de apă / gaz), (4,0 - 45,0); QPlogPo / w (coeficientul de partiție octanol / apă prezis), (-2,0 - 6,5); QPlogS (solubilitatea apoasă prevăzută, S în mol  $\times$  dm<sup>-3</sup>, este concentrația soluției dizolvate într-o soluție saturată în echilibru cu solidul cristalin), (-6,5 - 0,5); CIQPlogS (solubilitate apoasă predicată independentă de conformație, S ca mai sus), (-6,5 - 0,5); QPlogHERG (valoarea IC50 estimată pentru blocarea canalelor HERG K<sup>+</sup>), (sub -5); QPPCaco (prezis permeabilitatea celulelor Caco-2 aparente, în nm / sec; celulele Caco-2 modelează bariera intestinală; predicțiile QikProp sunt pentru transportul inactiv <25 săraci,> 500 mare; QPlogBB prezice coeficientul de partiție a creierului / sângelui, Predicțiile QikProp sunt pentru medicamentele administrate oral, astfel încât, de exemplu, dopamina și serotonina sunt negative la nivelul SNC, deoarece sunt prea polari pentru a traversa bariera hemato-encefalică), (-3,0 - 1,2); QPPMDCK (permeabilitatea aparentă a celulelor MDCK aparentă, exprimată în nm / sec; celulele MDCK sunt considerate a fi un bun imitativ pentru bariera hematoencefalică, predicțiile QikProp sunt pentru transport inactiv), (<25 săraci,> 500 mari); QPlogKp (permeabilitatea previzibilă a pielii, log Kp), (-8,0 -1,0); IP (eV) (7,9 - 10,5); EA (eV); PM3 (afinitate calcul electronică), (-0,9 - 1,7), #metab (numărul de reacții metabolice probabile), (1-8); QPlogKhsa (predicția legării la albumina din serul uman), (-1,5 - 1,5); Absorbția orală la om (absorbția orală estimată la om la scala de la 0 la 100%), (> 80% este mare <25% este slabă); S Amoxid Oxigen

(suprafață accesibilă a atomilor de oxigen de amidă), (0,0 - 35,0); PSA (suprafața de suprafață Van der Waals a azotului polar și a atomilor de oxigen), (7,0 - 200,0); # NandO (numărul atomilor de azot și oxigen), (2-15); RuleOfFive (numărul de încălcări ale regulii lui Lipinski de cinci.) Regulile sunt: mol\_MW <500, QPlogPo / w <5, donorHB  $\leq$  5, acptHB  $\leq$  10. Compușii care respectă regulile sunt considerați droguri. la limitele, care sunt multipli de 5), maxim 4); Rule 3 (numărul de încălcări ale regulii lui Jorgensen de trei.) Cele trei reguli sunt: QPlogS > -5,7, QP PCaco > 22 nm / s, # Metaboliti primari <7. Compușii cu mai puține încălcări ale acestor reguli pentru a fi disponibil pe cale orală maximă este 3); #ringatoms (numărul de atomi dintr-un inel); # in34 (numărul de atomi din inele cu 3 sau 4 membri); # in56 (numărul de atomi din inele cu 5 sau 6 membri); #noncon (numărul de atomi de inel care nu sunt capabili să formeze sisteme aromatice conjugate (de exemplu sp<sup>3</sup> C)); #nonHatm (numărul de atomi grei); Jm (rata de transport transdermică maximă estimată, Kp  $\times$  MW  $\times$  S ( $\mu$ g cm<sup>-2</sup> hr<sup>-1</sup>). Kp și S sunt obținuți din solubilitatea în apă și permeabilitatea pielii); QPlogKp și QPlogS.

Acești descriptori au fost utilizați pentru a evalua global toxicitatea BPEI 25kDa. În construirea modelelor QSAR, s-au considerat doar acei descriptori care prezintă valori distincte pentru conformațiile aceluiași molecule [8]. Descriptorii utilizați pentru QSAR sunt listați în Tabelul 1 (pentru celulele carcinomului pulmonar Lewis și Danio

erio embryo) și Tabelul 2 (pentru histocitomul uman și celulele alveolare epiteliale). Întreaga listă de descriptori calculați pentru BPEI 25kDa

În studiul prezent, au fost colectate două tipuri de rezultate, respectiv date experimentale și computaionale. Datele experimentale au fost folosite pentru a crea modelul QSAR pentru a prezice toxicitatea PEI datorită strategiilor moleculare diferite.

#### 4.4. Rezultate experimentale

Rezultatele prezente demonstrează clar toxicitatea PEI în toate modelele experimentale studiate la date. Așa cum s-a arătat în Figurile 1a și 3a, b, ambele celule de cancer pulmonar murin și uman, precum și celulele limfoamului histiocitar au prezentat o relație doză-răspuns în regimurile tratate cu PEI. Interesant, profilul de toxicitate obținut în celulele canceroase pulmonare se corelează bine cu cele obținute în embrionii zebrafish (Figura 2).

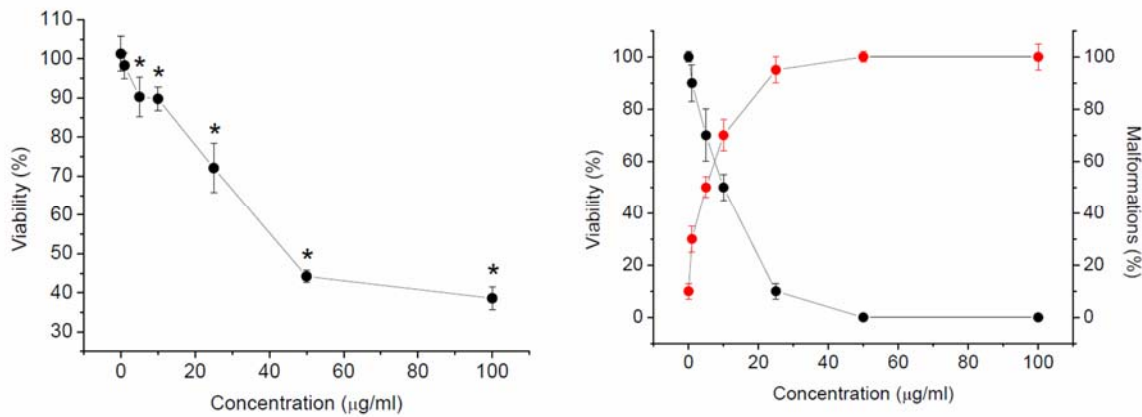
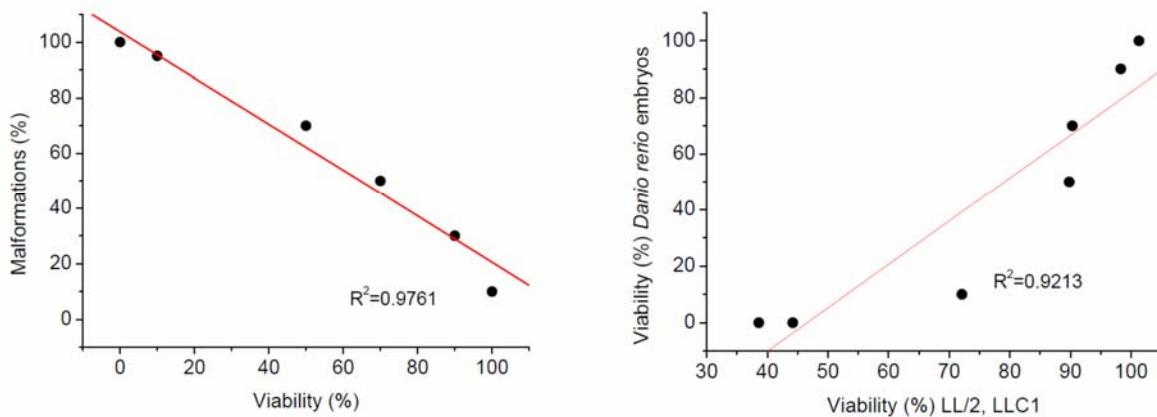


Figura 1. (a) Viabilitatea celulelor carcinomului pulmonar Lewis (LL / 2, LLC1) tratate cu 25 kDa BPEI timp de 24 de ore (analiza NRU). Datele sunt medii ± SD de la trei experimente independente (n = 18), \* P < 0,05 față de controlul normal; (b) Viabilitatea (negru) și malformații (roșii) de embrioni Danio rerio tratați cu 25 kDa BPEI timp de 24 de ore. Datele sunt medii ± SD de la trei experimente independente (n = 30).





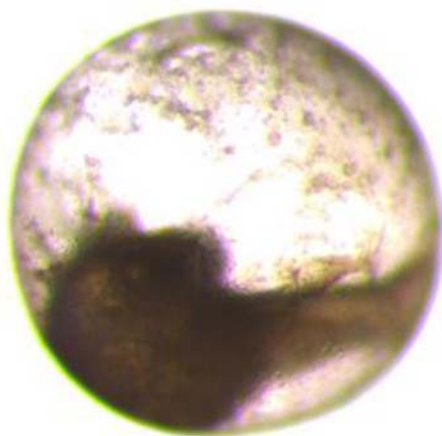


Figura 2 (a). Regiunea de regresie liniară; (b). linia de regresie liniară; (c). coagularea embrionului Danio rerio tratat cu 25 kDa BPEI (50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) timp de 24 de ore.

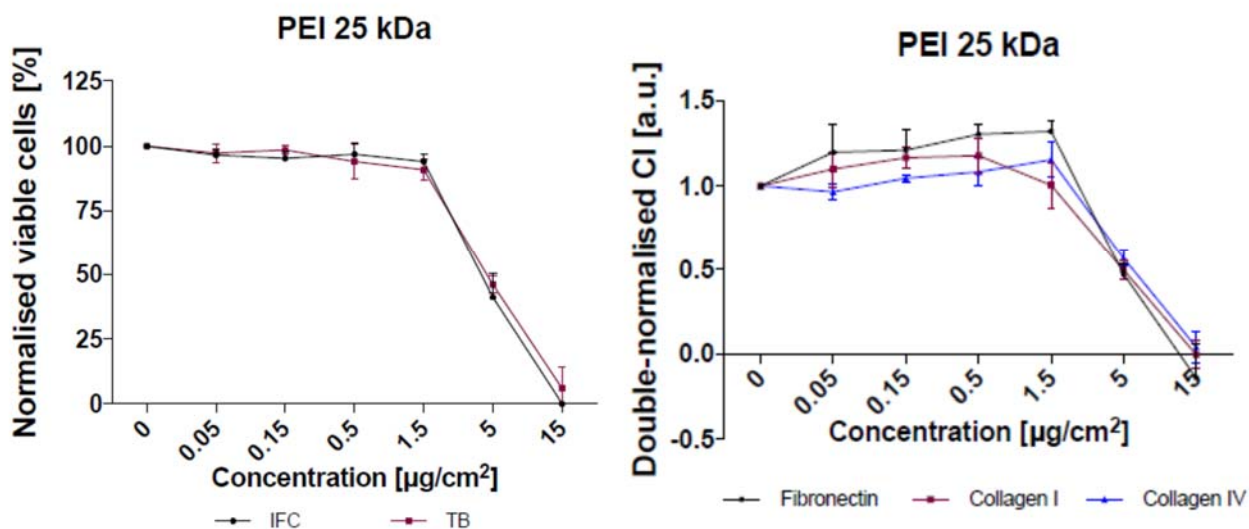


Figura 3. (a) Curbele dozelor-răspuns ale datelor de viabilitate TB și IFC normalizate  $\pm$  SE în procente. Celulele U937 au fost expuse la șase concentrații (0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5 și respectiv 15  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ) timp de 24 de ore. Fiecare încercare de viabilitate a fost efectuată în duplicat și experimentele individuale au fost repetate de trei ori; (b) date privind viabilitatea  $\pm$  procente SE ale celulelor A549 viabile expuse la 25 kDa BPEI timp de 24 de ore; (i) prima dată până la ultimul punct de măsurare înainte de expunerea pentru corectarea numărului de celule și ii) după expunerea la 24 de ore la viabilitatea celulelor martor (0  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ). Proliferarea crescută poate fi corelată cu valorile de peste 1 și moartea celulelor cu valori sub 1.

Datele prezente au fost găsite în acord cu alte studii recente care elucidează un potențial de citotoxicitate al BPEI (25 kDa). Rețineți că Hunter et al [20]. a demonstrat clar că apoptoza BPEI 800 Da, LPEI 20 kDa și BPEI 25 kDa a indus apoptoza în celulele HeLa și Vero, așa cum s-a raportat și de Lv și colab. [9]. În alte studii recente sa demonstrat că BPEI 800 Da produce necroze masive inacceptabile, comparativ cu LPEI 25 kDa, BPEI 1,8 kDa, BPEI 2 kDa și BPEI 11 kDa, ceea ce a arătat o toxicitate mai acceptabilă [10]. Profilurile de citotoxicitate ale BPEI 25 kDa au fost evidențiate în celulele de tip II epitelial alveolar (LA4) pentru a defini concentrațiile cu nivele de toxicitate

corespunzătoare pentru analiza genetică a genei bazate pe qRT-PCR (11). Rețineți că BPEI (25 kDa) și LPEI (750 kDa) pot induce atât deteriorarea membranei, cât și inițierea apoptozei în trei linii celulare umane relevante clinic (celulele T Jurkat, celulele endoteliale ale vezicii ombilicale și celulele hepatocite THLE3). A fost definită toxicitatea de fază I ca modificări timpurii necrotice (30 min) care rezultă din integritatea membranei compromise, evaluată prin eliberarea considerabilă a lactatului dehidrogenazei și prin translocarea fosfatidilserinei din membrana plasmatică interioară la suprafața celulară exterioară [12]. Citotoxicitatea de fază II (24 ore) se datorează activării unui program apoptotic mediat de mitocondriu, care rezultă din formarea canalului indus de PEI în membrana mitocondrială exterioară. Aceasta a condus la eliberarea citocromului proapoptotic c, la activarea ulterioară a caspazei 3 și la modificarea potențialului membranei mitocondriale ca rezultat al translocării caspazei în mitocondrii [13].

#### 4.5. Rezultate computaționale

Rezultatele privind descriptorii au fost rezumate în tabelele 1-3. Datele au fost asociate cu PEI și cu farmacoforul său, așa cum se arată în figura 4.

Table 1 Descriptors generated for Lewis lung cancer cells and *Danio rerio* embryos

Name	SASA	FOSA	FISA	Volume	ACxDN <sup>n</sup> . 5/SA	Glob	QPpolsz	QPlogPC1	QPlogPoc2	QPlogPw	QPlogPo/w	CIQlogHER	QPlogBB	QPlogKp	Jm	Energy	Lungu carcino ma cell viability	Cell viability Danio rerio	Cell malfor mations Danio rerio
0	1149.56	740.25	409.314	2031.73	0.062328	0.674852	52.04	25.031	45.574	37.52	-7.877	-16.233	-6.801	-9.732	0.009895	46.4251	100	100	5
10	1121.9	703.718	418.186	2011.46	0.063865	0.686884	51.229	24.632	45.729	37.514	-8.002	-16.039	-6.718	-9.896	0.006791	277.7	89	50	60
20	1120.39	706.617	413.775	2003.01	0.063951	0.685883	50.891	24.543	45.498	37.48	-8.023	-16.055	-6.673	-9.814	0.008188	297.7	75	19	80
30	1111.48	693.883	417.595	1977.11	0.064464	0.685412	49.854	24.334	45.143	37.485	-8.196	-16.062	-6.735	-9.885	0.006963	307.9	64	7	91
40	1111.41	692.049	419.361	1983.53	0.064468	0.686937	50.111	24.375	45.312	37.497	-8.166	-16.038	-6.734	-9.917	0.00646	318.3	53	3	96
50	1110.05	686.203	423.847	1992.38	0.064547	0.689821	50.465	24.43	45.6	37.524	-8.136	-15.991	-6.747	-10	0.005341	329.3	47	3	98
60	1109.92	698.631	411.293	1989.68	0.064554	0.689278	50.357	24.327	45.339	37.438	-8.066	-16	-6.581	-9.768	0.009098	339.8	45	3	98
70	1108.78	701.588	407.195	1998.44	0.064621	0.692011	50.708	24.324	45.481	37.407	-7.978	-15.956	-6.478	-9.693	0.010826	350.4	43	3	98
80	1108.12	707.273	400.844	1986.59	0.064659	0.689687	50.234	24.216	45.13	37.363	-8.009	-15.993	-6.427	-9.576	0.014175	359.7	42	3	98
90	1106.87	701.593	405.277	1982.28	0.064732	0.689464	50.061	24.211	45.129	37.39	-8.065	-15.997	-6.493	-9.658	0.011744	370	40	3	98
100	1103.51	682.248	421.265	1985.01	0.064929	0.692196	50.17	24.293	45.504	37.49	-8.149	-15.953	-6.671	-9.952	0.005959	380.7	39	3	98

Table 2 Descriptors generated for human histiocytic lymphoma cells and human alveolar epithelial cells

CO NC	SASA	FOSA	FISA	volume	ACX DN ^5/ SA	glob	QPolr	QI ogP C16	QI ogP oct	QI ogP w	QI ogP o/w	QI ogH ERG	QI ogBB	QI ogKp	Jm	Ener gy	Hystoci toma viabiit y	Alveolar ephitelial proliferati on
0	1101.53	694 .43 1	407 .10 2	196 8.7 1	0.0 650 46	0.6 896 39	49. 518	24.0 92	44.95 1	37.3 89	- 8.152	-15.994	- 6.51 6	- 9.69 1	0.01 086 9	46.4 25	100	1
0.0 5	1102.99	696 .28 5	406 .71 2	197 4.9 6	0.0 649 6	0.6 901 82	49. 768	24.1 37	45.05 7	37.3 9	- 8.112	-15.985	- 6.50 1	- 9.68 4	0.01 105 1	276. 9	98	1.25
0.1 5	1106.45	693 .31 1	413 .13 5	197 9.0 6	0.0 647 57	0.6 889 81	49. 932	24.2 46	45.19 4	37.4 42	- 8.139	-16.005	- 6.61 1	- 9.80 2	0.00 841 4	277	94	1.3
0.5	1106.05	703 .56 5	402 .48 7	198 1.3 7	0.0 647 8	0.6 897 63	50. 025	24.1 77	45.07 7	37.3 69	- 8.049	-15.992	- 6.44 9	- 9.60 6	0.01 322	277. 4	96	1.4
1	1105.98	702 .99 2	402 .98 5	198 3.7 3	0.0 647 85	0.6 903 57	50. 119	24.1 9	45.13 8	37.3 72	- 8.037	-15.982	- 6.44 6	- 9.61 5	0.01 294 4	278. 1	92	1.42
1.1 5	1107.73	706 .45 4	401 .27 9	198 5.3 8	0.0 646 82	0.6 896 46	50. 185	24.2 09	45.11 7	37.3 65	- 8.019	-15.994	- 6.43 4	- 9.58 4	0.01 391 6	278. 5	90	1.46
3	1108.63	694 .77 9	413 .85 9	198 5.6 3	0.0 646 3	0.6 891 38	50. 194	24.3 1	45.31 3	37.4 52	- 8.107	-16.002	- 6.61 9	- 9.81 6	0.00 815 9	279. 7	70	1.2
5	1108.12	707 .27 2	400 .84 6	198 6.5 9	0.0 646 59	0.6 896 86	50. 234	24.2 16	45.13 16	37.3 63	- 8.009	-15.993	- 6.42 7	- 9.57 6	0.01 417 4	282. 4	35	0.48
10	1119.48	706 .43 7	413 .04 6	200 2.5 2	0.0 640 03	0.6 863 28	50. 871	24.5 23	45.49 23	37.4 73	- 8.019	-16.048	- 6.65 5	- 9.80 1	0.00 844 6	287. 3	21	0.3
12. 5	1120.77	709 .67 3	411 .09 6	200 8.6 4	0.0 639 3	0.6 869 39	51. 116	24.5 55	45.57 1	37.4 63	- 7.969	-16.038	- 6.61 7	- 9.76 5	0.00 917 5	290. 1	10	0.2
15	1124.85	708 .44 2	416 .41 4	201 0.7 4	0.0 636 98	0.6 849 22	51. 2	24.6 55	45.63 6	37.5 09	- 8.002	-16.07	- 6.72 7	- 9.86 3	0.00 732 2	292. 8	0	-0.2

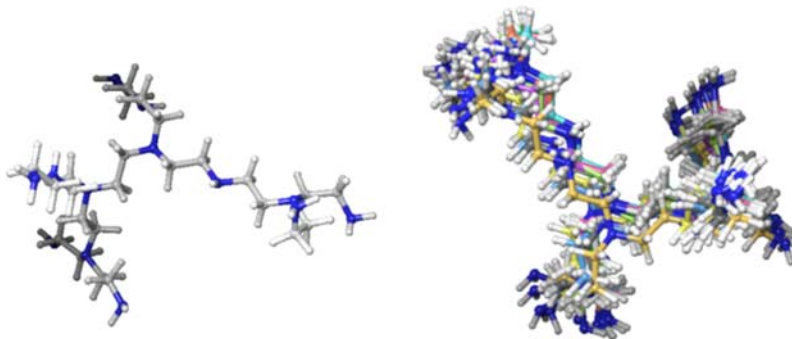


Figura 4. BPEI 25KDa reprezentată ca minge și bastoane (a). Atomii NH2 sunt reprezentați în albastru. Farmacoforul din BPEI (b). Sunt reprezentate fiecare 11 stări termodinamice.

Modelul QSAR pentru celulele carcinomului pulmonar Lewis (LL / 2, LLC1) este prezentat în Figura 5 utilizând un descriptor, și anume QplogC1; Corelația Pearson ( $r$ ) = 0,913, pătratul de corelație Pearson ( $r^2$ ) = 0,8326, corelația Spearman ( $p$ ) = 0,9363, pătrat validat ( $q^2$ ) = 0,8326. ecuația modelului este  $y = 1$  \* Descriptorii de viabilitate celulară observată \*.

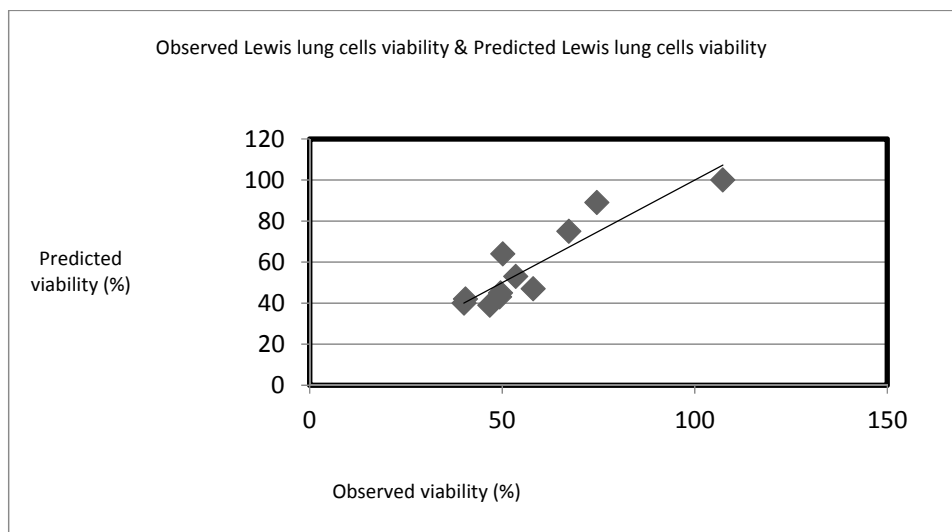


Figura 5. Diagrama scatter care arată corelația între viabilitatea carcinomului Lewis observată și cea prognozată (%).

Valorile  $r^2$  în cazul unui al doilea descriptor suplimentar la model sunt prezentate în Tabelul 3. Folosind mai mult de 2 descriptori, modelul își pierde previzibilitatea statistică. Peste 5 descriptori adăugați, adus la  $y = 1$  \* Descriptorii \* viabilității celulare observate;  $r^2 = 1$ .

Table 3. Descriptor's contribution to model using MLR

Number	Descriptors	$r^2$
1	QplogC1, QPlogKp	0.832
2	QplogC1, FISA	0.832
3	QplogC1, FOSA	0.832
4	QplogC1, Jm	0.833
5	QplogC1, QPlogPw	0.833
6	QplogC1, Energy	0.834
7	QplogC1, QPlogBB	0.835
8	QplogC1, QPlogPo/w	0.836

9	QplogC1, SASA	0.836
10	QplogC1, ACxDN <sup>.5</sup> /SA	0.837
11	QplogC1, QPlogPoct	0.840
12	QplogC1, QPpolrsz	0.840
13	QplogC1, Volume	0.840
14	QplogC1, CIQPlogHER	0.844
15	QplogC1, Glob	0.844

Modelul Danio rerio QSAR a fost construit utilizând SASA ca descriptor unic: corelația Pearson ( $r$ ) = 0,967, corelația pătrată Pearson ( $r^2$ ) = 0,934, corelația rangului Spearman ( $\rho$ ) = 0,872, pătrat validat ( $q^2$ ) = 0,934.  $y = 1,1668 + 0,934849 * \text{Viabilitatea Danio rerio embrionului observată}$  (Figura 6).

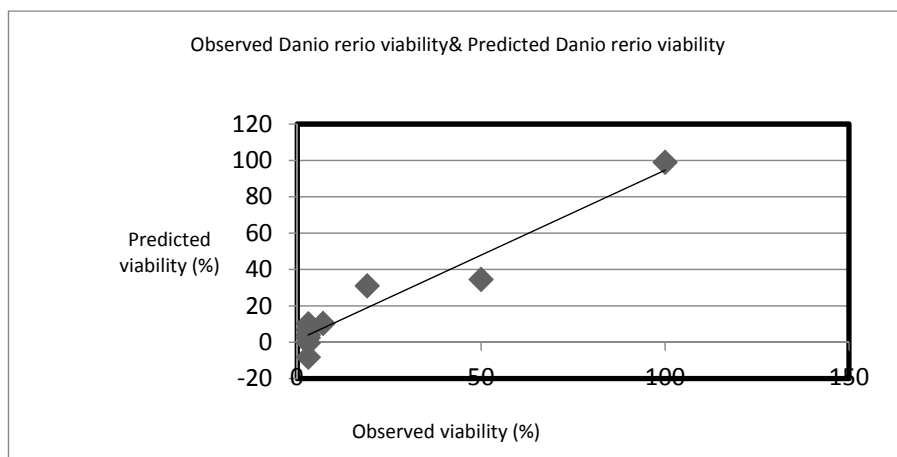


Figura 6. Diagrama scatter care arată corelația dintre viabilitatea embrionului Danio rerio observată și cea prognozată (%).

Valorile lui  $r^2$  la un al doilea descriptor suplimentar la model sunt prezentate în Tabelul 4. Folosind mai mult de 2 descriptori face modelul statistic nesemnificativ. Peste cinci descriptori adăugați, au condus la  $y = 1.1668 + 0.934849 * \text{Viabilitatea Danio rerio embrionului observată}$ ,  $r^2 = 1$ .

Table 4. Descriptor's contribution to model using MLR for Danio rerio viability QSAR model

Number	Descriptors	$r^2$
1	SASA, Jm	0.934
2	SASA, QPlogBB	0.934
3	SASA, Energy	0.935
4	SASA, QPlogKp	0.935

5	SASA, QPlogPw	0.935
6	SASA, FISA	0.935
7	SASA,	0.935
8	SASA, QPlogPo/w	0.937
9	SASA, ACxDN <sup>5</sup> /SA	0.938
10	SASA, QPlogPC1	0.939
11	SASA, QplogPoct	0.942
12	SASA, CIQlogHER	0.944
13	SASA, QPpolrsz	0.944
14	SASA, Glob	0.944
15	SASA, Volume	0.944

Modelul QSAR pentru construirea malformației de celule *Danio rerio* utilizând descriptorul SASA prezintă o corelație Pearson ( $r$ ) = 0,980, Pearson corelația pătrată ( $r^2$ ) = 0,961, Corelația rangului Spearman ( $p$ ) = 0,920, pătrat validat pătrat ( $q^2$ ) = 0.961,  $3.23104 + 0.961368 * \text{Danio rerio malformație observată (\%)} (Figura 7; Tabelul 5).$

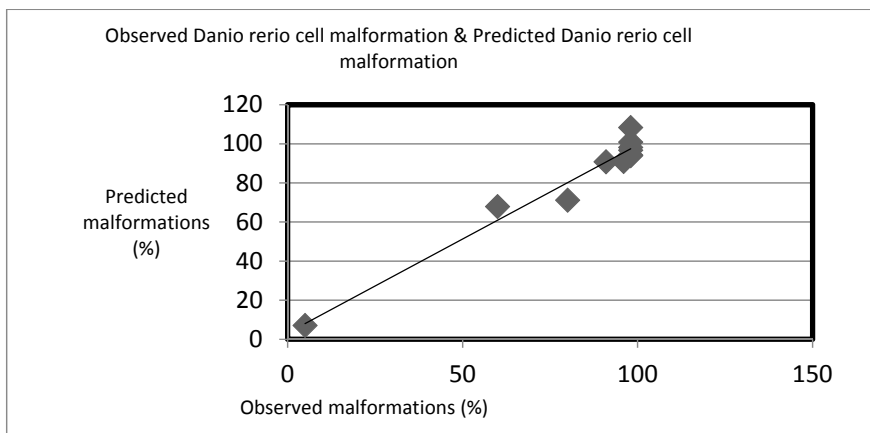


Figure 7. Scatter plot showing correlation between observed and predicted *Danio rerio* embryo malformations (%)

Modelul QSAR pentru celulele limfomului histocitar uman U937 utilizând descriptorul ACxDN<sup>5</sup> / SA prezintă o corelație Pearson ( $r$ ) = 0,928, Pearson corelație pătrată ( $r^2$ ) = 0,862, Corelația rangului Spearman ( $p$ ) = 0,963,  $0,862, y = 8,85165 + 0,862085 * \text{Viabilitatea celulelor limfomului histocitar observat (\%)} (Figura 8).$

Table 5. Descriptor's contribution to model using MLR for *Danio rerio* cell malformation QSAR model

Number	Descriptors	$r^2$
--------	-------------	-------

1	SASA, Jm	0.961
2	SASA, QPlogBB	0.961
3	SASA, Energy	0.961
4	SASA, QPlogKp	0.961
5	SASA, QPlogPw	0.961
6	SASA, FISA	0.961
7	SASA, FOSA	0.961
8	SASA, QPlogPo/w	0.961
9	SASA, ACxDN <sup>0.5</sup> /SA	0.967
10	SASA, QPlogPC1	0.962
11	SASA, QplogPoct	0.962
12	SASA, CIQPlogHER	0.963
13	SASA, QPpolsz	0.963
14	SASA, Glob	0.963
15	SASA, Volume	0.963

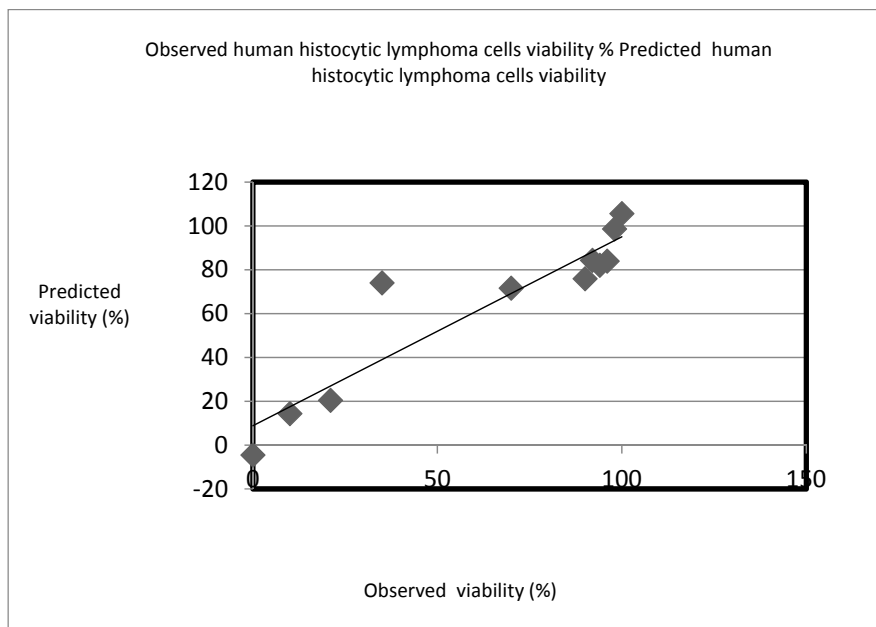


Figura 8. Diagrama care arată corelația între viabilitatea histiociclismomului uman observată și cea prognozată (%)

Valorile  $r^2$  în cazul unui al doilea descriptor suplimentar pentru modelul de contribuție sunt prezentate în Tabelul 6. Folosind mai mult de 2 descriptori face modelul statistic ne semnificativ. Peste 5 descriptori au fost adăugați la  $y = 8.85165 + 0.862085 * \text{Viabilitatea celulelor limfomului histiocic observat (\%)} a$  condus la  $r^2 = 1$  (Tabelul 6).

Table 6. Descriptor's contribution to model using MLR for human histiocytic lymphoma cells viability QSAR model

Number	Descriptors	$r^2$
1	ACxDN^5/SA,Jm	0.870
2	ACxDN^5/SA,QPlogKp	0.870
3	ACxDN^5/SA,QPlogBB	0.870
4	ACxDN^5/SA,QPlogHERG	0.866
5	ACxDN^5/SA,QPlogPo/w	0.870
6	ACxDN^5/SA,QPlogPw	0.870
7	ACxDN^5/SA,QPlogoct	0.866
8	ACxDN^5/SA,QPlogPC16	0.870
9	ACxDN^5/SA,globularity	0.866
10	ACxDN^5/SA,volume	0.866
11	ACxDN^5/SA,FISA	0.870
12	ACxDN^5/SA,FOSA	0.870
13	ACxDN^5/SA,SASA	0.863
14	ACxDN^5/SA,QPpolrz	0.866
15	ACxDN^5/SA,Energy	0.864

Modelul QSAR pentru celulele epiteliale alveolare umane A549 care utilizează globularitatea ca descriptor arată o corelație Pearson ( $r$ ) = 0,872, pătratul de corelație Pearson ( $r^2$ ) = 0,760, corelația rangului Spearman ( $p$ ) = 0,718, pătrat validat pătrat ( $q^2$ ) = 0.760,  $y = 0.214023 + 0.760015 * \text{Proliferarea celulelor epiteliale alveolare umane observate CI (au)}$  (Figura 9 și Tabelul 7).

Figura 9. Plot care prezintă corelația între celulele epteliale alveolare umane observate și prezise CI (u.a)

Number	Descriptors	$r^2$
1	Globularity, QplogPoct	0.760
2	Globularity, QPlogPC16	0.760



3	Globularity, Energy	0.766
4	Globularity, Qppolrz	0.769
5	Globularity, ACxDN <sup>5</sup> /SA	0.769
6	Globularity, Volume	0.769
7	Globularity, SASA	0.769
8	Globularity, QPlogpo/w	0.785
9	Globularity, QPlogHERG	0.789
10	Globularity, FOSA	0.792
11	Globularity, Jm	0.795
12	Globularity, QPlogPw	0.795
13	Globularity, QPlogKp	0.797
14	Globularity, QplogBB	0.797
15	Globularity, FISA	0.797

## CONCLUZII

Limfomul histocitic uman și celulele epiteliale alveolare au prezentat o sensibilitate crescută la PEI (viabilitatea celulară este 0% la PEI 15 μg / ml) comparativ cu celulele carcinomului pulmonar Lewis și cu embrionii Danio rerio (viabilitatea celulelor este de 85% la PEI 15 μg / ml). Analiza globală a toxicității computaționale a arătat că PEI de 25 kDa are proprietăți de droguri slabe în monoterapie și rate slabe de absorbție orală. QplogC1 (coeficientul de partiție), SASA (suprafața totală accesibilă solventului), ACxDN<sup>5</sup> / SA (indicele interacțiunii coeziunii în solide), valorile globularității sunt foarte corelate cu proprietățile toxice ale polimerului BPEI 25kDa.

### 4.6. STUDII DE DECORAREA A SUPRAFETEI NANOSTRUCTURILOR – “ BIO NANO DEVICE”

Moleculele de suprafață celulară (CSM), cum ar fi L selectin, VLA-4, LFA-1, CD2, CD4, TCR, CD44, CD45RA și CD45RO, joacă un rol major în interacțiunea, semnalizarea și funcția celulară. CSM sunt într-un "mozaic" de state activate? Aceste stări determină comportamentul celulelor. Celulele sunt controlate de un "cocktail" de molecule care acționează asupra CSM modularea stării lor. Sistemul Nano a fost conceput folosind metode computaționale cum ar fi dinamica moleculară, andocare, proiectarea ligandului, screening-ul virtual și metode experimentale, cum ar fi calorimetria de titrare izotermică (ITC) și tehnicile de imagistică cu o singură celulă. Sistemul este compus din nano polimeri, plasturi de grafen și fulleren pe care sunt încorporați "liganzi" - săruri amino-acizi sau peptide mici pentru CSM. Analizoare fizice chimice au fost utilizate pentru a activa MSMC. Interfața celulară prin MSMC permite controlul și ghidarea interacțiunii dinamice celulare cu toate căile care implică celula. MSMC prin plasa sa de nano polimer poate proteja sau stabiliza o anumită celulă sau țesut. MSMC a fost făcută cu celule specifice

prin încorporarea de motive Ig împotriva diferitelor tipuri de celule. Modelele computaționale ale L-selectinei, VLA-4, LFA-1, CD2, CD4, TCR, CD44, CD45RA și CD45RO au fost proiectate și încorporate într-o plasă de nano polimer. Suprafața externă MSMC a fost acoperită cu fosfatidilinositol, sphingnomielin și mono-strat de colesterol. Scopul sistemului este de a fi administrat iv. În prima etapă a dezvoltării, atenția sa axat pe manipularea unică a celulelor. A fost testată viabilitatea celulei (moartea celulară neintenționată) și lipsa efectelor adverse cum ar fi agregarea, hemoliza4, toxicitatea. Fiecare receptor a fost caracterizat individual și au fost elaborate o serie de motive proteice pentru încorporarea în MSMC. În concluzie, un dispozitiv bio-nano5 a fost conceput pentru a controla o celulă prin stimularea / inhibarea CD-urilor și primelor. Sistemul a fost conceput pentru a fi specific celular și țesut specific; dispozitivul este "controlat" de stimuli fizico-chimici. Scopul final al acestui sistem este de a controla volume mari de celule în cele din urmă țesuturi.

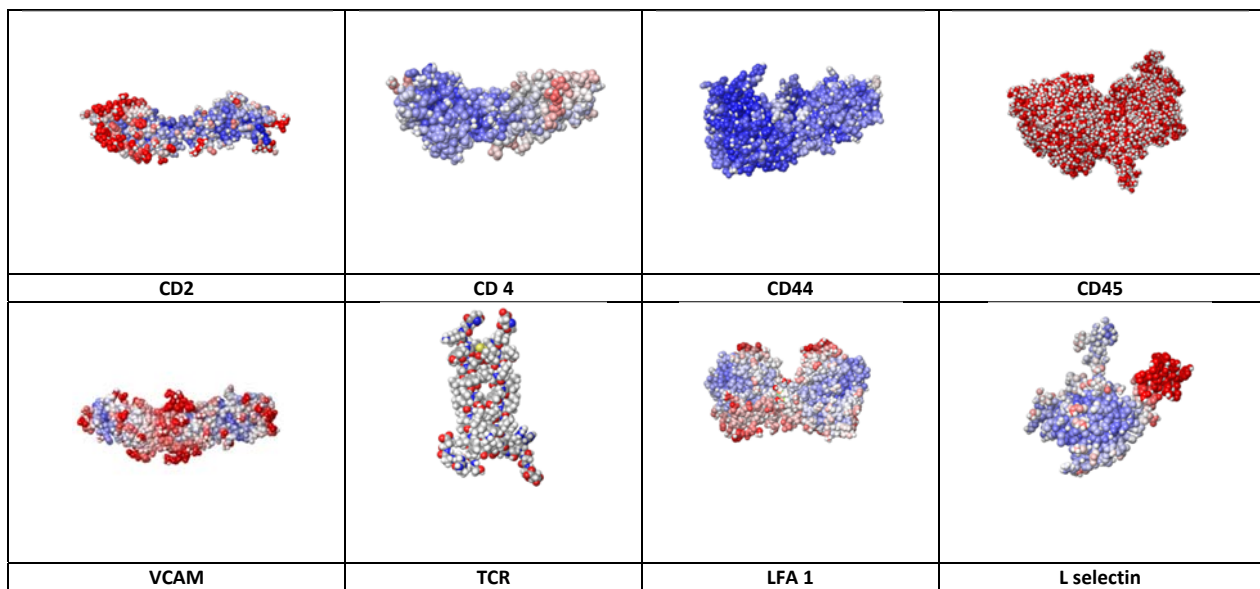


Figura 1 proteine ce decoreaza suprafata nanostructurii

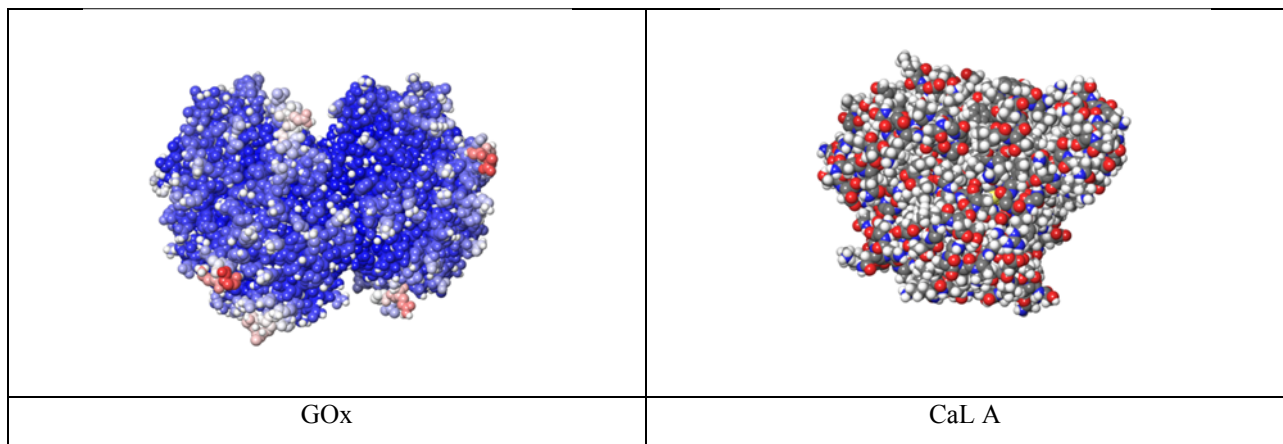


Figura 2 GOx si CaL

Protein	Sum positive surface area(A <sup>2</sup> )	Sum neative surface area(A <sup>2</sup> )	Sum donor surface area(A <sup>2</sup> )	Sum acceptor surface area(A <sup>2</sup> )	Hydrophobic moment	Molecular weight(kDa)	Charge(eV)
CD2	5392.89	2977.10	1839.57	1968.11	1210.43	21.32	5.00
CD4	28859.38	16591.90	9097.19	10327.81	2489.05	136.52	-1.00
CD44	7060.37	4630.51	2435.62	2964.77	523.96	33.43	-8.00
CD 45	28764.07	16709.32	9098.74	10427.34	2498.31	136.52	3.00
VCAM	5336.34	3417.40	1718.68	2337.94	1087.59	21.85	-9.00
TCR	3036.63	1572.36	682.02	629.96	185.49	7.50	2.00
LFA1	8452.90	5023.86	2394.24	3409.76	157.03	43.29	-4.00
L selectin	4090.56	2411.20	1390.75	1479.39	785.56	19.45	3.00
Glucooxidase	18542.52	1134.58	5547.59	7712.27	1854.73	134.20	-28.00
CaL A enzime	8249.18	4850.85	2200.60	3023.05	1172.71	45.93	-5.00

### Concluzii:

Interactiunea polimerilor cu nanostructurile poate fi cuantificata. Nanostructurile se preteza la decorarea cu protein fara a influenta functia acestora (glucoxidaza, imunoglobuline). GEMNs e un nano biosistem fezabil cu aplicatii in medicina, oncologie si radio imagistica.

### Referinte

1. Lungu C.N.; Diudea M.V.; Putz M.V.. Ligand shaping in induced fit docking of Mra Y inhibitors. Polynomial discriminant and laplacian operator as biologicaly activity descriptors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18(7); 1377.
2. Wang L; Hu C.; Shao L.. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, 12, 1227-1249
- 3 Lungu C.N., Diudea M.V., Putz M.V. Ligand shaping in induced fit docking of MraY inhibitors. Polynomial discriminant and laplacian operator as biological activity descriptors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18(7), 1377.
- 4 Diudea M.V., Lungu C.N., Nagy C.L. Cube-rhombellane related structures: A drug perspective., *Molecules*, 2018, 23(10), 2533.
- 5 Sabitha K., Vijayalakshmi R. Finding new inhibitors for EML4-ALK fusion protein: A computational approach. *I.R.J.P.*, 2012, 3(3).
- 6 Quidwai T. QSAR modeling docking and ADMET studies for exploration of potential antimalarial components against Plasmodium falciparum. *In silico Pharmacol.*, 2017, 5:6.

- 7 Majumdar S., Basak S.C., Lungu C.N., Diudea M.V., Grunald G.D. Mathematical structural descriptors and mutagenicity assessment: a study ith congeneric and diverse datasets. SAR QSAR Environ. Res., 2018, 29(8), 579-590.
- 8 Majumdar S., Basak S.C., Lungu C.N., Diudea M.V., Grunald G.D. Mathematical structural descriptors and mutagenicity assessment: a study ith congeneric and diverse datasets. SAR QSAR Environ. Res., 2018, 29(8), 579-590
- 9 Lungu C.N. C-C Chemokine receptor type 3 inhibitors: bioactivity prediction using local vertex invariants based on thermal conductivity layer matrix. Studia UBB Chemia, 2018, 1, 177-188.
- 10 Hunter AC. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58(14),1523-1531.
- 11 Lv H.; Zhang S.; Wang B.; Cui S.; Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. J. Controlled Release. 2006, 114(1), 100-109.
- 12 Fischer D.; Bieber T.; Li YX.; Elsasser HP.; Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharm. Res. 1999, 16(8),1273-1279
- 13 Moghimi SM.; Symonds P.; Murray JC.; Hunter AC.; Debska G., Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/ therapy. Mol. Ther. 2005, 11(6),990-995.