

Executive summary of the activities carried out during the implementation period

In the framework of the activities carried out, we continued the studies started in the previous phases. Thus, the effect of the obtained systems on tumor and normal spheroids was studied and a therapeutic index was proposed. Thus, Gramicidin A induces in healthy cells grown in monolayer (2D) a reduction of viability by 50% (IC₅₀) at a concentration of 12.5 μ M similar to NP-GA. Simple NPs produce a similar effect at double the concentration (25 μ M), after a 48h treatment. The effects produced in tumor cells under the same conditions are observed at values between 3 and 6 μ M. The results indicate that both GA and NP-GA are more effective for tumor cells compared to healthy ones. However, the effects produced in the case of spheroids are different. This is due to the intercellular interactions formed in the 3D construct. These interactions, similar to those observed in vivo, also represent a better protection against the applied treatments. This led to an increase in the concentration at which we observe the same effect, i.e. the reduction of viability by 50%. Thus, for L929 spheroids treated with GA and NP-GA the IC₅₀ value is 30-40 μ M, while for the tumor ones the IC₅₀ values are 25 μ M. We thus have a value of therapeutic indices for the investigated systems greater than or close to 1, indicating a greater antitumor effect compared to the toxic effect produced at the same concentration.

The second part of the phases followed the effects induced at the membrane level and their correlation with the cell biology data as well as the proposal of a mechanism of action. Taking into account that the peptide used is known to form ion channels both in the model membranes and in the cell membrane, we implemented studies that allow the identification of the changes produced at the membrane level. Although GA alone, but also simple NPs produced the release of LDH, an indicator of membrane lysis, in the case of NP-GA, this effect is diminished. The result is surprising, thus indicating that the use of NPs loaded with GA can lead to changes in the NP structure and the interactions between NP/GA and lipid membranes. The studies were thus focused on the effects produced at the membrane level, following the changes in membrane fluidity in both model membranes and biological membranes. In the case of GA alone, the application of increasing concentrations led to a stiffening of the lipid membranes both at 20 °C and at 37 °C. This result indicates that the peptide is inserted into the membrane, and from the LDH results we have the confirmation that a transmembrane pore was also created. In the case of NP with or

without GA, a correlation of biological effects with membrane biophysics studies can be observed. Thus, for HCT-116 cells treated with the 4 types of NPs, a similar membrane stiffening effect is observed, while in the case of cell biology studies, a similar decrease in viability is observed in percentage for all systems investigated. Unlike HCT-116 cells, in the case of HT-29 cells, different effects induced at the membrane level by the systems with and without GA are observed, but also at the level of the effect on cell viability. For NP without GA, after a slight stiffening we have an increase in fluidity, while for viability we have a sudden drop in viability. On the contrary, for NPs with GA, the application of the treatment leads to the stiffening of the membrane and to a lower toxicity compared to those without GA. These changes are also correlated with an increased release of LDH, which indicates a lysis of the cell membrane. Based on the results, we can say that the main mechanism of action of simple or GA-loaded NPs is triggered by the interaction with the cell membrane, but showing different effects depending on the cell line and the type of NP. Thus, simple NPs show greater toxicity and lead to membrane lysis, which ultimately lead to a decrease in membrane fluidity, while those with GA lead to a stiffening of the membrane, indicating a continuous accumulation of NPs in the membrane without leads to their lysis.

The expected results were:

1. Correlating cell biology results with biophysics studies and proposing a mechanism of action of transport systems;
2. 1 article sent for publication and presentation of the results at specialized conferences;
3. Active project web page;
4. Scientific report stage 3
5. Final scientific report

The objectives of stage III were fully achieved, and the indicators achieved within the stage are as follows:

Proposed mechanism of action of ACP/ACP-NPs;

Project web page active and kept up to date: <https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/67->

projects.html – will be updated with results as the articles in the works are accepted;

2 articles in preparation with the results presented in stage 2 and 3:

- the first article presents the effect of peptides on model membranes and cell membranes – the article will be sent for publication in the next 2 months;
- the second article presents the cell biology results (MTT, ATP and LDH release, ROS formation, cell cycle modification, morphological changes, etc.) obtained for the transport systems made within the project and applied to cell spheroids – the article will submit for publication by the end of the year.

1 oral presentation:

- Diana Lavinia Stan and Mihaela Bacalum, Effects of Gramicidin A on membrane fluidity, Bucharest University Faculty of Physics 2024 Meeting, 05/24/2024, Bucharest

3 poster presentations at international conferences:

- Roberta (Stoica) Moisa, Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Novel approach for anticancer peptides carried by nanoparticles, IUPAB2024, 24-28.06.2024, Kyoto, Japan
- Bogdan Zorila, Diana Lavinia Stan, Roberta (Stoica) Moisa, Mihaela Bacalum, Anticancer peptides delivery systems effects on model and natural lipid membranes, IUPAB2024, 24-28.06.2024, Kyoto, Japan
- Roberta (Stoica) Moisa, Ioana-Claudia Draghici, Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Using nanoparticles as carriers for anticancer peptides in two cancerous cell lines, The 7th edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences ” IC- ANMBES 2024” 17 - 20 September 2024, Brasov, Romania

Stage report and final scientific report.

Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare

În cadrul activităților realizat am continuat studiile începute în fazele anterioare. Astfel a fost studiat efectul sistemelor obținut asupra sferoizilor tumorali și normal și a fost propus un indice terapeutic. Astfel, Gramicidina A induce în celulele sanatoase crescute în monostrat (2D) o reducere a viabilității cu 50 % (IC50) la o concentrație de 12,5 μM similar cu NP-GA. NP simple produc un efect similar la dublul concentrației (25 μM), după un tratament de 48h. Efectele produse în celulele tumorale la aceleași condiții, sunt observate la valori între 3 și 6 μM. Rezultatele indică că atât GA cât și NP-GA prezintă o eficiență mai mare pentru celulele tumorale comparativ cu cele sanatoase. Efectele produse în cazul sferoizilor sunt însă diferite. Acest lucru este datorat interacțiilor intercelulare formate în constructul 3D. Aceste interacții, similare cu cele observate in vivo, reprezintă și o mai bună protecție împotriva tratamentelor aplicate. Acest lucru a dus la o creștere a concentrației la care observăm același efect, adică reducerea viabilității cu 50%. Astfel, pentru sferoizii de L929 tratați cu GA și NP-GA valoarea IC50 este de 30-40 μM, pe când pentru cei tumorali valorile IC50 sunt de 25 μM. Avem astfel o valoare de indici terapeutici pentru sistemele investigate mai mari sau aproape de 1 indicând un efect antitumoral mai mare comparativ cu efectul toxic produsă la aceeași concentrație.

A doua parte a fazei a urmărit efectele induse la nivel membranar și corelarea lor cu datele de biologie celulară precum și propunerea unui mecanism de acțiune. Ținând cont că peptida utilizată este cunoscută că formează canale ionice în atât în membranele model cât și în membrana celulelor, am implementat studii care permit identificarea modificărilor produse la nivel membranar. Deși GA singură, dar și NP simple au produs eliberare de LDH, un indicator al lizei membranare, în cazul NP-GA, acest efect este diminuat. Rezultatul este surprinzător, indicând astfel că utilizarea unor NP încărcate cu GA poate duce la modificarea structurii NP și a interacțiilor realizate între NP/GA și membranele lipidice. Studiile au fost astfel focusate pe efectele produse la nivel membranar urmărind modificările de fluiditate membranară atât în membrane model cât și membrane biologice. În cazul GA singure, aplicarea de concentrații crescătoare a dus la o rigidizare a membranelor lipidice atât la 20 °C cât și la 37 °C. Acest rezultat indică faptul că peptida se inseră în membrana, iar din rezultatele de LDH avem confirmarea că a fost realizat și un por transmembranar. În cazul NP cu sau fără GA se poate observa o corelație a efectelor biologice cu studiile de biofizică membranară. Astfel, pentru celulele HCT-116 tratate cu cele 4 tipuri de NP se

observa un efect similar de rigidizare a membranei, pe cand in cazul studiilor de biologie celulara se observa o scadere a viabilitatii similara in procent pentru toate sistemele investigate. Spre deosebire de celulele HCT-116, in cazul celulelor HT-29 se observa efecte diferite induse la nivelurile membranei de sistemele cu si fara GA, dar si la nivelul efectului asupra viabilitatii celulare. Pentru NP fara GA, dupa o usoara rigidizarea avem o crestere a fluiditatii, pe cand pentru viabilitate avem o scadere brusca a viabilitatii. Contrar, pentru NP cu GA, aplicarea tratamentului duce la rigidizarea membranei si la o toxicitate mai scazuta comparativ cu cele fara GA. Aceste modificari sunt corelate si cu o eliberare mai crescuta de LDH, ceea ce indica o lizare a membranei celulare. In baza rezultatelor putem spune ca mecanismul principal de actiune al NP simple sau incarcate cu GA este declansata de interactia cu mebrana celulara, prezentand insa diferite efecte in functie de linia celulara si tipul de NP. Astfel, NP simple prezinta o toxicitate mai mare si duc la o lizarea a menbranei, ceea ce in final duc la o scadere a fluiditatii membranare, pe cand cele cu GA duc la o rigidizare a membranei indicand o continua acumulare a NP in membrana fara a duce la lizarea acestora.

Rezultatele previzionate au fost:

1. Corelarea rezultatelor de biologie celulară cu studiile de biofizică și propunerea unui mecanism de actiune al sistemelor de transport;
2. 1 articol trimis spre publicare și prezentarea rezultatelor la conferințe de specialitate;
3. Pagină web proiect activă;
4. Raport științific etapa 3
- 5, Raport științific final

Obiectivele etapei III au fost realizate integral, iar indicatorii de ralizare îndepliniți în cadrul etapei sunt următorii:

Mecanism de acțiune al ACP/ACP-NPs;

Pagina web proiect activă și menținută la zi: <https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/67->

projects.html – se va updatea la rezultate pe măsură ce articolele în lucru sunt acceptate;

2 articole in pregătire cu rezultatele prezentate în etapa 2 și 3:

- primul articol prezintă efectul peptidelor asupra membranelor model și a membranelor celulare – articolul se va trimite spre publicare în următoarele 2 luni;
- al doilea articol prezintă rezultatele de biologie celulară (MTT, eliberare de ATP și LDH, formare de ROS-uri, modificarea ciclului celular, modificări morfologice, etc) obținute pentru sistemele de transport realizate în cadrul proiectului și aplicate asupra sferozilor celulari – articolul se va trimite spre publicare până la sfârșitul anului.

1 prezentare orală:

- Diana Lavinia Stan and Mihaela Bacalum, Effects of Gramicidin A on membrane fluidity, Bucharest University Faculty of Physics 2024 Meeting, 24,05,2024, Bucharest

3 prezentări poster la conferințe internaționale:

- Roberta (Stoica) Moisa, Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Novel approach for anticancer peptides carried by nanoparticles, IUPAB2024, 24-28.06.2024, Kyoto, Japan
- Bogdan Zorila, Diana Lavinia Stan, Roberta (Stoica) Moisa, Mihaela Bacalum, Anticancer peptides delivery systems effects on model and natural lipid membranes, IUPAB2024, 24-28.06.2024, Kyoto, Japan
- Roberta (Stoica) Moisa, Ioana-Claudia Draghici, Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Using nanoparticles as carriers for anticancer peptides in two cancerous cell lines, The 7th edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences ” IC-ANMBES 2024” 17 - 20 September 2024, Brasov, Romania

Raport de etapa si raport stiintific final.