

Executive summary of the activities carried out during the implementation period

This stage followed in the first part, taking into account the studies carried out previously, but also the information from the literature, the selection of some peptides with an increased anti-tumor activity and some protocols for obtaining bio-inorganic nanostructures. Starting from the results obtained in previous studies, we first selected 3 cationic peptides with antitumor efficiency: Melittin, Cecropin A and a hybrid of Melittin and Cecropin A. In order to be able to have a starting point in the following activities regarding the concentrations that affect the spheroids tumors, we performed a preliminary study, in which spheroids obtained from HT-29 and HCT-116 were treated with different peptide concentrations (1, 2.5, 5 and 10 μM). The first parameter investigated was their morphological change, achieved by transmission microscopy. The obtained results are encouraging, being able in the future stages to obtain ACP-NP using these three peptides to begin with. We consider diversifying the peptides tested, to allow adaptation of the protocols in case they do not give the expected results.

In the second part of the project, based on literature studies, were proposed 2 protocols for obtaining bio-inorganic nanostructures. The obtained bio-inorganic nanostructures were investigated by scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS) in order to determine their shape and size. The data obtained by DLS indicate that the diameter of the two types of nanoparticles is ~ 100 nm and 75 nm. The results obtained from the SEM images indicate values at least 2 times higher than those estimated from the DLS measurements. The differences are due to the SEM sample preparation protocol, which will be improved in the next phase. A preliminary test was also carried out to determine whether simple nanoparticles (without peptides) show toxicity to normal skin cells. The results showed that the obtained nanoparticles do not show toxicity even at the concentration of 100 μM . Based on the results obtained in this stage, in the next stage the protocol for obtaining nanoparticles will be refined to allow the incorporation of the peptides investigated in this phase, also trying to modulate the size of the nanoparticles.

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

- List of specific ACPs selected to be used: Melitin, Cecropin A and the Melitin-Cecropin A hybrid and reserve list: P6, Gramicidin A and Indolicidine;
- Detailed protocols that will be run during the project: presented in Act 1.2;
- Active project web page (English and Romanian): <https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/67-projects.html>;
- 1 article in preparation: presents the studies carried out on tumor spheroids using cationic peptides;
- 2 poster presentations at an international conference;
- Scientific report.

Romanian version below

Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare

Această etapă a urmărit în prima parte, ținând cont și de studiile realizate anterior, dar și de informațiile din literatură, selecția unor peptide cu o activitate antitumorală crescută dar și a unor protocoale de obținere a nanostructurilor bio-anorganice. Plecând de la rezultatele obținute în studii anterioare, am selectat pentru început 3 peptide cationice cu eficiență antitumorală: Melitina, Cecropina A și un hibrid al Melitinei și Cecropinei A. Pentru a putea avea în următoarele activități o bază de plecare cu privire concentrațiile care afectează sferoizii tumorali, am realizat un studiu preliminar, în care sferoizi obținuți din HT-29 și HCT-116 au fost tratați cu diferite concentrații de peptidă (1, 2.5, 5 și 10 μM). Ca prim parametru investigat a fost modificarea morfologică a acestora, realizată prin microscopie de transmisie. Rezultatele obținute sunt încurajatoare, putând în etapele viitoare să obținerea de ACP-NP utilizând pentru început aceste trei peptide. Avem în vedere diversificarea peptidelor testate, pentru a permite adaptarea protocoalelor în cazul în care acestea nu dau rezultatele preconizate.

În a doua parte a proiectului, în baza studiilor din literatură au fost propuse 2 protocoale de obținere a nanostructurilor bio-anorganice. Nanostructurile bio-anorganice obținute au fost investigate prin microscopie electronică cu scanare (SEM) și împrăștierea dinamică a luminii (DLS) pentru a putea determina forma și dimensiunea acestora. Datele obținute prin DLS indică că diametrul celor două tipuri de nanoparticulele este de ~ 100 nm și 75 nm. Rezultatele obținute din imaginile de la SEM indică valori de cel puțin 2 ori mai mari decât cele estimate din măsurătorile de DLS. Diferențele sunt datorate protocolului de pregătire al probelor de SEM, acesta fiind îmbunătățit în faza următoare. A fost realizat și un test preliminar pentru a determina dacă nanoparticulele simple (fără peptide) prezintă toxicitate pentru celulele normale de piele. Rezultatele au arătat că nanoparticulele obținute nu prezintă toxicitate nici la concentrația de 100 μM . Pe baza rezultatele obținute în această etapă, în etapa următoare se va rafina protocolul de obținere a nanoparticulelor pentru a permite încorporarea peptidelor investigate în cadrul acestei faze, încercând și modularea dimensiunii nanoparticulelor.

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

- Lista ACP-uri specifice selectate pentru a fi utilizat: **Melitină, Cecropină A și hibridul Melitină-Cecropină A** și listă rezervă: **P6, Gramicidina A și Indolicidina**;
- Protocoale detaliate care vor fi rulate pe parcursul proiectului: prezentate în cadrul Act 1.2;
- Pagina web proiect activa (engleza și română): <https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/67-projects.html>;
- 1 articol în pregătire: prezintă studiile realizate pe sferoizi tumorali utilizând peptidele cationice;
- 2 prezentări poster la o conferință internațională;
- Raport științific.