

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 in the previous phase, but also the preliminary information, the selection and proposal of a final protocol for obtaining bio-inorganic nanostructures. Gramicidin A (GA) peptides were used to obtain transport systems. The obtained systems were then characterized by dynamic light scattering (DLS) to be able to determine their shape and size. The results showed that the NPs obtained by precipitation with ammonia had the smallest dimensions, around 60 nm. Additionally, the NPs were characterized by UV-Vis spectrometry to highlight the insertion of GA into the NPs. We have in mind the diversification of the tested peptides, and to determine if the proposed system also allows the transport of other peptides, we have started the preparation of NP incorporating Melittin and a hybrid Melittin-Cecropin A. In the next stage, the results will be presented for these new systems obtained to allow protocols to be adapted if they do not produce the expected results.

In the second part of the project, the NP systems made in this phase were investigated to determine their biocompatibility on murine fibroblast cells. The results obtained are encouraging, indicating that cell viability is less affected compared to tumor cells. Next, the anticancer effects on 2 tumor lines (HT-29 and HCT-116) grown in monolayer (2D) or spheroids (3D) were studied. The results showed that the system obtained by precipitation with ammonia is more efficient, something that can be determined by the smaller dimensions. The efficiency of the systems is higher in the case of HCT-116 cells compared to HT-29. Studies will continue in the next stage to determine the mechanism of action of NP.

In the third part of the project, the study of the effect of the peptide alone or of the obtained systems on the biomimetic membranes (POPC liposomes) and the cell membrane (HCT-116) at different temperatures or peptide co-concentrations was started. The results showed that GA and the obtained nanoparticles induce a stiffening of the lipid membranes. The preliminary results obtained confirm their insertion in the lipid membranes. In the next stage, investigations will continue on the rest of the systems made and the microscopy tests made on giant lipid systems (GUV) will be completed.

The expected results were:

1. Final protocols for the system that presents the best results;
2. 1 article published/sent for publication and presentation of the results at specialized conferences;
3. The active project web page;
4. Scientific report stage 2

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

- **Final protocol** for the most efficient peptide transport system;
 - The project web page is active and kept up to date: <https://www.nipne.ro/proiecte/pn3/67-projects.html>;
 - **1 published article:** presents the studies carried out on tumor spheroids using cationic peptides:
 - **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Cancer Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial Peptides), a New Strategy against Colorectal Cancer, Toxins, 2023, <https://doi.org/10.3390/toxins15>
 - **1 oral presentation** at an international conferences;
 - **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Cationic peptides and proton therapy, 22nd International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science, Constanta, Romania, 09-12.07.2023;
 - **4 poster presentations** at an international conferences;
 - **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Peptide Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial peptides); a new strategy against colorectal cancer, EBSA 2023, 31.07-04.08.2023, Stockholm, Sweden;
 - **Mihaela Bacalum, Mina Raileanu, Bogdan Zorila** - EBSA 2023, 31.07-04.08.2023, Stockholm, Sweden;
 - **Bogdan Zorila, Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Antimicrobial peptides interaction with model and mammalian membranes, PIM 2023, 19-22.09.2023, Cluj-Napoca, Romania;
 - **Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Mina Raileanu, Stoica Roberta, Livia Chilug, Paul Mereuta** - Peptide doped ORMOSIL nanoparticles: preparation, characterization and efficiency testing on human cancer cell lines, PIM 2023, 19-22.09.2023, Cluj-Napoca, Romania;
 - **Dissemination of the project during the “Scoala de vara de Stiinta si Tehnologie de la Magurele”** editia a VI-a, 19.08-03.09.2023, where 3 highschool students tested the NP obtained on spheroids.
 - **2 articles in preparation:** shows the effect of peptides on model membranes and cell membranes.
- **Scientific report stage 2.**

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 în faza anterioară, dar și de informațiile preliminare, selecția și propunerea unui protocol final de obținere a nanostructurilor bio-anorganice. Pentru obținerea sistemelor de transport a fost utilizată peptida Gramicidină A (GA). Sistemele obținute au fost apoi caracterizate prin împrăștierea dinamică a luminii (DLS) pentru a putea determina forma și dimensiunea acestora. Rezultatele au arătat că NP obținute prin pricipitare cu amoniac au avut dimensiunile cele mai mici, în jur de 60 nm. Suplimentar, NP au fost caracterizate prin spectrometrie UV-Vis pentru a evidenția inserarea GA în NP. Avem în vedere diversificarea peptidelor testate, și de a determina dacă sistemul propus permite și transportul altor peptide, am început pregătirea de NP care încorporează Melitina și un hibrid Melitina-Cecropina A. În etapa următoare se vor prezenta rezultatele și pentru aceste noi sisteme obținute. Pentru a permite adaptarea protocoalelor în cazul în care acestea nu dau rezultatele preconizate.

În a doua parte a proiectului, sistemele de NP realizate în această fază au fost investigate pentru a determina biocompatibilitatea lor pe celule de fibroblast murine. Rezultatele obținute sunt încurajatoare, indicând că viabilitatea celulară este mai puțin afectată comparativ cu celulele tumorale. În continuare au fost studiate efectele anticancerigene pe 2 linii tumorale (HT-29 și HCT-116) crescute în monostrat (2D) sau sferoizi (3D). Rezultatele au arătat că sistemul obținut prin precipitare cu amoniac este mai eficient, lucru care poate să fie determinat de dimensiunile mai mici. Eficiența sistemelor este mai mare în cazul celulelor HCT-116 comparativ cu HT-29. Studiile vor continua în etapa următoare pentru a determina mecanismul de acțiune al NP.

În a treia parte a proiectului, a fost demarat studiul efectului peptidei singure sau a sistemelor obținute asupra membranelor biomimetice (lipozomi din POPC) și a membranei celulare (HCT-116) la diferite temperaturi sau concentrații de peptidă. Rezultatele au arătat că GA și nanoparticulele obținute induc o rigidizare a membranelor lipidice. Rezultatele preliminare obținute confirmă inserarea acestora în membranele lipidice. În etapa următoare se va continua investigați pe restul de sisteme realizate și se vor completa testele cu cele de microscopie realizate pe sisteme lipidice gigantice (GUV).

Rezultatele previzionate au fost:

1. Protocoale final pentru sistemul care prezintă cele mai bune rezultate;
2. 1 articol publicat/trimis spre publicare și prezentarea rezultatelor la conferințe de specialitate;
3. Pagina web proiect activă;
4. Raport științific etapa 2

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

- **Protocol** final pentru cel mai eficient sistem de transport peptide;

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

- **1 articol publicat:** prezintă studiile realizate pe sferoizi tumorali utilizând peptidele cationice:

- **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Cancer Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial Peptides), a New Strategy against Colorectal Cancer, Toxins, 2023, <https://doi.org/10.3390/toxins15>

- **1 prezentare orală** la o conferință internațională;

- **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Cationic peptides and proton therapy, 22nd International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science, Constanta, Romania, 09-12.07.2023;

- **4 prezentări poster** la conferințe internaționale;

- **Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Peptide Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial peptides); a new strategy against colorectal cancer, EBSA 2023, 31.07-04.08.2023, Stockholm, Sweden;
- **Mihaela Bacalum, Mina Raileanu, Bogdan Zorila** - EBSA 2023, 31.07-04.08.2023, Stockholm, Sweden;
- **Bogdan Zorila, Mina Raileanu, Mihaela Bacalum** - Antimicrobial peptides interaction with model and mammalian membranes, PIM 2023, 19-22.09.2023, Cluj-Napoca, Romania;
- **Bogdan Zorila, Mihaela Bacalum, Mina Raileanu, Stoica Roberta, Livia Chilug, Paul Mereuta** - Peptide doped ORMOSIL nanoparticles: preparation, characterization and efficiency testing on human cancer cell lines, PIM 2023, 19-22.09.2023, Cluj-Napoca, Romania;

- **Diseminarea proiectului** în cadrul “Școala de vară de Știință și Tehnologie de la Magurele” ediția a VI-a, 19.08-03.09.2023, unde 3 liceeni au testat NP obținut pe sferoizi.

- **2 articole în pregătire:** prezintă efectul peptidelor asupra membranelor model și a membranelor celulare.

- **Raport științific faza 2.**