

**VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT II – MICROSCOPIC MORPHOLOGY**

ROXANA MARIA JELERIU



PhD THESIS

**CARRIER MICROSTRUCTURES FOR MOLECULES USED IN
GENE THERAPY**

- ABSTRACT -

Scientific Coordinator
PROF. MARIA PUIU, MD PhD

**T I M I Ș O A R A
2 0 2 5**

TABLE OF CONTENTS

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCTION | 3 |
| AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH | 5 |
| RESULTS | 7 |
| Influence of Synthesis Temperature on PU–DCSS Vectors | 7 |
| Formulation Optimization: Influence of the Auxiliary Agent GDA | 8 |
| Mathematical Modeling and Computational Simulation..... | 8 |
| Degradation Kinetics of PU..... | 8 |
| Higuchi Model for DNA/RNA Release..... | 9 |
| PU–Cell Membrane Interaction | 10 |
| Correlation Between Experimental and Theoretical Results | 11 |
| ORIGINAL CONTRIBUTIONS AND ELEMENTS OF NOVELTY..... | 12 |
| LIMITATIONS OF THE RESEARCH..... | 13 |
| CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS | 14 |

ABSTRACT

INTRODUCTION

Gene therapy represents one of the most advanced directions in modern medicine, aiming to treat genetic disorders by introducing healthy sequences of genetic material into the patient's cells. The success of such therapies relies on the availability of efficient delivery systems capable of transporting nucleic acids to target tissues, while protecting them from degradation and ensuring controlled release. In this context, although viral vectors have demonstrated high gene transfer efficiency, they also pose significant immunological and genetic risks, which have shifted research interest toward developing safer and more versatile non-viral vectors.

Non-viral systems based on lipidic, polymeric, or hybrid nanoparticles have emerged as promising alternatives. Among these, cationic polymers, such as polyethyleneimine and its derivatives, have demonstrated the ability to form stable complexes with DNA and RNA. However, recent studies have highlighted polyurethane (PU)—an elastic, biocompatible, and biodegradable polymer—as a superior candidate for gene delivery, due to its tunable physicochemical properties, high stability, and sensitivity to biological factors such as pH and enzymatic activity.

The first syntheses of PU for biomedical applications date back to the late 20th century. Still, their use as carriers of genetic material has expanded significantly in the 21st century, following the development of innovative emulsification and interfacial polyaddition techniques. These approaches have enabled the production of micro- and nanostructures with reduced size, capable of efficiently encapsulating and gradually releasing therapeutic molecules. Subsequent studies have demonstrated that variations in synthesis temperature can affect the activation energy and final polymer architecture, thereby influencing the vector's performance.

The present research builds upon this line of development, with the primary objective of exploring the potential of PU-based microstructures as carriers for nucleic acids. The thesis adopts an interdisciplinary approach, integrating materials chemistry, biopharmacy, and cell biology, to evaluate the physicochemical, biological, and functional properties of PU vectors. In the experimental phase, two types of PU carriers were synthesized—one in the presence and one in the absence of an auxiliary agent—to assess how these variations affect encapsulation capacity, stability, and release profile. Characterization was performed by determining solubility, conductivity, physicochemical stability, and release kinetics in simulated biological media.

Biocompatibility was assessed using human dermal fibroblast (HDFa) cell lines, which demonstrated high cell viability and a controlled interaction with cellular membranes. The adsorption and internalization behavior of the vectors was analyzed using established

mathematical models (Langmuir, Higuchi), complemented by computational simulations of diffusion and degradation processes. Numerical modeling, performed in Python 3.9, enabled the prediction of vector behavior based on physicochemical parameters, thereby reducing the need for extensive preliminary experiments.

Beyond its fundamental scientific contribution, this work also reflects a personal and professional motivation—to bridge the fields of materials science, nanotechnology, and medical practice. In the context of personalized medicine, where treatments are tailored to each patient's genetic profile, the development of safe, scalable, and efficient vectors becomes a strategic priority. Due to its versatile properties, PU emerges as a promising candidate for next-generation gene carriers, with potential applications in oncologic, cardiovascular, and genetic therapies.

The obtained results confirm that PU microstructures can function not only as passive supports but also as active entities capable of positively influencing the pharmacokinetic profile of the genetic material. The study demonstrates the stability, controlled release, and biocompatibility of these vectors, providing a solid foundation for further in vitro and in vivo validation studies.

The doctoral thesis comprises three experimental studies conducted in accordance with the Principles of the Declaration of Helsinki (1975, revised in 2013) and approved by the institutional ethics committee. The research includes the following studies:

- *Polyurethane Microstructures for 2'-Deoxycytidinic Acid Delivery: Preparation and Preliminary Characterization* (Medicina, MDPI, Switzerland);
- *The Influence of Synthesis Temperature on a Polyurethane Carrier Used for the Transfer of 2'-Deoxycytidylic Acid* (Medical and Surgical Journal of the Society of Physicians and Naturalists of Iași);
- *Theoretical Models and Simulations of Gene Delivery Using Polyurethane: The Role of PU in Personalized Therapy* (Biomedicines, MDPI, Switzerland).

These works were published between 2024 and 2025 in ISI-indexed journals (Medicina and Biomedicines, MDPI), and together they present an original contribution to the field of gene therapy by proposing and validating an integrated experimental–computational model for evaluating PU-based vectors.

AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH

The primary objective of this doctoral thesis is to develop, characterize, and validate PU-based microstructures as carrier systems for molecules used in gene therapy, with a focus on their controlled release, physicochemical stability, and biological compatibility as non-viral vectors. The research seeks to demonstrate the potential of PU as an innovative, biocompatible, and versatile material, capable of incorporating, protecting, and releasing nucleic acids (DNA, RNA, or model nucleotides) in a controlled, safe, and efficient manner.

This work aligns with the current directions of non-viral gene therapy development, aiming to overcome the limitations of traditional viral vectors, such as the risk of genomic insertion, immunogenicity, and challenges in large-scale production. Within this context, the study contributes to the scientific and experimental foundation of PU-based systems in gene therapy, adopting an interdisciplinary approach that integrates chemical synthesis, physicochemical characterization, biological evaluation, and computational modeling.

The general aim of the thesis is complemented by a series of specific scientific objectives, structured along conceptual, experimental, and applicative directions, ensuring the overall coherence and validity of the research.

Specific Objectives of the Research

1. Development and optimization of the synthesis process for PU used as a non-viral vector, by:
 - selecting and employing biocompatible and non-carcinogenic raw materials;
 - eliminating aromatic isocyanates with potential toxicity;
 - studying the influence of temperature and reaction conditions on the formation of urethane bonds;
 - obtaining microstructures with controlled size and enhanced stability.
2. Comprehensive physicochemical characterization of the synthesized vectors, including:
 - determination of solubility, conductivity, and physicochemical stability;
 - analysis of morphological properties;
 - evaluation of the encapsulation efficiency of model molecules;
 - determination of release kinetics profiles in simulated biological media.
3. Investigation of the degradation and diffusion behavior of PU vectors under simulated biological conditions, through:
 - analysis of degradation rate as a function of environmental parameters (pH,

temperature, enzymatic activity);

- determination of release rate constants and modeling of transport processes;
 - establishing the relationship between the structural properties of PU and the diffusion dynamics of genetic material.
4. Evaluation of biological compatibility and cellular interactions, by:
 - testing cell viability on adult human dermal fibroblast (HDFa) cell lines;
 - observing adsorption, internalization, and release processes at the cell membrane level;
 - interpreting experimental data using established mathematical models (Langmuir, Higuchi).
 5. Theoretical modeling and numerical simulation of the gene delivery process, with the aim to:
 - develop a mathematical model based on first-order kinetic equations and diffusion laws;
 - implement numerical simulation algorithms using Python 3.9;
 - generate graphical representations and predictive analyses of vector behavior according to physicochemical parameters.
 6. Analysis of the structural adaptability potential of PU vectors for targeted delivery, through:
 - identifying chemical parameters that can be modified to direct vectors toward specific cell types or tissues;
 - assessing the feasibility of integrating molecular recognition agents (peptides, specific ligands);
 - defining perspectives for application in personalized therapies.
 7. Establishment of a scientific foundation for future clinical applications, by:
 - evaluating the reproducibility of experimental results;
 - analyzing the scalability of the synthesis process;
 - proposing optimization strategies for preclinical studies of PU-based vectors.

By achieving these objectives, the thesis aims to make a significant contribution to the development of nanotechnology applied to gene therapy, validating PU as a multifunctional polymeric material that can combine efficient gene transfer with biological safety requirements. The experimental study establishes a solid predictive framework for understanding the release and diffusion processes of genetic material from PU vectors, offering a concrete foundation for their future applicability in personalized medicine.

RESULTS

The study focused on the development and characterization of PU microstructures designed for the delivery of nucleic acids, with particular emphasis on 2'-deoxycytidylic acid (DCSS). The research was structured into three primary experimental stages:

- (1) evaluation of the influence of synthesis temperature on PU properties;
- (2) enhancement of solubility and performance through chemical modification; and
- (3) mathematical modeling and computational simulation of degradation, release, and cellular internalization processes.

INFLUENCE OF SYNTHESIS TEMPERATURE ON PU-DCSS VECTORS

Following synthesis at 25°C, 40°C, and 55°C, stable white suspensions were obtained, showing no color variation or macroscopic changes over a 30-day observation period. UV–Vis spectrophotometric analysis revealed only minor variations in maximum absorbance (<4.5%), confirming the physicochemical stability of the samples. The conductivity of aqueous solutions remained constant, indicating the absence of premature ionic degradation.

pH measurements indicated a slightly acidic tendency (pH 6.8–7.1), which is favorable for biological compatibility. Solubility tests demonstrated superior dissolution in water for samples synthesized at moderate temperatures (40°C), attributed to a more homogeneous polymer network structure.

Dynamic light scattering (DLS) analysis indicated particle sizes ranging from 120 to 800 nm, with a tendency toward aggregation at higher temperatures. The zeta potential decreased from –24.3 mV (PU_T1, 25°C) to –10.6 mV (PU_T3, 55°C), suggesting reduced colloidal stability and an increased propensity for agglomeration at elevated synthesis temperatures.

The encapsulation efficiency of DCSS was directly influenced by the synthesis temperature, with values of 62.4% at 25°C, 58.3% at 40°C, and 56.1% at 55°C. The release capacity of the active compound after five days progressively decreased from 63.2% (PU_T1) to 55.0% (PU_T3), confirming that higher temperatures reduce matrix uniformity and porosity.

Franz diffusion cell assays showed better permeability for PU_T1 (44.7%) compared with PU_T3 (34.5%), while cell viability tests on HDFa fibroblasts demonstrated 96.4% viability for PU_T1, 90.1% for PU_T2, and 84.7% for PU_T3. Therefore, the formulation synthesized at 25°C was considered optimal, as it provided a balanced combination of stability, encapsulation efficiency, and biological compatibility.

FORMULATION OPTIMIZATION: INFLUENCE OF THE AUXILIARY AGENT GDA

In the second stage, two new formulations were developed: PU2_1 (without glutaraldehyde, GDA) and PU2_2 (with 3.7 mL of GDA). The addition of GDA resulted in a denser and more uniform polymer network, improving the wettability and dispersibility of the system in aqueous media.

The encapsulation efficiency was high for both formulations: 64.5% for PU2_1 and 67.8% for PU2_2, indicating that the incorporation of GDA did not compromise the loading capacity.

The release profile, monitored over 60 hours in simulated body fluid (SBF), exhibited a gradual and controlled kinetic behavior. PU2_1 released 47% of DCSS at 24 hours and 58% at 48 hours, while PU2_2 released 51% at 24 hours and 61% at 48 hours. The obtained curves (Figure 6) followed a Higuchi-type release model, with no evidence of burst release, indicating uniform diffusion of the nucleotide. The presence of GDA led to a slightly accelerated release, likely due to increased matrix permeability.

Transmembrane permeability tests in the Franz diffusion system showed that PU2_2 exhibited a 15–18% higher diffusion rate than PU2_1, confirming the role of the auxiliary agent in enhancing the mobility of encapsulated molecules.

Scanning electron microscopy (SEM) confirmed a spherical morphology with smooth and homogeneous surfaces (~200 nm) for PU2_2, in contrast to the irregular aggregates observed in PU2_1.

Cell viability assays demonstrated 94.8% viability for PU2_1 and 92.1% for PU2_2 after 24 hours, confirming the high biocompatibility of both systems. In skin irritation tests, reactions were minimal and remained well below the dermal toxicity threshold.

MATHEMATICAL MODELING AND COMPUTATIONAL SIMULATION

DEGRADATION KINETICS OF PU

Modeling of degradation in a biological environment was performed according to first-order kinetics:

$$\frac{dM}{dt} = -k_{rel}M$$

Where:

- $M(t)$ is the mass of DNA/RNA material remaining in the PU matrix at time t ;
- k_{rel} is the release constant specific to the physiological environment.

The simulation revealed a predictable decrease in polymer mass over time, consistent with slow, controlled degradation (Figure 1). This behavior confirms the biodegradable nature of PU and its suitable stability for the sustained delivery of genetic material.

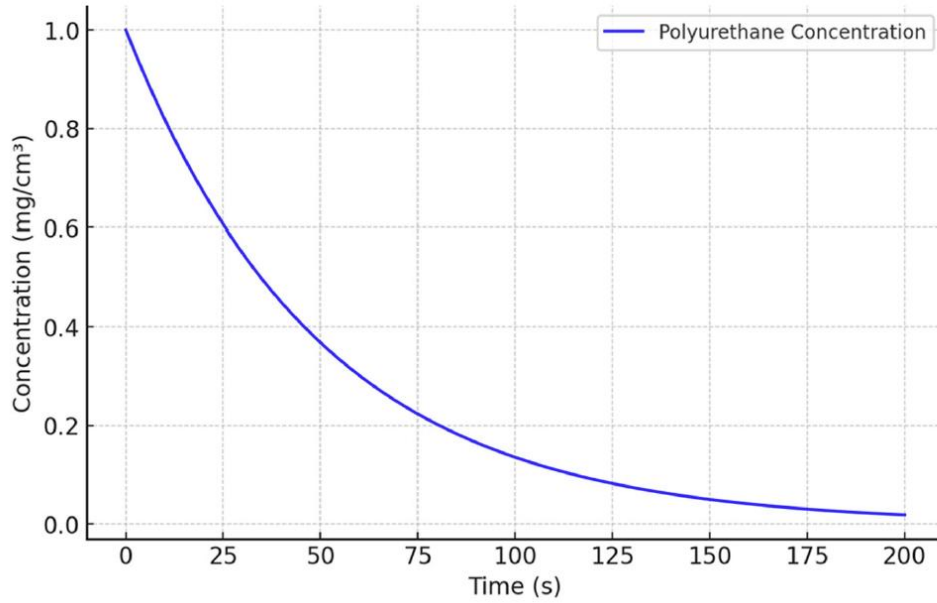


Figure 1. Degradation of PU in the biological environment

HIGUCHI MODEL FOR DNA/RNA RELEASE

The following relationship describes the diffusion-controlled release:

$$M_t = M_0 \left(1 - \sqrt{\frac{Dt}{L^2}} \right)$$

Where:

- M_t is the mass released at time t ;
- M_0 is the initial mass (1 mg/mL) of the encapsulated DNA/RNA;
- D is the diffusion coefficient, estimated between 10^{-12} and 10^{-10} m²/s;
- L is the diffusion length, set at 100 nm.

The simulations showed an exponential decrease in the mass of encapsulated DNA/RNA, reflecting a gradual release without burst effects (Figure 2). These results confirm that PU effectively modulates diffusion kinetics, acting as a controlled-release delivery system.

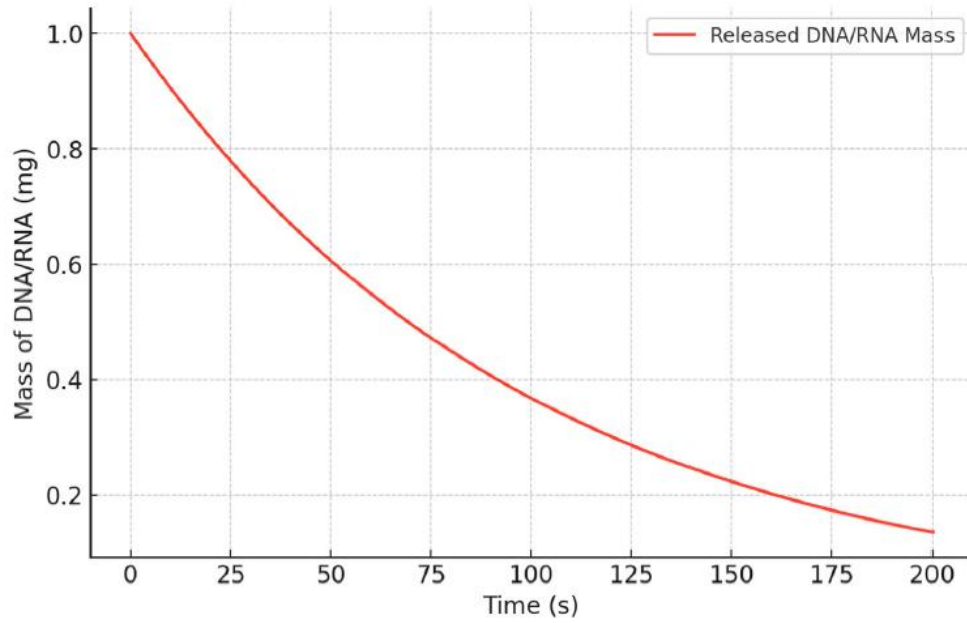


Figure 2. Degradation of DNA/RNA from the PU matrix

PU–CELL MEMBRANE INTERACTION

The adsorption of PU nanoparticles onto cell membranes was described using the Langmuir model:

$$\theta = \frac{KC}{1 + KC}$$

Where:

- θ represents the fraction of the cell membrane surface covered by PU nanoparticles;
- K is the adsorption constant, dependent on the affinity between nanoparticles and the membrane;
- C is the concentration of nanoparticles in the extracellular medium.

The simulation indicated a rapid increase in membrane coverage, followed by a plateau typical of saturation. The internalization of the vectors was subsequently described by a differential equation dependent on the endocytosis rate (k_{uptake}) and degradation rate (k_{degr}). The results showed progressive cellular uptake, followed by an equilibrium between internalization and degradation.

These simulations suggest that PU acts not merely as a passive vector but as an active selective delivery platform, capable of optimizing the balance between cellular uptake and intracellular stability.

CORRELATION BETWEEN EXPERIMENTAL AND THEORETICAL RESULTS

The correlation of empirical data with computational simulations confirmed a strong agreement between the Higuchi model and the experimental release profiles. The predictable degradation and Langmuir-type adsorption behavior support the applicability of PU as an intelligent vector for controlled gene delivery.

- Overall, the results demonstrate that:
- Synthesis temperature directly influences the size, charge, and efficiency of the vectors;
- GDA addition improves wettability and release behavior;
- PU exhibits controlled biodegradability and excellent biological compatibility;

Thus, this study confirms the potential of PU-based vectors in personalized gene therapy, offering a safe, scalable, and predictable non-viral alternative for the delivery of therapeutic DNA and RNA.

ORIGINAL CONTRIBUTIONS AND ELEMENTS OF NOVELTY

This thesis makes an authentic contribution to the development of non-viral vectors for gene therapy by introducing an integrated model of synthesis, characterization, and computational simulation of PU microstructures designed for nucleic acid delivery. Its originality lies in the multidisciplinary approach—combining chemical, biological, and numerical perspectives—which enables vector optimization before extensive experimental validation.

A distinctive feature of this work is the optimization of PU synthesis using non-carcinogenic precursors and controlled reaction temperatures, resulting in the formation of stable and biocompatible structures. The introduction of an auxiliary crosslinking agent (GDA) into the polymeric network represents a methodological innovation, resulting in improved porosity, homogeneity, and diffusion capacity of PU vectors, without compromising the molecular integrity of the genetic material.

The selection of 2'-deoxycytidylic acid as a model molecule represents a novel conceptual contribution, providing a reproducible reference system for evaluating the performance of gene delivery. In addition, the research introduced an original mathematical model, implemented in Python, capable of simultaneously describing polymer degradation, controlled release, and cell membrane interaction by adapting the Higuchi and Langmuir equations to the specific characteristics of PU vectors.

From a biological perspective, the thesis demonstrates, for the first time, the high viability of fibroblasts and the lack of irritant potential of these microstructures, confirming their suitability for safe biomedical applications. The correlation of physicochemical parameters (size, charge, diffusion rate) with the biological response constitutes a methodological contribution, directly explaining the relationship between PU structure and therapeutic performance.

By integrating experimental data with numerical predictions, this work proposes a predictive design model for gene delivery vectors, offering a transferable tool applicable to other polymeric systems. Therefore, the original contributions of this thesis focus on the development of an intelligent, safe, and adaptable PU-based system, with direct relevance for future applications in personalized gene therapy.

LIMITATIONS OF THE RESEARCH

Although this study provides a solid foundation regarding the potential of PU microstructures as non-viral vectors for gene delivery, it is characterized by several limitations that simultaneously outline the future directions of research. At the current stage, the results confirm the physicochemical performance and theoretical predictability of the vectors; however, the absence of extensive biological validation limits their immediate clinical applicability.

At the synthetic level, the investigation focused solely on the influence of temperature, without exploring other critical variables such as pH, solvent type, catalysts, or stoichiometric ratios. Future optimization of these parameters, combined with the use of natural precursors and green synthesis methods (such as microwave-assisted, ultrasonic, or sol-gel techniques), could enhance the uniformity, stability, and biocompatibility of PU. Moreover, adjusting the size and porosity of the structures may enable more precise and controlled release of genetic material.

In terms of characterization, the analysis relied primarily on basic spectrophotometric methods. Future studies should integrate advanced analytical techniques (FTIR, NMR, XPS, TEM/SEM microscopy) and employ simulated biological media to assess degradation and release kinetics under physiologically relevant conditions. The development of experimental platforms for real-time monitoring of the release process would also represent a significant advancement.

Although the theoretical modeling proposed in this study is innovative, it remains an idealized approximation of biological processes. Incorporating dynamic biological parameters and utilizing artificial intelligence algorithms in future simulations could significantly improve predictive accuracy and accelerate the design of optimized vectors.

From a biological perspective, the main limitation lies in the absence of *in vitro* and *in vivo* assays to confirm the system's compatibility and efficiency. Future research should therefore include toxicity, biodistribution, and cellular internalization studies, as well as the evaluation of hybrid PU vectors combined with other biocompatible materials.

Overall, these limitations do not diminish the value of the present work; instead, they define a progressive framework for future development. The proposed directions—synthesis optimization, refinement of theoretical models, expansion of biological validation, and process standardization—may ultimately transform PU-based vectors into a safe, scalable, and customizable platform for future gene therapy applications.

CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

This study demonstrated the potential of PU microstructures as efficient non-viral vectors for delivering nucleic acids, highlighting the direct relationship between synthesis parameters and the physicochemical and biological performance of the system. Moderate synthesis temperatures (25 °C) produced more stable structures with superior encapsulation and release efficiency, whereas higher temperatures led to aggregation, decreased zeta potential, and reduced cellular compatibility.

The addition of GDA significantly improved solubility and diffusion without compromising stability or biological safety. The release profiles followed predictable kinetics, demonstrating controlled and sustained release of the DCSS compound. Biological assays confirmed high biocompatibility, absence of cytotoxicity, and good skin tolerance.

The mathematical models developed in this work, based on first-order kinetics and the Higuchi model, revealed a strong correlation between polymer degradation, controlled release, and cellular uptake, reinforcing the concept of PU as an intelligent delivery vector with potential applicability in gene therapy.

The personal contribution of this research consisted of designing and optimizing synthesis protocols, developing theoretical models, and validating them through computational simulations, thereby providing a robust predictive basis for the clinical translation of these vectors.

Looking forward, research should be expanded toward in vitro and in vivo validation, toxicological evaluation, and testing on animal models, alongside the development of stimuli-responsive formulations and sustainable synthesis methods. The integration of artificial intelligence and advanced modeling approaches will further enable the optimization of PU vectors and their translation into safe, efficient, and personalized gene therapy applications.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINA
DEPARTAMENTUL II: MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ**

ROXANA MARIA JELERIU



TEZĂ DE DOCTORAT

**MICROSTRUCTURI TRANSPORTOARE PENTRU MOLECULE
UTILE ÎN TERAPIILE GENICE**

- REZUMAT -

Coordonator stiintific
PROF. UNIV. DR. MARIA PUIU

**T I M I Ș O A R A
2 0 2 5**

CUPRINS

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCERE..... | 3 |
| SCOP ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII..... | 5 |
| REZULTATE | 8 |
| Influența temperaturii de sinteză asupra vectorilor PU–DCSS | 8 |
| Optimizarea formulării: influența agentului auxiliar GDA | 9 |
| Modelarea matematică și simularea computațională..... | 9 |
| Cinetica degradării PU..... | 9 |
| Modelul Higuchi pentru eliberarea ADN/ARN | 10 |
| Interacțiunea PU–membrană celulară..... | 11 |
| Corelarea rezultatelor experimentale și teoretice | 11 |
| ELEMENTE DE ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII | 13 |
| LIMITELE CERCETĂRII | 14 |
| CONCLUZII ȘI DIRECȚII VIITOARE..... | 15 |

ABSTRACT

INTRODUCERE

Terapia genică este una dintre cele mai avansate direcții ale medicinei moderne, având ca obiectiv tratarea bolilor genetice prin introducerea unor secvențe sănătoase de material genetic în celulele pacientului. Eficiența acestor tratamente depinde de existența unor sisteme de livrare performante, capabile să transporte acizii nucleici către țesuturile-țintă, protejându-i totodată de degradare și asigurând eliberarea controlată. În acest context, vectorii virali, testați inițial, deși eficienți în transferul genic, prezintă riscuri imunologice și genetice importante, ceea ce a determinat orientarea cercetării spre dezvoltarea unor vectori non-virali, mai siguri și mai flexibili.

Sistemele non-virale, bazate pe nanoparticule lipidice, polimerice sau hibride, au devenit o soluție alternativă de interes. Printre acestea, polimerii cationici precum polietilenimina și derivații săi s-au remarcat prin capacitatea de a forma complexe stabile cu ADN și ARN. Totuși, cercetările recente au demonstrat că poliuretanul (PU), un polimer elastic, biocompatibil și biodegradabil, oferă avantaje superioare în livrarea genică datorită proprietăților fizico-chimice ajustabile, stabilității și sensibilității la factori biologici precum pH-ul sau enzimele tisulare.

Primele sinteze de PU pentru aplicații medicale datează din ultimele decenii ale secolului XX, însă utilizarea lor ca vectori pentru material genetic a luat amploare abia în secolul XXI, odată cu introducerea metodelor inovatoare de emulsificare și poliadiție interfacială. Aceste tehnici au permis obținerea unor micro- și nanostructuri cu dimensiuni reduse, eficiente în încapsularea și eliberarea treptată a moleculelor terapeutice. Studii ulterioare au confirmat faptul că variațiile de temperatură în procesul de sinteză influențează energia de activare și structura finală a polimerului, impactând performanța vectorului.

Cercetarea de față se înscrie în această linie de dezvoltare, având ca scop principal explorarea potențialului PU ca microstructuri transportoare pentru acizi nucleici. Teza propune o abordare interdisciplinară, care combină chimia materialelor, biofarmacia și biologia celulară, pentru a evalua proprietățile fizico-chimice, biologice și funcționale ale vectorilor PU. În faza experimentală, au fost sintetizate două tipuri de transportori PU, în prezența și absența unui agent auxiliar, urmărindu-se modul în care aceste diferențe influențează capacitatea de încapsulare, stabilitatea și profilul de eliberare. Caracterizarea s-a realizat prin determinarea solubilității, conductivității, stabilității fizico-chimice și cineticii de eliberare în medii simulate biologic.

Compatibilitatea biologică a fost evaluată pe linii de fibroblaste dermice umane (HDFa), demonstrând o viabilitate celulară ridicată și o interacțiune controlată cu membranele celulare. Analiza comportamentului de adsorbție și internalizare a vectorilor a fost realizată utilizând modele matematice consacrate (Langmuir, Higuchi), completate de simulări computaționale ale proceselor de difuzie și degradare. Modelarea numerică, efectuată în Python 3.9, a permis predicția comportamentului vectorilor în funcție de parametri fizico-chimici, reducând necesitatea experimentelor extensive în fazele preliminare.

Pe lângă aportul științific fundamental, lucrarea reflectă și o motivație personală și profesională, aceea de a aduce știința materialelor și nanotehnologia mai aproape de practica medicală. În contextul medicinei personalizate, unde tratamentele sunt adaptate profilului genetic al fiecărui pacient, dezvoltarea unor vectori siguri, scalabili și eficienți devine o prioritate strategică. PU, prin proprietățile sale versatile, se conturează ca un candidat promițător pentru vectorii genici de nouă generație, cu aplicabilitate în terapiile oncologice, cardiovasculare și genetice.

Rezultatele obținute confirmă faptul că microstructurile din PU pot acționa nu doar ca suporturi pasive, ci și ca entități active, capabile să influențeze favorabil profilul farmacocinetic al materialului genetic. Studiul demonstrează stabilitatea, controlul eliberării și compatibilitatea biologică a acestor vectori, oferind o bază solidă pentru extinderea cercetărilor către validări in vitro și in vivo.

Teza de doctorat cuprinde trei studii experimentale realizate în conformitate cu Principiile Declarației de la Helsinki (1975, revizuită în 2013), și cu aprobarea comitetului de etică. Cercetarea doctorală include următoarele studii: *Microstructuri din poliuretan pentru livrarea acidului 2'-deoxicitidinic: preparare și caracterizare preliminară* (Medicina (Editura MDPI, Elveția)), *Influența temperaturii de sinteză asupra unui vector din poliuretan utilizat pentru transferul acidului 2'-deoxicitidilic* (Revista Medicală și Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași) și *Modele teoretice și simulări ale livrării genice cu poliuretan: importanța poliuretanului ca vector în terapia personalizată* (Biomedicines (Editura MDPI, Elveția))

Lucrarile au fost publicate în 2024 și 2025 în reviste ISI (Medicina și Biomedicine (MDPI) și), iar cercetarea prezintă o contribuție originală la domeniul terapiilor genice prin propunerea și validarea unui model integrat, experimental și computațional, pentru evaluarea vectorilor de tip PU.

SCOP ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul principal al prezentei teze de doctorat este dezvoltarea, caracterizarea și validarea microstructurilor pe bază de PU ca sisteme transportoare pentru moleculele utile în terapiile genice, cu accent pe livrarea controlată, stabilitatea fizico-chimică și compatibilitatea biologică a acestor vectori non-virali. Cercetarea își propune să demonstreze potențialul PU ca material inovator, biocompatibil și versatil, capabil să încorporeze, protejeze și elibereze acizi nucleici (ADN, ARN sau nucleotide-model) într-o manieră controlată, sigură și eficientă.

Lucrarea se aliniază direcțiile de dezvoltare ale terapiilor genice non-virale, care urmăresc să depășească limitările vectorilor virali tradiționali, precum riscul de inserție genomică, imunogenicitatea și dificultățile de producție la scară industrială. În acest context, studiul își propune să contribuie la fundamentarea științifică și experimentală a utilizării PU în terapia genică, printr-o abordare interdisciplinară ce îmbină sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică, analiza biologică și modelarea computațională.

Scopul general al lucrării este completat de o serie de obiective științifice specifice, structurate pe direcții conceptuale, experimentale și aplicative, care asigură coerența și validitatea întregului demers.

Obiectivele specifice ale cercetării:

1. Dezvoltarea și optimizarea procesului de sinteză a PU utilizat ca vector non-viral, prin:
 - selecția și utilizarea unor materii prime biocompatibile și necarcinogene,
 - eliminarea izocianaților aromatici cu potențial toxic,
 - studierea influenței temperaturii și a condițiilor de reacție asupra formării legăturilor uretanice,
 - obținerea unor microstructuri cu dimensiuni controlate și stabilitate crescută.
2. Realizarea caracterizării fizico-chimice complete a vectorilor sintetizați, incluzând:
 - determinarea solubilității, conductivității și stabilității fizico-chimice,
 - analiza proprietăților morfologice,
 - evaluarea gradului de încapsulare a moleculelor model,
 - determinarea profilului cinetic de eliberare în medii simulate biologic.
3. Investigarea comportamentului de degradare și difuzie al vectorilor PU în condiții biologice simulate, prin:
 - analiza vitezei de degradare în funcție de parametrii mediului (pH, temperatură, prezența enzimelor),

- determinarea constantelor de viteză de eliberare și modelarea proceselor de transport,
 - stabilirea relației dintre proprietățile structurale ale PU și dinamica difuziei materialului genetic.
4. Evaluarea compatibilității biologice și a interacțiunii cu celulele țintă, prin:
- testarea viabilității celulare pe linii de fibroblaste dermice umane adulte (HDFa),
 - observarea proceselor de adsorbție, internalizare și eliberare la nivelul membranei celulare,
 - interpretarea datelor experimentale folosind modele matematice consacrate (Langmuir, Higuchi).
5. Modelarea teoretică și simularea numerică a procesului de livrare genică, cu scopul de a:
- elabora un model matematic bazat pe ecuații cinetice de ordinul întâi și legi ale difuziei,
 - implementa algoritmi de simulare numerică utilizând limbajul Python 3.9,
 - genera reprezentări grafice și previziuni asupra comportamentului vectorilor în funcție de parametri fizico-chimici.
6. Analiza potențialului de adaptare structurală a vectorilor PU pentru livrarea țintită, prin:
- identificarea parametrilor chimici care pot fi modificați pentru a direcționa vectorii către anumite tipuri celulare sau țesuturi,
 - evaluarea posibilității de integrare a unor agenți de recunoaștere moleculară (peptide, liganzi specifici),
 - stabilirea perspectivelor de aplicare în terapiile personalizate.
7. Elaborarea unei baze științifice pentru viitoare aplicații clinice, prin:
- evaluarea reproductibilității rezultatelor experimentale,
 - analizarea posibilităților de scalare a procesului de sinteză,
 - propunerea unor direcții de optimizare a vectorilor pentru studii preclinice.

Prin atingerea acestor obiective, lucrarea își propune să ofere o contribuție semnificativă la dezvoltarea domeniului nanotehnologiei aplicate în terapia genică, validând PU ca un material polimeric multifuncțional, capabil să îmbine eficiența transferului genic cu cerințele de siguranță biologică. Studiul experimental, completat de modelarea numerică, construiește o

bază predictivă solidă pentru înțelegerea proceselor de eliberare și difuzie a materialului genetic din vectorii PU, oferind premise concrete pentru aplicabilitatea acestora în medicina personalizată.

REZULTATE

Studiul a urmărit dezvoltarea și caracterizarea microstructurilor PU destinate livrării acizilor nucleici, cu accent pe acidul 2'-dezoxicitidilic (DCSS). Cercetarea a fost structurată în trei etape experimentale majore: (1) influența temperaturii de sinteză asupra proprietăților PU, (2) îmbunătățirea solubilității și performanței prin modificare chimică și (3) modelarea matematică și simularea computațională a proceselor de degradare, eliberare și internalizare celulară.

INFLUENȚA TEMPERATURII DE SINTEZĂ ASUPRA VECTORILOR PU–DCSS

În urma sintezei efectuate la 25°C, 40°C și 55°C, au fost obținute suspensii albe stabile, fără variații de culoare sau modificări macroscopice pe parcursul a 30 de zile. Analiza spectrofotometrică UV-Vis a evidențiat modificări minore ale absorbției maxime (<4,5%), confirmând stabilitatea fizico-chimică a probelor. Conductivitatea soluțiilor apoase a rămas constantă, indicând absența degradării ionice premature.

Măsurătorile de pH au arătat o tendință ușor acidă (6,8–7,1), favorabilă compatibilității biologice. Determinările de solubilitate au demonstrat o dizolvare superioară în apă pentru probele sintetizate la temperaturi moderate (40°C), atribuibilă unei structuri mai omogene a rețelei polimerice.

Analiza dimensională (DLS) a indicat variații între 120–800 nm, cu tendință de agregare la temperaturi înalte. Potențialul zeta a scăzut de la –24,3 mV (PU_T1, 25°C) la –10,6 mV (PU_T3, 55°C), sugerând o stabilitate coloidală mai scăzută și predispoziție la aglomerare la temperaturi ridicate.

Eficiența de încapsulare a DCSS a fost direct influențată de temperatura de sinteză: 62,4% la 25°C, 58,3% la 40°C și 56,1% la 55°C. Capacitatea de eliberare a substanței active după 5 zile a scăzut progresiv de la 63,2% (PU_T1) la 55,0% (PU_T3), confirmând că temperaturile mari reduc uniformitatea și porozitatea matricii PU.

Testele de difuzie în sistem Franz au arătat o permeabilitate mai bună pentru PU_T1 (44,7%) comparativ cu PU_T3 (34,5%), iar testele biologice de viabilitate pe fibroblaste HDFa au evidențiat o viabilitate de 96,4% pentru PU_T1, 90,1% pentru PU_T2 și 84,7% pentru PU_T3. Astfel, formula sintetizată la 25°C a fost considerată optimă, oferind echilibru între stabilitate, eficiență de încapsulare și compatibilitate biologică.

OPTIMIZAREA FORMULĂRII: INFLUENȚA AGENTULUI AUXILIAR GDA

În a doua etapă, au fost dezvoltate două noi formulări – PU2_1 (fără glutaraldehidă, GDA) și PU2_2 (cu 3,7 mL GDA). Adăugarea GDA a conferit o rețea polimerică mai densă și mai uniformă, îmbunătățind umectabilitatea și dispersibilitatea sistemului în mediu apos.

Eficiența de încapsulare a fost ridicată pentru ambele formulări: 64,5% (PU2_1) și 67,8% (PU2_2), ceea ce indică faptul că adăugarea GDA nu a compromis capacitatea de încărcare.

Profilul de eliberare, monitorizat timp de 60 ore în mediu SBF (simulated body fluid), a prezentat o cinetică graduală și controlată: PU2_1 a eliberat 47% din DCSS la 24 ore și 58% la 48 ore, iar PU2_2 – 51% la 24 ore și 61% la 48 ore. Curbele obținute (Figura 6) au urmat un model de eliberare Higuchi, fără fenomen de „burst release”, ceea ce demonstrează o difuzie uniformă a nucleotidei. Prezența GDA a determinat o ușoară accelerare a eliberării, atribuibilă unei permeabilități mai mari.

Testele de permeabilitate transmembranară în sistem Franz au arătat că PU2_2 prezintă o rată de difuzie cu 15–18% mai mare decât PU2_1, susținând rolul agentului auxiliar în îmbunătățirea mobilității moleculelor încapsulate.

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a confirmat o morfologie sferică, cu suprafețe netede și dimensiuni uniforme (~200 nm) pentru PU2_2, comparativ cu agregatele neregulate observate la PU2_1.

Testele de viabilitate celulară au arătat valori de 94,8% pentru PU2_1 și 92,1% pentru PU2_2 la 24 ore, confirmând biocompatibilitatea ridicată a ambelor sisteme. În testul de iritație cutanată, reacțiile au fost minime, toate sub pragul de toxicitate dermică.

MODELAREA MATEMATICĂ ȘI SIMULAREA COMPUTAȚIONALĂ

CINETICA DEGRADĂRII PU

Modelarea degradării în mediu biologic s-a realizat conform unei cinetici de ordinul I:

$$\frac{dM}{dt} = -k_{rel}M$$

Unde:

- $M(t)$ este masa de material ADN/ARN rămasă în matricea PU la momentul t
- k_{rel} este constanta de eliberare specifică mediului fiziologic.

Simularea a evidențiat o scădere predictibilă a masei polimerului în timp, corespunzătoare degradării lente controlate (Figura 1). Acest comportament confirmă caracterul biodegradabil al PU și stabilitatea adecvată pentru livrarea susținută a materialului genetic.

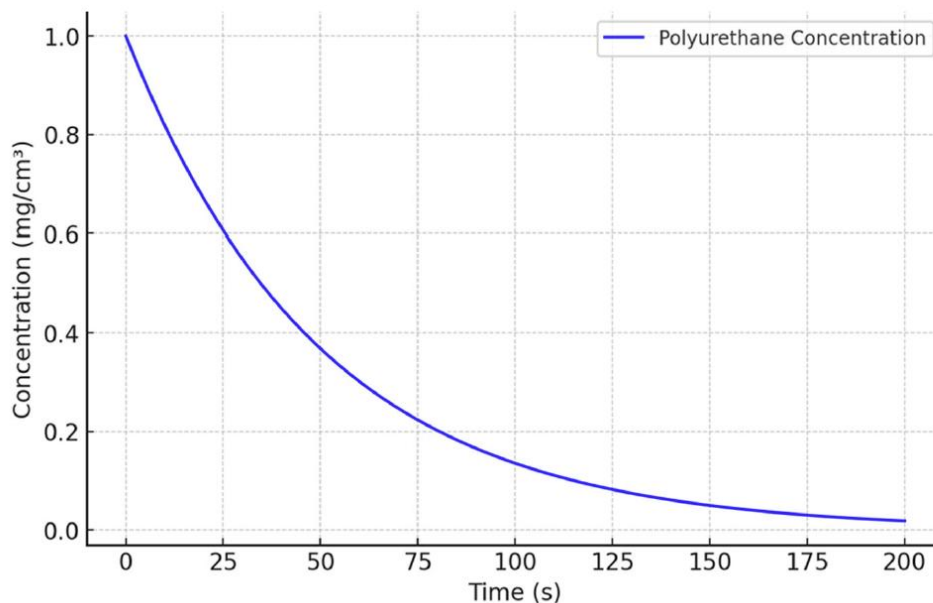


Figura 1. Degradarea PU în mediul biologic

MODELUL HIGUCHI PENTRU ELIBERAREA ADN/ARN

Eliberarea prin difuzie a fost descrisă de relația:

$$M_t = M_0 \left(1 - \sqrt{\frac{Dt}{L^2}} \right)$$

Unde:

- M_t este masa eliberată la momentul t
- M_0 masa inițială (1 mg/ml) a ADN/ARN-ului încapsulat
- D coeficientul de difuzie estimat între 10^{-12} și 10^{-10} m²/s
- L lungimea de difuzie stabilită la 100 nm.

Simulările au arătat o scădere exponențială a masei de ADN/ARN încapsulate, reflectând o eliberare treptată fără vârfuri bruște (Figura 2). Acest rezultat confirmă că PU modulează eficient cinetica de difuzie, comportându-se ca un sistem de eliberare controlată.

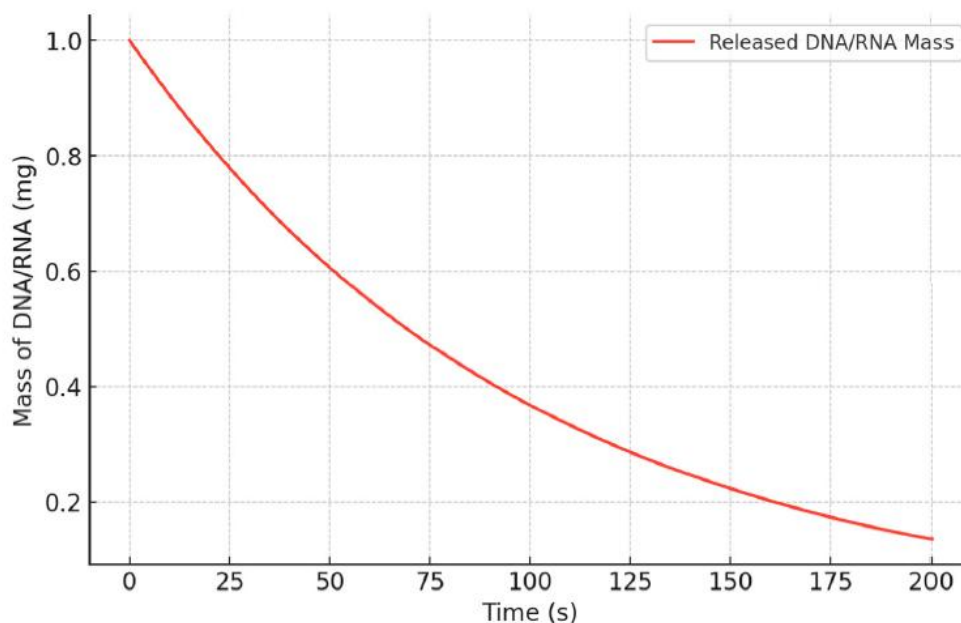


Figura 2. Degradarea AND/ARN-ului din matricea PU

INTERACȚIUNEA PU–MEMBRANĂ CELULARĂ

Absorbția nanoparticulelor PU pe membranele celulare a fost descrisă prin modelul Langmuir:

$$\theta = \frac{KC}{1 + KC}$$

Unde:

- θ reprezintă fracția din suprafața membranei acoperită de nanoparticulele PU.
- K este constanta de adsorbție, care depinde de afinitatea dintre nanoparticule și membrană.
- C este concentrația nanoparticulelor în mediul extracelular.

Simularea a indicat o creștere rapidă a acoperirii membranei, urmată de atingerea unui platou, caracteristic saturației. Internalizarea vectorilor a fost ulterior descrisă printr-o ecuație diferențială dependentă de rata de endocitoză (k_{uptake}) și degradare (k_{degr}). Rezultatele au arătat o absorbție celulară progresivă, urmată de un echilibru între internalizare și degradare.

Aceste simulări sugerează că PU acționează nu doar ca vector pasiv, ci ca platformă activă de livrare selectivă, capabilă să optimizeze raportul dintre absorbție și stabilitate intracelulară.

CORELAREA REZULTATELOR EXPERIMENTALE ȘI TEORETICE

Corelarea datelor empirice cu simulările computaționale a confirmat o bună concordanță între modelul Higuchi și profilurile experimentale de eliberare. Degradarea

predictibilă și absorbția de tip Langmuir susțin utilizarea PU ca vector inteligent pentru livrarea controlată a genelor.

În ansamblu, rezultatele demonstrează că: temperatura de sinteză influențează direct dimensiunea, sarcina și eficiența vectorilor, adăugarea GDA îmbunătățește umectabilitatea și eliberarea, PU prezintă o biodegradabilitate controlată și compatibilitate biologică excelentă, modelele matematice pot prezice cu acuratețe comportamentul vectorilor, constituind o bază pentru optimizarea ulterioară.

Astfel, lucrarea confirmă potențialul vectorilor PU în terapia genică personalizată, oferind o alternativă non-virală sigură, scalabilă și predictibilă pentru transportul ADN/ARN terapeutic.

ELEMENTE DE ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

Lucrarea aduce o contribuție autentică la dezvoltarea vectorilor non-virali pentru terapiile genice, prin introducerea unui model integrat de sinteză, caracterizare și simulare computațională a microstructurilor PU pentru transportului de acizi nucleici. Originalitatea constă în abordarea multidisciplinară (chimică, biologică și numerică) care permite optimizarea vectorilor înainte de validarea experimentală extinsă.

Un element distinctiv îl constituie optimizarea sintezei PU utilizând precursori necarcinogeni și temperaturi controlate, ceea ce a permis obținerea unor structuri stabile și biocompatibile. Introducerea unui agent auxiliar de tip GDA în rețea reprezintă o inovație metodologică proprie, care a condus la îmbunătățirea porozității, a uniformității și a capacității de difuzie a vectorilor PU, fără a compromite integritatea moleculară a materialului genetic.

Selecția acidului 2'-dezoxicitidilic ca moleculă-model a constituit o contribuție conceptuală nouă, oferind o bază reproductibilă pentru evaluarea performanței sistemelor de transport genic. Totodată, cercetarea a introdus un model matematic original, implementat în Python, capabil să descrie simultan degradarea polimerului, eliberarea controlată și interacțiunea cu membrana celulară, prin adaptarea ecuațiilor Higuchi și Langmuir la particularitățile vectorilor PU.

Din perspectivă biologică, teza demonstrează pentru prima dată viabilitatea fibroblastică ridicată și lipsa potențialului iritant al acestor microstructuri, confirmând posibilitatea utilizării lor în aplicații biomedicale sigure. Corelarea parametrilor fizico-chimici (dimensiune, sarcină, grad de difuzie) cu răspunsul biologic reprezintă o contribuție metodologică proprie, care explică direct relația dintre structura PU și performanța sa terapeutică.

Prin combinarea datelor experimentale cu predicțiile numerice, lucrarea propune un model predictiv de design al vectorilor genici, oferind un instrument aplicabil și altor materiale polimerice. Astfel, contribuțiile originale ale acestei teze se concentrează pe dezvoltarea unui sistem PU inteligent, sigur și adaptabil, cu relevanță directă pentru viitoarele aplicații ale terapii genice personalizate.

LIMITELE CERCETĂRII

Deși studiul oferă o bază solidă privind potențialul microstructurilor PU ca vectori non-virali pentru livrarea genică, acesta este marcat de câteva limitări care conturează totodată direcțiile viitoare de cercetare. În stadiul actual, rezultatele confirmă performanțele fizico-chimice și predictibilitatea teoretică a vectorilor, însă lipsa validărilor biologice extinse limitează aplicabilitatea clinică imediată.

La nivelul sintezei, cercetarea a vizat doar influența temperaturii, fără a explora alte variabile critice precum pH-ul, tipul de solvent, catalizatorii sau raporturile stoichiometrice. În viitor, optimizarea acestor factori, alături de utilizarea precursorilor naturali și a metodelor verzi de sinteză (microunde, ultrasunete, sol-gel), ar putea crește uniformitatea, stabilitatea și biocompatibilitatea PU. De asemenea, ajustarea dimensiunii și porozității structurilor ar permite o eliberare mai precisă și controlată a materialului genetic.

În ceea ce privește caracterizarea, analiza s-a bazat pe metode spectrofotometrice de bază. Viitoarele studii ar trebui să integreze tehnici avansate (FTIR, RMN, XPS, microscopie TEM/SEM) și să utilizeze medii biologice simulate, pentru a evalua degradarea și cinetica de eliberare în condiții fiziologice reale. Este necesară și dezvoltarea unor platforme experimentale care să permită monitorizarea în timp real a procesului de eliberare.

Modelarea teoretică, deși inovatoare, rămâne o aproximare idealizată a proceselor biologice. În viitor, integrarea parametrilor biologici dinamici și utilizarea algoritmilor de inteligență artificială pot crește precizia simulărilor și pot accelera proiectarea vectorilor optimi.

Pe plan biologic, cercetarea este limitată de absența testelor in vitro și in vivo, care să confirme compatibilitatea și eficiența sistemului. Viitoarele etape ar trebui să includă studii de toxicitate, biodistribuție și internalizare celulară, precum și testarea vectorilor hibridi PU combinați cu alte materiale biocompatibile.

În ansamblu, aceste limitări nu reduc valoarea lucrării, ci definesc un cadru evolutiv pentru cercetarea viitoare. Direcțiile propuse, optimizarea sintezei, rafinarea modelelor teoretice, extinderea validărilor biologice și standardizarea proceselor, pot transforma vectorii PU într-o platformă sigură, scalabilă și personalizabilă pentru aplicațiile viitoare ale terapiei genice.

CONCLUZII ȘI DIRECȚII VIITOARE

Lucrarea a demonstrat potențialul microstructurilor PU ca vectori non-virali eficienți pentru livrarea de acizi nucleici, evidențiind relația directă dintre parametri de sinteză și performanțele fizico-chimice și biologice ale sistemului. Temperaturile moderate (25 °C) au generat structuri mai stabile, cu eficiență superioară de încapsulare și eliberare, în timp ce valorile mai ridicate au condus la agregare, scăderea potențialului zeta și reducerea compatibilității celulare.

Adăugarea GDA a îmbunătățit semnificativ solubilitatea și difuzia, fără a afecta stabilitatea sau siguranța biologică. Profilurile de eliberare au urmat o cinetică predictibilă, demonstrând o eliberare controlată și constantă a compusului DCSS. Testele biologice au confirmat biocompatibilitatea ridicată, absența citotoxicității și toleranța cutanată bună.

Modelele matematice dezvoltate, bazate pe cinetica de ordinul întâi și pe modelul Higuchi, au confirmat o corelare strânsă între degradarea polimerului, eliberarea controlată și absorbția celulară, consolidând ideea că PU acționează ca un vector inteligent, cu potențial de aplicare în terapia genică.

Contribuția personală a constatat în proiectarea și optimizarea sintezei, dezvoltarea modelelor teoretice și validarea lor prin simulări computaționale, oferind o bază predictivă solidă pentru aplicarea clinică a acestor vectori.

Pentru viitor, cercetările trebuie extinse către validări in vitro și in vivo, evaluări toxicologice și testarea pe modele animale, alături de dezvoltarea unor formulări stimuli-sensibile și a unor metode sustenabile de sinteză. Integrarea inteligenței artificiale și a modelării avansate va facilita optimizarea vectorilor PU și translația lor către terapii genice sigure, eficiente și personalizate.