

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul VIII - Neuroștiințe**

RAMONA DANIELA PANĂ (PÂRVĂNESCU)



**OBSERVAȚII EXPERIMENTALE ASUPRA
MODIFICĂRILOR APĂRUTE ÎN EPIDERMOLIZA
BULOASĂ ȘI ALTE LEZIUNI CUTANATE**

REZUMAT

Conducător științific:

PROF. UNIV. DR. ALEXANDRA ENACHE

**Timișoara
2021**

CUPRINS

I. PARTEA GENERALĂ	1
1. PATOLOGIA CUTANATĂ ABORDATĂ EXPERIMENTAL	1
2. TERAPII INOVATIVE ÎN CAZUL LEZIUNILOR CUTANATE ȘI EPIDERMOLIZEI BULOASE.....	29
3. ASPECTE DE ETICĂ A CERCETĂRII PE MODELE EXPERIMENTALE.....	35
II. PARTEA SPECIALĂ.....	39
1. TERAPII UTILIZATE EXPERIMENTAL.....	41
2. MĂSURĂTORI COMUNE NON-INVAZIVE APLICATE PENTRU PATOLOGIA CUTANATĂ EXPERIMENTALĂ.....	51
2.3. Evaluarea biofizică și impactul catalizatorului asupra proprietăților purtătorilor de medicamente din poliuretan	62
3. ASPECTE LEGATE DE PRODUCEREA EXPERIMENTALĂ A EPIDERMOLIZEI BULOASE.....	72
3.1. Provocări și limitări în dezvoltarea unui model animal de epidermoliză buloasă folosind șoareci SJL	72
4. STUDII FIZICO-CHIMICE DE CEDARE A BETULINEI ȘI LUPEOLULUI DIN FORMULĂRI FARMACEUTICE PENTRU PATOLOGIA CUTANATĂ.....	80
4.1. Formulări de tip oleogel pentru eliberarea topică a betulinei și lupeolului în leziunile cutanate - prepararea, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea farmacotoxicologică	82
5. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE PRIVIND ORIGINALITATEA TEZEI DE DOCTORAT.....	105

Cuvinte cheie: epidermoliză buloasă, triterpene pentaciclice, transportori membranari, leziuni cutanate, radiații UV, parametri fiziologici ai pielii.

Observații experimentale asupra modificărilor apărute în epidermoliza buloasă și alte leziuni cutanate

Teza de doctorat se încadrează în tematica de cercetare referitoare atât la identificarea modificărilor apărute în tulburările genetice cu fragilitate cutanată care se caracterizează prin anomalii structurale ce pot include: peeling, vezicule, eroziuni, ulcerații, răni sau cicatrici – tulburare numită epidermoliză buloasă (EB); cât și la identificarea modificărilor apărute în alte leziuni cutanate, induse de radiațiile UV.

Teza de doctorat este structurată în două părți: partea generală și partea specială. Partea generală a tezei de doctorat, cuprinde trei capitole importante ce conțin ultimele informații științifice din literatura de specialitate cu privire la modificările apărute în epidermoliza buloasă, respectiv în alte leziuni cutanate. Partea specială este constituită din experimentele efectuate practic, în cadrul Centrului de Cercetări Farmaco-Toxicologice, Facultatea de Farmacie, UMFVBT, condus de Prof. Univ. Dr. Farm. Cristina Dehelean. Experimentele efectuate sunt împărțite în patru capitole, iar rezultatele obținute completează informațiile din literatura de specialitate și împreună, conduc la completarea tabloului clinic privind strategiile inovative de tratament pentru tratarea atât a epidermolizei buloase cât și a altor leziuni cutanate.

I. Partea Generală

I.1. Patologia cutanată abordată experimental

Acest capitol oferă o prezentare generală privind structura și funcțiile pielii, fiziopatologia de bază, respectiv câteva dintre considerațiile importante privind toxicitatea generată asupra pielii. Un obiectiv major pentru evaluarea toxicologică a unui medicament dermic este acela de a caracteriza pe deplin toxicitatea sistemică și toxicocinetică, acoperind astfel potențialul pentru cele mai nefavorabile situații. Studiile de toxicitate sistemică pot fi necesare în cazul în care expunerea sistemică scăzută sau minimă se realizează prin administrare dermică în studiile de toxicitate dermică.

Datorită faptului că produsele medicamentoase dermice sunt adesea utilizate pe pielea expusă la lumină (față, brațe), evaluarea potențialului fototoxic al produsului medicamentos în curs de dezvoltare poate fi de asemenea justificată. Tot în acest capitol am adus în prim plan și informații privind studiile de carcinogenitate dermică pentru produsele medicamentoase dermice destinate utilizării cronice și/sau recurente intermitente.

Pentru a ajunge la subiectul principal al tezei de doctorat, și anume: epidermoliza buloasă, am ales să descriu manifestările dermatologice apărute în bolile inflamatorii intestinale, clasificând leziunile mucocutanate, după care, m-am axat pe dezvoltarea informațiilor găsite în literatura de specialitate privind epidermoliza buloasă. Tot în acest capitol sunt prezentate și alte patologii care generează leziuni cutanate, de tipul: hiperplazie și hiperkeratoză, inflamația, iritarea și corозиunea pielii, hipersensibilitate, modificarea pigmentului pielii, încheind acest capitol cu cele mai noi informații generale privind cancerul cutanat.

I.2. Terapii inovative în cazul leziunilor cutanate și epidermolizei buloase

Capitolul 2 din partea teoretică descrie pe scurt terapiile abordate clinic, atât în cazul leziunilor cutanate cât și cele abordate în cazul epidermolizei buloase. Evoluțiile științifice rapide din ultimii ani fac să apară diverse strategii terapeutice promițătoare pentru tratamentul epidermolizei buloase. Diagnosticul și gestionarea diferitelor forme de epidermoliză buloasă sunt complexe și necesită o colaborare interdisciplinară. Formele severe de epidermoliză buloasă au cea mai mare nevoie de suport medical, iar majoritatea eforturilor de cercetare se concentrează pe dezvoltarea terapiilor pentru aceste forme. Se dezvoltă atât terapii curative, cât și terapii de ameliorare a simptomelor. O serie de terapii sunt în curs de dezvoltare preclinică, iar primele au ajuns deja în stadiul studiului clinic, fie în faza 1/2, fie în faza 3.

I.3. Aspecte de etică a cercetării pe modele experimentale

În acest capitol sunt descrise aspectele etice privind experimentele pe animale, adică regulile privind standardele de îngrijire a animalelor, ținând cont de principiul

celor „3R” ce trebuie luat în considerare, indiferent de domeniul în care se face cercetarea experimentală pe animale. Toate experimentele pe animale detaliate în teză au fost concepute și puse în aplicare după luarea în considerare a sănătății animalelor de laborator (șoareci), precum și după ce au fost evaluate influențele pe care experimentele le pot avea asupra bunăstării animalelor. În stabilirea standardelor de îngrijire a animalelor a fost luat în considerare criteriul referitor la bunăstarea animalelor, criteriu care a prevalat față de simpla supraviețuire a lor în condițiile nefavorabile ale experimentului. Studiile descrise în teza de doctorat au fost desfășurate cu respectarea principiilor impuse de Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului, din 22 septembrie 2010, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, inclusiv cele referitoare la competența cercetătorilor, astfel încât a fost asigurată pe deplin bunăstarea animalelor.

II. Partea specială

Scopul general al tezei de doctorat a fost atât identificarea modificărilor apărute în epidermoliza buloasă indusă pe model animal experimental, cât și identificarea modificărilor apărute în alte leziuni cutanate, respectiv proiectarea unor formulări terapeutice care să poată fi utilizate cu succes în tratarea acestor leziuni ale pielii.

Pentru atingerea scopului tezei s-au avut în vedere următoarele obiective, inclusiv activitățile lor specifice:

- a) inducerea leziunilor asemănătoare cu leziunile date de epidermoliza buloasă pe model animal, utilizând șoareci SJL de gen feminin, aplicând metoda de imunizare activă (100 μg collagen recombinant de șoarece de tip VII (GST-mCVIICr)/50 μL injecție/șoarece de două ori la un interval de 3 săptămâni);
- b) evaluarea toxicității unei materii prime din industria poliuretanilor și anume catalizatorul reacției de sinteză. În acest sens, am dezvoltat particulele poliuretane care conțin cantități diferite de catalizator, respectiv care nu conțin deloc urme de catalizator, în vederea stabilirii condițiilor sigure de utilizare din punct de vedere al toxicității. Pentru a evalua caracterul toxic și iritativ indus de

conținutul de catalizator în acești transportori transmembranari, am efectuat evaluări non-invazive privind parametrii pielii folosind un alt model animal (șoareci din rasa BALB/c). Măsurătorile privind parametrii pielii au fost efectuate utilizând un sistem profesional de monitorizare de tip MPA5 prevăzut cu o sondă Mexameter®MX18 pentru determinarea nivelului melaninei și a eritemului, respectiv o sondă Corneometer®CM825 pentru evaluarea modificărilor hidratării stratului cornos;

- c) dezvoltarea și tratarea altor leziuni cutanate asemănătoare cu leziunile epidermolizei buloase, pe model animal. În acest sens, am indus modelului animal (șoareci femele SLJ) leziuni solare, utilizând radiația UV. Tratamentul a constat în utilizarea unor oleogeluri sintetizate, cu conținut de betulină și lupeol. Eficiența acestor oleogeluri contra arsurilor solare a fost investigată prin măsurarea parametrilor pielii modelului animal utilizând sistemul profesional de monitorizare MPA5, la care de această dată au fost atașate sonda Mexameter®MX 18 pentru a înregistra nivelurile de melanină și eritem, în timp ce pierderea de apă transepidermică (TWL) și hidratarea pielii au fost măsurate folosind sondele Tewameter®TM 300 și respectiv Corneometer®CM 825.

II.1. Terapii utilizate experimental

Acest capitol face referire la preparatele fitomedicinale ce s-au dovedit a fi o alternativă utilă în a influența în mod benefic diferitele etape ale vindecării rănilor. Repararea rănilor este un proces biologic extrem de complex împărțit practic în trei faze suprapuse: inflamația, formarea de țesuturi noi și remodelarea. Vindecarea rănilor necesită integrarea multor evenimente celulare și moleculare complexe care pot fi vizate din multe puncte de vedere, ducând fie la vindecare accelerată, fie la întârziere, aceasta din urmă putând duce la răni cronice complexe. În literatura de specialitate sunt publicate un număr impresionant de studii ce demonstrează potențialul curativ al triterpenelor pentaciclice prin diverse activități biologice. Scoarța de mesteacăn este cunoscută ca fiind un remediu medicinal tradițional, încă de pe vremea indienilor nord-americieni care și-au înfășurat rănilor cu scoarță de mesteacăn pentru a accelera

vindecarea rănilor. Datorită acestui aspect, un medicament de tip oleogel (Episalvan) a fost aprobat pentru prima dată la nivel mondial în 2016 (EU/1/15/1069/001), și conține extract uscat purificat din scoarța *Betulei pendula* și *B. pubescens*, sau hibrizi ai ambelor specii, bogat în betulină ca ingredient activ (80%). Indicația cu care acest medicament a fost pus pe piață, a constat în tratarea rănilor superficiale ale pielii (epidermă și dermă superioară) și a arsurilor de gradul II la nivelul pielii adulte. Până în prezent, nu a existat niciun medicament aprobat în Europa cu eficacitate dovedită în accelerarea închiderii plăgilor.

II.2. Măsurători comune non-invazive aplicate pentru patologia cutanată experimentală

În general, fie că se discută despre produși noi sintetici sau pe bază de extracte naturale având ca destinație curățarea și îngrijirea pielii sau despre noi transportori transdermici precum carrierii polimerici (lipozomi) sau pe bază de nanocapsule anorganice (cu aur, argint, carbon sau diferiți oxizi metalici sau nemetalici), aceștia necesită testarea proprietăților lor în investigații experimentale care evaluează caracterul iritativ, hidratant, emolient, etc.

În ultimele decenii parametrii pielii au devenit cuantificabili prin utilizarea unei serii de sonde profesionale dezvoltate de producătorul german Courage-Khazaka (Köln, Germania). Sondele respective se conectează printr-o interfață digitală de tip MPA (adaptor multi-sondă) la calculator sau laptop și folosesc software specializat pentru a măsura cu precizie deosebită modificările survenite la suprafața pielii.

II.2.1. Evaluarea biofizică și impactul catalizatorului asupra proprietăților purtătorilor de medicamente din poliuretan

Datorită faptului că sistemele transdermice de administrare a medicamentelor au generat un interes extins ca alternativă preferată la administrarea orală a medicamentelor și a injecțiilor hipodermice, un alt capitol din teza de doctorat face referire la evaluarea toxicității unei materii prime din industria poliuretanilor (PU), și anume catalizatorul reacției de sinteză. Poliuretanii (PU) sunt o clasă de compuși

macromoleculari ce joacă rol de transportori transmembranari pentru o varietate mare de substanțe biologice active. Mai mult, diversitatea aplicațiilor acestor compuși macromoleculari s-a amplificat exponențial în ultimele decenii, datorită aplicațiilor din domeniul medical și anume: tuburi de cateter, așternuturi de spital, pansamente pentru răni, implanturi de reconstrucție osoasă, inimi artificiale, drenuri chirurgicale, pompe cu balon intra-aortic, dispozitive de dializă, mănuși non-alergenice, etc.

În acest sens, studiul efectuat pune față în față probe distincte de carrieri transmembranari pe bază de microstructuri poliuretane, în sinteza cărora s-au utilizat un amestec organic de hexameten-diizocianat și izoforon-diizocianat dizolvați în acetonă, respectiv o fază apoasă ce conține etilen-glicol, 1,4-butanediol și polietilen-glicol la diferite concentrații de DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octan). Rezultatele obținute au indicat faptul că DABCO folosit ca și catalizator nu influențează structural carrierul transmembranar. Caracterul toxic și iritativ indus de catalizator a fost cuantificat prin evaluări neinvazive ale parametrilor pielii folosind 6 șoareci din rasa BALB/c și un sistem profesional de monitorizare de tip MPA5. Au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește nivelul eritemului și hidratării pielii, influența catalizatorului fiind dependentă de doză. În concluzie, particulele poliuretane sintetizate, care nu conțin urme de catalizator, pot fi considerate mult mai sigure din punct de vedere al toxicității.

II.3. Aspecte legate de producerea experimentală a epidermolizei buloase

II.3.1. Provocări și limitări în dezvoltarea unui model animal de epidermoliză buloasă folosind șoareci SJL

Acest capitol prezintă o metodă de inducere a epidermolizei buloase asupra modelului animal experimental (șoareci SJL de gen feminin) și anume: metoda de imunizare activă utilizând collagen recombinant de șoarece de tip VII (GST-mCVIICr). Rezultatele obținute au indicat faptul că administrarea subcutanată (în talpa piciorului și la baza cozii) a 100 μ g de collagen de șoarece de tip VII recombinant (GST-mCVIICr) urmată de o injecție cu conținut de emulsie de anticorpi recombiinați, în ziua 21 post-

imunizare, nu a indus semne clinice cutanate specifice dezvoltării EB la niciunul dintre șoarecii imunizați. În concluzie, în condițiile prezentului protocol experimental, șoarecii femele SJL au fost rezistenți la dezvoltarea bolii clinice, dar vor fi efectuate studii suplimentare pentru a obține un model fiabil și reproductibil. Totuși, acest studiu ar putea fi considerat ca o lecție privind rolul critic jucat de tipul de selecție a speciei de șoareci atunci când se efectuează experimente pe modele animale.

În plus, tot pentru atingerea acestui obiectiv, am efectuat în cadrul Centrului de Cercetări Farmaco-Toxicologice din cadrul Facultății de Farmacie, o investigație farmacotoxicologică *in vitro* cu privire la biocompatibilitatea oleogelurilor cu conținut de betulină și lupeol, pe o linie celulară sănătoasă de piele umană (keratinocite umane imortalizate - Ha-CaT). Această investigație a fost completată de evaluarea *in vitro* a potențialului oleogelurilor privind vindecarea rănilor și reepitelializarea pielii, prin aplicarea testului Wound Healing (Scratch).

Pentru a completa profilul toxicologic, cele două oleogeluri cu conținut de substanță activă au fost testate și *in ovo*, în cadrul aceluiași centru de cercetare, cu scopul stabilirii profilului potențial iritativ al formulărilor preparate asupra membranei corioalantoice a embrionului de găină (testul HET-CAM).

II.4. Studii fizico-chimice de cedare a betulinei și lupeolului din formulări farmaceutice pentru patologia cutanată

II.4.1. Formulări de tip oleogel pentru eliberarea topică a betulinei și lupeolului în leziunile cutanate - prepararea, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea farmacotoxicologică

Pentru atingerea acestui obiectiv, au fost sintetizate oleogeluri cu betulină și lupeol, cu aplicabilitate în arsurile solare, datorită faptului că arsurile și protecția solară constituie un domeniu de cercetare în care se investește tot mai mult datorită numărului tot mai mare de cancere de piele. Studiul face referire la verificarea eficienței oleogelurilor cu betulină și lupeol contra arsurilor solare induse de radiația UV, prin utilizarea modelului animal experimental (șoareci femele SJL) pe care l-am expus inițial

la radiații UV. Rezultatele obținute au scos în evidență eficiența oleogelurilor cu betulină și lupeol la șoarecii care au fost tratați cu probele respective înregistrându-se valori net schimbate față de șoarecii din lotul de control sau cei tratați cu oleogel Blank – fără conținut de substanță activă. Trebuie menționat faptul că acesta a fost unul dintre puținele studii în care au fost mășurați parametrii pielii atât în perioada de iradiere UV (când se poate observa o deteriorare extraordinară a fiecărui parametru studiat) cât și în perioada ulterioară, perioada de tratament sau de refacere a pielii. În concluzie, putem afirma că oleogelurile cu triterpene pentaciclice, în special betulină și lupeol, pot fi utilizate cu succes ca și vehicule destinate protecției solare.

II.5. Concluzii generale și contribuții personale

Obiectivele propuse în cadrul tezei au fost îndeplinite în totalitate, rezultând următoarele concluzii:

- în cazul carrierilor transmembranari pe bază de microstructuri poliuretanic sintetizați, după caracterizare am cuantificat caracterul toxic și iritativ indus de catalizator prin evaluări neinvazive ale parametrilor pielii șoarecilor Balb/c și am constatat diferențe semnificative în ceea ce privește nivelul eritemului și al hidratării pielii, rezultatele arătând că influența catalizatorului utilizat în sinteză este dependentă de doză. În concluzie, particulele poliuretanic sintetizate care nu conțin urme de catalizator pot fi considerate mult mai sigure din punct de vedere al toxicității.
- referitor la studiul privind inducerea unor leziuni asemănătoare cu leziunile date de epidermoliza buloasă, experimentul nu a reușit dat fiind faptul că nu au fost observate semne specifice pentru dezvoltarea acestei boli, adică, șoarecii nu au dezvoltat vezicule, eroziuni, alopecie, cruste sau cicatrici. O posibilă explicație pentru nedeveloparea leziunilor specifice epidermolizei buloase după imunizare, ar putea fi legată de variațiile genetice care apar în cadrul unei tulpini de șoareci. Bazându-ne pe datele din literatură, un posibil factor care a dus la eșuarea

experimentului a fost că șoarecii utilizați în studiul nostru nu erau șoarecii consangvinizați.

- datorită faptului că nanoemulsiile și nanogelurile sunt cele mai potrivite vehicule pentru administrarea medicamentelor, datorită naturii lor lipofile, clarității optice și suprafeței, ultimul obiectiv propus în cadrul tezei a constat în obținerea și caracterizarea unor oleogeluri cu betulină și lupeol, ce au aplicabilitate în arsurile solare. După caracterizarea fizico-chimică a oleogelurilor cu conținut de substanță activă și fără conținut, rezultatele obținute au fost corelate cu biocompatibilitatea *in vitro* și proprietatea de vindecare a rănilor, deoarece biocompatibilitatea este obligatorie pentru formulările topice. Rezultatele privind viabilitatea, au indicat o lipsă de citotoxicitate a celor trei formulări cu sau fără conținut de substanță activă și o biocompatibilitate adecvată *in vitro* pe celulele HaCaT (keratinocite umane sănătoase). Testarea oleogelurilor pe membrana corioalantoică a relevat lipsa potențialului iritant al formulărilor testate, scorurile de iritare obținute pentru oleogelurile care conțin betulină și lupeol fiind mai mici decât 1. Rezultatele *in vivo* obținute (utilizând șoareci SJL), indică beneficiile oleogelurilor cu betulină și lupeol la nivelul pielii, caracterizate prin valori reduse ale eritemului și valori crescute ale umidității pielii (ambii parametri sunt modificați semnificativ în comparație cu grupul de șoareci de control și grupul șoarecilor tratați cu oleogel fără substanță activă).

Noutatea tezei de doctorat constă în faptul că am reușit să sintetizăm formulări semisolide cu conținut de betulină și lupeol, mult mai mici (0,3%) decât produsul deja aprobat pe piață (80%), o formulare care a demonstrat o bună biocompatibilitate *in vitro*, precum și o lipsă de toxicitate *in ovo* și *in vivo*. În plus, în ceea ce privește efectul asupra reepitelizării pielii, oleogelul cu conținut de btulină a exercitat cea mai puternică activitate de vindecare a plăgilor *in vitro*.

Caracterul original al tezei de doctorat este susținut de 4 lucrări științifice publicate în reviste ISI, din care 2 lucrări în reviste ISI cu factor de impact peste 1 și două lucrări științifice în reviste ISI cu factor de impact peste 4. La două dintre lucrările științifice publicate sunt prim autor, la o lucrare științifică, am contribuție egală cu primul autor, iar la ultima lucrare științifică sunt co-autor.