

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL IV**

UȚESCU CRINELA-MIHAELA



TEZĂ DE DOCTORAT

**NANOFORMULĂRI MODERNE PENTRU
TRANSPORTUL SUBSTANȚELOR ACTIVE
ÎN DIFERITE TIPURI DE CANCER**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. DUMITRAȘCU VICTOR

**Timișoara
2021**

CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate	VI
Lista cu abrevieri și simboluri	VII
Lista figurilor	VIII
Lista tabelor	X
Mulțumiri	XI
INTRODUCERE	xiii
 PARTEA GENERALĂ	 1
CAPITOLUL 1. HORMONII STEROIZI ȘI RELAȚIA CU BOLILE MALIGNNE MAMARE	1
1.1. Introducere	1
1.2. Biosinteza claselor specifice de steroizi – estrogenii și progesteronii	3
1.3. Produse cu activitate estrogenică	6
1.3.1. Etinilestradiolul	9
1.3.2. Fitoestrogenii	10
1.4. Relația cu apariția cancerului mamar	11
CAPITOLUL 2. COMPUȘI NATURALI ȘI RELAȚIA CU BOLILE MALIGNNE HEPATICE ȘI PULMONARE	15
2.1. Introducere	15
2.2. Bolile maligne hepatice și pulmonare	17
2.3. Compuși naturali cu potențial terapeutic antitumoral	19
CAPITOLUL 3. SISTEME MODERNE DE TRANSPORT A MEDICAMENTELOR	24
3.1. Noțiuni introductive	24
3.2. Nanoparticule biomedicale pe bază de acid polilactic	24
3.2.1. Prezentare, proprietăți, sinteză	24
3.2.2. Utilizare în domeniul medical	27
3.3. Nanoparticule biomedicale pe bază de lipozomi	31
3.3.1. Prezentare, proprietăți, sinteză	31
3.3.2. Utilizare în domeniul medical	33
3.4. Aspecte legate de toxicitate	35
 PARTEA SPECIALĂ	 37
CAPITOLUL 4. NANFORMULĂRI POLIMERICE PE BAZĂ DE HORMONI SINTETICI	38

4.1. Introducere.....	38
4.2. Materiale și metode.....	42
4.2.1. Reactivi.....	42
4.2.2. Obținerea și caracterizarea nanoformulărilor polimerice	42
4.2.3. Evaluarea nanoformulărilor polimerice	43
4.2.4. Date statistice	43
4.3. Rezultate și discuții	44
4.3.1. Caracterizarea nanoformulărilor polimerice pe bază de etinilestradiol	44
4.3.2. Activitatea citotoxică a nanoformulărilor polimerice pe bază de etinilestradiol	46
4.3.3. Caracterizarea nanoformulărilor polimerice pe bază de levonorgestrel.....	49
4.3.4. Activitatea citotoxică a nanoformulărilor polimerice pe bază de levonorgestrel.....	49
4.4. Concluzii parțiale.....	58
CAPITOLUL 5. NANFORMULĂRI PE BAZĂ DE LIPOZOMI-ARGINT- HORMONI SINTETICI	60
5.1. Introducere.....	60
5.2. Materiale și metode.....	61
5.2.1. Reactivi.....	61
5.2.2. Obținerea și caracterizarea nanoformulărilor pe bază de lipozomi-argint-hormoni.....	62
5.2.3. Evaluarea nanoformulărilor pe bază de lipozomi-argint-hormoni.....	63
5.2.4. Analiza statistică	63
5.3. Rezultate și discuții	64
5.3.1. Caracterizarea nanoformulărilor pe bază de lipozomi-argint- levonorgestrel.....	67
5.3.2. Activitatea citotoxică a nanoformulărilor pe bază de lipozomi- argint-levonorgestrel	69
5.4. Concluzii parțiale.....	77
CAPITOLUL 6. COLOIZI PE BAZĂ DE ARGINT ȘI SUBSTANȚĂ ACTIVĂ CU POTENȚIAL ANTITUMORAL	79
6.1. Introducere.....	79
6.2. Materiale și metode.....	82
6.2.1. Reactivi.....	82
6.2.2. Linii celulare.....	82
6.2.3. Sinteza și caracterizarea nanocoloizilor	82
6.2.4. Capacitatea de încărcare.....	83

6.2.5. Evaluarea citotoxicității	84
6.2.6. Analiza statistică	85
6.3. Rezultate și discuții	85
6.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a nanocoloizilor obținuți	85
6.3.2. Evaluarea potențialului citotoxic	90
6.4. Concluzii parțiale.....	103
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	104
BIBLIOGRAFIE	109
ANEXE	I

REZUMAT

Cancerul de sân este principala cauză de deces prin cancer la femei din întreaga lume iar instrumentele de evaluare a riscurilor pot identifica riscul de cancer de sân, iar pacienții cu risc ridicat pot fi candidați pentru medicamente care reduc acest risc. Alegerea medicamentului variază în funcție de starea menopauzei. În prezent, tratamentele hormonale sunt intens folosite din varii motive: prevenirea sarcinii, terapia hormonală de substituție, efecte antiîmbătrânire și multe altele. În ceea ce privește terapia contraceptivă, vârsta persoanelor care o utilizează a scăzut dramatic în ultimii ani, situându-se între 15 și 44 ani. Legătura tot mai pregnantă cu apariția cancerului de sân face din această terapie o controversă modernă. În continuare, există trei tipuri de pilule contraceptive orale: estrogen-progesteron combinat, numai progesteron și pilula de utilizare continuă sau extinsă, cea mai des prescrisă fiind pilula hormonală combinată cu estrogen și progesteron. Elucidarea acțiunii acestora, din punct de vedere al mecanismelor implicate cu finalitate benefică sau malefică, în contextul lumii moderne, în care factorii de mediu și cei genetici suferă importante modificări reprezintă o provocare pentru cercetătorii din domeniu. Este interesant că utilizarea pe termen lung a contraceptivelor orale a fost asociată cu o creștere mică a riscului de cancer la sân la femeile tinere. Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului a ajuns la concluzia că există suficiente dovezi pentru a lega carcinogenitatea de combinația cu estrogen-progestin la om, cu un risc crescut de cancer de sân limitat la femeile care le utilizează. La nivel global, peste sute de milioane de femei din întreaga lume utilizează contraceptive orale și alte câteva milioane recurg la terapie hormonală de substituție sau administrare de hormoni estrogeni sau progestativi pentru diferite alte manifestări. Dezvoltarea rațională a terapiilor țintite a revoluționat rezultatele cancerului de sân metastatic, deși rezistența la tratament rămâne o provocare majoră. Cancerul pulmonar este principala cauză a deceselor cauzate de cancer la nivel mondial, iar acest lucru o face o boală atractivă pentru revizuirea și eventual îmbunătățirea opțiunilor de tratament terapeutic. Chirurgia, radiatiile, chimioterapia, tratamentele țintite și imunoterapia separate sau în combinație sunt utilizate în mod obișnuit pentru a trata cancerul pulmonar. Cu toate acestea, aceste tipuri de tratament pot provoca diferite efecte secundare, iar regimurile bazate pe chimioterapie par să fi atins un platou terapeutic. Prin urmare, sunt necesare tratamente eficiente și mai bine tolerate. Progresele recente

au permis specialiștilor să investigheze mai bine utilizarea potențială a compușilor naturali pentru tratamentul sau controlul diferitelor boli canceroase. În ultimii 30 de ani, compușii naturali au fost pilonul chimioterapiei. Cu toate acestea, doar câțiva compuși au fost testați la pacienții cu cancer și sunt disponibile doar dovezi parțiale cu privire la eficacitatea lor clinică. Pacienții sunt adesea diagnosticați cu cancer hepatic în stadii avansate, contribuind la prognosticul acestuia. Dintre toate cazurile de cancer hepatic, peste 90% sunt carcinoame hepatocelulare pentru care chimioterapia și imunoterapia sunt cele mai bune opțiuni de terapie. Și în acest caz, utilizarea compușilor naturali și/sau a nanotehnologiei poate oferi pacienților rezultate mai bune, cu toxicitate sistemică mai mică și mai puține efecte secundare. Tratamentele îmbunătățite pot duce la un prognostic mai bun.

Lucrarea de față este structurată conform normelor de redactare în trei părți specifice: partea generală, partea specială și concluziile și contribuțiile personale. Partea generală tratează aspecte curente legate de: (1) hormonii steroizi - biosinteza claselor specifice de steroizi – estrogenii și progesteronii, produse cu activitate estrogenică, cu detalierea etinilestradiolului și fitoestrogenilor, urmată de relația cu apariția cancerului mamar; (2) compușii naturali și relația cu bolile maligne hepatice și pulmonare și (3) sisteme moderne de absorbție a medicamentelor, cu accentul asupra proprietăților, sintezei și utilizării în domeniu biomedical a nanoparticulelor pe bază de acid polilactic și a celor pe bază de lipozomi, încheindu-se cu aspectele legate de toxicitate.

Partea specială prezintă modul de obținere, caracterizare și evaluare a proprietăților biologice a unor tipuri moderne de nanoformulări încărcate cu substanțe active cu aplicabilitate în domeniul medical și anume: nanoformulări polimerice pe bază de hormoni sintetici (etinilestradiol și levonorgestrel), nanoformulări pe bază de lipozomi-argint, încărcate cu hormoni sintetici (levonorgestrel) și nanoformulări pe bază de colizi de argint încărcate cu fitocompus (acid betulinic). Lucrarea se încheie cu prezentarea principalelor concluzii și bibliografia care a stat la baza cercetărilor și cuprinde totodată lucrările publicate asociate studiilor realizate.

Primul studiu experimental a fost realizat pentru a obține o evaluare preliminară a comportamentului celulelor normale și tumorale (adenocarcinoma mamar) după stimularea cu etinilestradiol și nanoparticule cu etinilestradiol pe bază de acid polilactic (EENPs) și levonorgestrel și nanoparticule cu levonorgestrel pe

bază de acid polilactic (LNGNPs). Formulările polimerice se realizează prin urmare, în principal pentru a crește stabilitatea substanțelor active, pentru a păstra proprietățile biologice active și pentru a reduce efectele adverse nedorite, fiind utilizată o doză de substanță activă implicit mult redusă. În general, proprietățile fizico-chimice, dimensiunea, forma, încărcarea suprafeței, acoperirea etc. a nanoparticulelor sunt elemente cheie în interacțiunile cu sistemul imunitar, cu diferite mecanisme specifice de acțiune. Aceste proprietăți au o influență definitorie în ceea ce privește siguranța utilizării în domeniul biomedical iar tehnicile prin care se realizează caracterizarea fizico-chimică a compușilor obținuți trebuie să fie foarte atent selecționate. Conform valorilor obținute, nanoparticulele sintetizate corespund utilizării lor preliminare în aplicațiile farmaceutice. Studiile preclinice se bazează într-o primă fază pe comportamentul liniei celulare, în prezența compușilor care necesită evaluări farmaceutice. Celulele sănătoase sunt utilizate pentru a evalua toxicitatea potențială a compușilor. În această cercetare experimentală, a fost observat un efect stimulant asupra keratinocitelor umane imortalizate, în special atunci când s-au utilizat nanoparticule la cele mai mici concentrații. Linia de celule MCF 7 este cea mai frecvent utilizată în studiul mecanismelor ER-pozitive ale celulelor maligne de sân, datorită rezistenței sale la terapia dobândită prin utilizare. Astfel, celulele sunt optime pentru studiul rezistenței la terapia anti-hormonală, fiind ușor de cultivat și stimulat păstrând în același timp expresia ER. În studiul de față, compușii care au fost testați nu au avut o influență vizibilă asupra celulelor: etinilestradiolul la cele mai mici concentrații a avut un efect stimulator asupra celulelor, în timp ce, la cea mai mare concentrație, viabilitatea a fost de aproximativ 94%. Polimerul pe bază de etinilestradiol a menținut influențele compusului la concentrații mici și la cea mai mare concentrație a redus viabilitatea celulară la aproximativ 90%. Atât levonorgestrelul cât și nanoformulările polimerice pe bază de levonorgestrel nu au influențat viabilitatea keratinocitelor umane, s-a putut observa faptul că viabilitatea cea mai scăzută s-a înregistrat pentru concentrația cea mai mare de levonorgestrel testată (viabilitate ~96%) și pentru formularea polimerică asociată aceleiași concentrații (viabilitate ~95%). Levonorgestrelul și nanoparticulele pe bază de acid polilactic încărcate cu levonorgestrel nu au influențat în mod semnificativ celulele de adenocarcinom mamar MCF 7: levonorgestrelul la cele mai mici concentrații a avut un efect nesemnificativ asupra celulei, în timp ce la cele mai mari concentrații, s-a observat un efect ușor stimulator. Polimerul pe bază de levonorgestrel a menținut

influențele compusului la toate concentrațiile dar a redus din efectul stimulat exercitat de compusul părinte.

Polimerii sunt formulări extrem de utile în abordarea noilor terapii care au efecte benefice cu reducerea efectelor secundare. Etinilestradiolul este un compus intens studiat, deoarece exercită o serie de efecte atât în ceea ce privește contracepția, terapia de substituție hormonală, cât și interacțiunile alimente / medicamente sau medicamente / medicamente. Prin urmare, pentru a beneficia în continuare de efectele pozitive induse de acesta, este necesar să se găsească formulări care să păstreze activitatea farmacologică, dar care să reducă efectele nedorite. PLA este un compus adecvat pentru a obține nanoparticule etinilestradiol stabile și eficiente și pentru a stabili implicarea în apariția cancerului. Mai mult, se așteaptă ca liniile celulare de cancer mamar, cum ar fi MCF-7, să fie la baza cercetării în tratamentul acestor boli maligne. Datele obținute sunt necesare pentru a corela anumiți factori pentru a găsi modelul ideal *in vivo* care este eficient în multe moduri: medical, economic și social.

Cel de-al doilea studiu a avut drept scop obținerea nanoparticulelor de argint și levonorgestrel, care au fost ulterior încorporate în lipozomi pentru a obține un sistem compatibil și eficient corelat cu mediul biologic. Probele obținute au fost caracterizate prin metodele fizico-chimice obișnuite și au fost testate ulterior *in vitro* pentru o evaluare preliminară a comportamentului și siguranței. Nanoparticulele de argint încărcate cu levonorgestrel au fost obținute prin sinteză chimică pentru a le controla mai bine dimensiunea. S-a folosit spectroscopia UV-Vis în timpul sintezelor pentru a confirma formarea nanoparticulelor de argint sub formă de soluții coloidale. Analiza morfologică a fost realizată prin microscopie electronică cu transmisie (TEM) care a evidențiat nanoparticule aglomerate cu suprafață relativ netedă, cu un diametru mediu sub 200 nm; aspectul nanoformulărilor lipozomale cu argint încărcate cu levonorgestrel nu suferă modificări semnificative. Compoziția elementală a coloizilor de argint a fost realizată prin analiza EDAX. Elementele prezente în probele de nanoparticule de argint analizate au fost carbon, oxigen, azot, sodiu și argint exprimate în procente de greutate (% în greutate) sau procente atomice (At.%). Pentru a evalua stabilitatea probelor potențialul zeta a fost determinat și datele obținute au fost satisfăcătoare, valorile fiind negative și situate în intervalul -39 mV și -19 mV cu cele mai mici valori pentru sistemele lipozomale. Dimensiunea probelor obținute arată că acestea sunt biocompatibile cu mediul

biologic. Pentru a evalua impactul citotoxic al nanoparticulelor de argint cu levonorgestrel și a sistemelor lor lipozomale asupra celulelor epiteliale ale sânului - MCF 10A, au fost selectate două concentrații 0.1 μM și 1 μM , respectiv, timp de 24 de ore. Datele obținute au arătat că la 0.1 μM nu a fost înregistrată nicio influență semnificativă asupra viabilității celulare timp de 24 de ore. La o concentrație de 1 μM , a existat o ușoară scădere a viabilității celulare după tratamentul cu coloizii de argint (viabilitate $\sim 93\%$), coloizii de argint cu levonorgestrel (viabilitate $\sim 94\%$) și sistemele lipozomale cu coloizi de argint (viabilitate $\sim 94\%$). Potențialul citotoxic al eșantioanelor obținute pe celulele mamare de adenocarcinom uman a fost realizat pe celule MCF 7 care au fost stimulate cu aceleași concentrații utilizate în celulele non-canceroase (MCF 10A) 0.1 μM și, respectiv, 1 μM . Viabilitatea a fost influențată mai mult sau mai puțin statistic de toate probele testate la cea mai mare concentrație după cum urmează: $\sim 90\%$ pentru Ag_NPs și Lip_Ag_NPs_PEG, $\sim 91\%$ pentru Lip_Lng_Ag_NPs_PEG, $\sim 92\%$ pentru Ag_NPs_PEG, $\sim 93\%$ pentru Lip_Ag_NPs, $\sim 94\%$ pentru Lip_Lng_Ag_NPs. Datele din prezentul studiu relevă că nanoparticulele de argint cu levonorgestrel și sistemele lor lipozomale îndeplinesc cerințele de utilizare în aria biomedicală pe baza stabilității și dimensiunii lor. Testarea citotoxică a sistemelor obținute a fost efectuată pe două linii de celule mamare (celule non-tumorale - MCF 10A și celule tumorale - MCF7) pentru a evalua activitatea la concentrații scăzute, ținând cont de faptul că datele din literatură folosesc adesea concentrații care dovedesc citotoxicitatea pe liniile de celule tumorale dar nu folosesc comparații cu linii non-tumorale. A existat o ușoară reducere a viabilității celulelor tumorale, care a variat statistic în funcție de componentele probei, cele cu levonorgestrel având o influență mai mică comparativ cu cele fără aceste substanțe.

Cel de-al treilea studiu a fost propus pentru a contribui la dezvoltarea unor coloizi de argint atât acoperiți cât și neacoperiți cu PEG (polietilen glicol) ca transportori de tip nano adecvați pentru acidul betulinic cu potențial antitumoral sporit. În plus, noii nanocoloizi de argint încărcăți cu acid betulinic au fost caracterizați dintr-o perspectivă fizico-chimică și potențialul antitumoral a fost testat folosind modele *in vitro* de linii celulare de carcinom hepatocelular (HepG2) și cancer pulmonar (A549). Formarea nanocoloizilor de argint încărcăți cu acid betulinic a fost confirmată de apariția culorii galbene pal (evaluare macroscopică) și a unui vârf de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR) în intervalul spectral 400-440 nm în spectrele de absorbție UV-Vis. Sinteza chimică a fost propusă pentru a obține

dimensiunile și formele dorite, prin utilizarea unui agent de acoperire cu rol de control al mărimii și stabilității (SLS) și un agent reducător (TC). Aceste nanoparticule s-au încadrat în intervalul de dimensiuni de 20-80 nm și au avut dimensiuni hidrodinamice medii (DLS) de: 21 nm (SilCo), 53 nm (PEG_SilCo), 32 nm (SilCo_BA) și 71 nm (PEG_SilCo_BA). Valorile potențialelor zeta au confirmat stabilitatea compuşilor obținuți. Capacitatea de încărcare a substanței active este importantă pentru transportul și distribuția substanței active. În prezentul studiu, s-a observat o bună capacitate de încărcare a acidului betulinic în formulările propuse. Având în vedere faptul că noii nanocoloizi de argint încărcăți cu BA sunt destinați utilizării biologice, a fost testat impactul lor *in vitro* în ceea ce privește viabilitatea celulară și morfologia pe două linii celulare tumorale: HepG2 - carcinom hepatocelular uman și A549 - carcinom pulmonar uman. Rezultatele au indicat un tip morfologie celulară și un efect citotoxic dependent de timp. În cazul celulelor HepG2, SilCo și PEG_SilCo nu au avut niciun impact asupra viabilității celulelor după o expunere de 24 de ore în comparație cu celulele de control (celule care nu au primit tratament), în timp ce un tratament mai lung (48 de ore) a condus la o ușoară scădere a procentului de viabilitate celulară (aproximativ 89% pentru SilCo și, respectiv, 83% pentru PEG_SilCo). Un comportament similar a fost observat în cazul DMSO, solventul utilizat pentru solubilizarea BA. Pe baza acestor date, rezultatele obținute pentru nanocoloizii de argint încărcăți cu BA (SilCo_BA și PEG_SilCo_BA) au fost normalizate la SilCo, PEG_SilCo și, respectiv, DMSO. Nanocoloizii de argint încărcăți cu BA au indus o scădere a procentului de viabilitate a celulelor HepG2 care a fost mai semnificativă după 48 de ore: SilCo_BA (~66%) și PEG_SilCo_BA (~72%). O scădere a viabilității celulelor (~75%) a fost, de asemenea, observată în cazul BA solubilizat în DMSO (BA_DMSO), dar într-o măsură mai mică în comparație cu efectul nanocoloizilor. Aceste rezultate indică un efect citotoxic crescut al noilor nanocoloizi de argint încărcăți cu BA în comparație cu BA singur. Acidul betulinic (SilCo_BA și PEG_SilCo_BA) timp de 48 de ore a indus modificări semnificative în morfologia celulelor. O formă rotundă a celulei, pierderea aderenței și celule plutitoare în mediul de cultură precum și o distribuție sporadică a celulelor au fost elemente observate în comparație cu celulele martor. Expunerea celulelor la SilCo și PEG_SilCo, a cauzat modificări ale formei și aderenței celulei, dar la o rată mai mică în comparație cu nanocoloizii de argint încărcăți cu BA. Aceste modificări ale morfologiei celulelor reprezintă semne clare de citotoxicitate și confirmă

rezultatele evaluării viabilității celulelor. SilCo, PEG_SilCo și DMSO nu au interferat cu viabilitatea celulelor A549, nu s-au observat modificări semnificative în procentul de viabilitate a celulelor după tratamentul de 48 de ore. Celulele A549 au prezentat o susceptibilitate mai scăzută la BA_DMSO (~88%) și nanocoloizi de argint încărcăți cu BA (SilCo_BA - ~75% și PEG_SilCo_BA - ~87%), a fost înregistrată o scădere a procentului de viabilitate celulară, dar nu la fel de semnificativă ca pentru celulele HepG2. Modificări minore au fost observate în celulele A549 după aplicarea BA_DMSO și nanocoloizilor de argint încărcăți cu BA. Celulele erau rotunde, dar aderența lor nu a fost grav afectată **și nici confluința lor**. În prezentul studiu, a fost obținută cu succes o nouă formulare pe bază de acid betulinic, sub formă de nanocoloizi de argint neacoperiți și acoperiți cu PEG, care au prezentat caracteristici adecvate, cum ar fi: dimensiunea în intervalul 20-80 nm, forma sferică, potențialul zeta negativ și un diametru hidrodinamic mediu optim pentru sisteme de dimensiuni nano. Noii nanocoloizi de argint încărcăți cu BA au exercitat un efect citotoxic îmbunătățit atât în celulele HepG2, cât și în celulele A549 în comparație cu compusul părinte BA prin reducerea semnificativă a viabilității celulare și modificarea aspectului lor morfologic. Astfel, acest studiu demonstrează că nanocoloizii de argint neacoperiți și acoperiți cu PEG sunt adecvați ca platforme pentru livrarea acidului betulinic pentru îmbunătățirea efectului său antitumoral datorită efectului sinergic oferit de BA și asocierea cu nanocoloizii de argint. Sunt necesare studii aprofundate *in vivo* pentru a verifica atât siguranța, cât și eficiența antitumorală a noii nanoformulări pe bază de acid betulinic.

Contribuțiile originale care au fost aduse prin studiile experimentale desfășurate și diseminate în jurnale de specialitate, oferă o perspectivă asupra activității citotoxice a anumitor formulări pe bază de etinilestradiol și levonorgestrel (împotriva celulelor maligne ale sânului), descifrarea anumitor mecanisme asociate proceselor tumorale în prezența fitocompușilor (de exemplu viabilitatea celulară și morfologia specifică a celulelor maligne de plămân sau a carcinomului hepatocelular în prezența formulărilor pe bază de nanocoloizi de argint încărcăți cu acid betulinic). Având în vedere complexitatea și interdisciplinaritatea subiectelor dezbătute anterior, direcțiile de cercetare viitoare sunt variate și necesită evaluarea formulărilor în studii complexe, care să implice toate etapele necesare pentru accederea ulterioară în studii clinice, bineînțeles cu stabilirea completă a profilului farmacologic.