

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINA DENTARĂ
DEPARTAMENTUL III

PREDUȚ ANTOANETA-DENISA



TEZĂ DE DOCTORAT

BOLI ALE CAVITĂȚII ORALE ȘI TRATAMENTE PREVENTIVE
INOVATOARE BAZATE PE NANOPARTICULE ÎNCĂRCATE
CU BIOMOLECULE

REZUMAT

Coordonator Științific
PROF. UNIV. DR. ANCA JIVANESCU

Timișoara
2023

CUPRINS

Lista articolelor publicate	VI
Lista abrevierilor	VII
Indexul figurilor	VIII
Indexul tabelelor	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE	XV
PARTEA GENERALĂ	1
CAPITOLUL 1. CAVITATEA BUCALĂ ȘI AFECȚIUNI FRECVENTE	1
1.1 Introducere	1
1.2 Bacteriile și bolile bucale	5
1.2.1 Formarea bacteriilor și a biofilmului	5
1.2.2 Factori care influențează microbiota orală	10
1.2.3 Legătura dintre microbiomul oral și bolile bucale	16
CAPITOLUL 2. PLANTE MEDICINALE UTILIZATE ÎN BOLI ORALE	19
2.1 Introducere	19
2.2 Plante medicinale utilizate în produsele de igienă orală	21
CAPITOLUL 3. TIPURI DE FORMULĂRI MODERNE PENTRU CREȘTEREA BIODISPONIBILITĂȚII COMPUȘILOR ACTIVI	25
3.1 Prezentare generală	25
PARTEA SPECIALĂ	32
CAPITOLUL 4. EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII LIPOZOMILOR ÎNCĂRCAȚI CU SUBSTANȚE ACTIVE BIOLOGIC PE CELULELE TUMORALE ORALE.	34
4.1 Introducere	34
4.2 Materiale și metode	37
4.2.1 Reactivi	37
4.2.2 Prepararea și caracterizarea lipozomilor cu betulină	37
4.2.3 Cultura celulară	38
4.2.4 Evaluarea viabilității celulare	38
4.2.5 Morfologia celulară	39
4.2.6 Colorarea nucleară	39
4.2.7 Analiza statistică	40
4.3 Rezultate	40
4.3.1 Evaluarea viabilității celulare	40
4.3.2 Evaluarea morfologiei celulare	43

4.3.3 Evaluarea morfologiei nucleare	47
4.4. Discuții	51
4.5. Concluzii	53
CAPITOLUL 5. EVALUAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC AL FORMULĂRILOR CU RUTIN PE CELULELE ORALE UMANE	54
5.1 Introducere	54
5.2 Materiale și metode	57
5.2.1 Reactivi	57
5.2.2 Prepararea și caracterizarea lipozomilor	58
5.2.3 Cultura celulară	58
5.2.4 Evaluarea viabilității celulare	59
5.2.5 Analiza statistică	59
5.3 Rezultate	60
5.4 Discuții	66
5.5 Concluzii	70
CAPITOLUL 6. EVALUAREA PRIN METODE IN VITRO A PROPRIETĂȚILOR CITOTOXICE ALE FITOCOMPUȘILOR	71
6.1 Introducere	71
6.2 Materiale și metode	73
6.2.1 Reactivi	73
6.2.2 Cultura celulară	73
6.2.3 Evaluarea viabilității celulare	74
6.2.4 Morfologia celulară și evaluarea confluentei	74
6.2.5 Evaluarea morfologiei nucleare	74
6.2.6 Detectarea senescentei	75
6.2.7 Analiza statistică	75
6.3 Rezultate	76
6.3.1 Evaluarea viabilității celulare	76
6.3.2 Evaluarea morfologiei celulare	78
6.3.3 Evaluarea morfologiei nucleare	80
6.3.4 Evaluarea senescentei	83
6.4 Discuții	84
6.5 Concluzii	89
CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	90
REFERINȚE	93
ANEXA	I

REZUMAT

Bolile, atât cele cronice, cât și cele acute, în rândul populației sunt din ce în ce mai frecvente și, așa cum era de așteptat, includ toate grupele de vârstă. Cercetările efectuate în diferite domenii legate de aria stomatologică au evidențiat rolul major pe care îl joacă cavitatea bucală în propagarea bolilor sistemice. O stare optimă de sănătate a cavității bucale aduce o contribuție majoră la bunăstarea generală a întregului organism uman și are un impact evident asupra calității vieții. Bolile bucale, care sunt adesea însoțite de dureri severe, afectează funcțiile fizice normale (de exemplu vorbirea, mâncatul), afectând în același timp viața socială. În general, majoritatea patologiilor bucale pot fi prevenite, dar având în vedere că sunt foarte răspândite pe tot parcursul vieții și au reacții adverse importante, este necesar să fie studiate în detaliu și să le fie acordată atenția cuvenită.

Bolile tumorale bucale sunt asociate în cea mai mare parte cu carcinoamele cavității bucale, care la rândul lor implică o categorie vastă de neoplasme. Incidența tumorilor maligne bucale este în creștere în țara noastră, fiind printre cele mai frecvent dezvoltate boli maligne și este direct influențată de factori precum consumul de tutun și alcool. Carcinoamele cu celule scuamoase ale capului și gâtului includ, în general, cancerele epiteliale, inclusiv cele ale buzelor, faringelui, laringelui și glandelor salivare.

Protocoalele terapeutice presupun mai multe intervenții (chirurgicale, chimioterapeutice, radioterapeutice) care sunt adesea urmate de efecte adverse semnificative. Necesitatea de a găsi metode complementare și alternative este de o importanță majoră. Resursele naturale sunt bogate, oferă o serie de compuși cu acțiuni farmacologice importante și variate. Dezavantajul utilizării compușilor de origine naturală este legat în principal de biodisponibilitatea lor slabă, reducând astfel modul de acțiune și combaterea bolilor. Sistemele pe bază de lipide sunt evaluate ca sisteme de purtători eficiente în furnizarea de compuși naturali, datorită faptului că lipidele sunt biodegradabile și pot îmbunătăți transportul transcelular prin perturbarea straturilor duble lipidice. În stomatologie, lipozomii au fost folosiți într-o serie de acțiuni, inclusiv în prevenirea cariilor, combaterea gingivitei și chiar în tratamentul leziunilor bucale și al parodontozei. A fost investigat potențialul sistemelor de transport pe bază de lipozomi în tratamentul mucoasei bucale ulcerate, iar rezultatele obținute au fost promițătoare.

Prezenta teză este structurată în două părți și cuprinde partea generală și partea specială. În partea generală, sunt tratate aspecte actuale legate de cavitatea bucală, patologiile cavității bucale, resursele naturale și rolul acestora în abordarea patologiilor bucale și, nu în ultimul rând, tehnicile actuale de obținere a sistemelor de transport pentru biomolecule active farmacologic. În partea specială sunt prezentate direcțiile originale de cercetare.

Tema abordată este de interes internațional, întrucât patologiiile bucale, fie ele acute sau cronice, își lasă amprenta asupra stării de sănătate. Mai mult, patologiiile maligne sunt în creștere, iar protocoalele terapeutice nu sunt lipsite de consecințe, atât pe termen scurt, cât și pe termen lung, iar rezultatele sunt foarte diferite și depind de mai mulți factori. La nivel național, cancerul bucal ocupă un loc proeminent, măsurile de prevenire și control fiind imperios necesare. Căutarea unor metode complementare și alternative de combatere a incidenței crescute a patologiilor maligne bucale este un subiect de real interes, începând de la nivelul grupului de cercetare regional și până la cele mai înalte niveluri internaționale.

Metodele de cercetare care au stat la baza studiilor experimentale sunt recunoscute și utilizate la nivel internațional. Prin aplicarea acestora se obțin rezultate reproductibile și se elaborează protocoale specializate care stau la baza cercetării începând din stadiul preclinic până la introducerea în studiile clinice dacă rezultatele obținute în preclinic prezintă interes.

Bolile dentare sunt în mare parte boli cronice și progresive. Starea generală de sănătate este cel mai adesea afectată de unele dintre cele mai frecvente patologii orale, cariile dentare, boli parodontale și boli maligne bucale. Cele mai recente statistici plasează țara noastră printre cele mai afectate țări în ceea ce privește rata generală de apariție și progresia bolilor maligne bucale. Melanomul bucal este o boală malignă extrem de rară, care este cunoscută pentru evoluția sa rapidă și agresivitatea. Boala reprezintă o provocare din punct de vedere al tratamentului deoarece de cele mai multe ori, este descoperită într-un stadiu avansat, iar stomatologii joacă un rol cheie, în ceea ce privește diagnosticul prompt și contribuția majoră legată de diagnostic.

Abordarea terapeutică a acestor afecțiuni constă în general într-o combinație de proceduri chirurgicale cu chimioterapie, imunoterapie, terapie hormonală. Cu toate acestea, aceste tratamente nu sunt lipsite de efecte, iar marea majoritate a efectelor secundare sunt adesea severe. Metodele alternative sunt intens căutate și studiate în prezent, fiind necesare abordări terapeutice care prezintă efecte terapeutice eficiente, iar efectele secundare sunt cât mai puțin severe.

De-a lungul timpului, resursele de origine naturală (plante și compuși naturali) și-au demonstrat capacitatea farmacologică în numeroase tipuri de patologii (acute și cronice), precum și în cazul bolilor maligne. În ciuda acestor acțiuni benefice demonstrate, eficacitatea produselor de origine naturală, a compușilor derivați din surse naturale, precum și a complexelor și preparatelor obținute din surse naturale, este puternic influențată de stabilitate și biodisponibilitate. În prezent, aceste dezavantaje sunt abordate fie prin sintetizarea complexelor pentru a obține formulări hidrofile, fie prin producerea unei derivatizări pentru a obține mai multe molecule solubile în apă. Unele dintre sistemele de transport utilizate frecvent în domeniul medical sunt reprezentate de lipozomi. Acestea sunt

vezicule fosfolipidice, biocompatibile, care au proprietatea de a încorpora o gamă extrem de variată de molecule bioactive (hidrofobe, hidrofile și amfifile).

Luând în considerare cele descrise mai sus, principalele obiective ale prezentei teze au fost:

- determinarea eficienței încorporării unei triterpene pentaciclice cu proprietăți farmacologice dovedite (betulina) în lipozomi (obținerea unui sistem de eliberare a betulinei) și evaluarea citotoxicității formulării obținute, pe celulele tumorale faringiene (celule Detroit-562).
- determinarea eficienței încorporării unui flavonoid glicozilat cu proprietăți farmacologice dovedite (rutin) în lipozomi (obținerea unui sistem de eliberare a rutinului) și evaluarea citotoxicității formulării obținute, asupra celulelor tumorale faringiene (celule Detroit-562) și a celulelor de carcinom scuamos (celule SCC-4).
- oferirea unei perspective in vitro în ceea ce privește potențialului citotoxic al unui flavonoid glicozilat (rutin) asupra celulelor melanomului, atât de morfologie epitelială, cât și poligonală, prin evaluarea impactului asupra viabilității și morfologiei celulelor dar și asupra aspectului nuclear și a proprietăților legate de inducerea senescentei.

Scopul primului studiu a fost de a determina eficiența încorporării betulinei în lipozomi și de a evalua citotoxicitatea acestora asupra celulelor canceroase faringiene (celule Detroit-562). Mai precis, s-a dorit obținerea unui sistem de eliberare a betulinei, cu efect citotoxic puternic în cazul celulelor tumorale bucale. Acțiunile terapeutice ale fitocompușilor sunt bine cunoscute în diverse patologii, dar de cele mai multe ori compușii naturali nu pot fi administrați din cauza solubilității lor scăzute și este necesară găsirea unor formulări adecvate pentru a le crește proprietățile biomedicale. Studiul de față a relevat eficiența încorporării betulinei în lipozomi și efectul citotoxic al formulării pe bază de lipozomi asupra celulelor canceroase faringiene prin analize de morfologie, viabilitate și colorare nucleară. În funcție de concentrațiile testate, lipozomii betulinei au prezentat un efect citotoxic pronunțat, cu o scădere a viabilității celulare. În plus, s-au observat modificări ale morfologiei celulare cu semne de moarte celulară, celulele devenind rotunde și apoi desprinse de pe placă. De asemenea, sistemul lipozomal a scăzut semnificativ numărul de nuclei, determinând fragmentarea nucleară și formarea de corpuri apoptotice.

Scopul celui de-al doilea studiu a fost de a obține o formulare lipozomală încărcată cu rutin și de a o testa pe celule canceroase orale (linii celulare SCC-4 și Detroit-562) în comparație cu linia celulară de keratinocite gingivale sănătoase (PGK), în ceea ce privește identificarea posibilelor efecte citotoxice asupra carcinoamelor orofaringiene.

Factorii locali de pe țesuturile de susținere parodontale duc la apariția unor fenomene inflamatorii cronice care au ca rezultat apariția și dezvoltarea parodontozei. Una dintre țintele

terapeutice actuale se concentrează pe regenerarea țesutului parodontal afectat iar mai recent tehnicile de inginerie asociate țesutului parodontal au câștigat teren considerabil devenind protocoale terapeutice de succes în ceea ce privește regenerarea, recuperarea funcționalității. Ligamentele parodontale sunt alcătuite din numeroase celule stem ale ligamentului parodontal (celule stem mezenchimale nediferențiate), care au capacitate de regenerare și diferențiere multidirecțională, contribuind la refacerea țesutului parodontal, la menținerea echilibrului dinamic și la reglarea regenerării țesutului. S-a evidențiat faptul că aceste celule constitutive ale ligamentului parodontal sunt unele dintre cele mai utile tipuri de celule care contribuie la procesele de regenerare a țesutului parodontal afectat, diferențierea și proliferarea continuă, având capacitatea de a secreta factori de creștere care contribuie la înmprospătarea mediului local și în final are loc regenerarea țesutului afectat. În general, procesele inflamatorii cronice sunt asociate cu posibilitatea dezvoltării celulelor tumorale. Tratamentele bolilor maligne sunt recunoscute pentru agresivitatea lor și multitudinea de efecte adverse exercitate. De ani de zile s-au depus eforturi în căutarea unor tratamente diferite, fie preventive, fie curative, care să nu producă efecte adverse sau care să fie reduse semnificativ efectele adverse produse.

Cancerle bucale și orofaringiene sunt unele dintre cele mai frecvente tipuri de cancer la nivel mondial și prezintă o problemă de sănătate alarmantă. Opțiunile de tratament disponibile sunt radioterapia, chirurgia și chimioterapia cu cisplatină sau cetuximab. Cu toate acestea, aceste opțiuni de tratament induc toxicități acute severe, disfuncție de deglutiție și morbidități pe termen lung și necesită îmbunătățiri și/sau înlocuire.

Eficacitatea terapeutică asociată plantelor medicinale în cazul celulelor tumorale maligne a atras atenția cercetătorilor din întreaga lume. Flavonoidele sunt printre cele mai studiate fitocomponente, mai ales datorită prezenței lor semnificative în plantele medicinale. Consumul de plante medicinale și produse derivate s-a dovedit a fi benefic pentru sănătatea umană, mai ales datorită impactului semnificativ arătat în rapoartele care au studiat eficiența acestora împotriva diverselor stres viral, alergen, inflamator, oxidativ etc. O serie de studii au evidențiat capacitatea flavonoidelor și proantocianidinelor în ceea ce privește prevenirea cancerelor bucale și capului și reducerea incidenței patologiilor maligne asociate cu colon, sân, rinichi și ovare, devenind astfel potențiali candidați pentru protocoalele terapeutice antitumorale.

Nanotehnologia este știința care își propune să obțină particule de dimensiuni nanometrice, situate în intervalul 1-100 nm, cu scopul de a obține o creștere semnificativă a suprafeței și de a îmbunătăți proprietățile fizico-chimice din punct de vedere al biodisponibilității și stabilității. Prin urmare, nanotehnologia și-a găsit aplicații în diverse domenii extrem de variate, inclusiv în domeniul medical. În cazul domeniilor medicale, nanoparticulele sintetizate trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici pentru a obține

biocompatibilitatea necesară, iar forma, dimensiunea și stabilitatea lor sunt parametri definitori. Formulările finale destinate utilizării biomedicale trebuie să prezinte și o solubilitate adecvată, care la rândul său influențează direct absorbția celulară. O altă caracteristică importantă a formulărilor pe bază de nanoparticule este țintirea specifică, proces care este însoțit de mai multe avantaje, inclusiv reducerea dozei de substanță activă necesară pentru a obține efectul dorit.

Astfel, al doilea obiectiv a fost acela de evaluare a potențialului citotoxic al formulărilor cu rutin pe celulele orale umane care a implicat obținerea unei formulări lipozomale încărcate cu rutin (un fitocompus din clasa flavonoidelor) și testarea acestuia pe celulele tumorale orale pentru a identifica posibilele efecte benefice. Principalele concluzii care se pot trage sunt următoarele: s-a obținut o formulare biocompatibilă pentru transportul rutinului la locul de acțiune din mediul biologic; fitocompusul rutin este un flavonoid cu bune capacități de integrare în lipozomi; lipozomii pregătiți să joace rolul unui sistem de transport, care conțin colesterol și fosfatidilcolină, nu au prezentat efecte citotoxice; nanoformularile încărcate cu rutin au demonstrat o acțiune semnificativă asupra viabilității ambelor tipuri de celule tumorale, acțiune care s-a dovedit a fi superioară celei exercitate de compusul pur, neîncorporat în sistemul lipozomal.

Ultimul studiu și-a propus să ofere o perspectivă in vitro asupra potențialului citotoxic al fitocompusului împotriva a două linii celulare diferite de melanom uman: RPMI-7951 (morfologie epitelială) și SK-MEL-28 (morfologie poligonală) prin evaluarea impactului acestuia asupra viabilității celulare, morfologia celulară și evaluarea aspectului nuclear dar și proprietăților de inducere a senescenței.

Studiile asupra culturilor celulare sunt de real ajutor în ceea ce privește analiza proceselor biologice prin prisma mecanismelor care apar în diferite patologii, în special în studiul detaliat al anumitor mecanisme implicate în procesele de dezvoltare a celulelor tumorale și răspunsul acestora în prezența diferiților factori.

Radiațiile ultraviolete sunt unul dintre cei mai cunoscuți factori de risc pentru apariția și dezvoltarea bolilor maligne. Sunt recunoscute diferite mecanisme biologice asociate carcinogenezei instrumentate prin radiații ultraviolete, printre care se numără lezarea ADN-ului, inducerea imunosupresiei, acțiunea diferiților virusuri (de exemplu HPV), mutageneza etc. Interacțiunea dintre anumite proteine virale și procesele de reparare a ADN-ului este dăunătoare pentru procesele de reparare a ADN-ului deteriorat în urma expunerii la radiații ultraviolete. Unele cercetări au legat expunerea la radiații ultraviolete de dezvoltarea malignităților orale. Expunerea la radiații UV a fost luată în considerare în funcție de latitudinea la care au fost identificate cazuri, evidențiind faptul că au existat corelații importante între expunerea la radiații UV și incidența bolilor tumorale bucale.

Astfel, evaluarea prin metode in vitro a proprietăților citotoxice ale fitocompușilor, a urmărit obținerea unei perspective in vitro asupra potențialului citotoxic al rutinului asupra celulelor de melanom cu morfologie epitelială și poligonală. Principalele concluzii sunt reproduse în cele ce urmează: au fost analizate viabilitatea și morfologia celulară, aspectul și proprietățile de inducere a senescentei; rezultatele obținute au arătat că fitocompusul rutin prezintă activitate citotoxică dependentă de doză împotriva celulelor tumorale; efectul citotoxic a fost asociat cu o rată scăzută a viabilității celulare, cu semnalizarea modificărilor din punct de vedere al morfologiei celulare, cu evidențierea modificărilor nucleare similare modificărilor apoptotice și cu o confluență redusă; în plus, fitocompusul rutin a crescut senescenta în celulele cu morfologie poligonală la cele mai mari concentrații. Sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma și elucida mecanismele care stau la baza proprietăților anti-proliferative și pro-senescente ale rutinului în celulele tumorale.

Tehnicile actuale sunt de real ajutor în ceea ce privește aprofundarea mecanismelor exercitate și este necesar studiul detaliat al compușilor prezentați în lucrarea de față.

Direcțiile viitoare de cercetare ar trebui să se concentreze pe aprofundarea dezvoltării sistemelor de transport la zi, încărcate cu substanțe de origine naturală, pentru a ajuta la prevenirea bolilor bucale non-tumorale și tumorale. Scopul final al nanoparticulelor încărcate cu biomolecule este de a îmbunătăți prognosticul bolilor orale, de a reduce efectele secundare ale medicamentelor convenționale și de a promova o bună calitate a vieții pacienților.