

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE FARMACIE

Departamentul I

MARCOVICI J. IASMINA



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA UNOR STRUCTURI CA
POTENȚIALE CHIMIOTERAPICE DE GENERAȚIE URMĂTOARE**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. Dr. CRISTINA ADRIANA DEHELEAN

Conducător de doctorat cotutelă (dacă este cazul)

PROF. Dr. ISTVÁN ZUPKÓ

Timișoara

2024

CUPRINS

1. INTRODUCERE.....	3
2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII.....	3
3. REZULTATE.....	4
3.1. PROFILUL DE SIGURANȚĂ AL MEL-NPs.....	4
3.2. EFECTUL ANTITUMORAL AL MEL-NPs ÎN CM.....	6
3.3. PROFILUL DE SIGURANȚĂ AL RUT-O AND RUT-L.....	7
3.4. EFECTUL ANTITUMORAL AL RUT-O ȘI RUT-L ÎN NSCLC...8	
4. CONCLUZII.....	10

REZUMAT

1. INTRODUCERE

Cancerul, definit ca fiind un grup de boli caracterizate prin diviziunea celulară anormală și capacitate crescută de a invada țesuturile învecinate, este una dintre cauzele majore de deces la nivel mondial. Potrivit statisticilor recente, incidența cancerului s-ar putea confrunta cu creșteri fără precedent în viitor, ajungând la peste 20 de milioane de cazuri diagnosticate în 2030.

Melanomul cutanat (CM) este unul dintre cele mai mortale neoplasme, reprezentând majoritatea deceselor (aproximativ 90%) cauzate de cancerul de piele. CM s-a clasat pe locul 15 în categoria celor mai frecvente tipuri de cancer la nivel mondial, prezentând o incidență anuală care crește într-un ritm mai rapid comparativ cu cea a altor neoplasme. În prezent, există o gamă largă de opțiuni terapeutice care ar putea fi aplicate în tratamentul CM, inclusiv intervenție chirurgicală, chimioterapie, radioterapie, imunoterapie și terapie țintită. Cu toate acestea, metodele actuale se confruntă cu două dezavantaje principale care le limitează utilizarea în terapie și anume reacțiile adverse severe și rezistența.

Cancerul pulmonar (LC) este o altă cauză majoră a deceselor cauzate de tumori la nivel mondial, prezentând cea mai mare rată a mortalității în comparație cu alte neoplasme. Carcinomul pulmonar fără celule mici (NSCLC), este responsabil de majoritatea cazurilor de LC (80–85%), fiind împărțit în trei subtipuri histologice — adenocarcinom (40%), carcinom cu celule scuamoase (25–30%), și carcinom cu celule mari (10-15%).

În ciuda progreselor recente în domeniul agenților farmaceutici sintetizați chimic, relevanța terapeutică a compușilor naturali rămâne încă recunoscută în oncologie datorită potențialului lor antitumoral.

2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII

Pornind de la aceste considerente, această teză a fost elaborată pentru a oferi o investigație exhaustivă a unor produse cu structură chimică diversă pentru potențiala aplicare a acestora în tratamentul cancerului. Contribuțiile personale constau în prezentarea siguranței și a profilului terapeutic al structurilor polimerice (MEL-NPs) și lipidice (RUT-O și RUT-L) ca potențiale chimioterapice noi pentru tratamentul CM și, respectiv, NSCLC. Descoperirile originale descrise aici conferă o imagine de ansamblu asupra efectelor lor terapeutice, demonstrând că: (i) MEL-NPs prezintă un puternic efect anti-melanom prin inducerea citotoxicității, declanșarea apoptozei și blocarea migrației celulare prin afectarea tranziției

epitelial-mezenchimale; și (ii) numai RUT-L exercită efecte antineoplazice in vitro împotriva NSCLC provocând o moarte celulară non-apoptotică care este similară cu paraptoza datorită formării vacuolelor, în timp ce proprietățile anticanceroase ale RUT-O sunt absente. Pe lângă aceste observații, studiul contribuie și la cercetări ulterioare privind aplicațiile acestor tipuri de compuși în tratamentul cancerului, subliniind biocompatibilitatea acestora.

3. REZULTATE

3.1. PROFILUL DE SIGURANȚĂ AL MEL-NPs

Citotoxicitatea MEL-NPs la nivelul celulelor sănătoase derivate din piele (HEMA, HaCaT, JB6 Cl 41-5a) a fost evaluată prin evaluarea impactului acestora asupra viabilității celulare după un tratament de 24 de ore. După cum se observă în Figura 1, MEL-NPs au scăzut semnificativ viabilitatea celulelor HEMA, HaCaT și JB6 Cl 41-5a numai la cea mai mare concentrație de 100 $\mu\text{g/mL}$ (la 58,89%, 68,43% și, respectiv, 58,14%). La 10 $\mu\text{g/mL}$, MEL-NP-urile au exercitat un ușor efect stimulator asupra viabilității celulelor, care a crescut la 111,14% (HEMA), 105,74% (HaCaT) și 102,53% (JB6 Cl 41-5a), în timp ce la 25, 50, și 75 $\mu\text{g/mL}$, s-a menținut peste 80% în toate liniile celulare sănătoase.

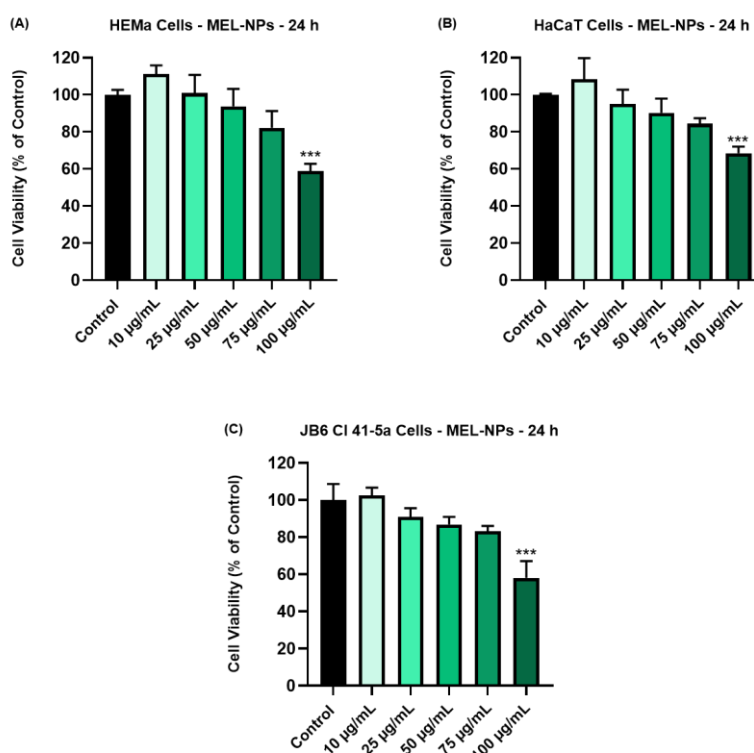


Figura 1. Influența MEL-NPs (10, 25, 50, 75 și 100 $\mu\text{g/mL}$) asupra viabilității celulelor sănătoase (A) HEMA, (B) HaCaT și (C) JB6 Cl 41-5a în urma unui tratament de 24 de ore. Datele au fost normalizate la control (reprezentând celule fără tratament) și exprimate ca medie \pm SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate cu MEL-NPs au fost determinate

folosind analiza ANOVA testul Dunnett (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ versus control).

Potențialul efect iritant la nivel cutanat al MEL-NPs s-a determinat folosind țesuturi reconstruite 3D EpiDerm™ (Figura 2). Un impact semnificativ asupra viabilității țesuturilor (9,69%) EpiDerm a fost obținut doar în cazul SDS 1% utilizat ca și control pozitiv. MEL-NPs (100 $\mu\text{g/mL}$) nu au prezentat potențial iritant in vitro, viabilitatea țesutului tratat fiind de peste 50%. Mai mult, MEL-NPs au exercitat un efect stimulator, crescând viabilitatea țesuturilor EpiDerm™ la 111,44%.

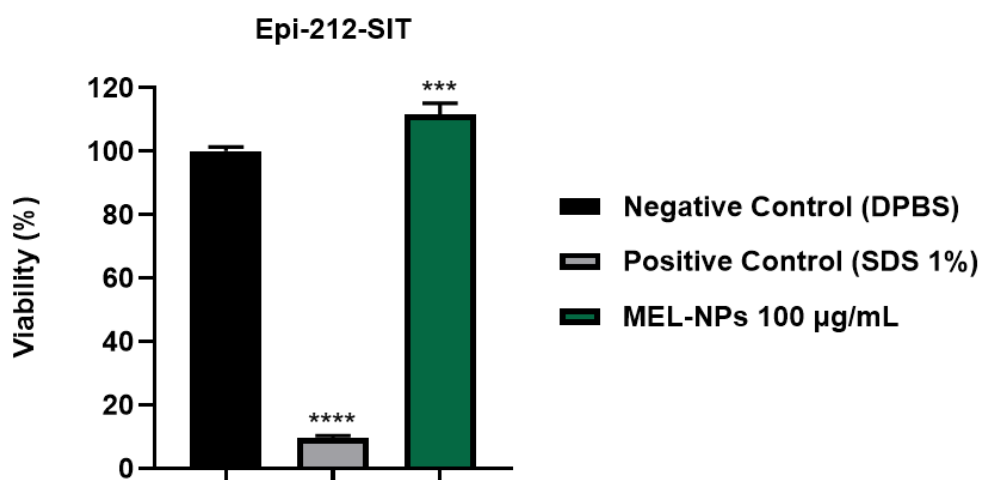


Figura 2. Procentul de viabilitate al țesuturilor EpiDerm (EPI-212-SIT) la 18 ore post-tratament cu MEL-NPs 100 $\mu\text{g/mL}$. Analiza ANOVA și testul Dunett au fost utilizate pentru a determina diferențele statistice dintre țesuturile tratate cu probă și cele tratate cu control negativ ($p < 0,0001$ indicat de **). Controlul pozitiv este reprezentat de SDS 1%, iar controlul negativ este reprezentat de DPBS.**

Potențialul iritant al MEL-NPs 100 $\mu\text{g/mL}$ a fost evaluat in ovo prin aplicarea testului HET-CAM (Figura 3). Apa distilată (H_2O) utilizată ca și control negativ nu a indus nici o modificare asupra structurii vasculare, în timp ce SLS 1% (control pozitiv) a provocat hemoragie, liză și coagulare la scurt timp după aplicarea sa pe CAM. Nu au fost observate tulburări vasculare severe după expunerea CAM la MEL-NPs, cu excepția semnelor ușoare de liză (la 100 $\mu\text{g/mL}$) la sfârșitul tratamentului.

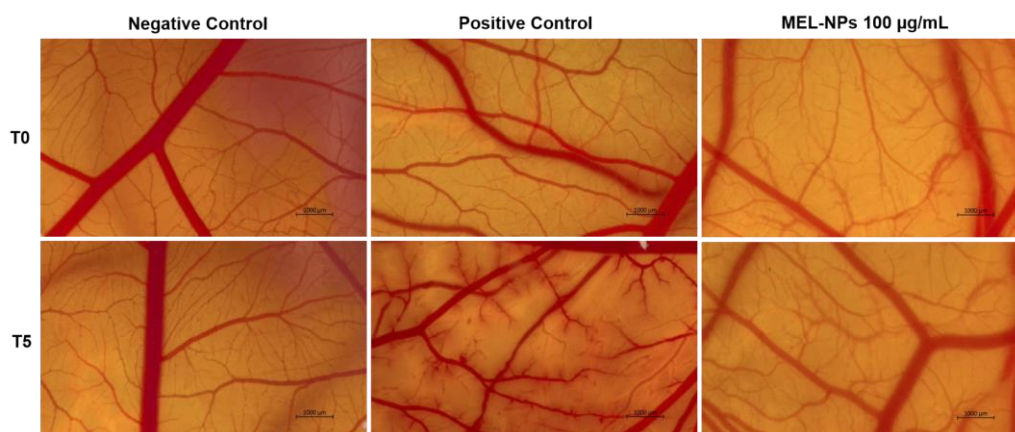


Figura 3. Imagini stereomicroscopice realizate înainte de aplicarea probelor evaluate (control negativ – apă distilată, control pozitiv – lauril sulfat de sodiu și MEL-NPs 100 µg/mL pe membrana corioalantoidiană (T0) și la 5 minute după aplicarea acestora (T5). Scala reprezintă 1000 µm.

Valorile scorului de iritare pentru probele testate este prezentat în Tabelul 1. Cea mai mare valoare IS a fost obținută pentru SLS 1%. În cazul MEL-NPs 100 µg/mL, IS a crescut ușor la 0,49. MEL-NPs au fost clasificate ca non-iritante pe CAM la această concentrație, neavând toxicitate vasculară.

Tabelul 3. Valorile scorului de iritare pentru controlul negativ (H₂O), controlul pozitiv (SLS 1%) și MEL-NPs (100 ug/mL).

Proba	Scor de iritare (IS)	Potențial iritant
Control negativ (H ₂ O)	0.07	Neiritant
Control pozitiv (SLS 1%)	19.88	Iritant puternic
MEL-NPs 100 µg/mL	0.49	Neiritant

3.2. EFECTUL ANTITUMORAL AL MEL-NPs ÎN CM

Tratamentul de 24 de ore al celulelor de CM cu MEL-NPs a provocat o scădere dependentă de concentrație a viabilității celulare, care a atins o semnificație statistică la toate concentrațiile pentru celulele A375 și începând cu concentrația de 25 µg/mL pentru celulele SH-4 și B164A5 (Figura 4). Viabilitatea celulelor SH-4 a fost redusă treptat de MEL-NPs de la 87,27% (la 10 µg/mL) la 73,98% (la 25 µg/mL), 61,12% (la 50 µg/mL), 53,98% (la 75 µg/mL), respectiv 46,81% (la 100 µg/mL). Procentul de celule B164A5 viabile a fost, de asemenea, scăzut de expunerea de 24 de ore la MEL-NPs la 86,95% (la 10 µg/mL), 72,66% (la 25 µg/mL), 67,30% (la 50 µg/mL), 61,23 % (la 75 µg/mL), și 55,24% (la 100 µg/mL).

Viabilitatea celulelor A375 după tratament a fost de 83,86% (la 10 $\mu\text{g/mL}$), 63,82% (la 25 $\mu\text{g/mL}$), 53,72% (la 50 $\mu\text{g/mL}$), 43,95% (la 75 $\mu\text{g/mL}$). $\mu\text{g/mL}$) și 37,41% (la 100 $\mu\text{g/mL}$).

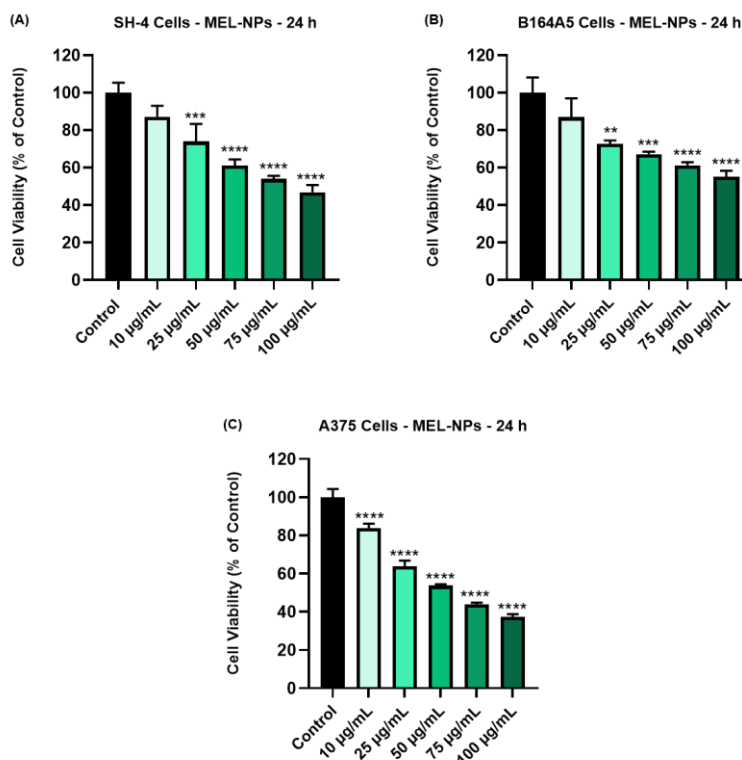


Figura 4. Influența MEL-NPs (10, 25, 50, 75 și 100 $\mu\text{g/mL}$) asupra viabilității celulelor de melanom cutanat (A) SH-4 și (B) B154A5 și (C) A375 după un tratament de 24 de ore. Datele au fost normalizate la control (reprezentând celule fără tratament) și exprimate ca medie \pm SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate cu MEL-NPs au fost determinate folosind analiza ANOVA testul Dunnett ($p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ versus control).**

3.3. PROFILUL DE SIGURANȚĂ AL RUT-O AND RUT-L

Pentru a investiga potențiala citotoxicitate a RUT-O și RUT-L la nivel pulmonar, a fost evaluat impactul lor (la concentrații cuprinse între 25 și 125 μM) asupra viabilității țesuturilor umane 3D EpiAirway™ după un tratament de 24 de ore. Rezultatele obținute, reprezentate grafic în Figura 5, indică faptul că acești compuși nu au cauzat nici o afectare semnificativă a viabilității țesuturilor EpiAirway™. La cele mai mici concentrații (25 și 50 μM), ambii derivați au crescut ușor procente de viabilitate care au atins valori peste 100%. La 100 μM , viabilitatea inserțiilor a rămas similară cu cea de control atât pentru RUT-O, cât și pentru RUT-L, în timp ce la 125 μM , compușii au redus viabilitatea la 98% și 94%.

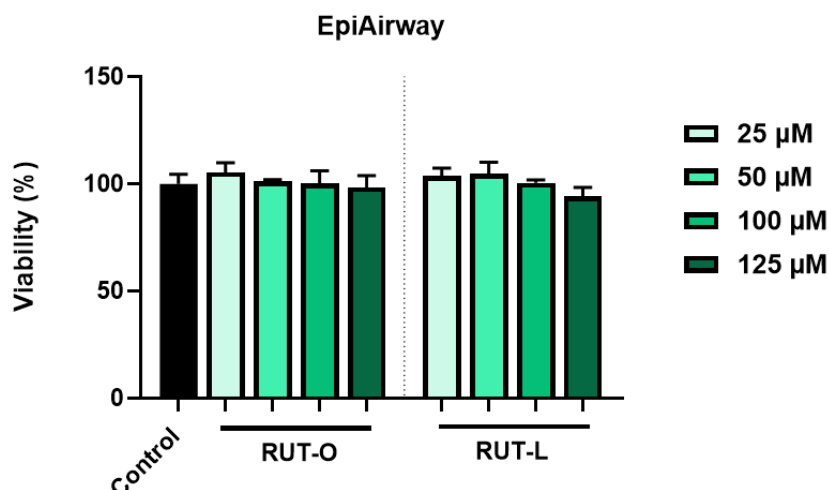


Figura 5. Viabilitatea țesuturilor umane EpiAirway™ 3D după 24 de ore de expunere la oleat de rutin (RUT-O) și linoleat de rutin (RUT-L) 25, 50, 100 și 125 μ M. Rezultatele au fost prezentate ca procente de viabilitate (%) normalizate la control (celule netratate) și exprimate ca medii \pm deviație standard a trei experimente efectuate în triplicat. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate au fost analizate utilizând testele ANOVA și Dunnett.

3.4. EFECTUL ANTITUMORAL AL RUT-O ȘI RUT-L ÎN NSCLC

Potențialul impact al RUT-O și RUT-L (25, 50, 100 și 125 μ M) asupra viabilității celulelor NCI-H23 a fost explorat la sfârșitul unui tratament de 24 de ore. Conform Figurii 6, s-a obținut o distincție clară între profilurile citotoxice ale RUT-O și RUT-L la acest interval de stimulare, procente de viabilitate celulară variind în funcție de compusul testat și concentrație. Astfel, RUT-O nu a exercitat activitate antitumorală asupra acestei linii celulare de NSCLC, ci dimpotrivă, s-a observat un efect stimulator la toate concentrațiile, cu valorile de viabilitate între 117% (la concentrația cea mai mică – 25 μ M) și 113 % (la concentrația cea mai mare – 125 μ M). RUT-L, pe de altă parte, a indus o reducere dependentă de concentrație a viabilității celulelor NCI-H23, cele mai scăzute și semnificative valori fiind obținute la cele mai mari concentrații testate (100 μ M – 63% și 125 μ M – 47%).

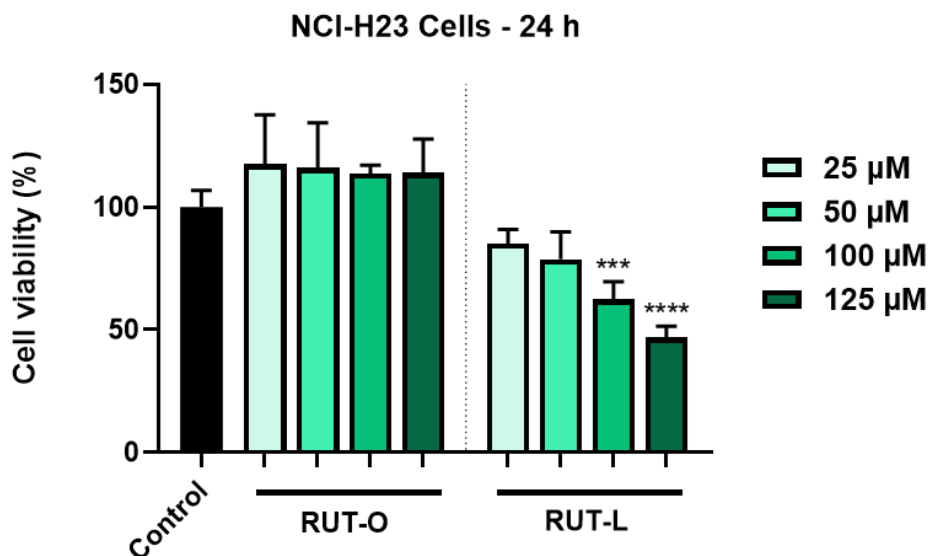


Figura 6. Reprezentarea grafică a procentului de celule NCI-H23 viabile după un tratament de 24 de ore cu oleat de rutin (RUT-O) și linoleat de rutin (RUT-L) la 25, 50, 100 și 125 μM . Rezultatele au fost prezentate ca procente de viabilitate (%) normalizate la control (celule netratate) și exprimate ca medii \pm deviație standard a trei experimente efectuate în triplicat. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate au fost analizate utilizând testele ANOVA și Dunnett (*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Pentru a evalua dacă morfologia celulelor NCI-H23 suferă modificări în urma tratamentului cu RUT-O și RUT-L, a fost efectuată o evaluare microscopică (Figura 7). RUT-O nu a cauzat modificări semnificative în morfologia celulelor NCI-H23 în comparație cu controlul, la concentrațiile testate. RUT-L a declanșat o scădere dependentă de doză a confluentei celulare pornind de la concentrația de 25 μM , care a fost mai proeminentă la 100 și 125 μM și însoțită de mai multe semne citotoxice (micșorarea celulelor, rotunjirea și detașarea de placă). O modificare interesantă a aspectului celulelor a fost observată după tratamentul lor de 24 de ore cu RUT-L la concentrații mari (100 și 125 μM), și anume vacuolarea citoplasmatică (indicată prin săgeți albe), evidențiată prin formarea a numeroase vezicule neregulate în citoplasmă care acopereau întreg spațiul perinuclear. La cea mai mare concentrație testată (125 μM), vacuolarea citoplasmatică a fost, de asemenea, asociată cu contracția masivă a celulelor.

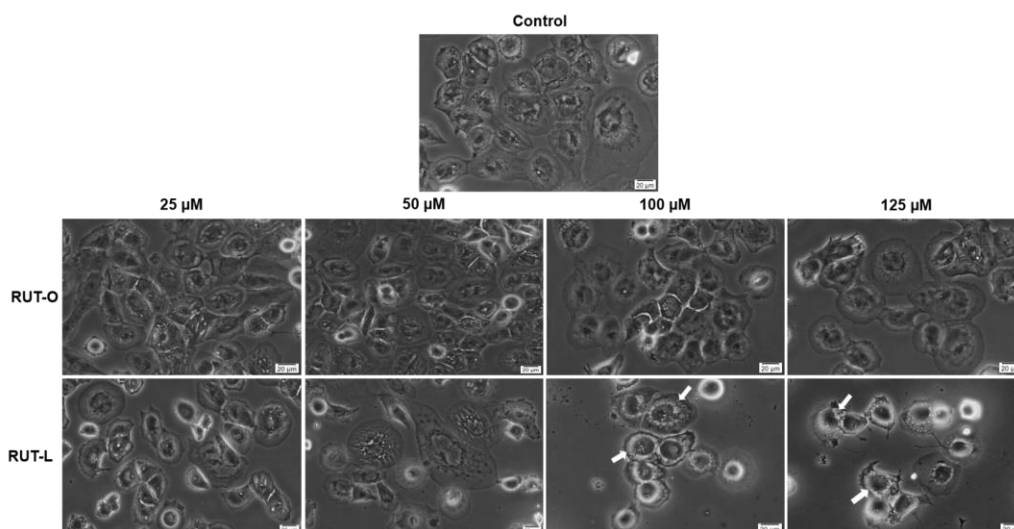


Figura 7. Imagini reprezentative care ilustrează morfologia și confluența celulelor NCI-H23 post-tratament cu oleat de rutin (RUT-O) și linoleat de rutin (RUT-L) la 25, 50, 100 și 125 μM pentru un interval de 24 de ore. Săgețile albe indică celulele care prezintă vacuolare citoplasmatică. Scala indică 20 μm .

4. CONCLUZII

Aceste rezultate arată că MEL-NPs au un efect citotoxic selectiv asupra celulelor de CM, prezentând în același timp o citocompatibilitate adecvată, dar dependentă de concentrație, în celulele cutanate sănătoase. De asemenea, MEL-NPs sunt lipsite de efect iritant la nivelul țesuturilor EpiDerm™ 3D. Aceste observații descriu atât lipsa de toxicitate asupra țesuturilor 3D EpiAirway™ a RUT-O și RUT-L, precum și implicarea potențială a RUT-L în căile de moarte celulară non-apoptotică, cum ar fi paraptoza.