

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL II**

ZAKZAK A. KHALED



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII EXPERIMENTALE PRIVIND
PROFILUL FARMACO-TOXICOLOGIC AL UNOR
FORMULĂRI TOPICE CARE CONȚIN COMPUȘI
ORGANOFOSFORICI**

Coordonator Științific
PROF. UNIV. DR. LAVINIA LIA VLAIA

Timișoara
2024

CUPRINS

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCERE | 1 |
| 2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | 2 |
| 3. SCOP ȘI OBIECTIVE | 8 |
| 4. CONTRIBUȚII PERSONALE | 10 |
| 4.1. IMPACTUL BIOLOGIC AL UNOR DERIVAȚI AI ACIDULUI FOSFONIC ȘI FOSFINIC ASUPRA OSTEOSARCOMULUI UMAN | 10 |
| 4.2. STUDIUL IN VITRO AL FORMULĂRILOR TOPICE DE CAFEINĂ ȘI FOSFAT DE ASCORBIL MAGNEZIU - PREPARARE, CARACTERIZARE FIZICO-CHIMICĂ ȘI EVALUARE FARMACO-TOXICOLOGICĂ | 12 |
| 4.3. PROFILUL DE BIOSECURITATE AL FORMULĂRILOR DE HIDROGEL PE BAZĂ DE CARBOMER CARE ÎNCORPOREAZĂ DERIVAȚI AI FOSFORULUI | 13 |

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Compușii organofosforici reprezintă o clasă diversă de substanțe chimice cu o gamă largă de aplicații în medicină, toxicologie, monitorizarea mediului și securitate. Proprietățile lor unice îi fac valoroși în diverse scopuri, de la inhibarea enzimelor în terapeutică la ignifugarea în mediul industrial. Continuarea cercetărilor privind sinteza, proprietățile și aplicațiile compușilor organofosforici este esențială pentru valorificarea beneficiilor lor potențiale și, în același timp, pentru reducerea riscurilor. De la rolul lor în incidentele de otrăvire la potențialul lor ca agenți neuroprotectori și intermediari catalitici, acești compuși rămân în prim-planul cercetării în diverse discipline științifice. Sinteza de noi agenți terapeutici și dezvoltarea de abordări sintetice durabile subliniază și mai mult importanța compușilor organofosforici în progresul științei și tehnologiei. Chimia compușilor organofosforici deține un potențial imens în domeniul medical, oferind numeroase oportunități pentru descoperirea de medicamente, dezvoltarea de materiale și aplicații catalitice.

Toxicitatea derivaților fosforici este încă un subiect de preocupare. Numeroase studii discută utilizarea raportului acut/cronic pentru a estima toxicitatea cronică din date acute, oferind o abordare cantitativă pentru a înțelege relația dintre toxicitatea acută și cronică a acestor compuși. În ciuda toxicității lor, în medicină, compușii organofosforici sunt studiați pe scară largă pentru a dezvolta bio-captatori care să protejeze împotriva toxicității organofosforice. Acești compuși joacă un rol crucial ca inhibitori ai unor enzime precum acetilcolinesterază (AChE), butirilcolinesterază (BChE), carboxilesterază (CaE) și neuropatia periferică. Aceste enzime joacă roluri vitale în neurotransmisie, iar inhibarea lor poate conduce la implicații terapeutice. Prin țintirea acestor enzime, compușii organofosforici pot modula nivelurile neurotransmițătorilor și căile de semnalizare, ceea ce îi face potențiali candidați pentru tratamentul diferitelor afecțiuni.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Compușii organofosforici sunt o clasă de substanțe chimice care se caracterizează prin prezența atomilor de fosfor legați de grupări organice, ceea ce conduce la o gamă largă de aplicații și efecte. Acești compuși se caracterizează prin molecule organice legate direct de fosfor sau prin heteroatomi precum sulf, oxigen sau azot. Datorită fracțiunilor lor organice care pot fi legate direct de fosfor sau prin heteroatomi precum sulf, oxigen sau azot, compușii organofosforici sunt prezenți pe scară largă în produsele farmaceutice, agrochimice și diverse produse industriale. Printre grupările organice se menționează grupările alcoxi, alchiltio, ariloxi, ariltio sau heterociclice, împreună cu o serie de alți substituenți. Clasificarea compușilor organofosforici este esențială pentru înțelegerea proprietăților, reactivității și impactului lor potențial asupra sănătății și mediului. O clasificare semnificativă a compușilor organofosforici se bazează pe utilizarea lor ca pesticide, în care compuși precum clorpirifos sunt clasificați ca fiind moderat periculoși.

Clasificarea compușilor organofosforici se extinde dincolo de pesticide și agenți neurotoxici pentru a include substanțe ignifuge și compuși polifosforici. Diferitele clase de compuși organofosforici prezintă proprietăți și aplicații distincte, necesitând o clasificare precisă în scopuri de reglementare și siguranță. În contextul agenților neurotoxici, compușii organofosforici precum Sarin, Soman și VX sunt clasificați ca agenți de război chimic datorită capacității lor de a perturba reglarea neurologică prin inhibarea ireversibilă a acetilcolinesterazei.

Acidul fenilfosfonic (PPA) și acidul fenilfosfinic (PPIA) au fost studiați pentru solubilitatea lor în diferiți solvenți, rolul lor întârzierea flăcării și capacitatea lor de a forma complecși cu alte molecule. Proprietățile lor de solubilitate pot influența interacțiunile lor cu alte substanțe și adecvarea lor pentru aplicații specifice. Solubilitatea acestor compuși este crucială pentru proiectarea sistemelor de administrare a medicamentelor sau pentru formularea implanturilor medicale, unde compatibilitatea cu diferiți solvenți este esențială. În plus, capacitatea acestor acizi de a forma complexe cu alte molecule evidențiază potențialul lor de a crea materiale noi cu proprietăți personalizate.

Acidul fosfonoacetic, cunoscut și sub denumirea de PAA, are o structură chimică unică, cu gruparea 4-hidroxi-2,3-dioxociclobut-1-enil încorporată, și a atras interesul chimiei medicinale pentru potențialele sale aplicații terapeutice. Această caracteristică structurală a fost explorată pentru proiectarea și dezvoltarea medicamentelor, demonstrând versatilitatea acestora, precum și a derivaților săi.

Acidul carboxietilfenilfosfinic, cunoscut și ca CEPPA, este un derivat al acidului fosfinic care a atras atenția pentru potențialele sale aplicații în domeniul medical, fiind un monomer fosforic copolimerizabil bifuncțional. Sinteza și solubilitatea CEPPA în apă au fost investigate, oferind informații valoroase privind comportamentul său chimic și elucidând caracteristicile fizico-chimice ale acestui compus.

Sinteza și caracterizarea compușilor organofosforici au condus la dezvoltarea de noi agenți farmaceutici cu diverse activități biologice. De exemplu, alchilfosfonații, care conțin legături triple reactive și grupări fosforil, servesc ca intermediari importanți care pot fi transformați în diverși derivați organofosforici, care prezintă adesea activități biologice sau farmacologice semnificative. Sinteza acestor compuși a fost un subiect de interes semnificativ pentru cercetare, ceea ce a condus la dezvoltarea diferitelor metode de obținere eficientă a acestora. O abordare implică utilizarea compușilor naturali ca materii prime pentru sinteza compușilor organofosforici chirali, care sunt esențiali în procesele farmaceutice și biochimice. Utilizarea reacțiilor catalizate de metale de tranziție a permis sinteza eficientă a compușilor organofosforici, demonstrând versatilitatea acestor compuși în diverse transformări chimice. Dezvoltarea metodelor de sinteză asimetrică a fost, de asemenea, o prioritate, cu scopul de a produce compuși chirali care sunt valoroși în cataliza asimetrică și în produsele farmaceutice. Proiectarea și sinteza liganzilor organofosforici chirali au fost cruciale în cataliza asimetrică, oferind căi eficiente de obținere a produselor enantioselective. În plus, sinteza stereoselectivă a compușilor organofosforici a reprezentat un domeniu semnificativ de cercetare, având ca scop controlul stereochemiei acestor compuși pentru aplicații specifice. Dezvoltarea de metode de sinteză ecologice pentru compușii organofosforici subliniază importanța practicilor durabile în sinteza chimică.

Toxicologia compușilor organofosforici a fost intens studiată datorită utilizării lor ca pesticide și agenți de război chimic. Înțelegerea efectelor toxice

ale acestor compuși este esențială pentru dezvoltarea de antidoturi și tratamente privind otrăvirea cu compuși organofosforici. În contextul războiului chimic și al terorismului, compușii organofosforici au fost identificați ca agenți potențiali pentru bioterorism. Acești compuși, în special agenții neurotoxici, își exercită efectele toxice prin inhibarea AChE, ducând la o cascadă de modificări fiziologice care pot duce în cele din urmă la deces prin insuficiență respiratorie. Inhibarea acetilcolinesterazei conduce la o serie de efecte toxice asupra sistemului nervos, cu implicații atât pentru cazurile acute de otrăvire, cât și pentru rezultatele pe termen lung asupra sănătății. Gravitatea otrăvirii cu compuși organofosforici poate fi evaluată prin diferiți markeri, inclusiv nivelurile serice de creatinfosfokinază, corelate cu gravitatea cazurilor de otrăvire acută. În plus, scara de comă Glasgow, scara de severitate a otrăvirii și scorul de otrăvire cu compuși organofosforici Peradeniya au fost evaluate pentru eficacitatea lor în prezicerea unor rezultate precum insuficiența respiratorie acută în urma otrăvirii cu acești compuși. Impactul compușilor organofosforici asupra mediului nu poate fi trecut cu vederea. Acești compuși, utilizați în mod obișnuit ca pesticide, pun în pericol ecosistemele și sănătatea umană datorită toxicității și persistenței lor în mediu.

În domeniul medical și terapeutic, compușii organofosforici au fost studiați pe scară largă pentru diferitele lor proprietăți și potențiale utilizări. În incidentele de otrăvire, compușii organofosforici sunt recunoscuți ca antidoturi actuale, inclusiv pretratamentul cu carbamați și terapia post-expunere cu medicamente anticolinergice și oximă pentru a contracara efectele excesului de acetilcolină. Acești compuși interacționează cu acetilcolinesteraza, afectând neurotransmisia și provocând efecte toxice. În plus, compușii organofosforici au potențial ca agenți neuroprotectori împotriva toxicității agenților neurotoxici, vizând stresul oxidativ pentru a reduce neuroinflamarea și neurodegenerarea. Terapia cu medicamente antioxidante a fost explorată ca o contramăsură împotriva toxicității agenților neurotoxici, cu scopul de a atenua stresul oxidativ, neuroinflamarea și neurodegenerarea. Terapia antioxidantă pentru atenuarea efectelor adverse subliniază importanța dezvoltării intervențiilor medicale neuroprotectoare împotriva neurotoxicității induse de compușii organofosforici.

În farmacie, derivații de fosfor sunt cruciali pentru îngrijirea pacienților și gestionarea medicației, pentru persoanele cu boală renală cronică (CKD), unde lianții de fosfor s-au dovedit a îmbunătăți ratele de supraviețuire și

controlul metabolismului mineral. În plus, punerea în aplicare a metodelor de predare bazate pe simulare în învățământul farmaceutic poate îmbunătăți formarea farmacistului, pregătindu-l pentru un rol clinic mai centrat pe pacient. Acizii fenilfosfonici și fenilfosfinici au fost utilizați în sinteza compușilor farmaceutici și în modificarea suprafețelor pentru acoperirea/fabricarea dispozitivelor medicale.

Derivații fosforici au aplicații în medicina regenerativă și în sistemele de administrare a medicamentelor. Polimerii care conțin fosfor sunt considerați materiale promițătoare pentru aplicații biomedicale datorită biocompatibilității, hemocompatibilității și rezistenței lor la adsorbția proteinelor. Aceste materiale au fost explorate pentru ingineria țesuturilor, acționând ca suporturi pentru creșterea și regenerarea celulelor. În plus, derivații fosforului sunt în curs de cercetare pentru dezvoltarea de sisteme de administrare a medicamentelor care vizează anumite zone ale corpului, sporind eficacitatea și siguranța tratamentelor farmaceutice.

Acizii fosfonici au fost utilizați în proiectarea medicamentelor și ca pro-droguri. Aceștia au fost, de asemenea, utilizați ca medicamente țintă pentru oase, fiind esențiali în tratamentele legate de bolile și afecțiunile osoase. În imagistica medicală, proprietățile lor chimice unice permit dezvoltarea de agenți de contrast pentru diverse modalități de imagistică. În plus, acestea au fost studiate ca fosfantigeni, care pot modula răspunsurile imune și au implicații în imunoterapie și dezvoltarea vaccinurilor.

În chimia medicinală, s-a constatat că acizii fosfonici și fosfinici prezintă un spectru larg de activități biologice, cu derivați precum acizii α -hidroxifosfonici ca inhibitori ai unor enzime esențiale precum renina și proteazele și polimerazele imunodeficienței umane.

Acizii fosfonici și derivații lor sunt preferați în chimia medicamentelor datorită rezistenței lor sporite la hidroliza enzimatică în comparație cu carboxilații și fosfații, ceea ce îi face valoroși în proiectarea medicamentelor. Acești compuși au fost utilizați ca antibiotice, agenți antivirali și inhibitori enzimatici. α -amino-fosfonații au fost investigați pentru activitatea lor anticancerigenă, indicând potențialul terapeutic divers al derivaților acidului fosfonic. Acești compuși au fost recunoscuți pentru capacitatea lor de a acționa ca inhibitori analogi de stare de tranziție ai enzimelor, consolidând în continuare rolul lor în descoperirea și dezvoltarea medicamentelor.

Acidul fosfonoacetic (PAA) a fost intens studiat pentru proprietățile sale antivirale, în special în inhibarea replicării diferitelor virusuri, inclusiv virusul herpes simplex (HSV), citomegalovirusul, virusul varicelo-zosterian și altele. PAA este cunoscut pentru capacitatea sa de a inhiba activitatea ADN polimerazei indusă de virus, împiedicând astfel sinteza ADN-ului viral. Acest mecanism de acțiune poziționează PAA ca un candidat promițător pentru terapia antivirală, în special în contextul infecțiilor cu herpesvirusuri. În plus, PAA a fost eficient în tratarea infecțiilor cutanate cu herpesvirus pe modele animale, sugerând potențialul său de aplicare locală în gestionarea bolilor virale ale pielii.

Impactul biologic al CEPPA, în special în contextul potențialului anti-neoplasic, a fost în ultima vreme un subiect de cercetare. S-a constatat că acest derivat al acidului fosfinic prezintă efecte promițătoare asupra celulelor osteosarcomului uman. Prin utilizarea diferitelor tehnici, cum ar fi testul MTT, evaluarea morfologiei celulare, testul LDH, colorarea Hoechst și RT-PCR pe culturi de celule umane, a fost evidențiat profilul farmacologic al CEPPA și rolul său potențial în combaterea osteosarcomului.

Sinteza unor noi formulări terapeutice care conțin compuși organofosforici și dezvoltarea unor abordări sintetice durabile subliniază în continuare importanța acestor compuși în progresul științei și tehnologiei. În plus, sinteza de noi sisteme pe bază de fosfor a fost investigată pentru a valorifica beneficiile heterociclorilor fosforice pentru diverse aplicații. Aceste structuri noi oferă proprietăți unice care ar putea fi exploatate în proiectarea de materiale avansate și produse farmaceutice, extinzând și mai mult domeniul de aplicare al derivaților fosforici în domeniul medical. Continuarea cercetărilor privind sinteza, proprietățile și aplicațiile compușilor organofosforici este esențială pentru valorificarea beneficiilor lor potențiale, reducând în același timp riscurile.

Dezvoltarea de noi produse biofarmaceutice eficiente și sigure este un proces îndelungat care începe cu identificarea substanței active terapeutice (chimică sau naturală) și se încheie atunci când produsul este aprobat și comercializat. Determinarea siguranței și eficacității unui produs biofarmaceutic experimental este o condiție obligatorie în cadrul dezvoltării preclinice pentru a stabili fezabilitatea acestuia pentru utilizare medicală. În prezent, cercetarea toxicologică este obligatorie în evaluarea biologică a potențialelor

medicamente, produse biofarmaceutice și dispozitive medicale. Motivul este că posibilele efecte adverse ale compusului testat pot fi identificate și prevenite prin experimente in vitro și teste de toxicitate in vivo. În ceea ce privește screeningul in vivo, studiile de toxicologie preclinică se referă atât la testarea siguranței acestuia, cât și la identificarea naturii și severității potențialelor efecte nocive ale compușilor farmacologic activi, care sunt semnalate pe organismul unui model experimental.

Hidrogelurile sunt rețele polimerice tridimensionale (3D) care au fost studiate pe scară largă în special datorită proprietăților lor fizico-chimice reglabile, biocompatibilității, structurii semisolide și capacității lor de a încapsula diverși compuși, medicamente, materiale, celule etc. Carbomerul, un polimer sintetic de acid poliacrilic reticulat, este utilizat pe scară largă pentru versatilitatea și eficacitatea sa ca agent gelifiant în diverse aplicații, în special în produsele farmaceutice, cosmetice și alimentare. Ca agent gelifiant, oferă numeroase avantaje, cum ar fi capacitatea de a crea geluri cu vâscozitate ridicată la concentrații relativ scăzute, proprietăți bioadezive, stabilitate termică, potențial scăzut de iritare a pielii, proprietăți organoleptice și compatibilitate cu o gamă largă de ingrediente active, făcându-l prima alegere pentru dezvoltarea diferitelor formulări. Vâscozitatea ridicată a hidrogelurilor pe bază de carbomer contribuie, de asemenea, la retenția prelungită a medicamentului, îmbunătățind biodisponibilitatea medicamentelor, în special în aplicațiile oculare.

Deoarece derivații organofosforici prezintă o multitudine de aplicații în biochimie și biologie, inclusiv în medicină, pentru a obține structuri polimerice caracterizate prin dimensiuni diferite, acizii fenilfosfinici au fost utilizați pentru a obține materiale hibride complexe (organice/inorganice). S-a constatat că substituenții fosforici modulează funcții biologice esențiale, alterările moleculare afectând semnificativ activitatea biologică. În plus, s-a demonstrat că prezența substituenților fosforici modulează activitățile biologice ale pesticidelor, agenților antivirali și compușilor antimicrobieni, subliniind rolul crucial al derivaților fosforici în cercetarea farmaceutică.

3. SCOP ȘI OBIECTIVE

Scopul acestei teze de doctorat a fost sinteza, caracterizarea și evaluarea biologică a unui compus chimic aparținând clasei derivaților fosforici, precum și a două formulări farmaceutice bazate pe două tipuri de hidrogeluri, conținând adjuvanți naturali și compusul chimic sintetizat, care, pe lângă toxicitatea sa bine cunoscută, pare să aibă efecte terapeutice cu impact asupra unei linii celulare tumorale.

Noutatea acestei teze de doctorat contează pe faptul că prezenta cercetare aduce o contribuție importantă în direcția derivaților fosforici și a potențialelor lor aplicații biomedicale, prin rezultatele obținute și discutate. O prezentare detaliată este oferită cu privire la:

- a) sinteza și caracterizarea unui compus nou sintetizat (acidul 2-carboxietilfenilfosfinic), care face parte dintr-o clasă de derivați ai fosforului, și impactul său biologic, comparativ cu cel biologic al altor trei derivați ai fosforului care au fost comercializați. Impactul biologic in vitro a fost evaluat pe două linii celulare umane, o linie sănătoasă - keratinocite imortalizate (culturi HaCaT) și o linie tumorală - celule de osteosarcom (SAOS-2).
- b) sinteza și caracterizarea unor formulări farmaceutice pe bază de poloxamer (hidrogel), conținând adjuvanți naturali, în vederea investigării profilului lor de siguranță in vitro și de vindecare a rănilor. Prin această cercetare, s-a urmărit să se observe dacă formulările farmaceutice care conțin adjuvanți naturali sunt biocompatibile și adecvate pentru a încorpora medicamente care doresc să fie testate in vitro și in vivo. Impactul biologic in vitro a fost evaluat pe două linii celulare sănătoase, linia HaCaT, și cealaltă linie murinică - celulele epidermice de șoarece JB6 Cl 41-5a.
- c) procesul de fabricație a patru formulări de tip hidrogel, pe bază de carbomer, care conțin cafeină și doi derivați ai fosforului (acizii fenilfosfinic și 2-carboxietilfenilfosfinic), caracterizarea acestora și evaluarea toxicologică complexă in vitro, in vivo și in ovo. Profilul de biosecuritate a fost completat prin testarea in vivo utilizând un model animal, iar testarea in ovo a fost efectuată utilizând membrana corioalantoică a unui ou embrionat de găină.

În ceea ce privește **noutatea și originalitatea acestei teze de doctorat**, a fost evaluat un screening toxicologic complex in vitro, in vivo și in ovo privind efectul terapeutic al unor derivați organofosforici, dintre care unul sintetizat de grupul nostru de cercetare, precum și efectele de biocompatibilitate și siguranță a două noi formulări terapeutice care conțin compuși organofosforici, printre care, unul fiind compusul nou sintetizat.

Screeningul toxicologic complex a fost realizat după o caracterizare completă și înțelegătoare atât a compusului organofosforic sintetizat, cât și a formulărilor terapeutice obținute, conținând compușii derivați ai fosforului. Prin urmare, această teză a fost menită să elimine orice disonanță referitoare la presupusa toxicitate a derivaților fosforici (în special a acidului 2-carboxietilfenilfosfinic), precum și la polimerii utilizați și la adjuvanții naturali. Figura 1. sintetizează întreaga teză de doctorat, sub formă schematică.

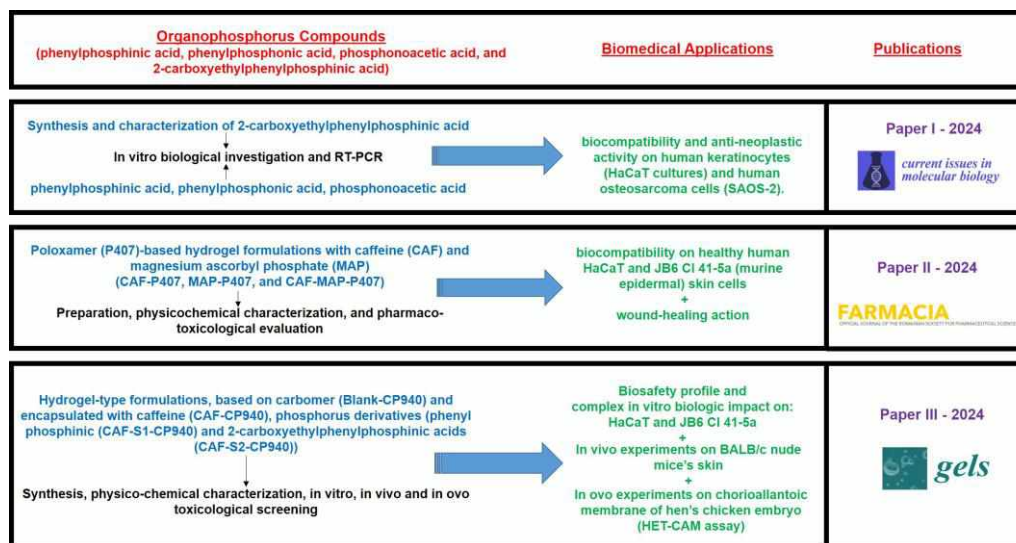


Figura 1. Schița întregii teze de doctorat, domeniul de aplicare și lucrările publicate.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. IMPACTUL BIOLOGIC AL UNOR DERIVAȚI AI ACIDULUI FOSFONIC ȘI FOSFINIC ASUPRA OSTEOSARCOMULUI UMAN

Osteosarcomul malign reprezintă în prezent o problemă majoră de sănătate; prin urmare, nevoia de noi abordări terapeutice este de mare interes. În acest sens, studiul de față își propune să evalueze potențialul anti-neoplastic al unui derivat al acidului fosfinic recent dezvoltat (acid 2-carboxietilfenilfosfinic) și, ulterior, să contureze profilul său farmacotoxicologic prin utilizarea a două culturi diferite de celule umane in vitro (keratinocite-HaCaT și celule osteosarcom SAOS-2), utilizând tehnici diferite (testul MTT, evaluarea morfologiei celulare, testul LDH, colorarea Hoechst și RT-PCR). În plus, rezultatele obținute sunt comparate cu trei compuși cu conținut de fosfor disponibili în comerț (P1, P2, P3). Cele două clase de derivați ai fosforului cuprind acizii fenilfosfonic și fenilfosfinic, acidul fosfonoacetic și acidul 2-carboxietilfenilfosfinic, utilizați ca reactivi sau intermediari datorită multitudinii lor de aplicații. Structurile chimice ale acestor compuși sunt prezentate în Figura 2.

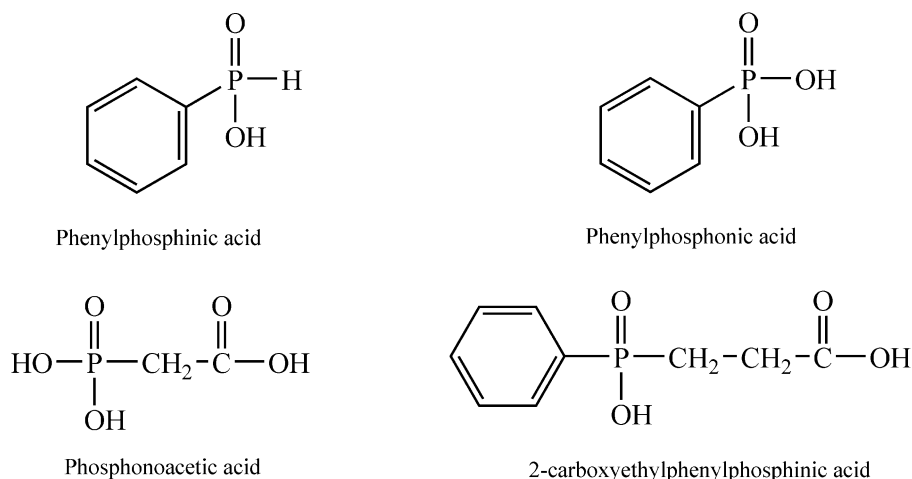


Figura 2. Structurile chimice ale probelor care conțin fosfor: acid fenilfosfinic, acid fenilfosfonic, acid fosfonoacetic și acid 2-carboxietilfenilfosfinic.

Rezultatele înregistrate pentru compusul nou dezvoltat (P4) au arătat o biocompatibilitate bună (viabilitate celulară de 77%) atunci când concentrații de până la 5 mM au fost utilizate pe celule HaCaT timp de 24 h. De asemenea, culturile HaCaT nu au prezentat modificări morfologice semnificative sau modulație genică, obținând astfel un profil de biosecuritate chiar superior unora dintre produsele comerciale testate. În plus, în ceea ce privește activitatea antiosteosarcomă, acidul 2-carboxietilfenilfosfinic a exprimat o activitate promițătoare pe monocelulele SAOS-2, celulele prezentând o viabilitate de numai 55%, precum și caracteristici de apoptoză și o modulație importantă a expresiei genelor, în special scăderea Bid.

În concluzie, profilul biologic al compusului nostru recent dezvoltat (acid 2-carboxietilfenilfosfinic) a indicat un profil bun de biosecuritate atunci când celulele HaCaT au fost expuse timp de 24 h la o concentrație maximă de 5 mM. De asemenea, proba a determinat o activitate anti-osteosarcomă promițătoare în cadrul aceluiași parametri in vitro (utilizând cea mai mare concentrație de 5 mM pentru 24 h timp de expunere). În plus, amalgamarea analizelor de expresie genică cu evaluările fenotipice, cuprinzând viabilitatea celulară, citotoxicitatea și modificările morfologice, oferă o evaluare multifacțată a impactului biologic al compușilor P1, P2, P3 și P4. În special, acidul 2-carboxietilfenilfosfinic (P4) demonstrează un profil convingător, caracterizat prin proprietăți anti-neoplastice pronunțate în linia celulară de osteosarcom SAOS-2, împreună cu un impact relativ benign asupra liniei celulare HaCaT. Aceste constatări, care indică un indice terapeutic favorabil, poziționează P4 ca un candidat de interes semnificativ pentru investigații suplimentare în contextul terapiei oncologice. Datele subliniază necesitatea de a utiliza o abordare dublă în evaluările preclinice, care să cuprindă atât modele de celule sănătoase, cât și modele de celule bolnave, pentru a evalua în mod holistic viabilitatea terapeutică a noilor compuși. Viitoarele eforturi de cercetare ar trebui îndreptate spre elucidarea fundamentelor mecaniciste ale interacțiunilor celulare ale P4, cu accent pe efectele pe termen lung și pe potențiala translatabilitate clinică.

4.2. STUDIUL IN VITRO AL FORMULĂRILOR TOPICE DE CAFEINĂ ȘI FOSFAT DE ASCORBIL MAGNEZIU - PREPARARE, CARACTERIZARE FIZICO-CHIMICĂ ȘI EVALUARE FARMACOTOXICOLOGICĂ

Pielea are un rol considerabil de protecție împotriva factorilor externi nocivi, astfel încât integritatea structurii sale este esențială. Cofeina și fosfatul de ascorbil magneziu sunt substanțe valoroase în tratamentul leziunilor cutanate. Prin urmare, scopul prezentei cercetări a fost prepararea, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea farmaco-toxicologică a formulărilor de hidrogel pe bază de poloxamer cu cafeină și ascorbil fosfat de magneziu (CAF-P407, MAP-P407 și CAF-MAP-P407) pentru aplicarea topică în tratamentul leziunilor cutanate.

Din punct de vedere fizico-chimic și reologic, toate formulările experimentale au prezentat proprietăți adecvate ca sisteme de gel in situ destinate aplicării cutanate. In vitro, CAF-P407, MAP-P407 și CAF-MAP-P407 au prezentat biocompatibilitate pe celulele pielii umane sănătoase HaCaT și JB6 Cl 41-5a. În plus, hidrogelurile au arătat o acțiune de vindecare a rănilor prin stimularea migrației celulelor pielii. În concluzie, formulările de hidrogel pot fi optime pentru administrarea topică a cafeinei și a derivaților acidului ascorbic în patologii cutanate.

Datorită numeroaselor beneficii ale cafeinei și ale ascorbilfosfatului de magneziu, au fost formulate și caracterizate din punct de vedere fizico-chimic hidrogeluri care conțin aceste substanțe ca ingrediente active. Prin urmare, au fost dezvoltate cu succes trei formulări pe bază de poloxameri care conțin ca ingrediente active cafeină (2,5%) și ascorbilfosfat de magneziu (1,5%), ca atare sau în combinație.

Din punct de vedere fizico-chimic și reologic, toate formulările experimentale au prezentat caracteristici adecvate ca sisteme de gel in situ destinate aplicării pe piele. În plus, hidrogelurile cu CAF, MAP și combinația celor doi compuși au exercitat in vitro o biocompatibilitate bună și o lipsă de toxicitate asupra liniilor de celule cutanate sănătoase HaCaT și JB6 Cl 41-5a. În ceea ce privește acțiunea asupra migrării și reepitelizării pielii, MAP-P407 și CAF-MAP-P407 au indus cel mai pronunțat efect de vindecare/închidere a rănilor, în special pe celulele HaCaT.

4.3. PROFILUL DE BIOSECURITATE AL FORMULĂRILOR DE HIDROGEL PE BAZĂ DE CARBOMER CARE ÎNCORPOREAZĂ DERIVAȚI AI FOSFORULUI

Determinarea siguranței unui produs experimental nou dezvoltat este o condiție esențială pentru utilizarea sa medicală, în special pentru studiile clinice. În acest sens, au fost fabricate patru formulări de tip hidrogel, toate pe bază de carbomer (Blank-CP940) și încapsulate cu cafeină (CAF-CP940), și derivați ai fosforului [acizi fenilfosfinici (CAF-S1-CP940) și 2-carboxietilfenilfosfinici (CAF-S2-CP940)]. Scopul principal al acestei cercetări a fost de a oferi o prezentare cuprinzătoare a profilului de biosecuritate al hidrogelurilor menționate mai sus.

Studiul de față evidențiază importanța evaluării toxicității potențiale a formulărilor de hidrogel pe bază de carbomer care conțin un amestec de cafeină și derivați de fosfor pe linii celulare relevante pentru a asigura siguranța acestora pentru aplicații biomedicale ulterioare. Au fost preparate și investigate hidrogeluri sintetice pe bază de cafeină (0,5 % în greutate) și compuși ai fosforului. În plus, au fost evaluate efectele hidrogelului asupra celulelor umane/murine primare sănătoase (in vitro) pentru a asigura utilizarea lor în siguranță și a fost evaluată biocompatibilitatea in vivo a hidrogelului utilizând un model experimental (șoareci BALB/c nude) în care s-a examinat variația parametrilor pielii șoarecilor în urma aplicării topice. În plus, a fost efectuat un test de embriototoxicitate, utilizând testul in ovo HET-CAM (testul membranei corioalantoice a ouălor de găină) pentru a înțelege posibilele consecințe ale utilizării potențiale a hidrogelului preparat, precum și aspectele speciale ale toxicității sistemice.

Screeningul in vitro complex efectuat pe două tipuri de linii celulare de piele sănătoasă (HaCaT - keratinocite umane și JB6 Cl 41-5a - celule epidermice murine) a prezentat un profil de biosecuritate bun atunci când ambele linii celulare au fost tratate timp de 24 h cu 150 µg/mL din fiecare hidrogel. O analiză cuprinzătoare a impactului hidrogelului asupra profilului genetic al celulelor HaCaT susține experimentele in vitro. În ceea ce privește profilul de biosecuritate prin intermediul testelor in vivo și in ovo, rezultatul a arătat că hidrogelurile dezvoltate au exercitat o biocompatibilitate bună după aplicarea topică pe pielea șoarecilor BALB/c nude. De asemenea, s-a

constatat o lipsă de toxicitate după expunerea pe embrionul de găină. Sunt necesare investigații suplimentare privind eficacitatea și siguranța terapeutică in vitro și in vivo pentru utilizarea pe termen lung și potențiala translatabilitate clinică. Conform cunoștințelor noastre, prezentul studiu reprezintă primul studiu care abordează această formulă de tip hidrogel care încorporează compuși ai fosforului. Deoarece formulările de hidrogel pe bază de carbomer care au fost obținute în studiul de față reprezintă un element de originalitate (nu au mai fost preparate astfel de formulări și nu au fost efectuate studii biologice), testarea efectelor in vivo ale hidrogelului a devenit obligatorie. Prin urmare, noutatea acestui studiu se bazează pe realizarea unui profil toxicologic complet (experimente in vitro, teste de biocompatibilitate in vivo și o evaluare a toxicității in ovo). În continuare, vom putea stabili profilul de biosecuritate al formulărilor de hidrogel pe bază de carbomer pregătite, care conțin cofeină și derivați ai fosforului. Prin efectuarea unui screening toxicologic cuprinzător, această cercetare urmărește să ofere o înțelegere holistică a profilurilor de biosecuritate ale acestor formulări noi, orientând viitoarele direcții de cercetare și deciziile de reglementare.

Teza de doctorat se bazează pe rezultatele originale obținute din trei articole de cercetare, în care subsemnatul este prim autor, astfel:

- Datele prezentate în Capitolul 2, fac obiectul unui articol ISI, publicat în revista *Current Issue in Molecular Biology* de la Editura MDPI, I.F. = 2,8.

Cele mai importante descoperiri din acest studiu sugerează că acidul 2-carboxietilfenilfosfinic poate fi considerat ca fiind un potențial tratament pentru osteosarcom și justifică investigații suplimentare în studii preclinice și clinice. Biocompatibilitatea sa favorabilă, profilul de siguranță și activitatea anticancerigenă justifică de asemenea investigații suplimentare în studii preclinice și clinice.

Principalele constatări cheie prezentate în Capitolul 2 au fost:

- Biocompatibilitate promițătoare: acidul 2-carboxietilfenilfosfinic a prezentat o biocompatibilitate bună în celulele HaCaT, viabilitatea celulară rămânând ridicată (77%) și la concentrații de până la 5 mM;
- Profil de siguranță superior: noul compus nu a cauzat modificări morfologice semnificative sau modularea genelor în celulele HaCaT,

indicând un profil de siguranță potențial superior comparativ cu unele tratamente existente;

- Activitate anti-osteosarcomă semnificativă: în celulele SAOS-2, compusul a demonstrat o activitate anti-cancer promițătoare, reducând viabilitatea celulară la 55% și inducând apoptoza (moartea celulară programată);
- Modularea expresiei genice: compusul sintetizat a afectat în mod semnificativ expresia genică în celulele SAOS-2, în special reglarea negativă a genei Bid, care este implicată în apoptoză.

- Datele prezentate în Capitolul 3, fac obiectul unui alt articol ISI, publicat în revista *Farmacia*, I.F. = 1.4.

În ceea ce privește acest studiu, concluzionăm că formulările de tip hidrogel prezintă o abordare promițătoare pentru administrarea topică a cafeinei și a derivaților acidului ascorbic pentru tratarea diferitelor patologii cutanate.

- Datele prezentate în Capitolul 4, fac obiectul celui de-al treilea articol ISI, publicat în revista *Gels* de la Editura MDPI, I.F. = 5.

În ceea ce privește acest studiu, pentru prima dată, a fost raportată sinteza unei formulări de tip hidrogel care încorporează compuși ai fosforului (acizii fenilfosfinic și 2-carboxietilfenilfosfinic). Studiul subliniază necesitatea critică de a asigura siguranța și eficacitatea noilor produse biofarmaceutice înainte de utilizarea lor la om. Principalele constatări prezentate au fost:

- viabilitatea celulară și citotoxicitatea: hidrogelurile au demonstrat un profil bun de biosecuritate pe două linii celulare de piele sănătoasă (HaCaT și JB6 Cl 41-5a) după 24 de ore de tratament cu o concentrație de 150 µg/mL;
- modificări morfologice: nu s-au observat modificări morfologice adverse semnificative după expunerea la hidrogeluri;
- profil genetic: analiza profilului genetic al celulelor HaCaT după expunerea la hidrogel a confirmat rezultatele experimentelor in vitro, indicând lipsa unui impact negativ semnificativ;
- aplicare topică: hidrogelurile au prezentat o biocompatibilitate bună atunci când au fost aplicate topic pe pielea șoarecilor BALB/c nude;
- expunerea embrionilor: nu s-a observat toxicitate la embrionii de pui de găină după expunerea la hidrogeluri.