

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL II**

GHIULAI ROXANA MARIA



REZUMAT

**STUDII ANALITICE ȘI BIOLOGICE DE ÎNALTĂ
PERFORMANȚĂ PRIVIND PROPRIETĂȚILE
FARMACOLOGICE ALE ACIDULUI BETULINIC**

Coordonator științific
PROF. UNIV. DR. ȘOICA CODRUȚA

**Timișoara
2022**

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	VI
LISTA ABREVIERILOR ȘI SIMBOLURILOR	VIII
LISTA FIGURILOR	X
LISTA TABELELOR.....	XII
MULȚUMIRI	XIII
INTRODUCERE	XIV
PARTEA GENERALĂ.....	1
1. TRITERPENE PENTACICLICE.....	1
2. ACIDUL BETULINIC.....	4
2.1. STRUCTURA CHIMICĂ.....	4
2.2. METODE DE EXTRACȚIE	6
2.3. SINTEZA CHIMICĂ.....	7
2.4. ACTIVITĂȚILE BIOLOGICE ALE ACIDULUI BETULINIC	8
2.4.1. ACTIVITATEA ANTICANCERIGENĂ	9
2.4.2. ACTIVITATEA ANTIINFLAMATOARE	13
2.4.3. VINDECAREA RĂNILOR	16
2.4.4. ACTIVITATEA ANTIDIABETICĂ.....	17
2.4.5. ACTIVITATEA CARDIOPROTECTOARE.....	17
2.4.6. ACTIVITATEA LIPOLITICĂ.....	18
2.4.7. DIVERSE ACTIVITĂȚI BIOLOGICE.....	19
2.5. SISTEME DE LIVRARE LA SCARĂ NANOMETRICĂ PENTRU ACIDUL BETULINIC	20
2.5.1. NANOEMULSII	21
2.5.2. NANOPARTICULE METALICE.....	21
2.5.3. LIPOZOMI.....	22
2.5.4. NANOPARTICULE POLIMERICE	23
2.5.5. NANOTUBURI DE CARBON	24
2.5.6. COMPLEXE CU CICLODEXTRINE.....	24
3. INVESTIGAȚII ANALITICE ALE PARAMETRILOR FARMACOCINETICI.....	25
3.1. STADIUL ACTUAL AL TEHNICII ÎN METABOLOMICĂ.....	25
PARTEA SPECIALĂ	27
4. CALEA METABOLICĂ <i>IN VIVO</i> A ACIDULUI BETULINIC	27
4.1. OBIECTIVE.....	27
4.2. MATERIALE ȘI METODE.....	28
4.2.1. PRODUSE CHIMICE.....	28
4.2.2. NANOEMULSIA DE ACID BETULINIC.....	28
4.2.3. EXPERIMENT <i>IN VIVO</i> PE ȘOARECI SKH1	29

4.2.4. PREGĂTIREA PROBEI PENTRU ANALIZA LC-MS	29
4.2.5. PREGĂTIREA PROBEI PENTRU ANALIZA HRMS	30
4.2.6. APARATURA HPLC-MS	30
4.2.7. METODE LC-MS	30
4.2.8. SPECTROMETRIE DE MASĂ ORBITRAP	31
4.3. REZULTATE.....	32
4.3.1. IDENTIFICAREA ȘI CUANTIFICAREA ACIDULUI BETULINIC DIN PROBELE DE PLASMĂ	32
4.3.2. SCREENINGUL HRMS AL METABOLIȚILOR PLASMATICI DE FAZA I A ACIDULUI BETULINIC PRIN NANOESI ORBITRAP MS	35
4.3.3. SCREENINGUL HRMS AL METABOLIȚILOR PLASMATICI DE FAZA II AI ACIDULUI BETULINIC PRIN NANOESI ORBITRAP MS	37
4.3.4. ANALIZA ÎN TANDEM MS A ACIDULUI BETULINIC ȘI A METABOLIȚILOR SĂI PLASMATICI PRIN CID NANOESI ORBITRAP MS	38
4.3.4.1. Analiza în tandem MS a acidului betulinic izolat din probele de plasmă.....	38
4.3.4.2. Analiza în tandem MS a metaboliților de fază I ai acidului betulinic izolați din probele de plasmă	41
4.3.4.3. Analiza în tandem a MS a metaboliților de fază II ai acidului betulinic izolați din probele de plasmă	49
4.3.4.3.1. Analiza în tandem a metaboliților metilați	49
4.3.4.3.2. Analiza în tandem a metaboliților sulfatați	51
4.3.4.3.3. Analiza în tandem a metaboliților glucuronoconjugați	59
4.4. DISCUȚII.....	67
5. PROIECTAREA, SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA PHISCO- CHIMICĂ A NANOPARTICULELOR DE AUR CU ACID BETULINIC	74
5.1. OBIECTIVE	74
5.2. MATERIALE ȘI METODE.....	75
5.2.1. SINTEZA NANOPARTICULELOR DE AUR ACOPERITE CU CITRAT (GNP).....	75
5.2.2. SINTEZA NANOPARTICULELOR DE AUR ÎNCĂRCATE CU BA (BA-GNP).....	75
5.2.3. CARACTERIZAREA GNP ȘI BA-GNP PRIN UV-VIS, FTIR, TEM, DIMENSIUNE HIDRODINAMICĂ, POTENȚIAL ZETA.....	76
5.2.4. EVALUAREA CONȚINUTULUI DE AUR AL GNP PRIN ANALIZA FLUORESCENȚEI CU RAZE X (XRF)	77
5.2.5. EVALUAREA EFICIENȚEI ÎNCĂRCĂRII SUBSTANȚEI.....	77
5.3. REZULTATE	78
5.3.1. SINTEZA GNP ACOPERITE CU CITRAT ȘI BA-GNP	78
5.3.2. CARACTERIZAREA UV-VIS A GNP ȘI BA-GNP	79
5.3.3. CARACTERIZAREA FTIR A GNP ȘI BA-GNP.....	80
5.3.4. MICROSCOPIE ELECTRONICĂ DE TRANSMISIE (TEM), ÎMPRĂȘTIERE DINAMICĂ A LUMINII (DLS), POTENȚIAL ZETA (Z),	

EFICIENȚA ÎNCĂRCĂRII SUBSTANȚEI (DLE) ȘI CONȚINUTUL DE AUR AL GNP ȘI BA-GNP	81
5.4. DISCUȚII.....	83
6. EVALUAREA BIOLOGICĂ IN VITRO ȘI ÎN OVO A NANOPARTICULELOR DE AUR CU ACID BETULINIC	86
6.1. OBIECTIVELE	86
6.2. MATERIALE ȘI METODE.....	86
6.2.1. CULTURA CELULARĂ.....	86
6.2.2. MODELE DE ȚESUTURI 3D (EPI-200 ȘI EPI-200-SIT, MATTEK LIFE SCIENCES).....	87
6.2.3. EVALUAREA VIABILITĂȚII CELULARE PRIN TESTUL ALAMAR BLUE ȘI MORFOLOGIA CELULARĂ	87
6.2.3.1. Testul Alamar Blue.....	87
6.2.3.2. Evaluarea morfologiei celulare.....	88
6.2.4. MODEL EPIDERMIC UMAN RECONSTRUIT (EPI-SIT-MD) – TEST DE IRITARE A PIELII	88
6.2.5. MODEL DE PIELE EPIDERM TM (EPI 200) - TEST DE FOTOTOXICITATE.....	89
6.2.6. TESTUL DE IMUNOFLUORESCENȚĂ	90
6.2.7. TESTUL HET-CAM	90
6.2.8. RESPIROMETRIE DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE	91
6.2.9. WESTERN BLOT	93
6.3. REZULTATE.....	94
6.3.1. EFECTUL GNP ȘI BA-GNP ASUPRA VIABILITĂȚII ȘI MORFOLOGIEI CELULARE	94
6.3.2. EVALUAREA MORFOLOGICĂ A CELULELOR APOPTOTICE PRIN COLORAREA DAPI.....	97
6.3.3. EFECTE GNP ȘI BA-GNP ASUPRA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE HACAT ȘI RPMI-7951	98
6.3.4. WESTERN BLOT	100
6.3.5. EFECTUL GNP ȘI BA-GNP ASUPRA MODELULUI EPIDERMIC UMAN RECONSTRUIT (EPI-SIT-MD) – TESTUL IRITĂRII PIELII	102
6.3.6. EFECTUL GNP ȘI BA-GNP ASUPRA MODELULUI DE PIELE EPIDERMICĂ (EPI 200) - TEST DE FOTOTOXICITATE	103
6.3.7. POTENȚIALUL DE IRITARE AL BA-GNP UTILIZÂND TESTUL HET-CAM	104
6.4. DISCUȚII.....	105
CONCLUZII SI CONTRIBUTII PERSONALE.....	110
REFERINȚE.....	113
ARTICOLELE PUBLICAT IN EXTENSO	I

REZUMAT

Acidul betulinic (BA) (3β , hidroxi-lup-20(29)-en-28-oic acid) (Figura 1) este un metabolit secundar al plantelor, membru al triterpenelor pentaciclice cu schelet lupan. BA este distribuit pe scară largă în surse naturale, cantități considerabile fiind găsite în întreaga specie Betulaceae, în straturile exterioare ale scoarței de mesteacăn. Unele surse vegetale cu cantități mari de BA sunt o parte importantă a remediilor naturale care includ medicina tradițională chineză, cum ar fi *Ziziphi Spinosae* (Rhamnaceae) sau remedii medicinale indiene, cum ar fi *Nyctanthes arbor-tristis*.

În ultimele decenii BA a fost investigat pe larg în timpul studiilor *in vitro* și *in vivo* care au demonstrat o gamă largă de activități biologice și farmacologice, cel mai mare profil fiind potențialul său anti-cancer, deja recunoscut de Institutul Național de Cancer din SUA. BA afișează activități de citotoxicitate bine documentate, în principal prin declanșarea căii mitocondriale a apoptozei în celulele canceroase exercitate asupra diferitelor tipuri de cancer, cum ar fi melanomul, cancerul colorectal, cancerul ovarian, cancerul de col uterin sau cancerul de sân. Prin urmare, BA are un potențial imens de a deveni un agent antineoplazic care combină activitatea anti-cancer ridicată, toxicitatea generală scăzută și selectivitatea ridicată.

Un dezavantaj major al BA este reprezentat de solubilitatea scăzută în apă, care afectează negativ biodisponibilitatea orală, limitând astfel activitatea sa farmacologică. Pentru a depăși aceste deficiențe și pentru a-și îmbunătăți caracteristicile farmacocinetice, au fost utilizate o mulțime de strategii pentru a dezvolta sisteme de livrare la scară nano, printre care complexarea cu ciclodextrine și mai multe nanoformulari care conțin BA, printre care lipozomi, nanoemulsii, nanoparticule metalice, nanotuburi de carbon (Figura 2).

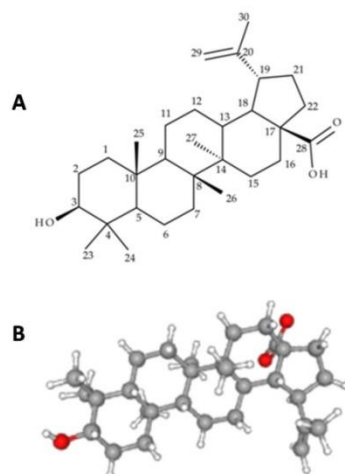


Figura 1. Structura chimică a acidului betulinic. (A) structura 2D. (B) Structura 3D

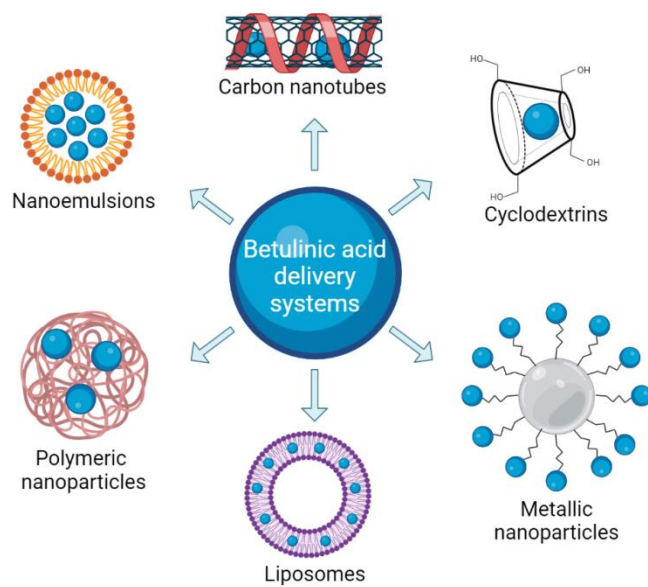


Figura 2. Sisteme de livrare la scară nano a acidului betulinic

În dezvoltarea medicamentului, o etapă obligatorie constă în dezvoltarea parametrilor farmacocinetici compleți, cum ar fi absorbția, distribuția, metabolismul și excreția, pe scurt profilul său ADME. În ciuda rezultatelor remarcabile în dezvoltarea mecanismelor moleculare subiacente pentru majoritatea activităților biologice și farmacologice ale BA în timpul studiilor *in vitro* și *in vivo*, există informații limitate cu privire la profilul său ADME *in vivo*.

Principalele obiective ale prezentei teze de doctorat, care reprezintă partea specială a tezei de doctorat, au fost de a aborda deficiențele BA și de a completa decalajul de informații cu privire la caracteristicile sale farmacologice. În acest scop, au fost efectuate **trei studii** având ca punct central acidul betulinic. Pentru a completa profilul farmacocinetic al BA cu informații privind transformarea lor metabolică *in vivo*, a fost efectuat un **amplu studiu** care a constatat în screening-ul și investigațiile structurale ale metaboliților săi de fază I și II. Pentru a aborda biodisponibilitatea slabă a BA, a fost efectuat un **al doilea studiu** care a constatat în sinteza nanoparticulelor de aur (GNP) încărcate cu BA (BA-GNP), care au fost caracterizate și investigate în mod aprofundat în ceea ce privește identitatea, stabilitatea și eficiența încărcării, nanoformulari care au acreditările pentru a crește biodisponibilitatea și de asemenea, de a spori eficacitatea terapeutică a BA. Evaluarea *in vitro* biologică a GNP a GNP funcționalizate cu BA a fost punctul central al **celui de-al treilea studiu**, care a fost efectuat pe celulele melanomului uman care au evidențiat proprietăți citotoxice selective și antiprolifera mai puternice în comparație cu BA liber, în timp ce au fost lipsite de potențial de iritație pe celulele normale/țesuturi. În plus, mecanismul anti melanom subiacent a fost dezvăluit prin intermediul unor teste biologice cu randament ridicat.

În timpul primului studiu, o nanoemulsie care conține BA (BA-NE) dezvoltată anterior a fost administrată în cavitatea peritoneală la șoarecii de sex feminin SKH1. În urma administrării *in vivo*, cercetarea s-a axat pe: i) detectarea și cuantificarea acestora în probele de plasmă prin LC-MS ii) screeningul și

secvențierea metaboliților BA folosind HRMS, prin nanoESI Orbitrap MS în modul ion negativ, iar caracterizarea structurală a fost realizată prin CID MS/MS. Rezultatele au indicat că metoda LC-MS a oferit o sensibilitate ridicată în detectarea BA chiar și după administrarea de doze mici la șoareci. Probele de plasmă cu cele mai mari concentrații detectate de BA, colectate după 2 ore după tratament, au fost analizate în continuare prin HRMS pentru a descoperi calea metabolică *in vivo* a BA. Proiectarea studiului, împreună cu metoda analitică utilizată, a permis detectarea a 13 metaboliți de fază I și II ai BA în probele de plasmă. Oxidarea, monohidroxilarea, dihidroxilarea și hidrogenarea au fost căile metabolice primare în timpul metabolismului de fază I al BA, în timp ce sulfatarea, glucuronoconjugarea și metilarea au fost procesele metabolice primare în timpul fazei II (tabelul 1).

Tabelul 1. Metaboliti propusi de fază I și faza II ai acidului betulinic

Metabolitul	Formula moleculară	<i>m/z</i>	Ion molecular	Reacția metabolică
M 1	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	457.37	[M-H ⁺] ⁻	- hidrogenare
M 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.35	[M-H ⁺] ⁻	- monohidroxilare
M 3	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.33	[M-H ⁺] ⁻	- oxiadare
M 4	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.34	[M-H ⁺] ⁻	- dihidroxilare
M 5	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	469.37	[M-H ⁺] ⁻	-metilare
M 6	C ₃₀ H ₄₈ O ₆ S	535.31	[M-H ⁺] ⁻	- sulfoconjugare
M 7	C ₃₀ H ₄₈ O ₇ S	551.30	[M-H ⁺] ⁻	- hidroxilare - sulfoconjugare
M 8	C ₃₀ H ₄₆ O ₈ S	565.28	[M-H ⁺] ⁻	-oxidare - sulfoconjugare
M 9	C ₃₀ H ₄₈ O ₈ S	567.30	[M-H ⁺] ⁻	- dihidroxilare - sulfoconjugare
M 10	C ₃₆ H ₅₆ O ₉	631.39	[M-H ⁺] ⁻	- glucuronoconjugare
M 11	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₀	647.38	[M-H ⁺] ⁻	- hidroxilare - glucuronoconjugare
M 12	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₁	661.36	[M-H ⁺] ⁻	- oxiadatie - glucuronoconjugare

M 13	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	663.37	[M-H ⁺]	- dihidroxilare - glucuronoconjugare
------	---	--------	---------------------	---

În timpul analizei structurale detaliate efectuate prin nanoESI CID MS/MS, principalele caracteristici de fragmentare prezentate atât pentru BA, cât și pentru metaboliții săi au constat în pierderi neutre de H₂O (-18 Da), CO₂ (-44 Da), HCOOH (-46 Da), C₃H₄ (-40 Da), O (-16 Da), CH₂ (-14Da) și fragmente ionice de scindare inelară, similar cu datele deja raportate pentru fitocompusi, cum ar fi triterpenele și acizii triterpenici. Rezultatele obținute indică formarea unui număr mare de ioni de fragmente diagnostic care sunt în concordanță cu structurile propuse ale metaboliților analizați. O evaluare comparativă a schemelor de fragmentare arată că toți metaboliții urmează un model de fragmentare similar cu cel al BA (figura 3).

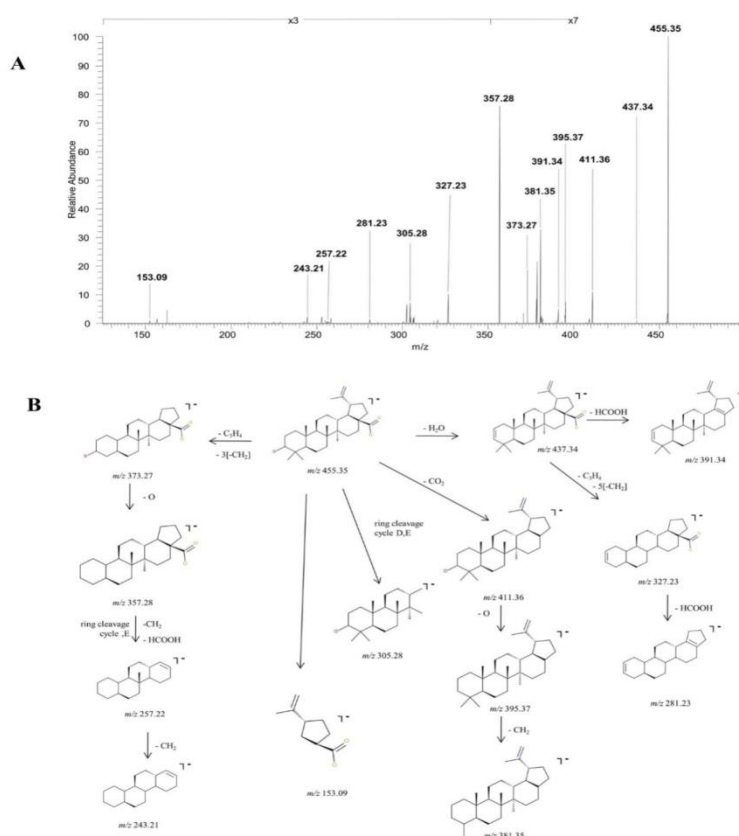


Figura 3. Caracterizarea structurală a acidului betulinic (BA) (A) spectrele ESI CID MS/MS ale ionului [M-H]⁻ detectat la m/z 455.35 în modul ion negativ (B) Calea de fragmentare propusă.

Rezultatele obținute oferă noi informații cu privire la calea metabolică *in vivo* a BA și documentează calea de fragmentare a BA și a metaboliilor sale. Studiul actual contribuie la elucidarea profilului metabolomic al BA și poate reprezenta un sprijin pentru studiile viitoare.

Pentru a aborda biodisponibilitatea slabă a BA, un al doilea studiu a fost efectuat, care a constatat în sinteza de nano-particule de aur încărcate cu BA (BA-GNP) în scopul creșterii biodisponibilității și eficacității terapeutice a BA. Folosind cisteamina ca legătură, BA a fost grefat pe GNP acoperite cu citrat- sintetizate anterior pentru a produce BA- GNP (Figura 4). BA- GNP au fost caracterizate și investigate din punctul de vedere al identității (de UV-VIS, FTIR, TEM, DLS, Z potențial), stabilității și eficienței de înglobare a BA.

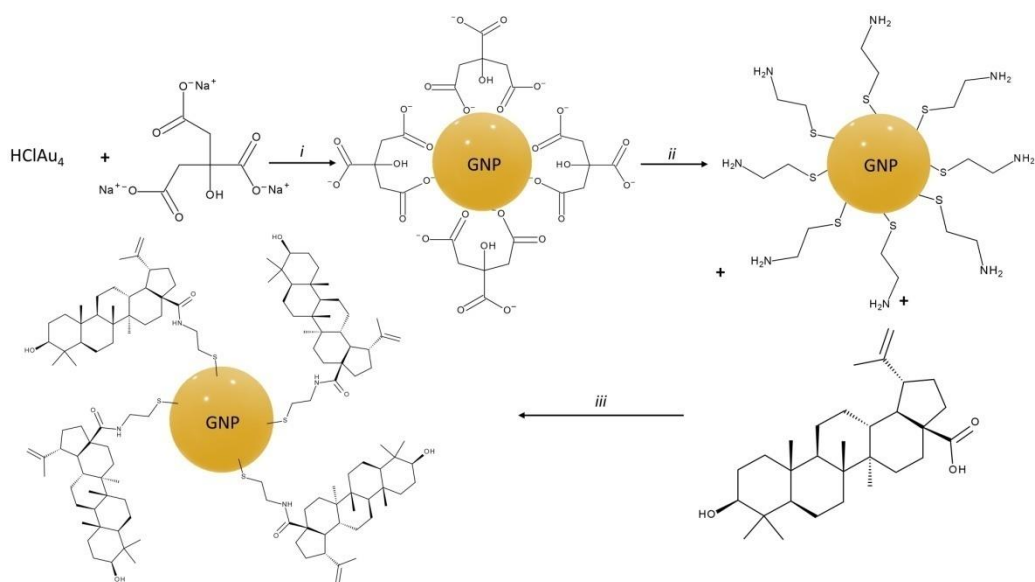


Figura 4. Calea de sinteză pentru GNB și BA- GNB

Evaluarea *in vitro* biologică a GNP funcționalizate cu BA nou obținute a fost punctul central al celui de-al treilea studiu, care a fost efectuat pe keratinocite umane HaCaT și celulele melanomului uman RPMI-7951. Testele biologice efectuate pe BA-GNB au evaluat efectul acestora asupra viabilității și morfologiei celulare, potențialul de iritare sau efectul lor asupra respirației mitocondriale. Rezultatele viabilității au indicat proprietăți citotoxice selective, datele experimentale au aratat lipsa efectelor citotoxice asupra keratinocitelor umane HaCaT și efecte antiproliferative mai puternice asupra celulelor melanomului uman RPMI-7951 în comparație cu BA liber (Figura 5). Indicatorul de reducere a oxidării prin testul Alamar Blue, care cuantifică viabilitatea celulară prin schimbarea culorii ca răspuns la reducerea chimică datorată creșterii celulare, a evidențiat un procent semnificativ de moarte celulară dependentă de doză după aplicarea probelor BA-GNP. De remarcat, viabilitatea celulară a scăzut mai pronunțat atunci când BA conjugat a fost testat în comparație cu BA liber, indicând astfel că prezența fitocompoundului joacă într-adevăr un rol-cheie în procesul inhibitor și că penetrarea sa în celulele canceroase este facilitată de nanocarrierul metalic.

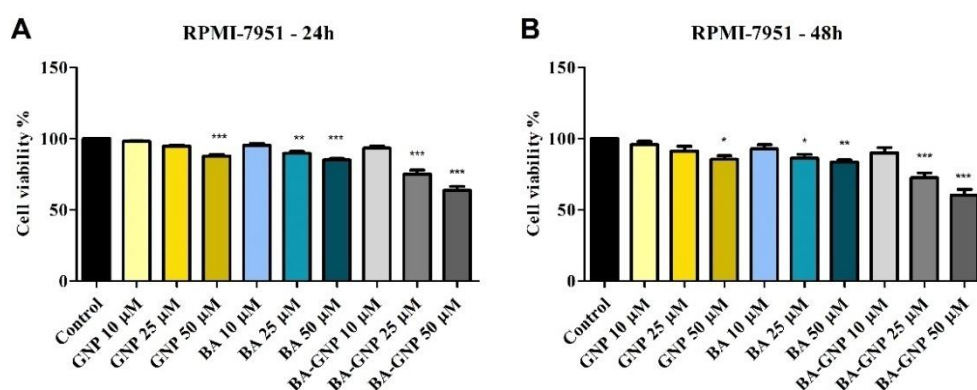


Figura 5. Viabilitatea celulară a celulelor RPMI-7951 după tratamentul de 24h (A) și 48h (B) cu GNP (dilat pentru a se potrivi cu același conținut de aur ca și pentru NPs încărcate cu BA la 10, 25 și 50 μM), BA și BA-GNP (10, 25 și 50 μM). Rezultatele sunt exprimate ca procent de viabilitate celulară (%) normalizat pentru a controla (100%).

Datele reprezintă valorile medii \pm SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice vs. control au fost determinate folosind analiza ANOVA unidirecțională, urmată de multiplele comparații ale lui Tukey post-test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ și *** $p < 0,0001$).

Mai mult, efectele pro-apoptotice au fost dezvăluite prin colorarea DAPI. Modificarea apoptotică, cum ar fi condensarea nucleară, contracția și fragmentarea într-o manieră dependentă de doză, au fost dezvăluite numai pentru GNP conjugate cu BA, în timp ce GNP goale a lăsat nucleeele nealterate care au fost coroborate de datele Western blot care demonstrează down-reglarea expresiei anti-apoptotice Bcl-2 și up-reglarea a Bax pro-apoptotice. BA-GNP a scăzut, de asemenea, considerabil respirația mitocondrială, demonstrând acțiunea specifică asupra mitocondriilor (Figura 6).

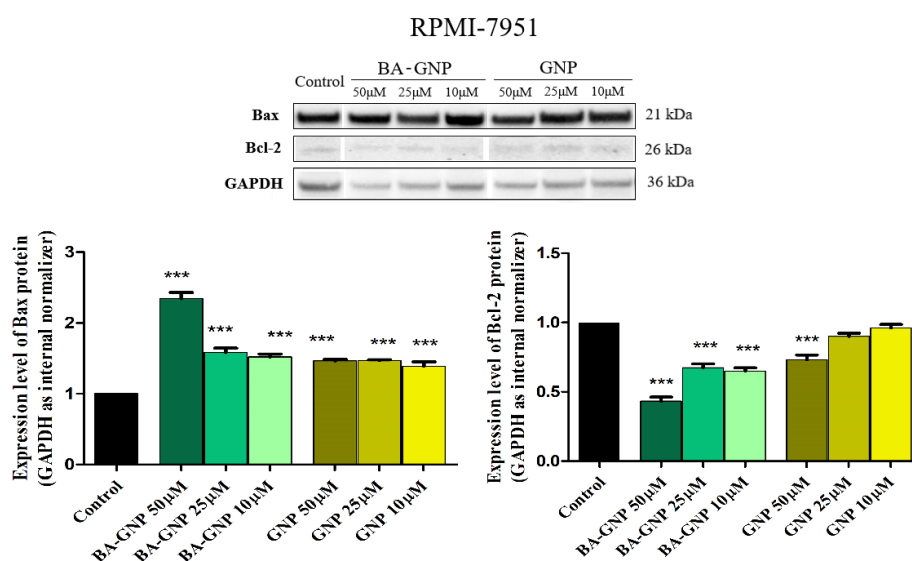


Figura 6. Determinarea expresiei proteinelor Bax și Bcl-2 în celulele RPMI-7951. S-au preparat extracte proteice din celule întregi și cantități egale de proteine (25 μg pe bandă) au fost separate de gelurile Bolt™ 4-12%, Bis-Tris și poliacrilamidă. După transferul pe membrana nitrocelulozei, imunodectia a fost efectuată folosind anticorpi anti-Bcl-2 și anti-Bax. Datele reprezintă valorile medii \pm SD a trei experimente independente după

normalizare în raport cu controlul încărcării GAPDH și grupul de control. Diferențele statistice față de control au fost determinate folosind analiza ANOVA unidirecțională, urmată de multiplele comparații post-test ale lui Tukey ($p < 0.0001$).**

Studii de înaltă rezoluție respirometrica au fost efectuate atât în celulele melanomului, cât și în keratinocitele umane pentru a evalua mecanismul de acțiune subiacent pentru BA-GNP. Datele experimentale au arătat că nici BA-GNB, nici GNB goale nu au avut o influență semnificativă asupra respirației mitocondriale în celulele HaCaT atunci când sunt utilizate în concentrații scăzute. În celulele melanomului RPMI-7951, datele au arătat că BA-GNP au produs o reducere semnificativă a tuturor ratelor respiratorii, împreună cu o creștere a ratei Cyt c. În plus, BA-GNP inhibă respirația activă ($\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$ și $\text{OXPHOS}_{\text{CI+CI}}$) și, de asemenea, capacitatea respiratorie maximă a lanțului de transport al electronilor (ETS_{CI} și $\text{ETS}_{\text{CI+CI}}$), demonstrând astfel afectarea funcției mitocondriale. Efecte similare au fost provocate de GNP goale în celulele RPMI-7951, dar numai atunci când a fost utilizată cea mai mare concentrație.

Potențialul de iritare al BA-GNP a fost efectuat utilizând testul HET-CAM (figura 7) și testul EPI-SIT-MD privind iritarea pielii, în timp ce potențialul fototoxic a fost evaluat în timpul testului de fototoxicitate EPI 200. Rezultatele au indicat că BA-GNP pot fi considerate biocompatibile cu țesuturile mucoasei și un tip sigur de nanoformulare a BA pentru aplicații locale, în timp ce potențialul non-iritant și non-fototoxic a fost demonstrate pe modelul epidermic uman reconstruit în 3D.

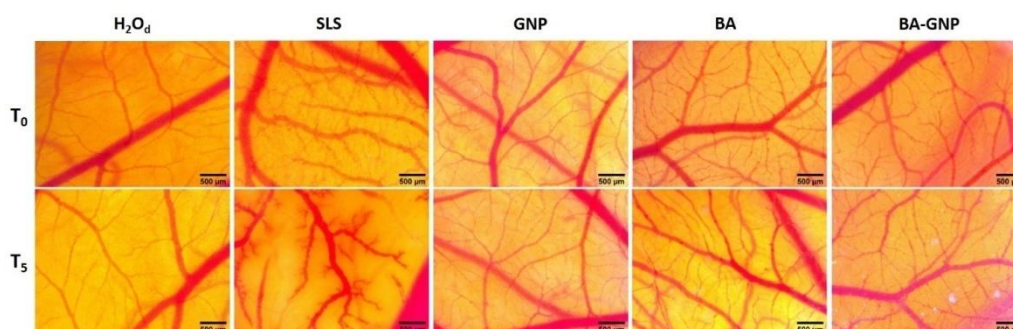


Figura 7. Evaluarea potențialului de iritație utilizând metoda HET-CAM după tratamentul cu GNP, BA și BA-GNP. Imaginile stereomicroscopului arată membrana

corioallantoică frontală înainte de (T_0) și 300 s după aplicarea (T_5) a 300 μ L din proba analizată în concentrații de 1 μ M și probe de control (apă distilată H₂O ca martor negativ, SLS 0,5% ca martor pozitiv și DMSO 0,5% ca martor al solventului); barele de scară reprezintă 500 μ m.

Toate rezultatele obținute combinate contribuie la îmbogățirea profilului farmacologic existent al BA atât cu date farmacocinetice, cât și cu mecanisme moleculare subiacente ale activității lor anticancerigene. În plus, aceste studii reprezintă o lucrare de bază pentru perspective viitoare în obținerea unor derivați eficienți sau a unor sisteme inovatoare de nano-transport pentru BA cu biodisponibilitate îmbunătățită și activitate farmacologică crescută.