

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTMENTUL I**

BOCIORT FLAVIA



TEZĂ DE DOCTORAT

**EXPERIMENTAL EVALUATION OF NATURAL
COMPOUNDS ON IN VITRO AND IN OVO MODELS**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. MOTOC ANDREI

Conducător de doctorat în cotutelă

PROF. UNIV. DR. DEHELEAN CRISTINA ADRIANA

**Timișoara
2023**

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VII
Lista abrevierilor.....	VIII
Indexul figurilor.....	X
Indexul tabelelor.....	XIII
Dedicatie.....	XIV
Mulumiri	XV
INTRODUCERE.....	XVII

PARTEA GENERALĂ

1. ACTIVITĂȚI BIOLOGICE ALE COMPUSILOR NATURALI	1
1.1 Sinteză și biosinteză.....	4
1.2 Cuantificare și detecție	6
1.3 Activitățile farmacologice ale lupeolului	7
1.3.1 Activitatea anticanceroasă a lupeolului	7
1.3.1.1 Inducerea apoptozei celulare.....	10
1.3.1.2 Inhibarea proliferării celulare.....	12
1.3.1.3 Inhibarea migrației și invaziei celulelor.....	14
1.3.1.4 Creșterea sensibilității celulelor la tratament.....	15
1.3.2 Activitatea antiinflamatoare și antioxidantă a lupeolului	16
1.3.2.1 Activitate antiinflamatoare.....	16
1.3.2.2 Activitate antioxidantă.....	19
1.3.2.3 Activitatea antimicrobiană.....	21
1.3.2.4 Efectul protector al lupeolului asupra pielii	22
2. BIODISPONIBILITATEA TRITERPENILOR ȘI A FLAVONOIDELOR- STUDII IN VITRO ȘI IN VIVO	24
2.1 Studii in vitro cu triterpene pentaciclice pentru a prezice biodisponibilitatea in vivo	25
2.2 Biodisponibilitatea triterpenelor pentaciclice bioactive in vivo	29

PARTEA SPECIALĂ

3. NANOPARTICULE METALICE NATURALE ȘI SINTETICE- OBȚINEREA, CARACTERIZAREA ȘI EVALUAREA BIOLOGICĂ ÎN COMBINAȚIE CU LUPEOL.....	35
3.1 MATERIAL ȘI METODĂ.....	36
3.1.1 Materiale	36
3.1.2 Sinteza chimică	36
3.1.3 Sinteza biochimică	37
3.1.3.1 Caracterizarea dovezilor	37

3.2 Rezultate.....	38
3.3 Discuții	40
3.4 Concluzii	41
4. GEL PRONIOSOMAL PENTRU ADMINISTRARE TOPICA DE RUTIN: PREPARARE, CARACTERIZARE FIZICO-CHIMICĂ ȘI PROFIL TOXICOLOGIC IN VITRO FOLOSIND ȚESUT EPIDERMAL UMAN RECONSTRUIT 3D ȘI CELULE 2D	42
4.1 Materiale și metode	46
4.1.1 Reactivi și linii celulare	46
4.1.2 Prepararea și caracterizarea formulărilor de gel proniosomal	46
4.1.3 Testarea epidermei	48
4.1.4 Model epidermic uman reconstruit (EPI-200-sit) - test de iritare a pielii	49
4.1.5 Model de piele Epiderm™ (EPI 200) — test de fototoxicitate.....	50
4.1.6 Citotoxicitatea pe cultura celulară 2D	51
4.1.7 Colorarea nucleară	51
4.1.8 Analiza statistică.....	52
4.2 Rezultate.....	52
4.2.1 Prepararea și caracterizarea gelului de medicament proniosomal	52
4.2.2 Gelul proniozomal cu rutin a arătat un efect proliferativ în epiderma reconstituită 3D.....	55
4.2.3 Gelul proniosomal de rutin clasificat ca neiritant pentru piele.....	56
4.2.4 Gelul proniozomal de rutin, potențial nefototoxic în țesutul 3D al epidermei umane reconstituite	57
4.2.5 Evaluarea citotoxicității în celulele 2D.....	59
4.2.6 Rutinul, un efect non-citotoxic asupra keratinocitelor umane imortalizate - HaCaT.....	59
4.2.7 Rutinul- inducere a unui efect citotoxic dependent de doză în celulele A375	62
4.3 Discuții	65
4.4 Concluzii	71
5. INVESTIGAREA LUPEOLULUI CA AGENT ANTI-MELANOM: PERSPECTIVE IN VITRO ÎN OVO	73
5.1 MATERIALE ȘI METODE	74
5.1.1 Reactivi	74
5.1.2 Culturi celulare	74
5.1.3 Evaluarea viabilității și morfologiei celulare.....	75
5.1.4 Evaluarea morfologiei nucleare	75
5.1.5 Imunofluorescență	76
5.1.6 Testul de vindecare a rănilor	76
5.1.7 Testul cu membrană corioalantoidiană (CAM)	77
5.1.8 Analiza statistică.....	77
5.2 Rezultate.....	78

5.2.1 Evaluarea viabilității și morfologiei celulare.....	78
5.2.2 AEvaluarea morfologiei nucleare.....	80
5.2.3 Imunofluorescență.....	81
5.2.4 Testul de vindecare a rănilor	83
5.2.5 Testul cu membrană corioalantoidiană (CAM)	84
5.3 Discuții	85
5.4 Concluzii	89
CONCLUZII	90
BIBLIOGRAFIE	94
ANEXE	I

INTRODUCERE

Plantele medicinale sunt surse importante de fitocompuși cu un spectru terapeutic extraordinar. Acest fenomen se observă și din perspectiva publicațiilor științifice, care recent s-au concentrat intens pe studiul compușilor naturali. Cele mai aprofundate și studiate sunt triterpenele și bioflavonoidele [1]. Una dintre cele mai cercetate afecțiuni cu o rată a mortalității în continuă creștere este cancerul. Terapiile clasice evoluează progresiv, dar insuficient și cu multe reacții adverse, cea mai gravă fiind toxicitatea ridicată. Din acest motiv, compușii naturali sunt studiați intens pentru a servi drept alternative sau chiar tratamente/co-tratamente anticancer.

Lupeol este un reprezentant triterpenic cu proprietăți antibacteriene, antioxidante, antiinflamatorii și anticancerigene cunoscute [2]. Acest compus natural este studiat intens pe formele de cancer de ficat, sân, gastro-intestinal, de prostată, cap, gât și vezică urinară și mai puțin studiat pe formele de cancer de piele, în special pe melanomul malign (MM), care reprezintă cel mai amenințător cancer de piele din lume, cu un tratament chimioterapeutic inefficient [3].

Rutinul este un alt fitocompus important, dar din clasa flavonoidelor, întâlnit frecvent în citrice, mere, ceai verde, hrișcă, ceai negru și legume, cu un spectru larg de potențial terapeutic, incluzând activități antioxidante și antitumorale [4].

Scopul prezentei lucrări este de a analiza in vitro și in ovo potențialul biologic al lupeolului și rutinului și optimizarea proprietăților de biocompatibilitate ale acestora. Principalele obiective ale acestui studiu sunt:

- a) analiza potențialului citotoxic exercitat de lupeol asupra celulelor melanomului uman,
- b) analiza potențialului citotoxic exercitat de rutin asupra celulelor melanomului uman,
- c) obținerea, caracterizarea și evaluarea potențialului citotoxic al unor formulări inovatoare pe bază de nanoparticule metalice încărcate cu lupeol,
- d) obținerea unei formulări pentru aplicare topică pe bază de gel proniozomal încărcat cu rutin și evaluarea biocompatibilității.

Cercetarea a fost împărțită în trei părți:

1. obținerea de nanoparticule metalice prin metodă verde și sinteză, încărcate cu lupeol, caracterizare și evaluare biologică
2. prepararea gelului proniozomal pentru administrarea locală cu rutin, caracterizarea fizico-chimică și analiza profilului toxicologic in vitro folosind țesut epidermic uman reconstruit 3D și celule 2D
3. investigarea in vitro și in ovo a lupeolului ca agent anti-melanom

Contribuția personală constă în evaluarea in vitro pe și in ovo a lupeolului și rutinului, formularea nanoparticulelor de lupeol și prepararea și caracterizare a gelului proniozomal cu rutin.

REZULTATE

În primul studiu, două nanoparticule de aur (AuNP) diferite au fost obținute prin sinteză chimică și, respectiv, biochimică. Limita de detecție a aurului a fost obținută la 0,0036 $\mu\text{g/L}$, iar concentrația de aur în AuNP-uri și nanoparticulele de aur cu lupeol (Lup_AuNP) obținute prin ICP-MS a fost de 29,8374 și 24,1642 $\mu\text{g Au/mL}$ suspensie. Nanoparticulele de aur obținute prin sinteză chimică au fost încărcate cu lupeol pentru a vedea activitatea în urma asocierii cu această moleculă bioactivă. Datele sunt prezentate în tabelul 1 împreună cu datele de dimensiune și stabilitate.

Tabelul 1. Caracterizarea nanoparticulelor de aur: i) sintetizate chimic, ii) încărcate cu lupeol și iii) biosintetizate

Exemplu	Concentrație ($\mu\text{g} / \text{Au} / \text{mL}$)	Marime (nm)	potential Zeta (mV)
AuNPs	29,486	38	-31
Lup_AuNPs	24,322	54	-38
B_AuNPs	31,485	82	-27

Testul de viabilitate celulară cu 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- bromură difeniltetrazolium (MTT) a fost efectuat pentru a evalua viabilitatea nanoparticulelor de aur chimice și biochimice, nanoparticulelor de aur încărcate cu lupeol apos, lupeol, și balsam de lămâie pe liniile celulare de cancer de colon HT-29 și CaCo-2. Celulele au fost stimulate cu diferite concentrații de compuși de testat la intervale de

24 de ore. În cazul lupeolului (Lup) și al Lup_AuNPs, datele au arătat că o scădere ușoară a viabilității celulare poate fi observată la concentrații scăzute pentru toate substanțele testate. În schimb, la concentrații mari de Lup_AuNPs viabilitatea celulelor HT-29 a fost de aproximativ 76% (la 25 μ M) și aproximativ 68% (la 50 μ M), iar la celulele CaCo-2 a fost de aproximativ 85% (la 25 μ M) și aproximativ 78% (la 50 μ M), așa cum se poate vedea în Figura 1.

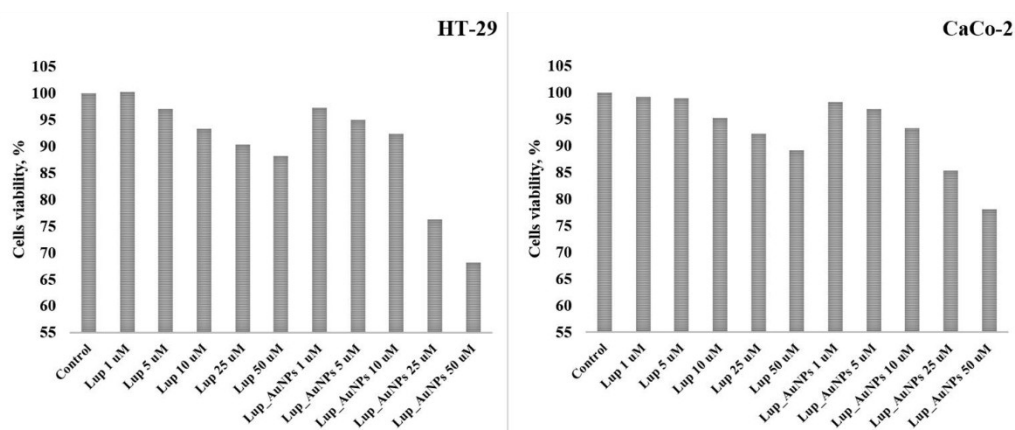


Figura 1. Viabilitatea celulelor de adenocarcinom colorectal în prezența nanoparticulelor de aur lupeol și lupeol

La testarea altor tipuri de formulări de lupeol prin testul MTT nu a evidențiat o scădere bruscă a viabilității celulare, iar tratamentele cu acesta și PLGL au arătat diferențe: la utilizarea lupeolului, viabilitatea a fost mai mică în comparație cu nanoparticulele PLGL [134]. Atât extractul apos de melișă (LBE), cât și nanoparticulele de aur biosintetizate (B_AuNPs) au fost evaluate pentru viabilitatea celulară. După cum se arată în Figura 2, extractul de melisa la concentrațiile testate (între 10-500 μ g/mL) nu prezintă un efect semnificativ asupra viabilității celulelor HT-29 sau CaCo-2.

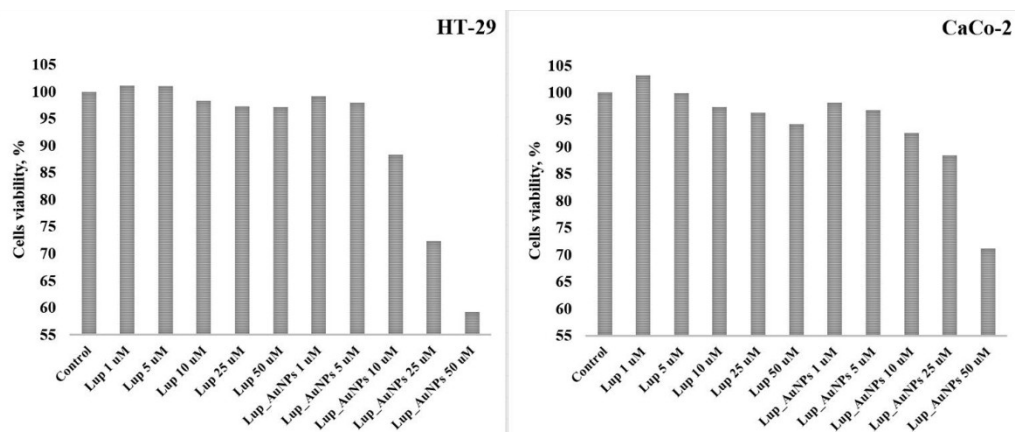


Figura 2. Viabilitatea celulelor de adenocarcinom colorectal în prezența extractului apos de melisa și a nanoparticulelor de aur biosintetizate

În cel de-al doilea studiu, în cazul proniozomilor, s-a observat un potențial zeta negativ, iar încărcarea cu rutin a condus la o ușoară modificare a potențialului zeta la o valoare mai negativă. În ceea ce privește dimensiunea medie și distribuția acestor tipuri de polimeri biodegradabili, se poate observa o creștere a dimensiunii proniozomilor pe bază de rutin în comparație cu dimensiunea proniozomilor martor. Tabelul 2 enumeră vâscozitatea aparentă și valorile tixotropiei obținute pentru formulările de gel proniozomal medicamentos și valorile pH-ului.

Table 2. Caracteristicile gelurilor proniosomale: vâscozitate, tixotropie, valori de penetrare și pH

Cod gel	Viscozitate (Step)	Thixotropie (Pa / s)	Valoare de penetrare (mm)	Valoare PH	Dimensiune (nm)	ζ Potential (mV)	EE (%)
PNS GEL	0.502 ± 0.24	2567	233.00 ± 1.15	7.105 ± 0.09	116.2 ± 1.13	25.53 ± 0.2	-
RUT_PNS GEL	0.488 ± 0.62	2930	249.00 ± 0.82	7.002 ± 0.18	140.5 ± 2.56	27.33 ± 0.09	59.6 ± 4.8

Rezultatele testului de răspândire sunt prezentate în Figura 3 ca profile extensiometrice. Aria de răspândire a crescut progresiv odată cu creșterea greutății aplicate, iar pentru toate greutatea aplicate, gelul proniozomal care conține 0,3% rutin a prezentat zone mai mari de răspândire. Rezultatele evaluării consistenței prin penetrometrie și testului de răspândire au fost în concordanță cu cele obținute în urma testului de curgere în regim de echilibru, sugerând influența proprietăților chimice ale moleculelor de medicament încorporate (rutin).

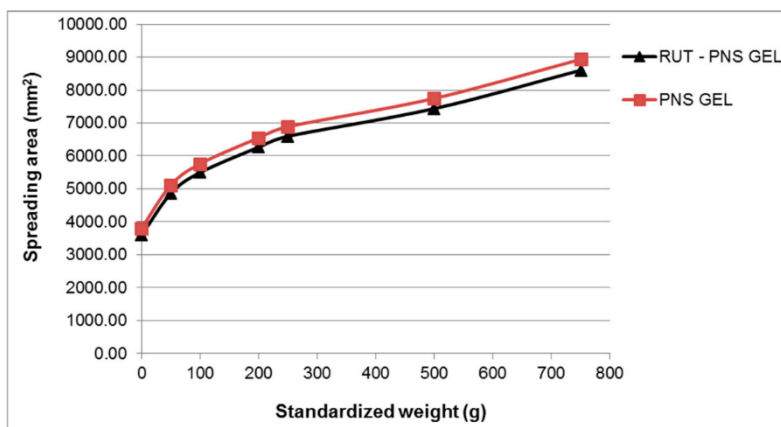


Figura 3. Curbele extensiometrice ale gelului proniozomal experimental care conține 0,3% rutin și formulări de control

Viabilitatea epidermei umane reconstituite (RhE) a fost obținută folosind testul MTT după 18 ore de expunere, iar apa ultrapură și Triton X-100 1% au fost utilizate ca control negativ și control pozitiv conform recomandărilor Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE). Viabilitatea RhE după expunerea la control pozitiv și perioada de incubație de 18 ore după aplicare a scăzut la aproximativ 5% (Figura 4). Gelurile de rutină și proniosomal (martor și cu rutină încărcate) au prezentat o viabilitate semnificativ mai mare decât controlul pozitiv, dar și comparativ cu controlul negativ.

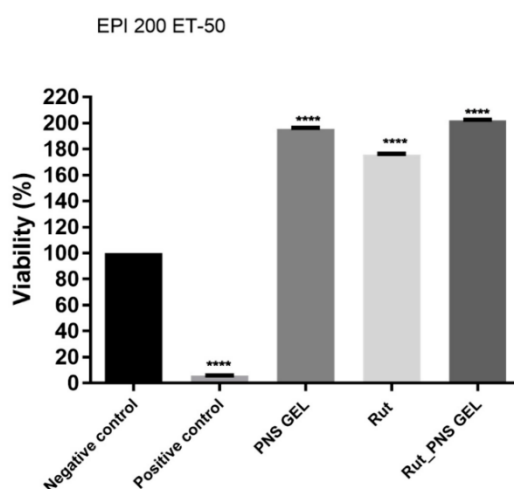


Figura 4. Procentul de viabilitate al insertului epidermic EpiDerm (EPI 200 ET-50) la 18 ore cu probele testate (gel de control proniozomal, gel proniosomal de rutin și rutin).

O altă linie celulară utilizată în prezentul studiu ca model experimental in vitro pentru a stabili profilul toxicologic al lui Ruth a fost A375 - linia celulară de melanom uman. Pentru a determina viabilitatea celulară, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de Ruth (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 25, 50 și 75 μ M) timp de 24 de ore. Rezultatele au arătat semne de citotoxicitate în celulele A375 începând cu cea mai mică concentrație - 1 μ M, dar cea mai semnificativă scădere a procentului de celule viabile a fost observată la cele mai mari concentrații testate (25, 50 și 75 μ M): 53,19 %, 58,12% și, respectiv, 49,32% (Figura 5). Valoarea IC_{50} calculată pentru Ruth este de 8601 pM.

A375 - human amelanotic melanoma cells 24h

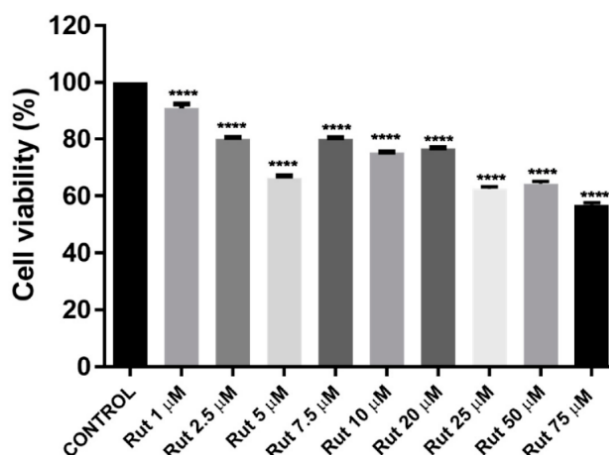


Figura 5. Evaluarea efectului in vitro al rutinei (Ruth; 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 50 și 75 uM) asupra viabilității celulelor melanomului uman (A375) după un tratament de 24 de ore prin aplicarea testului alamarBlue.

În cazul lupeolului, efectul anti-melanom a fost evaluat pe două linii de melanom malign uman: A375 și RPMI-7951. Siguranța LUP a fost evaluată pe două tipuri de celule ale pielii sănătoase (keratinocite umane - HaCaT și fibroblaste umane - 1BR3).

Celulele au fost evaluate după un tratament de 24 de ore cu concentrații crescânde (10-50 pM) de LUP. Rezultatele au indicat o activitate citotoxică dependentă de doză a LUP pe ambele linii celulare (Figura 6A, B), cea mai mare inhibare a viabilității celulare fiind înregistrată la cea mai mare concentrație testată (50 µM) când procentele au atins 61, 29% pentru A375 și, respectiv, 37,78% pentru RPMI-7951.

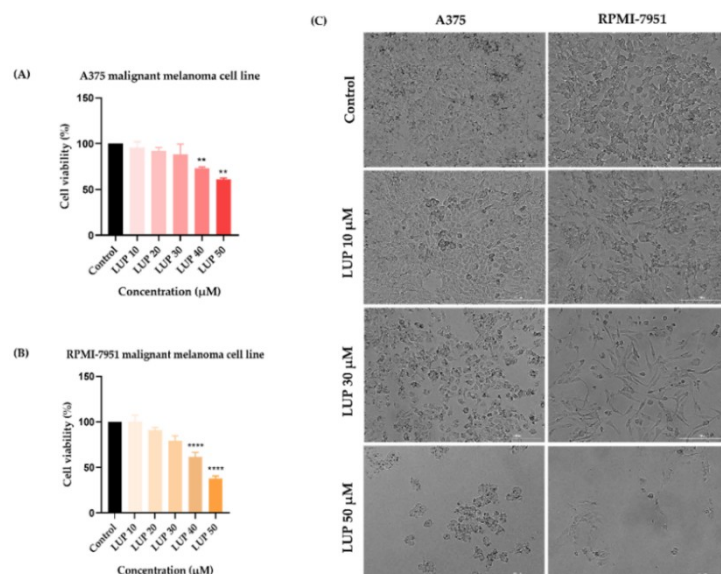


Figura 6. Evaluarea in vitro a efectului LUP (10, 20, 30, 40 și 50 μM) asupra viabilității (și (B) a celulelor RPMI-7951 MM după 24 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT și a morfologiei (C) și confluența celulelor MM după un tratament de 24 de ore cu LUP 10, 30 și 50 μM

În ceea ce privește efectul de apoptoză indus de LUP, nu au fost detectate modificări semnificative în celulele A375 la 10 μM în comparație cu controlul (celule netratate), în timp ce la concentrații mai mari pot fi observate caracteristici apoptotice specifice (indicate prin săgeți), cum ar fi fragmentarea nucleară și corpi apoptotici (LUP 20 μM), blebbing membranar și condensare a cromatinei (LUP 50 μM). În cazul celulelor RPMI-7951, semnele de apoptoză (umplerea membranei, fragmentarea nucleilor celulari) au fost înregistrate la toate concentrațiile (indicate prin săgeți). Rezultatele sunt prezentate în Figura 7.

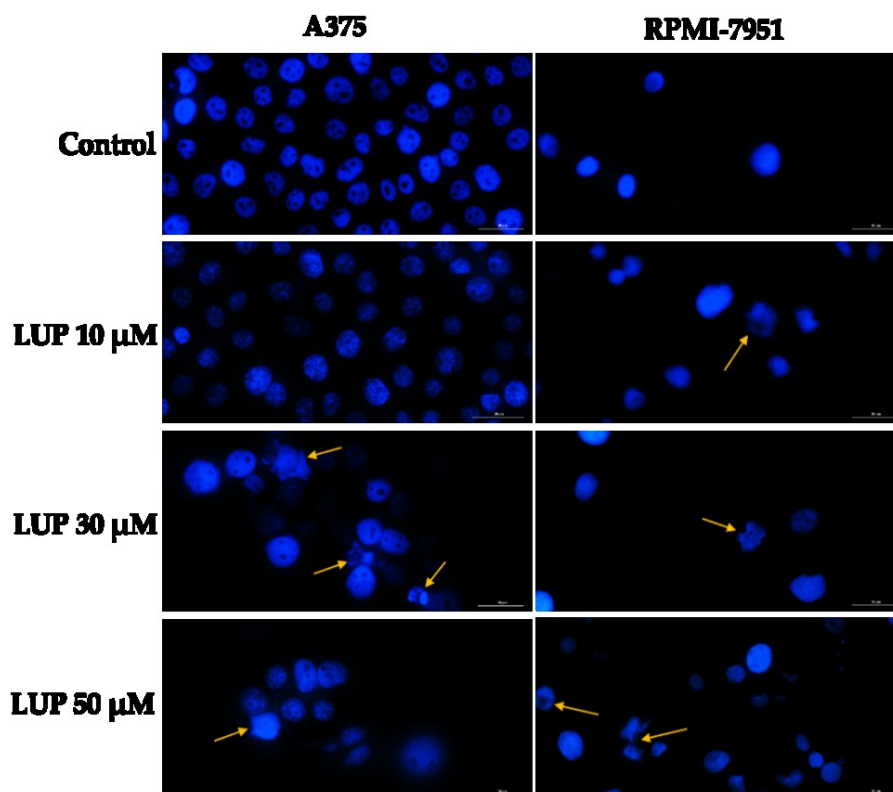


Figura 7. Colorarea nucleelor celulare folosind Hoechst 33342 în celulele de melanom malign A375 și RPMI-7951 după un tratament de 24 de ore cu LUP 10, 30 și 50 pM. Staurosporină (STP) 5 pM a fost selectată ca martor pozitiv pentru apoptoză. Săgețile indică nuclee apoptotice care exprimă caracteristici specifice. Barele scarii reprezintă 30 μm

Pentru a obține o perspectivă completă asupra impactului LUP asupra morfologiei celulelor melanom A375 și RPMI-7951, a fost aplicată o tehnică de imunochimie prin fluorescență care evidențiază modificările care au avut loc în distribuția componentelor citoscheletice (filamente de actină (AT) - roșii și microtubuli (MT) - verde) după 24 de ore de tratament. În plus, nucleele celulare au fost contracolorate cu DAPI. La cea mai mică concentrație testată (10 pM) LUP nu a indus modificări semnificative în aspectul citoscheletului celulelor A375 și RPMI-7951. Cu toate acestea, la concentrații mai mari (30 și 50 μM), pot fi observate unele modificări în organizarea AF și MT (indicate prin săgeți), după cum urmează: (i) în celulele A375 (Figura 8) - condensarea fasciculelor de actină și reorganizarea de MT într-un inel cortical care duce la rotunjirea celulelor; și (ii) în celulele RPMI-7951 (Figura 9) - condensarea actinei, distribuția perinucleară a MT și axa longitudinală scurtată a celulelor.

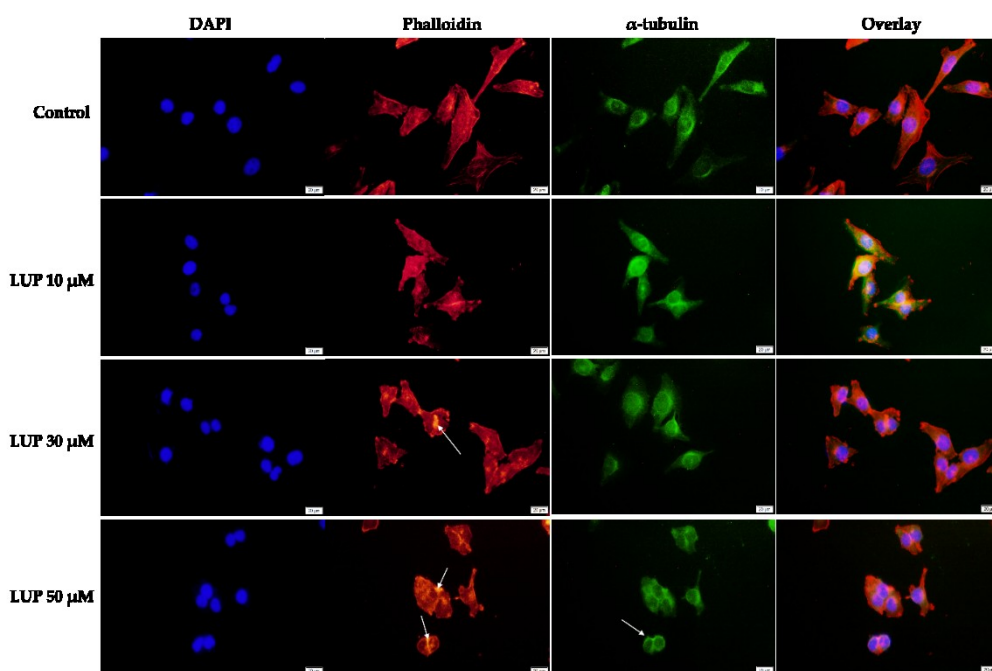


Figura 8. Celulele de melanom uman (A375) vizualizate prin microscopie cu fluorescență după un tratament de 24 de ore cu LUP (10, 30 și 50 μM). Nucleele celulare (DAPI), filamentele de actină (faloidină) și microtubulii (α -tubulină) sunt prezentate individual și, de asemenea, combinate (suprapuse). Barele scării indică 20 μm .

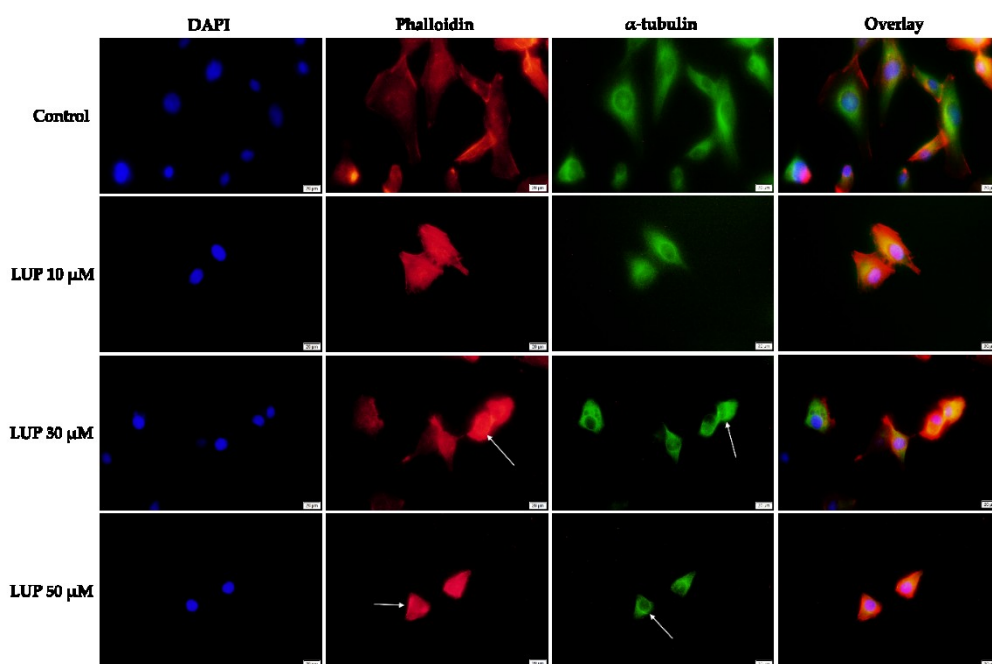


Figura 9. Celule de melanom uman (RPMI-7951) vizualizate prin microscopie cu fluorescență după un tratament de 24 de ore cu LUP (10, 30 și 50 μM). Nucleele celulare (DAPI), filamentele de actină (faloidină) și microtubulii (α -tubulină) sunt prezentate individual și combinate (suprapuse). Barele scării indică 20 μm .

Pentru a observa efectul LUP asupra dezvoltării vaselor de sânge, metoda in ovo a fost aplicată folosind testul CAM. Profilul potențial antiangiogenic al LUP la cea mai mare concentrație testată in vitro (50 μM) a fost examinat timp de 24 de ore. După acest timp, s-au observat o serie de modificări la nivelul plexului vascular,

precum scăderea densității capilare, unele zone ale membranei corioalantoice fiind lipsite de vascularizare. În plus, este de remarcat faptul că vasele de sânge formate sunt lipsite de ramuri, ceea ce este un aspect crucial în ceea ce privește angiogeneza în procesul tumoral. Mai mult, la nivelul membranei corioalantoice se poate observa o microhemoragie care în urma tratamentului cu LUP a fost împiedicată să evolueze (Figura 10).

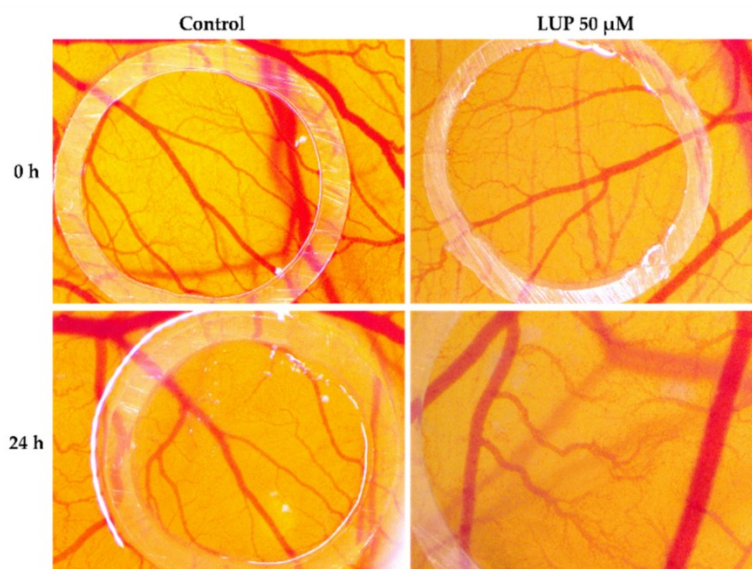


Figura 10. Imagistica stereomicroscopică a membranei corioalantoice evidențiind procesul angiogenetic după tratament timp de 24 de ore cu LUP 50 μ M.

CONCLUZII

Datele obținute au relevat un efect anti-melanom eficient și selectiv exercitat de lupeol la concentrații bine stabilite împotriva ambelor tipuri de celule melanom umane utilizate. S-a observat:

- a) o scădere dependentă de doză a celulelor viabile și, de asemenea, a confluentei celulare,
- b) apariția unor caracteristici nucleare apoptotice specifice în urma utilizării lupeolului,
- c) reorganizarea componentelor citoscheletice de importanță relevantă în procesele apoptotice
- d) inhibarea capacității celulelor de a migra în prezența lupeolului

În cazul formulării nanoparticulelor de lupeol, s-au tras următoarele concluzii:

- a) formarea nanoparticulelor metalice a fost confirmată prin spectroscopie UV-Vis, dimensiunile acestora au fost în intervalul necesar utilizării în medii biologice (38-82 nm) iar stabilitatea a fost bună raportat la valorile potențialului zeta înregistrate.
- b) pentru evaluarea efectului citotoxic asupra celulelor tumorale (adenocarcinom de colon), s-a realizat încărcarea nanoparticulelor metalice cu lupeol; în același timp au fost testate și nanoparticule goale (descărcate) și nanoparticule obținute prin sinteza verde folosind extract de plantă.
- c) a fost observată o activitate citotoxică mai pronunțată asupra celulelor tumorale pentru nanoparticulele de aur încărcate cu lupeol.

În studiul cu gel de rutină s-au evidențiat:

- a) formularea a prezentat caracteristici de aplicabilitate biologică (mărime, potențial zeta, grad de încapsulare, pH, proprietăți reologice)
- b) studiul de biocompatibilitate pe țesutul epidermic uman reconstruit a evidențiat lipsa de toxicitate corelată cu viabilitatea, potențialul iritant și fototoxicitatea.
- c) rutinul a exercitat efecte toxice asupra celulelor tumorale (melanomul uman) exprimate prin scăderea viabilității celulare, inducerea fragmentării nucleare și modificarea morfologiei celulare fără a fi toxică asupra cheratinocitelor umane.

În concluzie, studiile experimentale reflectă contribuții originale care completează în principal datele existente privind profilul terapeutic al compușilor naturali și al formulărilor inovatoare.