

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
Departamentul II**

AVRAMESCU IULIA ANDREEA



**AUGMENTAREA PROPRIETĂȚILOR ANTITUMORALE
ALE COMPUȘILOR NATURALI PRIN
FUNCȚIONALIZARE CU OBTINERE DE
NANOSTRUCTURI CU ACȚIUNE ȚINTITĂ**

REZUMAT

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. DEHELEAN CRISTINA ADRIANA

**Timișoara
2021**

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	VI
LISTA CU ABREVIERI	VII
LISTA CU FIGURI ȘI TABELE	IX
DEDICAȚIE	XIX
MULȚUMIRI	XX
INTRODUCERE	1
PARTEA GENERALĂ	5
CAPITOLUL 1. PLANTELE CA SURSE DE NOI COMPUȘI CU POTENȚIAL TERAPEUTIC	5
1.1 INTRODUCERE	5
1.2 COMPUȘII NATURALI AGENȚI CHEMOTERAPEUTICI	8
1.3 COMPUȘII NATURALI CU POTENȚIAL ANTITUMORAL	11
1.4 COMPUȘII NATURALI AGENȚI CHEMOPREVENTIVI	18
1.5 COMPUȘII NATURALI ȘI REZISTENȚA LA MEDICAMENTE	20
CAPITOLUL 2. SISTEME INTELIGENTE DE FUNCȚIONALIZARE ȘI TRANSPORT A COMPUȘILOR BIOACTIVI	22
2.1 PLATFORME EFEICIENTE PENTRU ÎNCORPORAREA ȘI LIVRAREA COMPUȘILOR NATURALI	22
2.2 NANOPARTICULELE DE ARGINT CA AGENȚI DE DIAGNOSTIC ÎN CANCER	25
2.3 NANOPARTICULELE DE ARGINT ÎN TERAPIA CANCERULUI	27
PARTEA ORIGINALĂ DE CERCETARE	30
CAPITOLUL 3. COMPORTAMENTUL CELULELOR DE MELANOM ÎN PREZENȚA RUTINULUI ȘI A ACIDULUI BETULINIC – STUDIU <i>IN VITRO</i> PE CELULE 2D	30
3.1 INTRODUCERE	30
3.2 MATERIALE ȘI METODE	34
3.2.1 Reactivi	34
3.2.2 Linii celulare	34
3.2.3 Culturile celulare	34
3.2.4 Viabilitatea celulară	35
3.2.5 Morfologia celulară	35
3.2.6 Marcarea nucleară	36
3.2.7 Detectarea senescenței	36
3.2.8 Analiza statistică	36
3.3 REZULTATE	37
3.3.1 Viabilitatea celulară	37
3.3.2 Morfologia celulară	42
3.3.3 Marcarea nucleară	45
3.3.4 Senescence detection	51
3.4 DISCUȚII	51
3.5 CONCLUZII	56
CAPITOLUL 4. GEL PRONIOZOMAL PE BAZĂ DE RUTIN PENTRU APLICARE TOPICĂ - STUDIU <i>IN VITRO</i> PE CELULE 3D	57
4.1 INTRODUCERE	57
4.2 MATERIALE ȘI METODE	60

4.2.1 Reactivi	60
4.2.2 Prepararea și caracterizarea fizico-chimică a gelului proniozomal pe bază de rutin	60
4.2.3 Evaluarea pe țesuturi umane reconstruite 3D	62
4.2.4 Analiza statistică	65
4.3 REZULTATE	66
4.3.1 Caracterizarea gelului proniozomal pe bază de rutin	66
4.3.2 Profilul toxicologic al gelului proniozomal pe bază de rutin evaluat pe țesuturi umane reconstruite 3D	68
4.4 DISCUȚII	70
4.5 CONCLUZII	73
CAPITOLUL 5. NANOPARTICULE PE BAZĂ DE ARGINT ÎNCĂRCATE CU COMPUȘI BIOACTIVI ÎN CELULELE TUMORALE – STUDIU <i>IN VIVO</i> PE MODEL ANIMAL	74
5.1 INTRODUCERE	74
5.2 MATERIALE ȘI METODE	76
5.2.1 Chimicale și reactivi specifici	76
5.2.2 Linii celulare	76
5.2.3 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint	76
5.2.4 Culturile celulare	77
5.2.5 Analize de viabilitate și proliferare celulară	77
5.2.6 Modelul de melanom murin <i>in vivo</i>	78
5.2.7 Evaluarea non-invazivă a parametrilor pielii	79
5.2.8 Evaluarea histopatologică	79
5.2.9 Analiza statistică	79
5.2.10 Respectarea cerințelor de etică	80
5.3 REZULTATE	80
5.3.1 Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor pe bază de argint	80
5.3.2 Evaluările citotoxicității nanoparticulelor de argint încărcate cu betulină	83
5.3.3 Activitatea <i>in vivo</i> a nanoparticulelor de argint pe bază de betulină PEGilate	91
5.3.4 Evaluările citotoxicității nanoparticulelor de argint încărcate cu acid betunic	97
5.4 DISCUȚII	101
5.5 CONCLUZII	105
CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI CONCLUZII FINALE	106
BIBLIOGRAFIE	109

REZUMAT

Afecțiunile pielii, de la simple iritații la afecțiuni maligne, au prezentat în ultimii ani trăsături diversificate, mai ales datorită factorilor de mediu care au crescut atât ca număr cât și ca agresivitate. Melanomul malign este tipul de cancer de piele cu cea mai mică incidență dar cel mai agresiv, cu un prognostic extrem de scăzut, fiind și responsabil pentru marea majoritate a deceselor cauzate de cancerul de piele. În ciuda progreselor înregistrate în ultimii ani atât în ceea ce privește metodele de diagnostic, dar și abordările terapeutice, există încă, câteva dezavantaje legate de rezistența la chimioterapie tumorală și de reacțiile adverse severe exercitate de terapiile clasice. Cu scopul de a remedia aceste inconveniente, domeniul de cercetare al compușilor naturali este explorat intens pentru a găsi noi alternative eficiente și sigure pentru terapia cancerului. Compușii derivați din plante posedă efecte farmacologice multiple devenind candidați ca agenți antitumorali autentici. Rutinul (flavonoidă glicozilată) este un compus de origine naturală, care datorită structurii sale chimice, exercită o multitudine de efecte biologice benefice la nivel cutanat, precum: activitate antioxidantă și antiinflamatorie, și acționează totodată ca un filtru pentru radiațiile ultraviolete. Alți doi compuși de origine naturală, betulina și acidul betulinic (triterpene pentaciclice) sunt investigați pentru proprietățile lor de inducere a apoptozei în diferite celule tumorale.

O preocupare semnificativ crescută pentru bolile maligne, în special cele ale pielii, plămânilor și ficatului există la nivel mondial și implicit la noi în țară. Acest lucru poate fi atribuit necesității unei speranțe de viață prelungite prin tratamente adecvate și adoptarea unui stil de viață care diminuează factorii de risc. O serie de factori sunt asociați cu un risc crescut de apariție și evoluție a cancerului, cum ar fi: (i) mutațiile genetice, consumul de alcool, obezitatea și inactivitatea fizică, toate au fost legate de un risc crescut de cancer, (ii) hepatita virală cronică, ciroza, consumul de alcool și tutun sunt câteva dintre principalele cauze care duc la apariția carcinomului hepatocelular, (iii) fumatul, expunerea la compuși toxici (arsen, azbest etc.), poluarea mediului, utilizarea anumitor suplimente alimentare se traduc în cancer pulmonar. Tratamentele utilizate pentru fiecare dintre aceste patologii, prezintă diferențe în ceea ce privește mecanismul de acțiune, dar au ca trăsătură comună apariția reacțiilor adverse grave. Majoritatea reacțiilor adverse după chimioterapie sunt determinate de lipsa specificității agenților antitumorali față de celulele tumorale. Aceste efecte pot fi contracarate prin stabilirea unui tratament personalizat și prin fabricarea unor formulări optime care să asigure o livrare țintită a substanței active. Descoperirea unor formulări adecvate care să acționeze ca purtători țintiți ai substanței active și să-i sporească proprietățile benefice este un domeniu de interes în expansiune.

Reducerea efectelor secundare ale medicamentelor chimioterapeutice clasice este o provocare continuă pentru cercetătorii din domeniu. În prezent, dezvoltarea unor formulări care

cresc gradul de stabilitate și biodisponibilitate, împreună cu reducerea dozei, păstrarea activității biologice și reducerea efectelor adverse este o problemă de actualitate. În ciuda progreselor înregistrate în ultimii ani, este încă nevoie de multă muncă asiduă pentru a elucida mecanismele implicate în diferite patologii, noi și vechi. Prin urmare, specialiștii în domeniu lucrează constant la metode noi și eficiente de creștere a speranței de viață și a calității vieții bolnavilor de cancer.

Principalele obiective stabilite pentru teza de doctorat au fost: (i) analiza efectului citotoxic exercitat de compușii naturali, rutinul și acidul betulinic, asupra a trei tipuri diferite de celule melanom (studiu *in vitro* pe celule 2D) (ii) prepararea unei formulări pe bază de rutin pentru aplicare locală și evaluarea profilului său de siguranță prin metode moderne efectuate pe produse cu aplicabilitate dermo-cosmetică (studiu *in vitro* pe țesut uman reconstruit - celule 3D) și (iii) obținerea de nanoparticule metalice încărcate cu betulină și acid betulinic, cu eficacitate crescută împotriva celulelor melanomului (studiu *in vivo* - model murin de melanom) și a celulelor tumorale hepatice și pulmonare (studiu *in vitro* cu celule 2D).

Teza de doctorat este structurată conform normelor metodologice în patru părți principale: (i) partea generală, (ii) partea originală de cercetare, (iii) contribuții și concluzii personale și (iv) bibliografie. Partea generală cuprinde două capitole care descriu noțiunile actuale legate de: (a) plantele medicinale ca surse de noi compuși cu potențial terapeutic și (b) sisteme inteligente de funcționalizare și transport de compuși biologic activi.

Partea originală de cercetare, care cuprinde cele trei studii experimentale (obiective, metodologie și rezultate), arată: (a) contribuțiile legate de comportamentul liniilor celulare de melanom în urma stimulării cu compușii de origine naturală, rutinul și acidul betulinic; (b) prepararea unui gel proniozomal încărcat cu rutin cu profil toxicologic sigur pentru utilizare locală în afecțiunile pielii și (c) sisteme teranostice de nanoparticule de argint pe bază de betulină și acid betulinic evaluate în ceea ce privește potențialul antimelanom și efectele citotoxice exercitate asupra altor tipuri de celule tumorale (carcinom hepatocelular și pulmonar). Partea finală a tezei integrează concluziile și contribuțiile personale, precum și referințele bibliografice citate, curente care au fost studiate pentru documentarea de fond, selecția metodelor de cercetare aplicate și pentru interpretarea rezultatelor obținute. Partea experimentală a tezei a fost realizată folosind metode standard validate la nivel internațional.

Primul studiu s-a axat pe evaluarea *in vitro* a doi compuși naturali, rutinul (RUT) și acidul betulinic (BA) în ceea ce privește potențialul citotoxic în celulele umane sănătoase (HaCaT) și melanom (A375, RPMI-7951 și SK-MEL-28). Potențialul citotoxic al RUT și BA a fost evaluat prin monitorizarea unor parametri specifici, cum ar fi: viabilitatea celulară, morfologia celulară și nucleară. Pentru a verifica impactul compușilor de testat asupra viabilității celulelor au fost aplicate două metode colorimetrice standardizate, MTT ((bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) și albastru Alamar, teste care oferă date privind procentul de celule viabile active

metabolic capabile să transforme MTT în formazan și respectiv resazurin în resorufin fluorescent (figurile 1 și 3). Modificările induse de compușii de testat asupra caracteristicilor morfologice celulare au fost monitorizate microscopic în câmp luminos și prin realizarea de fotografii la 24 h post stimulare. Modificările nucleare în urma tratamentului cu compușii de testat (timp de 24 de ore) au fost evidențiate prin intermediul colorației nucleare Hoechst 33342 (exemplificare în figura 2). Potențialul de inducere a senescentei al RUT a fost verificat prin intermediul unei metode validate, test de colorare X-Gal. Cei doi compuși au declanșat un efect citotoxic selectiv dependent de doză în celulele melanomului, caracterizat prin caracteristici apoptotice. În plus, RUT a prezentat un efect de inducere a senescentei, ce a fost evidențiat prin expresia crescută a SA-β-gal (beta-galactozidază asociată senescentei) în celulele melanomului SK-MEL-28. Rutinul exercită un profil citotoxic selectiv *in vitro*, după cum urmează: (i) fără impact dăunător asupra celulelor sănătoase – keratinocite umane imortalizate (celule HaCaT) în ceea ce privește viabilitatea celulară, morfologia celulară și nucleară la concentrațiile testate (1-50 μM) și (ii) un efect citotoxic în celulele melanomului uman (A375, RPMI-7951 și SK-MEL-28) dependent de concentrație și tipul celulei: A375 (IC₅₀ = 8.601 μM) > SK-MEL-28 (IC₅₀ = 47.44 μM) > RPMI-7951 (IC₅₀ = 64.49 μM).

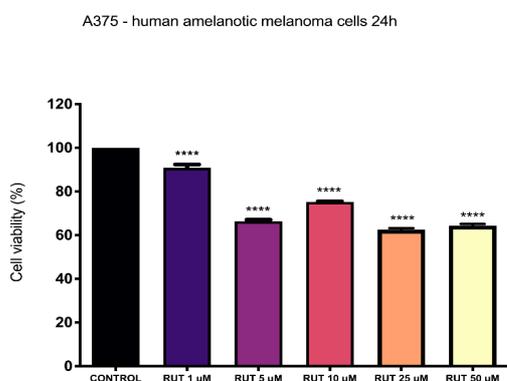


Figura 1. Evaluarea *in vitro* a activității rutinului (RUT) asupra viabilității celulelor melanomului uman (A375) după un tratament de 24 de ore cu cinci concentrații diferite (1, 5, 10, 25 și 50 μM) efectuată prin testul Alamar Blue. Rezultatele sunt prezentate ca procent (%) de celule viabile normalizate la celulele martor și sunt exprimate ca valori medii ± abaterea standard (SD) a trei teste independente efectuate în triplicat. Diferențele statistice (între celulele netratate și cele tratate) au fost calculate prin analiza ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul lui Tukey (****p < 0.0001).

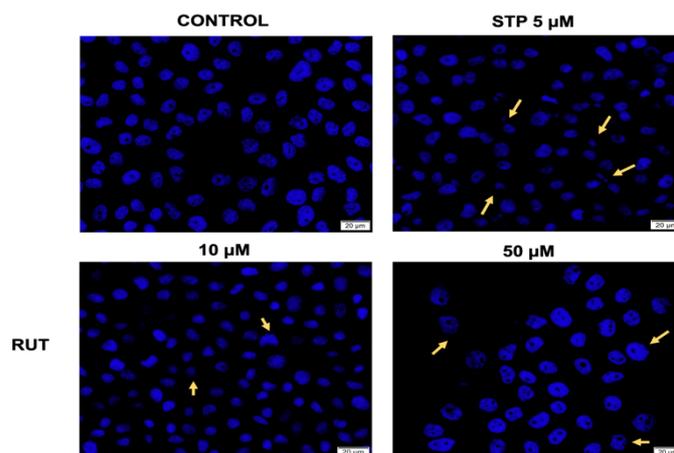


Figura 2. Marcare nucleară folosind Hoechst 33342 în celulele melanomului uman (A375) după tratamentul cu rutin (RUT) la două concentrații diferite (10 și 50 μM) timp de 24 de ore. Controlul pozitiv pentru modificările apoptotice la nivel nuclear a fost soluția de Staurosporină (STP) 5 μM , iar săgețile galbene evidențiază celulele apoptotice cu fragmentare nucleară. Bara de scară a fost de 20 μM .

Efectul citotoxic indus de rutin în celulele melanomului a fost caracterizat prin următoarele caracteristici: o scădere dependentă de doză a procentului de viabilitate celulară, modificări ale morfologiei celulelor (forma rotundă, celule plutitoare, pierderea aderenței și o confluență redusă) și semne nucleare specifice apoptotice (condensarea cromatinei, fragmentarea nucleară și blebbing). Tratamentul *in vitro* cu rutin declanșează capacitatea de pro-senescență în celulele melanomului uman SK-MEL-28 - un nou mecanism potențial de acțiune antimelanom.

Cele mai mari concentrații de BA (25 și 50 μM) au indus o reducere a keratinocitelor umane imortalizate - viabilitatea celulelor HaCaT, modificări ale morfologiei celulelor (celule rotunde și plutitoare) și fragmentare nucleară. Acidul betunic a dovedit un efect citotoxic dependent de doză în celulele melanomului uman A375 ($\text{IC}_{50} = 16.91 \mu\text{M}$) caracterizat printr-o scădere semnificativă a viabilității celulelor, modificări morfologice atât la nivel celular (celule rotunde plutitoare, pierderea aderenței celulare, resturile celulare și o confluență diminuată) și la nivel nuclear (condensarea cromatinei, fragmentarea nucleară și prezența corpurilor apoptotici). Tratamentul cu acid betunic a declanșat un efect citotoxic similar dependent de doză în celelalte două tipuri de celule de melanom uman, RPMI-7951 și SK-MEL-28, scăderea viabilității celulelor fiind mai pronunțată în cazul celulelor RPMI-7951 (figura 3).

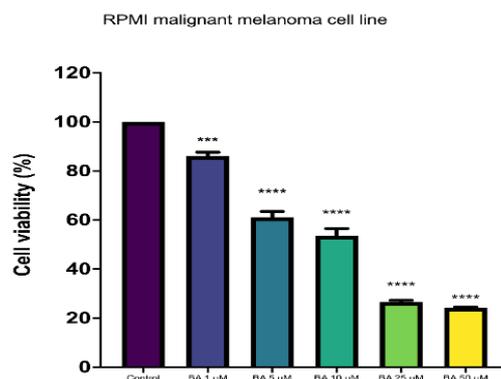


Figura 3. Evaluarea *in vitro* a activității acidului betulinic (BA) asupra viabilității celulelor melanomului uman (RPMI-7951) după un tratament de 24 de ore cu cinci concentrații diferite (1, 5, 10, 25 și 50 μM) efectuată prin test MTT. Rezultatele sunt prezentate ca procent (%) de celule viabile normalizate la celulele martor și sunt exprimate ca valori medii ± abaterea standard (SD) a trei teste independente efectuate în triplicat. Diferențele statistice (între celulele netratate și cele tratate) au fost calculate prin analiza ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul lui Tukey (* $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ și **** $p < 0.0001$).

Rutinul (RUT), o quercetină ramnoglucozidică, cunoscută și sub denumirea de soforină, rutozidă sau quercetin-3-rutinozidă, poate fi găsită în natură (citrice, legume, ceai negru, mere, hrișcă, ceai verde etc.) și pe baza structurii chimice a acesteia îndeplinește profilul unui compus antioxidant valoros. RUT (moleculă polifenolică hidrofobă) face parte din marea clasă de flavonoide, una dintre cele mai studiate clase de compuși derivați din plante datorită proprietăților lor antioxidante. Această moleculă mică și-a câștigat locul în diferite studii care au vizat evaluarea potențialului său ca agent natural activ formulat atât ca produse farmaceutice, cât și cosmetice datorită efectelor sale farmacologice și biochimice multispectrale, în special antioxidante, antiinflamatorii și antitumorale (figura 4).

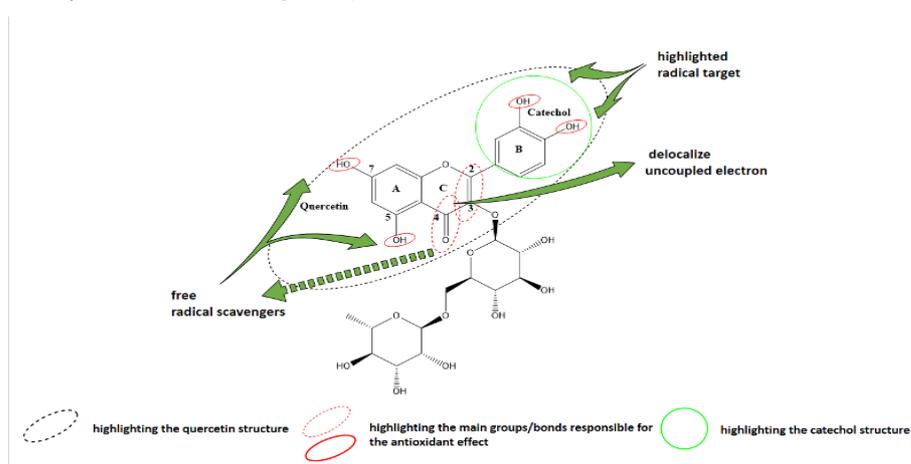


Figura 4. Structura chimică a rutinului (RUT) cu evidențierea grupărilor funcționale responsabile de efectul antioxidant.

În ciuda proprietăților farmacologice multiple ale RUT, aplicarea sa *in vivo* este limitată de solubilitatea foarte scăzută în medii apoase și de stabilitatea sa scăzută în fluidele biologice. Pentru

a remedia aceste inconveniente legate de administrarea RUT *in vivo*, al doilea studiu al tezei a fost orientat spre obținerea și caracterizarea unei nanoformulări inovatoare a RUT pentru aplicare topică – un gel proniozomal (figura 5).

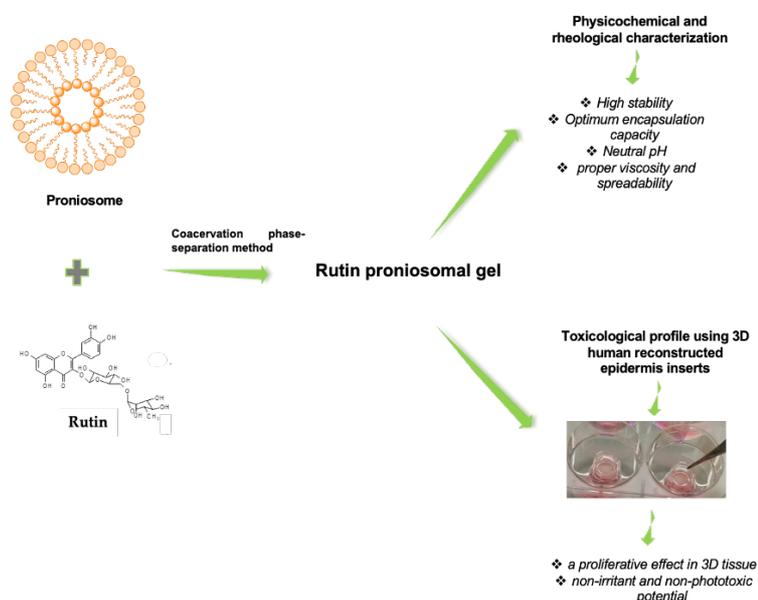


Figura 5. Schema protocolului aplicat în studiu

Gelul proniozomal a fost preparat prin metoda coacervare-separare a fazelor, o metodă descrisă frecvent în literatura de specialitate pentru prepararea gelurilor proniozomale ale diferiților agenți terapeutici. Gelul proniozomal pe bază de RUT obținut respectă cerințele standard în ceea ce privește dimensiunea particulelor (140.5 ± 2.56 nm), potențial zeta (-27.33 ± 0.09 mV), capacitate de încapsulare ($> 50\%$), pH (7.002 ± 0.18) și proprietățile reologice (comportament de subțiere-tixotrop, capacitate crescută de penetrare, vâscozitate și consistență optime și ușurință în aplicare) tipice ale preparatelor semisolide de uz medical. Evaluarea toxicologică a gelului a fost efectuată pe țesuturi de epidermă umană reconstruită 3D, o metodă alternativă *in vitro* la studiile *in vivo*, care a fost validată și inclusă în ghidurile internaționale pentru evaluarea dispozitivelor medicale. Gelul a prezentat un profil de siguranță *in vitro* care arată o biocompatibilitate ridicată în modelul de epidermă umană reconstruită 3D, caracterizat printr-o viabilitate crescută a celulelor și o lipsă de potențial iritant și fototoxic.

Cel de-al treilea studiu al tezei a constat în sinteza și caracterizarea (fizico-chimică și toxicologică) a nanoparticulelor de argint și a nanoparticulelor de argint PEGilate ca transportori de medicamente pentru betulină (B) și acid betulinic (BA), doi compuși naturali antitumorali foarte activi și cu o solubilitate slabă în medii apoase (figura 6).

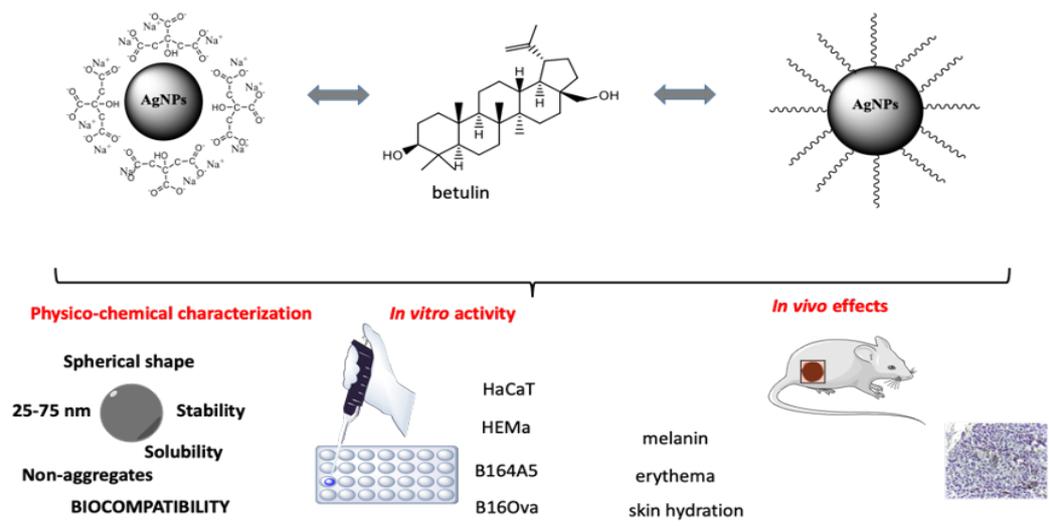


Figura 6. Procolul schematic al studiului *in vivo*

Nanoparticulele de argint simple și încărcate cu compuși activi au fost sintetizate prin aplicarea unei metode consacrate – procedeul Turkevich și au fost caracterizate folosind tehnici standard ca TEM, SEM, UV-VIS, DLS, etc. Nanoparticulele obținute au fost stabile, au prezentat forme sferice și diametre medii hidrodinamice în intervalul 25 nm și 75 nm.

Profilul toxicologic al AgNPs încărcate cu betulină și PEG_AgNPs a fost analizat atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Pentru evaluarea *in vitro*, experimentele au fost efectuate pe celule umane sănătoase (HaCaT – keratinocyte umane imortalizate și HEMa – melanocyte umane primare) și pe celule de melanom murin (B164A5 și B16Ova) folosind metoda MTT și testul Annexin V-FTIC (kit de detectare a apoptozei).

AgNPs simple s-au dovedit a fi foarte citotoxice *in vitro* după un tratament de 72 de ore atât pe celule sănătoase (keratinocyte umane - HaCaT și melanocyte umane primare - HEMA) cât și pe celulele melanomului murin (B164A5 și B16Ova) într-o manieră dependentă de doză și tip de celule, după cum urmează: HEMA ($IC_{50} = 26 \mu M$) > HaCaT ($IC_{50} = 40 \mu M$) > B164A5 ($IC_{50} = 70.81 \mu M$) > B16Ova ($IC_{50} = 73.07 \mu M$).

PEG_AgNPs simple s-au dovedit a fi mai citotoxice după tratamentul de 72 de ore pe celulele melanomului murin (B164A5 și B16Ova) în comparație cu AgNPs și mai puțin citotoxice pe celulele sănătoase (keratinocyte umane - HaCaT și melanocyte umane primare - HEMA), ceea ce arată un comportament toxic selectiv orientat spre celulele tumorale: B16Ova ($IC_{50} = 17 \mu M$) > B164A5 ($IC_{50} = 28.44 \mu M$) > HaCaT ($IC_{50} = 31.77 \mu M$) > HEMA ($IC_{50} = 39.73 \mu M$).

PEG_AgNPs încărcate cu betulină au prezentat cel mai sigur profil toxicologic *in vitro* pentru celulele sănătoase (keratinocyte umane - HaCaT și melanocyte umane primare - HEMA) și un efect citotoxic puternic asupra celulelor melanomului murin în comparație cu AgNPs încărcate cu betulină și betulina ca atare. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au exercitat un efect pro-apoptotic

dependent de doză, inducând apoptoză tardivă și necroză în celulele melanomului murin după tratamentul de 72 de ore. În plus, PEG_AgNP_B au scăzut semnificativ viabilitatea celulelor de carcinom pulmonar uman - A549 și carcinom hepatocelular - HepG2 după un tratament de 24 și 48 de ore cu 10 μ M în comparație cu AgNPs încărcate cu betulină și betulina simplă.

Potențialul antitumoral *in vivo* al PEG_AgNPs încărcate cu betulină a fost verificat într-un model de melanom murin de șoarece folosind tehnici neinvazive pentru supravegherea modificărilor fiziologice ale parametrilor pielii și examinarea histopatologică a organelor recoltate. Un model animal reproductibil de melanom murin a fost dezvoltat folosind șoareci femele C57BL/6J și o suspensie de celule B164A5 inoculate subcutanat. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au exercitat potențial antimelanom *in vivo*, deoarece lotul de șoareci tratat (grupul D) a prezentat mase tumorale reduse, prezența unor zone mari de necroză, fenotip modificat al celulelor tumorale (de la celule epitelioide agresive la cele mai puțin invazive cu formă fuziformă) și o cantitate crescută de melanină intracitoplasmatică ca semn al unui răspuns bun la terapie. Nu au fost detectate semne de metastază în grupul de șoareci tratat (PEG_AgNPs încărcate cu betulină – grupul D). Rezultatele *in vitro* și *in vivo* susțin utilizarea în siguranță a PEG_AgNPs încărcate cu betulină și obținute în condițiile experimentale descrise.

Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de argint cu BA (simple și PEGilate) a arătat următoarele rezultate: AgNPs și PEG_AgNPs nou sintetizate au prezentat o formă sferică și nano-dimensiuni optime, în intervalul 21 – 68 nm (pentru AgNPs simple și încărcate) și 53 – 75 nm (pentru PEG_AgNPs simple și încărcate).

În cazul nanoparticulelor de argint încărcate cu BA, evaluarea biologică a fost efectuată pe două modele experimentale *in vitro* - linii celulare de carcinom hepatocelular (HepG2) și cancer pulmonar (A549), folosind testul Alamar albastru pentru evaluarea impactului nanoparticulelor asupra viabilității celulelor.

AgNPs încărcate cu BA s-au dovedit a fi mai citotoxice *in vitro* la o concentrație de 10 μ M (după 24 și 48 de ore) pentru celulele de carcinom hepatocelular uman (HepG2) și pulmonar (A549), în comparație cu PEG_AgNPs încărcate cu BA și acidul betulinic.

Evaluarea *in vitro* a evidențiat un efect citotoxic dependent de tipul celulei și de timp, caracterizat printr-o scădere a viabilității celulare, după cum urmează: (i) AgNPs_BA (66.44%) < PEG_AgNPs_BA (72.05%) < BA_DMSO (75.30%) în celulele HepG2 și (ii) AgNPs_BA (75.28%) < PEG_AgNPs_BA (86.80%) < BA_DMSO (87.99%) în celulele A549. Noii nanocoloizi de argint încărcăți cu BA au indus un efect antitumoral crescut în comparație cu BA singur.

CONCLUZII FINALE

COMPORTAMENTUL CELULELOR DE MELANOM ÎN PREZENȚA RUTINULUI ȘI A ACIDULUI BETULINIC – STUDIU IN VITRO PE CELULELE 2D

1. Rutinul exercită un profil citotoxic selectiv *in vitro*, după cum urmează: (i) fără impact dăunător asupra celulelor sănătoase – keratinocite umane imortalizate (celule HaCaT) în ceea ce privește viabilitatea celulară, morfologia celulară și nucleară la concentrațiile testate (1-50 μM).) și (ii) un efect citotoxic în celulele melanomului uman (A375, RPMI-7951 și SK-MEL-28) dependent de concentrație și tipul celulei: A375 ($\text{IC}_{50} = 8.601 \mu\text{M}$) > SK-MEL-28 ($\text{IC}_{50} = 47.44 \mu\text{M}$) > RPMI-7951 ($\text{IC}_{50} = 64.49 \mu\text{M}$).
2. Efectul citotoxic indus de rutin în celulele melanomului a fost caracterizat prin următoarele caracteristici: o scădere dependentă de doză a procentului de viabilitate celulară, modificări ale morfologiei celulelor (forma rotundă, celule plutitoare, pierderea aderenței și o confluență redusă) și semne apoptotice specifice nucleare (condensarea cromatinei, fragmentarea nucleară și blebbing).
3. Tratamentul *in vitro* cu rutin declanșează capacitatea pro-senescentă în celulele melanomului uman SK-MEL-28 – ***un nou mecanism potențial de acțiune antimelanom.***
4. Cele mai mari concentrații de BA (25 și 50 μM) au indus o reducere a keratinocitelor umane imortalizate - viabilitatea celulelor HaCaT, modificări ale morfologiei celulelor (celule rotunde și plutitoare) și fragmentare nucleară.
5. Acidul betunic a dovedit un efect citotoxic dependent de doză în celulele melanomului uman A375 ($\text{IC}_{50} = 16.91 \mu\text{M}$) caracterizat printr-o scădere semnificativă a viabilității celulelor, modificări morfologice atât la nivel celular (celule rotunde plutitoare, pierderea adeziunii celulare, resturile celulare și o confluență redusă) și nivel nuclear (condensarea cromatinei, fragmentarea nucleară și prezența corpurilor apoptotice).
6. Tratamentul cu acid betunic a declanșat un efect citotoxic similar, dependent de doză, în celelalte două tipuri de celule melanom umane, RPMI-7951 și SK-MEL-28, scăderea viabilității celulelor fiind mai pronunțată în cazul celulelor RPMI-7951.

GEL PRONIOZOMAL PE BAZĂ DE RUTIN PENTRU APLICARE TOPICĂ – STUDIU IN VITRO PE CELULE 3D

1. Rutinul a fost încărcat într-o formulare inovatoare pentru aplicare topică – un gel proniozomal obținut prin metoda de coacervare-separare a fazelor.
2. Gelul proniozomal pe bază de rutin obținut a prezentat proprietăți fizico-chimice și reologice optime pentru formulările semisolide utilizate în scopuri biomedicale, precum: un pH neutru, o stabilitate ridicată, un comportament de subțiere-tixotrop, capacitate crescută de penetrare, vâscozitate și consistență optime, și ușurință în aplicare.

3. Evaluarea profilului toxicologic al gelului proniozomal pe bază de rutin folosind țesuturi de epidermă umană reconstruită 3D a indicat un profil de siguranță pentru formula nouă de RUT pentru aplicare topică, deoarece nu s-a observat nicio afectare în ceea ce privește viabilitatea țesuturilor și lipsa potențialului iritant și fototoxic.

NANOPARTICULE PE BAZĂ DE ARGINT ÎNCĂRCATE CU COMPUȘI BIOACTIVI ÎN CELULELE TUMORALE – STUDIU IN VIVO PE MODEL ANIMALE

1. AgNPs și PEG_AgNPs stabile, simple și încărcate cu betulină și acid betulinic au fost sintetizate prin metoda lui Turkevich adaptată.
2. AgNPs și PEG_AgNPs nou sintetizate au prezentat o formă sferică și nano-dimensiuni optime, în intervalul 21 – 68 nm pentru AgNPs simple și încărcate și între 53 – 75 nm pentru PEG_AgNPs.
3. AgNPs simple s-au dovedit a fi foarte citotoxice *in vitro* după un tratament de 72 de ore atât pe celule sănătoase (keratinocite umane - HaCaT și melanocite umane primare - HEMa) cât și pe celulele melanomului murin (B164A5 și B16Ova) într-o manieră dependentă de doză și tip de celule, după cum urmează: HEMa ($IC_{50} = 26 \mu M$) > HaCaT ($IC_{50} = 40 \mu M$) > B164A5 ($IC_{50} = 70.81 \mu M$) > B16Ova ($IC_{50} = 73.07 \mu M$).
4. PEG_AgNPs simple s-au dovedit a fi mai citotoxice după tratamentul de 72 de ore pe celulele melanomului murin (B164A5 și B16Ova) în comparație cu AgNPs și mai puțin citotoxice pe celulele sănătoase (keratinocite umane - HaCaT și melanocite umane primare - HEMa), ceea ce arată un comportament toxic selectiv orientat către celulele tumorale: B16Ova ($IC_{50} = 17 \mu M$) > B164A5 ($IC_{50} = 28.44 \mu M$) > HaCaT ($IC_{50} = 31.77 \mu M$) > HEMa ($IC_{50} = 39.73 \mu M$).
5. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au prezentat cel mai sigur profil toxicologic *in vitro* pentru celulele sănătoase (keratinocite umane - HaCaT și melanocite umane primare - HEMa) și un efect citotoxic puternic asupra celulelor melanomului murin în comparație cu AgNPs încărcate cu betulină și betulina ca atare.
6. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au exercitat un efect pro-apoptotic dependent de doză, inducând apoptoză tardivă și necroză în celulele melanomului murin după tratamentul de 72 de ore.
7. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au scăzut semnificativ viabilitatea celulelor carcinomului pulmonar uman – A549 și carcinomului hepatocelular – HepG2 după un tratament de 24 și 48 de ore cu $10 \mu M$ în comparație cu AgNPs încărcate cu betulină și betulina simplă.
8. Un model animal reproductibil de melanom murin a fost dezvoltat utilizând șoareci femele C57BL/6J și celule B164A5 inoculate subcutanat.

9. PEG_AgNPs încărcate cu betulină au prezentat potențial antimelanom *in vivo* deoarece lotul de șoareci tratat (grupa D) a prezentat mase tumorale reduse, prezența unor zone mari de necroză, fenotipul modificat al celulelor tumorale (de la celule epitelioide agresive la cele mai puțin invazive fuziforme) și o cantitate crescută de melanină intracitoplasmatică ca semn al unui răspuns bun la terapie.
10. Nu au fost detectate semne de metastază la lotul de șoareci tratat (PEG_AgNPs încărcate cu betulină – grupul D).
11. Rezultatele *in vitro* și *in vivo* susțin utilizarea în siguranță a PEG_AgNPs încărcate cu betulină și obținute în condițiile experimentale descrise.
12. AgNPs încărcate cu BA s-au dovedit a fi mai citotoxice *in vitro* la o concentrație de 10 μ M (după 24 și 48 de ore) pentru celulele de carcinom hepatocelular uman (HepG2) și pulmonar (A549) în comparație cu PEG_AgNPs încărcate cu BA și acidul betulinic ca atare.