

Raport științific PD 93/2022

Etapa III 2024

Efectele protectoare ale PTX-UA PMs împotriva mucozitei intestinale induse de chimioterapie

I. Rezumatul etapei:

Raportul științific al acestei etape detaliază cercetarea privind efectele protectoare ale unui nou sistem de micle polimerice încărcate cu Paclitaxel-ursolic (PTX-UA PMs) împotriva mucozitei intestinale induse de chimioterapie. În prima activitate din această etapă, respectiv **Activitatea 3.1.**, s-a efectuat analiza histopatologică a jejunului și colonului, evidențiind creșteri semnificative ale celulelor caliciforme în jejun și colon în loturile tratate, în special cu PTX-UA PMs. În cadrul **Activității 3.2.** a fost analizată expresia Muc-1 și Muc-4 care a fost restabilită prin tratamentele PTX-UA PMs, sugerând un efect protector asupra secreției de mucus. În **Activitatea 3.3.** a fost efectuat testul TUNEL care a arătat o reducere a apoptozei în grupul tratat cu PTX-UA PMs. **Activitatea 3.4.** a vizat analiza jejunului și colonului prin microscopie electronice, confirmând conservarea ultrastructurii celulare în grupurile tratate. Ultima **Activitate 3.5.**, a presupus diseminarea rezultatelor sub forma unei prezentări orale la o conferință națională/internațională și publicarea a două articole în reviste cotate ISI.

Formulările PTX-UA PMs s-au dovedit a oferi o protecție semnificativă împotriva alterărilor morfo-funcționale intestinale induse de chimioterapie.

II. Descrierea științifică

Activitatea 3.1. Analiza histopatologică

Jejunul proximal și colonul ușor au fost fixate în paraformaldehidă în PBS 4%, procesate și apoi încorporate în parafină, tăiate în secțiuni de 5 μ m, colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) și Alcian Blue pentru a evidenția mucusul eliberat de celulele caliciforme (Figura 1A și 2).

Toate celulele caliciforme din vilozitățile și criptele jejunului și colonului au fost numărate pe lamele colorate cu albastru Alcian (Figura 1). În grupul tratat cu doza mică de PTX-PMs, numărul total al celulelor caliciforme a crescut semnificativ cu 0,85 ori în jejun și 0,96 ori în colon comparativ cu grupul tratat cu PTX neformat. La doza mai mare, PTX-PMs a determinat o creștere semnificativă statistic a numărului de celule caliciforme în jejun ($p < 0,01$) și colon ($p < 0,001$) comparativ cu doza echivalentă a medicamentului neformat. În mod remarcabil, grupul tratat cu PTX-UA-PMs la doza mai mare a prezentat o creștere semnificativă a celulelor

caliciforme atât în jejun ($p < 0,01$), cât și în colon ($p < 0,001$), comparativ cu doza mai mare de PTX (Figura 1 B și 2B).

În ceea ce privește analiza histomorfometrică, s-a înregistrat o diminuare semnificativă a înălțimii vilozităților intestinale doar în cazul administrării dozei mari de PTX, iar tratamentele nu au determinat o modificare semnificativă a acestora (Figura 1 C).

Activitatea 3.2. Analiza mucinelor din compoziția mucusului

Expresia atât a Muc-1 cât și a Muc-4 este semnificativ redusă în urma tratamentelor cu PTX (Paclitaxel), dar formulările sale și combinațiile cu UA determină o creștere față de tratamentele cu PTX neformat (Figura 3).

Expresia imunohistochimică a Muc-1 și a Muc-4 la nivelul colonului demonstrează că tratamentele cu micle restabilesc secreția celulelor caliciforme comparativ cu tratamentele PTX neformat. Acestea sunt mai evidente în cazul analizei genice pentru Muc-4 care este caracteristică colonului, unde doza mare de PTX-UA-PMs a determinat o creștere semnificativă a expresiei genice a Muc-4 comparativ cu PTX neformat. De asemenea, s-au obținut rezultate pozitive semnificative pentru PTX format în micle la doza mare, comparativ cu doza echivalentă non-formată (Figura 4A,B).

Activitatea 3.3. Analiza celulelor intestinale epiteliale apoptotice prin testul TUNEL

Detectarea fragmentării ADN-ului nuclear în secțiuni de țesuturi de jejun și colon a fost realizată utilizând Kitul de Detectare In Situ a Apoptozei de la Calbiochem (EMD Chemicals, San Diego, CA, SUA). Metoda folosită a fost testul TUNEL (marcarea terminală deoxinucleotidică mediată de TdT cu dUTP), conform instrucțiunilor producătorului. Acest test implică încorporarea nucleotidelor biotinate în ADN-ul fragmentat, care apoi este detectat prin legarea de streptavidină-peroxidază de hrean (HRP). Reacția cu diaminobenzidina (DAB) produce un precipitat maro-închis la locurile fragmentării ADN-ului. Nucleii au fost contracolorați folosind o soluție de verde metil inclusă în kit.

Activitatea 3.4. Analiza epiteliului intestinal prin microscopie electronică

Probele de jejun și colon pentru microscopie electronică au fost prefixate cu soluție de glutaraldehidă 2,7% în tampon fosfat 0,1M, spălate cu tampon fosfat 0,15M (pH 7,2) și postfixate cu soluție de acid osmic 2% în tampon fosfat 0,15M. Ulterior, probele au fost deshidratate cu acetonă, incluse în rășină epoxidică Epon 812 și dublu contrastate cu acetat de uranil și citrat de plumb. Pentru obținerea secțiunilor s-a utilizat cu ultramicrotomul Leica EM UC7, iar analizarea imaginilor s-a efectuat cu ajutorul microscopului electronic TEM Tecnai 12 Biotwin.

Micrografiile electronice ale jejunului din lotul de control (Figura 6B) au evidențiat prezența unui aspect ultrastructural normal al enterocitelor, cu microvili intacti la marginile luminală și celule caliciforme normale intercalate între enterocite, la ambele momente analizate. Microscopia electronică a jejunului grupului tratat cu PTX neformat au arătat unele enterocite alterate, cu citoplasmă vacuolizată, cisterne RER dilatate și mitocondrii deteriorate. Celulele

caliciforme au prezentat o secreție redusă de mucină comparativ cu grupul de control. Alterarea ultrastructurii colonului a fost de asemenea observată (Figura 6A) și a afectat atât enterocitele, cât și, în special, celulele caliciforme, cu o scădere a granulelor de mucine. Tratamentul cu complexe formulate PTX și PTX-UA a determinat conservarea ultrastructurii jejunului și colonului aproape de cea de control.

Activitatea 3.5. Diseminare

Raportul științific a fost încărcat pe site-ul web al proiectului (<https://proiecte.uvvg.ro/PTXUA-PM/>), iar rezultatele au fost diseminate prin participarea la o conferință națională/internațională și publicarea a două articole în reviste indexate ISI:

Conferințe:

1. **Herman H**, Atanase L, Hermenean A. *In vivo antitumor efficacy of the of the novel dual PTX-ursolic acid loaded polymeric micellar system (PTX-UA PMs) against breast cancer*, Arad Academic Days, XXXIV-nd Edition, May 22-25, 2024 ISSN 3008-6701 – prezentare orală

Articole ISI:

1. **Herman H**, Rata DM, Cadinoiu AN, Atanase LI, Hermenean A. Colloidal and Biological Characterization of Dual Drug-Loaded Smart Micellar Systems. *Polymers (Basel)*. 2024;16(9):1189. doi: 10.3390/polym16091189. PMID: 38732658; PMCID: PMC11085147.
2. **Herman H**, Balta C, Ciceu A, Mladin B, Duma MA, Rosu M, Trotta MC, Condruc IP, Atanase LI, D'Amico M, Hermenean A. Synergistic anticancer and protective effects of ursolic acid and paclitaxel coencapsulation in polymeric micelles: targeting NF- κ B, Bax/Bcl-2 pathways, and reducing intestinal mucositis in triple-negative breast cancer, *Biochemical Pharmacology*, 2024 (în evaluare; BP-S-24-04410).

Gradul de realizare a obiectivelor

Obiectiv 1. Proiectarea, dezvoltarea și caracterizarea unui nou sistem dual de micle polimerice inteligente încărcate cu PTX-acid ursolic (PTX-UA PMs). – Activitățile: 1.1, 1.2, 1.3 (2022) – grad de realizare 100%

Obiectiv 2. Evaluarea *in vitro* și validarea *in vivo* a efectelor antitumorale ale noilor PTX-UA PMs împotriva cancerului de sân. – Activitățile: 1.4, 1.5 (2022), 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.8 (2023), 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 (2024) – grad de realizare 100%

Livrabile realizate:

Livrabilele realizate în această primă etapă sunt reprezentate de:

- obținerea de imagini de microscopie optică pentru jejun și colon (Activitatea 3.1.);
- obținerea de imagini de microscopie optică pentru markerii imunohistochimici mucina 1 și mucina 4 (Activitatea 3.2.);
- obținerea de imagini prin testul TUNEL în cazul jejunului și colonului (Activitatea 3.3.)

- obținerea de imagini de microscopie electronică pentru jejun și colon (Activitatea 3.4.);
- diseminarea rezultatelor obținute sub forma a unei prezentări orale la o conferință națională/internațională (Activitatea 3.5.);
- publicarea a două articole în reviste indexate ISI (Activitatea 3.5).

Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor:

Participarea la o conferință națională/internațională.

Publicarea a 2 articole în reviste indexate ISI.

Director Proiect,
Dr. Herman Hildegard

