

## RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

<b>Competiția:</b>	<b>Proiecte postdoctorale - PD 2021</b>
Nr. contract:	PD 93
Cod proiect:	<i>PN-III-P1-1.1-PD-2021-0346</i>
Titlul :	Un nou sistem dual de miclele polimerice inteligente încărcate cu paclitaxel și acid ursolic pentru tratamentul eficient al cancerului de sân
Acronim:	PTXUA-PM
Data începere proiect:	01/04/2022
Data finalizare proiect:	30/09/2024
Durata (luni):	30
Buget total:	250.000,00
Sursa 1 Bugetul de stat	250.000,00
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanțare):	-
Pagina web proiect:	<a href="https://proiecte.uvvg.ro/PTXUA-PM/">https://proiecte.uvvg.ro/PTXUA-PM/</a>
Instituția coordonatoare:	Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad
Director de proiect:	Dr.Hildegard Herman

### Obiectivele prevăzute/realizate

Scopul general al acestui proiect a fost de a dezvolta și testa un nou sistem drug delivery bazat pe încapsularea dublă a paclitaxelului și a acidului ursolic în miclele polimerice inteligente în vederea îmbunătățirii solubilității paclitaxelului, reducerea chimiorezistenței, creșterea biodisponibilității și a eficacității terapeutice a acestuia, dar și pentru diminuarea efectelor mucozitei intestinale induse de chimioterapie.

**Obiectiv 1.** Proiectarea, dezvoltarea și caracterizarea unui nou sistem dual de miclele polimerice inteligente încărcate cu PTX-acid ursolic (PTX-UA PMs).

**Obiectiv 2.** Evaluarea *in vitro* și validarea *in vivo* a efectelor antitumorale ale noilor PTX-UA PMs împotriva cancerului de sân.

**Gradul de indeplinire al obiectivelor: 100%**

### Rezumat rezultate:

În etapa 1. am realizat dezvoltarea și caracterizarea unui nou sistem dual de miclele polimerice inteligente încărcate cu paclitaxel și acid ursolic (PTX-UA PMs), precum și evaluarea efectelor citotoxice *in vitro* ale PTX-UA PMs. În **Activitatea 1.1** am obținut o serie de miclele polimerice încărcate cu PTX, UA și PTX+UA. La pregătirea miclelelor polimerice am utilizat doi copolimeri cu mase moleculare diferite (JPL12 și JPL7) și am aplicat diferite rapoarte de

medicament/copolimer. În continuare în cadrul **Activității 1.2** au fost caracterizate toate variantele de micle polimerice obținute. S-au determinat dimensiunile micelilor prin măsurători de difuzie dinamică a luminii (DLS); morfologia micelilor prin microscopie TEM și interacțiunea dintre medicamente și copolimer prin spectroscopie în infraroșu (FTIR). Am continuat caracterizarea micelilor polimerice în **Activitatea 1.3** prin determinarea eficienței de încapsulare. Pe baza rezultatelor obținute am ales să testăm în cadrul studiilor *in vitro* micellele polimerice cu raport de medicament/copolimer 1/10. Pentru experimentele *in vitro* și de asemenea *in vivo* folosim linia celulară de șoarece de carcinom mamar 4T1, cu proprietăți tumorigene și invazive. Cultivarea acestora este realizată în cadrul **Activității 1.4**. Efectul citotoxic al micelilor polimerice încărcate cu paclitaxel și acid ursolic (PTX-UA PMs) a fost măsurat prin testul de viabilitate celulară MTT în cadrul **Activității 1.5**. Grupele experimentale au fost tratate timp de 24 de ore cu diferite concentrații de paclitaxel (0, 0.01, 0.1 și 1  $\mu$ M) și acid ursolic, ambele încapsulate în micelii polimerice și în formă pură. Ambele tipuri de micle polimerice (JPL12 și JPL7), încărcate cu PTX și UA simultan, au determinat o scădere semnificativă a viabilității celulare comparativ cu PTX neîncapsulat, sugerând o posibilă acțiune sinergică a celor două componente. Ultima **Activitate 1.6**, a presupus diseminarea rezultatelor sub forma unei prezentări orale la o conferință națională/internațională.

În etapa 2. a fost realizată evaluarea efectelor pro-apoptotice *in vitro* și am testat eficacitatea antitumorală *in vivo* ale PTX-UA PMs. În cadrul testelor *in vitro* a fost evaluată în primul rând în **Activitatea 2.8**. citotoxicitatea formulărilor PTX, inclusiv PTX liber, PTX-UA PMs, PTX PMs folosind celule 4T1. Celulele au fost tratate utilizând diferite concentrații ale formulărilor PTX și evaluate cu ajutorul unui test CCK-8. Testarea *in vitro* a fost continuată în **Activitatea 2.1.**, în cadrul căreia potențialul proapoptotic al formulărilor PTX, inclusiv PTX liber, PTX-UA PMs, PTX PMs a fost evaluat folosind kitul ELISA Cell Death Detection. Studiul a fost continuat cu testarea eficacității antitumorale *in vivo* ale PTX-UA PMs în cadrul **Activității 2.2**. Am realizat un model *in vivo* de xenogrefe tumorale în cadrul căreia au fost inoculate tumori xenogrefe la șoareci Balb/c femele, prin injectarea în stratul glandular mamar a celulelor 4T1, folosite și în cadrul experimentelor *in vitro*. Când tumorile au ajuns la o mărime palpabilă am început să administrăm paclitaxel-acid ursolic PMs (PTX-UA PMs), paclitaxel PMs (PTX PMs), paclitaxel liber (PTX) și acid ursolic (UA) prin injecție intraperitoneală în două concentrații fiecare. În **Activitatea 2.3**. a fost monitorizată creșterea tumorii la fiecare 3 zile după inoculare, de asemenea, pierderea în greutate a animalelor. Analiza histopatologică a tumorilor a fost efectuată prin colorare cu hematoxină și eozină (H&E). Detectarea imunohistochimică a proteinelor Ki67 și PCNA a fost folosită pentru cuantificarea celulelor proliferative din tumori în cadrul **Activității 2.4.** Analiza celulelor tumorale apoptotice a fost efectuată prin testul TUNEL în **Activitatea 2.5.** Detectarea imunohistochimică a proteinelor CD31 a fost utilizat pentru a cuantifica densitatea microvaselor (MVD) în țesuturile tumorale folosind o metodă experimentală similară cu cea a testului de colorare Ki67. **Activitatea 2.7**, a presupus diseminarea rezultatelor sub forma unei prezentări poster la o conferință națională/internațională.

În etapa 3. au fost analizate efectele protectoare ale unui nou sistem de micle polimerice încărcate cu Paclitaxel-ursolic (PTX-UA PMs) împotriva mucozitei intestinale induse de chimioterapie. 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 tratate 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.

## Descrierea științifică

### **Etapa 1. Dezvoltarea unui nou sistem dual de micle polimerice inteligente încărcate cu PTX-acid ursolic (PTX-UA PMs) și evaluarea efectelor citotoxice *in vitro* ale PTX-UA PMs**

#### **Activitatea 1.1. Pregătirea PMs-urilor încărcate cu PTX-UA**

În acest studiu au fost utilizați doi copolimeri, sensibili la pH, de tipul poli(2 vinil piridina)-b-poli(etilen oxid) (P2VP-PEO) (Figura 1) și anume : P2VP<sub>274</sub>-b-PEO<sub>1406</sub>, denumit în continuare JPL 7, și P2VP<sub>55</sub>-b-PEO<sub>284</sub>, denumit JPL12. Indicii reprezintă gradele de polimerizare a celor două secvențe polimerice. Se poate observa că raportul molar dintre P2VP și PEO este identic, dar gradul lor de polimerizare (masa moleculară) este diferită. De aceea, a fost interesant de studiat influența masei moleculare.

Pregătirea sistemelor nanomicelare s-a realizat printr-o metodă de dializă pornind de la o soluție de copolimer în dimetilsulfoxid (DMSO). Aceeași metodă a fost folosită și pentru prepararea sistemelor micelare încărcate cu PTX și acid ursolic (UA) cu diferența că la soluția copolimerului în DMSO s-au adăugat cantități diferite de medicamente. După solubilizarea totală a copolimerului și a medicamentelor, soluția obținută s-a adăugat într-o membrană de dializă (12 -14 kDa) care a fost imersată într-un pahar Berzelius de 1L plin cu apă distilată. Timp de 24 de ore, s-au realizat 5 schimburi de apă distilată. După 24 ore, soluția din membrană a fost liofilizată timp de 24 ore iar pudra obținută a fost stocată la rece, 4°C. Astfel a fost posibilă obținerea a unor serii de micle polimerice încărcate cu PTX, UA și PTX+UA (50/50 masic).

#### **Activitatea 1.2. Caracterizarea PTX-UA PMs**

Dimensiunile micelilor dispersate în PBS (pH=7.4) au fost determinate prin măsurători de difuzie dinamică a luminii (DLS) utilizând un Malvern Nano-ZS Zetasizer (Worcestershire, Marea Britanie). Morfologia micelilor va fi determinată prin microscopie TEM. Interacțiunea dintre medicamente și copolimer a fost investigată prin FTIR.

Tabelele 1, 2 și 3 prezintă datele obținute prin DLS pentru suspensii micelare la o concentrație de 0.1% în funcție de temperatură și de raportul copolimer/medicament. Probele au fost analizate la 25° și 37°C, având în vedere potențiala lor administrare prin injecție. Au fost

determinate mai multe valori, cum ar fi : Z-average, care este diametrul mediu al micelilor, Dv-diametrul în volum și PDI-indicele de polidispersitate.

Din acest tabel se observă clar faptul că diametrul mediu al micelilor polimerice este strâns legat de masa moleculară a celor doi copolimeri. Proba JPL7, având un grad de polimerizare de aproape 4 ori mai ridicat decât cel al probei JPL 12, are dimensiuni de aproape 4 ori mai mari decât cele ale probei JPL 12. Se constată, de asemenea, o bună corelație între valorile Z-average și Dv ceea ce indică un indice de polidispersitate relativ redus. Totuși, se observă că valorile PDI sunt inferioare valorii de 0.1 pentru proba JPL 7 ceea ce înseamnă că micelile polimerice sunt foarte bine definite. O diferență semnificativă se poate observa și în ceea ce privește valorile de potențial zeta (ZP). Pentru proba JPL 7, lanțurile de PEO fiind mult mai lungi decât cele ale probei JPL 12 asigură o protecție mai ridicată a miezului micelii format din secvențele pH-sensibile P2VP.

Din Tabelul 2 se poate observa că atât valorile pentru Z-average cât și pentru Dv cresc cu creșterea cantității de PTX încărcată în micelile obținute pe baza copolimerului JPL12. De remarcat este faptul că indicele de polidispersitate nu urmează aceeași tendință ci rămâne la valori relativ mici. Totuși, se observă că la cel mai mic raport copolimer/PTX, care corespunde cantității celei mai ridicate de medicament, curba de distribuție a diametrelor devine bimodală. Acest comportament se poate explica prin prezența unor agregate micelare. Putem presupune ca medicamentul nu mai este încărcat doar în interiorul hidrofob al micelilor ci se găsește și în coroana hidrofilă pe baza de PEO ceea ce duce la scăderea stabilității micelilor. Având în vedere prezența grupelor OH în structura PTX, se poate presupune că se formează legături de hidrogen între grupările hidroxil ale secvențelor PEO și cele ale PTX. Acest fapt este confirmat și de scăderea potențialului zeta. O creștere foarte mare a diametrului micelilor se poate nota pentru proba JPL12/UA-10.1. Pentru această probă, potențialul zeta este aproape neutru ceea ce înseamnă că UA se regăsește imobilizat și în coroana hidrofilă de PEO, probabil se formează de asemenea legături de hidrogen.

În cazul încărcării simultane a PTX și UA în micelile polimerice pe baza copolimerului JPL12, indiferent de raportul copolimer/medicamente, se observă prezența a două populații de micelii: una care ar putea corespunde micelilor încărcate cu PTX și alta a căror diametre sunt similare cu micelile încărcate cu UA. Pentru aceste probe, indicele de polidispersitate este ridicat, ceea ce confirmă alura bimodală a curbelor de distribuție a diametrelor. O tendință similară se poate observa și în cazul copolimerului JPL 7.

La 37°C se poate nota o scădere ușoară a valorilor de Z-average și Dv ceea ce se explică prin faptul că apa devine un solvent mai neadecvat pentru secvențele PEO. În general, tendința este similară experimentelor realizate la 25°C.

Morfologia micelilor a fost analizată prin microscopie electronică în transmisie (TEM) iar cliseele obținute sunt prezentate în Figura 2.

După cum se poate observa în Figura 1, micelile polimerice au o formă sferică iar dimensiunea lor este puțin mai mică decât cea obținute prin DLS, așa cum este și normal având în vedere faptul că probele pentru microscopie electronică sunt în stare uscată și deci coroana de PEO nu este umflată de apă, așa cum se întâmplă în cazul testelor de DLS.

Utilizând spectroscopia în infraroșu (FTIR) au fost determinate spectrele pentru probele JPL12, PTX, UA, JPL12-PTX-10, JPL12-PTX-5, JPL12-PTX-2, JPL12-UA-10 și JPL12-PTX/UA-10. S-au observat picurile specifice pentru :

- UA : un pic caracteristic grupării carbonil ( $\text{HC}=\text{O}$ ) la aproximativ  $1715\text{ cm}^{-1}$
- Principalele picuri ale Paclitaxelului sunt următoarele: vibrații de întindere N-H la  $3479\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ , vibrații de întindere asimetrice și simetrice  $\text{CH}_2$  la  $2976\text{--}2885\text{ cm}^{-1}$ . Vârful situat la  $1733\text{--}1704\text{ cm}^{-1}$  a atribuit vibrației de întindere  $\text{C}=\text{O}$  din grupurile de esteri. Amida legată a fost situată în jurul a  $1647\text{ cm}^{-1}$ . Vibrațiile de întindere a legăturii estere și vibrațiile de întindere C-N sunt situate la  $1241\text{ cm}^{-1}$ , respectiv  $1178\text{ cm}^{-1}$ . Absorbția la  $1075$ ,  $965$  și  $703$  au fost atribuite legăturilor aromatice.

Picurile caracteristice ale medicamentelor, situate între  $1700$  și  $1600\text{ cm}^{-1}$ , se observă și în spectrele micelilor încărcate, JPL12-PTX, JPL12-UA, JPL12-PTX/UA confirmând astfel prezența medicamentelor.

### Activitatea 1.3. Analiza eficienței de încapsulare a PTX-UA PMs

Pentru a determina eficiența de încapsulare a ambelor medicamente, s-au construit două curbe de calibrare, folosind diferite concentrații de medicamente, iar valorile absorbanței acestora au fost înregistrate pe un spectrofotometru Nanodrop UV-Vis. Curbele de calibrare a PTX și UA sunt prezentate în Figura 4 și 5.

În Tabelul 4 este prezentată eficiența de încărcare a micelilor în funcție de raportul copolimer/medicament pentru cei 2 copolimeri studiați. Din acest tabel se poate constata că eficiența de încărcare în cazul PTX scade cu creșterea cantității inițiale de medicament, așa cum este și de așteptat. Pentru raportul cel mai ridicat copolimer/PTX, adică pentru cantitatea inițială de PTX cea mai mică, s-a obținut o eficiență de încărcare de  $94\%$ . O eficiență similară este observată și în cazul UA. În schimb, eficiența scade în cazul în care ambele medicamente, PTX și UA, sunt încărcate simultan.

### Activitatea 1.4. Culturi celulare

Pentru experimentele *in vitro* și de asemenea *in vivo* folosim linia celulară de șoarece de carcinom mamar 4T1, cu proprietăți tumorigene și invazive.

Celulele 4T1 de carcinom mamar fac parte dintr-o linie celulară inoculabilă care prezintă proprietăți înalt tumorigene și invazive, spre deosebire de alte tumori. Pot metastaza spontan din tumora primară la distanță în multiple situsuri cum ar fi limfonoduri, sânge, ficat, pulmon, creier și oase.

Celulele tumorale 4T1 au câteva caracteristici care le fac pretabile ca model experimental animal pentru cancerul de sân. În primul rând, celulele tumorale de acest tip pot fi ușor inoculate în glanda mamară astfel încât tumora primară se dezvoltă în pozițiile caracteristice din punct de vedere anatomic. A doua caracteristică, la fel ca și în cazul cancerului de sân uman, este reprezentată de dezvoltarea spontană a bolii metastatice din tumora primară în cazul acestor celule. De asemenea răspândirea progresivă a metastazelor 4T1 în limfonodului limfatici de drenaj și în alte organe este foarte asemănătoare cu a cancerului de sân uman.

Celulele 4T1 (Figura 6.) au fost cultivate în flaskuri de  $75\text{ cm}^2$  la  $37^\circ\text{C}$  într-o atmosferă de  $5\%$   $\text{CO}_2$ , în mediu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma / R8755-1L) suplimentat cu:

- $2,4\text{ g/L}$  HEPES ( $10\text{mM}$ ) (Sigma / H0887-100ml)
- $1\text{ mM}$  piruvat de Na (Sodium pyruvate solution,  $100\text{mM}$  – Sigma / S8636-100ml)

- 2,5 g/L glucoză
- 2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Sigma /S5761-500g)
- 1% ABAM (Antibiotic Antimycotic Solution – Sigma / A5955)
- 10% ser fetal bovin (Lonza DE 14-802F)

Alicoturi din celulele cultivate au fost înghețate și depozitate la -80°C pentru a asigura o rezervă de celule similare genetic pentru toate experimentele.

Mediu de înghețare pentru celule 4T1:

95% mediu de cultură complet (RPMI + 10% ser) + 5% DMSO (dimetil sulfoxid)

### Activitatea 1.5. Testul MTT

Efectul citotoxic al micelilor polimerice încărcate cu paclitaxel și acid ursolic (PTX-UA PMs) a fost măsurat prin testul de viabilitate celulară MTT. Testul MTT este un test colorimetric pentru evaluarea activității metabolice a celulelor.

Pe eficiențelor de încapsulare obținute am ales să testăm în cadrul studiilor *in vitro* micelile polimerice cu raport de medicament/copolimer 1/10. Pentru testarea viabilității celulele au fost tratate timp de 24 de ore cu diferite concentrații de paclitaxel (PTX) (0, 0.01, 0.1 și 1 μM) și acid ursolic (UA), ambele încapsulate în micelile polimerice și în formă pură. Am ales să testăm două tipuri de micelile polimerice, unele preparate cu copolimer JPL12 și altele cu JPL7..

Fiecare grup experimental a fost testat în trei concentrații diferite după cum este prezentat în Tabelul 5.

Pentru fiecare test 4x10<sup>3</sup> celule 4T1/godeu au fost însămânțate în placi cu 96-godeuri și timp de 24 ore au fost expuse tratamentelor cu concentrații corespunzătoare Tabelului 7. dizolvate în mediu complet RPMI. După cei 24 ore mediul cu tratamente a fost îndepărtat, celulele au fost spălate cu PBS și a fost pipetat în fiecare godeu 100 μl de mediu fără ser cu un conținut de 1 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), cu care au fost incubate timp de 4 ore la 37°C. La finalul perioadei de incubare a fost îndepărtat mediul cu MTT și cristalele de formazan formate în timpul incubării au fost dizolvate în 100 μl de MTT Solubilization Solution pe bază de izopropanol (din kitul In Vitro Toxicology Assay Kit – MTT based, Sigma /Tox-1). Măsurăm absorbanțele la 570 nm cu ajutorul unui cititor de plăci Tecan, din care scădem absorbantele obținute la 650nm, absorbanta de fundal a plăcilor multi-godeu.

Procentul de viabilitate se calculează după formula următoare:

$$\frac{A_{exp} - Media(A_{C\ neg})}{Media(A_{C\ poz})} \times 100 = \% Viabilitate$$

A<sub>exp</sub> – absorbanta grupei experimentale

A<sub>C neg</sub> – absorbanta controlului negativ (fără celule, fără tratament)

A<sub>C poz</sub> – absorbanta controlului pozitiv (doar celule, fără tratament)

Rezultatele obținute sunt prezentate pe Figurile 6-8.

La concentrația de 0,01 μM PTX s-a observat o scădere semnificativă a viabilității celulare pentru PTX, respectiv UA față de martor. Ambele tipuri de micelile polimerice (JPL12 și JPL7) încărcate cu PTX și UA au determinat o scădere semnificativă a viabilității celulare comparativ cu PTX neîncapsulat, sugerând o posibilă acțiune sinergică a celor două componente (Figura 7.).

La concentrațiile de 0,1  $\mu\text{M}$  și 1  $\mu\text{M}$  PTX (Figura 8 și 9), se remarcă o scădere a viabilității celulare la expunerea la PTX, dar o creștere semnificativă a viabilității celulare la expunerea la UA comparativ cu martorul. În schimb, PTX și UA încărcate simultan în ambele tipuri de micle polimerice (JPL12 și JPL7) au determinat o scădere semnificativă a viabilității celulare comparativ cu PTX neîncapsulat, sugerând o posibilă acțiune sinergică a celor două componente.

### **Activitatea 1.6. Diseminare**

Participare la conferințe naționale / internaționale:

1. Herman Hildegard, Leonard Atanase, Anca Hermenean. Polymeric micelles as promising nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *The Academic Days Of Arad XXXII-nd Edition*, Romanian-Chinese Workshop in Biomedical Research, May 25-29, 2022 – prezentare orală

## **Etapa 2. Evaluarea efectelor pro-apoptotice *in vitro* și a eficacității antitumorale *in vivo* ale PTX-UA PMs**

### **Activitatea 2.1. Test ELISA pentru detectarea apoptozei celulare *in vitro***

Potențialul proapoptotic al formulărilor PTX, inclusiv PTX liber, PTX-UA PMs, PTX PMs a fost evaluat folosind kitul ELISA Cell Death Detection, urmând manualul utilizatorului pus la dispoziție de producatorul Roche.

Modelul experimental utilizat este reprezentat de celule de carcinom mamar de șoarece (triplu negative) 4T1, acestea au fost repartizate câte  $10^4$  celule în fiecare godeu studiat. Fiecare substanță de evaluat, a fost aplicată în 3 concentrații asupra culturii celulare de 4T1. În aceste experimente am studiat efectul celor 3 concentrații ale următoarelor substanțe: PTX-UA-PMs, PTX-PMs, PTX și UA; evaluând pentru fiecare substanță și concentrație potențialul de a induce moarte celulară asupra culturilor de celule tumorale.

După analiza rezultatelor putem constata faptul că administrarea de acid ursolic în diverse concentrații nu influențează semnificativ statistic inducerea apoptozei celulare comparativ cu lotul martor, din potrivă putem observa o ușoară tendință de stabilizare a celulelor cu creșterea viabilității celulare comparative cu lotul control în direct corelație cu administrarea concentrației maxime de acid ursolic. Toate cele trei concentrații a citostaticului în cele 3 formulări distincte produc o creștere semnificativă a inducerii morții celulare la nivelul culturilor de 4T1, putând astfel concluziona că toate cele 3 formulări în diverse concentrații administrate au efect pozitiv asupra celulelor tumorale studiate (Figura 10.). Dintre aceste formulări din punct de vedere statistic se remarcă în mod semnificativ formularea PTX-UA-PMs și PTX, aplicate la concentrația de 0,1  $\mu\text{M}$  PTX pentru efectul lor pozitiv în inducerea morții celulare a celulelor canceroase, dintre cele 2 formulări se remarcă compusul PTX-UA-PMs ca având cel mai puternic efect antitumoral.

### **Activitatea 2.2. Model *in vivo* de xenogrefe tumorale**

Pentru testarea efectului antitumoral *in vivo* s-au utilizat șoareci Balb/c femele, în vârstă de 8 săptămâni. Aceștia au fost crescuți în condiții standard de crescătorie în Biobaza de Animale de Laborator din cadrul Institutului de Științe ale Vieții „Aurel Ardelean” al Universității de Vest

„Vasile Goldiș” din Arad. Toate procedurile experimentale au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Vest „Vasile Goldiș” din Arad (17/6.07.2021). Soarecii au fost cazați într-un microclimat controlat cu un ciclu de lumina/întuneric de 12/12 h, adăparea și alimentația acestora realizându-se *ad libitum*.

Pentru inocularea tumorilor xenogrefe,  $10^6$  celule 4T1 suspendate în PBS (200  $\mu$ L) au fost implantate ortotopic în stratul glandular mamar a șoarecilor în ziua 0. La zece zile după injectarea celulelor, a fost calculat volumul tumorii (V) ca  $V = L \times W^2/2$ , unde L este lungimea iar W este lățimea tumorii măsurată.

Animalele au fost împărțite în 10 grupuri a câte zece șoareci, astfel încât volumele medii ale tumorii să fie similare între grupuri. Am suplimentat loturile experimentale și cu un lot control compus din 10 animale sanatoase. Soluția salină, paclitaxel-acid ursolic PMs (PTX-UA PMs), paclitaxel PMs (PTX PMs), paclitaxel liber (PTX) și acid ursolic (UA) au fost injectate intraperitoneal în cazul fiecărui grup în zilele 10, 13, 16 și 19 post-inoculare tumorală în două concentrații (Figura 11.), după cum urmează: (1) control: PBS (200  $\mu$ L la fiecare 3 zile, ip), (2) tumoră – jumătate de lot a fost sacrificat în ziua 10 ca martor (înainte de tratamentul antitumoral) și cealaltă jumătate va sfârșitul experimentului (ziua 22), au primit numai PBS (200  $\mu$ L la fiecare 3 zile, ip), (3) PM PTX-UA (scăzut): miclele polimerice JPL7 încărcate cu PTX și UA, administrat la o concentrație de 10 mg/kg PTX (la fiecare 3 zile, ip), (4) PM PTX-UA (ridicat) : miclele polimerice JPL7 încărcate cu PTX și UA, administrat la o concentrație de 20 mg/kg PTX (la fiecare 3 zile, ip), (5) PM PTX (scăzut): miclele polimerice JPL7 încărcate cu PTX, administrat la o concentrație de 10 mg/kg PTX (la fiecare 3 zile, ip), (6) PM PTX (ridicat): miclele polimerice JPL7 încărcate cu PTX, administrat la o concentrație de 20 mg/kg PTX (la fiecare 3 zile, ip), (7) PTX (scăzut): 10 mg/kg PTX neformat (la fiecare 3 zile, ip), (8) PTX (ridicat): 20 mg/kg PTX neformat (la fiecare 3 zile, ip), (9) UA (scăzut) – au primit cantitatea de UA neformat conținut în PM-urile PTX-UA de 10 mg/kg (la fiecare 3 zile, ip), (10) UA (ridicat) –cantitatea de UA neformat conținut în PM-urile PTX-UA de 20 mg/kg (la fiecare 3 zile, ip).

Volumul tumorii și greutatea corporală a șoarecilor au fost măsurate la fiecare 3 zile. În ziua 22 după inoculare, șoarecii au fost eutanasiați sub anestezie, iar tumorile au fost colectate, cântărite și fotografiate. De asemenea, s-au recoltat jejunul proximal și colonul din toate grupurile experimentale.

### **Activitatea 2.3. Măsurarea tumorilor și analiza histologică a acestora**

Creșterea tumorii a fost monitorizată la fiecare 3 zile după inoculare, de asemenea, pierderea în greutate a animalelor. Analiza histopatologică a tumorilor a fost efectuată prin colorare cu hematoxilină și eozină (H&E).

În cazul lotului martor în primele 10 zile se constată o ușoară tendință de creșterea greutateii după care aceasta rămâne aproape constantă până la sfârșitul experimentului. În cazul loturilor cărora li s-au administrat celule tumorale se remarcă o prima etapă de creștere a greutateii, care este urmată de o etapă de stagnare, iar etapa finală este de pierdere a greutateii. Pierderea cea mai abruptă a greutateii se remarcă la toate loturile experimentale unde au fost induse tumori în ultimele 3 zile înainte de sacrificare. Scăderea cea mai semnificativă din punct de vedere statistic se constată în cazul lotului a cărei i s-a administrat PTX-UA-PMs în concentrație mare (Figura 12.).



Volumul initial tumoral înainte de instituirea în ziua 10 a tratamentelor a fost aproximativ egal în cazul tuturor loturilor. Până în ziua 13 se constată o pantă ascendentă lină în cazul tuturor loturilor tumorale tratate sau nu. Din ziua 13 până în ultima zi al experimentului se constată o pantă ascendentă abruptă de creșterea volumului tumoral (Figura 13.).

Cea mai mare creștere a volumului total tumoral se înregistrează în cazul lotului căruia nu i s-a administrat tratament. Rezultate semnificative în reducerea volumului tumoral putem observa în cazul formulărilor în ordine descrescătoare PTX-UA-PMs high, PTX-PMs high, PTX-UA-PMs low, PTX-PMs low. De aici putem concluziona că încapsularea PTX în PMs are efect pozitiv în reducerea volumului tumoral.

Formulările care nu folosesc PMs în nici o concentrație prezintă un volum net superior formulărilor care folosesc aceste micle, unele dintre ele apropiindu-se de lotul tumoral de control.

În Figura 15. prezentăm reprezentarea grafică a evoluției volumului tumoral în ziua 22 a experimentului, aceasta fiind ilustrată și în imagini în Figura 14.

Greutatea tumorală la finalul experimentului urmează același model ca și cele găsite în cazul volumului tumoral găsite în ziua 22 (Figura 16.).

Administrarea paclitaxelului cuplat cu acid ursolic și încapsulat în miclele polimerice JPL7 are efect pozitiv în reducerea volumului și greutății masei tumorale.

Colorația H&E a permis identificarea regiunilor tumorale care conțin celule tumorale și a regiunilor non-tumorale (stroma și celule stromale, limfocite, precum și zone de necroză și infiltrație leucocitară (Figura 17).

#### **Activitatea 2.4. Analiza imunohistochimică a markerilor de proliferare a cancerului mamar**

Ki67 este o proteină nucleară care este strâns legată de ciclul celular. Este un marker al proliferării celulare și a fost folosit pentru a stratifica categoriile de prognostic bun și prost în cancerul mamar invaziv. Similar și PCNA este utilizat ca marker de proliferare celulară.

În cazul loturilor V2 și V3 se constată o imunopozitivitate a Ki67 și PCNA marcantă, indicând o marcarea nucleară a celulelor carcinomului mamar invaziv. Tratamentele au scăzut numărul de celule marcate pozitiv, în special pentru loturile V4, V5 și V9 (Figura 18. și 19.).

#### **Activitatea 2.5. Analiza celulelor tumorale apoptotice prin testul TUNEL**

Pentru a cuantifica celulele apoptotice a fost efectuat testul TUNEL. Fragmentarea DNA se înregistrează după tratamente în special pentru loturile care conțin paclitaxel la concentrație mare (Figura 20).

#### **Activitatea 2.6. Analiza vascularizației tumorale**

CD31 (PECAM-1) este un marker pentru diferențierea endotelială, a fost utilizat pentru a cuantifica densitatea microvaselor (MVD) în țesuturile tumorale folosind o metodă experimentală similară cu cea a testului de colorare Ki67. Imunopozitivitatea este mai marcantă pentru tumora netratată la 22 zile și mai scăzută pentru tratamente în special pentru doza mare de paclitaxel formulat (Figura 21.)

## Activitatea 2.7. Diseminare

Participare la conferințe naționale / internaționale:

1. Herman Hildegard, Leonard Atanase, Anca Hermenean. Development of a novel dual PTX-ursolic acid loaded polymeric micellar system. *The 44<sup>th</sup> Annual Scientific Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu” (ICBP-NS) held jointly with The 40<sup>th</sup> Annual Scientific Session of the Romanian Society For Cell Biology (RSCB)*, November 16-17, Bucharest, Romania, **2023** – prezentare poster

## Activitatea 2.8. Testul CCK8

Citotoxicitatea formulărilor PTX, inclusiv PTX liber, PTX-UA PMs, PTX PMs a fost evaluată folosind celule 4T1. Celulele au fost tratate folosind diferite concentrații ale formulărilor PTX și evaluate folosind un test CCK-8.

Modelul experimental utilizat este reprezentat de celule de carcinom mamar de șoarece (triplu negativ) 4T1, acestea au fost repartizate câte  $4 \times 10^3$  celule în fiecare godeu studiat. Fiecare substanța de evaluat, a fost aplicată în 3 concentrații asupra culturii celulare de 4T1. În aceste experimente am studiat efectul celor 3 concentrații ale următoarelor substanțe: PTX-UA-PMs, PTX-PMs, PTX și UA; evaluând pentru fiecare substanță și concentrație efectul acestora asupra viabilității celulare tumorale.

Din punct de vedere statistic nu se remarcă influențe semnificative asupra viabilității celulare produse de administrarea diverselor formulări farmacologice în cazul utilizării concentrației minime de  $0,01 \mu\text{M}$  PTX (Figura 22.).

Administrarea singulară de acid ursolic în diverse concentrații nu are efecte semnificative din punct de vedere statistic asupra viabilității culturilor de celule canceroase studiate.

Creșterea concentrației de PTX la  $0,1$  respectiv  $1 \mu\text{M}$  PTX în cazul celor 3 formulări care conțin PTX este direct proporțională și semnificativă statistic cu scăderea viabilității celulelor tumorale. Dintre cele 3 formulări se remarcă ca cel mai potent produs antitumoral PTX-UA-PMs, acesta producând cea mai puternică scădere a viabilității celulelor canceroase 4T1.

## Etapa 3. Efectele protectoare ale PTX-UA PMs împotriva mucozitei intestinale induse de chimioterapie

### 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  $5 \mu\text{m}$ , colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) și Alcian Blue pentru a evidenția mucusul eliberat de celulele caliciforme (**Figura 23A și 24**).

Toate celulele caliciforme din vilozitățile și criptele jejunului și colonului au fost numărate pe lamele colorate cu albastru Alcian (**Figura 23**). 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 23 B si 23B**).

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 23 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 25**).

Expresia imunohistochimică a Muc-1 și a Muc-4 la nivelul colonului demonstrează că tratamentele cu micile 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 micile la doza mare, comparativ cu doza echivalentă non-formată (**Figura 26A,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 (**Figura 27**).

### **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 28B**) 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 28A**) 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.

### **1. Impactul rezultatelor obținute**

Cancerul de sân este al doilea cel mai frecvent tip de cancer la femei la nivel mondial, caracterizat printr-o proliferare și răspândirea anormală celulelor canceroase mamare [1]. Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății, în 2022 cancerul de sân a provocat 670.000 de decese la nivel mondial, situându-se pe locul al doilea în ceea ce privește mortalitatea asociată cancerului la femei, după cancerul pulmonar, care înregistrează cel mai mare număr de decese anual.

Societatea Europeană de Oncologie Medicală raportează că, în Uniunea Europeană cancerul de sân este cel mai frecvent diagnosticat tip de cancer la femei. În 2020, aproximativ 355.000 de femei din UE au fost diagnosticate cu cancer de sân, reprezentând 13,3% din totalul cazurilor de cancer.

Această afecțiune este una heterogenă, prezentând o variabilitate semnificativă din punct de vedere fenotipic și genotipic [2], ceea ce complică abordarea terapeutică. Cancerul de sân este clasificat în trei tipuri principale și cinci subtipuri, pe baza expresiei genelor și a receptorilor de suprafață, care influențează prognosticul și terapia [3].

În acest context, această cercetare referitoare la efectele protectoare ale unui nou sistem de micle polimerice încărcate cu Paclitaxel-ursolic (PTX-UA PMs) împotriva mucozitei intestinale induse de chimioterapie prezintă un impact științific semnificativ, oferind protecție împotriva alterărilor morfo-funcționale intestinale induse de chimioterapie.

#### *Bibliografie:*

- [1] Y. Feng, M. Spezia, S. Huang, C. Yuan, Z. Zeng, L. Zhang, X. Ji, W. Liu, B. Huang, W. Luo, B. Liu, Y. Lei, S. Du, A. Vuppalapati, H.H. Luu, R.C. Haydon, T.-C. He, G. Ren, Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis, *Genes Dis.* 5 (2018) 77–106.
- [2] M. Riaz, M.T.M. van Jaarsveld, A. Hollestelle, W.J.C. Prager-van der Smissen, A.A.J. Heine, A.W.M. Boersma, J. Liu, J. Helmijr, B. Ozturk, M. Smid, E.A. Wiemer, J.A. Foekens, J.W.M. Martens, miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs, *Breast Cancer Res. BCR* 15 (2013) R33.
- [3] T.M. Abu Samaan, M. Samec, A. Liskova, P. Kubatka, D. Büsselberg, Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer, *Biomolecules* 9 (2019) 789.

### **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:

## Indicatori de rezultat:

### 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- $\kappa$ B, Bax/Bcl-2 pathways, and reducing intestinal mucositis in triple-negative breast cancer, *Biochemical Pharmacology*, 2024 (în evaluare; BP-S-24-04410).

### Conferințe:

1. **Herman H**, Atanase L, Hermenean A. Polymeric micelles as promising nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *The Academic Days Of Arad XXXII-nd Edition, Romanian-Chinese Workshop in Biomedical Research*, May 25-29, **2022** – prezentare orală
2. **Herman H**, Atanase L, Hermenean A. Development of a novel dual PTX-ursolic acid loaded polymeric micellar system. *The 44<sup>th</sup> Annual Scientific Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology "Nicolae Simionescu" (ICBP-NS) held jointly with The 40<sup>th</sup> Annual Scientific Session of the Romanian Society For Cell Biology (RSCB)*, November 16-17, Bucharest, Romania, **2023** – prezentare poster
3. **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

Director Proiect,  
Dr. Herman

Hildegard

Data: 26.09.2024

