

## **Raport științific – Etapa 1**

**Denumire Etapa:** 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

**Rezultate Etapa:** micle polimerice inteligente încărcate cu paclitaxel-acid ursolic

### **Activități:**

#### **Act. 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) (Schema 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. În Tabelul 1 este prezentat planul experimental folosit.

Astfel a fost posibilă obținerea a unor serii de micle polimerice încărcate cu PTX, UA și PTX+UA (50/50 masic).

#### **Act. 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 2, 3 și 4 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 micellele 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 3 se poate observa că atât valorile pentru Z-average cât și pentru Dv cresc cu creșterea cantității de PTX încărcată în micellele 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 micellele polimerice pe baza copolimerului JPL12, indiferent de raportul copolimer/medicamente, se observă prezența a două populații de micelle: una care ar putea corespunde micelilor încărcate cu PTX și alta a căror diametre sunt similare cu micellele 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 clișeele obținute sunt prezentate în Figura 1.

După cum se poate observa în Figura 1, micellele 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 (Figura 2).

În Figura 2 se observă picurile specifice pentru :

- UA : un pic caracteristic grupării carbonil ( $\text{HC=O}$ ) 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  $\text{C=O}$  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.

### **Act. 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 absorbantei acestora au fost înregistrate pe un spectrofotometru Nanodrop UV-Vis. Curbele de calibrare a PTX și UA sunt prezentate în Figura 3 și 4.

În Tabelul 5 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.

### **Act. 1.4. Culturi celulare**

Pentru experimentele *in vitro* și de asemenea *in vivo* folosim linia celulară de șoarece de carcinom mamar 4T1, cu proprietăți foarte 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 5.) au fost cultivate în flaskuri de 75 cm<sup>2</sup> la 37°C într-o atmosferă de 5% CO<sub>2</sub>, în mediu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma / R8755-1L) suplimentat cu:

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

### **Act. 1.5. Testul MTT**

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

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 micelle polimerice și în formă pură. Am ales să testăm două tipuri de micelle polimerice, unele preparate cu copolimer JPL12 și altele cu JPL7. Astfel testul MTT s-a efectuat pe grupele experimentale din Tabelul 6.

Fiecare grupă experimentală a fost testată în trei concentrații diferite după cum este prezentat în Tabelul 7.

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 absorbanțele obținute la 650nm, absorbanta de fundal a plăcilor multi-godeu.

La concentrația de 0,01 uM PTX s-a observat o scădere semnificativă a viabilității celulare pentru PTX, respectiv UA față de martor. Ambele tipuri de micelle polimerice (JPL12 și JPL7) încărcate cu PTX și UA au determinat o scădere semnificativă a viabilității celulare

comparativ PTX neîncapsulat, sugerând o posibilă acțiune sinergică a celor două componente (Figura 6.).

La concentrațiile de 0,1  $\mu\text{M}$  și 1  $\mu\text{M}$  PTX (Figura 7 și 8), 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 PTX neîncapsulat, sugerând o posibilă acțiune sinergică a celor două componente.

#### **Act. 1.6. Diseminare**

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