

Raport științific

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

Rezumat Etapa:

În această etapă 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.

Descrierea științifică

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 experiment 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.

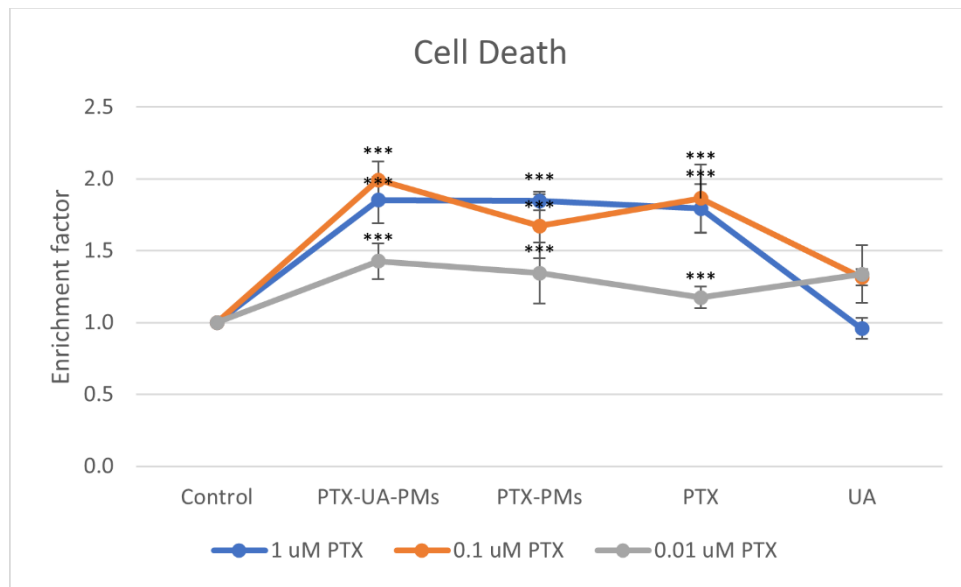


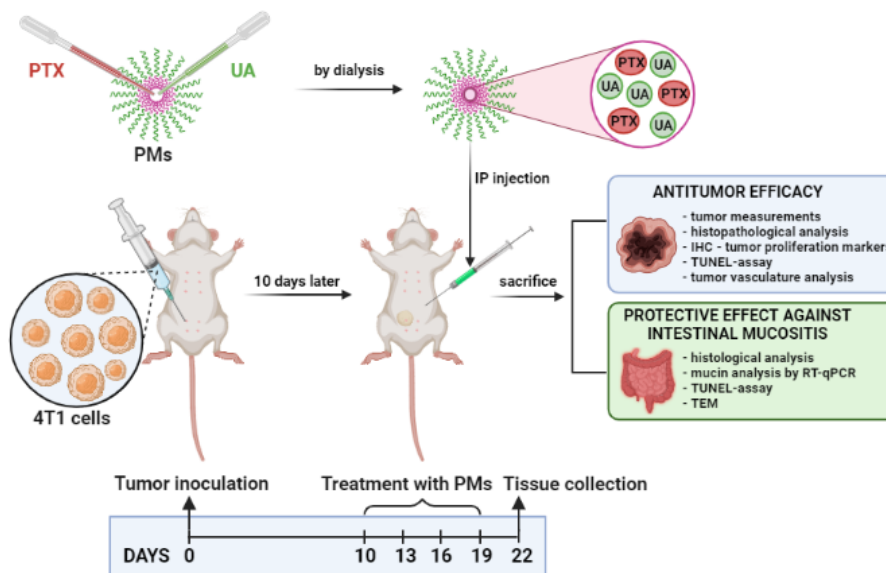
Figura 1. Detectarea apoptozei celulare induse de tratamentele cu PTX-UA-PMs, PTX-PMs, PTX și UA. Semnificație statistică: *** $p < 0.001$ comparat cu lotul control

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 usoară 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 1.). 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 μ 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.



Created in BioRender.com bio

Figura 2. Schema experimentală *in vivo*

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 2.), după cum urmează: (1) control: PBS (200 μ 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 la sfârșitul experimentului (ziua 22), au primit numai PBS (200 μ L la fiecare 3 zile, ip), (3) PM PTX-UA (scăzut): micelle 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) : micelle 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): micelle polimerice JPL7 încărcate cu PTX, administrat la o concentrație de 10 mg/kg PTX (la fiecare 3 zile, ip), (6) PM PTX (ridicat): micelle 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 neformulat (la fiecare 3 zile, ip), (8) PTX (ridicat): 20 mg/kg PTX neformulat (la fiecare 3 zile, ip), (9) UA (scăzut) – au primit cantitatea de UA neformulat conținut

în PM-urile PTX-UA de 10 mg/kg (la fiecare 3 zile, ip), (10) UA (ridicat) –cantitatea de UA neformulat conținut în PM-urile PTX-UA de 20 mg/kg (la fiecare 3 zile, ip) (Tabelul 1.)

Tratament			Lot experimental
CONTROL	sanatos fara tratament		V1
TUMOR	sacrif. inainte de tratament		V2
	sacrif. dupa tratament		V3
PTX-UA-PMs	low	10 mg/kg PTX	V4
	high	20 mg/kg PTX	V5
PTX-PMs	low	10 mg/kg PTX	V6
	high	20 mg/kg PTX	V7
PTX	low	10 mg/kg PTX	V8
	high	20 mg/kg PTX	V9
UA	low	cat e in PTX-UA-PMs low	V10
	high	cat e in PTX-UA-PMs high	V11

Tabelul 1. Loturile experimentale

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 in 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 in concentrație mare (Figura 3.).

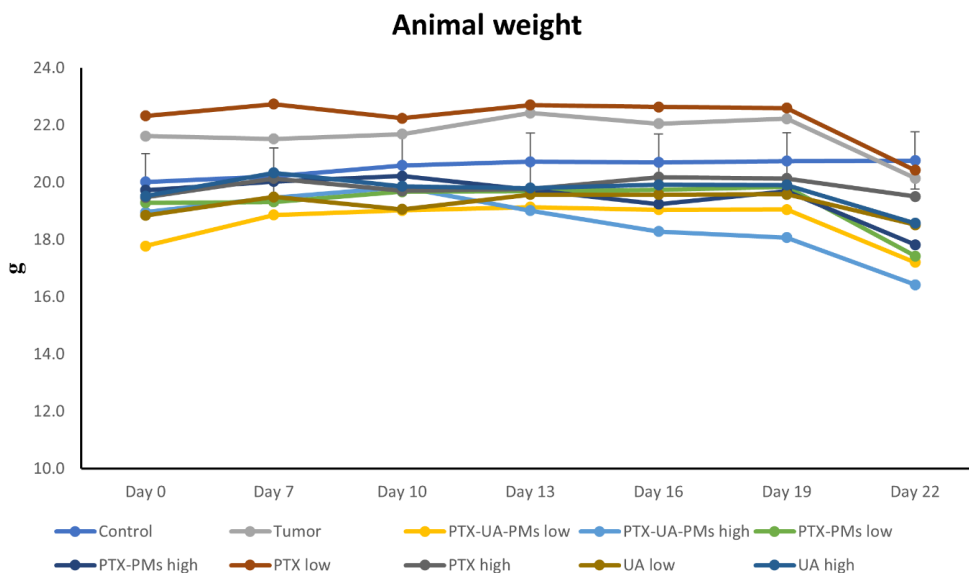


Figura 3. Evoluția greutății animalelor în urma instalării procesului tumoral și a efectului terapiei antitumorale administrate

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 4.).

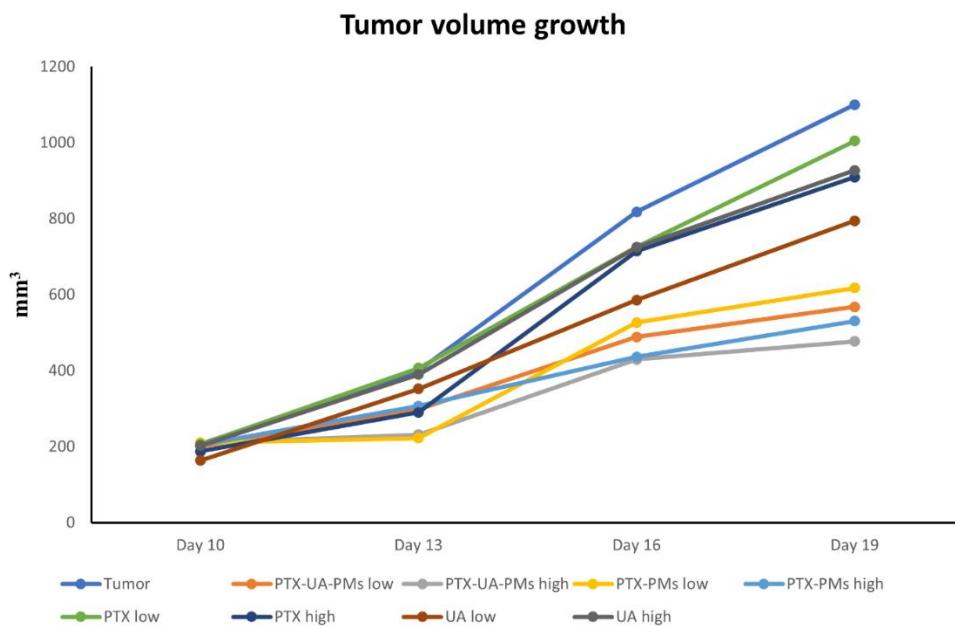


Figura 4. Evoluția volumului tumoral în urma efectului terapiei antitumorale administrate

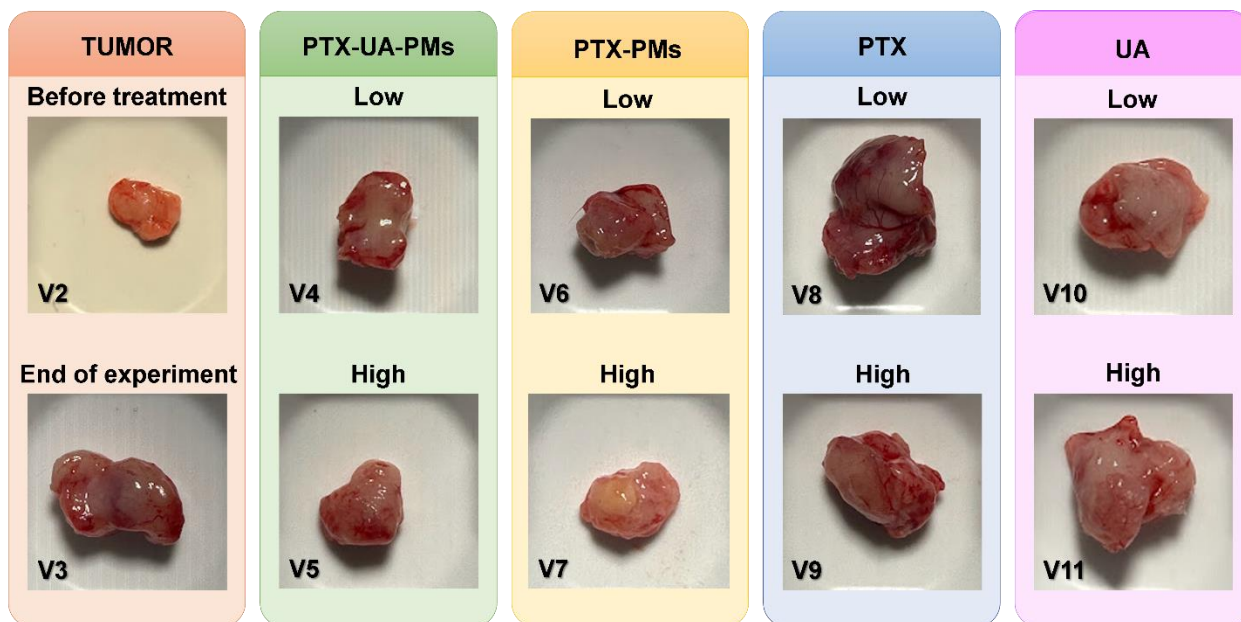


Figura 5. Reprezentare imagistică a evoluției volumului tumoral în urma efectului terapiei antitumorale administrate

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.

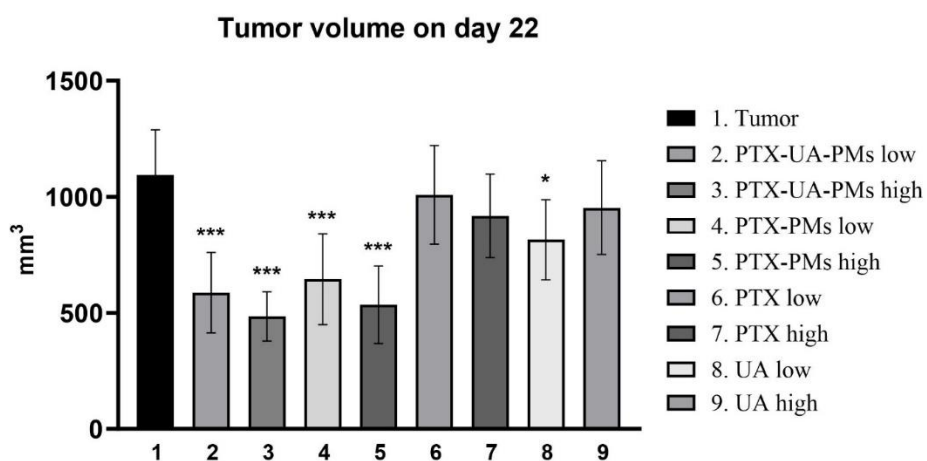


Figura 6. Volumul tumoral obținut în urma tratamentelor antitumorale în ziua 22 după inoculare cu celule tumorale. Semnificație statistică: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparat cu lotul control

În Figura 6. prezentăm reprezentarea grafică a evoluției volumului tumoral în ziua 22 a experimentului, aceasta fiind ilustrată și în imagini în Figura 5.

Greutatea tumorală la finalul experimentului urmează același model ca și cele găsite în cazul volumului tumoral găsite în ziua 22 (Figura 7.).

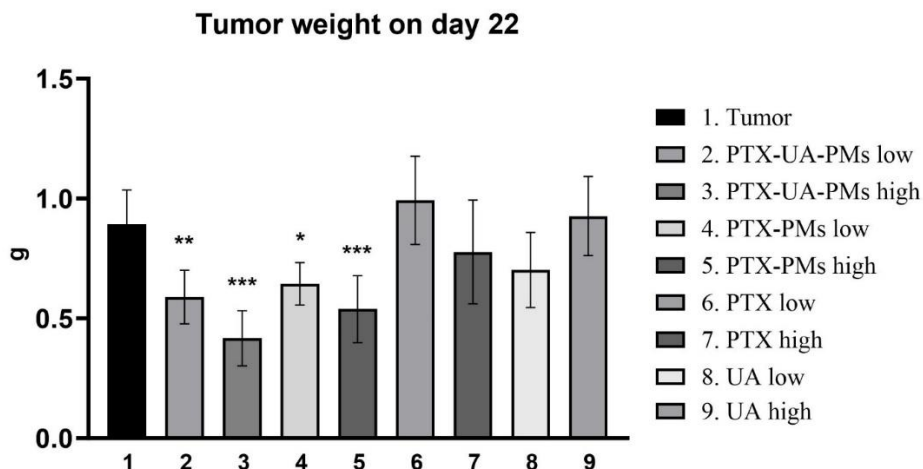


Figura 7. Greutatea tumorală obținută în urma tratamentelor antitumorale în ziua 22 după inoculare cu celule tumorale. Semnificație statistică: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparat cu lotul control

Administrarea paclitaxelului cuplat cu acid ursolic și încapsulat în micelle polimerice JPL7 are efect pozitiv în reducerea volumului și greutatei 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 8).

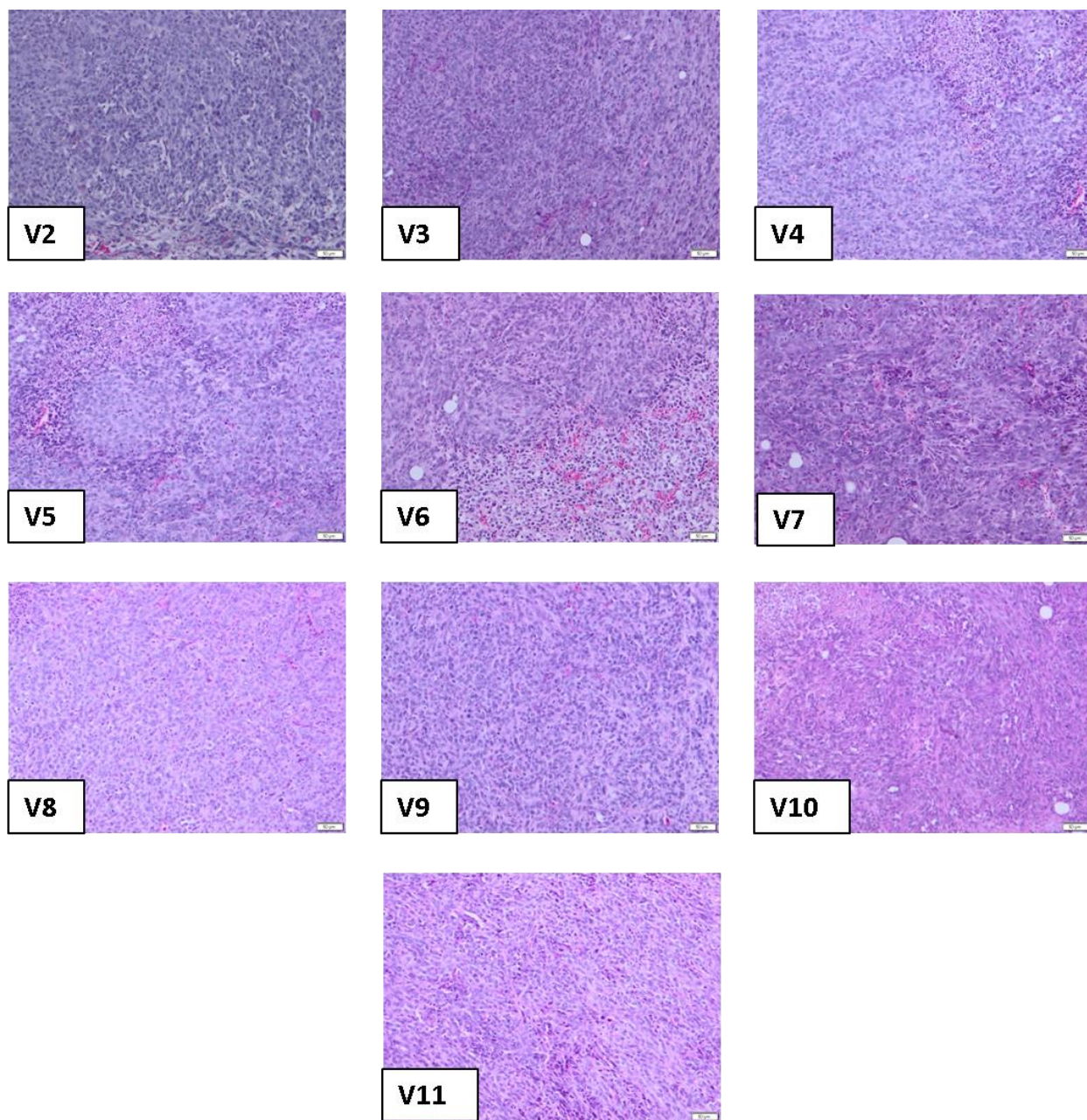


Figura 8. Aspectul histopatologic al tumorilor la loturile experimentale V2 - tumoră 10 zile, V3 - tumoră 22 zile, V3 - PTX-UA-PMs scăzut, V4 - PTX-UA-PMs ridicat, V5 – PTX-PMs scăzut, V6 – PTX-PMs ridicat), V7 - PTX scăzut, V8 - PTX ridicat, V9 - UA scăzut, V10 - UA ridicat, obiectiv 10x

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 9 și 10).

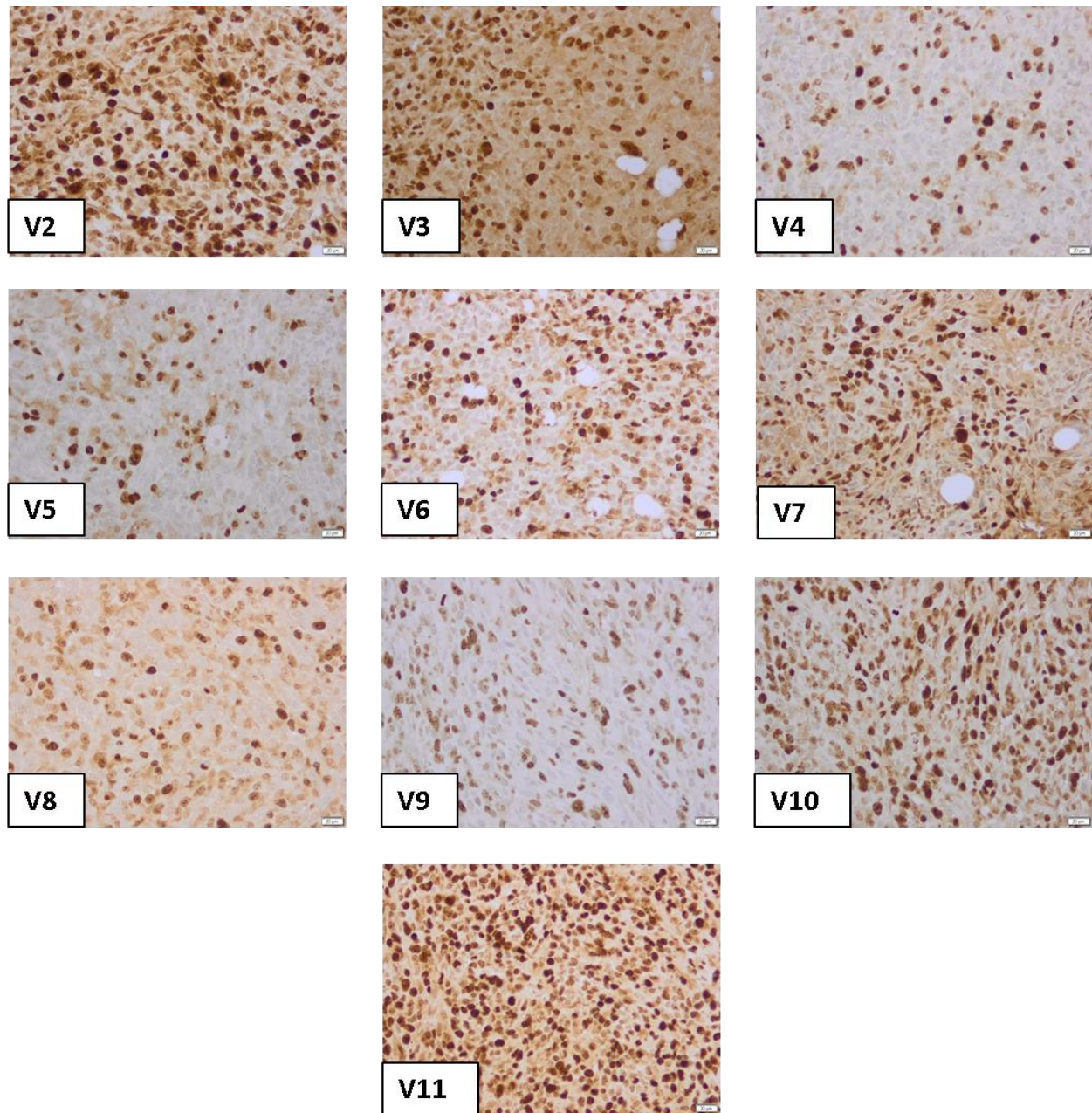


Figura 9. Expresia imunohistochimică a Ki67 la loturile experimentale V2 - tumoră 10 zile, V3 - tumoră 22 zile, V3 - PTX-UA-PMs scăzut, V4 - PTX-UA-PMs ridicat, V5 – PTX-PMs scăzut, V6 – PTX-PMs ridicat), V7 - PTX scăzut, V8 - PTX ridicat, V9 - UA scăzut, V10 - UA ridicat, obiectiv 20x

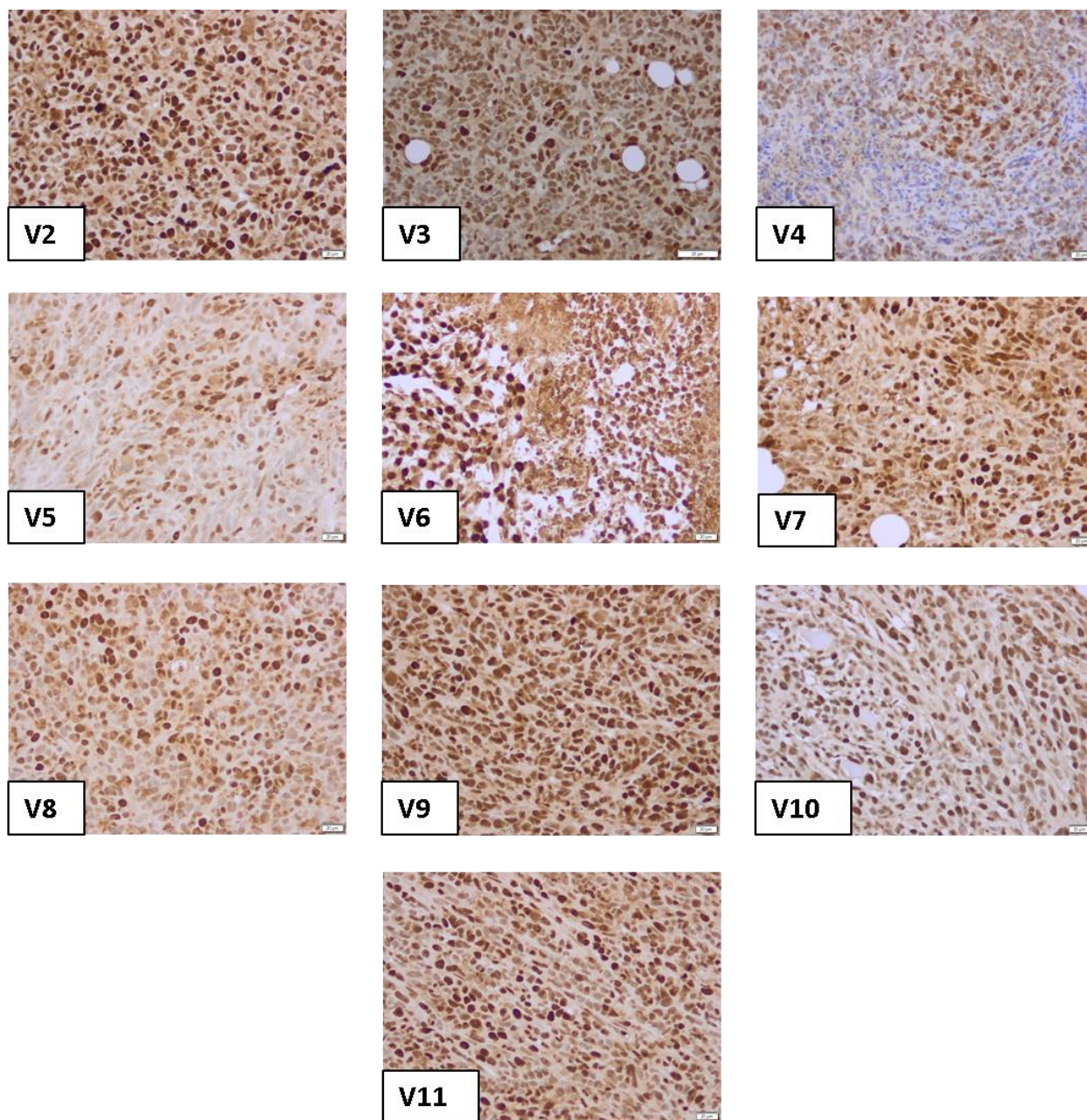


Figura 10. Expresia imunohistochimică a PCNA la loturile experimentale V2 - tumoră 10 zile, V3 - tumoră 22 zile, V3 - PTX-UA-PMs scăzut, V4 - PTX-UA-PMs ridicat, V5 – PTX-PMs scăzut, V6 – PTX-PMs ridicat), V7 - PTX scăzut, V8 - PTX ridicat, V9 - UA scăzut, V10 - UA ridicat, obiectiv 20x

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 11,).

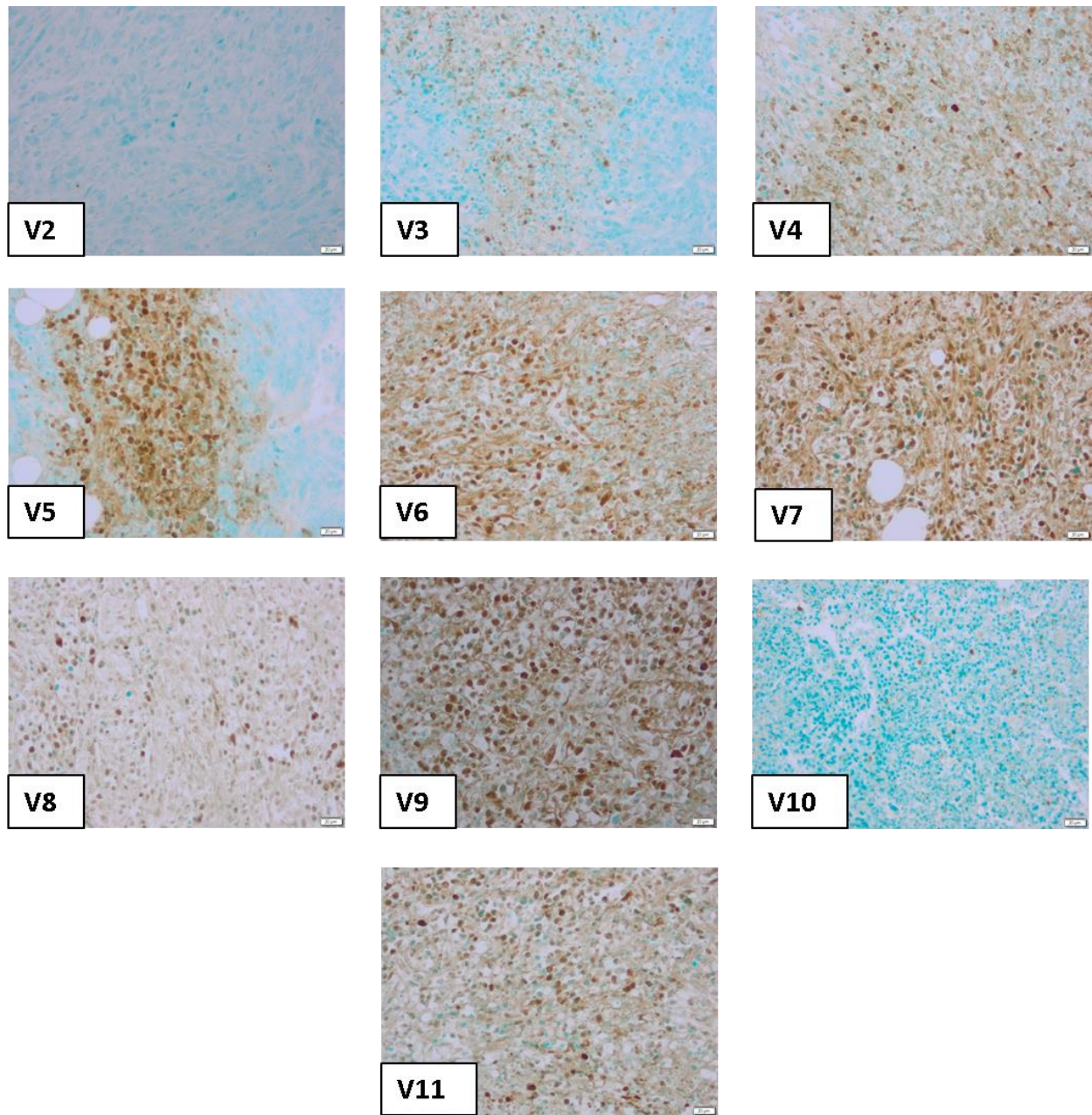


Figura 11. Evidențierea apoptozei celulare prin intermediul colorației TUNEL la loturile experimentale V2 - tumoră 10 zile, V3 - tumoră 22 zile, V3 - PTX-UA-PMs scăzut, V4 - PTX-UA-PMs ridicat, V5 – PTX-PMs scăzut, V6 – PTX-PMs ridicat), V7 - PTX scăzut, V8 - PTX ridicat, V9 - UA scăzut, V10 - UA ridicat, obiectiv 20x

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 12.)

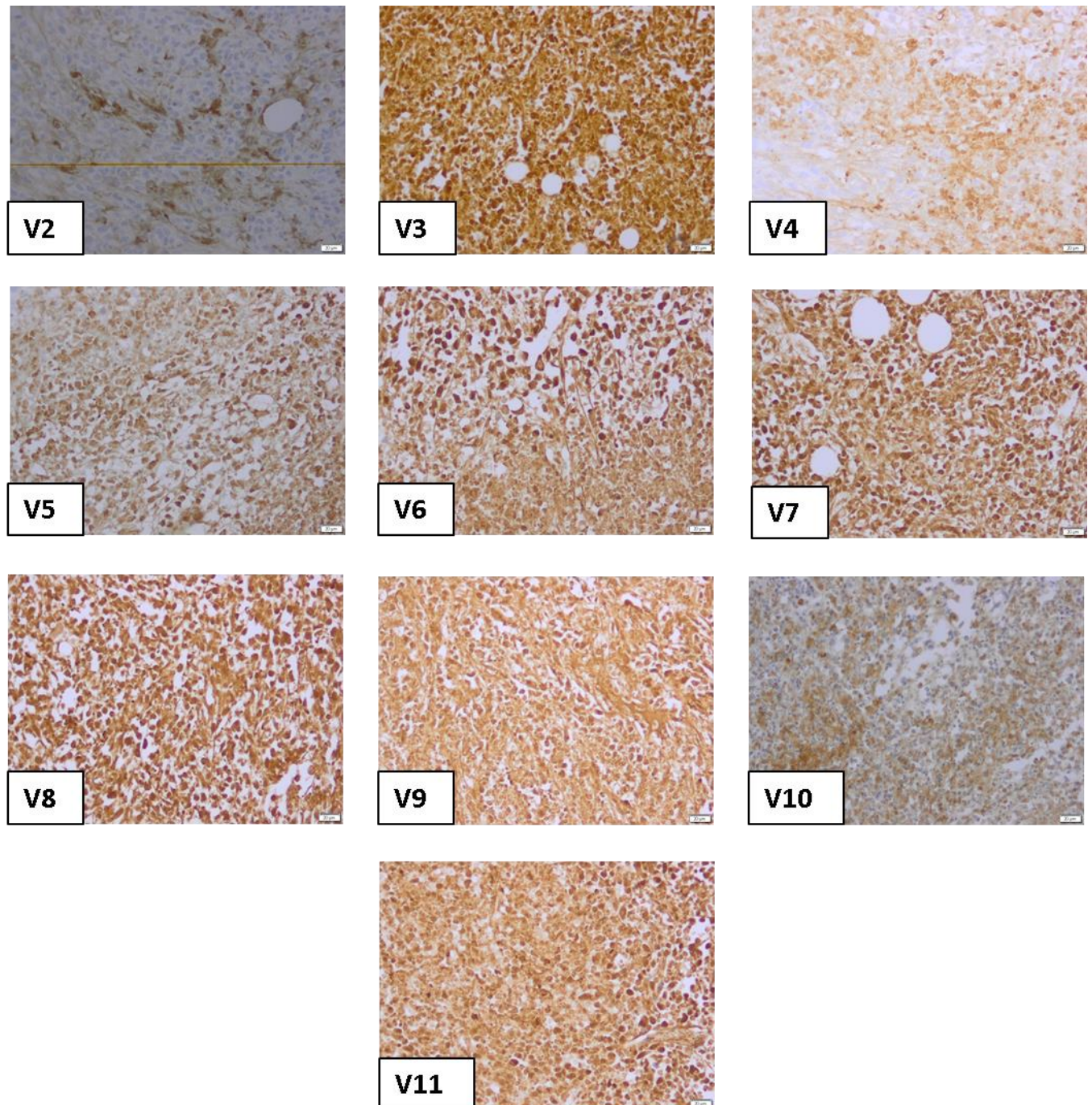


Figura 12. Expresia imunohistochimică a CD31 la loturile experimentale V2 - tumoră 10 zile, V3 - tumoră 22 zile, V3 - PTX-UA-PMs scăzut, V4 - PTX-UA-PMs ridicat, V5 – PTX-PMs scăzut, V6 – PTX-PMs ridicat), V7 - PTX scăzut, V8 - PTX ridicat, V9 - UA scăzut, V10 - UA ridicat, obiectiv 20x

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 44th Annual Scientific Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu” (ICBP-NS) held jointly with The 40th 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 4×10^3 celule în fiecare godeu studiat. Fiecare substanță de evaluat, a fost aplicată în 3 concentrații asupra culturii celulare de 4T1. În aceste experiment 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.

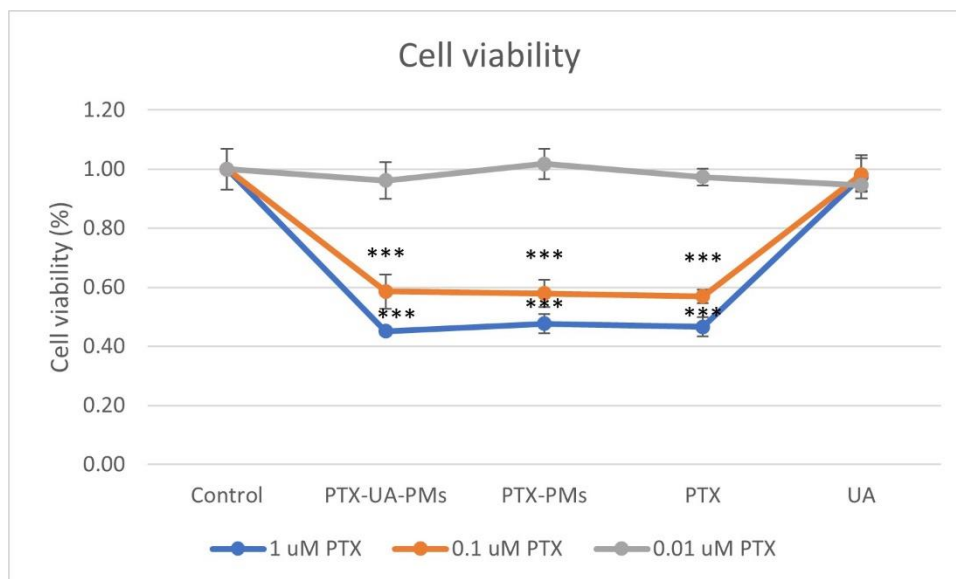


Figura 13. Detectarea viabilității celulare în urma tratamentelor cu PTX-UA-PMs, PTX-PMs, PTX și UA. Semnificație statistică: *** $p < 0.001$ comparat cu lotul control

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 μM PTX (Figura 13.).

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 μM 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.

Gradul de realizare a obiectivelor

Obiectiv 1. Proiectarea, dezvoltarea și caracterizarea unui nou sistem dual de micelle 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 (2024) – grad de realizare 69%

Livrabile realizate:

- rezultate al testului de apoptoză celulară pentru testarea PTX-UA PM, în comparație cu PTX PM și PTX liber (Activitatea 2.1)
- protocol experimental *in vivo*, probe prelevate (Activitatea 2.2)
- morfometrie (Activitatea 2.3)
- imagini IHC cu markerule Ki67 și PCNA ale tumorilor (Activitatea 2.4)
- imagini test TUNEL ale tumorilor (Activitatea 2.5)
- imagini IHC cu markerul CD31 ale tumorilor (Activitatea 2.6)
- participare la conferință internațională (Activitatea 2.7)
- rezultate CCK8 pentru testarea PTX-UA PM, în comparație cu PTX PM și PTX liber (Activitatea 2.8)

Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor:

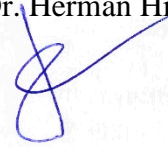
O participare la conferințe naționale/internaționale:

1. Herman Hildegard, Leonard Atanase, Anca Hermenean. Development of a novel dual PTX-ursolic acid loaded polymeric micellar system. *The 44th Annual Scientific Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu” (ICBP-NS) held jointly*

with *The 40th Annual Scientific Session of the Romanian Society For Cell Biology (RSCB)*,
November 16-17, Bucharest, Romania, **2023** – prezentare poster

Director Proiect,

Dr. Herman Hildegard

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, cursive 'H' followed by a long horizontal stroke that loops back under the 'H'.