

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”

BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

*Studiul unor sisteme supramoleculare de incluziune având la bază
complexi metalici cu acțiune biologică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. UIVAROSI VALENTINA

Student-doctorand:

RADU CLAUDIU

2024

Cuprins

Lucrări realizate în cadrul tezei de doctorat.....	8
Lista cu abrevieri și simboluri	9
Introducere.....	11
Partea generală.....	13
1. Complecși metalici ai flavonelor.....	13
1.1. Structura chimică a hidroxiflavonelor.....	13
1.2. Proprietățile antioxidante ale hidroxiflavonelor.....	14
1.3. Proprietățile antimicrobiene ale hidroxiflavonelor	15
1.4. Proprietățile antitumorale ale hidroxiflavonelor	16
1.5. Capacitatea hidroxiflavonelor de a forma combinații complexe cu ionii metalici .	17
1.6. Complecși ai hidroxiflavonelor cu ioni ai metalelor biogene și abiogene	19
1.6.1. Complecși ai hidroxiflavonelor cu ioni ai metalelor biogene.....	20
1.6.2. Complecși ai hidroxiflavonelor cu ioni ai metalelor abiogene	24
2. Sisteme de transport la țintă.....	29
2.1. Nanospongii ca sisteme de transport.....	30
2.1.1. Nanospongi derivați de ciclodextrină cu legături carbamice.....	33
2.1.2. Nanospongi derivați de ciclodextrină cu legături carbonat	33
2.1.3. Nanospongi derivați de ciclodextrine cu legături esterice	34
2.1.4. Nanospongi derivați de ciclodextrine cu legături eterice.....	34
2.1.5. Nanospongi funcționalizați	35
2.1.6. Nanospongi stimuli senzitivi	35
2.1.7. Nanospongi imprimați molecular	35
2.2. Lipozomii ca agenți de transport.....	35

II. Contribuții personale.....	38
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	38
4. Metodologia generală a cercetării.....	39
4.1. Complecși ai Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona.....	39
4.1.1. Sinteza complecșilor.....	39
4.1.2. Caracterizarea complecșilor	39
4.2. Nanospongi derivați de ciclodextrine ca agenți de transport	39
4.2.1. Sinteza nanospongiilor	39
4.2.2. Studii de solubilitate	39
4.2.3. Prepararea și caracterizarea complecșilor de incluziune	40
4.3. Lipozomii ca agenți de transport.....	40
4.3.1. Prepararea și caracterizarea lipozomilor.....	40
4.4. Evaluarea <i>in vitro</i> a acțiunii antitumorale	40
4.4.1. Studii de citotoxicitate și impactul asupra procesului apoptotic	40
5. Complecșii metalici ai Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona	42
5.1. Introducere	42
5.2. Materiale și metode	42
5.2.1. Reactivi utilizați.....	42
5.2.2. Sinteza complecșilor metalici ai aluminiului și galiului cu 5-hidroxi flavona.....	42
5.2.2.1. Sinteza complexului Al(III) cu 5-hidroxi flavona (Al-5HF)	42
5.2.2.2. Sinteza complexului Ga(III) cu 5-hidroxi flavona (Ga-5HF).....	42
5.2.3. Caracterizarea complecșilor	43
5.2.3.1. Spectrele de absorbție în infraroșu.....	43
5.2.3.2. Spectrele de absorbție în ultraviolet și vizibil.....	43
5.2.3.3. Analiza termică TGA și DSC	43

5.2.3.4. Predicția proprietăților complecșilor cu ajutorul serviciului web <i>SwissADME</i>	44
5.3. Rezultate și discuții	45
5.3.1. Caracterizarea complecșilor	45
5.3.1.1. Spectrele FT-IR.....	45
5.3.1.2. Spectrele UV-VIS	48
5.3.1.3. Analiza termică TGA și DSC	48
5.3.1.4. Predicția proprietăților complecșilor cu ajutorul serviciului web <i>SwissADME</i>	53
6. Nanospongii derivați de ciclodextrine ca sisteme de transport pentru combinațiile complexe ale Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona (complecși de incluziune).....	57
6.1. Introducere	57
6.2. Materiale și metode	57
6.2.1. Reactivi utilizați.....	57
6.2.2. Sinteza nanospongilor	57
6.2.2.1. Sinteza nanospongului cu difenilcarbonat (DPCNS).....	58
6.2.2.2. Sinteza nanospongului cu dianhidrida piromelitică (PMDACD)	59
6.2.3. Influența nanospongilor asupra solubilității complecșilor metalici.....	60
6.2.3.1. Trasarea dreptelor etalon în vederea cuantificării complecșilor metalici	61
6.2.3.1.1. Dreapta etalon pentru determinarea Al-5HF	61
6.2.3.1.2. Dreapta etalon pentru determinarea Ga-5HF	62
6.2.3.2. Determinarea solubilității în apă a complecșilor metalici.....	64
6.2.3.3. Diagramele de fază-solubilitate	65
6.2.3.3.1. Solubilitatea complecșilor Al-5HF și Ga-5HF în prezența DPCNS – diagrame de fază.....	66

6.2.3.3.2. Solubilitatea complexelor Al-5HF și Ga-5HF în prezența PMDACD – diagrame de fază.....	67
6.2.4. Prepararea sistemelor supramoleculare de incluziune formate din nanospongi derivați de ciclodextrină și combinațiile complexe studiate (complexi de incluziune)	67
6.2.5. Caracterizarea complexelor de incluziune	68
6.2.5.1. Spectrele de absorbție în infraroșu.....	68
6.2.5.2. Spectrele de absorbție în ultraviolet și vizibil.....	68
6.2.5.3. Analiza termică TGA și DSC	68
6.2.5.4. Capacitatea de încărcare (LC) și eficiența de încapsulare (EE).....	69
6.2.5.4.1. Materiale și echipamente.....	69
6.2.5.4.2. Condiții cromatografice.....	69
6.2.5.4.3. Efectuarea determinării	70
6.3. Rezultate și discuții	71
6.3.1. Influența nanospongelor DPCNS și PMDACD asupra solubilității complexelor Al-5HF și Ga-5HF	71
6.3.1.1. Determinarea solubilității în apă a complexelor	71
6.3.1.2. Studiu de solubilitate – diagrame de fază	72
6.3.1.2.1. Studiu de solubilitate în prezența DPCNS – diagrame de fază	72
6.3.1.2.2. Studiu de solubilitate în prezența PMDACD – diagrame de fază.....	75
6.3.2. Caracterizarea complexelor de incluziune	78
6.3.2.1. Spectrele FT-IR ale complexelor de incluziune	78
6.3.2.2. Spectrele UV-VIS ale complexelor de incluziune.....	83
6.3.2.3. Analiza termică TGA și DSC	84
6.3.2.4. Capacitatea de încărcare și eficiența de încapsulare	89
7. Lipozomii ca sisteme de transport pentru combinațiile complexe ale Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona.....	95

7.1. Introducere	95
7.2. Materiale și metode	95
7.2.1. Formula cantitativă a lipozomilor.....	96
7.2.2. Prepararea lipozomilor	98
7.2.2.1. Prepararea lipozomului Al-5HF-lip1	99
7.2.2.2. Prepararea lipozomului Ga-5HF-lip1	100
7.2.2.3. Prepararea lipozomului Al-5HF-lip2	100
7.2.2.4. Prepararea lipozomului Ga-5HF-lip2	101
7.2.3. Caracterizarea lipozomilor	101
7.3. Rezultate și discuții	101
7.4. Concluzii:	106
8. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității produșilor studiați și a efectului asupra procesului apoptotic pe linii celulare tumorale umane și pe celule normale umane	108
8.1. Introducere	108
8.2. Materiale și metode	108
8.2.1. Caracteristicile liniilor celulare standardizate	108
8.2.2. Cultivarea liniilor celulare	109
8.2.2.1. Materiale, reactivi și aparatură.....	109
8.2.2.2. Pasajul liniilor celulare aderente.....	109
8.2.2.3. Numărarea celulelor.....	110
8.2.2.4. Congelarea/ decongelarea celulelor	110
8.2.3. Evaluarea citotoxicității celulare prin tehnica colorimetrică (MTS).....	111
8.2.3.1. Materiale, reactivi și aparatură:.....	112
8.2.3.2. Tratamentele celulelor.....	112
8.2.3.3. Protocolul de lucru.....	112

8.3. Rezultate și discuții	114
8.3.1. Evaluarea citotoxicității celulare a compușilor studiați.....	114
8.3.1.1. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra celulelor normale HUVEC.....	116
8.3.1.2. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra celulelor normale HUVEC.....	118
8.3.1.3. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra celulelor tumorale de colon LoVo.....	120
8.3.1.4. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra celulelor tumorale LoVo	122
8.3.1.5. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra celulelor tumorale ovariene SKOV-3.....	124
8.3.1.6. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra celulelor tumorale SKOV-3	126
8.3.2. Impactul compușilor analizați asupra procesului apoptotic	127
8.3.2.1. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra procesului apoptotic al celulelor normale HUVEC	128
8.3.2.2. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra procesului apoptotic al celulelor normale HUVEC.....	129
8.3.2.3. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra procesului apoptotic al celulelor tumorale de colon LoVo	130
8.3.2.4. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra procesului apoptotic al celulelor tumorale de colon LoVo	131
8.3.2.5. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în nanospongi asupra procesului apoptotic al celulelor tumorale ovariene SKOV-3	133
8.3.2.6. Efectul complexilor Al(III) și Ga(III) incluși în lipozomi asupra procesului apoptotic al celulelor tumorale ovariene SKOV-3.....	134
9. Concluzii și contribuții personale	136

9.1. Concluzii	136
9.2. Contribuții personale, elemente de originalitate	139
Bibliografie.....	140

1. Problema fundamentală

Cancerul constituie una din principalele cauze ale mortalității populației la nivel global, aproximativ una din șase persoane fiind victima acestei maladii. În anul 2022 au fost raporate aproape 20 de milioane de cazuri noi de cancer, și 9,7 milioane de decese. Estimările sugerează că aproximativ unul din cinci bărbați sau femei dezvoltă cancer de-a lungul vieții, în timp ce aproximativ unul din nouă bărbați și una din 12 femei mor din cauza neoplasmelor maligne [1,2].

2. Ipoteza de cercetare

Activitatea antitumorală a flavonelor este cunoscută, fiind bine documentată în literatura de specialitate. Aceste molecule simple prezintă o multitudine de mecanisme prin care își exercită proprietățile anticanceroase și anume, modulează activitățile enzimelor de captare a speciilor reactive de oxigen (ROS), induc apoptoza, participă la oprirea ciclului celular și autofagie, suprimă proliferarea și invazivitatea celulelor canceroase [3,4].

Prin complexarea flavonelor cu ioni metalici, poate avea loc modificarea profilelor farmacocinetice și farmacodinamice, cu creșterea potenței efectelor farmacologice [5–7]. Dezavantajul principal al complexilor metalici cu flavone este reprezentat de solubilitatea scăzută în apă. Prin urmare, pentru a contracara acest dezavantaj se pot utiliza sisteme de transport care pot îmbunătăți proprietățile farmacocinetice ale substanțelor greu solubile.

Ipoteza cercetării s-a axat pe încercarea de a maximiza proprietățile antitumorale ale unor complecși metalici ai flavonelor, prin îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice și farmacodinamice, utilizând ca strategie înglobarea complexilor metalici în sisteme de transport.

3. Obiectivele cercetării

În contextul global în care este necesară descoperirea de noi tratamente anticanceroase, cercetările realizate în prezenta lucrare se aliniază tendințelor moderne în dezvoltarea de noi strategii în terapia antitumorală. Pornind de la efectul antitumoral promițător al 5-hidroxi flavonei, comparativ cu alți derivați din aceeași clasă [8], precum și al complexilor săi cu Al^{3+} și Ga^{3+} , caracterizați însă printr-o solubilitate scăzută în apă, pe parcursul acestei lucrări am evaluat posibilitățile de îmbunătățire a profilului farmacocinetic și farmacodinamic al combinațiilor complexe menționate, prin înglobarea acestor compuși în două sisteme de transport, obținându-se sistemele supramoleculare de incluziune.

4. Metodologia de cercetare

Metodologia de cercetare a urmărit sinteza combinațiilor complexe ale 5-hidroxi flavonei cu Al(III) și Ga(III), caracterizarea acestor complecși, urmată de înglobarea acestora în două tipuri de sisteme de transport, și anume nanospongii derivați de ciclodextrine și sistemele lipozomale. Sistemele de transport obținute au fost caracterizate și au făcut evaluate din perspectiva citotoxicității și efectului apoptotic asupra a două linii celulare umane standardizate, derivate din tumori maligne ovariene (SKOV-3) și tumori colorectale (LoVo).

5. Complecșii metalici ai aluminiului și galiului cu 5-hidroxi flavona

Sinteza combinațiilor complexe ale 5-hidroxi flavonei cu ionii metalici Al^{3+} și Ga^{3+} a fost efectuată utilizând un procedeu general care constă în amestecarea de soluții de sare metalică și 5-hidroxi flavonă în etanol în raport molar de 1:3, corectând pH-ul soluției finale la valoarea 6, pentru a favoriza deprotonarea ligandului, urmată de încălzirea la reflux, timp de 3 ore, a amestecului de reactanți.

Pentru caracterizarea complecșilor metalici sintetizați, au fost înregistrate spectrele în infraroșu (FT-IR), în ultraviolet-vizibil (UV-VIS), și s-a realizat analiza termică prin calorimetrie diferențială de scanare (DSC) și termogravimetrie (TGA). În vederea evaluării *in-silico* a complecșilor metalici a fost utilizat serviciul web *SwissADME*, astfel estimându-se anumite proprietăți ce influențează profilul farmacocinetic al moleculelor. Complecșii metalici încalcă două reguli ale lui Lipinski, prezentând un logP mai mare de cinci și o masă moleculară mai mare de 500 Da, însă conform modelului computațional Veber, complecșii metalici respectă regulile de evaluare a biodisponibilității orale.

6. Nanospongii derivați de ciclodextrine ca sisteme de transport pentru combinațiile complexe ale Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona (complecși de incluziune)

Sinteza nanospongiilor are la bază reacția de condensare a ciclodextrinelor cu ajutorul unui agent de reticulare. Ciclodextrina utilizată a fost β -ciclodextrina, iar agenții de reticulare au fost: difenilcarbonatul (DPC) rezultatul fiind un nanosponge cu caracter predominant hidrofob (DPCNS), și respectiv dianhidrida piromelitică (PMDA), obținându-se un polimer mai hidrofil (PMDACD). Datorită acestor macromolecule cu grade diferite de lipofilie, am dorit observarea influenței acestei variabile în ceea ce privește solubilitatea și efectele farmacodinamice ale complecșilor analizați.

În cadrul studiilor de solubilitate s-a determinat efectul pe care îl au nanospongii derivați de ciclodextrină asupra solubilității combinațiilor complexe. Solubilitatea în apă a complexelor este scăzută (1,18 $\mu\text{g/mL}$ în cazul Al-5HF și 0,71 $\mu\text{g/mL}$ în cazul Ga-5HF). În prezența nanospongului de ciclodextrină DPCNS, solubilitatea scade, acest lucru datorându-se caracterului hidrofob al macromoleculii. În ceea ce privește polimerul cu dianhidrida piromelitică, prin condensarea moleculelor de ciclodextrină cu ajutorul agentului de reticulare, rămân grupări carboxilice libere, care cresc gradul de hidrofilie al macromoleculii. Prin urmare, prin interacțiunea combinațiilor complexe metalice cu polimerul PMDACD, solubilitatea în apă a complexului de Al(III) a crescut de aproximativ 9,5 ori, iar în cazul complexului de Ga(III) de aproximativ 16,5 ori.

Au fost determinate și diagramele de fază solubilitate, după modelul Higuchi și Connors [9]. Evaluarea concentrației analiților a fost efectuată spectrofotometric. În cazul complexului Al-5HF în prezența DPCNS s-a observat un trend descrescător, solubilitatea complexului de incluziune format fiind foarte scăzută; astfel, în prezența nanospongului, complexul metalic începe să precipite imediat, atingând un platou la aproximativ 2 $\mu\text{g/mL}$. În cazul complexului Ga-5HF s-a observat o diagramă de fază-solubilitate de tip B_s, unde nanospongele crește inițial solubilitatea complexului, ajungând la un platou, după care urmează un trend descrescător.

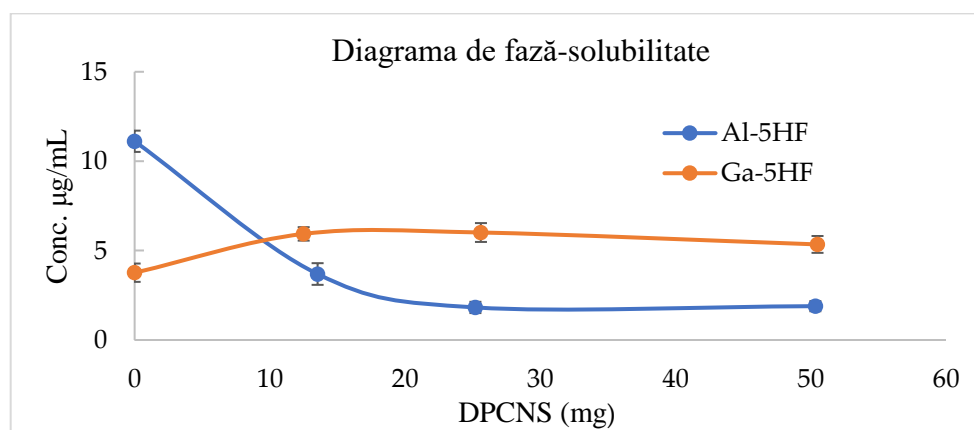


Figura 1. Diagrame de fază solubilitate în prezența DPCNS

În prezența polimerului PMDACD solubilitatea complexelor metalice Al-5HF și Ga-5HF crește odată cu cantitatea de PMDACD adăugată. Astfel, digramele de fază-solubilitate sunt de tip A_L, unde dependența este liniară, punctele înscriindu-se pe o dreaptă cu un coeficient de corelare R^2 de 0,9805 în cazul Al-5HF și 0,9948 în cazul Ga-5HF.

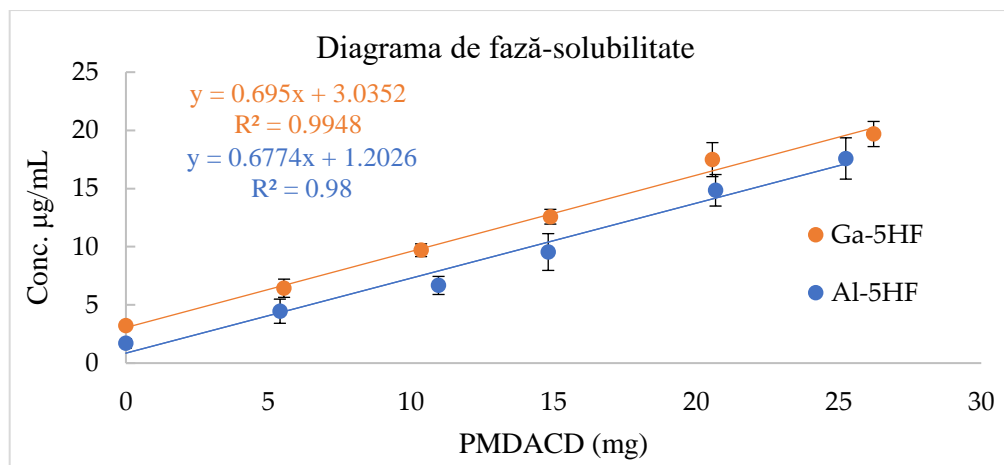


Figura 2. Diagrame de fază solubilitate în prezența PMDADC

Complecșii de incluziune au fost preparați prin înglobarea complecșilor metalici de Al(III) și Ga(III) în rețeaua tridimensională reticulată a nanospongului. Această înglobare s-a efectuat atât în suspensie apoasă urmată de uscare, rezultând compușii denumiți Al-5HF-DPCNS2 și Ga-5HF-DPCNS2, cât și mecanochimic prin triturare, obținându-se Al-5HF-DPCNS1 și Ga-5HF-DPCNS1, respectiv Al-5HF-PMDACD1 și Ga-5HF-PMDACD1. Complecșii de incluziune au fost caracterizați prin spectrometrie FT-IR, UV-VIS și prin analiză termică DSC și TGA, prin coroborarea acestor tehnici demonstrându-se interacțiunile care au loc între complecșii metalici și macromoleculele de nanosponge.

În vederea evaluării procesului de înglobare au fost determinate și capacitatea de încărcare și eficiența de încapsulare a nanospongelor, determinarea fiind efectuată printr-o tehnică cromatografică de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC). În ceea ce privește eficiența de încapsulare, aceasta a prezentat valori între $64,96 \pm 1,92$ pentru complexul de incluziune Al-5HF-PMDACD1 și $91,00 \pm 1,73$ pentru Ga-5HF-DPCNS2. În strânsă corelație sunt și rezultatele de la capacitatea de încărcare, acestea variind între $10,43 \pm 0,31$ pentru Al-5HF-PMDACD1 și $13,82 \pm 0,26$ pentru Ga-5HF-DPCNS2. Mai mult decât atât, se pot observa valori mai ridicate pentru Ga-5HF, comparativ cu Al-5HF.

7. Lipozomii ca sisteme de transport pentru combinațiile complexe ale Al(III) și Ga(III) cu 5-hidroxi flavona

Metoda de preparare a lipozomilor a avut la bază tehnica hidratării stratului lipidic, și s-a bazat pe solubilizarea substanțelor lipofile în solvenți organici, urmată de evaporarea acestora pentru a obține un film lipidic. Filmul rezultat a fost ulterior rehidratat cu o soluție

corespunzătoare pentru a forma vezicule lipozomale multilamelare (MLV), care au fost extrudate în mod repetat prin membrane de policarbonat pentru obținerea de vezicule lipozomale unilamelare (SUV).

Au fost preparate două formulări lipozomale pentru fiecare complex. Prima formulare conține complexul studiat prins într-o matrice de Phospholipon 90G și Tween 80 ca surfactant. Codificările acestor formulări lipozomale în prezentul studiu au fost: Al-5HF-lip1 (pentru complexul metalic al aluminiului) și Ga-5HF-lip1 (pentru complexul metalic al galiului). A doua formulare conține în plus colesterol. Codificările acestor formulări lipozomale în prezentul studiu au fost: Al-5HF-lip2 (pentru complexul metalic al aluminiului) și Ga-5HF-lip2 (pentru complexul metalic al galiului). Colesterolul adăugat în formulările Al-5HF-lip2 și Ga-5HF-lip2 are rolul de a conferi stabilitate structurală suplimentară lipozomilor. Colesterolul se intercalează în structura bistratului fosfolipidic, reducând fluiditatea membranei și crescând rezistența mecanică a lipozomilor.

Caracterizarea fizico-chimică a formulărilor lipozomale obținute s-a realizat prin evaluarea dimensiunilor particulelor sistemelor rezultate și a indicelui de polidispersie (PDI) utilizând tehnica DLS (împrăștiere dinamică a luminii), precum și prin evaluarea potențialului electrocinetic al acestora.

Au fost obținuți lipozomi cu dimensiuni medii între 134 nm și 230 nm, cu formulările Ga-5HF-lip2 prezentând cele mai mici dimensiuni ($133,98 \pm 8,34$ nm). Valorile PDI obținute au variat între $0,2161 \pm 0,011$ și $0,3220 \pm 0,027$, indicând o distribuție dimensională uniformă, cu cea mai omogenă formulare fiind Ga-5HF-lip2. Acest rezultat sugerează că această formulare are particule cu dimensiuni similare, ceea ce este crucial pentru stabilitatea și reproductibilitatea lipozomilor în aplicații clinice. Potențialul electrocinetic al formulărilor a variat între $-6,42 \pm 0,79$ mV și $-8,56 \pm 0,21$ mV, indicând o stabilitate electrostatică adecvată. Ga-5HF-lip2 a prezentat cel mai negativ potențial electrocinetic ($-8,56 \pm 0,21$ mV), ceea ce sugerează o stabilitate coloidală mai mare, esențială pentru prevenirea agregării și menținerea unei suspensii stabile.

8. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității produșilor studiați și a efectului asupra procesului apoptotic pe linii celulare tumorale umane și pe celule normale umane

Pentru realizarea testelor de citotoxicitate, am utilizat două linii celulare umane standardizate, derivate din tumori maligne ovariene (SKOV-3) și tumori colorectale (LoVo). Studiul a vizat investigarea efectului complecșilor metalici neincluși și respectiv incluși în

sistemele de transport studiate asupra celulelor tumorale LoVo și SKOV-3 comparativ cu linia celulară normală HUVEC, sub raportul impactului asupra proliferării și apoptozei celulare. Controlul pozitiv al studiului a fost citostaticul cisplatina (CisPt), utilizată în mod obișnuit pentru tratarea cancerului de colon și ovarian. Am expus liniile celulare la diferite concentrații ale compușilor și sistemelor de transport timp de 24 și 48 ore la concentrații cuprinse între 0,3125 și 50 $\mu\text{g/mL}$.

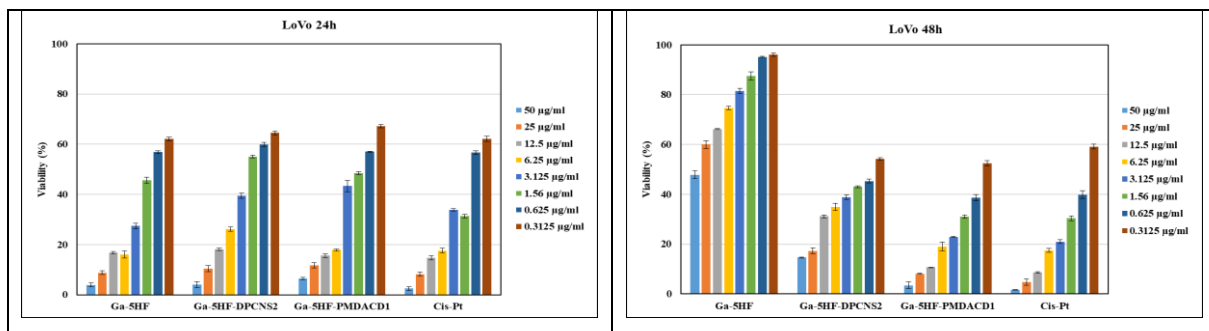


Figura 3. Impactul complexului Ga-5HF izolat și inclus în nanospongi asupra viabilității celulelor tumorale de colon LoVo.

Analiza datelor de viabilitate obținute în urma tratamentului liniei tumorale LoVo cu complexul Ga-5HF-PMDACD1 arată că după 24 de ore de tratament, acesta acționează ca citostaticul de referință (CisPt), inhibând semnificativ viabilitatea celulară indiferent de concentrație (Fig. 3).

În cazul complecșilor Ga(III) cu nanospongi, după 48 de ore de tratament a fost observat un efect mult mai puternic decât cel indus de Ga-5HF. Efectul compusului Ga-5HF-PMDACD1 este comparabil cu cel al cisplatinei, inhibând viabilitatea celulelor LoVo sub 50%.

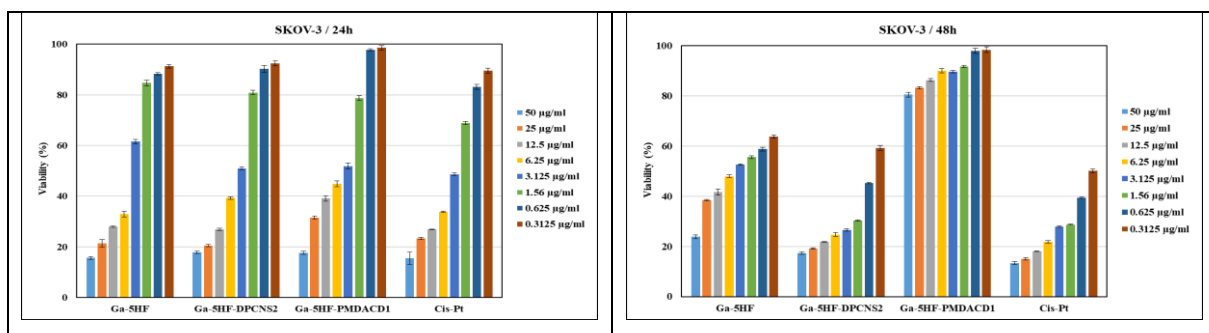


Figura 4. Impactul complexului Ga-5HF izolat și inclus în nanospongi asupra viabilității celulelor tumorale SKOV-3.

În cazul celulelor tumorale SKOV-3, se poate observa o diferență mare între cele două tipuri de nanospongi, complexii polimerului hidrofili fiind mult mai puțin activi comparativ cu cei ai nanospongului lipofil DPCNS, indiferent de ionul metalic. Prin compararea din punct de vedere al ionilor metalici, se observă o activitate mai pronunțată în cazul complexilor Ga(III). Mai mult decât atât, complexul Ga-5HF-DPCNS2 prezintă efecte antitumorale pe această linie de celule asemănătoare cu cele ale Cis-Pt.

În ceea ce privește procesul apoptotic, activitatea cea mai bună au prezentat-o formulările lipozomale cu complex de Ga(III). În urma tratamentului celulelor tumorale ovariene SKOV-3 cu formulările Ga-5HF-lip1 și Ga-5HF-lip2, timp de 48 de ore, la cele două concentrații de lucru (0,5 și 5 $\mu\text{g/mL}$), se înregistrează o creștere a procentelor de apoptoză, aproape de două ori mai mari decât citostaticul Cis-Pt (Fig. 5).

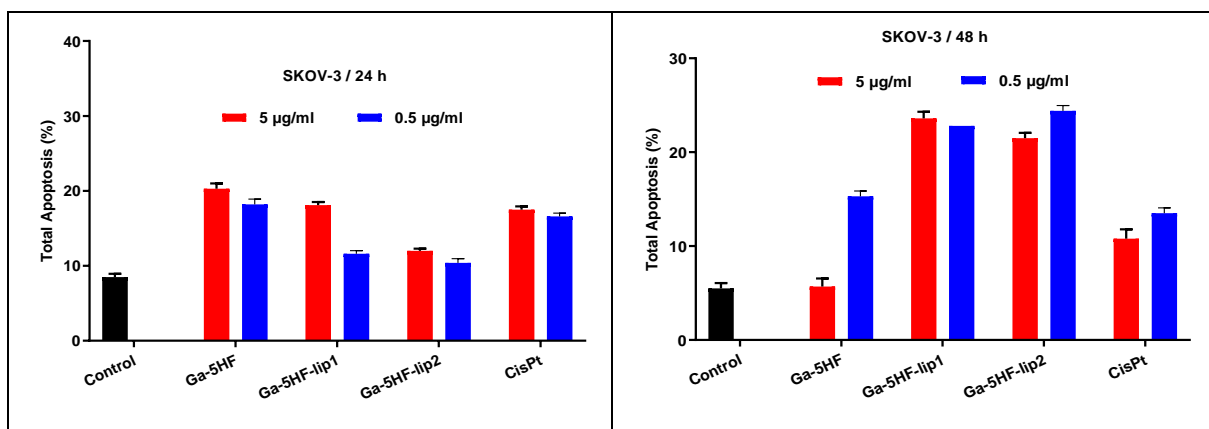


Figura 5. Efectul complexului Ga-5HF izolat și inclus în lipozomiasupra procesului apoptotic al celulelor tumorale SKOV-3

9. Concluzii și contribuții personale

9.1. Concluzii

În prezenta teză de doctorat, am urmărit îmbunătățirea profilelor farmacocinetice și farmacodinamice ale unor complecși ai derivatului flavonic natural 5-hidroxiavona cu ionii metalici Al^{3+} și Ga^{3+} .

Complecșii metalici studiați sunt descriși în literatură, dovedind efecte antitumorale promițătoare. În prezenta lucrare, am sintetizat compușii pe baza metodelor din literatură și am verificat identitatea și puritatea acestora prin metode FT-IR, UV-VIS și prin analiză termică: TGA și DSC. Folosind metode *in silico*, am realizat o analiză de predicție a unor proprietăți farmacocinetice ale complecșilor metalici studiați.

În vederea maximizării efectelor farmacodinamice și a profilelor farmacocinetice ale acestor compuși, am sintetizat două tipuri de sisteme de transport: nanospongiile derivați de ciclodextrine și lipozomii.

Am preparat două tipuri de nanospongi, unul hidrofil și unul hidrofob folosind dianhidrida piromelitică, respectiv difenilcarbonatul ca agenți de reticulare. Confirmarea formării complexilor de incluziune a fost demonstrată prin două tehnici diferite, și anume FT-IR și analiza termică TGA și DSC.

În studiile de solubilitate efectuate am arătat că incluziunea în nanospongele hidrofile PMDACD duce la o creștere semnificativă a solubilității complexilor metalici. Prin diagramele de fază-solubilitate s-a observat o dependență liniară a concentrației complexilor în prezența cantităților crescătoare de nanosponge PMDACD.

Cel de al doilea tip de încapsulare studiat a fost reprezentat de sistemele lipozomale. Am preparat două tipuri de lipozomi, în care au fost înglobați complexii metalici ai aluminiului și galiului cu 5-hidroxi flavona.

Ambele tipuri de sisteme supramoleculare au făcut subiectul unui studiu de determinare a citotoxicității și a efectului asupra procesului apoptotic, studiile fiind realizate *in vitro*, pe linii de celule tumorale umane LoVo și SKOV-3, comparativ cu linia celulară normală HUVEC. Controlul pozitiv al studiului a fost citostaticul cisplatina, care este utilizată în mod obișnuit pentru a trata cancerul de colon și ovar.

Complexii de incluziune cu nanospongele hidrofile PMDACD afectează semnificativ celulele tumorale de colon LoVo, cu un efect asemănător cu cel al cisplatinei, în cazul complexului Ga(III) efectul fiind chiar superior antitumoralului pe studiile *in vitro* efectuate.

Complexii de incluziune cu nanospongele hidrofobe Al-5HF-DPCNS2 și Ga-5HF-DPCNS2 au fost cei mai eficienți pe celulele tumorale ovariene SKOV-3, efectele citostatice fiind comparabile cu cisplatina.

Atât complexii de incluziune cu nanospongiile, cât și complexii lipozomali ai galiului s-au dovedit a fi mai eficienți decât cei ai aluminiului.

Comparând cele două sisteme de transport, pe ambele tipuri de celule, nanospongiile derivați de ciclodextrine s-au dovedit a avea acțiune citotoxică superioară sistemelor lipozomale.

În ceea ce privește studiul procesului apoptotic, în cazul celulelor tumorale LoVo, toate sistemele supramoleculare preparate au determinat o creștere a apoptozei asemănătoare cu cea indusă de cisplatină. Celulele tumorale SKOV-3 au suferit o creștere diferită a procesului apoptotic: în cazul complexilor aluminiului și galiului cu nanospongele hidrofil PMDADC creșterea este asemănătoare cu cea determinată de cisplatină, iar în cazul complexilor lipozomali aceasta este chiar superioară antitumoralului.

9.2. Contribuții personale

Lucrarea de cercetare prezintă contribuții personale în ceea ce privește dezvoltarea de noi agenți de transport ai moleculelor cu efecte antitumorale, prin această metodă îmbunătățindu-se anumite proprietăți ce influențează profilul farmacocinetic și farmacodinamic.

Caracterul de originalitate este constituit de realizarea complexilor de incluziune formați între complexii metalici și cele două sisteme de transport studiate, această asociere nefiind citată în literatura de specialitate.

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat includ completarea caracterizării fizico-chimice a complexilor metalici studiați (*capitolul 5*), sintetizarea nanospongelor și a complexilor de incluziune cu nanospongii și caracterizarea acestora (*capitolul 6*), prepararea și caracterizarea complexilor lipozomali (*capitolul 7*), precum și evaluarea *in vitro* a efectului farmacologic al formulărilor obținute în cadrul tezei de doctorat (*capitolul 8*). Metoda HPLC de determinare cantitativă a ligandului din *capitolul 6* prezintă de asemenea caracter de originalitate.

Bibliografie

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74, 229–63, 2024.
- [2] Frick C, Rungay H, Vignat J, Ginsburg O, Nolte E, Bray F, et al. Quantitative estimates of preventable and treatable deaths from 36 cancers worldwide: a population-based study. *Lancet Glob Health*, 11, 1700–12, 2023.
- [3] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23, 519–34, 2003.
- [4] Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457, 2020.
- [5] Munteanu AC, Badea M, Olar R, Silvestro L, Mihaila M, Brasoveanu LI, et al. Cytotoxicity studies, DNA interaction and protein binding of new Al (III), Ga (III) and In (III) complexes with 5-hydroxyflavone. *Appl Organomet Chem*, 32(12), 4579, 2018.
- [6] De Souza RFV, De Giovanni WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97–104, 2004.
- [7] Birjees Bukhari S, Memon S, Mahroof Tahir M, Bhanger MI. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-queracetin complex. *J Mol Struct*, 892, 39–46, 2008.
- [8] Nishizaki Y, Ishimoto Y, Hotta Y, Hosoda A, Yoshikawa H, Akamatsu M, et al. Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(16), 4706–10, 2009.
- [9] Higuchi T, Connors K.A. Phase-Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, 117-212, 1965.

Lucrări realizate în cadrul tezei de doctorat

Lucrări publicate în reviste indexate ISI (Clarivate) cu factor de impact

1. Radu C, Olteanu AA, Aramă C, Mihăilă M, Uivaroși V. Investigating the Effect of Cyclodextrin Nanosponges and Cyclodextrin-Based Hydrophilic Polymers on the Chemical Pharmaceutical and Toxicological Profile of Al(III) and Ga(III) Complexes with 5-Hydroxyflavone. *Appl. Sci.*, 14, 5441, 2024. <https://doi.org/10.3390/app14135441>

Indexarea revistei: AGRIS, BibCnrs, CAPlus / SciFinder, CNKI, CNPIEC, Dimensions, DOAJ, EBSCO, Elsevier Databases (Scopus), FRIDOC, Gale, Inspec, INSPIRE, J-Gate, OpenAIRE, OSTI (U.S. Department of Energy), PATENTSCOPE, ProQuest, SafetyLit, Web of Science.

Factorul de impact (IF)/2023: 2,5 (Q1 - JCR Category Engineering, Multidisciplinary)

Lucrare realizată din capitolele 6 și 8 (paginile 57-94 și 108-135).

2. **Radu C**, Olteanu AA, Arama CC, Uivarosi V. Hydroxiflavone Complexes with Biogenic and Abiogenic Metals. *Farmacia*, 72, 751–64, 2024. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.4.3>

Indexarea revistei: Science Citation Index Expanded, SciVerse Scopus, Chemical Abstracts Service, EMBASE, SCImago Journal&Country Rank, IPA, British Library, SSCI, A&HCI, CPCIS, CPCIS-SH, BKCI-S, BKCI-SH, ESCI, CCR-EXPANDED, IC.

Factorul de impact (IF)/2023: 1,6.

Lucrare realizată din capitolul 1 (paginile 13-29).

Lucrări publicate sub formă de postere

1. **Radu C**, Olteanu AA, Uivaroși V, Aramă C. Investigating the Effect of Cyclodextrin Nanosponges and Cyclodextrin-Based Hydrophilic Polymers on the Chemical Pharmaceutical and Toxicological Profile of Al(III) and Ga(III) Complexes with 5-Hydroxyflavone. European Cyclodextrin Conference, ediția 7, 5-8 septembrie, 2023, Bugapesta, Ungaria.

2. **Radu C**, Anuța V, Dinu-Pirvu CE, Mihăilă M, Uivaroși V. Investigating the effect of liposomal inclusion on the in vitro anticancer activity of new Al (III) and Ga (III) complexes with 5-hydroxyflavone. Congresul Național de Farmacie, ediția XIX, 27-29 septembrie, 2023, Cluj-Napoca, România.