

Raport științific

privind testarea biocompatibilității in vitro și in vivo, cât și activitatea anticanceroasă pe celule HeLa a sistemelor de eliberare pe bază de chitosan, piridoxal 5-fosfat și 5-fluorouracil

A treia etapă a proiectului “Hidrogeluri injectabile pe bază de chitosan utilizate ca matrici biocompatibile și biodegradabile pentru formulări cu 5-fluorouracil cu aplicare locală anticancer (BioDrugSyst)”, a prevăzut **sinteza și testarea in vitro și in vivo a unor sisteme de eliberare pe bază de chitosan, piridoxal 5-fosfat și 5-fluorouracil**, prin realizarea a 2 obiective ce conțin 2 activități, respectiv 1, conform anexei II din contractul de finanțare.

În conformitate cu planul de activități, sistemele de eliberare obținute în etapa a doua a acestui proiect au fost testate în vederea evaluării biocompatibilității *in vitro* pe celule fibroblaste dermice umane normale, variind 3 factori în etapa de obținere a formulărilor. Primul factor a fost cel al cantității de apă din hidrogelurile testate, astfel au fost alese 4 sisteme ce conțin același raport molar între chitosan și aldehydă, dar și aceeași cantitate de medicament, însă cu volume diferite de apă.

În urma testării, a fost observat faptul că viabilitatea celulară este nesemnificativ influențată de cantitatea de apă din hidrogel, cea mai mare viabilitate fiind 82.61 ± 2.66 %, iar cea mai mică 78.33 ± 0.75 %. Se poate observa că diferența dintre procentele de viabilitate celulară relativă este foarte mică, neputând astfel să spunem că volumul de apă din formulările finale influențează biocompatibilitatea acestora pe celulele NHDF.

Cel de-al doilea factor care a fost investigat în vederea determinării biocompatibilității formulărilor a fost influența raportului molar dintre chitosan și aldehydă. Astfel, au fost alese 3 rapoarte diferite, păstrând constant volumul de apă din hidrogel, cât și cantitatea de medicament. A fost observat faptul că odată cu creșterea raportului molar dintre chitosan și aldehydă, viabilitatea celulară scade. De asemenea, putem concluziona faptul că medicamentul influențează procentul de viabilitate celulară a formulărilor, deoarece în toate cele 3 cazuri viabilitatea celulară a formulărilor este mai mică decât a matricelor folosite ca martor, în schimb viabilitatea celulară este peste 80% în toate cazurile prezentate, concluzionând astfel că formulările prezintă o bună biocompatibilitate *in vitro*.

Cel de-al treilea factor investigat a fost cantitatea de medicament din formulări. În acest caz, au fost testate 5 formulări ce conțin 2, respectiv 3 cantități diferite de medicament în matrice. În urma acestor testări, am putut observa faptul că o dată cu creșterea cantității de medicament din formulări, scade procentul de viabilitate celulară, așa cum era de așteptat. În

schimb, nu putem vorbi despre o citotoxicitate a hidrogelurilor, deoarece viabilitatea celulară este >70% în toate cazurile. Astfel, putem spune că toate formulările testate sunt biocompatibile cu celulele NHDF.

Cea de-a doua activitate a acestei etape a fost cea de testare a citotoxicității formulărilor pe celule canceroase HeLa. La fel ca în cazul testărilor pe celule normale, testarea citotoxicității pe celule HeLa a fost realizată urmărind influența celor 3 factori care au fost variați la obținerea sistemelor de eliberare.

Variind primul factor, cantitatea de apă din formularea finală, putem observa că o dată cu creșterea cantității de apă, viabilitatea celulară crește, fapt ce ar putea fi pus pe seama faptului că hidrogelul se strânge în contact cu mediul de testare, conducând la o eliberare mai lentă a medicamentului.

În cel de-al doilea caz, variația raportului molar dintre chitosan și aldehydă nu influențează viabilitatea celulară a celulelor HeLa, având valori procentuale în jur de 70.

În ultimul caz, am observat faptul că variind cantitatea de medicament, viabilitatea celulară scade o dată cu creșterea cantității de medicament. Însă, încapsularea medicamentului nu conduce la rezultate mult îmbunătățite față de medicamentul martor, la cantitățile testate.

În urma testării viabilității celulare a celulelor HeLa în contact cu formulările și cu martorii aferenți, putem concluziona faptul că nu au fost observate variații majore ale viabilității la concentrațiile testate.

Cea de-a treia activitate a constat în testarea formulărilor *in vivo* pe șoareci în vederea determinării biocompatibilității și a biodegradabilității. Astfel, au fost testate 4 sisteme de eliberare pentru care au fost obținute cele mai bune rezultate la caracterizarea prezentată în etapa 2 și în paragrafele de mai sus.

Incubarea suspensiei de celule roșii sanguine cu formulărilor testate a produs un grad redus de hemoliză, dar fără importanță din punct de vedere statistic față de martorul negativ, ceea ce semnifică faptul că acestea prezintă o bună biocompatibilitate *in vitro*.

Nu au fost identificate modificări evidente ale numărului de GR, ale valorilor Hb și Ht, la animalele care au primit formulările testate, față de animalele care au primit, la 24 ore și nici la 7 zile ale experimentului.

Valorile procentuale ale elementelor componente ale formulei leucocitare (PMN, Ly, E, M, B) obținute la analiza sângelui recoltat de la animalele la care s-au administrat hidrogelurile studiate sunt la niveluri comparabile cu cele de la animalele cu apă distilată, la 24 de ore și la 7 zile.

Investigațiile de laborator nu au relevat diferențe notabile ale nivelurilor ALT, AST și LDH în sânge la animalele care au primit formulările testate, comparativ cu animalele martor, la cele două momente ale determinării.

Administrarea pe cale orală a formulărilor studiate nu a fost însoțită de variații considerabile ale valorilor plasmaticice ale ureei și creatininei față de lotul cu apă distilată, la nici unul din cele două momente de timp la care s-au făcut testările.

Nu s-au pus în evidență diferențe substanțiale referitoare la activitatea complementului seric și la capacitatea de fagocitoză a PMN din sângele periferic între animalele tratate cu formulări și animalele ce au primit apă distilată, nici după 24 de ore, nici după 7 zile de la administrare.

Formulările au demonstrat o bună biocompatibilitate pe șobolani, fapt confirmat de lipsa hemolizei *in vitro*, precum și de absența modificărilor hematologice, a variației activității transaminazelor hepatice, a lactat dehidrogenazei, a ureei și creatininei, dar și a unor parametri ai apărării imunitare comparativ cu lotul martor la 24 de ore și la 7 zile.

În concluzie, 13 de sisteme de eliberare pe bază de chitosan, piridoxal 5-fosfat și 5-fluorouracil au fost obținute și evaluate atât din punct de vedere al biocompatibilității in vitro, cât și al activității anticanceroase in vitro. De asemenea, a fost evaluată biocompatibilitatea in vivo pe șoareci pentru 4 sisteme de eliberare. Formulările au arătat o bună biocompatibilitate atât in vitro, cât și in vivo. Așa cum se poate observa prin compararea rezultatelor cu planul de realizare propus, gradul de realizare al obiectivelor propuse în etapa III este de 100%.

Tot în această etapă, datele obținute în cadrul proiectului privind obținerea de hidrogeluri pe bază de chitosan și piridoxal-5-fosfat, caracterizate din punct de vedere al stabilității și a proprietăților reologice, au fost redactate sub forma unei lucrări științifice care a fost publicată în revista Polymers. De asemenea, datele obținute au fost prezentate la 3 conferințe internaționale, după cum urmează: 2 prezentări orale: 12th International Conference on Materials Science & Engineering (BRAMAT 2022), Brasov, Romania, 9-12 Martie 2022 și Congresul Internațional Pregătim Viitorul Promovând Excelența Ediția a XXXII-a, Iasi, Romania, 28 februarie – 2 martie 2022 și 1 poster: International Conference on Rheology, Iasi, Romania, 26 Mai 2022.