

Etapa 2023

Formulări topice multifuncționale inovatoare, bioactive pentru gestionarea rănilor
maligne

Acronim: ARGOS

Rezumat

A doua etapă a proiectul ARGOS a avut drept obiectiv obținerea și caracterizarea pansamentelor multifuncționale pe bază de colagen (Col) în care au fost încorporate nanoparticule (NP) de Au, Ag și magnetice (MNP) funcționalizate cu compuși naturali (acid galic-AG, acid tanic-AT, acid ferulic-AF și quercetină-Q), ca potențiale alternative pentru tratamentul rănilor sau tumorilor tegumentare maligne. Pentru atingerea acestui obiectiv s-au realizat următoarele activități: i) sinteza și caracterizarea fizico-chimică a NP de Au, MNP și de Ag funcționalizate cu compuși naturali. Utilizând diferite metode de sinteză și de caracterizare au fost obținute nanoparticule de AuPEG-PEI-AG, AuPEG-PEI-AF, Au-AT, Au-Q, MNP-AT, MNP-AF și MNP-AG, cu o morfologie sferică și dimensiuni cuprinse între 14-681 nm. Activitatea antimicrobiană evaluată față de tulpini microbiene de referință, prin metode calitative și cantitative a permis selectarea NP cu spectru larg, respectiv MNP-AT, AuNP-AT, AgNP-AF și a celor cu spectru limitat asupra bacteriilor Gram-pozitive (MNP-DEX-AG, MNP-DEX-AF, AuNP-Q, AgNP-AT, AgNP-AG și AgNP-Q). Majoritatea NP au inhibat selectiv aderența microbiană a tulpinilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* și *C. albicans*. Activitatea antioxidantă determinată prin metodele DPPH și CUPRAC a scăzut semnificativ pentru NP de Au-PEG-PEI-GA și Au-PEG-PEI-FA și a crescut pentru cele de AuNP-TA, AuNP-Q, MNP, AgNP-AF și AgNP-Q comparativ cu antioxidanții puri, AG și AF. NP au fost testate pentru citotoxicitate față de celule normale HaCaT și canceroase non-melanom Cal-27, prin testele MTT și LDH, rezultatele obținute sugerând faptul că MNP-AG, MNP-AF, MNP-AT, AuNP-AT, AuNP-Q și AgNPs-AT manifestă efect citotoxic selectiv asupra celulelor tumorale Cal-27; ii) optimizarea metodei de obținere a pansamentelor funcționale pe bază de colagen și NPs funcționalizate. Prin coroborarea rezultatelor obținute în prima activitate, au fost selectate pentru înglobarea în matricea colagenică MNP-DEX-AG, NPAG-AT2 și AuNP-AT; iii) obținerea pansamentelor funcționale pe bază de colagen – AuNPs, MNPs sau AgNPs care conțin compuși derivați din plante s-a realizat utilizând Col de tip I, obținut și caracterizat în etapa 1 a proiectului, obținându-se compozitele Col-AuNP-AT, Col-AgNP-AT și Col-MNP-AG; iv) caracterizarea fizico-chimică a pansamentelor multifuncționale s-a realizat prin FT-IR, EDX și SEM, care a relevat o structură cu porozitate ridicată, cu diametrul porilor de 50 - 200 μm, în care NP formează agregate de diferite dimensiuni; v) evaluarea gradului de eliberare a compușilor bioactivi din pansamentele obținute prin metode spectrofotometrice a demonstrat că sistemele colagenice încărcate cu NP purtătoare de compuși bioactivi reprezintă sisteme viabile ce pot fi utilizate în eliberarea controlată și prelungită a principiilor active; vi) evaluarea prin metode calitative și cantitative a viabilității și creșterii microorganismelor procariote și eucariote pe hidrogelurile nou sintetizate s-a realizat pe probele sterilizate în prealabil cu ajutorul radiațiilor gamma (Co-60). Col-AgNP-AT a manifestat efect microbicid semnificativ față de tulpinile clinice de *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* și *C. albicans*, iar Col-AuNP-AT față de cele de *S. aureus*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* și *C. albicans*. vii) analiza capacității de aderență microbiană și de formare a biofilmelor a evidențiat faptul că activitatea anti-biofilm se corelează cu concentrația de NO exogen eliberat de donatorii de NO, cel mai eficient material anti-biofilm fiind Col-AgNP-AT; viii) evaluarea *in vitro* a pansamentelor multifuncționale pe bază de Col și molecule bioactive a presupus analiza profilului apoptotic al celulelor HaCaT și Cal-27. Dacă în cazul celulelor diploide normale HaCaT expresia markerilor pro/apoptotici este slab influențată de materialele testate, apoptoza celulelor tumorale Cal-27 este puternic

influențată în prezența materialelor testate, cu stimularea expresiei factorilor proapoptotici, în corelație cu inhibarea celor anti-apoptotici, mai ales de către materialele Col-AuNP-AT și Col-AgNP-AT; ix) evaluarea activității antioxidante a evidențiat clasificarea materialelor testate în ordinea Col-AgNP-AT > Col-MNP-AG > Col-AuNP-AT; x) evaluarea răspunsului inflamator al celulelor diploide umane HaCat și Cal-27 cultivate în prezența pansamentelor funcționale a relevat faptul că profilul citokinic extracelular și intracelular variază în funcție de fracția celulară, de materialul testat și de linia celulară, variațiile de expresie fiind mai numeroase și de amplitudine mai mare în cazul lizatelor comparativ cu supernatantul, respectiv în cazul celulelor normale comparativ cu cele tumorale. În cazul celulelor normale HaCat, se remarcă stimularea producerii unui răspuns de tip anti-inflamator și stimulator al regenerării epiteliale, potențat de inhibarea expresiei citokinelor pro-inflamatorii TNF- α și IL-1 β de către toate materialele testate. Dintre materialele testate, coroborând profilurile extra și intracelular, cel mai promițător material, cu activitate anti-inflamatorie și pro-regenerare tisulară este Col-AgNP-AT, urmat de Col-MPN-AG și Col. În cazul celulelor tumorale Cal-27, inhibarea marcantă a producerii intracelulare de IL-10, de către toate materialele testate, ar putea indica un efect pro-inflamator al acestor materiale, care, în contextul aplicării topice în cazul unei rani maligne sau tumori cutanate, poate sugera declanșarea/stimularea imunității antitumorale; xi) evaluarea critică a performanțelor biologice ale pansamentelor nanostructurate pe bază de colagen s-a realizat în toate etapele de caracterizare a funcționalității matricelor colagenice care conțin NPs funcționalizate cu compuși fenolici. Prin urmare, variantele pentru care se recomandă scalarea de la studiile de laborator (TLR4) către studii *in vivo* și producția micropilot vor fi ulterior selectate conform reproductibilității funcționalității materialelor dezvoltate. În concluzie, pentru aceasta etapă s-au realizat toate activitățile de documentare, experimentare și diseminare prevăzute, necesare pentru întocmirea rapoartului științific și financiar, iar toți indicatorii de rezultat au fost 100% îndepliniți sau depășiți.

Abstract

~~The second stage of the ARGOS project aimed to obtain and characterize multifunctional dressings based on collagen (Col) incorporating Au, Ag and magnetic nanoparticles (NPs) functionalized with natural compounds (gallie acid AG, tannic acid AT, ferulic acid AF and quercetin Q), as potential alternatives for the treatment of malignant skin tumors. In order to achieve this objective, the following activities were carried out: i) the synthesis and physico-chemical characterization of Au NPs, MNPs and Ag functionalized with natural compounds. Using different synthesis and characterization methods, Au-PEG-PEI-AG, Au-PEG-PEI-AF, Au-AT, Au-Q, MNP-AT, MNP-AF and MNP-AG nanoparticles were obtained, with a spherical morphology and sizes between 14–681 nm. The antimicrobial activity evaluated against reference microbial strains, by qualitative and quantitative methods, allowed the selection of NPs with a broad spectrum, respectively MNP-AT, AuNP-AT, AgNP-AF and those with a limited spectrum on Gram-positive bacteria (MNP-DEX-AG, MNP-DEX-AF, AuNP-Q, AgNP-AT, AgNP-AG and AgNP-Q). Most of the NPs selectively inhibited the microbial adhesion of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* strains. Antioxidant activity determined by DPPH and CUPRAC methods decreased significantly for Au-PEG-PEI-GA and Au-PEG-PEI-FA NPs and increased for AuNP-TA, AuNP-Q, MNP, AgNP-AF and AgNP-Q compared to pure antioxidants, AG and AF. The NPs were tested for cytotoxicity against normal HaCaT and non-melanoma Cal-27 cancerous cells, by MTT and LDH assays, the obtained results suggesting that MNP-AG, MNP-AF, MNP-AT, AuNP-AT, AuNP-Q and AgNPs-AT show selective cytotoxic effect on Cal-27 tumor cells; ii) optimization of the method of obtaining functional dressings based on collagen and functionalized NPs. By corroborating the results obtained in the first activity, MNP-DEX-AG, AgNP-AT2 and AuNP-AT were selected for loading in the collagen matrix; iii) obtaining functional dressings based on collagen—AuNPs, MNPs or AgNPs containing compounds derived from plants were achieved using type I Col, obtained and characterized in stage I of ARGOS project, obtaining the composites Col-AuNP-AT, Col-AgNP-AT and Col-MNP-AG; iv) the physico-chemical characterization of the multifunctional dressings carried out by FT-IR, EDX and SEM, revealed a structure with high porosity, with a pore diameter of 50–200 μ m, in which NPs form aggregates of different sizes; v) the evaluation of the bioactive compounds release from the dressings performed by spectrophotometric methods demonstrated that collagen systems loaded with NPs carrying bioactive compounds represent viable~~

systems that can be used in the controlled and prolonged release of active principles; vi) the evaluation by qualitative and quantitative methods of the viability and growth of prokaryotic and eukaryotic microorganisms on the newly synthesized hydrogels was carried out on the samples previously sterilized with the help of gamma radiation (Co-60). Col-AgNP-AT showed significant microbicidal effect against the clinical strains of *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*, and Col-AuNP-AT against those of *S. aureus*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*; vii) the analysis of the capacity of microbial adhesion and biofilm formation revealed that the anti-biofilm activity correlates with the concentration of exogenous NO released by NO donors, the most effective anti-biofilm material being Col-AgNP-AT; viii) the *in vitro* evaluation of multifunctional dressings based on Col and bioactive molecules involved the analysis of the apoptotic profile of HaCat and Cal-27 cells. If in the case of normal diploid HaCaT cells the expression of pro/anti-apoptotic markers remains almost unchanged, the apoptosis of Cal-27 tumor cells is strongly influenced in the presence of the tested materials, with the stimulation of the expression of pro-apoptotic factors, in correlation with the inhibition of the anti-apoptotic ones, especially by Col-AuNP-AT and Col-AgNP-AT materials; ix) the evaluation of the antioxidant activity highlighted the classification of the tested materials in the order Col-AgNP-AT > Col-MNP-AG > Col-AuNP-AT; x) the evaluation of the inflammatory response of human diploid cells HaCat and Cal-27 cultured in the presence of functional dressings revealed that the extracellular and intracellular cytokine profile varies according to the cell fraction, the tested material and the cell line, the expression variations being more numerous and of greater amplitude in the case of lysates compared to the supernatant, respectively in the case of normal cells compared to tumor ones. In the case of normal HaCat cells, the stimulation of the production of an anti-inflammatory response and stimulator of epithelial regeneration, has been potentiated by the inhibition of the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β by all tested materials. By corroborating the extra- and intracellular cytokines profiles, the most promising material, with anti-inflammatory and pro-tissue regeneration activity, is Col-AgNP-AT, followed by Col-MPN-AG and Col. In the case of Cal-27 tumor cells, the marked inhibition of intracellular IL-10 production, by all tested materials, could indicate a pro-inflammatory effect of these materials, which, in the context of local application in case of a malignant wound or skin tumor, may suggest the triggering/stimulation of antitumor immunity; xi) the critical evaluation of the biological performances of nanostructured collagen-based dressings was carried out in all stages of the characterization of the functionality of collagen matrices containing NPs functionalized with phenolic compounds. Therefore, the variants recommended to be scaled up from laboratory studies (TLR4) to *in vivo* studies and micropilot production will be subsequently selected according to the reproducibility of their functionality. In conclusion, for this stage, all the foreseen documentation, experimentation and dissemination activities were carried out all deliverables have been achieved.