

Etapa a 3-a- 2022 Sinteza nanoparticulelor ce înglobează Dexametazonă și evaluarea efectelor protectoare asupra celulelor urechii interne afectate de Cisplatin *in vitro* și *in vivo*

Activitatea 3.1. Fabricarea nanoparticulelor și încapsularea Dexametazonei, caracterizarea NP, evaluarea eficienței încărcării cu Dex și profilul de eliberare în diverse medii. P2-UBB.

Sinteza și caracterizarea suspensiilor micelare de Pluronic încapsulate cu DEXA (MiceliiPluDex)

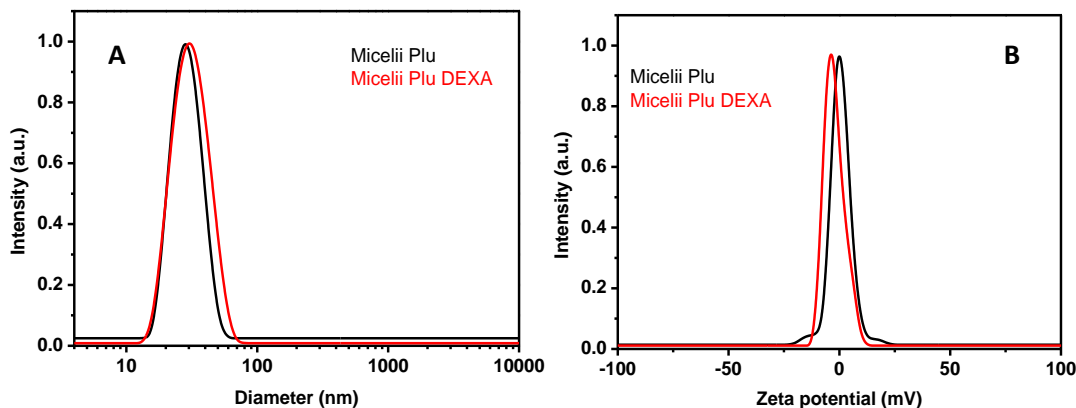


Figura 1. A. Diametrul hidrodinamic al nanoveziculelor micelare de Plu (spectrul negru) și al nanoveziculelor micelare de Plu încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu) măsurat prin DLS; B. Potențialul Zeta al nanoveziculelor micelare de Plu (spectrul negru) și al nanoveziculelor micelare de Plu încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu). Spectrele au fost normalizate pentru comparație.

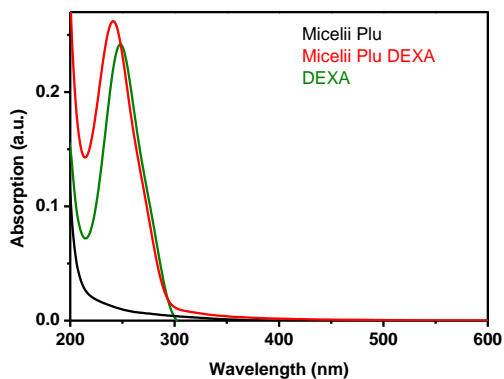


Figura 2. Spectrele de absorbție UV-Vis ale nanoveziculelor micelare de Plu (spectrul negru), al nanoveziculelor micelare de Plu încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu) și al dexametazonei (spectrul verde)

Sinteza și caracterizarea suspensiilor apoase de chitosan încapsulate cu DEXA (NPChitDex)

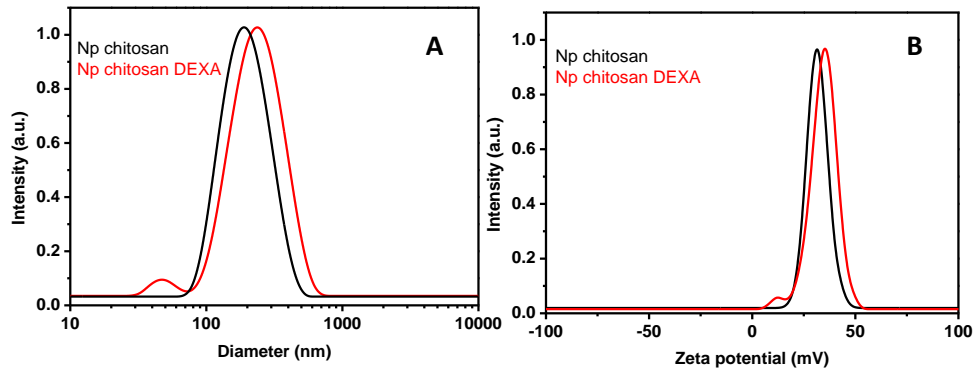


Figura 3. A. Diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor de chitosan (spectrul negru) și al NP de chitosan încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu) măsurat prin DLS (200-225nm); B. Potențialul zeta al NP de chitosan (spectrul negru) și al NP de chitosan încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu). Spectrele au fost normalizate pentru comparație.

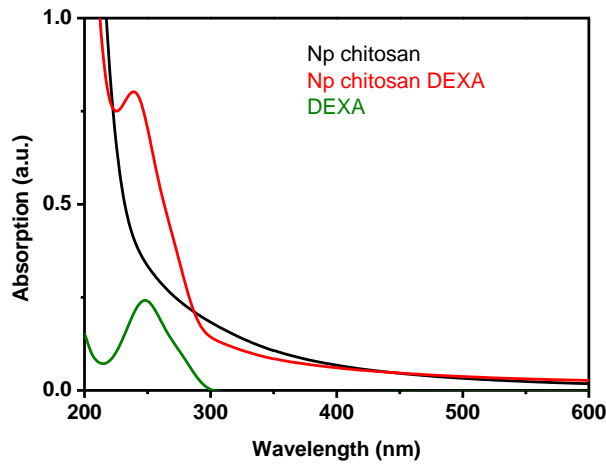


Figura 4. Spectrele de absorbție UV-Vis ale nanoparticulelor de chitosan (spectrul negru), al nanoparticulelor de chitosan încapsulate cu dexametazonă (spectrul roșu) și al dexametazonei (spectrul verde).

Eficiența de încapsulare (encapsulation efficiency (EE

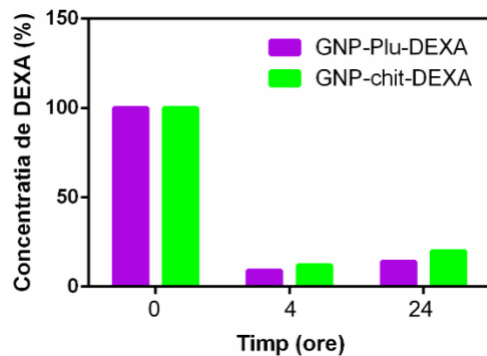


Figura 5. Reprezentarea grafică a medicamentului eliberat de GNP-Plu-DEXA și GNP-chit-DEXA după menținerea acestora timp de 4 și respectiv 24 ore la temperatura de 37°C.

Activitatea 3.2. Studiul preluării NP de către celulele neurosenzoriale *in vitro* și *in vivo*.
3.2.1. P2- UBB. Studiul preluării NP de către celule prin microscopie de fluorescență

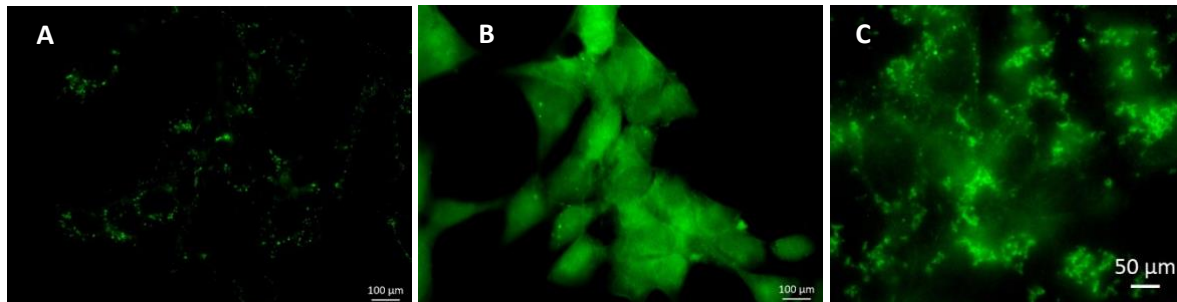


Figura 6.

Imagini de fluorescență ale celulelor HEI-OC1 control (A), incubate cu micelii de Pluronic încapsulate cu dexametazonă marcată cu fluoresceină (B) și incubate cu nanoparticule de chitosan încapsulate cu dexametazonă marcată cu fluoresceină (C).

Activitatea 3.1 P2-UBB. CO-UMF. Caracterizarea GNP: formă, dimensiuni (TEM)

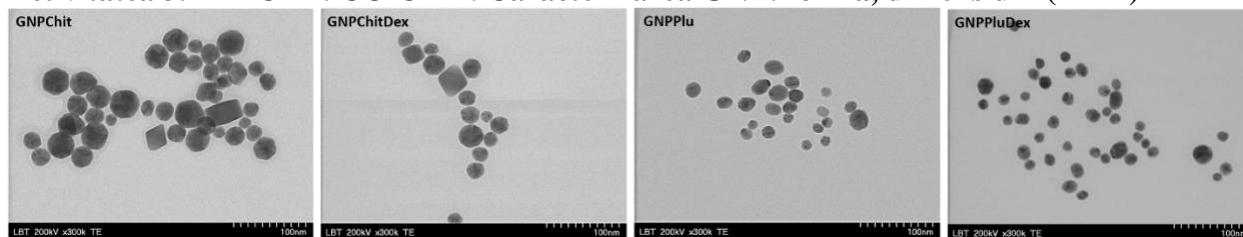


Figura 7. GNP de Plu și Chit cu și fără Dex. Se constată că particulele de Chitosan sunt mai mari ca dimensiuni decât cele de Plu. Captarea GNP de către celule a fost raportată în etapa a 2a.

Caracterizarea MiceliilorPlu și NPChit (TEM)

a. Micelii Plu (a și b) și MiceliiPluDex (c), NPChitDex (d)

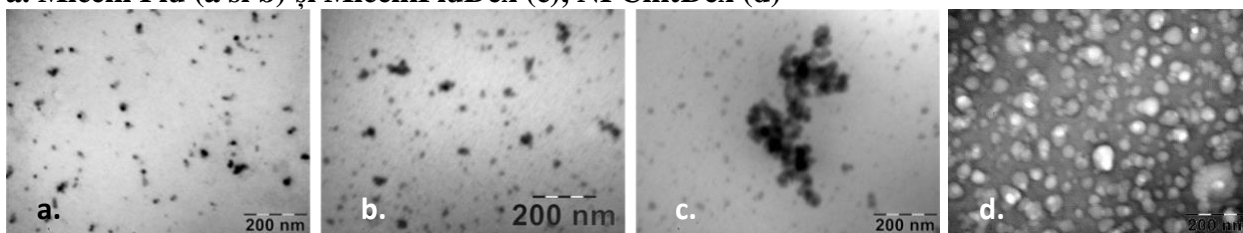


Figura 8. Aspectul miceliilor de Pluronic (a și b) și a miceliilor încărcate cu Dex (c). Dimensiunea medie a miceliilor de Plu și a celor încărcate cu Dex a fost de 10-15nm. NPChit au avut dimensiunea medie de 212nm(d).

3.2.2. P1- IOC.N. CO-UMF. Studiul preluării miceliilor de Plu și a NP Chit de către celule prin microscopie electronică de transmisie (TEM)

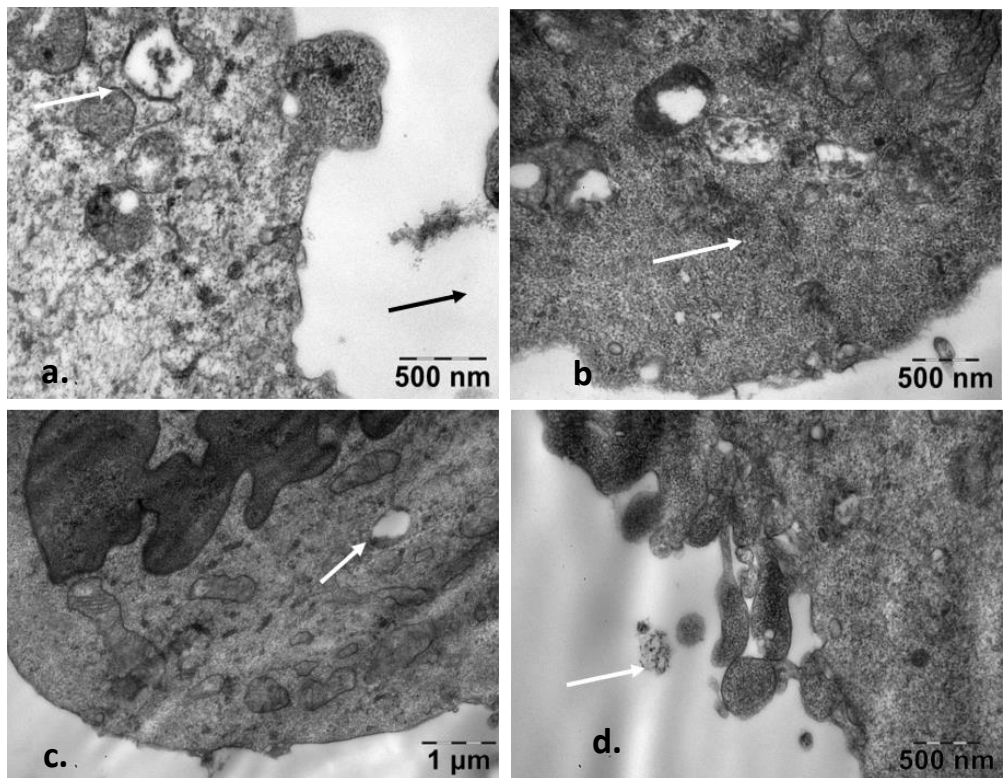


Figura 9. MiceliiPlu (a și b) și Micelii PluDex (c și d). Se constată că Miceliile sunt preluate de către celulele HEI-OC1 și sunt depozitate în endozomi (săgețile albe). Săgeata neagră indică miceliile extracelulare. Structura celulei nu apare modificată în urma captării miceliilor.

b. NPChit si NPChitDex

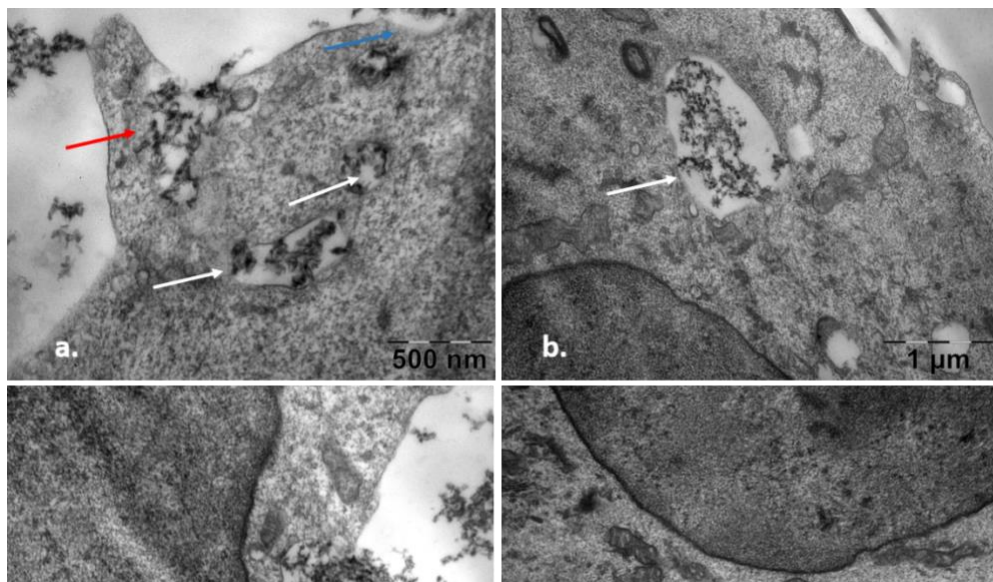


Figura 10. NPChit (a și b) și NPChitDex (c). În figura 10 d. e prezentată imaginea unei celule netratate HEI-OC1 (control). Se constată că NPChit sunt preluate de către celulele HEI-OC1 și sunt depozitate în endozomi (săgețile albe). Săgeata roșie indică formarea unui endozom prin intermediul căruia celula captează particulele. Săgeata albastră evidențiază invaginarea membranei pentru formarea endozomului. Structura celulei nu se modifică în urma captării NPChit.

3.2.3. CO- UMF. Evaluarea distribuției NP în structurile urechii medii

În urma studiilor *in vitro* TEM s-a demonstrat preluarea NP de către celulele urechii interne.

Activitatea 3.3. Evaluarea efectului protector al Dexametazonei libere și înglobate în NP asupra celulelor HEI-OC1 tratate cu Cisplatin

3.3.1. P1- IOCN. Studiul proceselor de apoptoză, eliberarea speciilor reactive de oxigen și a eliberării de citokine în urma tratamentului cu NP al celulelor urechii interne afectate în prealabil de Cisplatin

a. Efectul protector al GNP (NP de aur) asupra celulelor HEI-OC1 afectate de tratamentul cu Cisplatin. GNP au fost sintetizate și caracterizate în etapa a 2-a.

Eliberarea de specii reactive de oxigen (ROS). cu 2',7' – cu diclorofluorescein diacetat (DCFDA).

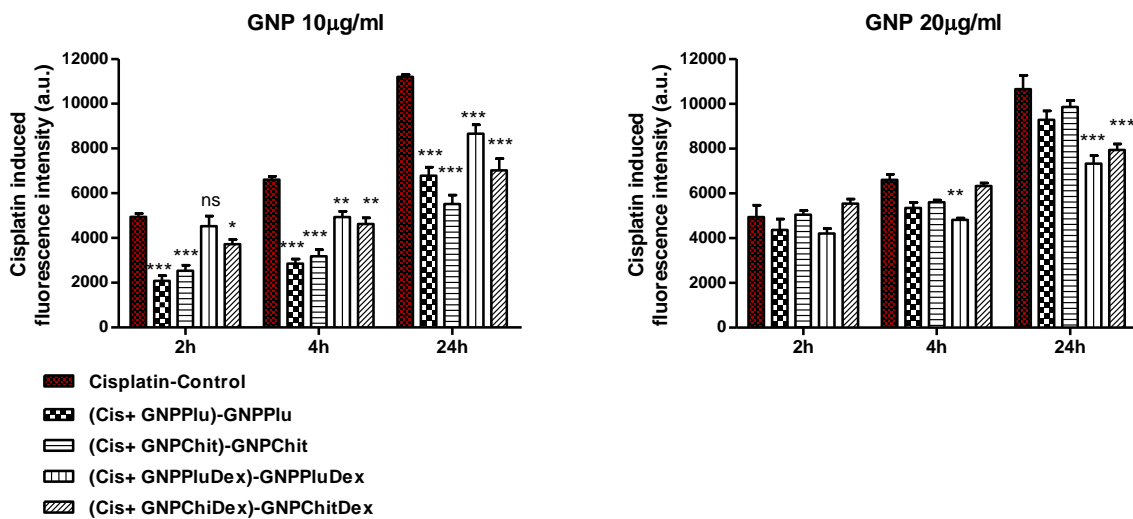


Figura 11. Intensitatea fluorescenței dată de ROS eliberate în urma tratamentului cu Cisplatin cu și fără GNP și diferențele dintre acestea și fluorescența dată de control netratat și celule tratate doar cu GNP.

Apoptoza

Cisplatinul a indus moarte celulară, atât apoptoza cât și necroza. Toate GNP administrate înainte de Cisplatin au diminuat procentul acestor celule similar cu protecția dată de Dex (25μg/ml).

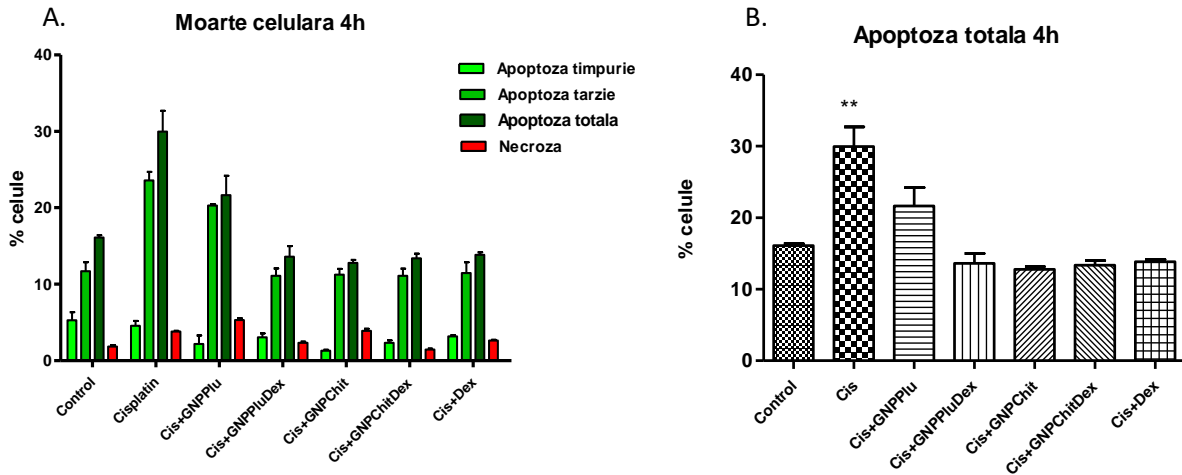


Figura 12. A. Procentele de celule aflate în diferite stadii de apoptoză sau necroză în urma tratamentului cu Cisplatin, precedat sau nu de GNP sau Dex. Toate GNP administrate înainte de Cis duc la scăderea procentelor celulelor apoptotice și necrotice; 12 B. Compararea procentului de celule apoptotice totale pentru diferite tratamente.

Secreția de citokine inflamatorii- ELISA

Secreția de citokine inflamatorii TNFα și IL6 s-a măsurat cu kiturile ELISA DuoSet de la R&D. Concentrația de citokine s-a calculat pe baza curbei de absorbție cu softul Magellan 3.

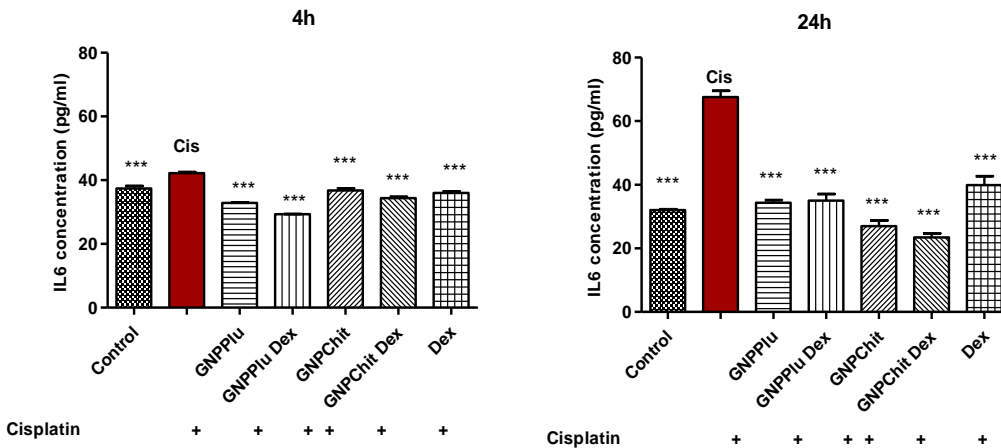


Figura 13. Concentrațiile de IL6 (pg/ml) măsurate prin ELISA în supernatantul celulelor HEI-OC1 tratate cu Cisplatin, precedat sau nu de GNP.

b. Particule proteice: Micelii Pluronic (Micelii Plu) și NP de Chitosan (NPChit) cu și fără Dexametazonă.

Evaluarea toxicității particulelor prin teste de citotoxicitate: MTT.

Pentru evaluarea toxicității particulelor am efectuat testul de viabilitate MTT pe celulele HEI-OC1 tratate cu concentrații crescânde de MiceliiPlu și NPChit.

Micelii Pluronic

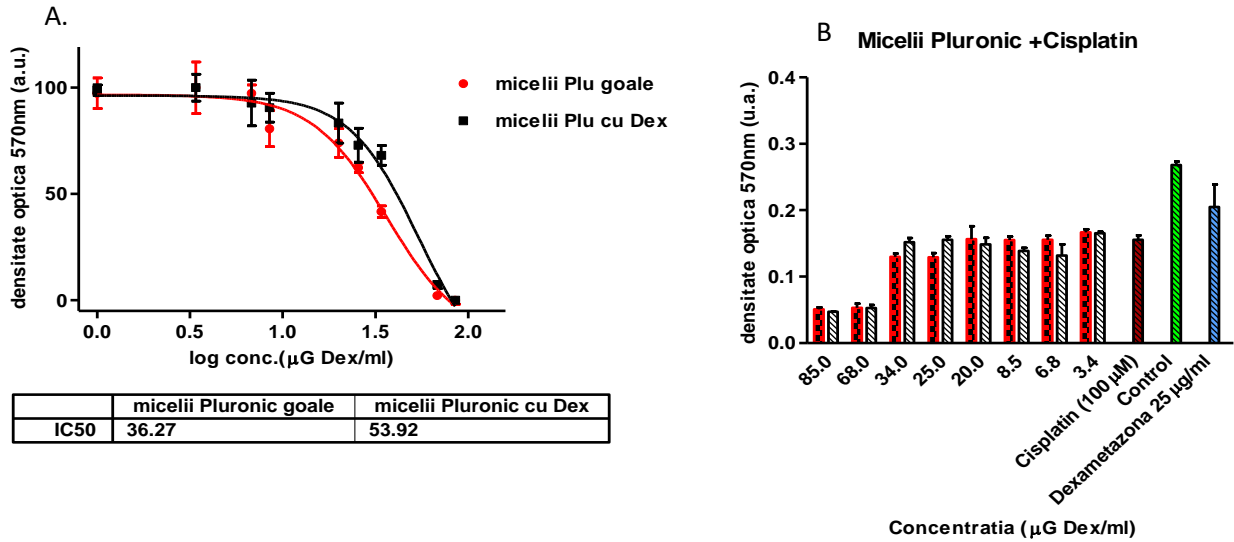


Figura 14. A. Curbe de supraviețuire obținute în urma tratamentului cu diluții seriate ale miceliilor Plu cu și fără Dex; B. Compararea toxicității date de Cisplatin față de celulele netratate (control) și respectiv cele pretratate cu miceliile Plu (cu și fără Dex) precum și Dex (25μg/ml).

NPChit cu și fără Dex au avut valori mai mici comparativ cu Miceliile de Plu, însemnând toxicitate mai mare

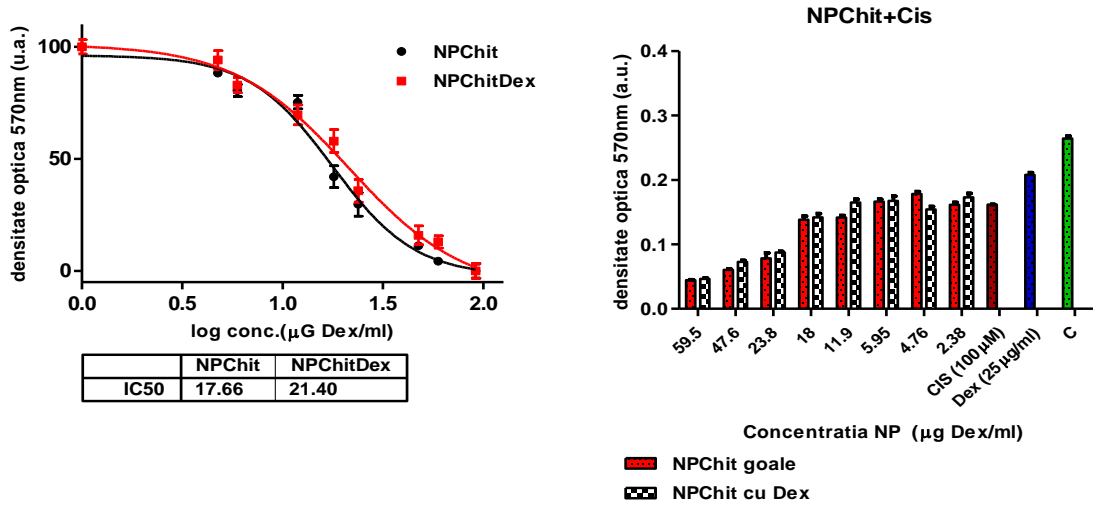


Figura 15. A. Curbe de supraviețuire obținute în urma tratamentului cu diluții seriatale ale NPChit cu și fără Dex. B. Compararea toxicității date de Cisplatin față de celulele netratate (control) și respectiv cele pretratate cu NPChit (cu și fără Dex) precum și Dex (25μg/ml).

ROS

Evaluarea producerii ROS după administrarea miceliilorPlu și NPChit.

Micelii Plu nu au dus la creșterea eliberării ROS din celulele HEI-OC1 comparativ cu controlul netratat.

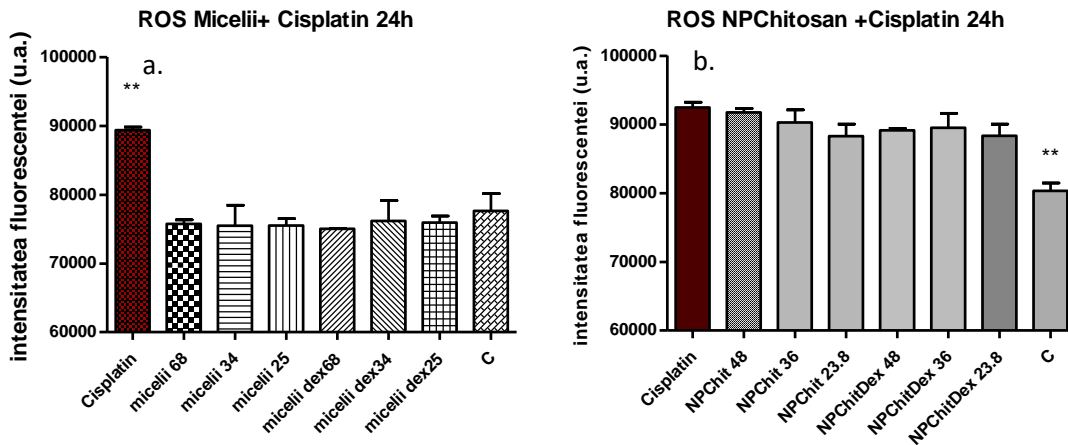


Figura 16. Efectul tratamentului combinat MiceliiPlu (16a) sau NPChit (16b) cu Cisplatin asupra eliberării ROS la 24h

Apoptoza

S-a constatat o frecvență redusă a celulelor marcate cu Anexina V (verde)- celule apoptotice sau PI (roșu) celule necrotice sau ambele (portocaliu) (apoptoză tardiva

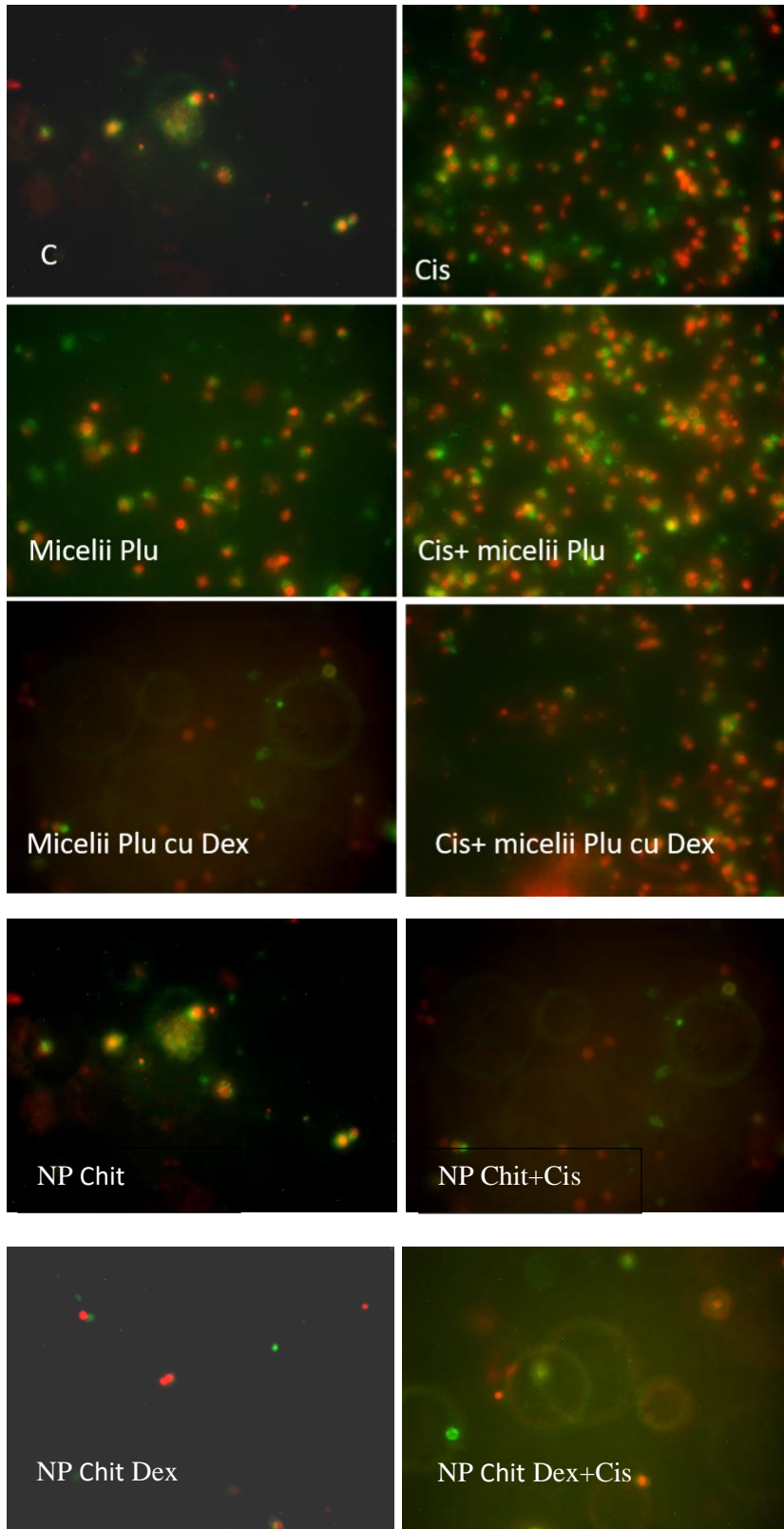


Figura 17. Imagini microscopice în fluorescență Zeiss Axio Observer D1. Pe coloana din stânga sunt imagini cu celulele control respectiv cele tratate cu micelii și NP.

ELISA

Celulele HEI-OC1 nu secretă TNF α în concentrație crescută după niciuna din particulele administrate, dar nici după Cisplatin.

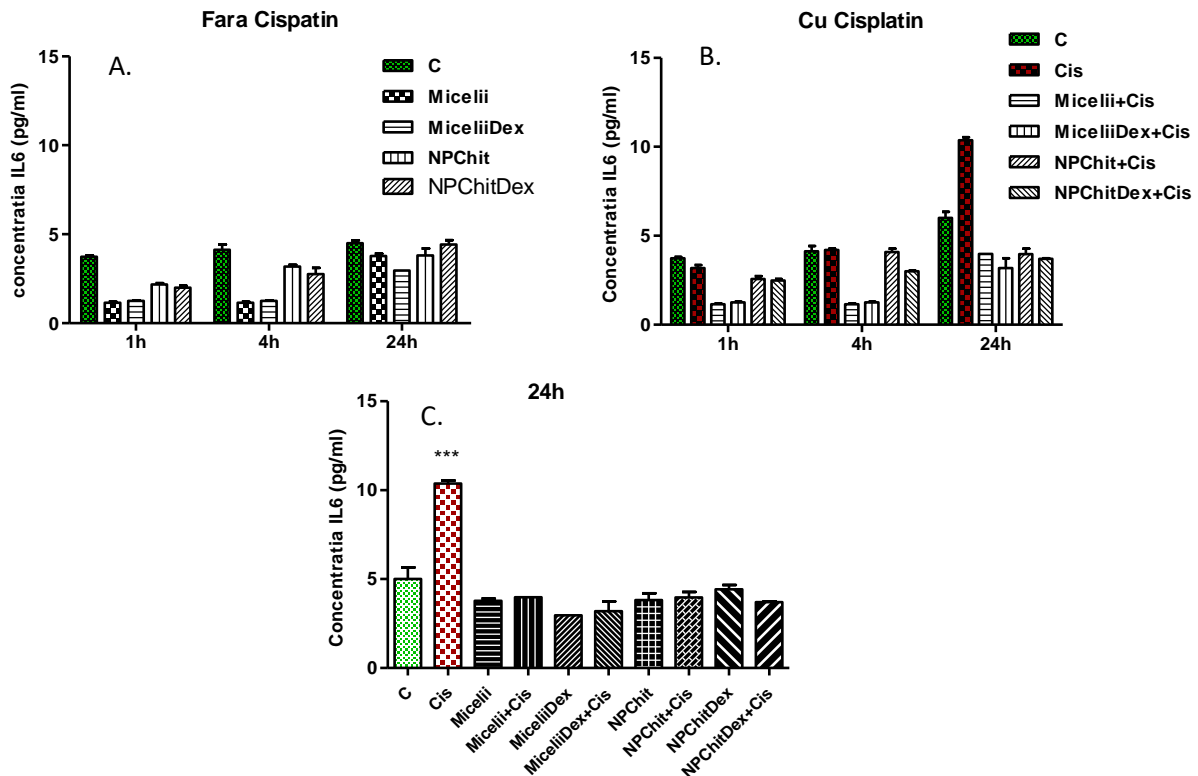


Figura 18. Concentrațiile de IL6 eliminate de celulele HEI-OC1 tratate cu MiceliiPlu și NPChit cu și fără Dex (18A); Concentrația de IL6 crește la 24h după tratamentul cu Cisplatin, iar pretratamentul cu MiceliiPlu și NPChit duce la o eliberare de IL6 comparativ cu celulele netratate (18B); Concentrația de IL6 eliberată la 24h de celulele tratate cu Cisplatin a fost semnificativ mai mare decât la celulele control sau la celulele tratate în prealabil cu MiceliiPlu și NPChit ($P < 0.01$, one-way ANOVA, testul Dunnett de comparații multiple).

Activitatea 3.4. Evaluarea efectului protector al Dexametazonei și al NP cu Dex administrate la animalele de experiență la care s-a indus surditate cu Cisplatin

3.4.1. CO-UMF. Evaluarea funcțională a efectului protector prin înregistrarea potențialelor evocate auditive. Evaluarea morfologică a efectului protector al NP cu Dex prin examenul histologic al cohleilor recoltate de la animale.

NP de chitosan și a miceliilor de Pluronic prin administrare locală intratimpanică nu au dus la modificări ale pragurilor auditive sau modificări morfologice la examenul histopatologic.

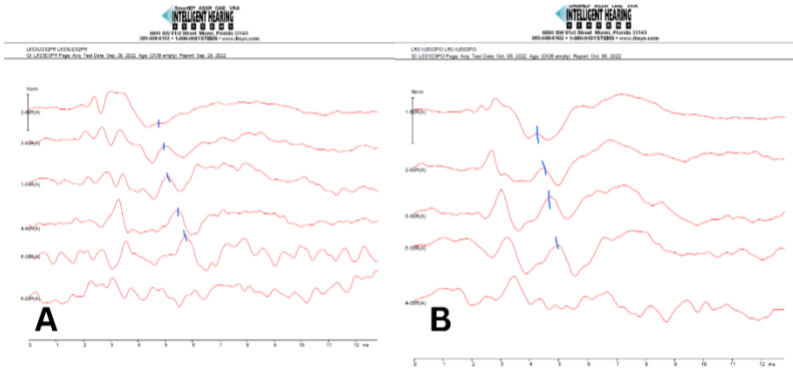


Figura 19. Praguri audiologice fără modificări după aplicare locală a nanoparticulelor de chitosan

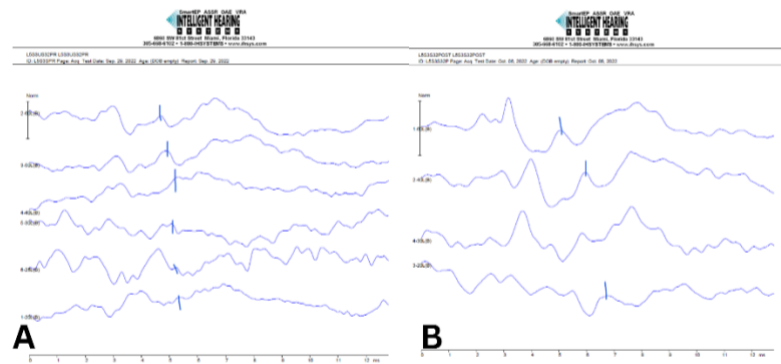


Figura 20. Praguri audiologice fără modificări după aplicare locală a nanoparticulelor de Pluronic.

Rezultate

1. *GNPPluDex*

Valorile pragurilor auditive nu au prezentat diferențe semnificative statistic la stimul click ($p > 0.05$, T-test).

2. *GNPChitDex*

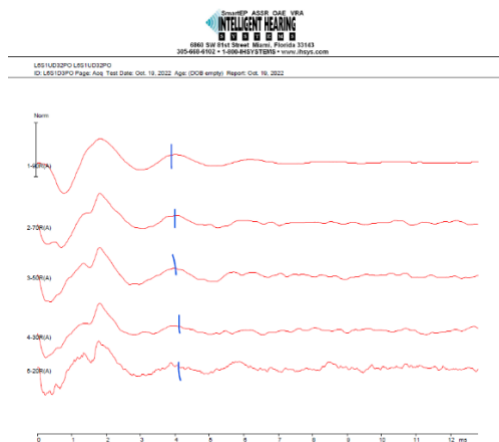


Figura 21. Prag audiologic 32kHz post GNPCHitDex
32kHz post Dex

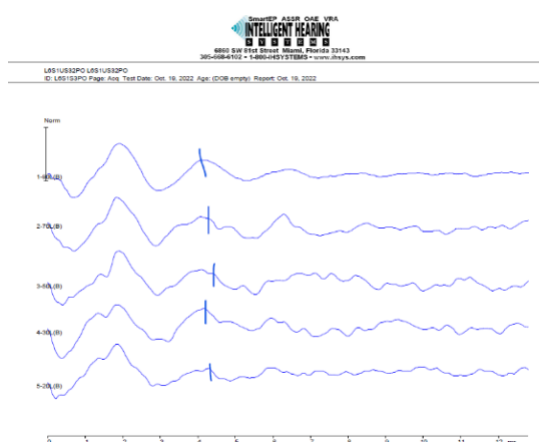


Figura 22. Prag audiologic 32kHz post Dex

Nu au fost decelate diferențe semnificative pentru pragurile audiologice nici pentru stimul click sau pentru tonuri pure ale celor două loturi după administrare intratimpanică asociate ototoxicității induse de Cisplatin.

3. MiceliiPluDex

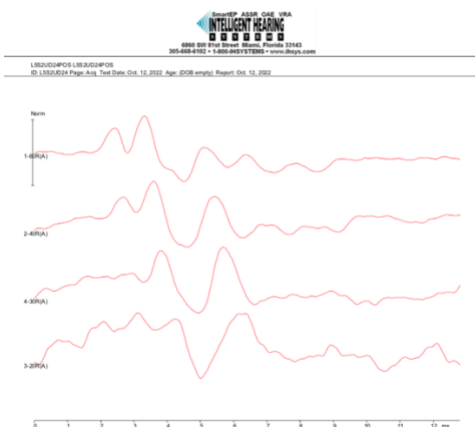


Figura 23. Prag audiologic 32kHz post MiceliiPluDex
32kHz post Dex

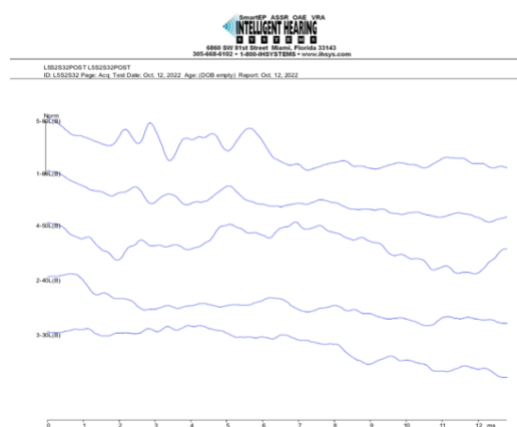


Figura 24. Prag audiologic 32kHz post Dex

MiceliiPluDex utilizate prin administrare intratimpanică au protejat mai bine frecvențele înalte față de Dex în cazul unor anumiți șobolani, dar în lotul actual nu s-a putut atinge o diferență statistic semnificativă.

4. NPChit Dex

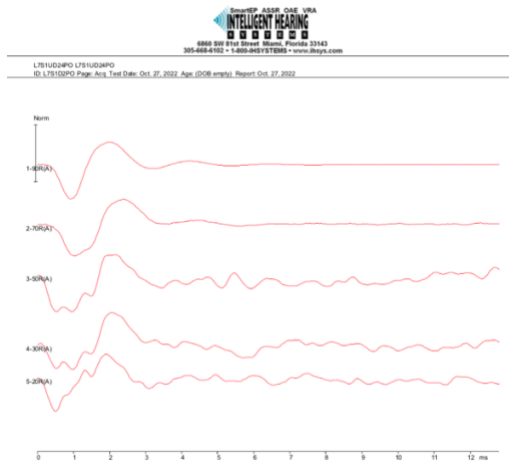


Figura 25. Prag audiologic 24kHz post NPChitDex
24kHz post Dex

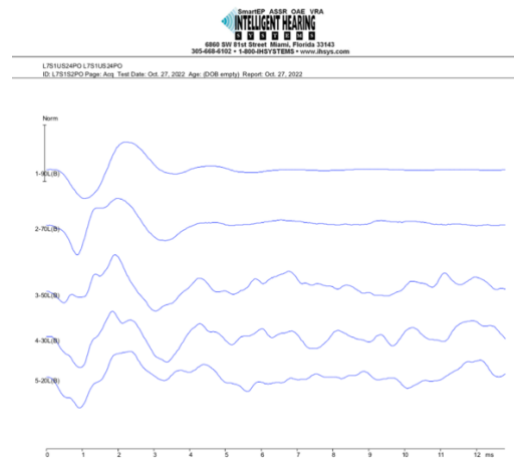


Figura 26. Prag audiologic

Atât *NPChit Dex* utilizate prin administrare intratimpanică, cât și *Dex* au arătat o protecție pe frecvențele înalte în lotul studiat, fără a exista diferențe semnificativ statistice între cele două opțiuni terapeutice.

Evaluarea histologică a elementelor urechii interne după tratament cu Cisplatin evidențiază distrucție celulară mai marcată în spira bazală (corespunzătoare frecvențelor înalte) și celule neafectate către vârful cohleei, direct proporțional cu gradul de hipoacuzie indus de Cisplatin fiecărui șobolan.

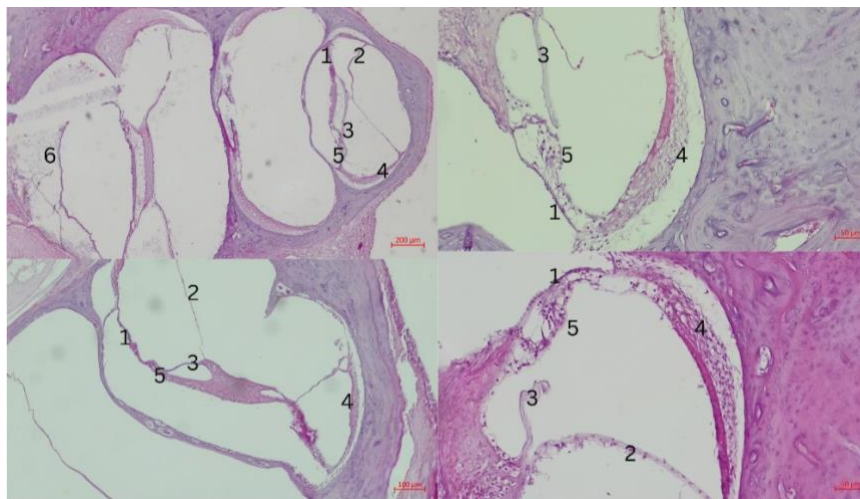


Figura 27. Secțiuni longitudinale cohleare. Distrucție celulară la nivelul spirei bazale fără afectarea organului Corti de la vârful cohleei; 1-membrana bazilară; 2-membrana Reissner; 3-membrana tectoria; 4-stria vasculară; 5-organ Corti; 6-reacție inflamatorie spiră bazală.

Diseminarea rezultatelor, participare la conferințe, simpozioane, publicarea rezultatelor.

Una dintre cele mai importante căi de diseminare a rezultatelor este website-ul proiectului: <http://www.umfcluj.ro/component/content/article/8-ro/667-nanosmart?Itemid=216>

Acesta este astfel structurat încât să conțină toate informațiile privind obiectivele și activitățile proiectului, membrii implicați și activitatea acestora, date de contact, evenimente (seminarii, workshopuri), rapoarte științifice intermediare de etapă pentru fiecare partener implicat, participări la conferințe și congrese, publicații în reviste științifice și capitole în teze de doctorat.

Publicarea rezultatelor obținute în reviste științifice de impact a fost o altă cale de diseminare a rezultatelor:

- Cenariu, D.; Fischer-Fodor, E.; Țigu, A.B.; Bunea, A.; Virág, P.; Perde-Schrepler, M.; Toma, V.-A.; Mocan, A.; Berindan-Neagoe, I.; Pinte, A.; Crișan, G.; Cenariu, M.; Maniu, A. Zeaxanthin-Rich Extract from Superfood *Lycium barbarum* Selectively Modulates the Cellular Adhesion and MAPK Signaling in Melanoma versus Normal Skin Cells In Vitro. *Molecules* **2021**, *26*, 333. <https://doi.org/10.3390/molecules26020333>
- Maximilian George Dindelegan, Cristina Blebea, Maria Perde-Schrepler, Anca Dana Buzoianu, Alma Aurelia Maniu, "Recent Advances and Future Research Directions for Hearing Loss Treatment Based on Nanoparticles", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2022, Article ID 7794384, 15 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7794384>
- Blebea, Cristina Maria, Violeta Necula, Monica Potara, Maximilian George Dindelegan, Laszlo Peter Ujvary, Emil Claudiu Botan, Alma Aurelia Maniu, and Marcel Cosgarea. 2022. "The Effect of Pluronic-Coated Gold Nanoparticles in Hearing Preservation Following Cochlear Implantation-Pilot Study" *Audiology Research* 12, no. 5: 466-475. <https://doi.org/10.3390/audiolres12050047>
- Dindelegan, M. G., Pașcalău, V., Suci, M., Neamțu, B., Perde-Schrepler, M., Blebea, C. M., Maniu, A. A., Necula, V., Buzoianu, A. D., Filip, M., Csapai, A., & Popa, C. (2022). Biopolymer Lipid Hybrid Microcarrier for Transmembrane Inner Ear Delivery of Dexamethasone. *Gels* (Basel, Switzerland), *8*(8), 483. <https://doi.org/10.3390/gels8080483>

O altă modalitate de diseminare a rezultatelor obținute în proiect a constat în prezentarea lor la manifestări științifice. Membri ai colectivului de cercetare au participat în calitate de lectori la manifestări științifice internaționale:

- Maria Perde-Schrepler, Ioana Carmen Brie, Maximilian George Dindelegan, Monica Potara, Alma Maniu: "Gold and polymeric nanoparticles for the delivery of Dexamethasone to the inner ear", Book of abstracts: 10th jubilee International Conference on radiation in various fields of research (RAD 2022) summer edition.
- „The International School of Experimental Microsurgery” Ed.6, curs organizat între 11-18 Iulie 2021 în Cluj-Napoca unde au susținut prezentări:
 - Alma Maniu - „Microsurgery in otology”

- Maximilian Dindelegan- „Experimental microsurgery-headstart for a promising medical career”.

Cercetarea echipei a contribuit la două teze de doctorat ale membrilor echipei de cercetare

- Cristina Maria Blebea – Teză de doctorat cu titlul ”Metode de reducere a reacției inflamatorii la urechea implantată cohlear” – Cercetarea din cadrul tezei de doctorat urmărește identificarea unor noi metode de administrare a agenților antiinflamatori în urechea internă după implant cohlear. Unul din studiile experimentale cuprinse în teza de doctorat implică folosirea nanoparticulelor de Aur funcționalizate cu Pluronic pentru eliberarea locală a dexametazonei după implantarea cohleară pe model animal. Rezultatele audiologice au evidențiat tendința de a proteja pragurile auditive preponderent a frecvențelor joase comparativ cu dexametazonă liberă. Teza de doctorat este în curs de susținere (susținere programată în data de 03.11.2022)
- Maximilian George Dindelegan – Teză de doctorat cu titlul ”Sistem inovativ de eliberare controlată a dexametazonei la nivelul urechii interne pe bază de microparticule” – Cercetarea din teza de doctorat urmărește sintetizarea și testarea de noi platforme de eliberare controlată a dexametazonei la nivelul urechii interne pentru tratamentul hipoacuziei de cauză ototoxice în fază acută și a surdității brusc instalate. Unul din studiile cuprinse în cadrul tezei de doctorat a constat în studierea literaturii de specialitate din domeniu și publicarea unui articol de tip review narativ în legătură cu stadiul actual al cunoașterii în tratamentul hipoacuziei bazat pe nanoparticule. Studiile experimentale din cadrul lucrării de doctorat constau în compararea diversilor compuși activi (microcapsule, nanoparticule) nou sintetizați ce permit eliberare controlată de dexametazonă și nivelul de protecție oferit de către aceștia în cadrul hipoacuziei induse de ototoxice.

Concluzii

Primul obiectiv al proiectului a fost îndeplinit total, prin obținerea unor nanostructuri noi și versatile pentru livrarea Dex către celulele ciliate ale urechii interne, *in vitro* și *in vivo*: NP de aur (GNP), NP de aur acoperite cu chitosan (GNPChit), NP de aur acoperite cu Pluronic (GNPPlu), NP de chitosan (NPChit), micelii de Pluronic (MiceliiPlu), micelii de Pluronic încapsulate cu Dex (MiceliiPluDex) și nanoparticule de chitosan încapsulate cu Dex (NPChitDex)

Al 2-lea obiectiv al proiectului, de asemenea îndeplinit în totalitate, a constat în evaluarea modificărilor NP în condiții biologice, în corelație cu efectele asupra celulelor tratate. Pentru aceasta au fost puse la punct, implementate și utilizate mai multe protocoale experimentale *in vitro*, utilizând linia de celule senzoriale auditive HEI-OC1. Aceste celule care exprimă mai mulți markeri moleculari specifici celulelor senzoriale ale organului Corti, în condiții de cultură permissive (33 °C, 10% CO₂) sunt extrem de sensibile la substanțe ototoxice.

A fost demonstrată preluarea GNP, a miceliilor de Pluronic și a nanoparticulelor de chitosan de către celulele HEI-OC1 (gradul de internalizare) prin următoarele metode:

- *Spectrometrie atomică de absorbție.*

- *Microscopie optică în câmp întunecat.*
- *Microscopie electronică de transmisie TEM.*
- *Microscopie de fluorescență.*

S-a făcut o evaluare a toxicității și a efectului NP și soluțiilor nanoveziculare asupra celulelor aparatului auditiv cu ajutorul testelor de măsurare a:

- *Viabilității celulare*
- *Apoptozei*
- *Stressului oxidativ produs de NP*
- *Secreției de citokine inflamatorii TNF α și IL6 cu ajutorul tehnicii ELISA..*

Al 3-lea obiectiv al proiectului a fost îndeplinit în totalitate și a constat în evaluarea efectului protector al Dexametazonei libere și înglobate în NP împotriva ototoxicității induse de Cisplatin. Această evaluare s-a făcut atât *in vitro*, pe celulele HEI-OC1 în cultură, cât și *in vivo*, pe animale cărora li s-a indus surditatea cu Cisplatin. Pentru studierea eficacității otoprotecției oferite de nanoparticulele nou sintetizate încărcate cu dexametazonă s-au folosit pe post de bioreactor șobolani Wistar. Aceștia li s-a indus ototoxicitate prin administrare intraperitoneală de Cisplatin. Ulterior, prin injecție transtimpanică li s-a administrat atât dexametazonă simplă, cât și nanoparticule încărcate cu dexametazonă pentru a compara nivelul otoprotecției oferite de fiecare în parte. Toate experimentele *in vivo* au fost efectuate în cadrul Biobazei UMF.

Evaluarea *in vitro* a efectului protector al Dexametazonei libere și înglobate în NP asupra celulelor HEI-OC1 tratate cu Cisplatin s-a făcut prin:

- *Eliberarea de specii reactive de oxigen (ROS)*
- *Cuantificarea apoptozei*
- *Secreția de citokine inflamatorii TNF α și IL6 a fost măsurată cu kiturile ELISA DuoSet*

Evaluarea *in vivo* a efectului protector. Evaluarea funcțională a potențialului efect otoprotector al nanoparticulelor considerate în studiu a constat în determinarea audiologică. Evaluarea morfologică a fost realizată prin examen histopatologic.

Ca *evaluare funcțională* s-au folosit potențialele evocate auditive, înregistrate înainte de injectarea Cisplatinului și la 7 zile după administrarea acestuia.

Al 4-lea obiectiv al proiectului, îndeplinit în întregime, a constat într-o integrare a rezultatelor obținute la primele 3 obiective. Prin extrapolarea modelelor experimentale s-a reușit crearea unui demonstrator experimental pentru testarea, validarea și utilizarea acestor bio-nanomateriale în studii clinice de evaluare a efectelor protective ale NPs asupra celulelor urechii interne afectate de tratamente ototoxice.

Concluzii

Toate obiectivele propuse au fost îndeplinite în întregime, cu obținerea unor rezultate valoroase ale cercetării propuse în acest proiect.

S-a reușit obținerea de produse noi - sintetizarea unor biomateriale noi, nanoparticule de aur stabilizate cu Pluronic sau chitosan, miceli de Pluronic și nanoparticule de Chitosan – cât și

punerea la punct a proceselor tehnologice de obținere a acestora. Aceste noi particule complexe au fost încărcate sau nu cu Dexametazonă și au fost preluate de către celulele urechii interne, unde s-au dovedit a fi netoxice, neafectând celulele neurosenzoriale, dar în schimb oferind protecție împotriva ototoxicității induse de Cisplatin.

Toate procesele biologice explorate, împreună cu procedurile, metodele și tehnologiile utilizate, au fost integrate într-un model demonstrativ reproductibil care poate servi ca ghid teoretic și practic pentru cercetări viitoare de tipul trialurilor clinice.

Director Proiect

Prof. Dr. Maniu Alma Aurelia