



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**STUDII INTERDISCIPLINARE ASUPRA UNOR COMPUȘI
TETRAPIROLICI CU POTENȚIALĂ APLICABILITATE ÎN
DERMATOLOGIA ONCOLOGICĂ**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,
PROF. DR. DUMITRU LUPULIASA**

**STUDENT DOCTORAND,
ANDREEA MIHAELA BURLOIU (POHRIB)**

2024

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	4
1. Prezentare generală asupra patogenezei și terapiei afecțiunilor cutanate premaligne și maligne	6
1.1. Aspecte privind arhitectura generală a pielii și tipurile de celule componente...	6
1.2. Keratoza actinică. Factori determinanți și caracteristici clinice. Managementul keratozei actinice.....	7
1.3. Carcinomul cutanat cu celule scuamoase și carcinomul bazocelular. Factori determinanți, caracteristici clinice, management terapeutic	14
2. Terapia fotodinamică – abordare terapeutică modernă în dermatologia oncologică	19
2.1. Principiile fundamentale ale terapiei fotodinamice	19
2.2. Fotosensibilizatori utilizați în dermatologia oncologică	26
3. Studiu asupra obținerii și evaluării <i>in vitro</i> a unui nou compus cu aplicabilitate în dermatologia oncologică	29
3.1. Evaluarea preliminară <i>in silico</i> a potențialului de localizare și profilului antitumoral, farmacocinetic și toxicologic pentru un nou compus cu nucleu porfirinic.....	30
3.1.1. Predicția difuziunii pasive prin membrana celulară.....	30
3.1.2. Evaluarea preliminară <i>in silico</i> a profilului antitumoral, farmacocinetic și toxicologic	33
3.1.3. Concluzii.....	42
3.2. Obținerea, evaluarea structurală și spectrală a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina.....	42
3.2.1. Sinteza compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina.....	42
3.2.2. Evaluarea structurală și spectrală a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina.....	44
3.2.3. Concluzii.....	46
3.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina pe linii celulare relevante pentru dermatologia oncologica.....	47
3.3.1. Evaluarea gradului de internalizare celulară al compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina în raport cu celule de tip HaCaT, HS27 și B16F10.....	47
3.3.2. Evaluarea biocompatibilității compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina în raport cu celule de tip HaCaT, HS27 și B16F10	49

3.3.3. Capacitatea compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-carboximetilfenil) porfirina de a realiza terapie fotodinamică <i>in vitro</i>	52
3.3.4. Concluzii	56
4. Studiu complex pentru selecția unor molecule tetrapirolice cu aplicabilitate în terapia afecțiunilor cutanate premaligne și maligne	57
4.1. Analiza <i>in silico</i> privind potențialul de difuziune prin membrana celulară și profilul ADMET al compușilor porfirinici incluși în studiu.....	58
4.1.1. Predicția permeabilității prin membrana celulară	58
4.1.2. Predicția profilului ADMET (absorbție, distribuție, metabolizare, eliminare, toxicitate).....	61
4.1.3. Concluzii	63
4.2. Evaluarea prin microscopie de forță atomică a potențialului de agregare moleculară a compușilor porfirinici în soluții cu solvent PEG 200.....	64
4.2.1. Metodologia determinării statusului de agregare al compușilor porfirinici prin microscopie de forță atomică	64
4.2.2. Analiza rezultatelor privind profilul morfologic și textural al compușilor porfirinici	65
4.2.3. Concluzii	70
4.3. Studiu comportamentului spectral UV-Vis și de fluorescență al unor soluții cu concentrații 10^{-5} M compus porfirinic dizolvat în polietilen glicol 200 sau soluție tampon fosfat	71
4.3.1. Analiza proprietăților de absorbție ale compușilor porfirinici în solvent polietilen glicol 200 sau soluție tampon fosfat.....	72
4.3.2. Analiza proprietăților de emisie ale compușilor porfirinici în solvent polietilen glicol 200 sau soluție tampon fosfat	76
4.3.3. Concluzii	79
4.4. Selecția fotosensibilizatorilor porfirinici prin evaluarea potențialului de internalizare celulară și a profilului terapeutic. Testarea <i>in vitro</i> pe fibroblaste dermice umane normale, keratinocite umane normale și linii celulare tumorale..	79
4.4.1 Evaluarea potențialului de localizare la nivel celular al structurilor porfirinice în raport cu celule de tip HaCaT, HS27, SCC si B16F10.....	80
4.4.2 Evaluarea profilului terapeutic al structurilor porfirinice din punct de vedere al eficienței în PDT asupra celulelor de tip HaCaT, HS27, SCC si B16F10	83
4.4.3 Concluzii.....	91
5. Studii de formulare a fotosensibilizatorilor selectați pentru aplicații în dermato-oncologie	92
5.1 Formularea hidrogelurilor cu porfirine	93
5.2 Evaluarea farmacotehnică a hidrogelurilor cu porfirine	94

5.2.1	Determinarea pH-ului	94
5.2.2	Capacitatea de întindere	95
5.2.3	Capacitatea de adeziune <i>in vitro</i>	97
5.2.4	Caracteristicile reologice	99
5.2.5	Evaluarea filmelor formate de geluri	101
5.2.6	Concluzii	106
5.3	Evaluarea fizico-chimică a hidrogelurilor cu porfirine	107
5.3.1	Studiu comportamentului spectral UV-Vis și de fluorescență al compușilor porfirinici în gelurile polimerice	107
5.3.2	Analiza caracteristicilor FT-IR a gelurilor cu porfirine	109
5.3.3	Evaluarea prin microscopie de forță atomică a profilului morfologic și textural al gelurilor cu porfirine	111
5.3.4	Analiza termogravimetrică a gelurilor cu porfirine	124
5.3.5	Analiza structurală prin difracție de raze X a gelurilor cu porfirine	126
5.3.6	Concluzii	128
5.4	Studiu de cedare <i>in vitro</i> a compusului 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20- <i>tris</i> -(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina din matricea polimerica HPMC	129
	CONCLUZII GENERALE	132
	Bibliografie	135
	Lista lucrărilor științifice publicate	157
	Anexe	158

INTRODUCERE

Statisticile realizate recent evidențiază cancerul ca fiind principala cauză de deces la nivel mondial. La un număr de 20 milioane cazuri noi de cancer identificate în anul 2022 au fost înregistrate aproximativ 10 milioane de decese prin cancer. Povara globală a cancerului este de așteptat să fie de 28,4 milioane de cazuri în 2040, o creștere cu 42% față de 2022 (Bray și colab., 2024; Kim și Chang, 2023). De aceea, eforturile specialiștilor în domeniul medical de a dezvolta strategii inovative pentru diseminarea măsurilor de prevenire a cancerului și furnizarea de noi compuși antitumorali, sunt esențiale în managementul eficient al acestei patologii.

Cancerle de piele non-melanom sunt încadrate de statisticile mondiale printre cele mai frecvente forme de cancer cu o evoluție de un milion de cazuri noi raportate anual (Bray și colab., 2024). În această categorie se înscriu carcinomul bazocelular, carcinomul cutanat cu celule scuamoase, keratozele actinice, limfoamele cutanate, sarcomul Kaposi și angiosarcomul (Esteve și colab., 2017; Zink, 2019).

Variabilitatea componentelor implicate în apariția tumorilor cutanate face dificilă identificarea factorului declanșator al acestora și impun specialiștilor în dermatoncologie dezvoltarea de noi strategii terapeutice ca alternative la terapiile clasice.

Terapia fotodinamică (PDT) cu fotosensibilizatori cu structuri apropiate protoporfirinei IX, reprezintă o alternativă bună la terapiile clasice, datorită eficienței terapeutice pe termen lung și efectelor toxice minime în raport cu celulele sănătoase. În plus, PDT cu fotosensibilizator aplicat local oferă avantajul PDT-ului de câmp și scade riscul de fototoxicitate sistemică. PDT topic cu acid aminolevulinic (ALA) sau esterul său metilic este o opțiune frecventă în dermatoncologie dar potențialul clinic al ALA este limitat de capacitatea scăzută de internalizare celulară și biodisponibilitate slabă, ambele atribuite caracteristicilor sale structurale și naturii hidrofille (Luo și colab., 2024). Forme farmaceutice care conțin fotosensibilizatori cu structuri de tetrapiroli (Purlytin[®], Foscan[®], Foslip[®]) sunt utilizate în prezent în PDT topic. Structurile tetrapirolice au selectivitate bună pentru celulele tumorale, citotoxicitate scăzută în absența luminii, proprietăți fotofizice excelente cu absorbții în fereastra fototerapeutică (600–800 nm) și eficiență bună în producerea speciilor reactive de oxigen (Sarbadhikary și colab., 2021). Cu toate aceste avantaje, aplicarea derivaților tetrapirolici în PDT topic este limitată de solubilitatea redusă a acestora în mediile biologice și de tendința de agregare moleculară cu efect negativ asupra absorbției în celulele tumorale (Kim și colab., 2023). Internalizarea slabă a PS în țesuturile cutanate limitează efectul terapeutic al PDT doar la leziunile superficiale

ale pielii. Aceste dezavantaje pot fi limitate prin implementarea unor strategii de drug-design în obținerea de noi molecule, cu arhitecturi structurale asociate unui raport hidrofил/lipofил favorabil unei internalizării celulare eficiente (Yano și colab., 2011). În plus, utilizarea nanotehnologiilor farmaceutice ar putea fi o abordare optimă pentru a asigura o bună eliberare a moleculei PS în masa tumorală. Nanoparticulele polimerice au capacitatea de a îmbunătăți solubilitatea PS prin creșterea capacității de dizolvare hidrofobă, cresc biodisponibilitatea și asigură eliberarea controlată a PS în țesuturile tumorale. Molecule hidrofилle precum polietilenglicolul și polizaharidele sunt frecvent utilizate în acest scop (Yang și colab., 2023).

Justificat de aspectele prezentate, obiectivul principal al tezei de doctorat a urmărit evaluarea structurală, spectrală, biologică și formularea unor noi compuși cu aplicabilitate în terapia fotodinamică optimizată a afecțiunilor cutanate premaligne și maligne.

Etapete urmărite în realizarea studiilor includ:

- documentarea aprofundată privind stadiul actual al cercetărilor referitor la identificarea și terapia tipurilor de afecțiuni cutanate premaligne și maligne.

- obținerea, caracterizarea structurală, spectrală și evaluarea *in vitro* a unui nou compus cu potențial de aplicabilitate în dermatologia oncologică.

- selecția unor compuși porfirinici de sinteză cu potențial în terapia afecțiunilor cutanate, selecție realizată pe criterii structurale și spectrale; studiul a inclus și evaluarea *in vitro* a compușilor prin testare pe fibroblaste dermice umane normale, keratinocite umane normale, linii celulare tumorale (carcinomul cutanat cu celule scuamoase și melanom de șoarece din linia B16F10).

- formularea compușilor selectați pentru aplicații în PDT topic și evaluarea farmaco-tehnică și fizico-chimică a formelor farmaceutice obținute.

- studiu preliminar de cedare *in vitro* a substanței active din forma farmaceutică.

Studiile interdisciplinare realizate în cadrul părții experimentale a tezei de doctorat s-au desfășurat în laboratoarele de cercetare ale Disciplinei de Tehnologie Farmaceutică și Biofarmacie din Facultatea de Farmacie, U.M.F. „Carol Davila”, ale Institutului Național de Cercetare Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș” și ale Institutului de Chimie Fizică "Ilie Murgulescu" al Academiei Române; experimentele au fost finanțate din fondurile proiectului „Protocol fotodinamic cu porfirine inovative și modulatori redox în patologia cutanată premalignă- demonstrare preclinică”, proiect din colectivul căruia am făcut parte în perioada 2022-2024.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul 3. Studiu asupra obținerii și evaluării *in vitro* a unui nou compus cu aplicabilitate în dermatologia oncologică

În ultimii ani, dezvoltarea de noi fotosensibilizatori cu structuri tetrapirolice a creat o multitudine de perspective terapeutice, în special în identificarea și terapia formațiunilor tumorale (Plekhoa și colab., 2022). Arhitectura structurală, profilul fotofizic și capacitatea de absorbție moleculară în domeniul fototerapeutic corelat cu potențialul de generare a speciilor reactive de oxigen (ROS) în prezența oxigenului molecular și a luminii, sunt factorii principali care justifică potențialul lor terapeutic (Sarbadhikary și colab., 2021).

Având în vedere necesitatea dezvoltării de noi PS cu proprietăți adecvate pentru PDT în afecțiunile cutanate premaligne și maligne, într-o prima etapa a studiilor doctorale, am realizat sinteza, evaluarea *in silico* și *in vitro* a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil) porfirina (P5.2) (Figura 3.1) (Burloiu și colab., 2022; Burloiu și colab., 2024b).

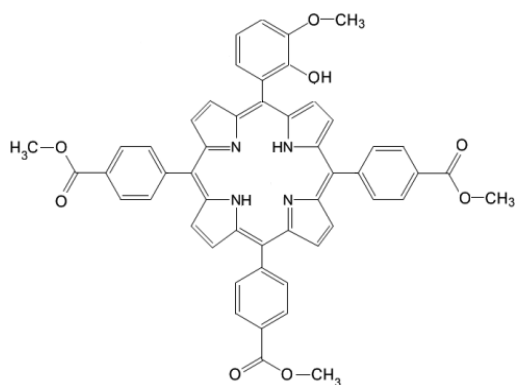


Figura 3.1. Structura moleculara a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil) porfirina (P5.2)

Evaluarea preliminară in silico a potențialului de localizare și profilului antitumoral, farmacocinetic și toxicologic pentru un nou compus cu nucleu porfirinic.

Capacitatea compusului porfirinic P5.2 de a traversa membrana celulară a fost prezisă cu programul PerMM (*Permeability of Molecules across Membranes*) (Lomize și colab., 2019) prin simularea translocării P.52 printr-un strat bilipidic alcătuit din dioleoil-fosfatidilcolină. Programul utilizat a permis calculul energiei de legare de membrana celulară (ΔG , kcal/mol), coeficientul de permeabilitate ($\log Perm$) și generarea profilului energiei de transfer funcție de distanța față de centrul membranei. Rezultatele simulării au indicat o valoare estimată a energiei de legare a membranei celulare, $\Delta G = -6,06$ kcal/mol, și a coeficientului de permeabilitate $\log Perm = -2,7$, sugerând o permeabilitate relativ bună a membranei în raport cu P5.2 (Burloiu și colab., 2024b). Evaluarea preliminară a profilului ADMET (absorbție, distribuție, metabolizare, excreție și toxicitate) al derivatului porfirinic, a fost realizată prin estimarea unor parametri farmacocinetici și toxicologici. Au fost luate în considerare administrarea topică dar și cea sistemică a

compusului P5.2. Modelele utilizate au indicat un potențial bun de difuziune la nivelul țesutului cutanat, aspect important pentru o structură ce urmează a fi testată în vederea utilizării în identificarea și tratamentul PDT al leziunilor cutanate premaligne sau maligne. După difuziunea prin membrana celulară, compusul manifestă potențial de localizare la nivelul mitocondrial, putând astfel să își manifeste efectul citotoxic prin producerea unor disfuncții la acest nivel. Derivatul porfirinic investigat, prezintă o probabilitate foarte mică de a produce toxicitate cutanată la administrare locală, acest aspect este relevant pentru scopul propus de noi cu privire la aplicabilitatea acestei noi structuri, și anume terapia afecțiunilor cutanate premaligne și maligne. În plus, modelele utilizate au indicat pentru P5.2 lipsa unei toxicități marcante asupra celulelor non-maligne după administrare locală. Simulările de andocare moleculară și dinamică moleculară au susținut potențiala activitate antitumorală a P5.2, care ar putea viza anhidraza carbonică IX asociată tumorii induse de hipoxie (Burloiu and colab., 2024b).

Obținerea, evaluarea structurală și spectrală a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina

Procedeul tehnic aplicat pentru obținerea compusului porfirinic a fost inițiat de reacția de condensare dintre pirol, 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehida și metil 4-formil benzoat, în raport molar 4:1:3, prin iradiere cu microunde, în mediu anhidru (Burloiu și colab., 2022). Produsul de reacție a fost dizolvat în amestec diclorometan/eter etilic (30v/1v), soluția a fost filtrată la presiune normală iar filtratul a fost concentrat prin distilare simplă. Separarea compusului P5.2 din produsul brut s-a realizat prin cromatografie (Burloiu și colab., 2022). 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina ($C_{51}H_{38}N_4O_8$) a fost obținută cu randament de 38% și este descris de următoarele caracteristici spectrale: 1H -NMR, δ_H (400 MHz, $CDCl_3$), ppm: - 2.75 (s, 2H), 4.13 (s, 3H), 4.18 (s, 9H), 5.83 (s, 1H), 7.28 (d, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.65 (t, 1H), 8.32 (d, 6H), 8.47 (d, 6H), 8.81 (d, 6H); 8.91 (d, H); IR (cm^{-1}): 3424, 3316, 2924, 2853, 1722, 1606, 1558, 1468, 1434, 1402, 1276, 1179, 1100, 1020, 963, 867, 801, 760, 735. UV-Vis (solvent PEG200) λ_{max} (nm): 402, 495, 528, 570, 630.

Evaluarea spectrală a confirmat structura compusului P5.2 și a evidențiat proprietăți de absorbție și fluorescență adecvate unui fotosensibilizator. Spectrul de absorbție înregistrat pentru o soluție 10 μ M P5.2 dizolvat în PEG 200, prezintă caracteristici spectrale tipice porfirinelor cu o bandă Soret intensă la 402 nm, însoțită de alte patru benzi Q în 496–630. Prezența benzii Q la 630 nm (Figura 3.2a), confirmă potențialul de absorbție al compusului P5.2 în domeniul fototerapeutic. În plus, evaluarea proprietăților fluorescente ale P5.2 a confirmat prezența unui maxim de emisie la $\lambda=657$ nm (Figura 3.2b), valoare relevantă pentru un fotosensibilizator destinat aplicabilității în PDT.

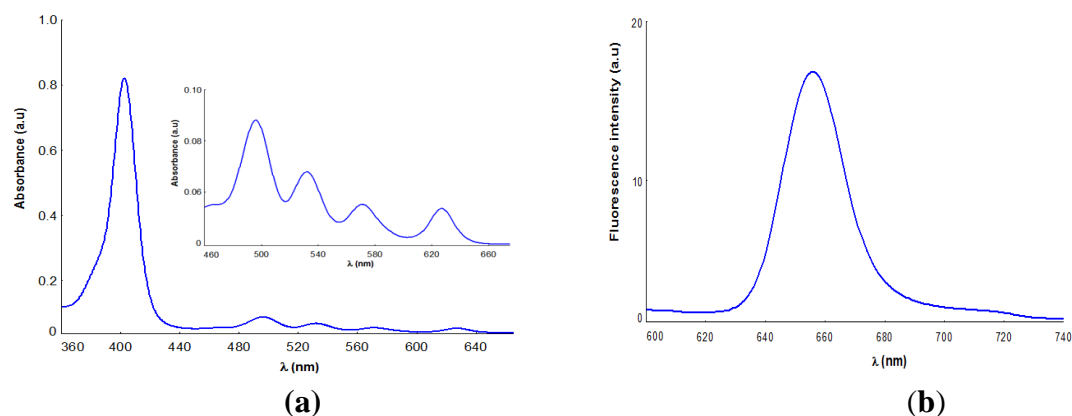


Figura 3.2. (a) Spectrul de absorbție și (b) spectrul de fluorescență ale compusului P5.2 dizolvat în PEG 200, $c=10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=410 \text{ nm}$.

Evaluarea in vitro a compusului 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina pe linii celulare relevante pentru dermatologia oncologică

Studiul biologic *in vitro* a urmărit evaluarea biocompatibilității compusului P5.2, capacitatea de internalizare celulară a acestuia, potențialul de marcator celular fluorescent și efectele celulare ale terapiei fotodinamice (PDT) realizată cu derivatul porfirinic.

Pentru experimentele *in vitro* s-au utilizat următoarele tipuri de celule aderente specifice pentru piele: keratinocite umane normale din linia celulară HaCaT, fibroblaste dermice umane din linia celulară HS27 și celule tumorale de melanom de șoarece din linia B16F10. Metodologia experimentală aplicată în studiile *in vitro* este descrisă detaliat în referința Burloiu și colab. 2024b.

Având în vedere proprietățile fluorescente ale compusului porfirinic, încorporarea acestuia în celule specifice pielii a fost evaluată prin citometrie în flux. Rezultatele experimentale prezentate în Figura 3.3 confirmă incorporarea P5.2 în toate tipurile de celule (HaCaT, HS27 și B16F10).

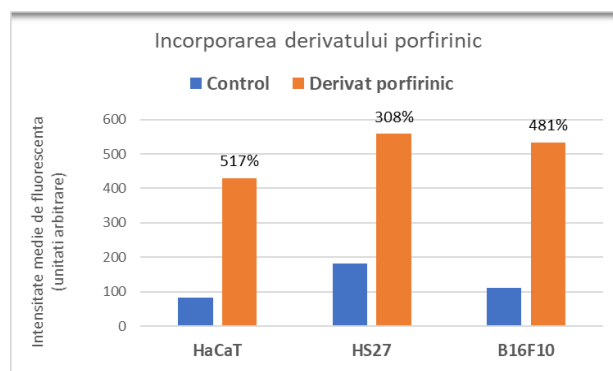


Figura 3.3. Incorporarea compusului P5.2 ($c=10 \mu\text{M}$, timp de incubare 24 h) de către celulele HaCaT, HS27 și B16F10. Rezultate exprimate în procent al intensității medii de fluorescență în celule tratate cu P5.2 din fluorescența medie a celulelor netratate.

Se observa o creștere a fluorescenței celulare de 517% în keratinocitele HaCaT, de 308% în fibroblastele Hs27 respectiv 481% pentru B16F10. Rezultatele confirmă utilitatea P5.2 de marcator fluorescent al celulelor normale sau tumorale din piele. În plus, internalizarea celulară a derivatului porfirinic este o condiție esențială pentru potențiala lui utilizare ca fotosensibilizator în PDT.

Biocompatibilitatea P5.2 a fost evaluată prin testul de reducere MTS [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazoliu)], care oferă informații despre numărul de celule active metabolic în cultură, completate cu testul de eliberare a lactat dehidrogenazei (LDH), care oferă informații despre alterarea integrității membranei plasmatică corelată cu moartea celulelor prin necroza. Rezultatele au evidențiat faptul că pentru concentrații de 10μM P5.2, nu se modifică statistic semnificativ eliberarea de LDH de către niciuna dintre liniile celulare investigate, normale sau tumorale (Figura 3.4).

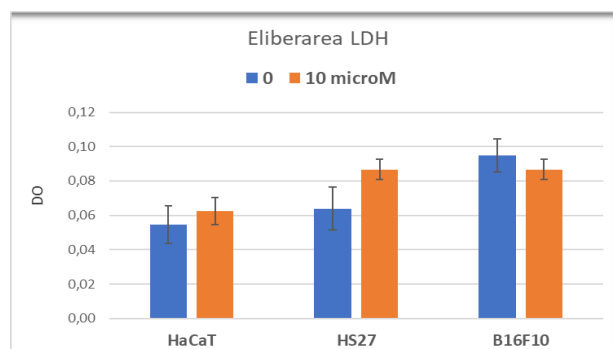


Figura 3.4. Eliberarea de LDH de către celulele HaCaT, HS27 sau B16F10, tratate timp de 24h cu P5.2 la concentrația de 10μM. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie ± SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

P5.2 nu este citotoxic în condiții de întuneric. Totuși, există o tendință mai pronunțată de a elibera LDH în cazul fibroblastelor cutanate umane Hs27 în comparație cu keratinocitele HaCaT (Figura 3.5).

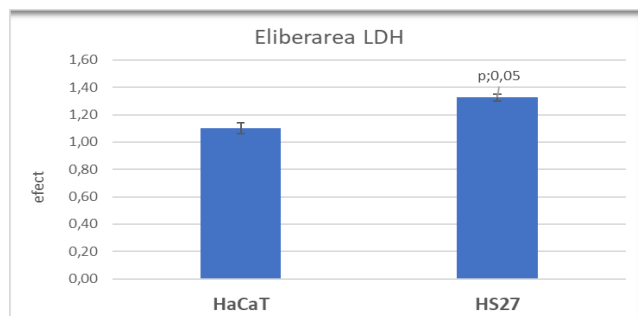


Figura 3.5. Efectul tratării cu derivatul porfirinic ($c=10 \mu\text{M}$, 24h), a celulelor HaCaT, HS27. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii ± SEM ale eliberării LDH, obținute în două experimente independente. Diferențele dintre celule au fost considerate statistic semnificative pentru valori $p < 0.05$.

Datele privind reducerea MTS au arătat reduceri nominal mai mici ale MTS de către keratinocite umane normale ($p < 0,05$), în timp ce fibroblastele dermice umane nu au fost afectate la nivelul acestui parametru.

Efectul exercitat *in vitro* de compusul porfirinic P5.2 asupra numărului de celule metabolic active, a fost evaluat ca măsură a potențialelor efecte antiproliferative a acestuia. Datele de reducere a MTS evidentiază o tendință de scădere a reducerii MTS de către keratinocitele umane normale din linia HaCaT, în timp ce fibroblaștii umani dermici HS27 nu sunt afectați la nivelul acestui parametru (Figura 3.6).

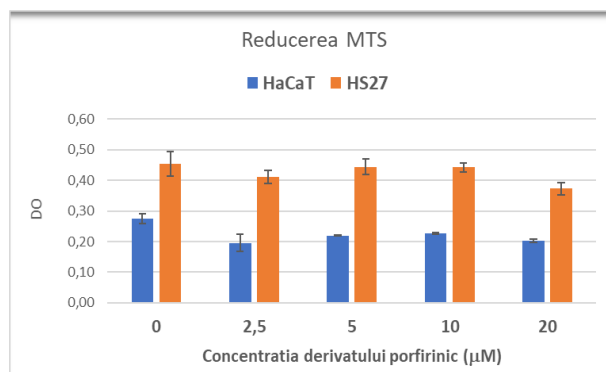


Figura 3.6. Reducerea MTS de către celulele HaCaT și HS27 tratate timp de 24h cu P5.2 ($c=2.5-20\mu\text{M}$) Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

Conform rezultatelor, P5.2 inhibă proliferarea keratinocitelor, dovedind astfel, pe lângă proprietățile fluorescente, și activitate anti-proliferativă moderată. Aceste proprietăți ale P5.2 au relevanță în cazul keratozei actinice caracterizată prin proliferarea aberantă a keratinocitelor de la nivelul epidermei (Dodds și colab., 2014).

PDT *in vitro* s-a realizat cu echipamentul Modulight ML6600 (Modulight Inc) prevăzut cu laser având lungimea de undă de 635 nm, sistem computerizat de control al dozei, iradianței și temperaturii laserului. Parametrii asociați procedurii PDT au fost: doza de 10 J/cm^2 și iradianța de 50 mW/cm^2 (Dobre, și colab., 2021).

Datele experimentale referitoare la linia celulară HaCaT (Figura 3.7) arată că PDT realizat *in vitro* cu derivatul porfirinic reduce la aproximativ 72% intensitatea reacției de reducere a MTS de către aceste celule, crescând în același timp eliberarea de LDH de aproximativ 3 ori. Prin urmare, rezultatele evidențiază potențialul P5.2 de a induce o fotosensibilizare moderată a keratinocitelor normale.

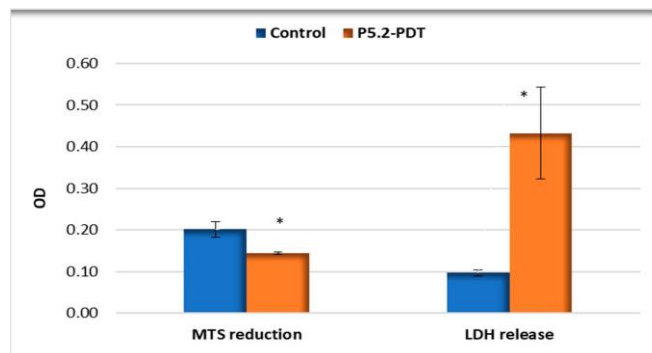


Figura 3.7. Reducerea MTS și eliberarea LDH de către keratinocitele umane din linia HaCaT încărcate cu derivatul porfirinic (10 μ M), expuse la PDT (10J/cm², 50 mW/cm²) și analizate la 24h post-PDT. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm SEM a densității optice (DO) pentru triplicate de probă.

Evaluarea *in vitro* pe celule relevante pentru afecțiunile cutanate premaligne și maligne, a evidențiat o bună internalizare celulară și o bună biocompatibilitate pentru compusul testat. Profilul fluorescent bun și capacitatea de incorporare celulară, recomandă P5.2 ca marcator fluorescent în afecțiuni cutanate premaligne și maligne. În plus, P5.2 inhibă multiplicarea keratinocitelor, rezultat favorabil pentru aplicabilitatea acestuia în keratoza actinică.

Capitolul 4. Studiu complex pentru selecția unor molecule tetrapirolice cu aplicabilitate în terapia afecțiunilor cutanate premaligne și maligne

O altă etapă în dezvoltarea părții experimentale a tezei de doctorat a fost selecția unor compuși tetrapirolici cu potențial de fotosensibilizator în terapia afecțiunilor cutanate premaligne și maligne. Au fost evaluați pe criterii structurale, spectrale și farmacotoxicologice cinci compuși cu structură porfirinică (Figura 4.1.) (Boscencu și colab., 2017; Boscencu și colab., 2020; Boscencu și colab., 2023b):

- 5,10,15,20-tetrakis-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina (**P2.1**)
- 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina (**P2.2**)
- 5,10,15,20-tetrakis-(4-carboximetilfenil) porfirina (**P3.1**)
- 5-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-10,15,20-tris-(4-carboximetilfenil) porfirina (**P3.2**)
- 5-(2,4-dihidroxifenil)-10,15,20-tris-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina (**P4.2**)

Studiul a urmărit:

- analiza *in silico* privind potențialul de difuziune prin membrana celulară a compușilor porfirinici și predicția profilului ADMET (absorbție, distribuție, metabolizare, eliminare, toxicitate) al acestora;
- evaluarea potențialului de agregare moleculară în soluții 10 μ M, solvent PEG 200;
- analiza profilului spectral al porfirinelor în soluții de concentrație 10 μ M utilizând ca solvent PEG 200 sau PBS;
- evaluarea potențialului terapeutic și profilului toxicologic al porfirinelor prin testarea *in vitro* pe fibroblaste dermice umane normale, keratinocite umane normale și

linii celulare tumorale (carcinomul cu celule scuamoase și melanom de soarece). Studiile *in vitro* au urmărit capacitatea de localizare la nivel celular, biocompatibilitatea și potențialul compușilor de a distruge celulele tumorale la activare cu lumina de lungime de unda specifică (terapie fotodinamică *in vitro*).

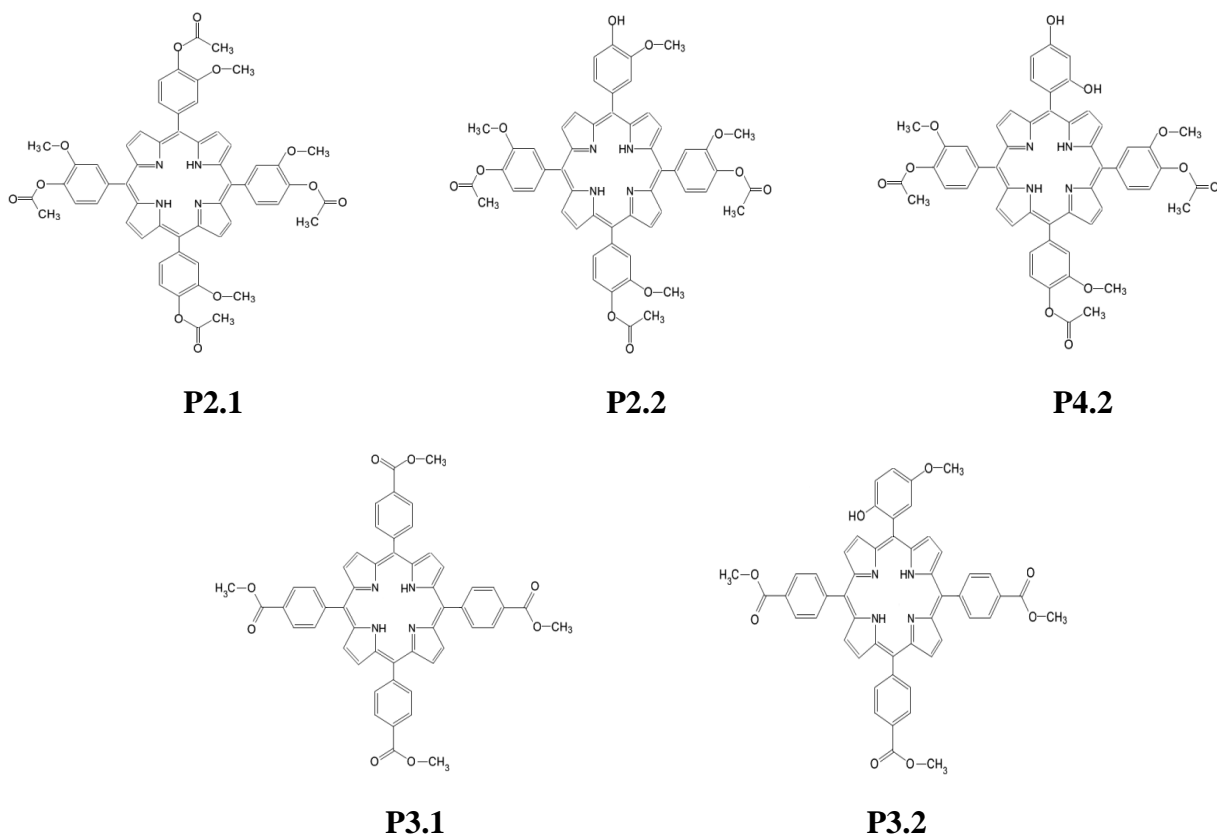


Figura 4.1. Formulele structurale ale compușilor porfirinici incluși în studiu

Analiza in silico privind potențialul de difuziune prin membrana celulară și profilul ADMET al compușilor porfirinici incluși în studiu

Deoarece absorbția celulară a derivaților porfirinei este esențială pentru a acționa ca fotosensibilizatori eficienți în celule și țesuturi, am prezis mai întâi translocarea compușilor investigați prin membrana celulară folosind serverul web PerMM (*Permeability of Molecules across Membranes*) (Lomize și colab., 2019).

Rezultatele simulărilor sunt redată în Figura 4.2, ca profil al energiei de transfer (ΔG_{transf}) prin membrană, funcție de distanța față de centrul stratului bilipidic (Z).

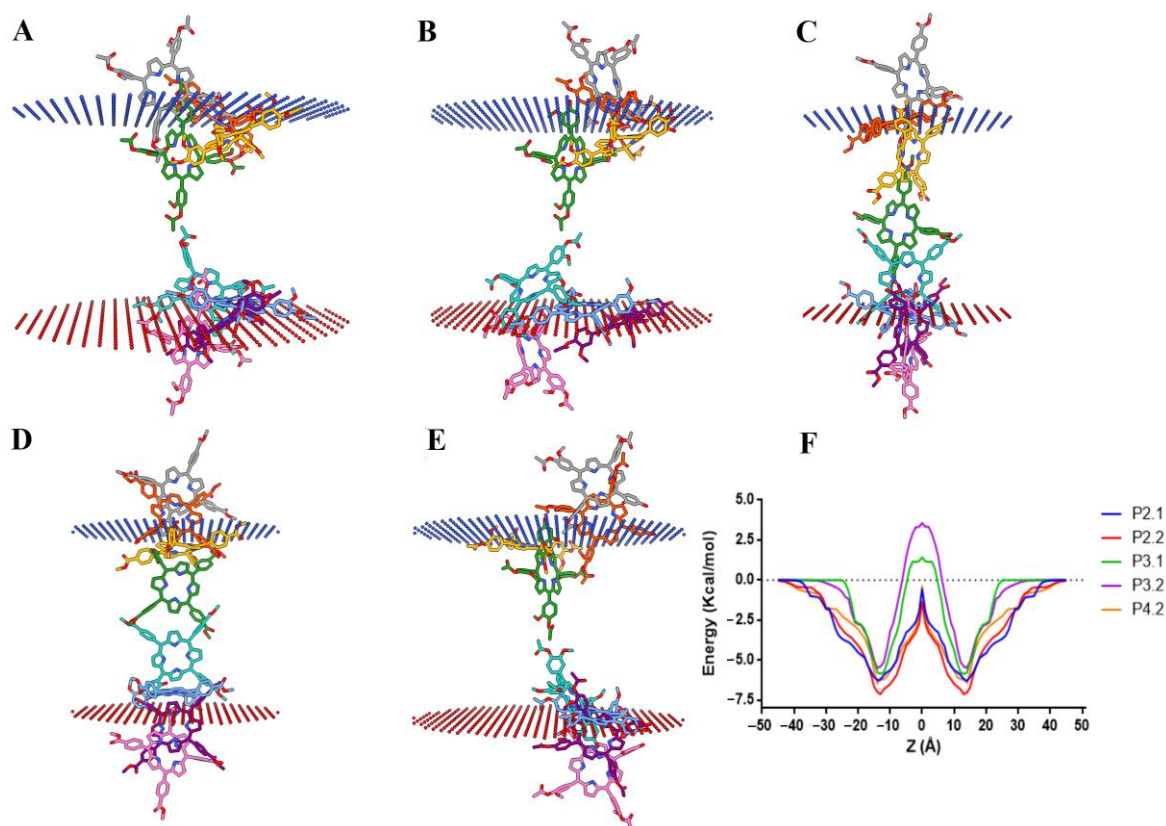


Figura 4.2. Simularea căilor de translocare prin stratul dublu lipidic a porfirinelor P2.1 (A), P2.2 (B), P3.1 (C), P3.2 (D) și P4.2 (E) și variația energiei de transfer în funcție de distanța față de centrul stratului bilipidic (F) (Burloiu și colab., 2024a).

Conform valorilor calculate pentru coeficientul de permeabilitate \logPerm și profilurilor $\Delta G_{trans}(Z)$, porfirinele P2.2, P4.2 și P2.1 au potențial apreciabil de permeabilitate membranară. Structurile P3.1 și P3.2, necesită energii de transfer mai mari și permeabilitate membranară mai scăzută comparativ cu P2.2, P4.2 și P2.1., deși P3.2 are potențial de interacțiune prin legături de hidrogen cu capetele hidrofile ale lipidelor membranare (Burloiu și colab., 2024a).

Profilul ADMET al celor 5 derivați porfirinici a fost prezis utilizând trei servere web diferite: admeSAR (Yang și colab., 2019), pkCSM (Pires și colab., 2015) și ProTox-II (Banerjee și colab., 2018). Deoarece compușii investigați sunt candidați pentru terapia fotodinamică a leziunilor cutanate premaligne sau maligne, cele mai relevante proprietăți ADMET sunt permeabilitatea cutanată și sensibilizarea pielii. Pentru toți derivații porfirinici investigați, rezultatele au evidențiat o permeabilitate cutanată ($\log K_p$, -2.735 cm/h) care se încadrează în intervalul acceptabil pentru medicamente (Chavan și colab., 2014). După difuziunea prin membrana celulară, structurile porfirinice au potențial de localizare prezis la nivel mitocondrial, aspect favorizant eficienței PDT cu acești compuși. Compușii investigați au avut o toxicitate prezisă relativ scăzută (clasa V) și au fost negativi în ce privește sensibilizarea cutanată (Burloiu și colab., 2024a).

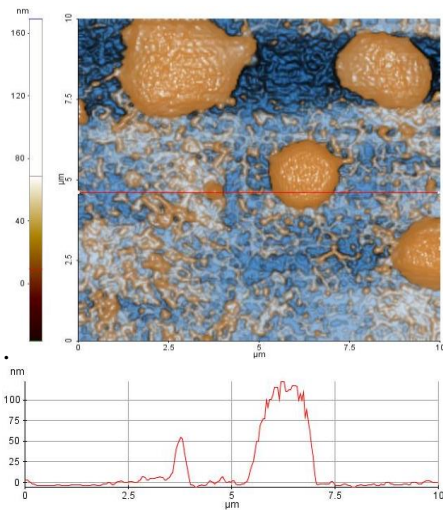
Evaluarea prin microscopie de forță atomică a potențialului de agregare moleculară a compușilor porfirinici în soluții cu solvent PEG 200

AFM s-a dovedit o metodă versatilă în evaluarea profilului structural și a potențialului de agregare moleculară a porfirinelor cu aplicabilitate în PDT. Metoda furnizează informații referitoare la morfologia și proprietățile texturale ale structurilor tetrapirolice și permite aprecierea capacității de agregare moleculară, fenomen cu influență majoră asupra comportamentului la nivel celular al acestor compuși.

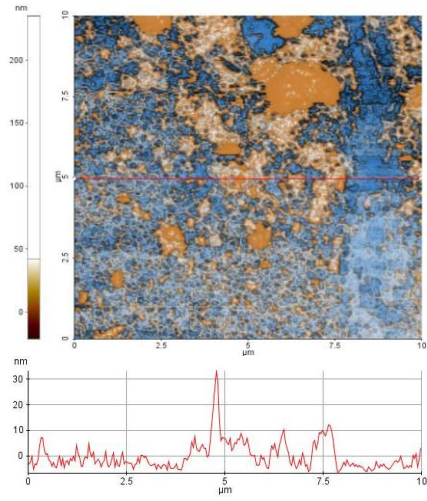
Studiul complex de selecție al porfirinelor cu potențial de aplicabilitate în PDT pentru afecțiuni cutanate premaligne și maligne, a inclus evaluarea prin AFM a statusului de agregare al structurilor P2.1, P2.2, P3.1, P3.2 și P4.2. Rezultatele studiului sunt prezentate în detaliu în referința Burloiu și colab. 2024a.

Măsurătorile de microscopie de forță atomică (AFM) s-au efectuat în modul de lucru non-contact, recomandat pentru scanarea nedistructivă a probelor moi, utilizând un aparat XE-100 de la Park Systems (Suwon, Republica Coreea) și soluții cu concentrație 10 μM porfirina. O picătură de soluție a fost depusă pe un substrat curat de sticlă microscopică (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germania) și a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei, în întuneric. Ca rezultat al utilizării PEG 200 ca mediu de dispersie, s-au obținut nanostructuri de porfirine, având forma circulară, cu o bună dispersie, favorabilă studiilor biologice. Formațiunile de diametru mare, peste 100 nm, de formă circulară, au un conținut ridicat a mediului de dispersie utilizat. Imaginile AFM topografice au fost înregistrate pe mai multe zone de scanare la $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$ și $(2 \times 2) \mu\text{m}^2$. Toate imaginile au fost prelucrate cu Programul de procesare a imaginilor, XEI – v.1.8.0, dezvoltat de Park Systems (Suwon, Republic of Korea) și sunt prezentate în modul „contrast îmbunătățit”. Au fost evaluați o serie de parametri de rugozitate și texturali: rugozitatea pătrată medie (R_q), înălțimea de la vârf la vârf (R_{pv}), asimetria (sk_i), kurtoza (ku), dimensiunea medie fractală (MFD) și indicele textural (S_{tdi}).

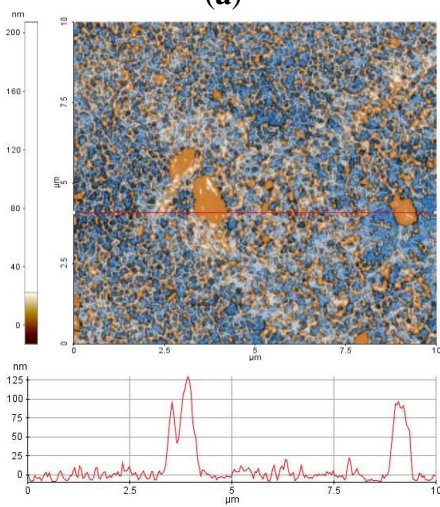
În figura 4.3 sunt redate imagini topografice AFM bidimensionale (2D) cu contrast îmbunătățit ale probelor P2.1(a), P2.2(b), P3.1(c), P3.2(d) și P4.2(e) scanate pe o zonă de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$, împreună cu profilele caracteristice suprafețelor (scanare în linie). Se poate observa că, la scara de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$, toate probele investigate au fost izotrope și auto-similare, cu grade de agregabilitate ușor diferite. Fenomenul de agregare moleculară se poate datora aderenței la substratul utilizat pentru depunere (substrat microscopic de sticlă) dar și naturii mediului de dispersie (PEG 200). Particulele mai mici (agregate) încep de la zeci de nm ajungând la sute de nm în diametru. Cea mai mare tendință de agregare o are compusul P2.1 (Figura 4.3a).



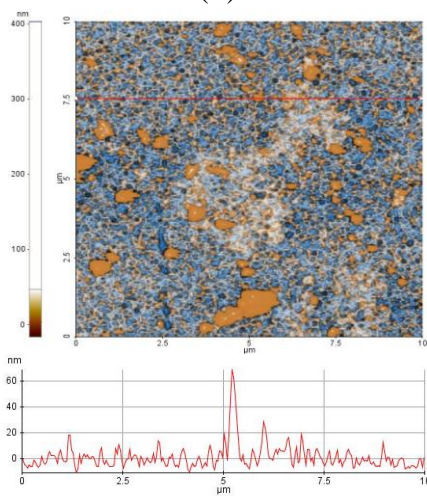
(a)



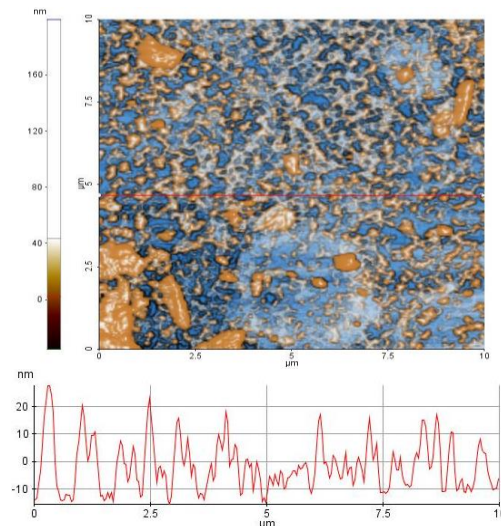
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.3. Imagini topografice AFM bidimensionale (2D) cu contrast îmbunătățit ale probelor P2.1(a), P2.2(b), P3.1(c), P3.2(d) și P4.2(e) scanate pe o zonă de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$, împreună cu profilele caracteristice suprafețelor (scanare în linie)

Studiu comportamentului spectral UV-Vis și de fluorescență a unor soluții cu concentrații 10μM compus porfirinic dizolvat în PEG 200 sau PEG 200/PBS (1/1000)

Comportamentul spectral al structurilor porfirinice selectate a fost evaluat prin spectrometrie de absorbție și de emisie fluorescență. Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrometru SPECORD 200 (Analytik Jena, Germania) iar spectrele de emisie cu spectrofluorimetrul JASCO FP 6500 (JASCO Co., Ltd., Kyoto, Japonia) ($\lambda_{ex}=410$ nm). Soluțiile testate au fost preparate pornind de la o soluție stoc 10 mM în polietilen glicol 200, prin diluții cu PEG 200 sau soluție tampon fosfat, la concentrația finală de 10 μM porfirină.

Spectrele de absorbție moleculară ale compușilor P 2.1, P 2.2, P 3.1, P3.2 și P4.2 în polietilen glicol 200 sau diluții 1/1000 în soluție tampon fosfat, pentru o concentrație finală de 10μM porfirină (Figura 4.4), au un profil tipic compușilor porfirinici și nu indică fenomene de asociere moleculară la concentrațiile testate. În spectrele de absorbție moleculară ale compușilor investigați, se evidențiază banda Soret, ca rezultat al unei absorbții intense, în intervalul spectral 400 - 407 nm și cele patru benzi Q în regiunea 495–629 nm. Prezența, în intervalul spectral 621–630 nm a maximumului de absorbție (banda Qx(0,0)), confirmă faptul că, la concentrațiile testate compușii testați absorb în domeniul fototerapeutic, domeniu spectral relevant pentru terapia fotodinamică a formațiunilor tumorale (Pandey & Zheng, 2000; Simpson & Novikova, 2022).

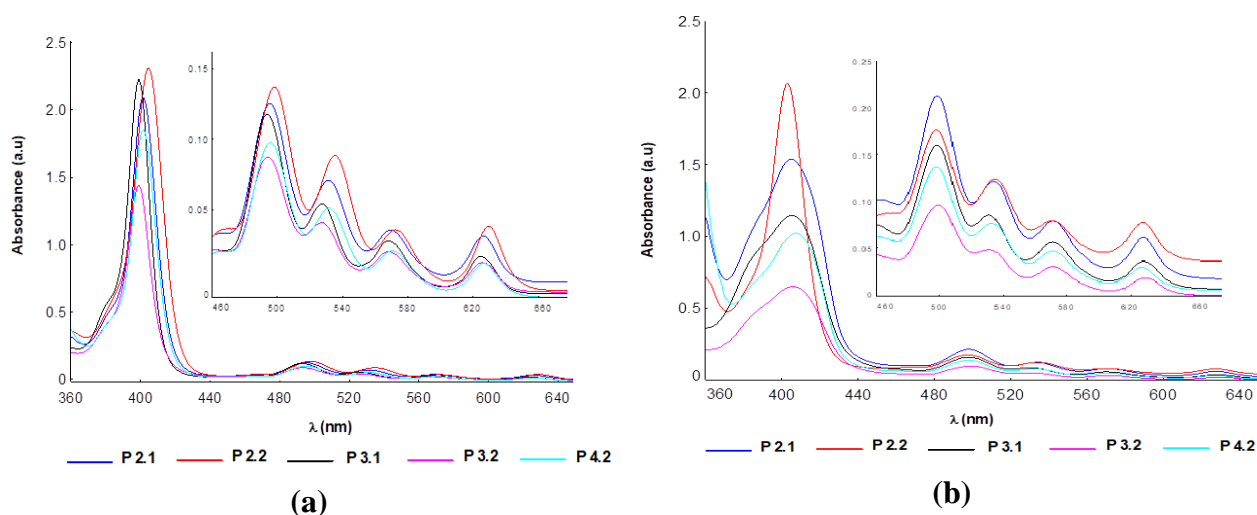


Figura 4.4. Spectre de absorbție ale porfirinelor în soluții 10μM cu solvent PEG 200 (a) și soluții 10μM și solvent PEG 200/PBS (1/1000) (b)

Rezultatele obținute indică modificări mici în poziționarea maximelor de absorbție ca efect al diferențelor structurale între compușii testați. Pentru același solvent, benzile spectrale ale compușilor asimetrice sunt ușor deplasate către roșu comparativ cu cele ale structurilor simetrice. În ce privește intensitatea benzilor de absorbție, cele mai mari valori ale coeficienților molari de extincție sunt asociate compusului P2.2, iar cele mai mici

porfirinei P3.2 (Figura 4.4). Raportat la regiunea spectrală de interes terapeutic 621-630 nm, cele mai bune absorbții au fost înregistrate pentru compușii P2.2 și P2.1 (Figura 4.4).

Datele din literatura de specialitate arată că, intensitățile benzilor din spectrul de absorbție sunt determinate de valorile energetice ce însoțesc tranzițiile electronice între orbitalele complet ocupate cu electroni (a_{2u} și a_{1u}) și orbitalele neocupate (e_{1g}), respectiv de sistemul de electroni π al moleculei (Gouterman, 1978; Gouterman și colab., 1963).

Compușii P2.1, P2.2 și P4.2 prin natura substituenților periferici macrociclului tetrapirolic, au o încărcătură electronică mai mare comparativ cu P3.1 și P3.2. Pot apărea efecte de conjugare între electronii acestor substituenți și electronii ai orbitalelor a_{2u} cu creșterea intensității absorbției. Pe de altă parte, prezența în structura P4.2 a două grupe funcționale $-OH$, crește potențialul de formare de legături de hidrogen cu moleculele solventului cu efect în scăderea intensității absorbției comparativ cu P2.2 și P2.1.

Profilul spectral al porfirinelor investigate nu se modifică semnificativ în soluții cu un conținut de $10\mu M$ porfirină în PEG 200/PBS (1/1000), comparativ cu soluții de aceeași concentrație în solvent PEG 200. Se evidențiază o creștere ușoară a intensității absorbțiilor însoțită de mici deplasări batocrome ale benzilor spectrale (Figura 4.4b).

În condițiile experimentale abordate, proprietățile de emisie ale compușilor investigați sunt influențate de natura solventului și efectele electronice dictate de particularitățile structurale ale fiecărei porfirine. Pentru același solvent, spectrele de emisie ale celor 5 porfirine (Figura 4.5) păstrează profilul spectral tipic fluorescenței porfirinelor baze libere, cu o scădere a fluorescenței în ordinea $P2.1 > P3.1 > P2.2 > P4.2 > P3.2$.

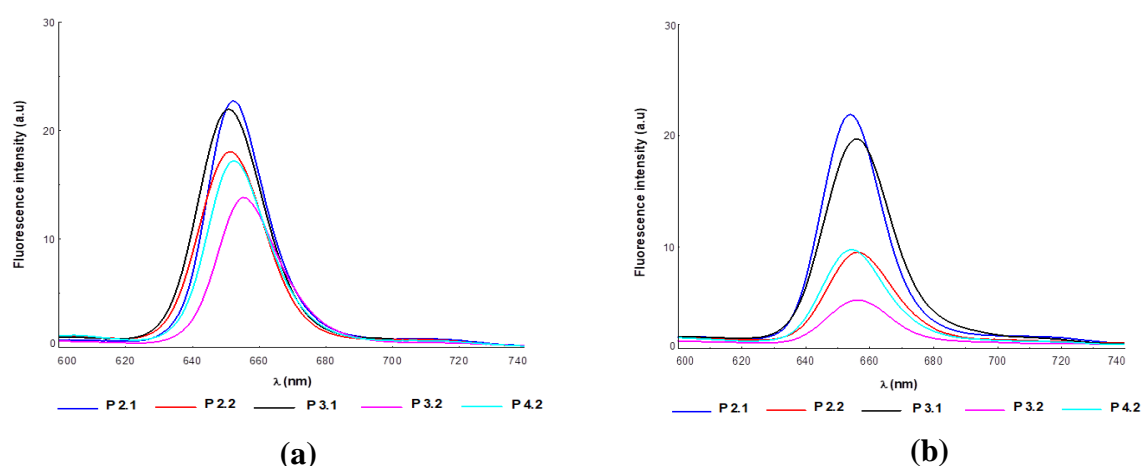


Figura 4.5. Spectre de emisie fluorescentă ale porfirinelor în solvent PEG 200 (a) și solvent PEG 200/PBS (1/1000) (b) ($c=10\mu M$ porfirina; $\lambda_{exc} = 410$ nm)

Referitor la proprietățile fluorescente ale compușilor investigați, pentru concentrații $10\mu M$ porfirină în solvent PEG 200/PBS (1/1000), se observă deplasări mici ale benzilor spectrale cu reducerea intensității fluorescente (mai mult pentru P3.1, P2.2 și P4.2) comparativ cu soluții de aceeași concentrație și solvent PEG 200. Aceste modificări

spectrale conduc la concluzia că utilizarea solventului PEG 200/PBS (1/1000), permite formarea de agregate moleculare, generând stingerea fluorescenței. Indiferent de natura solventului, structurile simetrice P2.1 și P3.1, manifestă fluorescența superioară celor asimetrice, P2.2, P4.2 și P3.2. Scăderea semnalului fluorescent, este o consecință a efectelor electronice induse de grupa funcțională –OH, respectiv de deplasări ale densității electronice în sistemele π conjugate din structura porfirinică. De exemplu, în seria P2.1, P2.2, P4.2, pentru structurile asimetrice P2.2 și P4.2 s-au înregistrat fluorescențe mai slabe comparativ cu structura simetrică P2.1.

Compușii investigați confirmă absorbția în domeniul spectral relevant pentru terapia fotodinamică. Maximele de fluorescență ale porfirinelor în soluții cu solvent PEG200 sau PEG 200/PBS (1/1000) se încadrează în valorile impuse unui fotosensibilizator. Spectrele de emisie ale porfirinelor în soluții 10 μ M porfirină, păstrează profilul tipic al spectrului asociat unui fotosensibilizator porfirinic, cu mici deplasări ale maximelor de emisie în cazul soluțiilor cu solvent PEG 200/PBS (1/1000).

Selecția fotosensibilizatorilor porfirinici prin evaluarea potențialului de internalizare celulară și a profilului terapeutic. Testarea in vitro pe fibroblaste dermice umane normale, keratinocite umane normale și linii celulare tumorale

Potențialul de internalizare celulară și efectul terapiei fotodinamice asupra viabilității, proliferării și necrozei celulelor HaCaT, Hs27, SCL II și B16F10 au fost evaluate *in vitro*, în corelație cu proprietățile structurale și fotofizice ale porfirinelor investigate, precum și cu predicțiile privind difuzia prin membranele celulare și proprietățile ADMET.

Testarea experimentală *in vitro* a celor cinci structuri porfirinice s-a realizat pe următoarele tipuri de celule specifice pentru piele:

- ✚ fibroblaste dermice umane din linia celulară HS27 (ATCC® CRL-1634™),
- ✚ keratinocite umane normale din linia celulară HaCaT (CLS Cell Lines Service GmbH)
- ✚ celule umane de carcinom cu celule scuamoase SCL II (CLS Cell Lines Service GmbH),
- ✚ celule tumorale de melanom de șoarece din linia B16F10 (ATCC® CRL-1634™).

Metodologia experimentală aplicată în studiile *in vitro* este descrisă detaliat în referința Burloiu și colab. 2024a.

Internalizarea celulară a porfirinelor investigate

Evaluarea potențialului de internalizare celulară a porfirinelor incluse în studiu, s-a realizat pe baza proprietăților fluorescente ale acestora și prin măsurarea semnalului fluorescent mediu al celulelor suspendate în PBS prin citometrie în flux. Celulele au fost incubate în mediu de cultură timp de 24 de ore cu soluții 10 μ M porfirină. Ținând cont de faptul că porfirinele investigate au valori ale intensităților de emisie diferite, fluorescența intracelulară măsurată a fost normalizată la intensitatea maximă

corespunzătoare fluorescenței fiecărei porfirine, pentru a avea date reale în raport cu absorbția celulară. Cu toate acestea, nu am luat în considerare potențiala scădere a semnalului fluorescent intracelular din cauza interacțiunii porfirinelor cu componentele intracelulare. Conform rezultatelor experimentale (Figura 4.6), compusul P2.2 a înregistrat cea mai bună absorbție celulară în toate liniile celulare investigate ($p < 0,05$), urmată de P3.2, P4.2 și P2.1. Cea mai scăzută rată de încorporare în celule a fost pentru compusul P3.1, rezultat în acord cu datele studiului *in silico* (subcapitolul 4.1.1 din teza), care au indicat pentru P3.1 și P3.2 energii de transfer ridicate și pozitive necesare internalizării celulare.

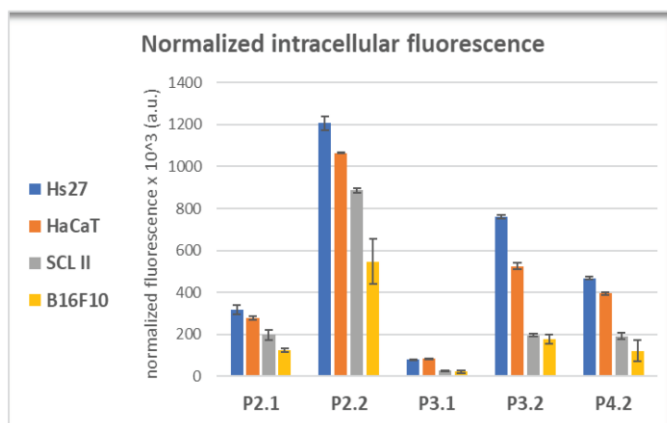


Figura 4.6. Fluorescența intracelulară a porfirinelor (timp de incubare 24h, $c=10\mu\text{M}$) în celule Hs27, HaCaT, SCL II și B16F10. Fluorescența intracelulară a fost evaluată ca medie geometrică a semnalului de fluorescență normalizat la emisia de fluorescență corespunzătoare a porfirinei în PEG 200/PBS (1/1000) ca solvent. Datele sunt prezentate ca valoare medie \pm SD pentru 2-3 experimente independente în care toate porfirinele au fost investigate simultan.

Rezultatele studiului *in vitro* au evidențiat pentru toate porfirinele investigate, o absorbție mai mare în fibroblastele și keratinocite normale, în timp ce pentru celulele tumorale SCL II și B16F10 au fost înregistrate absorbții mai mici; P2.2 are cel mai bun profil de încorporare atât în celule normale cât și în celule tumorale (Figura 4.6). Referitor la compusul P2.1, rezultatele studiului *in vitro* au confirmat o încorporare celulară mai mică comparativ P2.2, deși P2.1 a înregistrat cele mai bune proprietăți fluorescente (Figura 4.5) dintre toate structurile investigate. Pentru P2.1, potențialul mai mic de internalizare, poate fi explicat de proprietățile moleculelor de a se asocia cu formare de aggregate moleculare, așa cum au demonstrat experimentele AFM realizate în subcapitolul 4.2 (Figura 4.3 a).

În concluzie, rezultatele studiului *in vitro* indică faptul că, porfirina P2.2 asimetrică este cea mai potrivită pentru încorporarea în celule normale (HaCaT și Hs27) sau tumorale (SCL II și B16F10) specifice pentru piele, cu cele mai bune rezultate în celulele HaCaT și Hs27.

Efectele in vitro ale terapiei fotodinamice cu porfirinele investigate

Evaluarea celor cinci compuși porfirinici în raport cu potențialul terapeutic, respectiv capacitatea lor de a ucide celulele prin terapie fotodinamică, a fost realizată *in vitro* pe linii celulare relevante pentru pielea umană: fibroblaste Hs27, keratinocite HaCaT și celule de carcinom cu celule scuamoase SCL II. Pentru comparație au fost investigate și celule tumorale de melanom de șoarece din linia celulară B16F10. După incubarea 24 de ore a celulelor cu soluții ce conțin 10 μ M compus porfirinic, s-a realizat PDT cu lumină laser de 635 nm, doza de 10 J/cm² și iradianța de 50 mW/cm² (Dobre și colab., 2021). Ulterior PDT, celulele au fost cultivate încă 24 de ore sau 48 de ore pentru stabilirea impactului terapiei la nivelul reducerii MTS și eliberării LDH. Datele de reducere a MTS (Figura 4.7) au arătat că P2.2 și, într-o măsură ceva mai mică, compusul simetric P2.1 au indus o scădere drastică a numărului de celule metabolice active la 24 de ore, efectul fiind persistent și la 48 de ore după PDT.

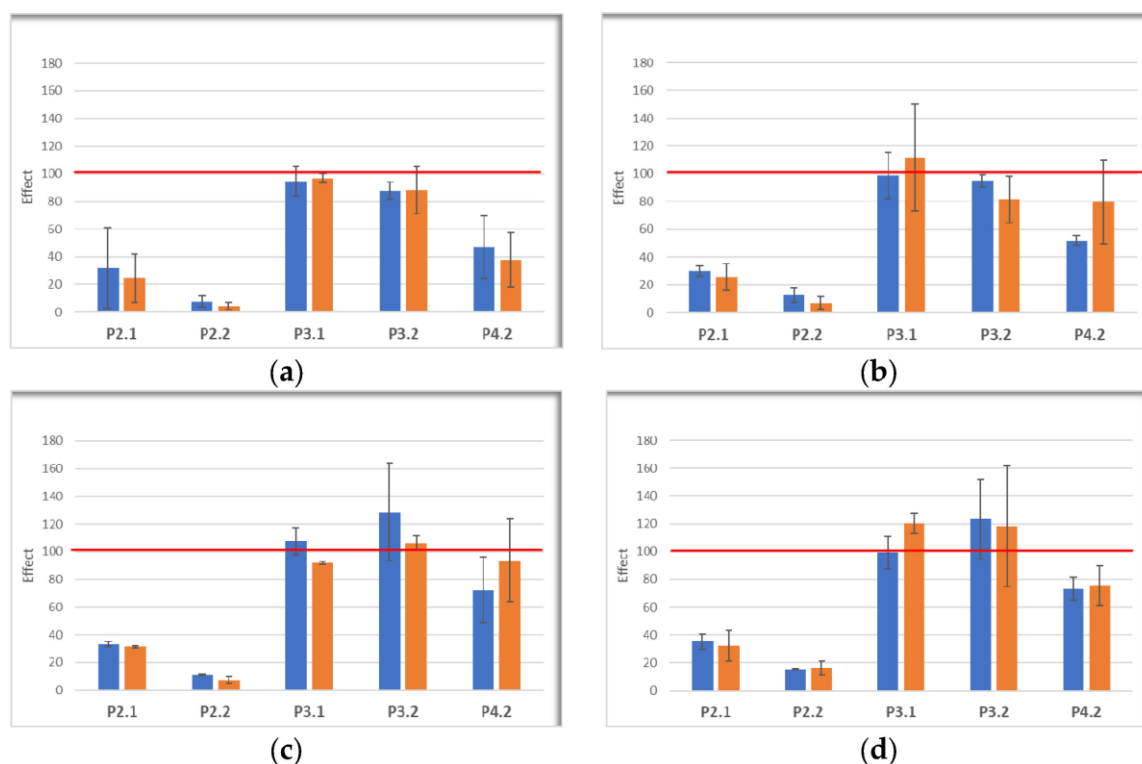


Figura 4.7. Reducerea MTS de către celulele Hs27 (a), HaCaT (b), SCL II (c) și B16F10 (d) incubate cu soluții ale compușilor porfirinici (10 μ M) și apoi expuse la PDT (10 J/cm², 50 mW/cm²). Măsurătorile au fost efectuate la 24 de ore (albastru) și 48 de ore (portocaliu) după PDT. Efectul PDT asupra reducerii MTS a fost calculat ca: (răspuns celular în prezența PDT)/(răspuns celular în absența PDT)×100. Linia roșie desemnează efectul de 100% (fără efect).

Efectul exercitat de P4.2 este dependent de tipul celular. Astfel, porfirina asimetrică P4.2 a scăzut intensitatea reducerii MTS în fibroblastele Hs27 expuse la PDT, la niveluri similare cu cele provocate de PDT cu compusul simetric P2.1. În cazul PDT cu P4.2,

rezultatele evidențiază o scădere mică a numărului de celule metabolic active de tip HaCaT, SCL II și B16F10 în comparație cu P2.1, în special la 24 de ore. De asemenea, în cazul PDT cu porfirinele P3.1 și P3.2, nu au fost evidențiate efecte semnificative în raport cu reducerea MTS pentru liniile celulare investigate, deși P3.2 a fost bine încorporat de celulele testate, în special de fibroblaste și keratinocite.

Pentru investigarea morții celulare prin necroză după PDT, eliberarea LDH a fost măsurată în aceleași probe celulare în care a fost evaluată reducerea MTS. Eliberarea LDH (efect > 500%) a fost înregistrată în primele 24 de ore după PDT în fibroblastele Hs27 și keratinocitele HaCaT expuse la PDT cu compușii P2.1, P2.2 și P4.2 (Figura 4.8a,b), indicând faptul că scăderea celulelor active metabolic după PDT s-a datorat parțial morții rapide a celulelor prin necroză. Răspunsul de eliberare a LDH a fost mai mic în cazul celulelor tumorale (Figura 4.8 c, d), pentru care efectul PDT asupra reducerii MTS a fost, de asemenea, scăzut (Figura 4.7). În timp ce o eliberare crescută de LDH a fost limitată la primele 24 de ore după PDT în cazul P2.1 și P2.2, moartea celulară prin necroză a continuat să apară și la 48 de ore în cazul PDT cu P4.2.

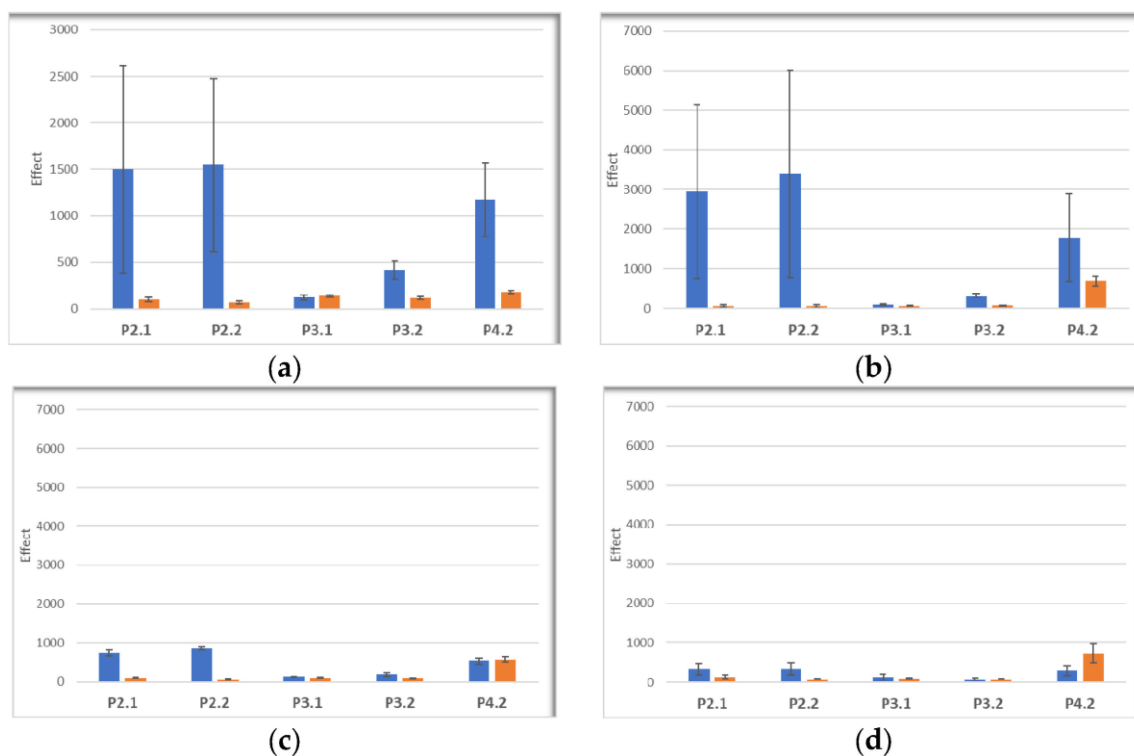


Figura 4.8. Eliberarea LDH de către celulele Hs27 (a), HaCaT (b), SCL II (c) și B16F10 (d) incubate cu soluții ale compușilor porfirinici (10 μ M) și expuse la PDT (10J/cm², 50mW/cm²). Măsurătorile au fost efectuate la 24 de ore (albastru) și 48 de ore (portocaliu) după PDT, în aceleași probe celulare în care a fost evaluată reducerea MTS. Efectul PDT asupra eliberării LDH a fost calculat ca: (răspuns celular în prezența PDT)/(răspuns celular în absența PDT)×100.

În cazul PDT cu porfirinele P3.1 și P3.2 nu au fost înregistrate modificări semnificative în eliberarea LDH și reducerea MTS (Figura 4.7). Rezultatele experimentelor *in vitro* recomandă compusul porfirinic P2.2 ca un candidat valoros pentru PDT în afecțiunile maligne ale pielii, cu amendamentul că pielea normală din jurul tumorii ar trebui protejată de PDT.

Studiul *in vitro* efectuat pe celule non-maligne și maligne relevante pentru piele a evidențiat porfiringa asimetrică P2.2 ca fiind un candidat fotosensibilizator promițător pentru PDT în afecțiunile cutanate.

Studiul a demonstrat că P2.2 se acumulează bine în interiorul celulelor, deși a avut un anumit grad de agregare în PEG 200 și a indus de PDT o scădere masivă a numărului de celule cutanate active metabolic, parțial din cauza morții celulare prin necroză în primele 24h post-PDT. P2.2 a avut în acest sens un comportament mai bun decât compusul simetric P.2.1 care, deși prezintă cele mai bune proprietăți fluorescente, a avut un grad mai mare de agregare. P2.2 a fost, de asemenea, superior compusului asimetric P4.2. Compușii P3.1 și P3.2 au avut o valoare mare estimată a clearance-ului total și nu s-au putut acumula bine în celulele pielii, deși au prezentat un grad mai scăzut de agregabilitate decât P2.2.

Capitolul 5. Studii de formulare a fotosensibilizatorilor selectați pentru aplicații în dermato-oncologie

Studiile de formulare a fotosensibilizatorilor selectați pentru aplicații în dermato-oncologie, au urmărit încorporarea în hidrogeluri de hidroxipropilceluloza (HPC), hidroxipropilmetilceluloza (HPMC) și Carbopol 940 a porfirinelor P2.1 și P2.2.

Evaluarea spectrală și structurală a acestora a fost realizată prin analiza UV-Vis și de fluorescență, FT-IR, difracție de raze X, analiză termo-gravimetrică, microscopie de forță atomică. În plus, au fost efectuate evaluări farmacotehnice pentru a confirma potențiala lor aplicabilitate în afecțiuni cutanate.

Într-o primă etapă s-au obținut hidrogeluri HPC 10%, HPMC 10% și Carbopol 1% prin dispersarea polimerului în apă și amestecarea acestuia la 800 rpm sau 900 rpm la temperatura camerei. Pentru dezaerare, hidrogelurile au fost păstrate peste noapte la frigider la 5°C. În cazul gelului cu Carbopol, după 24 h s-a adăugat trietanolamina, treptat și sub agitare continuă până la obținerea unui gel translucid. Gelurile obținute au servit drept referințe în analizele ulterioare și, de asemenea, ca bază pentru gelurile de porfirine. Gelurile cu porfirine s-au preparat prin adăugarea soluției cu porfirină 1mM în PEG 200 la baza de gel 10% și agitare (750 rpm), la întuneric și la temperatura camerei. Proprietățile gelurilor obținute au fost evaluate în comparație cu gelurile simple 10%.

Evaluarea farmacotehnică a arătat că hidrogelurile au proprietăți mecanice adecvate pentru aplicare pe piele și cu valori de pH în intervalul optim pentru aplicații topice,

minimizând riscul de iritare. În plus, s-au observat capacități bune de absorbție a apei, benefice pentru menținerea unui mediu umed al plăgii. S-a remarcat, de asemenea, o capacitate excelentă de întindere, asigurând o aplicare ușoară și o acoperire uniformă pe suprafața pielii.

Evaluarea fizico-chimică a hidrogelurilor cu porfirine

Rezultatele analizei spectrale UV-Vis și de fluorescență, evidențiază menținerea profilului spectral al celor două porfirine după încorporarea în gelurile polimerice, cu maxime de absorbție și emisie în domeniul spectral relevant pentru aplicații în PDT (Simpson & Novikova 2022). Valori pentru maxime de absorbție și fluorescență ale gelurilor cu porfirine sunt prezentate în tabelul 5.1. În figura 5.1, sunt prezentate pentru exemplificare, spectrele de absorbție și emisie ale P2.1 și P2.2 în matricea polimerică HPMC.

Tabelul 5.3. Caracteristici spectrale ale gelurilor cu porfirine

Gel	Absorbție λ_{\max} (nm)					Emisie λ_{\max} (nm)
	Banda Soret	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)	
HPC-P2.1	427	517	551	589	647	653
HPMC-P2.1	426	518	552	591	658	654
Carbopol-P2.1	427	516	550	595	645	652
HPC-P2.2	426	517	556	597	649	654
HPMC-P2.2	428	521	556	594	652	656
Carbopol-P2.2	424	519	555	590	650	654

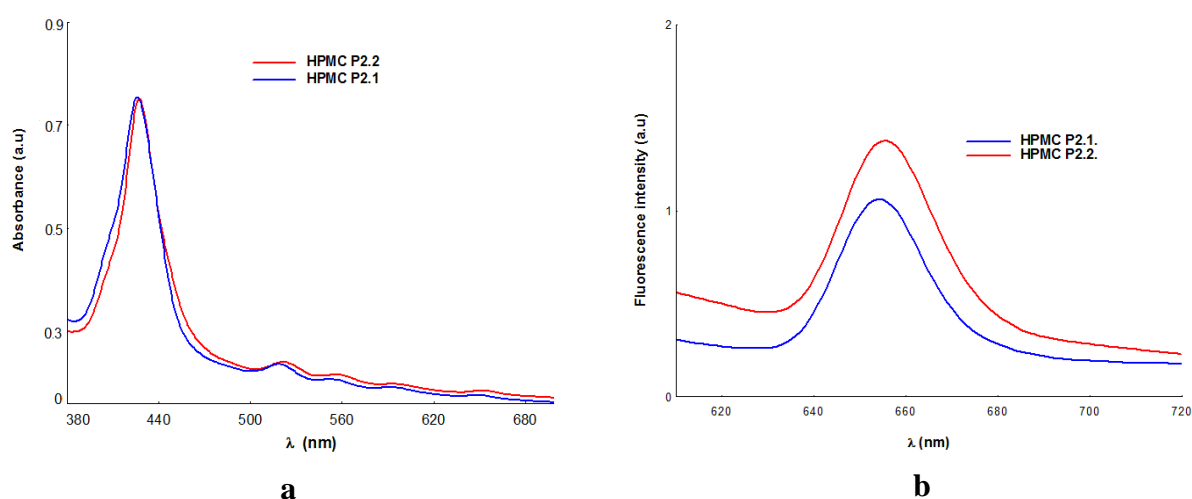


Figura 5.1. Spectre de absorbție (a) și fluorescență (b) ale gelurilor cu porfirine în matrice polimerică de tip HPMC

Spectrele FT-IR au confirmat încorporarea porfirinelor în matricea polimerică, prin existența unor benzi de absorbție caracteristice care indică interacțiunile porfirina-polimer. În Figura 5.2. sunt prezentate pentru exemplificare spectrele FT-IR ale gelurilor din seria HPC. Se observă mici deplasări ale benzii asociate grupărilor -OH din structura polimerului (de la 3400 cm^{-1} la $3401,82\text{ cm}^{-1}$ pentru HPC P2.1. și $3393,14\text{ cm}^{-1}$ pentru HPC P2.2.), ca efect al interacțiunii porfirina-polimer. Benzile asociate frecvențelor de vibrație ale CH₂ și CH sunt, de asemenea ușor deplasate datorită interacțiunii polimerului cu grupările metoxi și acetoxi din structura porfirinelor.

Analiză comparativă între HPC P2.2. și HPC P2.1. indică moduri distincte de interacțiune. Prezența grupeii -OH în structura P2.2, imprimă moleculei un potențial de interacție cu matricea polimeră superior compusului P2.1, cu efecte asupra proprietăților spectrale ale gelului. Astfel, în cazul HPC-P2.2 semnalul FT-IR asociat grupeii -OH se deplasează spre frecvențe mai mici (la $3393,14\text{ cm}^{-1}$) comparativ cu HPC-P2.1 ($3401,82\text{ cm}^{-1}$). Modificări spectrale similare s-au înregistrat și în cazul gelurilor cu HPMC și al celor cu Carbopol.

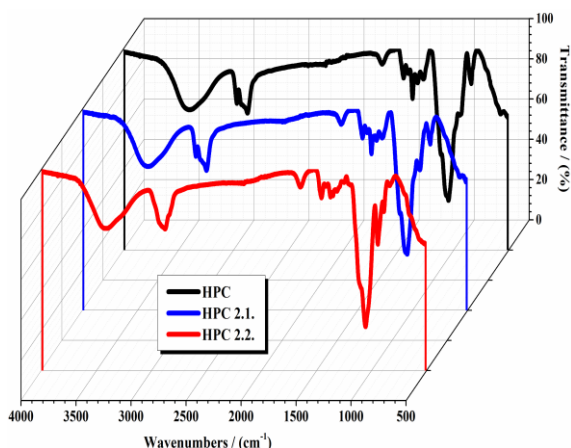


Figura 5.2. Spectre FT-IR ale gelurilor din seria HPC

Evaluarea profilului morfologic și textural al gelurilor cu porfirine a fost realizată prin microscopie de forță atomică. Măsurătorile AFM s-au efectuat în modul de lucru non-contact cu un aparat XE-100 de la Park Systems (Suwon, Republica Coreea), echipat cu scanere XY (probă)/Z (sondă) decuplate. Imaginile AFM sunt prezentate în așa-numitul mod „contrast îmbunătățit”. Imaginile au fost prelucrate cu Programul XEI – v.1.8.0 (dezvoltat de Park Systems, Suwon, Republic of Korea). Au fost evaluați parametri: Rq (rugozitatea pătrată medie, ca abatere standard a valorii înălțimii în imagine), Rpv (diferența de înălțime dintre punctele cel mai jos și cel mai înalt din zona scanată), Spk (înălțimea materialului în zona de vârf), Sk (adâncimea rugozității miezului, adâncimea relativă a zonei de mijloc a suprafeței) și Svk (adâncimea redusă a văii). Au fost evaluate izotropia texturală a probelor precum și auto-similaritatea suprafețelor gelurilor cu/fără porfirine. Analiza AFM a fost efectuată pe cele 3 serii de geluri cu

porfirine. În continuare, vom descrie pentru exemplificare, rezultate ale evaluării AFM a hidrogelurilor pe bază de hidroxipropilceluloză (HPC 10%, HPC-P2.1, HPC-P2.2).

Figura 5.3 (a-c) prezintă imaginile topografice 2D ale probelor HPC 10% (Figura 5.3a), HPC-P2.1 (Figura 5.3b) și HPC-P2.2 (Figura 5.3c), scanate pe o suprafață de $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$. Gelul HPC 10% este caracterizat printr-o valoare a rugozității pătratice medii (RMS), R_q , de 11,9 nm și o diferență de înălțime de 93,7 nm. Încorporarea porfirinei P2.1 în gelul polimeric cu 10% HPC scade ondulara suprafeței, așa cum se poate observa din imaginea AFM (Figura 5.3b) și din profilul liniei de scanare. Suprafața totală scanată are o rugozitate RMS de $\sim 4,6$ nm și un parametru de vârf la vale de 34,3 nm. Prin încorporarea porfirinei P2.2 în gelul polimeric (Figura 5.3c) se observă o scădere suplimentară a parametrilor de corugație. Pentru gelul HPC-P2.2 (Figura 5.3c) s-a înregistrat o valoare $R_q \sim 1,3$ nm și pentru parametrul $R_{pv} \sim 12$ nm, pentru aria de $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$.

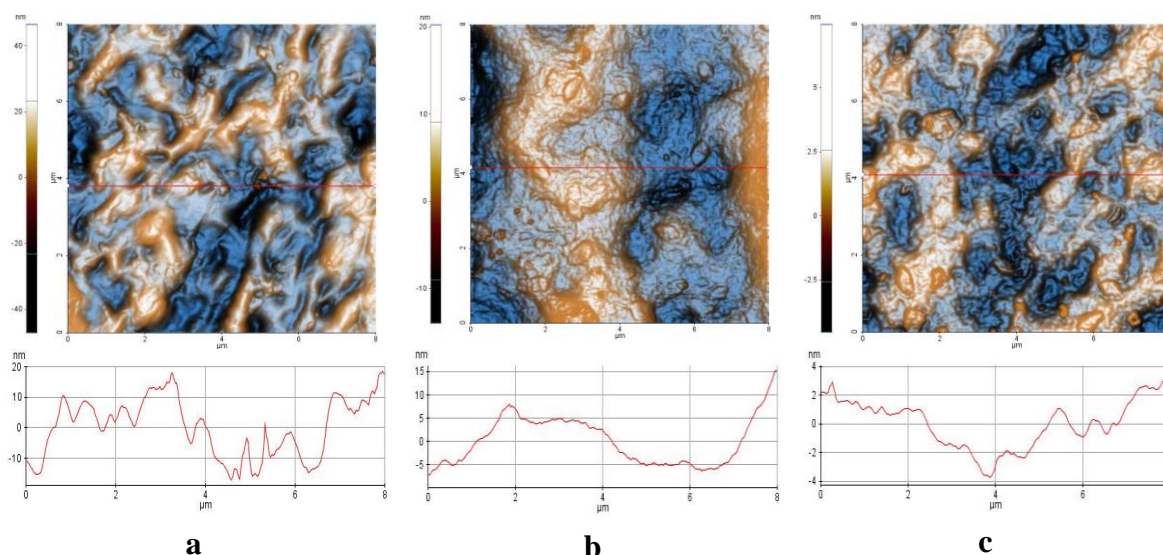


Figura 5.3. Imagini topografice AFM bidimensionale (2D) cu contrast îmbunătățit ale probelor HPC 10% (a), HPC-P2.1 (b) and HPC-P2.2 (c) scanate pe o zonă de $8\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$, împreună cu profilele caracteristice suprafețelor .

Figura 5.4 prezintă evaluarea profilului de rugozitate cu valorile parametrilor de amplitudine (RMS (R_q) și R_{pv}) și ale parametrilor funcționali (S_{pk} , S_k și S_{vk}). Pentru gelurile analizate, se poate observa o scădere a valorilor parametrilor de rugozitate în ordinea: HPC > HPC-P2.1 > HPC-P2.2.

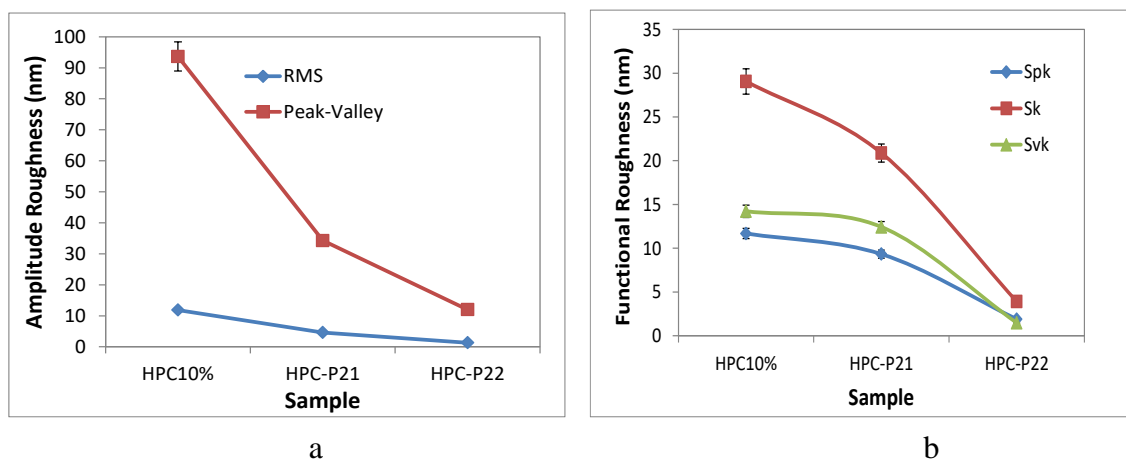


Figura 5.4. Evaluarea rugozității gelurilor HPC10%, HPC-P2.1 și HPC-P2.2 pe baza valorilor parametrilor de amplitudine Rq și Rpv (a) și ale parametrilor funcționali Spk, Sk și Svk (b).

În cazul probelor investigate, o valoare mare a parametrului Sk se corelează cu o modificare geometrică a suprafeței, respectiv valori mai mari ale rugozității Rq (RMS). Valorile Spk sunt asociate suprafețelor din zona superioară a materialului, iar Svk este o măsură a adâncimii văii sub rugozitatea miezului și poate fi legată de o posibilă retenție de lichid (sau a resturilor de gel). Cele mai mici valori din serie (proba HPC-P2.2) pot exprima proprietăți mecanice promițătoare (stabilitate și elasticitate) pentru aplicații farmacoterapeutice ale gelurilor pe baza de HPC. Determinări similare au fost efectuate și pe gelurile HPMC și cele cu Carbopol, iar rezultatele obținute confirmă faptul că textura suprafeței este izotropă și auto-similară pentru hidrogelurile cu porfirine.

Analizele termogravimetrice ale gelurilor cu porfirine au fost efectuate cu termogravimetru Mettler Toledo TGA/SDTA851 (Mettler-Toledo, Greifensee, Elveția), flux de aer 80 mL/min și viteză de încălzire de 10°C/min.

Analiza termogravimetrică oferă informații importante privind stabilitatea și comportamentul la descompunere a acestor tipuri de materiale. Compararea profilurilor termice ale bazei de gel 10% cu cele ale gelurilor cu porfirine, evidențiază influența structurii porfirinice asupra proprietăților termice ale gelului polimeric.

Datele experimentale de analiză termică sunt sumarizate în tabelul 5.4 iar în figura 5.5 sunt date ca exemplu curbele de analiză termică (TG, DTG și DTA) ale gelurilor pe bază de HPC 10%.

Tabelul 5.4. Date experimentale obținute din curbele de analiză termică

Gel	Etapa 1 Temperatura/pierdere de masa	Etapa 2 Temperatura	Masa ramasa la 600°C
HPC	< 100°C/2.4%	T _{DTA} = 365°C; T _{DTG} = 355°C T _{DTA} = 495°C; T _{DTG} = 501°C	Fara reziduuri
HPC-P2.1.	< 100°C/1.8%	T _{DTA} = 367°C; T _{DTG} = 357°C T _{DTA} = 491°C; T _{DTG} = 487°C	Fara reziduuri
HPC-P2.2.	< 100°C/2.2%	T _{DTA} = 367°C; T _{DTG} = 361°C T _{DTA} = 492°C; T _{DTG} = 489°C	Fara reziduuri
HPMC	< 100°C/2.7%	T _{DTA} = 335°C; T _{DTG} = 330°C T _{DTA} = 461°C; T _{DTG} = 458°C	0.38%
HPMC-P2.1.	< 100°C/2.2%	T _{DTA} =342.16°C; T _{DTG} =345°C T _{DTA} =453.8°C; T _{DTG} = 453.5°C	Fara reziduuri
HPMC-P2.2.	< 100°C/2%	T _{DTA} =342.6°C; T _{DTG} = 346.5°C T _{DTA} = 447°C; T _{DTG} = 443°C	Fara reziduuri
Carbopol	< 150°C/11.6%	T _{DTA} =206.3°C; T _{DTG} = 205.3°C T _{DTA} = 375°C; T _{DTG} = 374.6°C T _{DTA} = 528.1°C;	3%
Carbopol-P2.1	< 150°C/8.6%	T _{DTA} = 228°C; T _{DTG} = 253°C T _{DTG} = 447°C; T _{DTG} = 443°C	3.26%
Carbopol-P2.2	< 150°C/10%	T _{DTA} = 240°C; T _{DTG} = 233.1°C T _{DTG} = 508°C; T _{DTA} = 509.6°C	2.9%

Curbele TG pentru gelurile baza 10% prezintă două etape principale de pierdere în greutate: (i) în prima etapă (sub 100°C pentru HPC și HPMC și sub 150°C pentru Carbopol) pierderea inițială în greutate este atribuită evaporării umidității absorbite (2,4%-11,6%), indicând pierderea de apă legată fizic de polimer; (ii) a doua etapă corespunde degradării termice a polimerului.

Descompunerea implică ruperea legăturilor chimice și volatilizarea ulterioară a produselor cu greutate moleculară mică. Curbele de analiză termică ale gelurilor cu porfirine afișează un profil termic diferit față de baza de gel 10%. Pentru toate probele investigate, prima etapă corespunde pierderii de umiditate.

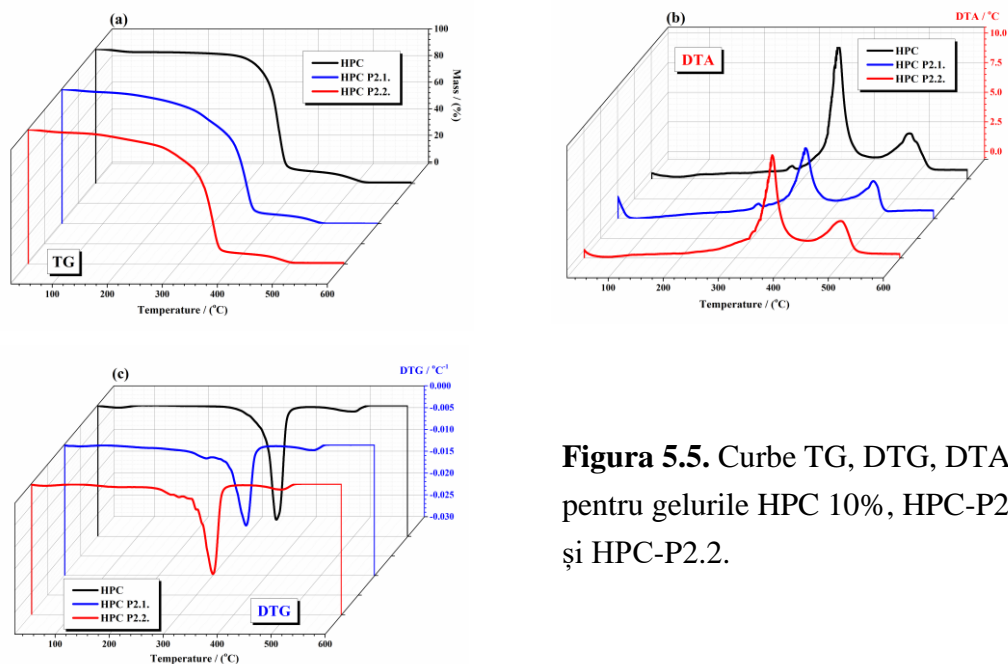


Figura 5.5. Curbe TG, DTG, DTA pentru gelurile HPC 10%, HPC-P2.1 și HPC-P2.2.

Interacțiunea gelului bază cu moleculele P2.1 și P2.2 are influență asupra capacității de reținere a umidității de către formula gel. Pierderile în greutate ale probelor cu porfirine au fost cuprinse între 1,8% și 2,2% pentru geluri cu porfirine și derivați de celuloză. Gelurile cu carbopol au înregistrat pierderi de 8,6%-11,6%. Analiza termică a demonstrat stabilitatea termică a hidrogelurilor în intervalul de temperatură relevant pentru aplicațiile farmaceutice. Comparativ cu baza de gel, stabilitatea termică a gelurilor cu porfirine, este superioară.

Morfologia de suprafață a gelurilor cu porfirine a fost evaluată prin tehnica de difracție cu raze X (XRD), utilizând difractometru Rigaku Ultima IV (Rigaku Co., Tokyo, Japonia) și radiație $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Difractogramele XRD au fost analizate în intervalul unghiular 2θ de la 5° la 60° , la o viteză de scanare de $2^\circ/\text{min}$ și o dimensiune a pasului de $0,02^\circ$. Un exemplu de difractogramă de raze X pentru gelurile seriei HPC este prezentat în Figura 5.6.

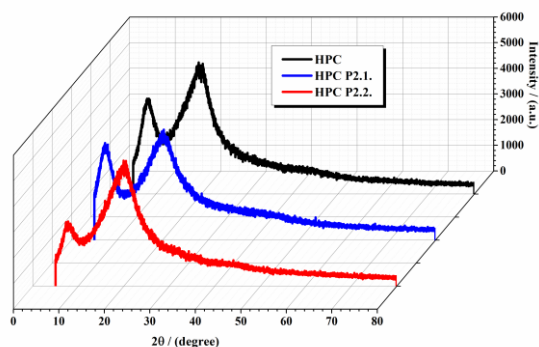


Figura 5.6. Difractograme XRD ale gelurilor HPC, HPC P2.1 și HPC P2.2.

Analiza XRD a arătat că porfirinele au fost integrate eficient în matricea polimerică, contribuind la stabilitatea și proprietățile funcționale ale acestora. Cristalinitatea indusă, proprietățile morfologice și termice ale gelurilor cu porfirine sugerează potențialul bun de eliberare controlată a fotosensibilizatorului în PDT topic.

O ultimă etapă în realizarea părții experimentale a tezei de doctorat a inclus un studiu de cedare *in vitro* a compusului 5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-acetoxi-3-metoxifenil) porfirina din matricea polimerica HPMC.

Studiul a fost efectuat folosind un sistem Hanson Microette (Hanson Research, Chatsworth, SUA) echipat cu celule de difuzie verticală în conformitate cu specificațiile Farmacopeei Statelor Unite (USP 2024). Mediul receptor a constat din 20% (v/v) etanol absolut în tampon fosfat 0,05 M (pH = 6,0), la $32 \pm 0,5$ °C. Membranele de difuzie utilizate sunt discuri de membrane filtrante Supor® din polietersulfonă (PES) (25 mm diametru, 0,45 μm dimensiunea porilor, 145 μm grosime; Pall Life Sciences, Portsmouth, Marea Britanie). Formula gel a fost aplicată uniform pe suprafața membranei hidratate din compartimentul donor. Mediul receptor a fost agitat continuu la 600 rpm. La intervale de timp prestabilite (30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 și 480 de minute), probe de 1 mL au fost extrase manual din compartimentul receptor în tuburi Eppendorf din polipropilenă. Formula gel cu porfirina a fost testată în sextuplicat (n = 6) iar rezultatele au fost exprimate ca valori medii ± abatere standard (SD). Concentrația porfirinei din probele colectate a fost determinată folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță. Pentru analiza cantitativă a compusului porfirinic din hidrogel a fost folosit un sistem HPLC Jasco LC-4000 Series (JASCO Corporation, Tokyo, Japonia). Faza mobilă a constat din apă (faza mobilă A) și un amestec 1:1 (v/v) de acetonitril și metanol (faza mobilă B). S-a efectuat o eluare izocratică cu o compoziție în fază mobilă de 20% A și 80% B, furnizată la un debit constant de 0,7 mL/min. Detectarea porfirinelor a fost efectuată la $\lambda=419$ nm, iar volumul de injecție a fost de 5 μL. Pentru a asigura liniaritatea, acuratețea, precizia, specificitatea și sensibilitatea metodei, validarea a fost făcută în acord cu ghidurile ICH Q2(R2), (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf . accessed on 12 June 2024).

La dozarea prin HPLC s-a observat un răspuns liniar ($R^2 = 0,9995$) în intervalul de concentrație 0,078–10 μg/mL a porfirinelor și curba de calibrare definită de ecuația: $y=36662x- 4078$. Evaluarea specificității testului, realizată prin determinarea potențialelor interferențe din matricea formulată a confirmat capacitatea metodei de a cuantifica cu acuratețe porfirinele în prezența excipienților. Limita de cuantificare, determinată folosind un raport semnal-zgomot de 10:1, a fost stabilită la 0,032 μg/mL.

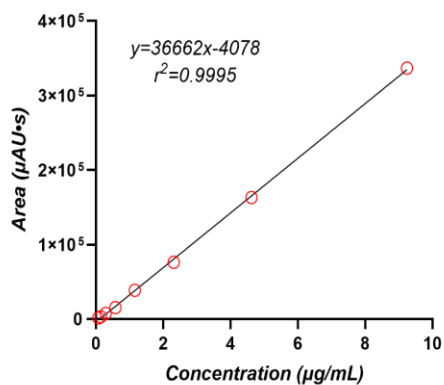


Figura 5.7. Curba de calibrare a P2.2. în intervalul de concentrație 0,078–10µg/mL

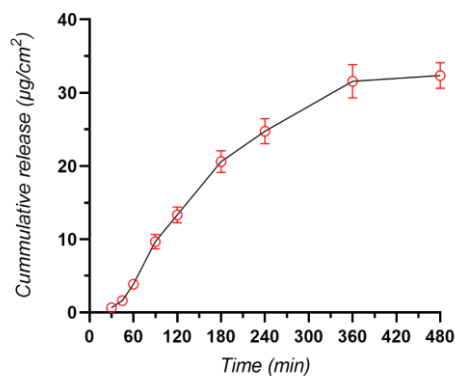


Figura 5.8. Cantitatea cumulativă de P2.2. difuzată prin membrana PES în funcție de timp (min)

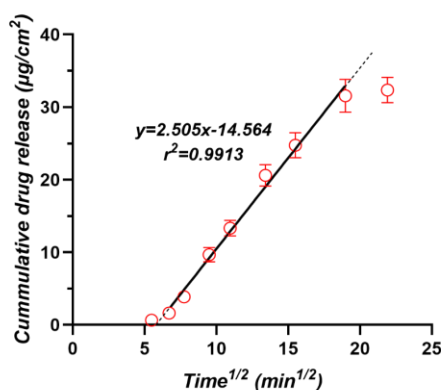


Figura 5.9. Cantitatea cumulativă de P2.2. difuzată prin membrana PES tratată în funcție de rădăcina pătrată a timpului ($\text{min}^{1/2}$)

Cedarea cumulativă de porfirină per unitate de suprafață în timp este ilustrată în Figura 5.8. Datele reprezintă media \pm SD pentru șase determinări. Sistemul a atins echilibrul după 360 de minute, indicat de platoul din profilul de eliberare. Rata de cedare a P2.2. a fost determinată folosind modelul Higuchi, urmând abordarea recomandată de ghidul SUPAC-SS (<https://www.fda.gov/media/71141>/accessed on 12 June 2024). Rata de cedare a fost identificată ca panta porțiunii liniare a cantității cumulate eliberate reprezentată grafic în raport cu rădăcina pătrată a timpului, corespunzătoare realizării transferului în stare de echilibru prin membrana artificială (Figura 5.9). Această cedare la starea de echilibru a fost observată între 30 și 360 de minute. Rata de cedare calculată a fost de $2,505 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{1/2}$, indicând un profil de eliberare susținută în intervalul de timp studiat. În plus, a fost observat un timp de întârziere inițial de aproximativ 35 de minute înainte de stabilirea difuziei în stare de echilibru. În această fază, moleculele de porfirină trebuie să depășească mai multe bariere, inclusiv difuzia prin matricea de gel și penetrarea inițială a membranei. Prezența acestui timp de întârziere sugerează că porfirina necesită ceva timp pentru a satura membrana și a alcătui un gradient de concentrație suficient pentru a conduce difuzia la starea de echilibru.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat “*Studii interdisciplinare asupra unor compuși tetrapirolici cu potențială aplicabilitate în dermatologia oncologică*”, include în prima parte o prezentare generală asupra patogenezei și terapiei afecțiunilor cutanate premaligne și maligne, completată de date generale referitoare la Terapia fotodinamică (PDT) ca abordare terapeutică modernă în dermatologia oncologică. Sunt prezentate pe scurt principiile fundamentale ale PDT și câteva exemple de fotosensibilizatori utilizați în prezent în tratamentul afecțiunilor dermatologice de tip malign.

Partea a doua a tezei de doctorat este structurată în trei capitole care includ rezultatele experimentale obținute în realizarea obiectivelor propuse.

Într-o prima etapă, am urmărit obținerea, caracterizarea structurală, spectrală și evaluarea *in vitro* a unui nou compus cu potențial de aplicabilitate în dermatologia oncologică. Experimentele de sinteză și evaluare spectrală au fost precedate de un studiu complex *in silico* privind potențialul de internalizare și profilul antitumoral, farmacocinetic și toxicologic al structurii porfirinice selectate.

Rezultatele studiului *in silico* au prezis, pentru structura aleasă, permeabilitate membranară bună cu potențial de localizare la nivel mitocondrial și absorbție bună la nivel cutanat. Simulările de andocare și de dinamică moleculară de 250 ns au confirmat pentru structura aleasă capacitatea de a forma un complex stabil cu situsul catalitic al anhidrazei carbonice IX, țintă implicată în progresia cancerului.

În capitolul 3 al lucrării este descris procedeul tehnic ales pentru obținerea noului compus, 5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-10,15,20-*tris*-(4-carboximetilfenil) porfirina (P5.2), cu precizarea parametrilor asociați reacției de sinteză, condițiilor de purificare și rezultatelor evaluării structurale și spectrale a acestuia.

Capitolul 3 include și rezultatele evaluării biocompatibilității, a capacității de internalizare celulară și a potențialului de marcator celular fluorescent al compusului P5.2. Experimentele *in vitro* au fost completate de studiul efectelor la nivel celular al terapiei fotodinamice (PDT) realizată cu derivatul porfirinic.

Evaluarea *in vitro* a compusului P5.2 în raport cu liniile celulare HaCaT, HS27 și B16F10, a evidențiat o bună internalizare celulară și o bună biocompatibilitate pentru compusul testat. Prin profilul fluorescent bun și capacitatea de încorporare celulară, porfirina P5.2 are potențial de marcator fluorescent în afecțiuni cutanate premaligne și maligne. În plus, compusul P5.2 inhibă multiplicarea keratinocitelor, aspect cu relevanță terapeutică în cazul keratozei actinice caracterizată prin hiperproliferarea acestor celule.

În capitolul 4 al tezei de doctorat sunt prezentate rezultatele studiului complex de selecție al unor structuri porfirinice cu potențial fotosensibilizator în PDT pentru afecțiuni cutanate premaligne și maligne.

O evaluare strictă pe criterii structurale, spectrale și farmaco-toxicologice a permis selecția a două structuri cu profil optim pentru continuarea studiilor de formulare.

Abordarea *in silico* privind abilitatea de a traversa membrana celulară a evidențiat potențial apreciabil de internalizare pentru 3 dintre structurile investigate (P2.2, P4.2 și P2.1). Modelele predictive referitoare la profilul ADMET asociat structurilor porfirinice au indicat pentru toți compușii toxicitate relativ scăzută, fiind negativi din punct de vedere al sensibilității cutanate.

Evaluarea prin microscopie de forță atomică a compusilor dizolvați în PEG 200 la concentrații 10 μM, a permis obținerea de date referitoare la statusul de agregare a compușilor incluși în studiu. Cea mai mare tendință de asociere moleculară (agregare) a fost evidențiată pentru compusul P2.1.

Justificat de relevanța profilului spectral al unui fotosensibilizator în ce privește eficiența în PDT, studiul de selecție a inclus și evaluarea comportamentului spectral UV-Vis și fluorescent în soluții 10 μM și solvent PEG 200 sau PEG 200/PBS (1/1000). Toți compușii investigați au confirmat absorbții în domeniul fototerapeutic, 620–630 nm, interval spectral relevant pentru terapia fotodinamică.

Selecția finală a fotosensibilizatorilor porfirinici s-a realizat prin corelarea rezultatelor obținute la evaluarea *in silico*, spectrală și morfologică cu cele privind potențialul de localizare la nivel celular și efectul terapiei fotodinamice asupra celulelor normale și tumorale specifice pielii.

Din seria celor cinci compuși, candidatul cu profil de fotosensibilizator eficient pentru PDT în afecțiuni cutanate premaligne și maligne, a fost P2.2. Experimental, porfirina P2.2 a demonstrat potențial bun de internalizare celulară și eficiență terapeutică apreciabilă prin scăderea drastică a numărului de celule metabolice active la 24 de ore, efectul fiind persistent și la 48 de ore după PDT. Efectul PDT cu P2.2 a fost superior terapiei cu P2.1, compusul simetric care, deși prezintă cele mai bune proprietăți fluorescente, manifestă tendințe de agregare moleculară la concentrațiile investigate cu efect în scăderea eficienței terapeutice. P2.2 a fost, de asemenea, superior compusului asimetric înrudit P4.2.

Compușii P3.1 și P3.2 nu s-au putut acumula bine în celulele testate, deși au prezentat un grad mai scăzut de agregabilitate decât P2.2, și nu au provocat PDT semnificativ *in vitro*. Studiul complex a permis selecția compusului P2.2 pentru dezvoltarea de forme farmaceutice semisolide, eficiente pentru PDT în afecțiunile cutanate premaligne și maligne. Justificat de profilul spectral bun și potențialul terapeutic apreciabil al P2.1, în studiile de formulare a fotosensibilizatorilor pentru aplicații în dermato-oncologie, am inclus cele două porfirine P2.1 și P2.2. Tinanad cont de faptul că polimerii naturali oferă avantajul unei biodisponibilități optime, sunt biocompatibili, biodegradabili și pot asigura o rată bună de transport a porfirinelor către celula tumorală,

în studiul de formulare al P2.1 și P2.2 am utilizat ca baza de gel hidroxipropilceluloza, hidroxipropilmetilceluloza și Carbopol 940.

Evaluarea spectrală UV-Vis și de fluorescență a gelurilor cu porfirine a confirmat prezența fotosensibilizatorului în matricea polimerică și menținerea caracteristicilor spectrale ale acestuia în domeniul de interes al aplicabilității în PDT. În plus, analiza FTIR a relevat interacțiuni porfirina-polimer de tip legături de hidrogen, sugerând potențialul bun al polimerilor aleși ca matrici de înglobare pentru porfirine. Morfologic și textural formulele preparate au fost evaluate prin AFM, prezentând un profil de suprafață izotrop și auto-similar. Analiza termică a demonstrat stabilitatea hidrogelurilor în intervalul de temperatură relevant pentru aplicațiile farmaceutice iar analiza XRD a confirmat integrarea eficientă a porfirinelor în gelurile polimerice, cu contribuții relevante la stabilitatea și proprietățile funcționale ale acestora. Cristalinitatea indusă, proprietățile morfologice și termice ale gelurilor cu porfirine sugerează un potențial bun de eliberare a fotosensibilizatorului la utilizare în PDT topic.

Studiu preliminar de cedare *in vitro* efectuat cu celule de difuzie verticală, membrane artificiale, mediu receptor - etanol absolut în tampon fosfat 0,05 M (20% (v/v) și pH=6, a evidențiat un profil de eliberare susținută în intervalul de timp studiat. În condițiile experimentale abordate, sistemul a atins echilibrul după 6 ore iar rata de cedare calculată a fost de $2,505 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{1/2}$.

Rezultatele experimentale obținute prin evaluarea complexă a gelurilor cu porfirine sunt favorabile testării privind biocompatibilitatea și potențialul PDT în raport cu linii celulare relevante pentru dermatologia oncologică.

Bibliografie selectiva

1. Banerjee, P.; Eckert, A. O.; Schrey, A. K.; Preissner, R. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, **2018**, 46(W1), W257–W263.
2. Boscencu, R.; Manda, G.; Radulea, N.; Socoteanu, R.P.; Ceafalan, L.C.; Neagoe, I.V.; Ferreira Machado, I.; Basaga, S.H.; Vieira Ferreira, L.F. Studies on the synthesis, photophysical and biological evaluation of some unsymmetrical meso-tetrasubstituted phenyl porphyrins. *Molecules* **2017**, 22, 1815.
3. Boscencu, R.; Manda, G.; Socoteanu, R. P.; Hinescu, M. E.; Neagoe, I. V.; Olariu, L.; Dumitriu, B. Porphyrin Derivative for Theranostic Use. Patent No. 132752 B1: published in RO-BOPI, 11 from 29 November **2023 b**.
4. Boscencu, R.; Manda, G.; Olariu, L.; Neagoe, I. V.; Socoteanu, R. P.; Hinescu, M. E.; Vieira Ferreira, L. F.; Cuadrado, A.; Basaga, H. Tetrapyrrolic derivative for antitumor photodynamic therapy and obtaining process. Patent application 201900799, published in RO-BOPI, 9 from 30.09.2020.
5. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **2024**, 74, 229-263.
6. Burloiu, A. M.; Manda, G.; Boscencu, R.; Neagoe, I.V.; Lupuliasa, D.; Surcel, M.; Olariu, L.; Mihai, D. P. *Porphyritic compound with fluorescent marker potential in dermatology*, Patent application 202200775/28.11.2022, published in RO-BOPI 5/30.05.2023.
7. Burloiu, A. M.; Manda, G.; Lupuliasa, D.; Socoteanu, R. P.; Mihai, D. P.; Neagoe, I. V.; Anghelache, L. I.; Surcel, M.; Anastasescu, M.; Olariu, L.; Gîrd, C. E.; Barbuceanu, S. F.; Ferreira, L. F. V.; Boscencu, R. Assessment of Some Unsymmetrical Porphyrins as Promising Molecules for Photodynamic Therapy of Cutaneous Disorders. *Pharmaceuticals* **2024 (a)**, 17, 62.
8. Burloiu, A. M.; Mihai, D. P.; Manda, G.; Lupuliasa, D.; Neagoe, I. V.; Socoteanu, R. P.; Surcel, M.; Anghelache, L. I.; Olariu, L.; Gîrd, C. E.; Boscencu, R. In Silico and In Vitro Studies on an Asymmetrical Porphyrin Derivative with Therapeutic Potential in Skin Disorders. *Pharmaceuticals* **2024 (b)**, 17, 688.
9. Chavan, S.; Nicholls, I.A.; Karlsson, B.C.G.; Rosengren, A.M.; Ballabio, D.; Consonni, V.; Todeschini, R. Towards global QSAR model building for acute toxicity: Munro database case study. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 18162–18174.
10. Dobre, M.; Boscencu, R.; Neagoe, I.V.; Surcel, M.; Milanesi, E.; Manda, G. *Pharmaceutics* **2021**,13,1032.
11. Dodds, A.; Chia, S.; Shumack, S. *Dermatol Ther (Heidelb)*. **2014**, 4, 11-31.
12. Esteva, A.; Kuprel, B.; Novoa, R.A.; Ko, J.; Swetter, S.M.; Blau, H.M.; Thrun, S. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. **2017**, 542, 7639.

13. Gouterman, M. Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings, In *The Porphyrins*, Dolphin D., Ed. Academic Press: New York, NY, USA, 1978, Volume 3, 11–87.
14. Gouterman, M.; Wagniere, G. H.; Snyder, L. C. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. *J. Mol. Spectrosc.*, 1963, 11, 108–127.
15. Kim, T.E; Chang, J.E. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics*. 2023, 15, 2257.
16. Lomize, A.L.; Hage, J.M.; Schnitzer, K.; Golobokov, K.; LaFaive, M.B.; Forsyth, A.C.; Pogozheva, I.D. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, 59, 3094–3099.
17. Luo, O.D.; Bose, R.; Bawazir, M.A.; Thuraisingam, T.; Ghazawi, F.M. A Review of the Dermatologic Clinical Applications of Topical Photodynamic Therapy. *J Cutan. Med. Surg.* **2024**, 28, 1-18.
18. Pandey, R.K.; Zheng, G. Porphyrins as photosensitizers in photodynamic therapy. In *The Porphyrin Handbook*; Kadish, K.M., Guillard, R., Smith, K.M., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 2000; Volume 6, pp. 157–230.
19. Pires, D.E.V.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 4066–4072.
20. Plekhova, N.; Shevchenko, O.; Korshunova, O.; Stepanyugina, A.; Tananaev, I.; Apanasevich, V. Development of Novel Tetrapyrrole Structure Photosensitizers for Cancer Photodynamic Therapy. *Bioengineering* **2022**, 9, 82.
21. Sarbadhikary, P.; George, B.P.; Abrahamse, H. Recent Advances in Photosensitizers as Multifunctional Theranostic Agents for Imaging-Guided Photodynamic Therapy of Cancer., *Theranostics* **2021**, 11, 9054-9088.
22. Simpson, M.C.; Novikova, I.N. Porphyrins: Electronic structure and ultraviolet/visible absorption spectroscopy. In *Fundamentals of Porphyrin Chemistry: A 21st Century Approach*; Brothers, P.J., Senge, O.M., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: New Jersey, NJ, USA, 2022; Volume 1, pp. 505–586.
23. Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Tang, Y. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, **2019**, 35, 1067–1069.
24. Yang, J.; Wang, S. Polysaccharide-Based Multifunctional Hydrogel Bio-Adhesives for Wound Healing: A Review. *Gels* **2023**, 9, 138.
25. Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.I.; Ikeda, A.; Kataoka, H.; Tanaka, M.; Joh, T. Current states and future views in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2011**, 12, 46– 67.
26. Zink, A. Trends in the treatment and prevention of keratinocyte carcinoma (non-melanoma skin cancer). *Curr Opin Pharmacol.* **2019**, 46, 19-23.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole in extenso publicate în reviste indexate ISI

In silico and in vitro studies on an asymmetrical porphyrin derivative with therapeutic potential in skin disorders. **Burloiu, A. M.**, Mihai, D. P., Manda, G., Lupuliasa, D., Neagoe, I. V., Socoteanu, R. P., Surcel, M., Anghelache, L. I., Olariu, L., Gîrd, C. E., Boscencu, R. *Pharmaceuticals*, 17(6), 688, 2024 (F.I.=4.3, Q1) (capitolul 3), <https://doi.org/10.3390/ph17060688>.

Assessment of some unsymmetrical porphyrins as promising molecules for photodynamic therapy of cutaneous disorders. **Burloiu, A. M.**, Manda, G., Lupuliasa, D., Socoteanu, R. P., Mihai, D. P., Neagoe, I. V., Anghelache, L. I., Surcel, M., Anastasescu, M., Olariu, L., Gîrd, C. E., Barbuceanu, S. F., Ferreira, L. F. V., Boscencu, R. *Pharmaceuticals*, 17(1), 62, 2024 (F.I.=4.3, Q1) (capitolul 4), <https://doi.org/10.3390/ph17010062>.

Porphyrin photosensitizers into polysaccharide based biopolymer hydrogels for topical Photodynamic Therapy: Physicochemical and pharmacotechnical assessments. **Burloiu, A. M.**, Ozon, E. A., Musuc A. M., Anastasescu M., Socoteanu R. P., Atkinson, I., Culita D., Anuta, V., Popescu, I. A., Lupuliasa, D., Mihai, D. P., Gîrd, C. E., Boscencu, R. *Gels*, 2024 10, 499. (F.I.=5, Q1) (capitolul 5), <https://doi.org/10.3390/gels10080499>.

Brevet de inventie

Compus porfirinic cu potential de marker fluorescent in dermato-oncologie, **Burloiu Andreea Mihaela**, Manda Gina, Boscencu Rica, Neagoe Ionela Victoria, Lupuliasa Dumitru, Surcel Mihaela, Olariu Laura, Mihai Dragos Paul. Cerere de brevet nr. 202200775, publicat in RO-BOPI 5/30.05.2023 (capitolul 3).

Alte lucrari indexate ISI

Porphyrin macrocycles: general properties and theranostic potential. Boscencu, R.; Radulea, N.; Manda, G.; Machado, I. F.; Socoteanu, R. P.; Lupuliasa, D.; **Burloiu, A.M.***; Mihai, D. P.; Ferreira Vieira, L. F. *Molecules*, 28(3), 11492023, 2023 (F.I.=4.2).

Interaction of some asymmetrical porphyrins with U937 cell membranes-in vitro and in silico studies. Mihai, D. P.; Boscencu, R.; Manda, G.; **Burloiu, A. M.***; Vasiliu, G.; Neagoe, I. V.; Socoteanu, R. P.; Lupuliasa, D. *Molecules*, 28(4), 1640, 2023 (F.I.=4.2).

Preliminary in vitro evaluation of some porphyrins using human breast tumor cells. Boscencu, R.; Manda, G.; Vasiliu, G.; Socoteanu, R. P.; Lupuliasa, D.; **Burloiu, A. M.**; Neagoe, I. V.; Olariu, L. *Letters in Drug Design & Discovery*, 20(8), 1040, 2023 (F.I.=1).