

**BABEȘ–BOLYAI UNIVERSITY  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Conducător științific**

**PROF. DR. ELENA RAKOSY-TICAN**

**Doctorand**

**LAURA-IOANA PĂTRAȘ**

**CLUJ-NAPOCA**

**2019**

**BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**INVESTIGAREA ROLULUI MACROFAGELOR  
ASOCIATE CANCERULUI COLORECTAL ÎN  
MODULAREA REZISTENȚEI LA TERAPIILE  
APPLICATE**

**- Rezumatul tezei de doctorat -**

**Conducător științific**

**PROF. DR. ELENA RAKOSY-TICAN**

**Doctorand**

**LAURA-IOANA PĂTRAȘ**

**CLUJ-NAPOCA**

**2019**

## CUPRINS

Prefață	4
Lista de abrevieri	5
<b>Capitolul I.</b> Introducere generală și stadiul actual al cunoașterii	6
<b>Capitolul II.</b> Comunicarea intercelulară din micromediul tumoral mediată de vezicule extracelulare ca punct de plecare pentru țintirea progresiei tumorale	24
<b>Capitolul III.</b> Scopul tezei și obiectivele generale	37
<b>Capitolul IV.</b> Veziculele extracelulare produse în urma tratamentului cu doxorubicină modulează răspunsul celulelor stromale la chimioterapie <i>in vitro</i>	39
<b>Capitolul V.</b> Rolul dual al macrofagelor în răspunsul celulelor de carcinom de colon murin C26 la tratamentul cu 5-fluorouracil	56
<b>Capitolul VI.</b> Prednisolon fostatul liposomal potențează activitatea antitumorală a 5-fluorouracilului liposomal în carcinomul de colon murin C26 <i>in vivo</i>	72
<b>Capitolul VII.</b> Concluzii generale, originalitatea tezei și perspective	92
Bibliografie	95
Lista publicațiilor incluse în teză sub formă de capitole sau subcapitole	136
Lista publicațiilor neincluse în teză	136
Lista participărilor la conferințe naționale și internaționale	139
Fonduri	143
Mulțumiri	145

## **Lista de abrevieri**

CRC – cancer colorectal

EPR – permeabilitate crescută și retenție

TME – micromediul tumoral

EV- vezicule extracelulare

TAM – macrofage asociate tumorii

LCL – liposomi cu timp prelungit de circulație

5-FU – 5-fluorouracil

PLP – prednisolon fosfat

CAFs – fibroaste asociate cancerului

MSC – celule stem mezenchimale

TEV – vezicule extracelulare secretate de celule tumorale

DOX- doxorubicină

MDA - malondialdehidă

IL-4 – interleukina 4

NO – oxide nitric

ROS – specii reactive de oxigen

bFGF – factorul bazal de creștere a fibroblastelor

FasL - ligandul Fas

EE – eficiență de încapsulare

AP-1 c-Jun – subunitatea c-Jun a proteinei activatoare-1

iNOS – sintetaza oxidului nitric inductibilă

IL - interleukină

ANOVA – analiza varianței

DT – timp de dublare

AUTC – aria de sub curba de creștere a tumorii

**Cuvinte cheie:** cancer colorectal, macrofage asociate tumorii, vezicule extracelulare, liposomi cu timp de circulație prelungit, 5-fluorouracil, prednisolon fosfat, rezistența la terapie

## **Capitolul I. Introducere generală și stadiul actual al cunoașterii**

### **I.1. Introducere**

Cancerul colorectal (CRC) rămâne în continuare una din cauzele majore ale mortalității datorate cancerului, iar detecția acestuia este făcută în stadiile avansate la care eficiența terapiei convenționale este limitată datorită biodisponibilității reduse a medicamentelor, a efectelor secundare crescute, și nu în ultimul rând datorită dezvoltării chimiorezistenței celulelor canceroase. Pentru a surveni aceste limitări, terapiile țintite care utilizează liposomi pot facilita acumularea agentului terapeutic la nivelul tumorii prin intermediul “Efectului de Permeabilitate și Retenție crescută”, crescând astfel indicele terapeutic, cu precădere în cazul cancerelor avansate sau rezistente la tratament.

O caracteristică distinctivă a tumorilor solide, cum este CRC, este comunicarea bidirecțională continuă dintre celulele maligne și celulele stromale care se infiltrează sau sunt rezidente în tumoră și care creează micromediul tumoral (TME). Această comunicare se realizează prin intermediul moleculelor bioactive solubile sau prin intermediul veziculelor extracelulare (EV) și contribuie major la progresia tumorală. Macrofagele asociate tumorii (TAM) sunt componente esențiale ale sistemului imunitar înăscut, fiind cele mai abundente celule stromale din tumoră. În micromediul tumoral, TAM sunt educate să afișeze un comportament care favorizează procesele asociate cu progresia tumorală (creșterea tumorii, inflamația, angiogeneza, invazia și metastazarea, precum și rezistența celulelor canceroase la terapie), orchestrând astfel rezultatul terapeutic. Așadar, viitoarele terapii țintite ar trebui să aibă ca scop diminuarea funcției protumorale a TAM și să stimuleze funcția antitumorală a acestora.

Această teză investighează rezistența la terapie a celulelor de CRC mediată de comunicarea bidirecțională dintre TAM și celulele canceroase. De asemenea, în această teză este propusă, dezvoltată și testată o nouă strategie terapeutică pentru CRC într-un model de carcinom de colon murin *in vivo*. Această strategie constă într-o terapie combinată, bazată pe administrarea țintită prin intermediul liposomilor cu timp de circulație prelungit a unui agent cytotoxic frecvent folosit în tratamentul acestui tip de cancer (LCL-5-FU), în combinație cu o terapie țintită asupra TAM folosind prednisolon fosfat încapsulat în liposomi cu timp de circulație prelungit (LCL-PLP).

### **I.2. Terapia cancerului colorectal**

Chimioterapia CRC este bazată pe folosirea unor medicamente cu diferite mecanisme de acțiune, cum ar fi 5-FU (antimetabolit), irinotecan (inhibitor al topoizomerazei I), și oxaliplatină (inhibitor al replicării ADN) (Longley *et al.*, 2003; Xu și Villalona-Calero, 2002; Raymond *et al.*, 1998). Dezavantajele care apar în cazul folosirii acestor agenți terapeutici (biodisponibilitate redusă, efecte secundare puternice, rezistența celulelor canceroase la tratament) nu pot fi în

totalitate depășite prin introducerea medicamentelor orale în schema de tratament (capecitabină, trifluridină/tipiracil și acid folinic) cu toate că acestea cresc biodisponibilitatea și citotoxicitatea medicamentului (Machover, 1997; Cutsem *et al.*, 2004; Peeters *et al.*, 2018). Din aceste motive, dezvoltarea terapiilor țintite care urmăresc creșterea specificității antitumorale a medicamentului și reducerea efectelor secundare a dus îmbunătățirea rezultatelor terapeutice în cancerurile avansate (Marabelle și Gray, 2015; van Cutsem *et al.*, 2016; Heinemann *et al.*, 2013). Cele mai promițătoare terapii țintite aprobate de Food and Drug Administration (FDA) pot fi clasificate în imunoterapii, care urmăresc activarea celulelor sistemului imunitar din micromediul tumoral în scopul obținerii unui răspuns antitumoral din partea acestora și, respectiv, agenți bioterapeutici constând în anticorpi monoclonali care țintesc creșterea tumorii și angiogeneza (Buchbinder și Desai, 2016; Ng și Cunningham, 2004; van Cutsem *et al.*, 2017; Hurwitz *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2014).

Ca alternativă, numeroase studii în derulare au ca scop implementarea terapiilor bazate pe nanoparticule pentru tratamentul CRC, acestea constând în folosirea liposomilor, a micelilor și a particulelor polimerice pentru transportul țintit al agenților chimioterapeutici la nivelul tumorilor (Bobo *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2016). Încapsularea medicamentelor în acești nanocărăuși oferă numeroase avantaje printre care: capacitatea de țintire a tumorilor, toxicitate redusă, biocompatibilitate, biodisponibilitate, și stabilitate pentru eliberarea prelungită a medicamentului sau biodegradabilitate la nivelul țesutului țintă (Bharali și Mousa, 2010). Capacitatea de țintire a tumorii este asigurată de fenomenul EPR datorită permeabilității vasculare crescute a tumorii cu pori care variază ca dimensiune de la 100 la 780 nm de-a lungul celulelor endoteliate și datorită unui drenaj limfatic deficient (Maeda, 2001; Cho *et al.*, 2008; Kumar, 2012). Prin urmare, acumularea nanocărăușilor la nivelul tumorii și transportul pasiv al medicamentului este facilitate prin modularea dimensiunii acestora (50-150 nm) și acoperirea cu un strat hidrofил pentru a evita recunoașterea acestora la nivelul sistemului reticuloendotelial și pentru a prelungi timpul de circulație sistemică (Gabizon și Papahadjopoulos, 1988; Marcucci și Lefoulon, 2004; Li și Huang, 2009; Kumar, 2012).

Cu toate că există o gamă largă de nanomedicamente concepute pentru țintirea tumorii și eliberarea țintită a agentului terapeutic, dintre toate terapiile liposmale care sunt aprobate de FDA, încă nu există nicio formulare liposomală aprobată pentru medicamentele clasice folosite pentru tratamentul CRC (5-FU, oxaliplatină, irinotecan).

### **I.3. Imaginea de ansamblu asupra terapiilor pentru CRC care folosesc nanoparticule pentru țintirea agentului terapeutic 5-FU**

*[Părți ale subcapitolului I.3 au fost publicate în: Rusu A.D., Patras L., Banciu M. 2015. Overview on nanoparticulate formulations for 5-Fluorouracil delivery in colorectal cancer treatment. Studia Biologia, 60(2):89-96. ISSN:1221-8103]*

Principala abordare chimioterapeutică pentru tratamentul CRC se bazează pe 5-FU, care rămâne piatra de temelie a tratamentului systemic pentru acest tip de cancer (Wolpin și Mayer, 2008). Acest agent citotoxic este un analog al uracilului care conține fluor, fiind clasificat ca un antimetabolit care este convertit intracelular în trei metaboliți activi care pot fi încorporați în ADN sau ARN, ducând la apoptoza și moartea celulelor (Anitha *et al.*, 2014; Longley *et al.*, 2003). Aplicabilitatea clinică a 5-FU este limitată datorită biodisponibilității reduse și a lipsei capacității de țintire a tumorilor din cauza ca majoritatea medicamentului este degradat enzimatic la nivelul ficatului, necesitând astfel tratamentul cu doze mari de medicament care acționează și asupra celulelor și țesuturilor sănătoase ducând la puternice efecte adverse (Zhang *et al.*, 2008b; Wigmore *et al.*, 2010). Un alt obstacol major pentru folosirea 5-FU în tratamentul CRC avansat constă în dezvoltarea rezistenței celulelor canceroase la tratament prin numeroase mecanisme moleculare (Zhang *et al.*, 2008b; Ortiz *et al.*, 2012).

Au fost descrise un număr mare de terapii pentru CRC bazate pe încapsularea agentului cytotoxic 5-FU într-o gamă variată de sisteme de țintire de tipul nanoparticulelor în scopul depășirii limitărilor prezentate anterior și pentru a crește eficacitatea terapeutică a medicamentului prin țintirea specifică la nivelul tumorilor și eliberarea controlată a acestuia (Nair *et al.*, 2011; Subudhi *et al.*, 2015). Rezultate promițătoare au fost obținute folosind mecanisme pentru eliberarea medicamentului dependente/activate de pH (e.g. hidrogeluri și nanoparticule sferice pe bază de chitosan grefate cu grupări tiolice) de microfloră (e.g. nanoparticule pe bază de chitosachitosan biodegradabile) sau hipertermie (e.g. liposomi magnetici multilamelari) (Subudhi *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2010b; Clares *et al.*, 2013).

Chiar dacă au fost dezvoltate o multitudine de formulări bazate pe nanoparticule pentru țintirea 5-FU la nivelul CRC care s-au dovedit a fi superioare administrării tradiționale a medicamentului, unele efecte adverse nu au putut fi prevenite. Din acest motiv, este de dorit optimizarea acestor tipuri de terapii țintite care încorporează 5-FU în nanoparticule, având în vedere faptul că în prezent nu există nicio terapie aprobată pentru CRC care să aibă la bază folosirea acestor nanocărăuși.

## **I.4. Modularea progresiei tumorilor și a răspunsului la terapie de către micromediul tumoral**

### **I.4.1. Micromediul tumoral**

În cazul tumorilor solide, TME este un factor critic pentru rezultatul terapiilor aplicate datorită interacțiunii dintre celulele maligne (canceroase) și celulele stromale constând în celule ale sistemului imunitar, celule endoteliale vasculare, celule limfatice endoteliale, pericite, fibroblaste asociate cancerului (CAFs), celule stem mezenchimale (MSC) și adipocite (Li *et al.*,

2007; Casazza *et al.*, 2014a). Transferul bidirecțional al semnalelor secretate (e.g. factori solubili și vezicule extracelulare care transmit molecule bioactive) asigură interacțiunea reciprocă și co-evoluția dintre tumoră și stromă, interacțiuni care modulează la rândul ei procesele asociate tumorii (creșterea tumorală, evitarea sistemului imunitar, angiogeneza, invazia și metastazarea, precum și dezvoltarea rezistenței la terapie a celulelor canceroase) (Li *et al.*, 2007; Whiteside, 2008; Egeblad *et al.*, 2010; Pitt *et al.*, 2016).

Rolul primordial al celulelor inflamatoare care se infiltrează la nivelul tumorilor (macrofage, limfocite, celule dendritice, celule “natural killer”) este redirecționat spre producerea de molecule imunosupresive, citokine, chemokine, factori de creștere, care împreună duc la perturbarea sistemului imunitar antitumoral și contribuie la progresia tumorală (Zitvogel *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Whiteside, 2008; Mancino și Lawrence, 2010; Balkwill and Mantovani, 2001). Linia de descendență celulară hematopoietică monocit-macrofag constă în celule care modulează această tranziție datorită abundenței lor intratumorale și plasticității crescute caracteristică macrofagelor care pot fi polarizate spre două stări distincte de activare în funcție de semnalele primite din mediu (Mantovani *et al.*, 2002; Mantovani și Locati, 2013). Activarea clasică a macrofagelor înspre fenotipul M1 antitumoral asigură un mediu proinflamator și imunostimulator care duce la moartea celulelor tumorale (Zhong *et al.*, 2018; Mantovani *et al.*, 2004b). Activarea alternativă a macrofagelor înspre fenotipul M2 protumoral asigură un mediu antiinflamator și imunosupresiv caracterizat prin capacitatea de remodelare tisulară (Mantovani *et al.*, 2004a; Mantovani, 2006; Mantovani *et al.*, 2013).

#### **I.4.2. TAM sunt contributory esențiali la TME**

TAM sunt asociate cu un fenotip asemanator macrofagelor M2, iar rolul lor de bază în orchestrarea progresiei tumorale și a răspunsului la terapie TAM rezultă din capacitatea acestora să secrete molecule inflamatoare, enzyme proteolitice, factori de creștere proangiogenici (Mantovani *et al.*, 2004a; Lewis și Pollard, 2006; Mancino și Lawrence, 2010; Zhong *et al.*, 2018). Aceste molecule susțin și coordonează majoritatea proceselor asociate TME cum sunt imunosupresia, creșterea tumorală, inflamația și stresul oxidativ asociat cu angiogeneza, invazia și metastazarea, și nu în ultimul rând, chimiorezistența (Mantovani *et al.*, 2006; Pollard, 2004; Crowther *et al.*, 2001; De Palma și Lewis, 2013; Zhong *et al.*, 2018).

Deși numeroase studii atribuie un rol protumoral acestor TAM în tumorile solide și asociază infiltrarea lor în TME cu un prognostic slab, rolul TAM în progresia CRC rămâne controversat, având în vedere că atât efecte pro și antitumorale au fost descrise în literatură pentru aceste celule, observațiile variind în funcție de semnătura moleculară a tipului de cancer, de condițiile experimentale și de medicamentul folosit (Zhong *et al.*, 2018). Prin urmare, pentru



intervenția terapeutică asupra CRC, cunoștințe ulterioare asupra mecanismelor exacte prin care TAM susțin sau reduc progresia tumorală vor putea fi folosite pentru a concepe și implementa terapii care țintesc specific TAM, fie prin inhibarea funcției lor protumorale, fie prin re-educarea acestora înapoi la un fenotip M1 antitumoral (Stout *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2018). De asemenea, strategiile de re-educare a TAM care combină terapia citotoxică cu terapia țintită asupra TAM, ar putea duce la efecte antitumorale net superioare datorită unui rezultat sinergic sau complementar (Mantovani *et al.*, 2017).

## **Chapter II. Comunicarea intercelulară din micromediul tumoral mediată de vezicule extracelulare ca punct de plecare pentru țintirea progresiei tumorale**

*[Porțiuni din Capitolul II au fost acceptate pentru publicare în jurnalul Current Pharmaceutical Design în ediția specială intitulată: "Active Nanotargeting in Medicine" ca: Patras L. and Banciu M. 2019. Intercellular crosstalk via extracellular vesicles in tumor milieu as emerging therapies for cancer progression. Current Pharmaceutical Design, DOI:10.2174/1381612825666190701143845, ISSN: 1873-4286]*

### **II.1. Introducere**

Veziculele extracelulare (EV) sunt nanostructuri membranoase heterogene cu un rol esențial ca mecanisme de comunicare intercelulară în TME prin transferal bidirecțional de molecule funcționale între celulele canceroase și cele stromale (Yuana *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2016; Vader *et al.*, 2014). Numeroase studii au confirmat contribuția activă a EV la progresia cancerului și rezultatul terapeutic prin medierea interacțiunii dintre celule stromale și cele tumorale care poate duce la crearea unui micromediu favorabil pentru evoluția proceselor protumorale: angiogeneză, invazie și metastazare, dezvoltarea rezistenței la medicamente a celulelor canceroase (Kanada *et al.*, 2016).

Alături de potențialul EV de a permite descifrarea unor aspecte cruciale ale comunicării intercelulare intratumorale, strategiile terapeutice bazate pe EV au ca scop țintirea progresiei tumorale prin intervenția asupra producerii veziculelor cu rol protumoral, prin blocarea preluării acestora de către celulele destinate sau prin alterarea încărcăturii transportate de EV (Peinado *et al.*, 2012; Atai *et al.*, 2013; Lunavat *et al.*, 2017). În plus, EV sunt folosite în momentul de față ca nanocărăuși datorită analogiei acestora cu liposomii și avantajelor oferite de proprietățile lor intrinseci (de exemplu dimensiunea redusă și stratul natural de proteine și lipide de pe suprafața veziculelor) care include biodisponibilitatea crescută, timp de circulație prelungit, preluarea preferențială de către celulele tumorale, capacitatea de a depăși barierele biologice (Fischer *et al.*, 2009; Petros și DeSimone, 2010; El Andaloussi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015a; Kim *et al.*, 2018).

Au fost testate numeroase abordări care urmăresc optimizarea eficienței de încorporare a unei game variate de molecule terapeutice în aceste nanovezicule (van Dommelen *et al.*, 2012; Raposo și Stoorvogel, 2013; Vader *et al.*, 2016). În general, aceste abordări au recurs fie la modificarea inginerie genetică a celulelor donoare de EV astfel încât acestea să secrete EV modificate pentru a purta diferiți agenți terapeutici, fie la modificarea EV după izolarea și purificarea acestora (Vader *et al.*, 2016).

## **II.2. Rolul veziculelor extracelulare în micromediul tumoral**

EV produse de celulele tumorale (TEV) au fost direct implicate în recrutarea și polarizarea macrofagelor înspre fenotipul M2 protumoral prin stimularea funcției anti-inflamatoare și imunosupresive a acestor macrofage (Chow *et al.*, 2014; Cooks *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019). Alte studii au arătat că EV produse de către TAM au putut modifica fenotipul și funcția celulelor micromediului tumoral în vederea exercitării unor efecte asociate cu imunosupresia și creșterea potențialului invaziv și metastatic al celulelor vizate (Shao *et al.*, 2018b; Shen și Ren, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Așadar, aceste rezultate sugerează că interacțiunea mediată de EV dintre celulele canceroase sau alte celule stromale și macrofagele cu fenotip M2 din TME are o contribuție majoră la progresia tumorală și scoate în evidență noi oportunități terapeutice care pot apărea prin intermediul strategiilor de re-educare a TAM sau blocarea producerii de EV cu rol protumoral în TME.

Literatura de specialitate din ultimii ani a demonstrat contribuția EV la instalarea rezistenței celulelor canceroase la chimioterapie, radioterapie și la terapiile țintite prin mecanisme foarte variate (Meads *et al.*, 2009; Azmi *et al.*, 2013; Sharma, 2017). De exemplu, TEV induc chimiorezistența prin capacitatea lor de a sechestra agenți terapeutici și metaboliți ai acestora în scopul scoaterii din celule sau pot transfera molecule funcționale care induc rezistență la medicamente unor celulele care sunt sensibile la tratament, modificând astfel răspunsul lor la terapie (Safaei, 2005; Ciravolo *et al.*, 2012; Raposo și Stoorvogel, 2013; Vader *et al.*, 2013).

## **II.3. Avantajele folosirii EV ca noi strategii pentru terapia cancerului**

EV au conturat o clasă nouă de sisteme pentru livrarea țintită a agenților terapeutici care este promițătoare prin prisma posibilităților oferite și a contribuției la noile descoperiri legate de reechilibrarea și re-educarea micromediului tumoral în scopul contracarării principalelor procese care susțin și ajută la progresia proceselor maligne (Kooijmans *et al.*, 2012; El Andaloussi *et al.*, 2013). Deoarece avantajul major al folosirii EV pentru transferul agenților terapeutici este efectul cytotoxic pronunțat asupra celulelor destinate care poate duce la evitarea dezvoltării rezistenței la terapie a mai multor tipuri de cancer, numeroase studii pun în practică metodologii de izolare a EV, funcționalizare și încărcare cu compuși bioactivi (Mulcahy *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016;

Kim *et al.*, 2018). O altă strategie abordată constă în exploatarea EV produse de celule (canceroase sau aparținând sistemului imunitar) modificate prin inginerie genetică în scopul transferului specific (datorită unui ligand) sau a unei încărcături specifice (molecule supraexprimate în EV). Aceasta din urmă a demonstrat capacitatea unor astfel de EV de a contracara progresia tumorală și de a induce chimiosensibilitate în celulele destinate atât *in vitro* cât și *in vivo* (Lou *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

Cu toate acestea, un obstacol major reprezentat de noile strategii descrise este transferul inefficient sau în cantități reduse a medicamentului la nivelul țesutului țintit. Noi descoperiri care vizează biologia EV și cu precădere studiul proteinelor și lipidelor de pe suprafața acestora, precum și a moleculelor conținute de veziculele, vor contribui la optimizarea și dezvoltarea continuă a EV ca nanosisteme de țintire a medicamentelor în cadrul oncologiei.

### **Chapter III. Scopul tezei și obiectivele generale**

În circumstanțele în care tratamentul CRC se confruntă frecvent cu eșecul chimioterapiei, dovezile actuale atribuie veziculelor extracelulare și macrofagelor asociate tumorii un rol protumoral tot mai pronunțat, considerându-le contributori critici ai TME care inițiază și susțin progresia tumorală și modulează efectul terapiei anticanceroase. Deși terapiile țintite ale CRC sunt în continuă dezvoltare, în momentul de față nu există nicio terapie liposomală aprobată pentru acest tip de cancer, precum nu există nicio terapie care țintește progresia tumorală mediată de TAM. Așadar, **scopul acestei teze** a fost de a dezvolta a nouă terapie combinată țintită asupra CRC care să urmărească modularea comunicării intercelulare dintre celule de carcinoma de colon murin C26 și celulele TME. Pentru îndeplinirea acestui scop au fost stabilite două obiective generale.

**Primul obiectiv** a constat în studiul interacțiunii dintre celulele canceroase C26 și TAM pentru a descoperi mecanismele moleculare responsabile pentru modularea răspunsului la terapie de către aceste celule. Cercetarea din **Capitolul IV** a investigat rolul EV în medierea comunicării dintre celulele canceroase și macrofage, și respectiv asocierea acestora cu instalarea rezistenței celulelor de cancer colorectal la tratamentul cu DOX *in vitro*. **Capitolul V** s-a adresat modulării mediate de TAM asupra răspunsului celulelor C26 la agentul citotoxic 5-FU, într-un model de cultură *in vitro*.

**Al doilea obiectiv** a urmărit dezvoltarea unei noi terapii liposomale combinate bazată pe țintirea simultană a celulelor de cancer de colon murin C26 folosind liposomi cu tip de circulație prelungit încărcăți cu agentul citotoxic 5-FU (LCL-5-FU) și a efectelor mediate de TAM folosind LCL-PLP. Capacitatea terapiei liposomale țintite propuse (LCL-5-FU+LCL-PLP) de a potența citotoxicitatea agentului terapeutic prin contracararea proceselor protumorale menținute de TAM *in vivo* a fost investigată în **Capitolul VI**.

## **Capitolul IV. Veziculele extracelulare produse în urma tratamentului cu doxorubicină modulează răspunsul celulelor stromale la chimioterapie *in vitro***

*[Capitolul VI reprezintă un manuscris trimis spre publicare ca: Patras L., Fens M.H.A.M., Vader P., Barendrecht A., Banciu M., Schiffelers R. 2019. Doxorubicin-elicited tumor extracellular vesicles modulate the response of stromal cells to chemotherapy in vitro]*

Transferul bidirecțional din TME care stă la baza comunicării dintre tumoră și stroma susține progresia tumorală prin reglarea răspunsului sistemului imunitar, angiogeneză, invazie, metastază și rezistența medicamentoasă a cancerului. Rolul modulator al TEV asupra efectului terapeutic al tratamentelor aplicate survine din capacitatea acestor vezicule de a modifica fenotipul și comportamentul celulelor destinate, astfel remodelând TME și interacțiunea complexă dintre celulele canceroase și cele stromale. Astfel s-a investigat capacitatea TEV izolate de la celule de colon murin C26 expuse *in vitro* în condiții de hipoxie (1% oxigen) și de stres terapeutic (doxorubicină (DOX)) de a altera răspunsul celulelor C26 și RAW 264.7 - asemănătoare macrofagelor, la același agent terapeutic în condiții de normoxie și hipoxie. Rezultatele obținute sugerează potențialul TEV izolate din condiții normoxice de a determina un răspuns mai diminuat la DOX în celulele destinate (C26 și RAW 264.7). Acest efect a fost atribuit unui fenotip care tinde să fie mai rezistent la terapie în celulele donoare de TEV, sugerat de un răspuns anti-apoptotic puternic și capacitatea acestor celule de a menține un nivel fiziologic de stres oxidativ.

În concluzie, acest studiu ridică o nouă perspectivă asupra rolului modulator pe care îl au TEV induse de chimioterapie în micromediul tumoral al CRC, care poate ilustra mai bine evenimentele care contribuie la achiziționarea rezistenței la agenții chimioterapeutici de către celulele canceroase *in vivo*.

## **Capitolul V. Rolul dual al macrofagelor în răspunsul celulelor de carcinom de colon murin C26 la tratamentul cu 5-fluorouracil**

*[Capitolul V a fost publicat ca: Patras L., Sesarman A., Licarete E., Luca L., Alupei M.C., Rakosy-Tican E., Banciu M. 2016. Dual role of macrophages in the response of C26 colon carcinoma cells to 5-fluorouracil administration, Oncology Letters, 12(2):1183–1191. ISSN:1792-1082, DOI: 10.3892/ol.2016.4708]*

### **V.1. Introducere**

În lumina studiilor existente, s-a demonstrat că TAM sunt mediatori critici ai progresiei tumorale care modulează angiogeneza, inflamația, metastazarea, stresul oxidativ și răspunsul celulelor canceroase la agenții citotoxici. Cu toate acestea, rolul TAM în prognosticul CRC la terapie este încă controversat. Astfel, studiul actual a avut ca scop investigarea mecanismelor prin

care TAM mediază răspunsul celulelor de carcinoma de colon murin C26 la agentul citotoxic 5-FU, în momentul co-cultivării TAM cu celule canceroase *in vitro*. În aceste condiții, citotoxicitatea 5-FU a fost evaluată atât în condiții de monocultură cât și în condiții de co-cultură a celulelor C26 cu macrofage peritoneale. În continuare, pentru concentrația cea mai mică de 5-FU care a avut un efect citotoxic major, s-a determinat din lizate tumorale nivelul de exprimare a factorului de transcriere NF- $\kappa$ B prin analiza western blot, precum și nivelul de producție de proteine angiogenice și inflamatoare printr-o analiză de screening (array pentru proteine). Pentru a obține informații legate de influența exercitată de TAM asupra stresului oxidativ, s-a măsurat concentrația de malondialdehidă (MDA) prin HPLC și concentrația de nitriți (ca metaboliți principali ai oxidului nitric) printr-o metodă colorimetrică. Rezultatele au demonstrat că TAM afișează un rol dual în modificarea răspunsului celulelor C26 la în momentul administrării 5-FU în modelul de co-cultură.

Astfel, TAM au reușit să sensibilizeze celulele C26 la tratamentul cu 5-FU prin inhibarea producerii de proteine implicate în angiogeneză și inflamație, dar în schimb au protejat celulele canceroase de stresul oxidativ indus de agentul terapeutic folosit. Împreună, rezultatele acestui studiu indică faptul că administrarea 5-FU împreună cu agenți farmacologici care să prevină rolul protumoral al TAM, și anume capacitatea TAM de a menține un nivel fiziologic de stres oxidativ intratumoral, ar putea îmbunătăți considerabil eficacitatea 5-FU.

## V.2. Material și metode

**Celulele de carcinoma de colon murin C26** (Cell Line Services GmbH, Germany) au fost cultivate în monostrat, în mediu de cultură RPMI 1640 complet (Lonza) suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat prin încălzire (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), la 37 °C într-o atmosferă umidificată conținând 5% CO<sub>2</sub>.

**Co-cultura celulelor C26 cu macrofage** a fost obținută prin însămânțarea suspensiei de celule tumorale C26 peste o cultură în monostrat de macrofage peritoneale induse de tioglicolat și isolate de la șoarecii BALB/c singeneici (Cantacuzino Institute, Romania), într-un raport de densitate celulară de 1:4 care asigură polarizarea macrofagelor înspre fenotipul asemănător TAM și aproximează condițiile optime pentru dezvoltarea carcinomului de colon murin *in vivo* (Herbeuval *et al.*, 2004). În plus, pentru a confirma diferențierea macrofagelor peritoneale înspre fenotipul caracteristic TAM, gradul de exprimare a 24 de proteine angiogenice/inflamatoare din modelul de co-cultură a fost comparat cu gradul de exprimare a aceluiași proteine atunci când s-au folosit macrofage peritoneale diferențiate cu IL-4 (rezultând un fenotip caracteristic TAM) co-cultivate cu celule canceroase, iar comparația dintre cele două modele nu a arătat diferențe semnificative (date neincluse) (Martinez *et al.*, 2006). Experimentele au fost desfășurate conform regulilor

naționale și au fost aprobate de comisia de etică a universității pentru experimente efectuate pe modele animale (nr. înregistrare 32652/01.07.2014).

**Testul de proliferare celulară** a fost efectuat folosind testul imunocolorimetric ELISA BrdU- (Roche Applied Science, Germany) pentru a determina dacă prezența TAM poate afecta capacitatea proliferativă a celulelor C26 în urma tratamentului. În acest scop, citotoxicitatea unor concentrații de 5-FU cuprinse între 0.125-16  $\mu\text{M}$  a fost evaluată după 72h de tratament asupra monoculturii de C26 ( $1 \times 10^4$  celule C26/godeu) și a co-culturii de C26 și TAM în raport de densitate de 1:4. Rezultatele au fost exprimate ca % de inhibare a proliferării celulelor C26 sau a co-culturii comparative cu controlul (cultură standard sau co-cultură în lipsa tratamentului).

**Lizatele celulare** au fost preparate pentru evaluarea ulterioară a efectelor tratamentului cu 4  $\mu\text{M}$  5-FU în prezența TAM asupra unor markeri “cheie” asociați cu progresia tumorală. Tamponul de liză a constat în 10 mM HEPES (pH 7), 200 mM NaCl, 1% Triton X, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ditiotreititol (DTT) și tablete conținând un amestec de inhibitori de proteaze (Complete, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Concentrația proteică a fost determinată prin metoda Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) (Bradford, 1976).

**Gradul de exprimare a factorului de transcriere NF- $\kappa$ B** a fost determinat din lizate celulare prin analiza western blot pentru a testa efectele 5-FU asupra acestui factor mediator al angiogenezei și inflamației tumorale, și pentru a testa dacă prezența TAM poate potența sau nu efectele medicamentului asupra acestei proteine. Anticorpul primar folosit a fost anticorp IgG monoclonal de șoarece anti-NF- $\kappa$ B p65 de la șoarece (Santa Cruz Biotechnology). Benzile au fost detectate folosind Clarity™ Western ECL (Bio-Rad) iar membranele au fost expuse la un film de raze X (Kodak) care după dezvoltare a fost fotografiat folosind instrumentul BioSpectrum Imaging System (BioSpectrum AC Chemi HR 410, Cambridge, England). Programul TotalLab Quant a fost folosit pentru analiza densitometrică, iar gradul de exprimare a NF- $\kappa$ B în monocultură și co-cultură a fost ilustrat ca % de inhibare comparativ cu controlul.

**Gradul de producție a proteinelor inflamatoare și angiogenice** din fiecare condiție experimentală a fost determinat folosind kitul RayBio® Mouse Angiogenic Cytokine Antibody Array (RayBiotech Inc., Norcross, GA) după cum a fost descris anterior (Banciu *et al.*, 2006). Gradul de exprimare a 24 de proteine implicate în procese asociate inflamației și angiogenezei a fost cuantificat prin densitometrie folosind programul TotalLab Quant.

**Concentrația de MDA** a fost măsurată prin Cromatografie Lichidă de Înaltă Performanță (HPLC) după cum a fost descris anterior (Alupei *et al.*, 2015), deoarece MDA este un produs peroxidării lipidelor mediată de speciile reactive de oxigen (ROS) și se folosește frecvent ca indicator al stresului oxidativ (Del Rio *et al.*, 2005). Această determinare a urmărit investigarea rolului modulator al TAM asupra stresului oxidativ după tratamentul cu 5-FU. Coloana de HPLC a fost



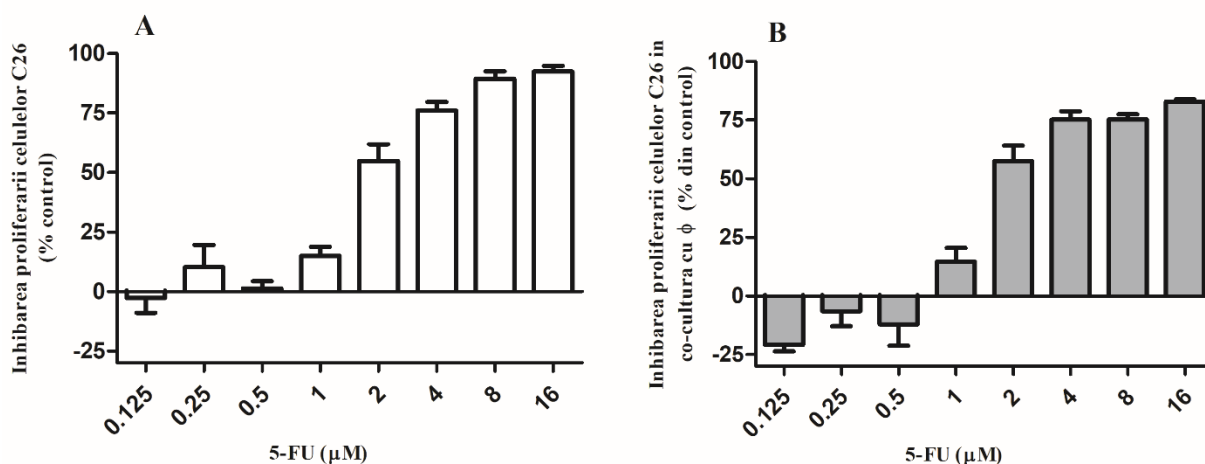
RP18 (5  $\mu\text{m}$ ) (Supelco, Pennsylvania, USA) și faza mobilă a constat în 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /metanol într-un raport volumetric de 65:35%. Pentru detecția MDA s-a folosit un detector UV (UV - 2070/2075 Jasco, Tokyo, Japan) setat la 254 nm. Datele au fost exprimate ca  $\mu\text{M}$  MDA după normalizarea față de concentrația de proteine din lizatele celulare.

**Concentrația de metaboliți ai oxidului nitric (NO)** după tratamentul cu 5-FU în cultură standard și în co-cultură a constat în măsurarea nitriților prin testul colorimetric Griess, după cum a fost descris anterior (Alupei *et al.*, 2015). NO este o moleculă implicată în semnalizarea celulară, a cărei concentrație foarte mare devine citotoxică, în timp ce concentrațiile reduse de NO exercită efecte protumorale (Rahat și Hemmerlein, 2013). Datele au fost exprimate ca nM nitriți după normalizarea față de concentrația de protein din lizatele celulare.

**Analiza statistică** a constat în folosirea testului *t* de neperechi pentru compararea efectelor 5-FU asupra culturii standard de celule C26 sau a co-culturii celulelor C26 cu macrofage, iar analiza de varianță bifactorială (two-way ANOVA) cu corecția Bonferroni pentru comparații multiple a fost folosită pentru a compara efectele 5-FU asupra gradului de exprimare a proteinelor angiogenice/inflamatoare din lizatele celulare. Datele au fost exprimate ca medie  $\pm$  deviația standard (SD) și programul GraphPad (San Diego, CA) a fost folosit pentru toate analizele. O valoare a coeficientului de corelație Pearson (*P*) mai mică de 0.05 a fost considerată semnificativă.

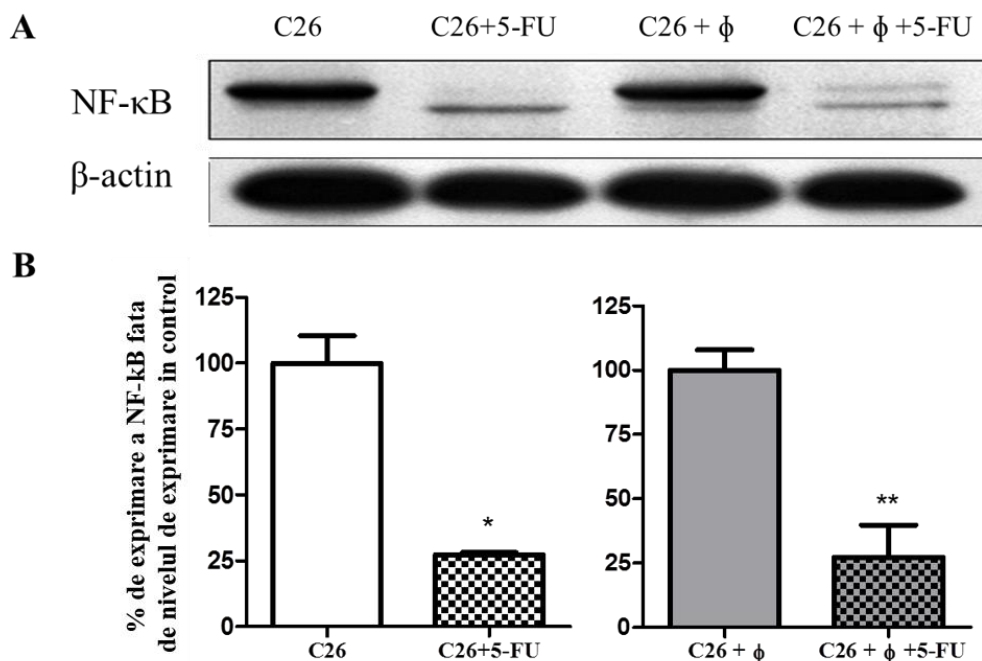
### V.3. Rezultate și discuții

#### V.3.1. Tratamentul cu 5-FU a inhibat puternic proliferarea celulelor C26 și a redus gradul de exprimare a factorului de transcriere NF- $\kappa\text{B}$ independent de prezența TAM



**Figura V.1. Efectele 5-FU asupra proliferării celulelor de cancer colorectal murin C26.** (A) 72h după incubarea celulelor C26 cu concentrații diferite de 5-FU (0.125-16  $\mu\text{M}$ ); (B) 72h după incubarea co-culturii de celule C26 cu macrofage peritoneale ( $\phi$ ) concentrații diferite de 5-FU (0.125-16  $\mu\text{M}$ ). Datele sunt reprezentate ca medie  $\pm$  SD a 3 măsurători și exprimate ca % inhibare a proliferării celulelor C26 sau a co-culturii după tratament cu 5-FU comparativ cu proliferarea celulelor în control (C26 sau co-cultură fără tratament).

La concentrații mai mari 4  $\mu$ M, 5-FU a inhibat puternic strongly (cu 75% față de control) proliferarea celulelor C26 atât în condiții standard de cultură (Fig. V.1A) cât și în co-cultură de celule ce 26 cu TAM (Fig. V.1B). Cea mai mica concentrație de 5-FU (4  $\mu$ M) care a avut efecte citotoxice puternice asupra proliferării celulare (Fig. V.1A și B) a fost folosită pentru experimente ulterioare pentru testarea activității modulatorie a TAM asupra răspunsului celulelor C26 la tratamentul cu 5-FU.



**Figura V.2. Efectele administrării 5-FU asupra nivelului de exprimare al NF- $\kappa$ B.** (A) Analiza western blot asupra nivelului de NF- $\kappa$ B levels în celulele C26. C26 = celule C26 netratate; C26+5-FU = celule C26 tratate cu 4  $\mu$ M 5-FU pentru 72h; C26 +  $\phi$  = co-cultură de celule C26 cu macrofage ( $\phi$ ) fără tratament; C26 +  $\phi$  + 5-FU = co-cultură de celule C26 și  $\phi$  incubate cu 4  $\mu$ M 5-FU pentru 72h.  $\beta$ -actin a fost controlul de încărcare a probelor în gel; (B) Cuantificarea datelor de western blot. Rezultatele sunt comparate cu nivelul NF- $\kappa$ B din controale și exprimate ca medie  $\pm$  SD a 2 experimente; *ns* - nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ .

Ținând cont de rolul controversat al TAM în dezvoltarea CRC, s-a studiat dacă acest tip de celule 5-FU asupra nivelului de exprimare a factorului de transcriere NF- $\kappa$ B – mediator critic al potențialului proliferativ, anti-apoptotic și angiogenic, factor care este constitutive activat în majoritatea linilor de CRC, precum și în modelul *in vitro* din acest studio (Fig. V.2) (Uetsuka *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.* 2009). Este interesant faptul că tratamentul cu 4  $\mu$ M 5-FU a inhibat puternic exprimarea NF- $\kappa$ B (cu 70% comparative cu controlul) independent de prezența TAM (Fig. V.2A și B), ceea ce poate fi în conexiune cu efectul inhibitor asupra proliferării celulare observat (Fig. V.1A și B). Acest rezultat este conform cu studii anterioare care au raportat asocierea citotoxicității crescute a medicamentului cu inhibarea NF- $\kappa$ B și a dus la moartea celulelor canceroase prin apoptoză (Azuma *et al.*, 2001; Uetsuka *et al.*, 2003; Nowis *et al.*, 2007).



### **V.3.2. TAM au indus susceptibilitatea la tratamentul cu 5-FU a celulelor C26 prin medierea unui răspuns anti-angiogenic și anti-inflamator puternic**

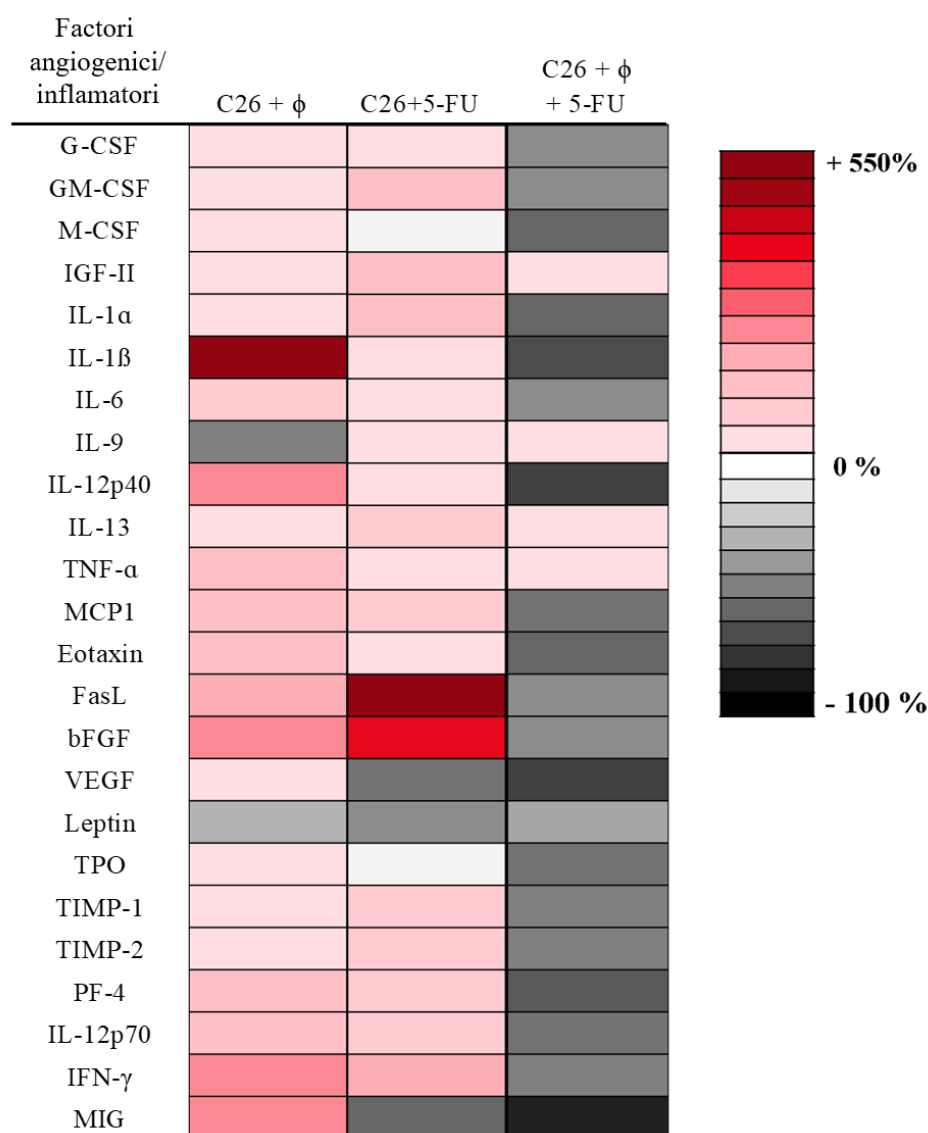
Screening-ul a 24 de proteine implicate în inflamație și angiogeneză a urmărit dacă TAM au capacitatea de a modula acțiunea 5-FU asupra acestor procese și imaginea de ansamblu asupra nivelului de exprimare al acestor proteine în fiecare condiție experimentală este ilustrat în Fig. V.3. În concordanță cu alte studii, rezultatele noastre au confirmat rolul crucial al TAM în susținerea proceselor protumorale (inflamație, angiogeneză, metastază) deoarece prezența TAM în co-cultura netratată a stimulat producția totală a acestor proteini de 2 ori comparative cu producția proteinelor în cultura standard (Fig. V.3) ( Choo *et al.*, 2005; Banciu *et al.*, 2008b; Solinas *et al.*, 2009; Alupei *et al.*, 2015).

Totodată, în prezența macrofagelor, tratamentul cu 5-FU a determinat reducerea nivelului total de proteine testate (cu 44%,  $P < 0.0001$ ) față de producția aceluiași proteini co-cultura netratată (Fig. V.3). Efectele anti-angiogenice și anti-inflamatorii observate, împreună cu suprimarea producției de NF- $\kappa$ B ar putea fi responsabile pentru micromediul antiproliferativ creat, în care TAM mediază susceptibilitatea celulelor C26 la tratamentul cu 5-FU (Zins *et al.*, 2007; Hagemann *et al.*, 2008; Quatromoni și Eruslanov, 2012; Gutschalk *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014).

În absența TAM, celulele C26 tratate cu 5-FU au avut un nivel mult mai crescut al majorității proteinelor angiogenice și inflamatoare proteice comparative cu celulele C26 netratate (cu 84 %,  $P < 0.0001$ ). Prin urmare, aceste celule afișează un fenotip mai rezistent la tratament, care poate fi datorat stimulării considerabile a producerii bFGF (de 3 ori) și FasL (de 5 ori) comparativ cu controlul, deoarece supraexprimarea acestor proteine este asociată cu o agresivitate crescută și cu un potențial metastatic ridicat al celulelor canceroase (Figure V.3) (Casanovas *et al.*, 2005; Igney și Krammer, 2005).

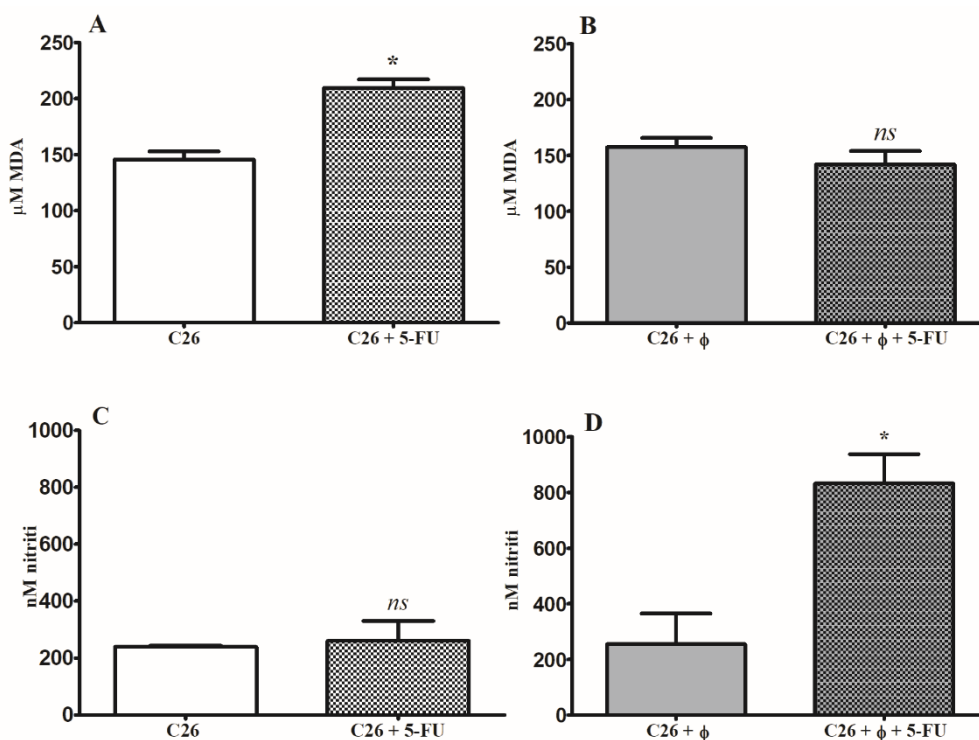
### **V.3.3. TAM au manifestat un efect protectiv asupra celulelor C26 expuse la 5-FU prin menținerea nivelului de stres oxidativ fiziologic**

Deoarece numeroase studii au sugerat că TAM sunt capabile să mențină nivelul fiziologic de stres oxidativ, în acest studiu am investigat dacă TAM au capacitatea de a modula stresul oxidativ în urma tratamentului cu 4  $\mu$ M 5-FU în co-cultură prin cuantificarea unor markeri de bază ai stresului oxidativ din lizate celulare (MDA și nitriți) (Kundu *et al.*, 1995; Siegert *et al.*, 1999; Wartenberg *et al.*, 2003; Del Rio *et al.*, 2005; Nowis *et al.*, 2007) (Fig. V4). Doar tratamentul cu 5-FU a crescut semnificativ concentrația MDA în celulele C26 în monocultură (cu 45%,  $P < 0.05$ , Fig. V.4A) în comparație cu celulele C26 netratate. Capacitatea acestui agent citotoxic de a induce o acțiune pro-oxidantă în celule de CRC a fost observată și în alte studii, iar creșterea stresului oxidativ peste nivelul fiziologic este asociată cu moartea celulară prin apoptoza indusă de specii reactive de oxigen (ROS) (Hwang *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014).



**Figura V.3. Efectele diferitelor condiții experimentale asupra nivelului de proteine angiogenice/inflamatoare în lizatele celulare.** Rezultatele sunt prezentate fie ca procent (%) de reducere (-) a exprimării proteinelor variind între 0% (alb) și 100% (negru) sau ca % de stimulare (+) a exprimării proteinelor variind de la 0% (alb) la 550% (roșu) în: C26 +  $\phi$  = co-cultură comparativ cu nivelul de exprimare al proteinelor angiogenice/inflamatoare în lizate de la celule C26 netratate; C26 + 5-FU = celule C26 tratate cu 4  $\mu$ M 5-FU comparativ cu nivelul de exprimare al proteinelor angiogenice/inflamatoare în lizate de la celule C26 netratate; C26 +  $\phi$  + 5-FU = co-cultură tratată cu 4  $\mu$ M 5-FU comparativ cu nivelul de exprimare al proteinelor angiogenice/inflamatoare în lizate de la celule C26 netratate.

Spre deosebire de monocultură, în prezența TAM, 5-FU nu a reușit să inducă stresul oxidativ sugerând că TAM ar putea fi responsabile pentru protejarea celulelor canceroase de stresul oxidativ indus de 5-FU contribuind la contracararea efectelor citotoxice produse de medicament (Fig. V.4B). Acest efect este confirmat și de datele care arată o creștere semnificativă a producției de nitriți în urma tratamentului cu 5-FU (by 4-fold,  $P=0.0329$ , Fig. V.4D) doar în prezența macrofagelor. Deoarece nivelul de stres nitrozativ detectat (interval nM) nu a depășit limitele fiziologice de NO necesare la care acesta începe să exercite efecte antitumorale, rezultatul obținut poate fi în strânsă legătură cu protecția împotriva apoptozei celulare mediată de ROS și menținerea unui nivel de stres nitrozativ netoxic (Rahat și Hemmerlein, 2013; Krishnaiah *et al.*, 2002; Wartenberg *et al.*, 2003; Riganti *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2008).



**Figura V.4. Efectele tratamentului cu 5-FU asupra markerilor de stres oxidativ în lizate obținute din culturi standard și din co-culturi.** (A) Concentrația MDA în celule C26 după 72h de tratament cu 4 μM 5-FU; (B) Concentrația MDA în co-cultură după 72h de tratament cu 4 μM 5-FU; (C) Concentrația nitriților în celule C26 după 72h de tratament cu 4 μM 5-FU; (D) Concentrația nitriților în co-cultură după 72h de tratament cu 4 μM 5-FU. Datele sunt reprezentate ca medie ± SD a 2 experimente; *ns* - nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ .

#### V.4. Concluzii

Rezultatele acestui studiu dovedesc rolul dual al TAM în modularea răspunsului celulelor de carcinom de colon murin C26 la tratamentul cu 5-FU. Cu toate că în prezența macrofagelor s-a observat o chemosensitivitate crescută a celulelor C26 față de agentul citotoxic indicată de reducerea puternică a majorității proteinelor implicate în angieneză și inflamație, TAM au avut un efect protector asupra efectului pro-oxidant indus de 5-FU prin menținerea unui nivel de stres oxidativ fiziologic. Aceste descoperiri sugerează că strategiile terapeutice pentru CRC ar trebui să exploateze stresul oxidativ intrinsec al celulelor canceroase prin combinarea administrării 5-FU împreună cu un agent farmacologic care să interfereze cu capacitatea TAM de a menține stresul oxidativ într-un interval fiziologic.

### Capitolul VI. Prednisolon fostatul liposomal potențează activitatea antitumorală a 5-fluorouracilului liposomal în carcinomul de colon murin C26 *in vivo*

[Capitolul VI a fost publicat ca: Patras L., Sylvester B., Luput L., Sesarman A., Licarete E., Porfire A., Muntean D., Drotar D.M., Rusu A.D., Nagy A.L., Catoi C., Tomuta I., Vlase L., Banciu M., Achim M. 2017. Liposomal prednisolone phosphate potentiates the antitumor activity of

## **VI.1. Introducere**

Eficacitatea antitumorală a 5-FU în CRC avansat este împiedicată nu doar de indicele therapeutic redus, dar și datorită achiziționării rezistenței la terapie a celulelor tumorale. Din aceste motive, pentru a potența activitatea antitumorală a 5-FU, în acest studiu s-a dezvoltat o nouă terapie ținută bazată pe co-administrarea *in vivo* a 5-FU în LCL împreună cu formularea liposomală LCL-PLP care s-a dovedit a avea efecte anti-angiogenice asupra carcinomului de colon murin C26.

În acest scop, efectele terapiei liposomale propuse asupra carcinomului de colon murin C26 au fost evaluate din punct de vedere al creșterii tumorilor, precum și din prisma producerii de marker intratumorali cu rol “cheie” ca de exemplu molecule implicate în angiogeneză, inflamație și stres oxidativ. Pentru aprofundarea stadiului de polarizare a TME în urma terapiei, am determinat raportul IL-10/IL-12p70 din tumori. Rezultatele au arătat că terapia liposomală propusă a inhibat aproape total creșterea tumorilor și a fost superioară ca eficacitate față de terapiile liposomale singure. Efectul antitumoral pronunțat care a fost observat s-a datorat activității supresive a tratamentului asupra angiogenezi și inflamației la nivelul micromediului carcinomului de colon C26, fiind favorizat și de efectul reglator al terapiei combinate asupra stresului oxidativ intratumoral și de redirecționarea polarizării celulelor micromediului tumoral spre un fenotip antineoplasic. Așadar, acest studiu deschide noi perspective și oferă o strategie promițătoare de ținere a CRC folosind o terapie liposomală combianată.

## **VI.2. Material și metode**

**Formulările liposomale de LCL** au fost pregătite prin metoda hidratării filmului lipidic folosindu-se 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine: N-(Carboxymethoxypolyethyleneglycol-2,000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine (Na-salt): cholesterol (DPPC:PEG-2,000-DSPE:CHL) în raport de 9.5:0.5:1 care au conținut 4.5 mol % PEG 2,000 (as PEG-2,000-DSPE), după cum a fost descris anterior (Schiffelers *et al.*, 2005; Alupei *et al.*, 2015; Sylvester *et al.*, 2016; Achim *et al.*, 2016). LCL-PLP au avut o dimensiune medie de 100 nm cu un indice de polidispersie < 0.1 și eficiența de încapsulare (EE) a PLP a fost de 22% (9 mg PLP/ml) (Sylvester *et al.*, 2016). LCL-5-FU au avut o dimensiune medie de 180 nm, cu un indice de polidispersie < 0.10 și EE a fost de 1.4% (150 μg/ml) (Achim *et al.*, 2016). Avantajul dimensiunii nanometrice a acestor liposomi este că nu depășesc limitele impuse de endoteliile vasculare tumorale (200–800 nm) ceea ce facilitează acumularea pasivă a liposomilor în țesutul tumoral (Porfire *et al.*, 2014).

**Celulele de carcinoma de colon murin C26** (Cell Line Services, 440156) au fost crescute în mediu RPMI 1640 complet (Lonza, 09-774F) îmbogățit cu 10% (v/v) ser fetal bovin inactivat prin încălzire (HyClone, SV30160.03), la 37 °C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO<sub>2</sub>.

**Modelul de carcinoma de colon murin C26** a fost obținut prin inoculararea subcutanată a  $1 \times 10^6$  celule C26 în fâncul drept al șoarecilor singeneici masculi BALB/c mice (6-8 săptămâni) (Institutul Cantacuzino, Romania). Experimentele au fost desfășurate în conformitate cu regulile naționale și au fost aprobate de comisia de etică a universității pentru experimente pe modele animale (nr. înregistrare 31375/06.04.2015). Dimensiunea tumorilor a fost măsurată zilnic din ziua 7 (când tumorile au devenit palpabile), iar volumul tumoral a fost calculat după formula  $V=0.52xa^2xb$ , unde a este cel mai mic și b este cel mai mare diametru superficial al tumorii (mm).

**Activitatea antitumorală a terapiei liposomale propuse** a fost evaluată prin efectele inhibitorii asupra creșterii tumorilor. Grupurile experimentale a căror activitate antitumorală a fost testată au fost următoarele:

- 20 mg/kg PLP (LCL sau sub formă liberă)
- 1.2 mg/kg 5-FU (LCL sau sub formă liberă)
- 20 mg/kg PLP + 1.2 mg/kg 5-FU (terapie combinată folosind LCL)
- 20 mg/kg PLP + 1.2 mg/kg 5-FU (sub formă liberă)

Aceași schemă de tratament a fost folosită pentru toate grupurile experimentale prezentate mai sus (injectarea în vena caudală a tratamentului în zilele 8 și 11, iar în ziua 12 șoarecii au fost sacrificați).

**Activitatea antitumorală a două strategii diferite de administrare terapiei combinate liposomale asupra creșterii tumorale** a fost investigată pentru a compara administrarea simultană a 20 mg/kg PLP + 1.2 mg/kg 5-FU (ca LCL sau sub formă liberă în zilele 8 și 11) administrarea secvențială a aceluiași formulări, care a constat în pretratamentul cu PLP (ca LCL sau sub formă liberă în zilele 7 și 10) cu 24h înainte de tratamentul cu 5-FU (ca LCL sau sub formă liberă în zilele 8 și 11). Strategia din urmă a fost indicată înainte deoarece mai multe studii au sugerat că pretratamentul cu corticosteroizi stimulează efectul terapiei citotoxice în modele de CRC (Wang, 2004; Rayburn, 2009). Șoarecii au fost sacrificați în ziua 18, când tumorile au ajuns la un volum de 2,000 mm<sup>3</sup>.

**Determinarea producției de NF-κB și AP-1 ca factori de transcriere esențiali în inflamație** s-a testat prin tehnica western blot din homogenate tumorale după determinarea concentrației de proteine prin metoda biuretului (Gornall *et al.*, 1949). Anticorpi primari pentru NF-κB p65 (sc-56735), c-Jun (sc-45) sau β-actin (sc-130656) (Santa Cruz Biotechnology) au fost folosiți. Imunocomplexele au fost dezvoltate folosind kitul Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, 170-5061)

și expuse la un film de raze X-ray (Kodak, Z358487) pentru 1-2 minute. Rezultatele au fost exprimate ca medie  $\pm$  SD a două experimente independente.

**Gradul de exprimare a proteinelor inflamatoare și antiangiogenice** din homogenate tisulare de la fiecare condiție experimentală au fost determinate prin screening-ul a 24 de proteine folosind kitul RayBio® Mouse Angiogenic Cytokine Antibody Array (RayBiotech Inc., Norcross, GA) as described previously (Banciu *et al.*, 2006). Rezultatele au fost prelucrate prin densitometrie folosind programul TotalLab Quant.

**Analiza imunohistochimică a țesutului tumoral după aplicarea tratamentelor** a avut ca scop investigarea nivelului de infiltrare a TAM la nivelul tumorilor, prin examinarea prezenței acestora folosind markerul pentru macrofage murine F4/80 și markerul pentru sintetaza NO inductibilă (iNOS) în scopul verificării prezenței macrofagelor cu fenotip M1 (Austyn și Gordon, 1981; Kou *et al.*, 2015). Numărului de celule pozitive pentru F4/80 și iNOS de pe mai multe câmpuri nesuprapuse i-a fost atribuit un scor în funcție abundența acestor celule (Banciu *et al.*, 2008a).

**Efectele terapiei combinate propuse asupra raportului IL-10/IL-12p70** a fost determinat deoarece acest raport este reprezentativ pentru gradul de polarizare în ansamblu a TME spre un fenotip protumoral sau antitumoral (Liu *et al.*, 2013). În acest caz, producția de IL-10 a fost măsurată folosind kitul ELISArray pentru măsurarea citokinelor inflamatoare murine (Qiagen, MEM-004A) și exprimată ca % comparativ cu producția IL-10 în control. Producția de IL-12p70 a fost determinată prin tehnica array pentru proteine descrisă mai sus, iar rezultatele au fost exprimate % comparativ cu producția acestei interleukine în control.

**Determinarea concentrației de MDA în tumorile de carcinom de colon murin C26** s-a efectuat prin tehnica HPLC pentru a investiga efectele diferitelor terapii testate asupra stresului oxidativ tumoral, după cum a fost descris anterior (Alupeii *et al.*, 2015; Patras *et al.*, 2016). Rezultatele au fost exprimate ca  $\mu$ M MDA  $\pm$  SD și au fost normalizate după concentrația de proteine.

**Analizele statistice** au constat în folosirea analizei de varianță unifactorială (one-way ANOVA) cu corecția Bonferroni pentru comparații multiple pentru compararea efectelor totale a diferitelor tratamente asupra creșterii tumorilor și a markerilor testați, și respectiv a analizei de varianță bifactorială (two-way ANOVA) cu corecția Bonferroni pentru comparații multiple în cazul comparării efectelor terapiilor propuse asupra nivelului de producție a proteinelor angiogenice și inflamatoare. Timpul de dublare a volumului tumoral (DT) a fost estimat utilizând ecuația de creștere exponențială a tumorii. Datele au fost exprimate ca medie  $\pm$  SD și programul GraphPad (San Diego, CA) a fost folosit pentru toate analizele. O valoare a coeficientului *P* mai mică de 0.05 a fost considerată semnificativă.



### VI.3. Rezultate și discuții

#### VI.1. Administrarea simultană a terapiei liposomale combinate a inhibat mai eficient creșterea tumorilor de carcinom de colon murin comparativ cu terapiile liposomale singulare sau terapia liposomală combinată administrată secvențial

Efectele diferitelor tratamente asupra dezvoltării tumorilor au arătat că administrarea LCL-5-FU a afectat moderat creșterea tumorilor (cu 53%,  $P < 0.01$ ), în timp ce tratamentul cu LCL-PLP a avut un efect mai puternic inhibând cu 70% această creștere comparativ cu controlul (tumori netratate), iar administrarea medicamentelor sub formă liberă nu a avut efecte semnificative. Aceste rezultate subliniază capacitatea formulărilor liposomale testate de a ținti tumora (Fig. VI.1).

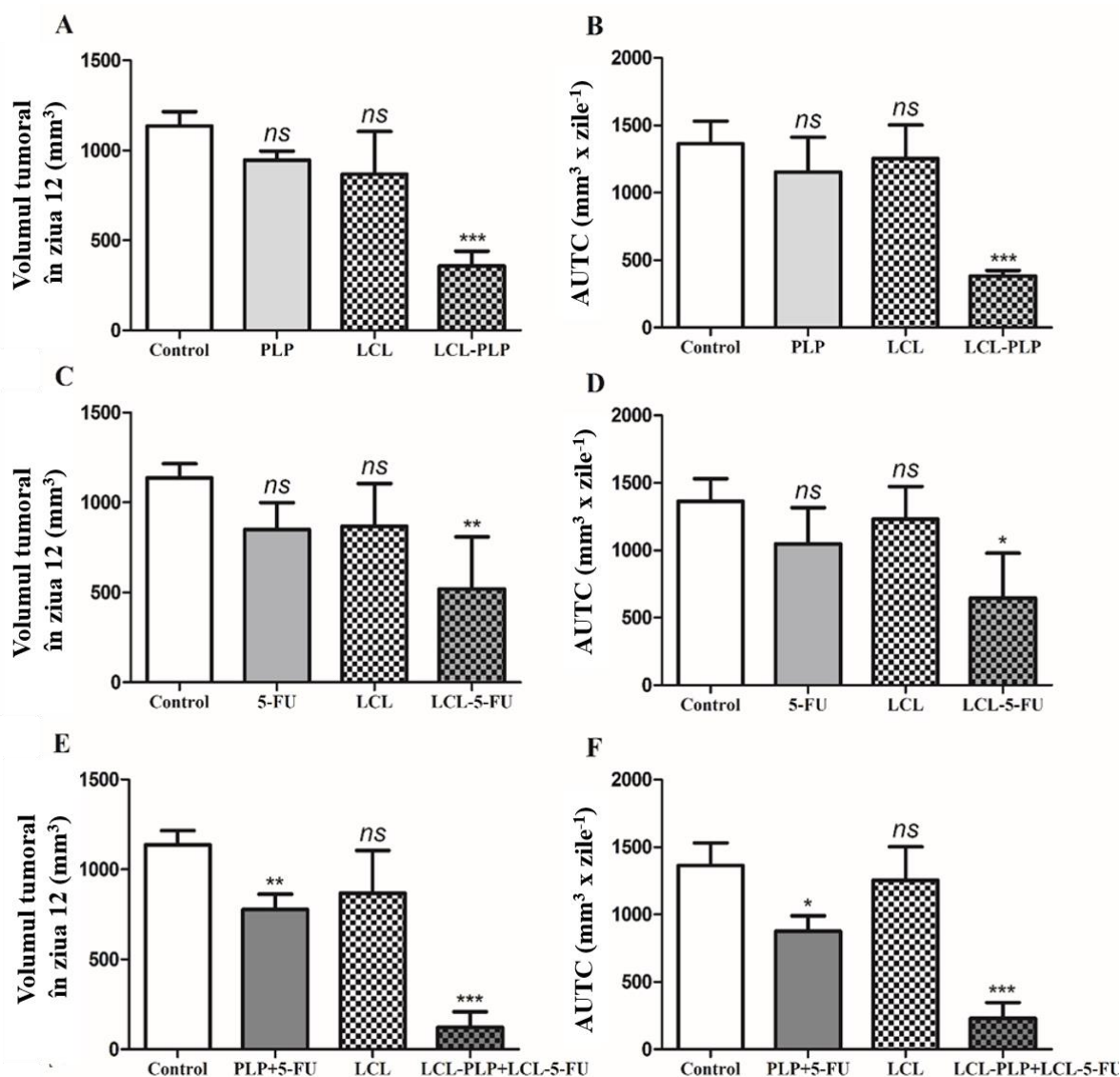
Administrarea simultană a 20 mg/kg LCL-PLP cu 1.2 mg/kg LCL-5-FU (LCL-PLP+LCL-5-FU) a decelerat aproape total (cu peste 80%,  $P < 0.001$ , Fig. VI.1E și F) creșterea tumorilor, în timp ce tratamentele administrate în combinație sub formă liberă au inhibat foarte puțin această creștere (cu 30%,  $P < 0.01$ , Fig. VI.1E și F). Este de menționat că DT calculat în urma tratamentului cu LCL-PLP+LCL-5-FU a fost de 2.5-3.5 ori mai lung decât DT pentru tumorile care au primit oricare alt tratament (Tabel VI.1).

Au fost testate două scheme diferite de administrare a formulărilor liposomale (20 mg/kg LCL-PLP + 1.2 mg/kg LCL-5-FU versus 20 mg/kg LCL-PLP / 1.2 mg/kg LCL-5-FU) pentru a evalua eficacitatea lor antitumorală (Fig. VI.2).

Rezultatele au arătat că administrarea simultană a medicamentelor încapsulate în LCL a fost mai eficientă decât administrarea secvențială a aceluiași tratament (inhibare a creșterii tumorale de 72% vs 50% comparativ cu controlul,  $P = 0.02$ ).

Având în considerare aceste rezultate, abordarea terapeutică care utilizează administrarea simultană a tratamentelor liposomale țintite (LCL-PLP și LCL-5-FU) are potenția pentru a fi folosită sau optimizată ulterior pentru terapia CRC.

De aceea, mecanismele principale care stau la baza activității antitumorale a LCL-PLP+LCL-5-FU în carcinomul de colon murin C26 au fost în continuare studiate din punctul de vedere al producției intratumorale de marker inflamatori, angiogenici și ai stresului oxidativ, care sunt descriși în literatură ca modulatori ai proceselor protumorale (Schiffelers *et al.*, 2005; Banciu *et al.*, 2008a; Sylvester *et al.*, 2016; Patras *et al.*, 2016).



**Figura VI.1. Efectele administrării combinate a LCL-PLP și LCL-5-FU asupra creșterii carcinomului de colon murin C26.** Volumele tumorale în ziua 12 după inocularea celulelor tumorale (când șoarecii au fost sacrificați) după fiecare tratament sunt afișate (A, C, și E). Aria de sub curba de creștere tumorală (AUC) obținute în urma fiecărui tratament sunt prezentate (B, D și F). Tratamentele au fost administrate în zilele 8 și 11. Doza terapeutică folosită pentru PLP a fost de 20 mg/kg (formă liberă sau LCL). Doza terapeutică folosită pentru 5-FU a fost de 1.2 mg/kg (formă liberă sau LCL). Rezultatele au fost comparate cu controlul (PBS) și exprimate ca medie  $\pm$  SD a volumelor tumorale a 5-6 șoareci.; ns - ne semnificativ,  $P > 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; Control = grup netratat; LCL = grup tratat cu liposomi goi.

## VI.2. Terapia combinată bazată pe LCL-PLP+LCL-5-FU a indus efecte anti-angiogenice și anti-inflamatoare puternice în mediul tumoral al carcinomului de colon C26

Datele având în vedere determinarea markerilor inflamatori și angiogenici, confirmă mecanismul principal de acțiune al terapiei liposomale propuse ca fiind unul puternic anti-inflamator și anti-angiogenic în micromediul carcinomului de colon murin *in vivo*. În speță, tratamentul cu LCL-PLP+LCL-5-FU a redus nivelul de exprimare a doi factori de transcriere esențiali care modulează inflamația tumorală comparativ cu exprimarea acestora în control (NF-



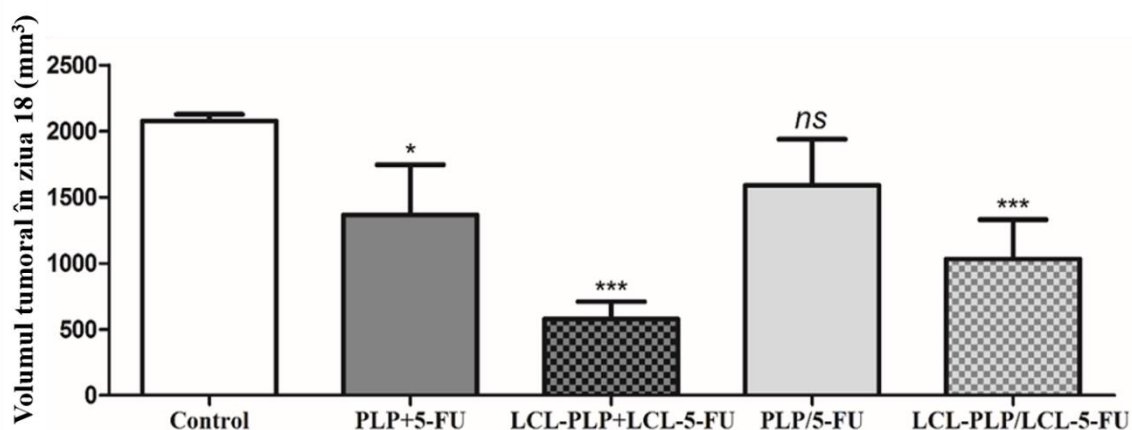
$\kappa$ B a fost inhibat cu 35%, iar AP-1 c-Jun cu 60%) (Fig. VI.3). Acest efect ar putea explica și suprimarea puternică a majorității proteinelor pro-inflamatoare și pro-angiogenice observată prin screening-ul a 24 de proteine asociate cu aceste procese, în timp ce nivelul proteinelor anti-inflamatoare și anti-angiogenice au fost doar puțin sau deloc afectate (Fig. VI.4) (Wang *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2001; Ashida *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009).

**Tabel VI.1.**

**Timpul de dublare (DT) a creșterii carcinomului de colon C26  
în urma tratamentelor administrate**

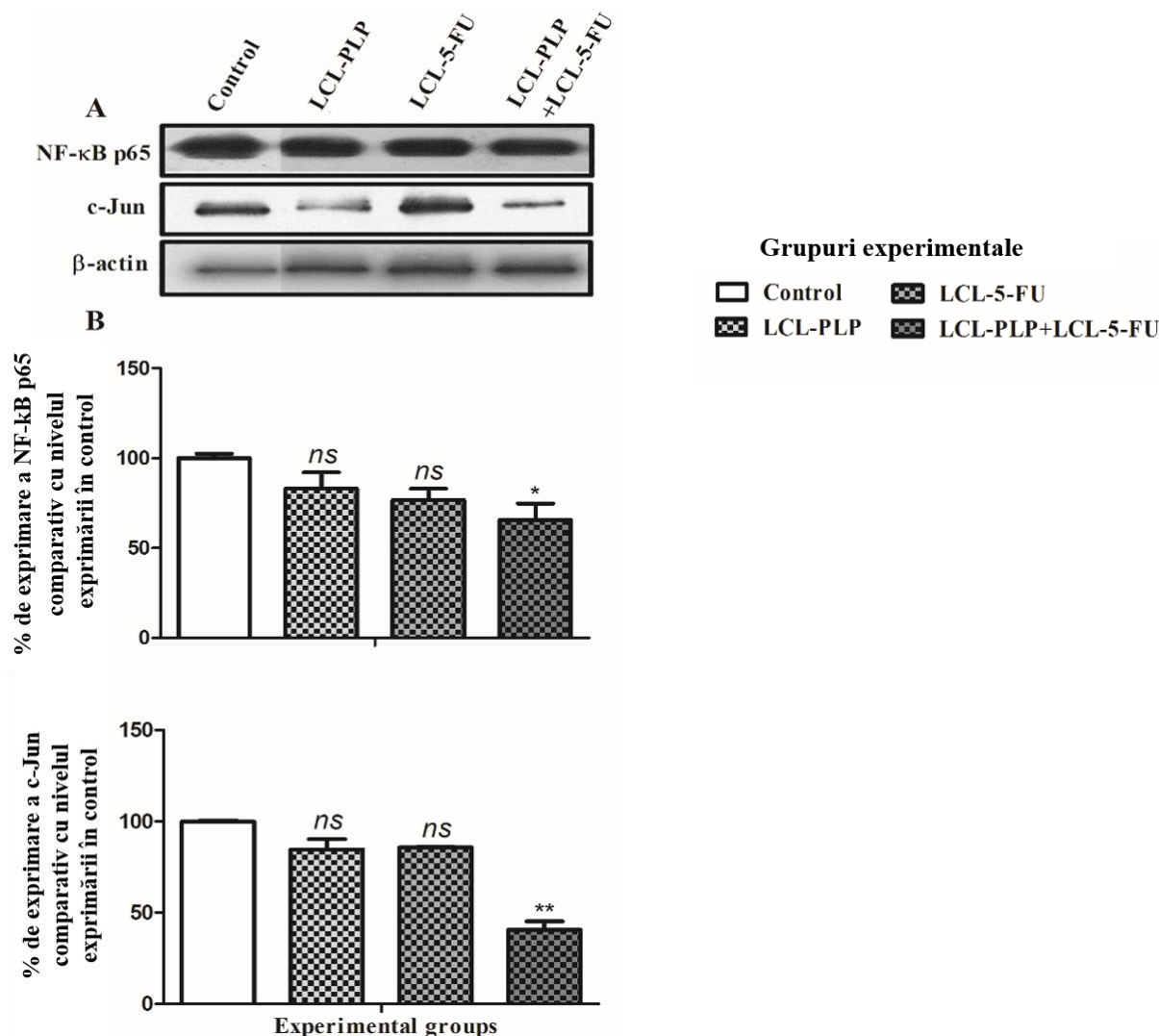
Grupuri experimentale	Timpul de dublare (zile)
Control	1.864
LCL	1.531
PLP	1.771
LCL-PLP	2.040
5-FU	1.764
LCL-5-FU	1.996
PLP+5-FU	1.905
LCL-PLP+LCL-5-FU	5.364

Control = grup netratat; LCL = grup tratat cu liposomi goi; PLP sau LCL-PLP au fost administrate într-o doză de 20 mg/kg drug în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; 5-FU sau LCL-5-FU au fost administrate într-o doză de 1.2 mg/kg 5-FU în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale.



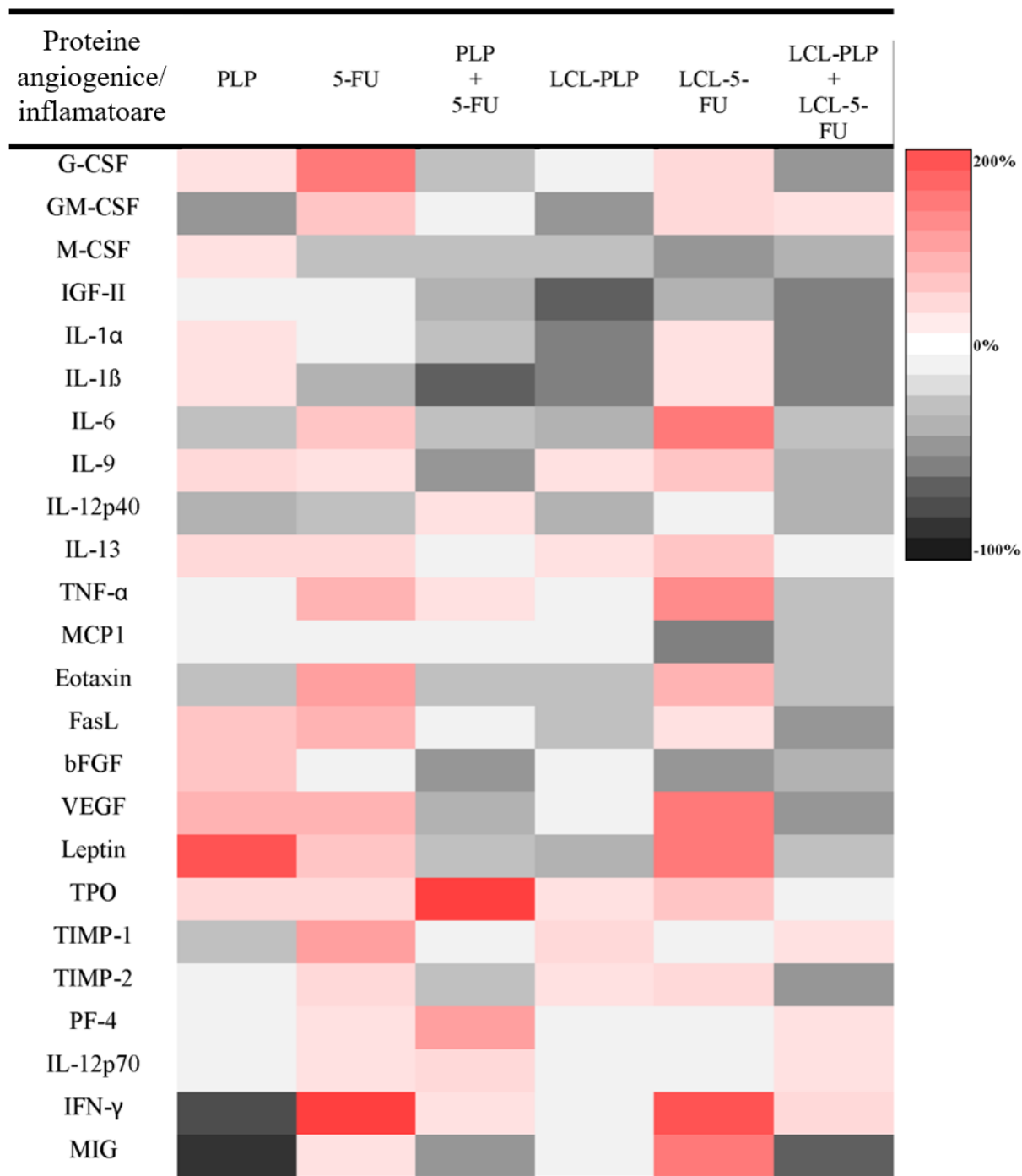
**Figura VI.2. Efectele a două scheme diferite de administrare a terapiilor combinate (LCL-PLP+LCL-5-FU versus LCL-PLP/LCL-5-FU) asupra creșterii carcinomului de colon C26.** Graficul arată volumele tumorale în ziua 18 după inocularea celulelor tumorale (când tumorile din control au ajuns la 2,000 mm<sup>3</sup>). Rezultatele au fost comparate cu controlul și exprimate ca medie ± SD a volumelor tumorale a 5-6 șoareci. *ns* - nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; Control = grup netratat; LCL-PLP+LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP și 1.2 mg/kg LCL-5-FU în zilele 8 și 11; LCL-PLP/LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP în zilele 7 și 10 after și cu 1.2 mg/kg LCL-5-FU în zilele 8 și 11.

În plus, reducerea considerabilă atât a factorilor de transcriere, cât și a anumitor proteine pro-angiogenice (bFGF, VEGF) și pro-inflamatoare (IL-1 $\alpha$ , IL-12p40, TNF- $\alpha$ , MCP-1, FasL) ar putea explica capacitatea terapiei liposomale combinate de a afecta, în plus, și proliferarea celulelor tumorale și de a induce apoptoza acestora (Takahashi *et al.*, 1996; Salven *et al.*, 1998; Casanovas *et al.*, 2005; Ashida *et al.*, 2005; Igney și Krammer, 2005; Tammali *et al.*, 2006; Nai *et al.*, 2007; Nowis *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2009).



**Figura VI.3. Efectele diferitelor tratamente asupra nivelului intratumoral al factorilor de transcriere NF- $\kappa$ B și c-Jun AP-1.** (A) Rezultatele analizei western blot pentru NF- $\kappa$ B p65 și c-Jun în homogenatele tisulare din fiecare grup experimental suspus terapiilor cu formulări liposomale. Tratamentele au fost administrate în ziua 8 și 11; Control = grup netratat (banda 1); LCL-PLP = grup tratat cu 20 mg/kg PLP sub formă liposomală (banda 2); LCL-5-FU = grup tratat cu 1.2 mg/kg 5-FU sub formă liposomală (banda 3); LCL-PLP+LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP și 1.2 mg/kg LCL-5-FU sub formă liposomală (banda 4).  $\beta$ -actina a fost controlul folosit. Cuantificarea rezultatelor western blot pentru nivelul de exprimare a NF- $\kappa$ B p65 (B) și pentru c-Jun (C). Nivelul de exprimare al proteinelor din fiecare grup experimental a fost comparat cu nivelul de exprimare al aceleiași proteine din control, iar datele au fost reprezentate ca medie  $\pm$  SD a două experimente independente; *ns* - nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Tratamentele cu PLP, 5-FU, PLP+5-FU, și LCL-5-FU au stimulat moderat (40-100%) sau puternic (100-200%) producția intratumorală a anumitor proteine dintre cele testate, comparativ cu producția acestora în control (Fig. VI.4).



**Figura VI.4. Efectele diferitelor tratamente asupra producției deproteine angiogenice și inflamatoare în țesutul carcinomului de colon C26.** Datele sunt reprezentate ca % medie de reducere a nivelului de proteine variind de la 0% (alb) la -100% (negru) sau stimulare (+) a producerii proteinelor variind de la 0% (alb) la +200% (roșu) comparativ cu nivelul aceluiași proteine în tumorile control. Toate tratamentele au fost administrate în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; PLP sau LCL-PLP au fost administrate într-o doză de 20 mg/kg medicament. 5-FU sau LCL-5-FU au fost administrate într-o doză de 1.2 mg/kg medicament.

### VI.3.3. Tratamentul cu LCL-PLP+LCL-5-FU a favorizat redirecționarea TME spre un fenotip antitumoral în micromediul carcinomului de colon C26

Analiza imunohistochimică a țesuturilor tumorale a avut ca scop determinarea gradului de infiltrare a macrofagelor în tumori, deoarece polarizarea acestora înspre un fenotip protumoral sau antitumoral este un contributor critic la efectul terapeutic (De Palma și Lewis, 2013; Zhong et al., 2018; Mantovani et al., 2006). Scorurile oferite prin analiza calitativă a secțiunilor prezentată în Tabelul VI.3 a dezvăluit abundența celulelor pozitive pentru markerii F4/80 și iNOS doar în urma tratamentului cu LCL-5-FU (Tabel VI.3). Acest efect se datorează cel mai probabil supraexprimării proteinelor pro-angiogenice VEGF și leptină (Fig. VI.4), dar și concentrației reduse de 5-FU la nivelul tumorii (datorită dozelor mici folosite pentru acest agent terapeutic), care împreună denotă agresivitatea tumorii și ineficiența terapiei cu LCL-5-FU (Mantovani și Allavena, 2015). Dimptrivă, tumorile tratate cu LCL-PLP și LCL-PLP+LCL-5-FU au expus o inhibare puternică angiogenezei și inflamației tumorale (Fig. VI.1 și VI.4), care probabil a condus la infiltrarea ocazională a macrofagelor în țesutul tumoral deoarece s-au remarcat doar puține celule pozitive sau deloc pentru markerii F4/80 și iNOS (Tabel VI.3).

**Tabel VI.3.**

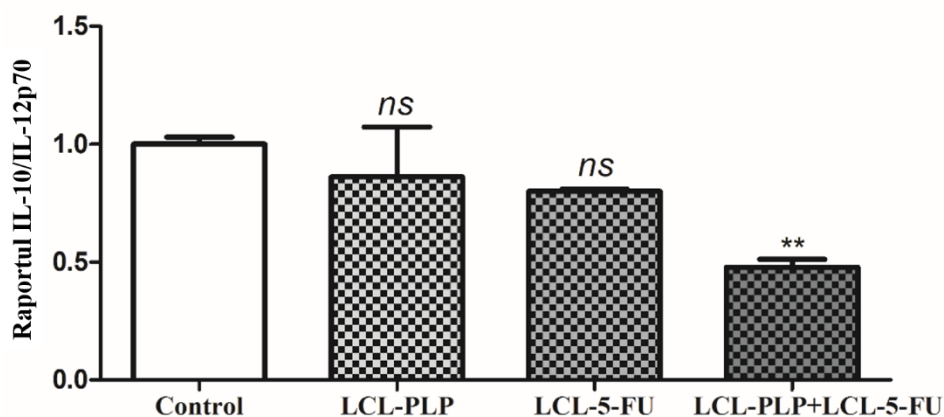
#### **Analiza imunohistochimică a gradului de infiltrare a macrofagelor în țesutul carcinomului de colon C26 în urma tratamentelor administrate**

Marker	Grupuri experimentale			
	Control	LCL-PLP	LCL-5-FU	LCL-PLP+LCL-5-FU
F4/80	+	+	+++	+
iNOS	++	+	+++	+

Control = grup netratat; Tratamentul a fost administrat în zilele 8 și 11. LCL-PLP = grup tratat cu 20 mg/kg PLP sub formă liposomală; LCL-5-FU = grup tratat cu 1.2 mg/kg 5-FU sub formă liposomală; LCL-PLP+LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP și 1.2 mg/kg LCL-5-FU. Numărul celulelor pozitive pentru markerii F4/80 și iNOS din fiecare grup experimental a fost categorisit în trei grupuri în funcție de densitatea acestor celule : +, puține; ++, moderate; +++, multe.

Pentru o imagine de ansamblu mai bună asupra efectelor terapiei liposomale combinate abordată în acest studiu asupra polarizării celulelor TME, am determinat nivelul de producție al citokinelor antagoniste IL-10 (marker pentru macrofagele M2) și IL-12p70 (marker pentru macrofagele M1), care au fost exprimate ca % al nivelului de exprimare comparativ cu nivelul acestor proteine în control (tumori netratate), iar raportul IL-10/IL-12p70 a fost calculat pentru fiecare grup experimental și prezentat în Fig. VI.5 (Michielsen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Atunci când a fost administrată terapia liposomală combinată s-a observat o reducere de 2 ori a

raportului IL-10/IL-12p70 ( $P=0.0037$ ) în timp ce terapiile liposomale singure nu au avut niciun efect asupra acestui raport (Fig. VI.5). Acest efect, împreună cu reducerea nivelului de proteine M-CSF, IL-6 (Fig. VI.4), și a gradului de exprimare a NF- $\kappa$ B (Fig. VI.3A și B) indus de terapia liposomală combinată, sugerează conversia celulelor sistemului imun de la un fenotip imunosupresiv la unul antitumoral (Rolny *et al.*, 2011; Cook și Hagemann, 2013).

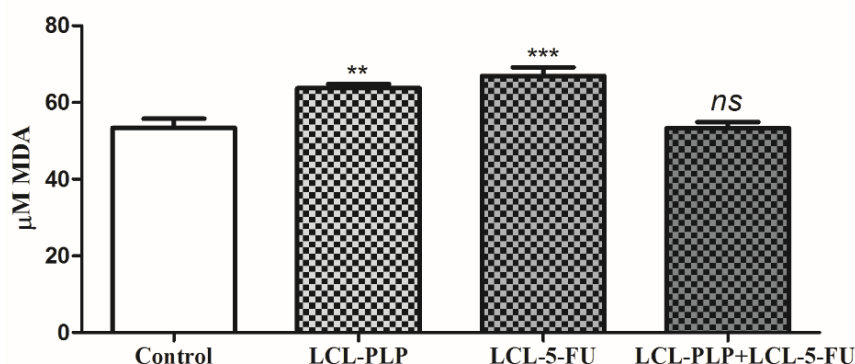


**Figura VI.5. Efectele diferitelor tratamente liposomale asupra raportului IL-10/IL-12p70 în țesutul carcinomului de colon murin.** Nivelul de exprimare al citokinelor IL-10 și IL-12p70 este reprezentat ca % medie  $\pm$  SD comparativ cu exprimarea aceluiași proteine în control. Tratamentele au fost administrate în zilele 8 și 11 pentru toate grupurile experimentale. Control = grup netratat; LCL-PLP = grup tratat cu 20 mg/kg PLP sub formă liposomală; LCL-5-FU = grup tratat cu 1.2 mg/kg 5-FU sub formă liposomală; LCL-PLP+LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP și 1.2 mg/kg LCL-5-FU; ns - nesemnificativ,  $P>0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ .

#### VI.3.4. Terapia liposomală combinată controlează progresia micromediului carcinomului de colon C26 asociată cu stresul oxidativ intratumoral

Ambele terapii liposomale administrate separat au indus un efect pro-oxidant asupra tumorilor care se încadrează în intervalul proliferativ ( $\mu$ M) al stresului oxidativ tumoral și care ar putea fi asociat cu rezistența la tratament mediata de ROS care ar putea explica activitatea antitumorală redusă a acestor terapii (Fig. VI.1A-E, Fig. VI.6 și Tabel VI.1) (Licarete *et al.*, 2015; Boonyong *et al.*, 2017). Deoarece alte studii recente au dovedit că stresul oxidativ intratumoral potențează capacitatea angiogenică a micromediului carcinomului de colon C26 (Luput *et al.*, 2017), este posibil ca administrarea LCL-5-FU să inducă agresivitate tumorilor, lucru susținut și de nivelul crescut de VEGF, leptin, IL-6, și IL-13 în micromediul acestor tumori (Fig. VI.4 și VI.6) (Becker *et al.*, 2004; Pucci *et al.*, 2009; Bendardaf *et al.*, 2009; Gordon și Martinez, 2010; Gonzalez-Perez *et al.*, 2013; Guerriero *et al.*, 2013). Cu toate acestea, efectul protumoral al terapiilor administrate separat a putut fi contracarat de administrarea simultană a tratamentelor liposomale, efect indicat de nivelul de MDA, care a fost menținut la același nivel cu cel din

tumorile control după tratamentul cu LCL-PLP+LCL-5-FU (Fig. VI.6). Acest lucru sugerează capacitatea terapiei liposomale combinate de a controla stresul oxidativ tumoral.



**Figura VI.6. Efectele diferitelor tratamente asupra nivelului de MDA din omogenatele tumorale.**

Tratamentele au fost aplicate în zilele 8 și 11. Datele au fost reprezentate ca medie  $\pm$  SD a 3 măsurători. Control = grup netratat; LCL-PLP = grup tratat cu 20 mg/kg PLP sub formă liposomală; LCL-5-FU = grup tratat cu 1.2 mg/kg 5-FU sub formă liposomală; LCL-PLP+LCL-5-FU = grup tratat cu 20 mg/kg LCL-PLP și 1.2 mg/kg LCL-5-FU sub formă liposomală; *ns* - nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

#### VI.4. Concluzii

Ținând cont de toate rezultatele obținute, studiul de față demonstrează eficacitatea antitumorală crescută a terapiei liposomale combinate propuse care constă în administrarea simultană a LCL-PLP și LCL-5-FU în comparație cu rezultatul obținut în cazul terapiilor liposomale singulare, asupra carcinomului de colon C26. Mecanismul de acțiune care stă la baza activității antitumorale LCL-PLP+LCL-5-FU a constat în inhibarea angiogenezei și inflamației tumorale într-un micromediu de carcinom de colon C26 care a fost redirecționat înspre un fenotip antineoplasic.

#### VII. Concluzii generale

Primul studiu (**Capitolul IV**) a sugerat faptul că celulele de cancer de colon C26 tratate cu un agent citotoxic au achiziționat un fenotip anti-apoptotic, mai rezistent, și au produs TEV care au avut capacitatea de a modifica răspunsul altor celule canceroase sau al macrofagelor la tratamentul cu același agent terapeutic *in vitro*. Acest lucru a subliniat importanța EV ca mediatori ai rezistenței la terapie prin implicarea lor în comunicarea dintre celule tumorale și macrofage, motiv pentru care în continuare au fost studiate efectele acestei comunicări asupra răspunsului la terapia anticanceroasă într-un model de co-cultură de celule de cancer de colon și TAM, *in vitro*.

Rezultatele prezentate în **Capitolul V** subliniază rolul dual pe care TAM îl au în modularea răspunsului celulelor C26 la agentul cytotoxic 5-FU, deoarece cu toate că TAM au contribuit la inhibarea proteinelor implicate în angiogenază și inflamație sub acțiunea 5-FU, aceste celule au protejat în același timp celulele canceroase de stresul oxidativ indus de 5-FU, menținând un stres

oxidativ fiziologic. Acest studiu propune ca abordările terapeutice să țintească TAM în sensul diminuării capacității acestor celule de a menține stresul oxidativ într-un interval fiziologic.

Ultimul studiu prezentat în această teză (**Capitolul VI**) a propus o nouă terapie liposomală combinată țintită (LCL-PLP și LCL-5-FU) și studiat mecanismul de acțiune al acestei terapii, demonstrând că efectul antitumoral puternic observat se datorează efectului singergistic exercitat de administrarea simultană a celor două formulări liposomale. Astfel, LCL-PLP a potențat efectele citotoxice ale 5-FU, iar împreună, cei doi agenți au indus în micromediul tumorilor de carcinom de colon murin C26 un răspuns anti-inflamator și anti-angiogenic puternic, caracterizat prin polarizarea celulelor TME spre un fenotip antineoplastic *in vivo*. Prin urmare, terapia pe bază de LCL-PLP și LCL-5-FU propusă a țintit procesele protumorale mediate de TAM și poate fi optimizată pentru studii ulterioare care vizează țintirea TME.



## Bibliografie

- Achim M., Tomuta I., Muntean D., Porfire A., Tefas L. R., Patras L., Licarete E., Alupei M. C., Vlase L., Banciu M. (2017). Optimization and *in vitro* evaluation of 5-fluorouracil – loaded long – circulating liposomes. *Farmacia* 65, 82-91.
- Alupei, M. C., Licarete, E., Patras, L., and Banciu, M. (2015). Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Letters* 356(2 Pt B):946-952.
- Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K., Lakshmanan, V.-K., and Jayakumar, R. (2014). Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1840, 2730–2743.
- Ashida, R., Tominaga, K., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., *et al.* (2005). AP-1 and colorectal cancer. *Inflammopharmacology* 13, 113–125.
- Atai, N. A., Balaj, L., van Veen, H., Breakefield, X. O., Jarzyna, P. A., Van Noorden, C. J. F., *et al.* (2013). Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *Journal of Neuro-Oncology* 115, 343–351.
- Austyn, J. M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology* 11, 805–815.
- Azmi, A. S., Bao, B., and Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews* 32, 623–642.
- Azuma, M., Yamashita, T., Aota, K., Tamatani, T., and Sato, M. (2001). 5-Fluorouracil suppression of NF-KappaB is mediated by the inhibition of Ikb kinase activity in human salivary gland cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 292–296.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357, 539–545.
- Banciu, M., Fens, M. H. A. M., Storm, G., and Schiffelers, R. M. (2008a). Antitumor activity and tumor localization of liposomal glucocorticoids in B16 melanoma-bearing mice. *Journal of Controlled Release* 127, 131–136.
- Banciu, M., Metselaar, J. M., Schiffelers, R. M., and Storm, G. (2008b). Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue. *Neoplasia* 10, 108–117.
- Banciu, M., Schiffelers, R. M., Fens, M. H. a M., Metselaar, J. M., and Storm, G. (2006). Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate on B16 melanoma in mice. *Journal of Controlled Release* 113, 1–8.
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., and Lyden, D. (2016). Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* 30, 836–848.
- Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., *et al.* (2004). IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* 4, 220–223.
- Bendardaf, R., Buhmeida, A., Hilska, M., Laato, M., Syrjänen, S., Syrjänen, K., *et al.* (2009). MMP-9 (Gelatinase B) expression is associated with disease-free survival and disease-specific survival in colorectal cancer patients. *Cancer Investigation* 28, 38–43.



- Bharali, D. J., and Mousa, S. A. (2010). Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise. *Pharmacology & Therapeutics* 128, 324–335.
- Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., and Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical Research* 33, 2373–2387.
- Boonyong, C., Pattamadilok, C., Suttisri, R., and Jianmongkol, S. (2017). Benzophenones and xanthone derivatives from *Garcinia schomburgkiana* -induced P-glycoprotein overexpression in human colorectal Caco-2 cells via oxidative stress-mediated mechanisms. *Phytomedicine* 27, 8–14.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- Buchbinder, E. I., and Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology* 39, 98–106.
- Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309.
- Casazza, A., Di Conza, G., Wenes, M., Finisguerra, V., Deschoemaeker, S., and Mazzone, M. (2014). Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene* 33, 1743–1754.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. (Georgia), and Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 1310–1316.
- Choo, M. K., Sakurai, H., Koizumi, K., and Saiki, I. (2005). Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF- $\alpha$  promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Letters* 230, 47–56.
- Chow, A., Zhou, W., Liu, L., Fong, M. Y., Champer, J., Van Haute, D., *et al.* (2014). Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Scientific Reports* 4, 5750.
- Clares, B., Biedma-Ortiz, R. A., Sáez-Fernández, E., Prados, J. C., Melguizo, C., Cabeza, L., *et al.* (2013). Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85, 329–338.
- Cook, J., and Hagemann, T. (2013). Tumour-associated macrophages and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 13, 595–601.
- Cooks, T., Pateras, I. S., Jenkins, L. M., Patel, K. M., Robles, A. I., Morris, J., *et al.* (2018). Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nature Communications* 9, 771.
- Crowther, M., Brown, N. J., Bishop, E. T., and Lewis, C. E. (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *Journal of leukocyte biology* 70, 478–490.
- Cui, D., Cao, D., Yang, Y., Qiu, M., Huang, Y., and Yi, C. (2014). Effect of BRAF V600E mutation on tumor response of anti-EGFR monoclonal antibodies for first-line metastatic colorectal cancer treatment: a meta-analysis of randomized studies. *Molecular Biology Reports* 41, 1291–1298.

- Cutsem, E. V., Hoff, P. M., Harper, P., Bukowski, R. M., Cunningham, D., Dufour, P., *et al.* (2004). Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. *British Journal of Cancer* 90, 1190–1197.
- De Palma, M., and Lewis, C. E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer cell* 23, 277–286.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., and Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15, 316–328.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell* 18, 884–901.
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., and Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 347–357.
- Fu, Y., Yang, G., Zhu, F., Peng, C., Li, W., Li, H., *et al.* (2014). Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell death & disease* 5, e983.
- Gabizon, A., and Papahadjopoulos, D. (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6949–6953.
- Gonzalez-Perez, R., Lanier, V., and Newman, G. (2013). Leptin's pro-angiogenic signature in breast cancer. *Cancers* 5, 1140–1162.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry* 177, 751–766.
- Guerriero, E., Capone, F., Rusolo, F., Colonna, G., Castello, G., and Costantini, S. (2013). Dissimilar cytokine patterns in different human liver and colon cancer cell lines. *Cytokine* 64, 584–589.
- Gutschalk, C. M., Yanamandra, A. K., Linde, N., Meides, A., Depner, S., and Mueller, M. M. (2013). GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer medicine* 2, 117–129.
- Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. a, Kulbe, H., Thompson, R. G., *et al.* (2008). “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 205, 1261–1268.
- Heinemann, V., Douillard, J. Y., Ducreux, M., and Peeters, M. (2013). Targeted therapy in metastatic colorectal cancer - an example of personalized medicine in action. *Cancer Treatment Reviews* 39, 592–601.
- Herbeuval, J.-P., Lelievre, E., Lambert, C., Dy, M., and Genin, C. (2004). Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. :1950)* 172, 4630–4636.
- Hwang, P. M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T. A., Murphy, M. P., *et al.* (2001). Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nature medicine* 7, 1111–1117.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2005). Tumor counterattack: Fact or fiction? *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54, 1127–1136.
- Kanada, M., Bachmann, M. H., and Contag, C. H. (2016). Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends in Cancer* 2, 84–94.

- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., *et al.* (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12, 655–664.
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., *et al.* (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 14, 195–204.
- Kooijmans, S. A. A., Vader, P., van Dommelen, S. M., van Solinge, W. W., and Schiffelers, R. M. (2012). Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International Journal of Nanomedicine* 7, 1525–1541.
- Kou, X.-X., Li, C.-S., He, D.-Q., Wang, X.-D., Hao, T., Meng, Z., *et al.* (2015). Estradiol promotes M1-like macrophage activation through cadherin-11 to aggravate temporomandibular joint inflammation in rats. *The Journal of Immunology* 194, 2810–2818.
- Krishnaiah, Y., Satyanarayana, V., Kumar, B. D., and Karthikeyan, R. (2002). *In vitro* drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmacological Sciences* 16, 185–192.
- Kumar K.V. (2012). Targeted delivery of nanomedicines. *International Scholarly Research Notices Pharmacology* 2012, 571394.
- Kundu, N., Zhang, S., and Fulton, A. M. (1995). Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis* 13, 16–22.
- Leung, E. L., Fraser, M., Fiscus, R. R., and Tsang, B. K. (2008). Cisplatin alters nitric oxide synthase levels in human ovarian cancer cells: involvement in p53 regulation and cisplatin resistance. *British Journal of Cancer* 98, 1803–1809.
- Lewis, C. E., and Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 66, 605–612.
- Li, H., Fan, X., and Houghton, J. M. (2007). Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 101, 805–815.
- Licarete, E., Sesarman, A., and Banciu, M. (2015). Exploitation of pleiotropic actions of statins by using tumour-targeted delivery systems. *Journal of Microencapsulation* 32, 619–631.
- Lind, D. S., Hochwald, S. N., Malaty, J., Rekkas, S., Hebig, P., Mishra, G., *et al.* (2001). Nuclear factor- $\kappa$ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 130, 363–369.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3, 330–338.
- Lou, G., Song, X., Yang, F., Wu, S., Wang, J., Chen, Z., *et al.* (2015). Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology* 8.
- Lunavat, T. R., Cheng, L., Einarsdottir, B. O., Olofsson Bagge, R., Veppil Muralidharan, S., Sharples, R. A., *et al.* (2017). BRAFV600inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E5930–E5939.
- Luput, L., Licarete, E., Sesarman, A., Patras, L., Alupeii, M. C., and Banciu, M. (2017). Tumor-associated macrophages favor C26 murine colon carcinoma cell proliferation in an oxidative stress-dependent manner. *Oncology Reports* 37, 2472–2480.
- Machover, D. (1997). A comprehensive review of 5-fluorouracil and leucovorin in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 80, 1179–1187.

- Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation* 41, 189–207.
- Mancino, A., and Lawrence, T. (2010). Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. *Clinical Cancer Research* 16, 784–789.
- Mantovani, A., and Allavena, P. (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 212, 435–445.
- Mantovani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004a). Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *European Journal of Cancer* 40, 1660–1667.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology* 229, 176–185.
- Mantovani, A., and Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33, 1478–1483.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumor-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, 399–416.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004b). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677–686.
- Marabelle, A., and Gray, J. (2015). Tumor-targeted and immune-targeted monoclonal antibodies: Going from passive to active immunotherapy. *Pediatric Blood Cancer* 62, 1317–1325.
- Marcucci, F., and Lefoulon, F. (2004). Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discovery Today* 9, 219–228.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(10), 7303–7311.
- Meads, M. B., Gatenby, R. A., and Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature Reviews Cancer* 9, 665–674.
- Michielsen, A. J., Hogan, A. E., Marry, J., Tosetto, M., Cox, F., Hyland, J. M., *et al.* (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS ONE* 6, e27944.
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., and Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3, 24641.
- Nai, Y.-J., Jiang, Z.-W., Wang, Z.-M., Li, N., and Li, J.-S. (2007). Prevention of cancer cachexia by pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in colon 26 tumor-bearing mice. *Journal of parenteral and enteral nutrition* 31, 18–25.
- Nair, L., Jagadeeshan, S., Nair, S. A., and Kumar, G. V. (2011). Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International Journal of Nanomedicine* 6, 1685–1697.
- Ng, M., and Cunningham, D. (2004). Cetuximab (Erbix) – an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *International Journal of Clinical Practice* 58, 970–976.

- Nowis, D., McConnell, E. J., Dierlam, L., Palamarchuk, A., Lass, A., and Wójcik, C. (2007). TNF potentiates anticancer activity of bortezomib (Velcade®) through reduced expression of proteasome subunits and dysregulation of unfolded protein response. *International Journal of Cancer* 121, 431–441.
- Ortiz, R., Prados, J., Melguizo, C., Arias, J. L., Ruiz, M. A., Alvarez, P. J., *et al.* (2012). 5-Fluorouracil-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles combined with phage E gene therapy as a new strategy against colon cancer. *International Journal of Nanomedicine* 7, 95–107.
- Park, J. E., Dutta, B., Tse, S. W., Gupta, N., Tan, C. F., Low, J. K., *et al.* (2019). Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift. *Oncogene*. 38(26), 5158-5173.
- Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K., and Kwon, I. C. (2010b). Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 28–41.
- Patras, L., Sesarman, A., Licarete, E., Luca, L., Alupei, M. C., Rakosy-Tican, E., *et al.* (2016). Dual role of macrophages in the response of C26 colon carcinoma cells to 5-fluorouracil administration. *Oncology Letters* 12(2), 1183–1191.
- Peeters, M., Cervantes, A., Moreno Vera, S., and Taieb, J. (2018). Trifluridine/tipiracil: an emerging strategy for the management of gastrointestinal cancers. *Future Oncology* 14, 1629–1645.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* 18, 883–891.
- Pitt, J. M., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2016). Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *The Journal of clinical investigation* 126, 1139–1143.
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 4, 71–78.
- Porfire, A., Tomuta, I., Muntean, D., Luca, L., Licarete, E., Alupei, M. C., *et al.* (2014). Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *Journal of Liposome Research* 25, 261–269.
- Pucci, S., Mazzarelli, P., Sesti, F., Boothman, D. A., and Spagnoli, L. G. (2009). Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression. *Cell Cycle* 8, 473–481.
- Quatromoni, J. G., and Eruslanov, E. (2012). Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *American journal of translational research* 4, 376–89.
- Rahat, M. a., and Hemmerlein, B. (2013). Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Frontiers in Physiology* 4 JUN, 1–15.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* 200, 373–383.
- Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M., and Chaney, S. G. (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Seminars in Oncology* 25, 4–12.
- Ren, G., Liu, D., Guo, W., Wang, M., Wu, C., Guo, M., *et al.* (2016). Docetaxel prodrug liposomes for tumor therapy: characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Delivery* 23, 1272–1281.



- Riganti, C., Miraglia, E., Viarisio, D., Costamagna, C., Pescarmona, G., Ghigo, D., *et al.* (2005). Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux. *Cancer Research* 65, 516–525.
- Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., *et al.* (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 19, 31–44.
- Ryan, A. E., Colleran, A., O’Gorman, A., O’Flynn, L., Pindjaco, J., Lohan, P., *et al.* (2014). Targeting colon cancer cell NF- $\kappa$ B promotes an anti-tumour M1-like macrophage phenotype and inhibits peritoneal metastasis. *Oncogene*, 1–12.
- Safaei, R. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 4, 1595–1604.
- Sakamoto, K., Maeda, S., Hikiba, Y., Nakagawa, H., Hayakawa, Y., Shibata, W., *et al.* (2009). Constitutive NF- $\kappa$ B activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2248–2258.
- Salven, P., Ruotsalainen, T., Mattson, K., and Joensuu, H. (1998). High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 79, 144–146.
- Schiffelers, R., Fens, M., Janssen, A., Molema, G., and Storm, G. (2005). Liposomal targeting of angiogenic vasculature. *Current Drug Delivery* 2, 363–368.
- Shao, Y., Chen, T., Zheng, X., Yang, S., Xu, K., Chen, X., *et al.* (2018b). Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis* 39, 1368–1379.
- Sharma, A. (2017). Chemoresistance in cancer cells: exosomes as potential regulators of therapeutic tumor heterogeneity. *Nanomedicine* 12, 2137–2148.
- Shen, M., and Ren, X. (2018). New insights into the biological impacts of immune cell-derived exosomes within the tumor environment. *Cancer Letters* 431, 115–122.
- Siegert, A., Denkert, C., Leclere, A., and Hauptmann, S. (1999). Suppression of the reactive oxygen intermediates production of human macrophages by colorectal adenocarcinoma cell lines. *Immunology* 98, 551–556.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology* 86, 1065–1073.
- Stout, R. D., Watkins, S. K., and Suttles, J. (2009). Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 1105–1109.
- Subudhi, M. B., Jain, A., Jain, A., Hurkat, P., Shilpi, S., Gulbake, A., *et al.* (2015). Eudragit S100 coated citrus pectin nanoparticles for colon targeting of 5-fluorouracil. *Materials* 8, 832–849.
- Sun, L., Luo, C., and Liu, J. (2014). Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. *Food & Function* 5, 1909.
- Sylvester, B., Porfire, A., Muntean, D.-M., Vlase, L., Lupuț, L., Licarete, E., *et al.* (2016). Optimization of prednisolone-loaded long-circulating liposomes via application of Quality by Design (QbD) approach. *Journal of Liposome Research* 28, 49–61.

- Takahashi, Y., Mai, M., Wilson, M., Kitadai, Y., Bucana, C., and Ellis, L. (1996). Site-dependent expression of vascular endothelial growth factor, angiogenesis and proliferation in human gastric carcinoma. *International Journal of Oncology*. doi:10.3892/ijo.8.4.701.
- Tammali, R., Ramana, K. V., Singhal, S. S., Awasthi, S., and Srivastava, S. K. (2006). Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research* 66, 9705–9713.
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 131–135.
- Uetsuka, H., Haisa, M., Kimura, M., Gunduz, M., Kaneda, Y., Ohkawa, T., *et al.* (2003). Inhibition of inducible NF- $\kappa$ B activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line. *Experimental Cell Research* 289, 27–35.
- Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., and Ohyashiki, J. H. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 124, 3748–3757.
- Vader, P., Breakefield, X. O., and Wood, M. J. A. (2014). Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 20, 385–393.
- Vader, P., Fens, M. H., Sachini, N., van Oirschot, B. A., Andringa, G., Egberts, A. C., *et al.* (2013). Taxol®-induced phosphatidylserine exposure and microvesicle formation in red blood cells is mediated by its vehicle Cremophor®EL. *Nanomedicine* 8, 1127–1135.
- Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., and Schiffelers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 106, 148–156.
- Van Cutsem, E., Joulain, F., Hoff, P. M., Mitchell, E., Ruff, P., Lakomý, R., *et al.* (2016). Afibercept plus FOLFIRI vs. placebo plus FOLFIRI in second-line metastatic colorectal cancer: a post hoc analysis of survival from the phase III VELOUR study subsequent to exclusion of patients who had recurrence during or within 6 months of completing adjuvant oxaliplatin-based therapy. *Targeted Oncology* 11, 383–400.
- Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., *et al.* (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1658–1664.
- van Dommelen, S. M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S. A. A., van Solinge, W. W., Wood, M. J. A., *et al.* (2012). Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 161, 635–644.
- Wang, H., Birkenbach, M., and Hart, J. (2000). Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 21, 1313–1317.
- Waniczek, D., Lorenc, Z., Śnietura, M., Wesecki, M., Kopec, A., and Muc-Wierzgoń, M. (2017). Tumor-Associated Macrophages and Regulatory T Cells Infiltration and the Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis (Warsz)* 65(5), 445–454.
- Wartenberg, M., Schallenberg, M., Hescheler, J., and Sauer, H. (2003). Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *International Journal of Cancer* 104, 274–282.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27(45), 5904–5912.
- Wolpin, B. M., and Mayer, R. J. (2008). Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134, 1296–1310.

- Xu, Y., and Villalona-Calero, M. A. (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Annals of Oncology* 13, 1841–1851.
- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., *et al.* (2015a). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharmaceutical Research* 32(6), 2003–2014.
- Yuan, Z., Kolluri, K. K., Gowers, K. H. C., and Janes, S. M. (2017). TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *Journal of Extracellular Vesicles* 6, 1265291.
- Yuana, Y., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2013). Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood reviews* 27, 31–39.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., and Chen, W.-S. (2008b). 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13, 1551–1569.
- Zhong, X., Chen, B., and Yang, Z. (2018). The role of tumor-associated macrophages in colorectal carcinoma progression. *Cellular Physiology and Biochemistry* 45, 356–365.
- Zhou, J., Li, X., Wu, X., Zhang, T., Zhu, Q., Wang, X., *et al.* (2018). Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunology Research* 6, 1578–1592.
- Zins, K., Abraham, D., Sioud, M., and Aharinejad, S. (2007). Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Research* 67, 1038–1045.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology* 6, 715–727.



## **Lista publicațiilor incluse în teză sub forma de capitole sau subcapitole**

### **Capitolul I.**

Alexandra Doina Rusu, **Laura Patras**, Manuela Banciu. 2015. Overview on nanoparticulate formulations for 5-Fluorouracil delivery in colorectal cancer treatment. *Studia Biologia*; 60(2):89-96.

### **Capitolul II.**

**Laura Patras** and Manuela Banciu. 2019. Intercellular crosstalk via extracellular vesicles in tumor milieu as emerging therapies for cancer progression. *Current Pharmaceutical Design (accepted for publication in the Special Issue entitled: "Active Nanotargeting in Medicine")* DOI: 10.2174/1381612825666190701143845.

### **Capitolul IV.**

**Laura Patras**, Marcel H.A.M. Fens, Pieter Vader, Arjan Barendrecht, Manuela Banciu, Raymond Schiffelers. 2019. Doxorubicin-elicited tumor extracellular vesicles modulate the response of stromal cells to chemotherapy *in vitro*. (*submitted for publication*)

### **Capitolul V.**

**Laura Patras**, Alina Sesarman, Emilia Licarete, Lavinia Luca, Marius Costel Alupei, Elena Rakosy-Tican, Manuela Banciu. 2016. Dual role of macrophages in the response of C26 colon carcinoma cells to 5-fluorouracil administration. *Oncology Letters*; 12(2):1183–1191. DOI: 10.3892/ol.2016.4708.

### **Capitolul VI.**

**Laura Patras**, Bianca Sylvester, Lavinia Luput, Alina Sesarman, Emilia Licarete, Alina Porfire, Dana Muntean, Denise Minerva Drotar, Alexandra Doina Rusu, Andras-Laszlo Nagy, Cornel Catoi, Ioan Tomuta, Laurian Vlase, Manuela Banciu, Marcela Achim. 2017. Liposomal prednisolone phosphate potentiates the antitumor activity of liposomal 5-fluorouracil in C26 murine colon carcinoma *in vivo*. *Cancer Biology & Therapy*; 18(8):616-626. DOI: 10.1080/15384047.2017.1345392.