

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**EXPLOATAREA POTENȚIALULUI TERAPEUTIC AL  
UNOR AGENȚI AI MODULĂRII STRESULUI  
OXIDATIV ÎN MELANOM**

**~Rezumat~**

**Conducător Științific**

**PROF. DR. ELENA RAKOSY**

**Doctorand**

**VALENTIN-FLORIAN RAUCA**

**CLUJ-NAPOCA  
2020**

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**EXPLOATAREA POTENȚIALULUI TERAPEUTIC AL  
UNOR AGENȚI AI MODULĂRII STRESULUI  
OXIDATIV ÎN MELANOM**

**~Rezumat~**

**Conducător Științific**

**PROF. DR. ELENA RAKOSY**

**Doctorand**

**VALENTIN-FLORIAN RAUCA**

**CLUJ-NAPOCA**

**2020**

## CUPRINS

<b>Capitolul I. Stresul oxidativ favorizează procese cu rol major în cancer</b> .....	9
<b>1. Stresul oxidativ și inflamația ca factori de risc în dezvoltarea melanomului</b> .....	9
<b>2. Stresul oxidativ și angiogeneza tumorală</b> .....	11
<b>3. Stresul oxidativ promovează fenotipuri agresive ale celulelor de melanom</b> .....	13
<b>4. Stresul oxidativ și imunosupresia</b> .....	16
4.1. Componentele ale sistemului imunitar prezente în micromediul tumoral .....	16
4.2. Plasticitatea fenotipică a macrofagelor .....	20
4.3. Macrofagele asociate tumorii susțin dezvoltarea cancerului și rezistența la terapie ...	23
<b>Capitolul II: Modularea stresului oxidativ tumoral, o abordare terapeutică inovatoare</b>	25
<b>1. Specii reactive de oxigen și sisteme endogene antioxidante</b> .....	25
<b>2. Terapii curente în melanom</b> .....	27
2.1. Sisteme de livrare a medicamentelor pe bază de nanoparticule .....	27
2.2. Tipuri de terapii țintite în melanom .....	29
<b>3. Agenți și terapii cu rol în modularea stresului oxidativ</b> .....	31
3.1. Compuși naturali .....	32
3.2. Compuși semisintetici: simvastatina .....	34
3.3. Compuși sintetici: DMXAA .....	36
3.4. Terapii antioxidante vs terapii pro-oxidante .....	39
<b>Capitolul III. Scopul tezei și obiective generale</b> .....	41
<b>Capitolul IV. Extracte din specii de <i>Ajuga</i> cu activitate biologică de modulare a unor procese esențiale pentru dezvoltarea celulelor canceroase</b> .....	42
<b>1. Introducere</b> .....	42
<b>2. Materiale și metode</b> .....	43
2.1. Substanțe chimice și reagenți .....	43
2.2. Prepararea de soluții standard .....	44
2.3. Probe din plante și proceduri de extracție .....	44
2.4. Conținutul total de fenoli, flavonoide și iridoizi al extractelor din partile aeriene .....	44
2.5. Cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC)-Spectrometrie de masă (MS) .....	45
2.6. Linii celulare și condiții de cultură .....	46
2.7. Testul de proliferare celulară .....	46
2.8. Prepararea lizatelor celulare .....	46

2.9. Analiza western blot a exprimării subunității p65 a factorului NF-κB .....	47
2.10. Măsurarea parametrilor de stres oxidativ .....	47
2.11. Analiza multivariată a datelor.....	48
2.12. Analiza statistică.....	48
<b>3. Rezultate</b> .....	49
3.1. Conținutul total de compuși bioactivi prin metoda HPLC-MS .....	49
3.2. Efect antiproliferativ al extractelor vegetale asupra liniilor celulare C26 și B16.F10.51	
3.3. Efect de inhibare a exprimării NF-κB-p65 în lizate totale din liniile celulare C26 și B16.F10 .....	53
3.4. Extractele din specii de <i>Ajuga</i> exercită acțiuni modulatorie asupra stresului oxidativ “fiziologic” al celulelor canceroase.....	54
3.5. Analiza multivariată a datelor .....	57
<b>4. Discuții</b> .....	59
<b>5. Concluzie</b> .....	62
<b>Capitolul V. Terapia combinată cu simvastatină și DMXAA suprimă sinergistic fenotipul agresiv al celulelor B16.F10 de melanom murin</b> .....	63
<b>1. Introducere</b> .....	63
<b>2. Materiale și metode</b> .....	65
2.1. Liniile celulare și condiții de cultură.....	65
2.2 Co-cultura celulelor B16.F10 cu macrofage.....	66
2.3. Prepararea soluțiilor de agenți terapeutici .....	66
2.4. Testul de proliferare celulară.....	67
2.5. Testul de apoptoză.....	67
2.6. Testul de migrare celulară .....	68
2.7. Prepararea lizatelor celulare .....	68
2.8. Determinarea cantitativă a malondialdehidei prin metoda HPLC.....	68
2.9. Determinarea conținutului de melanină din co-cultura B16.F10 - macrofage .....	69
2.10. Analiza western blot a exprimării factorului de transcriere HIF-1α.....	69
2.11. Analiza exprimării proteinelor angiogenice prin tehnica „array” pentru proteine ...70	
2.12. Cuantificarea exprimării unor markeri ai TAM prin tehnica Real Time PCR.....	70
2.13. Determinarea metabolitului oxid nitric în TAMs .....	71
2.14. Analiza statistică.....	71
<b>3. Rezultate</b> .....	71

3.1. Efect sinergistic al SIM și DMXAA asupra proliferării celulelor de melanom .....	71
3.2. Evaluarea acțiunii apoptotice/necrotice a SIM și DMXAA asupra micromediului tumoral generat de modelul <i>in vitro</i> .....	73
3.3. Tratamentul combinat reduce capacitatea de migrare a liniei de melanom B16.F10.	74
3.4. Puternic efect antioxidant al tratamentului combinat în co-cultură.....	75
3.5. Efectele tratamentului combinat asupra producției de melanină în co-cultură .....	76
3.6. Inhibarea producției de HIF-1 $\alpha$ de către tratamentul combinat.....	77
3.7. Suprimarea capacității angiogenice a micromediului tumoral în co-cultură.....	77
3.8. Tratamentul combinat induce “reeducerea” parțială a TAM.....	80
<b>4. Discuții</b> .....	81
<b>5. Concluzii</b> .....	84
<b>Capitolul VI. Co-administrarea agenților simvastatină și DMXAA încapsulați în liposomi perturbă mecanisme moleculare cu rol cheie în progresia melanomului malign</b> .....	85
<b>1. Introducere</b> .....	85
<b>2. Materiale și metode</b> .....	86
2.1. Prepararea și caracterizarea fizico-chimică a liposomilor .....	86
2.2. Linia celulară și modelul de tumoră murin <i>in vivo</i> .....	86
2.3. Evaluarea efectelor diferitelor tratamente asupra creșterii tumorale .....	87
2.4. Analiza imunohistochimică .....	87
2.5. Analiza exprimării proteinelor angiogenice prin tehnica „array” pentru proteine .....	88
2.6. Evaluarea producției de proteine intratumorale prin tehnica western blot .....	88
2.7. Evaluarea activității metaloproteinazelor MMP-2 și MMP-9 prin zimografie în gel.....	88
2.8. Determinarea parametrilor de stres oxidativ .....	89
2.9. Cuantificarea exprimării Arg-1, iNOS și IL-1 $\beta$ prin tehnica Real Time PCR .....	89
2.10. Analiza statistică.....	90
<b>3. Rezultate</b> .....	91
3.1. Caracterizarea formulărilor liposomale .....	91
3.2. Terapia liposomală combinată a redus cel mai eficient creșterea tumorală .....	91
3.3. Terapia liposomală combinată a determinat suprimarea capacității angiogenice a melanomului murin B16.F10 <i>in vivo</i> .....	93
3.4. Efecte modulatorie ale terapiei liposomale combinate asupra stresului oxidativ în cadrul micromediului tumoral. ....	96
3.5. Creșterea raportului Bax/Bcl-xL ca principal mecanism al acțiunii antiapoptotice a simvastatinei .....	97

3.6. Efect inhibitor al terapiei liposomale combinate asupra producției unor promotori ai proceselor de invazie și metastazare.....	99
3.7. Efect modulator al terapiilor singulare și combinate asupra nivelului de exprimare a două enzime cu rol-cheie în metabolizarea argininei: iNOS și Arg-1.....	101
<b>4. Discuții.....</b>	<b>101</b>
<b>5. Concluzii.....</b>	<b>104</b>
<b>Capitolul VII. Concluzii generale și perspective.....</b>	<b>105</b>
<b>1. Concluzii generale.....</b>	<b>105</b>
<b>2. Perspective.....</b>	<b>106</b>
<b>3. Originalitatea tezei.....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>109</b>
<b>Lista publicațiilor incluse în teză.....</b>	<b>131</b>
<b>Lista publicațiilor neincluse în teză.....</b>	<b>131</b>
<b>Lista participărilor la conferințe.....</b>	<b>133</b>
<b>Lista cursurilor de formare.....</b>	<b>136</b>
<b>Fonduri.....</b>	<b>137</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>137</b>

## LISTA ABREVIERILOR

**AKT (PKB)**, protein-kinaza B; **ANOVA**, Analiza varianței; **ARG-1**, arginaza-1; **AUTCs**, ariile de sub curbele de creștere tumorală; **Bax**, proteina X asociată Bcl-2; **BMDMs**, macrofage derivate din măduva osoasă hematogenă; **CHL**, colesterol; **CoCl<sub>2</sub>**, clorură de cobalt(II); **DMSO**, sulfoxid de dimetil; **DMXAA**, acid 5,6-dimethylxanthenone-4- acetic; **DPPC** – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; **dw**, greutate uscată; **EEAC**, extract etanolic din părți aeriene de *A. chamaepitys*; **EEAG**, extract etanolic din părți aeriene *A. genevensis*; **EEAL**, extract etanolic din părți aeriene de *A. laxmannii*; **EMT**, tranziția epitelial-mezenchimală; **ERK**, kinaza receptorului extracelular; **GM-CSF**, factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage; **GTPase**, guanozin-trifosfat hidrolază; **HIF-1 $\alpha$** , factorul indus de hipoxie 1 $\alpha$ ; **HPLC**, cromatografie lichidă de înaltă performanță; **IC<sub>50</sub>**, jumătatea concentrației maxime inhibitorie; **IL-12 p40**, interleukina 12 p40; **IL-12 p70**, interleukina 12 p70; **IL-13**, interleukina 13; **IL-1 $\alpha$** , interleukina 1 $\alpha$ ; **IL-1 $\beta$** , interleukina 1 $\beta$ ; **IL-6**, interleukina 6; **IL-9**, interleukina 9; **iNOS**,

sintetaza inductibilă a oxidului nitric; **i.v.**, intravenos; **LCL**, liposomi cu timp de circulație prelungit; **M-CSF**, factorul de stimulare a coloniilor monocitare; **MDA**, malondialdehidă; **MEK**, kinaza MAPK/ERK; **MIG**, monokină indusă de IFN- $\gamma$ ; **MMP-2**, metaloproteinază de matrice-2; **MMP-9**, metaloproteinază de matrice-9; **NF- $\kappa$ B**, factorul nuclear  $\kappa$ B; **pAP-1-c-Jun**, forma fosforilată a subunității c-Jun a AP-1; **ROS**, specii reactive de oxigen; **s.c.**, subcutanat; **SD**, deviație standard; **SIM**, simvastatină; **SNAIL1**, proteina deget de zinc SNAIL; **STAT**, transductor de semnal și activator al transcrierii; **TAC**, capacitate antioxidantă totală; **TAMs**, macrofage asociate tumorii; **TGF- $\beta$** , factorul de creștere și transformare- $\beta$ ; **TIC**, conținut total de iridoizi; **TIMP-1**, inhibitor tisular al metaloproteinazei 1; **TIMP-2**, inhibitor tisular al metaloproteinazei 2; **TME**, micromediu tumoral; **TNF- $\alpha$** , factor  $\alpha$  de necroză tumorală; **TPO**, trombopoietină; **TPC**, conținut fenolic total; **VDA**, agent de perturbare vasculară; **VEGF**, factor de creștere vascular-endotelială; **VEGFR**, receptorul factorului de creștere vascular-endotelială.

**CUVINTE-CHEIE:** melanom, modularea stresului oxidativ, macrofage asociate tumorii, terapie combinată, simvastatină, acid 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic, liposomi cu timp de circulație prelungit.

## **Capitolul I. Stresul oxidativ favorizează procese cu rol major în cancer**

Abordarea integrativă recentă în tratamentul cancerului evidențiază ideea micromediului tumoral ca rețeaua în care mai multe tipuri de celule distincte sunt angajate în interacțiuni de semnalizare complexe care duc la progresia și invazia bolii (Wang și colab., 2017). Prin urmare, tumorile sunt privite ca organe în raport cu întregul organism (Egeblad și colab., 2010). Rețeaua stromală interconectată este formată din celule tumorale, macrofage asociate tumorii (TAM), celule dendritice, celule natural killer și T natural killer, limfocite, neutrofile asociate tumorii și fibroblaste asociate cancerului, celule endoteliale vasculare, celule supresoare derivate mieloide, adipocite, pericite și alte tipuri de celule (Balkwill și colab., 2012). Există anumiți factori care contribuie la dobândirea capacităților biologice maligne de către micromediul tumoral, care acționează într-o manieră mai mult sau mai puțin concertată. Printre acești factori, proliferarea susținută, inducerea apoptozei, invazia și imortalitatea replicativă indusă de mutațiile ADN (Hanahan și Weinberg, 2011) sunt influențate de stres oxidativ.

### **1. Stresul oxidativ și inflamația ca factori de risc în dezvoltarea melanomului**

Este binecunoscut faptul că un micromediu inflamator poate precede și promova dezvoltarea multor tipuri de cancer. Radiații UV în exces, precum și expunerea prelungită la substanțe chimice cancerigene pot induce inflamații persistente și transformarea tumorigenică a melanocitelor pielii prin mutații ale ADN-ului. (Mantovani și colab., 2008). Sistemul imunitar este înzestrat cu un vast arsenal de mediatori ai răspunsului inflamator, astfel inflamația cronică a pielii poate fi legată fie de un răspuns imun hiperactiv (alergii), fie de autoinflamare (boală autoimună) (Dainichi și colab., 2014)

La nivel molecular, cancerul de piele și inflamația se află în strânsă legătură, prin căi intrinseci celulare și extrinseci (Maru și colab., 2014). Printre căile intrinseci, activarea oncogenelor, în special cele din calea de semnalizare RAS-RAF-MEK-ERK, este considerată un semn distinctiv al melanomului malign, deși alte căi interconectate și activate simultan, cum ar fi PI3K / AKT, JNK / c-JUN sau Calea Wnt /  $\beta$ -catenină sunt caracteristici foarte frecvente ale acestui tip de cancer (Lopez-Bergami și colab., 2008). Pe de altă parte, căile inflamatorii extrinseci sunt, de obicei declanșate de radiații și alți factori de stres ai pielii, mecanici, chimici



și biologici (virusuri herpetice), care sunt responsabili de inflamația cronică însoțită de stres oxidativ (Khansari și colab., 2009). Legătura dintre căile extrinseci și cele intrinseci este reprezentată de activarea factorilor de transcriere asociați inflamației în celulele pre-canceroase ale pielii, în principal NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  și STAT3, cu eliberarea în consecință a semnalizării prin intermediul moleculelor inflamatorii IL-1, IL-6, IL-8 și TNF- $\alpha$  (Maru și colab., 2014).

O asociere directă între supraexprimarea citokinelor pro-inflamatorii și calea de semnalizare oncogenă mediată de RAS a fost deja demonstrată în alte tipuri de celule cutanate (Cataisson și colab., 2012). Radicalii liberi și în special H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au acțiuni inhibitorii asupra fosfatazelor, enzimele care inhibă semnalele proliferative și rețelele kinazelor care promovează inflamația. Prin urmare, nivelul de radicali liberi din țesuturi poate promova căile inflamatorii și proliferarea aberantă a celulelor, contribuind la dezvoltarea și progresia cancerului (Meng și colab., 2002).

## **2. Stresul oxidativ și angiogeneza tumorală**

Angiogeneza tumorală începe o dată cu “switch-ul angiogenic”, un episod dependent de timp în care are loc o schimbare a echilibrului între factorii pro și anti-angiogenici, ceea ce duce la apariția formării vaselor *de novo* în stroma tumorală (Baeriswyl și Christofori, 2009). Se știe că supraproducția de VEGF și supraexprimarea VEGFR joacă un rol-cheie în formarea unor astfel de arborizații vasculare anormale, dar și în modularea răspunsului imun în tumori și în modularea semnalizării celulelor tumorale prin căi paracrine și autocrine (Goel și Mercurio, 2013). Perturbarea fluxului sanguin în tumoră induce microregiuni hipoxice care sunt responsabile pentru heterogenitatea în cadrul aceleiași tumori individuale, dar și pentru rezistența crescută la chimioterapie și radioterapie (Siemann, 2011). Deprivarea de oxigen duce la răspunsuri adaptative în zonele afectate, coordonate în principal de factori de transcriere din grupul HIF, posesori ai unor subunități  $\alpha$  sensibile la oxigen, HIF-1 $\alpha$  fiind în acest sens cel mai important reprezentant (Petrova și colab., 2018).

S-a stabilit o legătură directă între stresul oxidativ și hipoxie, ROS având capacitatea de a inactiva domeniul prolin hidroxilazei, enzima inhibitor care stabilizează HIF-1 $\alpha$  în normoxie, ceea ce duce la exprimarea genică pro-angiogenică dependentă de HIF (Tafari și colab., 2016). Există, de asemenea, o legătură directă între inflamație, angiogeneza și stres oxidativ raportată de

studii pe modele de pești-zebră cu rezoluție înaltă a vaselor de sânge și în care germinarea celulelor endoteliale, primul pas către neovascularizație, a fost mediată în mod direct de ROS și NF- $\kappa$ B, fără a fi influențată de hipoxie (Schaafhausen și colab., 2013).

### **3. Stresul oxidativ promovează fenotipuri agresive ale celulelor de melanom**

Agresivitatea oricărui tip de cancer este definită prin capacitatea celulelor tumorale de a dezvolta un fenotip rezistent și invaziv în favoarea creșterii și răspândirii rapide. Obiectivul final al acestei transformări este reprezentat de colonizarea organelor îndepărtate într-un proces în mai multe etape, denumit cascadă metastatică. Un eveniment major în declanșarea invaziei melanomului este tranziția epitelial-mezenchimală (EMT), o complexă transformare fenotipică a unei celule epiteliale într-o celulă mezenchimală cu caracteristici migratorii-invazive, caracterizată prin supraproducția componentelor matricei extracelulare (ECM), care în cele din urmă duc la degradarea membranei bazale (Kalluri și Weinberg, 2009).

Stresul oxidativ poate afecta joncțiunile celulare și barierele epiteliale, având un efect stimulator asupra a doi dintre cei mai importanți factori de transcriere care induc EMT, ZEB1 și SNAIL1, direct sau prin calea de semnalizare NF- $\kappa$ B (Imani și colab., 2016). Reglarea factorilor de transcriere care promovează agresivitatea celulelor tumorale, cum ar fi HIF-1  $\alpha$ , NF- $\kappa$ B sau c-Jun s-a dovedit a fi în strânsă legătură cu statusul redox a celulei (Lopez-Bergami și colab., 2008). Potențialele terapii anti-metastatice ar putea distruge celulele tumorale circulante înainte de extravazarea lor și colonizarea nișelor pre-metastatice, prin inhibarea capacității celulei tumorale de a contracara stresul oxidativ ridicat întâlnit pe tot parcursul procesului metastatic (Tasdogan și colab., 2020).

## **4. Stresul oxidativ și imunosupresia**

### **4.1. Componentele ale sistemului imunitar prezente în micromediul tumoral**

Departate de a fi considerate simple aglomerări de celule care proliferază aberant, știința modernă descrie tumorile solide ca fiind organe anormale compuse din celule tumorale, infiltrat imun, rețele vasculare și limfatice, țesut conjunctiv, adipocite și alte populații de celule în corelație strânsă cu tipul de cancer și cu localizarea tumorii primare (Balkwill și colab., 2012). Micromediul imunitar al tumorii (TIME) este una dintre cele mai studiate categorii de celule din

stroma tumorală, datorită potențialelor implicații terapeutice ale manipulării sistemului imunitar în vederea perfecționării imunoterapiei în cancer.

Celulele de melanom sunt înzestrate cu un adevărat arsenal de sisteme antioxidante enzimatic și non-enzimatic care le protejează împotriva stresului oxidativ cumulat și contribuie la selectarea fenotipurilor rezistente (Morry și colab., 2017). În plus, majoritatea celulelor imune din TME (TAMs, TILs, Tregs, MDSCs, neutrofile și eozinofile) pot produce, de asemenea, ROS în principal prin căi NOX dependente, amplificând stresul oxidativ general până la niveluri la care are loc supresia răspunsului imun (Chen și colab., 2016). Acest schimb reciproc de cataboliți, deși benefic pentru progresia cancerului, poate oferi de asemenea și perspective în dezvoltarea de medicamente care vizează sinergia metabolică între celulele tumorale și alte celule stromale rezidente (Sotgia și colab., 2013).

#### **4.2. Plasticitatea fenotipică a macrofagelor**

Mills și colaboratorii au fost printre primii care au observat o dicotomie fundamentală în funcția macrofagelor. Ca răspuns la diverși factori de creștere și citokine, „marii consumatori” se pot diferenția în subtipuri inflamatorii M1 (luptă) sau regenerative M2 (repară) care în consecință pot promova sau inhiba dezvoltarea cancerului (Mills și colab., 2000). Fenotipul M1 se caracterizează printr-o producție ridicată a citokinei pro-inflamatorii IL-12 comparativ cu producția citokinei IL-10 imunosupresivă, spre deosebire de fenotipul M2 caracterizat printr-un raport invers al celor două citokine reprezentative (Mosser și Edwards, 2008). O altă diferență majoră între cele două subtipuri este reprezentată de felul în care metabolizează arginina, un element metabolic limitant în regiunile cu inflamație persistentă și în țesuturile cu cerere metabolică ridicată, cum ar fi tumorile. Macrofagele M1 exprimă enzima iNOS care folosește L-arginina ca substrat pentru a produce cantități mari de NO, un agent citotoxic precum și un declanșator al arsenalului molecular M1 (Ley, 2017). Cealaltă enzimă care folosește L-arginina ca substrat este arginaza specifică M2 care produce cantități semnificative de ornitină, un promotor al proliferării celulare, al reparației țesuturilor și al angiogenezei (Mills, 2001).

#### **4.3. Macrofagele asociate tumorii susțin dezvoltarea cancerului și rezistența la terapie**

TAM sunt cea mai abundentă populație de celule din TME și majoritatea sunt polarizate M2 sau exprimă un „fenotip asemănător M2”, care este responsabil pentru reglarea activității altor celule imune din stroma tumorii, pentru promovarea creșterii tumorale, sprijinind invazia

celulelor canceroase prin citokine (VEGF, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ), enzime (MMPs, Arg-1) și diverse chemokine (Chen și colab., 2019). Prin urmare, TAMs au o funcție pro-tumorală foarte importantă care ajută celulele tumorale să nu fie recunoscute de sistemul imunitar și susține motilitatea acestora.

În melanom, un infiltrat abundent de macrofage este în general asociat cu un prognostic nefavorabil, deoarece celulele de melanom au capacitatea de a produce o mare varietate de factori autocrini în sprijinul proliferării aberante, precum și factori paracrini, cum sunt IL-10, TGF- $\beta$ , GM-CSF și CCL2 care pot transforma fenotipic macrofagele în aliați pro-tumoral. Macrofagele asemănătoare M2 asigură supraviețuirea celulelor stem canceroase prin sinteza de compuși poliaminici derivați din arginază și stimulează formarea de colonii de celule de melanom care sunt astfel protejate de agenții chimioterapeutici (Tham și colab., 2014).

## Capitolul II: Modularea stresului oxidativ tumoral, o abordare terapeutică inovatoare

### 1. Specii reactive de oxigen și sisteme endogene antioxidante

Radicalii liberi sunt molecule cu o viață scurtă, instabile și hiper-reactive. Având un număr impar de electroni, manifestă tendința de a obține stabilitate prin spolierea electronilor prezenți în moleculele stabile ale celulei vii (Arulselvan și colab., 2016). Studiile anterioare au stabilit că în țesuturile normale, fiecare celulă este expusă la  $\sim 1,5 \times 10^5$  atacuri oxidative pe zi (Perillo și colab., 2020). În organismele complexe, fiecare țesut are un potențial anti-oxidativ specific determinat de cantitatea și activitatea antioxidanților non-enzimatici și enzimatici din celulele rezidente, ca răspuns la un dezechilibru de status redox (Haddad, 2002). Imposibilitatea sistemelor antioxidante de a compensa un dezechilibru pro-oxidant duce în cele din urmă la stres oxidativ. În melanom, stresul oxidativ joacă un rol central în dezvoltarea, precum și în evoluția bolii. Nivelurile ROS ridicate pot induce mecanisme de adaptare în celulele tumorale, promovând abilitatea metastatică a celulelor tumorale și rezistența la terapie (Cannavo și colab., 2019).

### 2. Terapii curente în melanom

#### 2.1. Sisteme de livrare a medicamentelor pe bază de nanoparticule

1) *Liposomi*. Vezicule artificiale de formă sferică, cu dimensiuni cuprinse între 5 și 200 nm având o structură asemănătoare membranelor biologice. Compuse din fosfolipide non-toxice și colesterol, sunt utilizate pe scară largă ca vehicule de molecule active în industria farmaceutică datorită capacității lor de a îngloba atât compuși hidrofobi cât și hidrofilii care pot fi eliberați țintit în țesuturi/organe vizate (Akbarzadeh și colab., 2013).

2) *Nanoparticule bazate pe polimeri (NPs)* sunt reprezentate de diferite tipuri de polimeri naturali și sintetici care permit atât țintirea terapeutică pasivă cât și activă .

3. *Nanoparticule lipidice (LNs)* sunt folosite ca sisteme alternative de livrare a medicamentelor datorită stabilității superioare comparativ cu liposomii și LNs.

4. Alte nanoparticule cu potential în terapia cancerelor de piele sunt reprezentate de exosomi, puncte cuantice (QD), nanoparticule de oxid de fier superparamagnetice (SPION) și nanoparticule de aur (AuNPs).

## **2.2. Tipuri de terapii țintite în melanom**

Cele mai eficiente în acest tip de cancer sunt *terapiile care vizează cascade de semnalizare activate de oncogene, imunoterapia și terapiile țintite anti-angiogenice.*

## **3. Agenți și terapii cu rol în modularea stresului oxidativ**

### **3.1. Compuși naturali**

În timpul răspunsului organismului la condiții de stres, sistemele proprii antioxidante de răspuns pot fi copleșite de abundența producției de ROS și, astfel aportul exogen de antioxidanți naturali poate avea un rol profilactic (Arulselvan și colab., 2016). Una dintre cele mai abundente categorii de antioxidanți ai plantelor este reprezentată de polifenoli, metaboliți secundari cu rol în protecția împotriva radiațiilor ultraviolete și în apărarea împotriva patogenilor. În alimente, aceștia dau gustul amar, culoare, aromă și conferă stabilitate oxidativă (Pandey și Rizvi, 2009). Există un număr remarcabil de studii în favoarea proprietăților anticancerigene ale polifenolilor. Cu toate acestea, în lumina recentelor meta-analize cuprinzătoare privind legătura dintre polifenoli și cancer din ultimii zece ani, majoritatea rezultatelor au o semnificație clinică limitată, fiind la stadiul de studii preliminare, ambigue sau incidentale (Grosso și colab., 2017).

Este important să fie făcută o diferență clară între tratamentul și prevenția cancerului în ceea ce privește utilizarea compușilor naturali, mai ales că acest aspect este confuz în majoritatea studiilor *in vitro*, care par să ignore categoriile „previne-împiedică-întârzie-vindecă” ca și acțiuni anticancerigene care de cele mai multe ori nu au loc simultan (Wang și colab., 2012). În plus, compușii fitochimici prezintă activitate antioxidantă la concentrații mici și activitate pro-oxidantă în doze mari. Atunci când se iau în considerare compușii naturali ca modulatori ai stresului oxidativ în terapia cancerului, trebuie să se țină seama de efectul ROS de “sabie cu două tăișuri” precum și de concentrația de antioxidanți din acești compuși (Valko și colab., 2007). Terapiile țintite pe bază de antioxidanți pot fi utilizate pentru a perturba, menține sau restabili homeostaza redox, în funcție de efectul dorit și în raport cu tipul de boală.

### 3.2. Compuși semisintetici: simvastatina

Pe lângă utilizarea lor principală ca medicamente antihipercolesterolemiantе în gestionarea și prevenirea bolilor coronariene, compuși precum simvastatina au prezentat efecte pleiotropice și imunomodulatoare, de alterare a stresului oxidativ și a inflamației, având chiar și un rol în apoptoza celulelor endoteliale (Kirmizis și colab., 2010). Prin inhibarea sintezei izoprenoidelor, statinele pot afecta funcția proteinelor mici de legătură GTP, Rho, Ras și Rac, dependente de izoprenilare, implicate în căile de semnalizare care reglementează proliferarea, motilitatea celulară, organizarea citoscheletului, EMT și transcrierea diversilor factori care contribuie la progresia cancerului (Liao și Laufs, 2005; Parri și Chiarugi, 2010).

Efectele anticancerigene ale SIM au fost descrise de într-un număr mare de studii care subliniază mecanisme variate de acțiune asupra diferitelor linii celulare canceroase și modele tumorale. Înainte de dezvoltarea sistemelor de administrare țintită tumorală, relevanța studiilor pre-clinice asupra statinelor a rămas neclară, datorită faptului că mai puțin de 5% din doza de statine administrate *in vivo* ajungea efectiv în circulația sistemică din cauza localizării lor preferential hepatice, cu repercursiuni de hepatotoxicitate și miopatii determinate de doze tot mai mari administrate (Boudreau și colab., 2010). În special în cancer, introducerea vehiculelor nanoparticulate de țintire activă a tumorii poate duce la depășirea dezavantajelor menționate în cazul simvastatinei (Alupei și colab., 2015).

### 3.3. Compuși sintetici: DMXAA

Agenții de perturbare vasculară (VDA) reprezintă o abordare atractivă a tratamentului împotriva cancerului, deoarece celulele endoteliale sunt stabile genetic, endoteliul tumoral este ușor accesibil prin terapie intravenoasă și lezarea vasculară deprivează brusc și sever marea majoritate a celulelor tumorale de substanțe nutritive vitale și gaze esențiale (Hinnen și Eskens, 2007). VDAs sunt agenți terapeutici care au un mecanism de acțiune complet diferit de cel al terapiilor clasice axate pe VEGF / VEGFR, profitând de diferențele structurale și funcționale ale endoteliului tumoral fragil care se dezvoltă rapid. Cu toate acestea, principalul dezavantaj al unei opriri vasculare rapide constă în formarea unei zone centrale necrotice și a unei margini tumorale viabile în care sunt selectate celule tumorale cu fenotipuri invazive (Cooney și colab., 2006).

Acest fapt împreună cu observația că VDA tind să interacționeze sinergic cu agenți citotoxici și factori anti-angiogenici încurajează utilizarea lor în terapii combinate în care două

sau mai multe medicamente anticancerigene se completează reciproc cu efecte semnificative în doze mai mici, mai eficiente, vizând atât miezul tumoral hipoxic, cât și marginea irigată a tumorii (Siemann și Horsman, 2009; Spear și colab., 2011).

DMXAA este un flavonoid sintetic care participă la interacțiuni hidrofobe prin intermediul grupărilor aromatice 5,6 metil. A fost considerat un candidat foarte promițător pentru terapia cancerului, dar nu s-a ridicat la nivelul rezultatelor pre-clinice în urma testării clinice pe subiecți umani datorită sensibilității extreme specifice, fiind un activator reductabil al căii de semnalizare STING murină, dar nu și umană (Shih și colab., 2018). Cu toate acestea, procesul de identificare a analogilor DMXAA pentru specia umană este în derulare (Tijono și colab., 2013; Hwang și colab., 2019). Experimental, pe modele murine, s-a constatat că DMXAA are o activitate antitumorală remarcabilă prin blocarea selectivă a fluxului de sânge în tumoră la mai puțin de o oră după administrare (Baguley, 2003).

### **3.4. Terapii antioxidante vs terapii pro-oxidante**

#### *Terapii antioxidante*

Antioxidanții enzimatici precum și non-enzimatici sunt în prezent priviți ca o “sabie cu două tăișuri” în tratamentul cancerului. Tratamentele cu antioxidanți au de obicei efecte imunomodulatoare complementare. De exemplu, curcumina este descrisă ca un modulator puternic al activității limfocitelor T și B, macrofagelor, neutrofilelor, celulelor NK și dendritice (Jagetia și Aggarwal, 2007) iar administrarea resveratrolului inhibă polarizarea M2 în cancerul pulmonar (Sun și colab., 2017). Cu toate acestea, adăugarea de antioxidanți în doze specifice pentru a diminua stresul oxidativ indus de chimioterapie a devenit controversată și există o mulțime de factori, cum ar fi alegerea între doza preventivă (scăzută) și terapeutică (ridicată), tipul de cancer sau momentul colectării datelor ca aspecte ce trebuie luate în considerare înainte de a trage concluzii ferme despre interacțiunile pozitive sau negative între antioxidanți și chimio/radioterapie (Singh și colab., 2018)

#### *Terapii pro-oxidante*

Un număr tot mai mare de studii sugerează că activitățile antioxidante mediate de principala genă implicată în răspunsul antioxidant (NRF2) contracarează efectul dăunător al



stresului oxidativ în celulele transformate, promovând tumorigeneza și rezistența celulelor din tumorile primare și în CTC, în timp ce nivelurile ridicate de NADPH sporesc capacitatea metastatică a melanomului (Perillo și colab., 2020; Tasdogan și colab., 2020). Aceste aspecte vin în sprijinul teoriei „călcâiul lui Ahile” care sugerează că dependența celulelor tumorale de antioxidanți pentru a contracara producția de ROS mult sporită comparativ cu celulele normale ar putea fi punctul lor slab. Prin urmare, ROS ar putea fi considerați „latura strălucitoare a lunii” în terapia cancerului.

### **Capitolul III: Scopul tezei și obiective generale**

Scopul acestei teze a fost dezvoltarea și testarea unei terapii liposomale țintite cu acțiuni de modulare a stresului oxidativ în melanom.

- **Primul obiectiv** al acestei teze a fost realizarea unui screening fitochimic al mai multor specii de *Ajuga* utilizate în medicina tradițională și evaluarea activității lor anticancerigene pe linii celulare metastatice susceptibile la modularea terapeutică a statusului lor redox.
- **Al doilea obiectiv** al acestei teze a fost investigarea activității de modulare a stresului oxidativ și potențialul anticancerigen al unei noi terapii combinate cu SIM și DMXAA pe un model *in vitro* de micromediu tumoral specific melanomului
- **Al treilea obiectiv** al acestei teze a fost evaluarea potențialului de modulare a stresului oxidativ și a eficacității anticancerogene a unei combinații terapeutice țintite constând în LCL-SIM și LCL-DMXAA pe un model de melanom murin *in vivo*.

### **Capitolul IV. Extracte din specii de *Ajuga* cu activitate biologică de modulare a unor procese esențiale pentru dezvoltarea celulelor canceroase**

*Acest capitol a fost publicat ca: Valentin-Florian Rauca, Laurian Vlase, Tibor Casian, Alina Sesarman, Ana-Maria Gheldiu, Andrei Mocan, Manuela Banciu, Anca Toiu, Biologically active ajuga species extracts modulate supportive processes for cancer cell development, Frontiers in Pharmacology, 2019; 10:334, doi: 10.3389/fphar.2019.00334*

#### **1. Introducere**

Speciile de *Ajuga* au fost utilizate în medicina tradițională pentru proprietățile lor diuretice, antiinflamatorii, de vindecare a rănilor și hepatoprotectoare. Profilul fitochimic și

potențialul anticanceros a trei specii de *Ajuga* (*A. genevensis*, *A. chamaepitys* și *A. laxmannii*) din România au fost cercetate. Extractul etanolic de *A. laxmannii* a arătat cel mai mare conținut total de fenoli și flavonoide, în timp ce extractul etanolic de *A. genevensis* a fost mai abundent în iridoizi. Efectul citostatic general al extractelor de plante investigate a fost exercitat prin acțiuni inhibitorii puternice asupra NF-κB, molecula cheie implicată în răspunsul inflamator și prin efectele modulatorie ale stresului oxidativ atât în linia celulară C26 de carcinom de colon murin cât și în linia celulară de melanom murin B16.F10. *Ajuga laxmannii* a arătat cea mai semnificativă activitate antitumorală și reprezintă o sursă importantă de compuși bioactivi, posibil o formă suplimentară de tratament alături de medicamente anticanceroase convenționale.

## 2. Materiale și metode

Compușii fitochimici au fost extrași din părțile aeriene de *Ajuga* sp. prin utilizarea diferiților solvenți și metode. Extractele hidroalcoolice au fost examinate pentru conținutul total de fenoli, flavonoide și iridoizi iar tehnica HPLC/MS a fost utilizată pentru a analiza compușii polifenolici și iridoizii. Profilul fitochimic a fost, de asemenea, evaluat prin analiza componentelor principale în legătură cu eficacitatea antitumorală a extractelor. Potențialul antiproliferativ a fost evaluat folosind testul colorimetric de proliferare celulară ELISA BrdU. Pentru a determina gradul de exprimare a subunității p65 a proteinei inflamatorii NF-κB din lizatele celulare, s-a efectuat tehnica western blot. Cuantificarea markerului de stres oxidativ MDA a fost realizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Capacitatea antioxidantă enzimatică și non-enzimatică a fost evaluată prin măsurarea activității catalazei și prin evaluarea capacității antioxidante totale (TAC) a celulelor tratate.

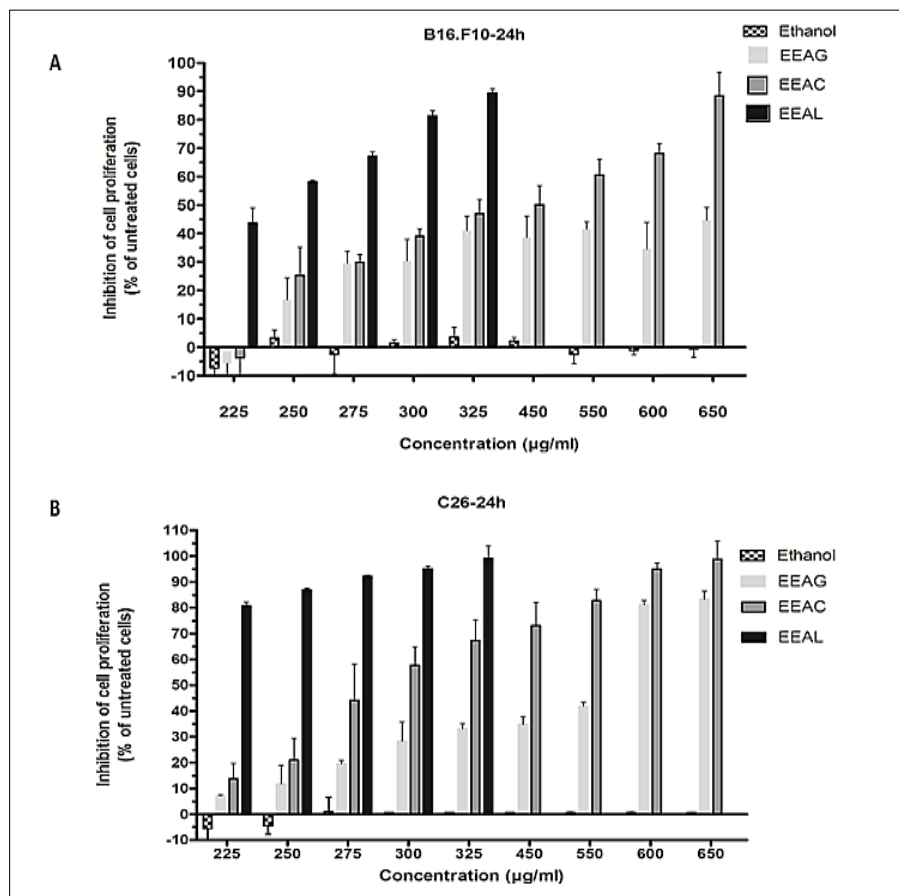
## 3. Rezultate și discuții

### 3.1. Efect antiproliferativ al extractelor vegetale asupra liniilor celulare C26 și B16.F10

Efectele diferitelor tratamente într-un anumit interval de concentrații (50–650 μg /mL) asupra proliferării celulelor C26 și B16.F10 au fost prezentate ca și procent de inhibare al proliferării comparativ cu controlul (**Figura 1 A,B**), cât și ca valori ale IC<sub>50</sub> pentru fiecare extract (**Tabel 1**).

Datele noastre au arătat că EEAL a exercitat efecte inhibitoare puternice la concentrații mult mai mici decât EEAC și EEAG asupra celulelor de melanom B16.F10 (**Figura 1A** și

**Tabelul 1**), precum și asupra celulelor carcinomului de colon C26 (**Figura 1B și Tabelul 1**). Relația dintre variabilele de intrare (specii de plante, concentrația extractului, tipul de celule - set de date X) și rata de inhibare a proliferării celulare (set de date Y) a fost evaluată prin încadrarea unei ecuații polinomiale prin metoda PLS. Tipurile specifice de polifenoli (izoquercitrină, rutină și apigenină) și iridoizi (harpagozidă și 8-*O*-acetyl-harpagidă) ar putea fi implicate în activitatea antitumorală puternică a extractelor din plante testate.



**Figura 1: Efectele extractelor din specii de *Ajuga* asupra proliferării celulare. (A)** la 24 ore după incubarea celulelor B16.F10 cu diferite concentrații de extracte SEE, EEAC și EEAL. **(B)** la 24 ore după incubarea celulelor C26 cu concentrații diferite de extracte SEE, EEAC și EEAL. Datele sunt prezentate ca medie ± SD al măsurătorilor în triplicat. EEAG, extract etanolic din *A. genevensis*; EEAC, extract etanolic din *A. Chamaepitys* extract etanolic; EEAL, extract de etanolic din *A. laxmannii*. Celulele tratate cu etanol au fost utilizate ca și controale de toxicitate.

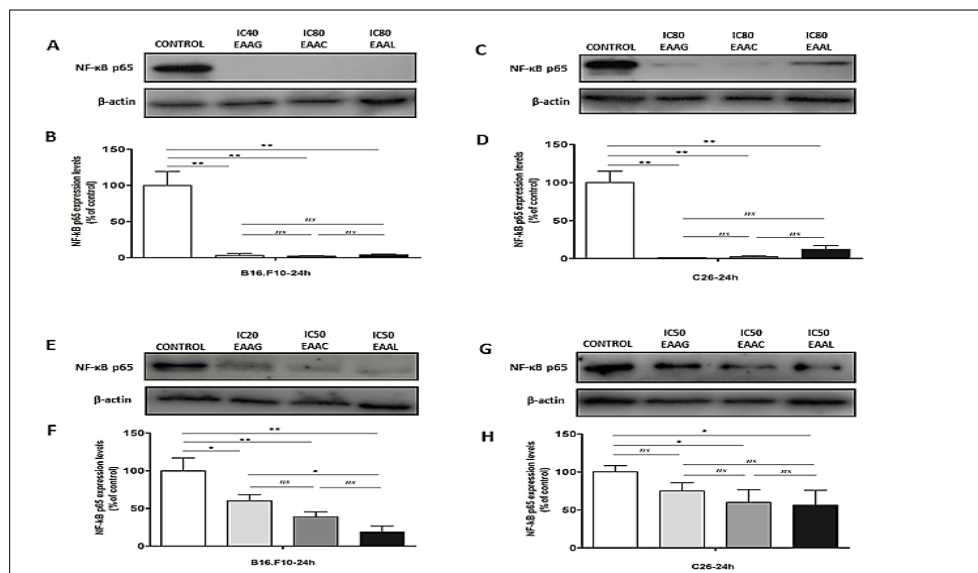
**Tabel 1: Citotoxicitatea extractelor etanolice din specii de *Ajuga* asupra liniilor celulare de cancer murin C26 și B16.F10 prin intermediul testului de proliferare ELISA BrdU (valoare IC<sub>50</sub>, µg /mL).**

Linia celulară	C26		B16.F10	
	IC <sub>50</sub>	Interval de confidență 95%	IC <sub>50</sub>	Interval de confidență 95%
EEAG ( <i>A. genevensis</i> )	457.5	374.0 to 559.7	741.4	388.5 to 1415
EEAC ( <i>A. chamaepitys</i> )	303.0	274.8 to 334.1	406.7	341.7 to 484.1
EEAL ( <i>A. laxmannii</i> )	176.3	154.5 to 201.1	236.8	227.1 to 246.8

IC<sub>50</sub> reprezintă jumătate din concentrația maximal inhibitorie pentru compusii testați.

### 3.2. Efect de inhibare a exprimării NF-κB-p65 în lizate totale din liniile celulare C26 și B16.F10

Rezultatele noastre au indicat că IC<sub>80</sub> al tuturor extractelor din *Ajuga* sp. testate în acest studiu (IC<sub>40</sub> în cazul EEAG testat pe B16.F10) au determinat o inhibare foarte puternică ( $\geq 80\%$  în comparație cu controlul) a expresiei factorului-cheie de transcriere NF-κB-p65 implicat în răspunsul inflamator (**Figura 2 A-D**).



**Figura 2: Variații în producția NF-κB-p65 în lizate celulare după diferite tratamente.** Analiza Western blot a expresiei totale a NF-κB-p65 în lizate celulare de la (A, E) celule B16.F10 și (C, G) celule C26 după diferite tratamente; β-actina a fost utilizată ca proteină control. (B)% din expresia NF-κB-p65 în raport cu controlul în celulele B16.F10 de melanom după diferite tratamente (IC<sub>40</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC și IC<sub>80</sub> EEAL). (F)% din expresia NF-κB-p65 în raport cu controlul în celulele melanomului B16.F10 după

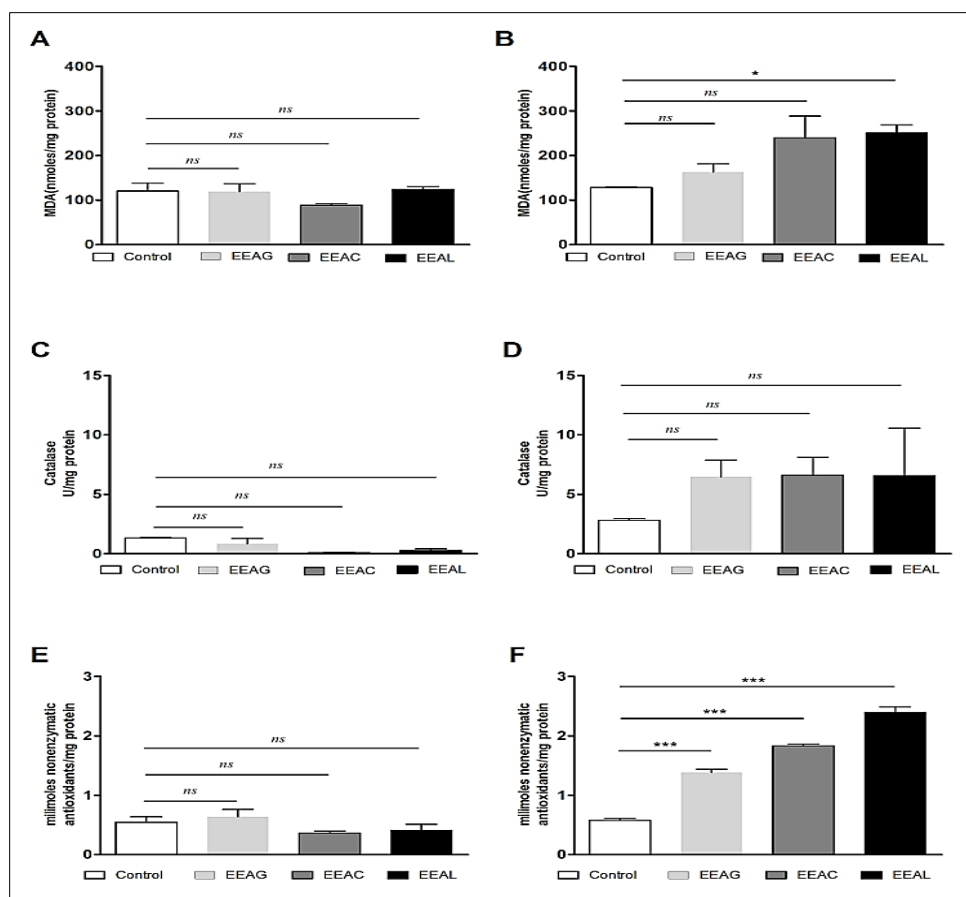
diferite tratamente (IC<sub>20</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC și IC<sub>50</sub> EEAL). **(D)**% din expresia NF-κB în raport cu controlul în celulele carcinomului de colon C26 după diferite tratamente (IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC și IC<sub>80</sub> EEAL). **(H)**% din expresia NF-κB în raport cu controlul în celulele carcinomului de colon C26 după diferite tratamente (IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC și IC<sub>50</sub> EEAL). Pe celule B16.F10: Control, celule netratate; IC<sub>40</sub> sau IC<sub>20</sub> EEAG, celule incubate cu 650 μg / mL sau 260 μg / mL extract etanolic din *A. genevensis* ; IC<sub>80</sub> sau IC<sub>50</sub> EEAC, celule incubate cu 650 μg / mL sau 406.7μg / mL extract etanolic din *A. Chamaepitys*; IC<sub>80</sub> sau IC<sub>50</sub> EEAL, celule incubate cu 325 μg / mL sau 236,8 μg / mL extract etanolic din *A. laxmannii*. Pe celulele C26: Control, celule netratate; IC<sub>80</sub> sau IC<sub>50</sub> EEAG, celule incubate cu 650 μg / mL sau 457,5 μg / mL extract etanolic din *A. genevensis* ; IC<sub>80</sub> sau IC<sub>50</sub> EEAC, celule incubate cu 650 μg / mL sau 303 μg / mL extract etanolic din *A. Chamaepitys* ; IC<sub>80</sub> sau IC<sub>50</sub> EEAL, celule incubate cu 325 μg / mL sau 176,3 μg / mL extract etanolic din *A. laxmannii*. Rezultatele reprezintă media ± SD a două măsurători independente. Testul ANOVA cu corecție Bonferroni pentru comparații multiple a fost utilizat pentru a analiza efectele diferitelor tratamente (ns,  $P > 0.05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ).

Concentrațiile IC<sub>50</sub> (**Tabel 1**) testate pe ambele linii celulare (IC<sub>20</sub> în cazul EEAG testat pe B16.F10) au determinat diferite grade de inhibare (30–70% comparativ cu controlul) (**Figura 2 E–H**).

### **3.3. Extractele din specii de *Ajuga* exercită acțiuni modulatorie asupra stresului oxidativ “fiziologic” al celulelor canceroase**

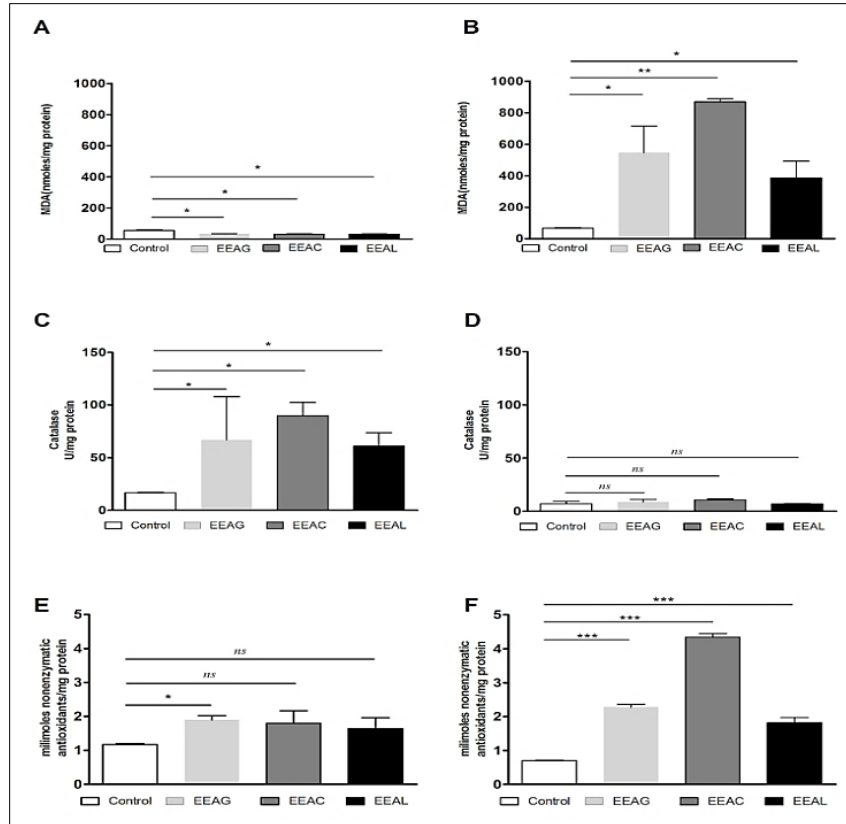
Deoarece celulele canceroase se află sub un stres oxidativ constant (Alupei și colab., 2015), am investigat relația potențială dintre activitatea antiproliferativă a extractelor vegetale și stresul oxidativ generat în ambele tipuri de celule canceroase. Astfel, nivelurile unui marker de stres oxidativ general - MDA, precum și activitatea catalitică a catalazei și capacitatea antioxidantă totală au fost evaluate în lizate din ambele linii celulare și sunt prezentate în **Figurile 3, 4**.

Rezultatele noastre au indicat faptul că IC<sub>80</sub> ale extractelor (IC<sub>40</sub> în cazul EEAG testat pe celulele B16.F10) au avut o acțiune pro-oxidantă (**Figurile 3B, 4B**) în corelație cu o creștere proporțională a capacității antioxidante a celulelor canceroase rămase (**Figurile 3F, 4F**) în ambele linii celulare. Activitatea enzimei antioxidante catalază în ambele linii celulare nu a fost modificată în mod semnificativ de concentrațiile de extract IC<sub>80</sub> utilizate în această investigație (**Figurile 3D, 4D**).



**Figura 3: Efectele extractelor de *Ajuga* asupra stresului oxidativ generat de către celulele C26. (A, B)** Cantitatea de MDA după (A): tratamentul cu IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL (B): tratamentul cu IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL (C, D) Activitatea catalitică a catalazei în urma tratamentului cu (C): IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL și (D): tratamentul cu IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL (E, F) Capacitatea totală antioxidantă în lizate celulare obținute din linia celulară C26 după 24h de incubare cu următoarele tratamente (E): IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL și (F): IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL. (n.s,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

Cu toate acestea, concentrațiile IC<sub>50</sub> de extract (IC<sub>20</sub> în cazul EEAG) au avut un efect antioxidant moderat asupra celulelor B16.F10 prin reducerea nivelului MDA în comparație cu controlul (Figura 4A) și stimularea ușoară a activității catalazei (Figura 4C). În cazul celulelor C26, concentrațiile IC<sub>50</sub> ale extractelor nu au modificat în mod semnificativ niciunul dintre parametrii testului de stres oxidativ (Figurile 3 A, C, E).



**Figura 4: Efectele extractelor de *Ajuga* asupra stresului oxidativ generat de către celulele B16.F10 (A, B) Cantitatea de MDA după (A): tratamentul cu IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL (B): tratamentul cu IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL (C, D) Activitatea catalitică a catalazei în urma tratamentului cu (C): IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL și (D): tratamentul cu IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL (E, F) Capacitatea totală antioxidantă în lizate celulare obținute din linia celulară C26 după 24h de incubare cu următoarele tratamente (E): IC<sub>50</sub> EEAG, IC<sub>50</sub> EEAC, IC<sub>50</sub> EEAL și (F): IC<sub>80</sub> EEAG, IC<sub>80</sub> EEAC, IC<sub>80</sub> EEAL (ns,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).**

## 4. Concluzii

În concluzie, rezultatele studiului nostru au indicat că efectul citostatic general al extractelor de plante investigate a fost exercitat prin acțiuni inhibitorii puternice asupra NF- $\kappa$ B-p65, molecula cheie implicată în răspunsul inflamator și prin efectele modulatorie ale stresului oxidativ în cazul ambelor linii celulare testate. Dintre cele trei specii selectate *Ajuga laxmannii* a determinat cea mai puternică acțiune de inhibare a proliferării liniilor de celule canceroase B16.F10 și C26 datorită compoziției sale mai bogate în compuși polifenolici bioactivi. Cu toate acestea, eventuale studii extinse asupra unor modele de tumori experimentale ar putea clarifica mai multe aspecte referitoare la acțiunea antitumorală a extractelor din plante folosite în acest

studiu. Rezultatele noastre indică faptul că extractul de *Ajuga laxmannii* are potențialul de a deveni o formă suplimentară de tratament sau profilaxie, alături de medicamente anticancer convenționale.

## **Capitolul V. Terapia combinată cu simvastatină și DMXAA suprimă sinergistic fenotipul agresiv al celulelor B16.F10 de melanom murin**

*Acest capitol a fost publicat ca: Valentin-Florian Rauca, Emilia Licarete, Lavinia Luput, Alina Sesarman, Laura Patras, Paul Bulzu, Elena Rakosy-Tican, Manuela Banciu, Combination therapy of simvastatin and 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid synergistically suppresses the aggressiveness of B16.F10 melanoma cells, PLoS ONE, 2018; 23;13(8):e0202827, doi: 10.1371/journal.pone.0202827.*

### **1.Introducere**

Principalul dezavantaj al actualelor terapii anti-angiogenice este reprezentat de apariția fenomenului de rezistență cauzată în primul rând de supraexprimarea factorului de transcriere HIF-1 $\alpha$  ca urmare a hipoxiei induse de tratament, care stimulează celulele canceroase să dezvolte fenotipuri agresive și imunosupresive. Mai mult decât atât, rezistența celulelor canceroase la terapiile anti-angiogenice este mediată profund de comunicarea dintre celulele tumorale și macrofagele asociate tumorii (TAMs) - cele mai importante celule din micromediul tumoral pentru coordonarea proceselor pro-tumorigenice. Astfel, țintirea simultană a TAM și a celulelor canceroase ar putea îmbunătăți rezultatul terapiilor anti-angiogenice. Întrucât studiile noastre anterioare au demonstrat că simvastatina (SIM) exercită acțiuni antiproliferative puternice asupra celulelor de melanom murin B16.F10 prin reducerea stresului oxidativ mediat de TAM și inhibarea producției intratumorale de HIF-1 $\alpha$ , am investigat dacă eficacitatea antitumorală a agentului de perturbare vasculară DMXAA ar putea fi îmbunătățită prin administrarea concomitentă cu această statină lipofilă. Rezultatele noastre oferă dovezi confirmatorii în ceea ce privește capacitatea tratamentului combinat de a suprima fenotipul agresiv al celulelor de melanom B16.F10 în co-cultură cu TAM în condiții chimice care mimează efectele hipoxiei *in vitro*. Astfel, capacitatea de proliferare și migrare a celulelor de melanom a fost puternic decelerată după administrarea concomitentă a SIM și DMXAA. Mai mult, datele noastre au sugerat că acțiunea anti-oxidantă a tratamentului combinat, ca urmare a stimulării



melanogenezei, ar putea fi cauza principală pentru suprimarea simultană a moleculelor-cheie implicate în dobândirea agresivității celulelor de melanom, prezente atât în celulele tumorale (HIF-1 $\alpha$ ) precum și în TAM (arginază-1). Efectul supresiv concomitent al acestor proteine poate fi motivul reducerii drastice a capacității angiogenice a celulelor din co-cultură.

## 2. Materiale și metode

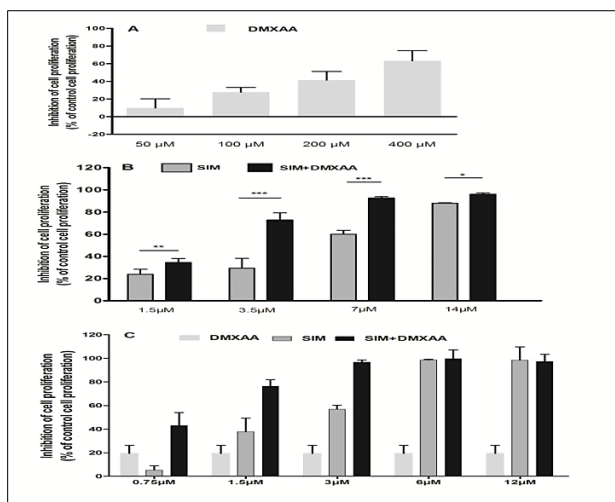
Linia celulară de melanom murin B16.F10 (ATCC, CRL-6475) a fost cultivată în mediu DMEM (Lonza, Basel, CH), completat cu 10% ser bovin fetal inactivat termic, 100 UI / ml penicilină-streptomycină 100  $\mu$ g / ml și 4mM L-glutamină, în monostrat la 37 ° C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO<sub>2</sub>. După diferențierea celulelor măduvei osoase în BMDMs, aceste celule au fost recoltate (Zhang și colab., 2008) și co-cultivate cu celule B16.F10 la un raport de densitate celulară de 4:1 care aproximează condițiile fiziologice ale dezvoltării melanomului murin *in vivo* (Haase-Kohn et al., 2014; Luput și colab., 2017). Pentru a mima ambientul intratumoral hipoxic, celulele au fost incubate timp de 24 de ore cu mediu de cultură suplimentat cu 200  $\mu$ M de clorură de cobalt (II) (CoCl<sub>2</sub>) - un inductor de stabilizare a factorului de transcriere HIF-1 $\alpha$  (Al Okail, 2010). DMXAA (Selleckchem, Houston, TX, SUA) a fost dizolvat în sulfoxid de dimetil (DMSO) 100%. SIM (Sigma-Aldrich, MO, SUA) a fost dizolvată în etanol 70% pentru a prepara soluția stoc. Pentru a determina efectele diferitelor tratamente asupra proliferării celulelor melanomului B16.F10,  $1 \times 10^3$  celule canceroase / godeu au fost co-cultivate cu macrofage așa cum se arată mai sus, în plăci cu 96 de godeuri timp de 24 de ore. Activitatea proliferativă a celulelor canceroase după diferite tratamente a fost testată folosind testul de proliferare colorimetric ELISA BrdU (Roche Applied Science, Penzberg, DE). Pentru a determina dacă inhibarea proliferării celulare se datorează inducerii apoptozei în co-cultură s-a efectuat testul de apoptoză bazat pe izotiocianat de fluoresceină (FITC) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, SUA ). Pentru a determina capacitatea de migrare a celulelor, celulele de melanom murin B16.F10 co-cultivate cu macrofage la un raport de densitate celulară de 1: 4 au fost dispuse în plăci cu 24 de godeuri. După 24 de ore, monostraturile de celule confluențe au fost zgâriate cu un vârf de plastic (1 mm) conform protocolului descris anterior (Liang și colab., 2007). Migrarea a fost monitorizată cu ajutorul unui microscop echipat cu cameră foto la ora 0 și la 24 de ore.

În vederea realizării analizei moleculare, s-au preparat lizate celulare. Din lizate s-a realizat cuantificarea malondialdehidei (MDA) prin analiza HPLC, determinarea conținutului de melanină, analiza western blot a nivelului HIF-1 $\alpha$ , analiza exprimării proteinelor angiogenice prin tehnica „array” pentru proteine (proteine RayBio® Mouse Angiogenic Antibody Array membranelor 1.1, RayBiotech Inc., Norcross, GA, SUA) și cuantificarea qPCR a exprimării markerilor TAM și a producției de oxid nitric. Datele din diferite experimente au fost indicate ca medie  $\pm$  deviație standard (SD).

### 3. Resultate și discuții

#### 3.1. Efect sinergistic al SIM și DMXAA asupra proliferării celulelor de melanom

Efectele diferitelor tratamente asupra proliferării celulelor B16.F10 în monocultură și în prezența TAMs în condiții care mimează efectele hipoxiei au fost exprimate ca procent de inhibare în comparație cu proliferarea celulelor netratate (celule martor) (**Figura 5 A-C**) și ca valori IC<sub>50</sub> pentru fiecare agent terapeutic testat (Hiss și colab., 2007) prezentate în **tabelul 2**.



**Figura 5: Efectele administrării combinate de SIM și DMXAA asupra proliferării celulelor B16.F10 în condiții care mimează efectele hipoxiei (A) la 24 h după incubarea co-culturii formate din celule B16.F10 și TAMs cu diferite concentrații de DMXAA; (B) la 24 h după incubarea co-culturii formate din celule B16.F10 și TAMs cu diferite concentrații de SIM administrate singură sau în combinație cu 100 μM DMXAA; (C) la 24h după incubarea monoculturii celulare B16.F10 cu 100 μM DMXAA administrat singur și cu diferite concentrații de SIM administrată singură sau în combinație cu 100 μM DMXAA. Datele sunt prezentate ca media  $\pm$  SD a unor măsurători în triplicat;**

**Table 2: Efect sinergic al co-administrării de SIM și DMXAA asupra proliferării celulelor B16.F10 în prezența TAM**

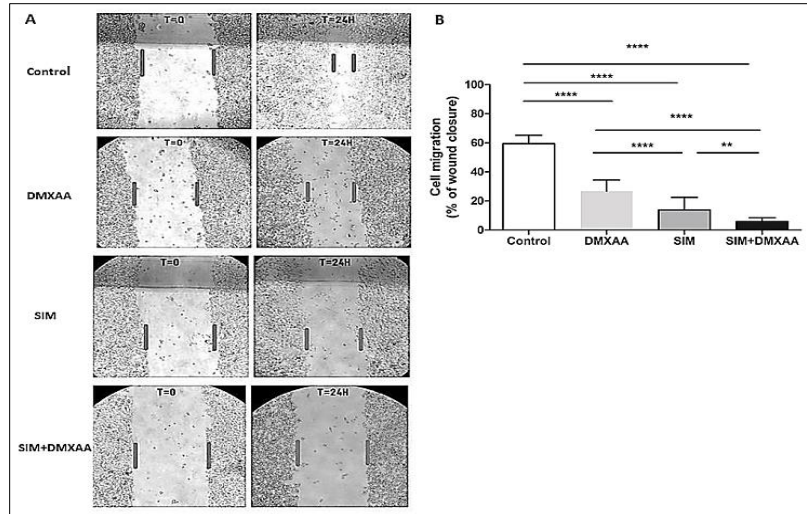
Tratament	IC <sub>50</sub>	Interval de confidență 95%	Indice de combinație (CI)	
			Valoarea CI	Interpretare
SIM	4.825	1.232 to 18.89	-	-
DMXAA	288.1	209.2 to 396.9	-	-
SIM+100 μM DMXAA	2.088	1.933 to 2.256	0.77	Sinergism

IC<sub>50</sub> reprezintă jumătate din concentrația maximă inhibitorie pentru agenții terapeutici testate iar CI reprezintă indicele de combinație care cuantifică relația de sinergism (CI < 1), efect aditiv (CI = 1) și antagonism (CI > 1) conform metodei Chou-Talalay.

Deoarece 100 μM DMXAA a fost prima concentrație care a inhibat moderat proliferarea celulelor B16.F10 în co-cultură (cu 30% în comparație cu proliferarea celulelor din control) (**Figura 5A**), această concentrație a fost selectată pentru tratamente combinate cu diferite concentrații de SIM (**Figura 5B**). În special, asocierea de 100 μM DMXAA cu fiecare concentrație SIM testată a îmbunătățit statistic semnificativ efectele antiproliferative ale SIM asupra monoculturii, precum și a celulelor tumorale din co-cultură (**Figura 5 B-C**). Mai mult decât atât, IC<sub>50</sub> al SIM a scăzut de 1,8 ori când tratamentele cu statina au fost administrate în combinație cu 100 μM DMXAA pe celulele din co-cultură (**tabelul 2**).

### **3.2. Tratamentul combinat reduce capacitatea de migrare a liniei celulare de melanom B16.F10**

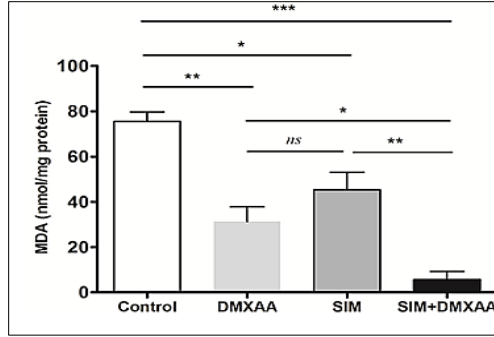
Pentru a evalua dacă tratamentul aplicat a afectat capacitatea invazivă a celulelor de melanom murin B16.F10 în co-cultură cu TAMs, am efectuat testul de migrare a celulelor în monostrat (**Figura 6A**). Rezultatele noastre au sugerat că toate tratamentele aplicate au inhibat puternic migrarea celulelor tumorale. Cu toate acestea, efectul supresor exercitat de tratamentul combinat a fost mai mare decât cel exercitat de fiecare tratament în parte (**Figura 6A-B**). Astfel, administrarea combinată de SIM și DMXAA a inhibat aproape complet migrarea celulelor B16.F10 (peste 90% inhibare în comparație cu migrarea celulelor netratate), în timp ce administrarea fie a DMXAA, fie a SIM a suprimat cu 50-75% capacitatea de invazie a acestor celule canceroase (**Figura 6B**). Această constatare sugerează faptul că fenotipul agresiv al celulelor B16.F10 ar putea fi afectat în urma tratamentului combinat.



**Figura 6: Evaluarea capacității de migrare a celulelor de melanom B16.F10 în co-cultură cu TAMs după diferite tratamente (A)** Celulele B16.F10 în co-cultură cu TAMs înainte de administrare (T=0) și la 24h (T=24H) după administrarea diferitelor tratamente. Patru imagini/godeu au fost capturate pentru fiecare condiție experimentală (Fig 3A,100x). **(B)** Cuantificarea migrării celulare estimată ca procentaj de acoperire a zonei deschise comparativ cu deschiderea la T=0. Control= celule netratate în co-cultură; DMXAA: co-cultura incubată cu 100  $\mu$ M DMXAA; SIM: co-cultura incubată cu 3.5  $\mu$ M SIM, SIM+DMXAA: co-cultura incubată cu 3.5  $\mu$ M SIM administrat în combinație cu 100  $\mu$ M DMXAA..

### 3.3. Efecte modulatorie ale terapiei liposomale combinate asupra stresului oxidativ în cadrul miromediului tumoral

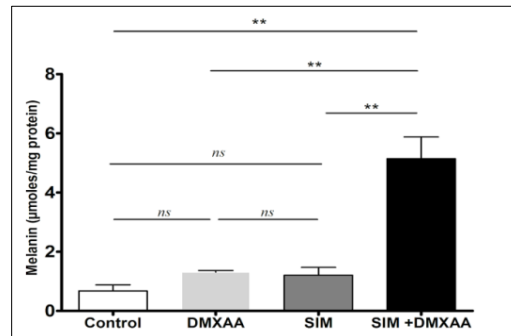
Pentru a corela efectele tratamentelor asupra proliferării și migrării celulelor canceroase de modularea stresului oxidativ (Luput și colab., 2017) în modelul de co-cultură, am determinat nivelurile de MDA - produsul de peroxidare lipidică, un marker tipic pentru stresul oxidativ (Patras și colab., 2016). Rezultatele noastre au arătat că stresul oxidativ a fost în mod special suprimat de toate tratamentele, dar cea mai puternică inhibare a fost cauzată de tratamentul combinat, care a redus aproape complet nivelul de MDA în lizatele din co-cultură celulară (mai mare de 90% în comparație cu producția de MDA în celule control netratate) (**Figura 7**). Aceste date au sugerat că acțiunea anti-oxidantă foarte puternică a terapiei combinate ar putea fi responsabilă pentru inhibarea capacității de migrare a acestor celule, dar și pentru suprimarea proliferării celulelor B16.F10 prezentată anterior.



**Figura 7: Efectele diferitelor tratamente asupra nivelului MDA în co-cultura dintre celulele B16.F10 și TAMs, incubate pentru 24h în condiții care mimează efectele hipoxiei.** Rezultatele sunt exprimate ca media ± deviația standard a două măsurători independente. Control= celule netratate în co-cultură; DMXAA: co-cultura incubată cu 100 μM DMXAA; SIM: co-cultura incubată cu 3.5 μM SIM, SIM+DMXAA: co-cultura incubată cu 3.5 μM SIM administrat în combinație cu 100 μM DMXAA..

### 3.4. Determinarea conținutului de melanină din co-cultura B16.F10 – macrofage

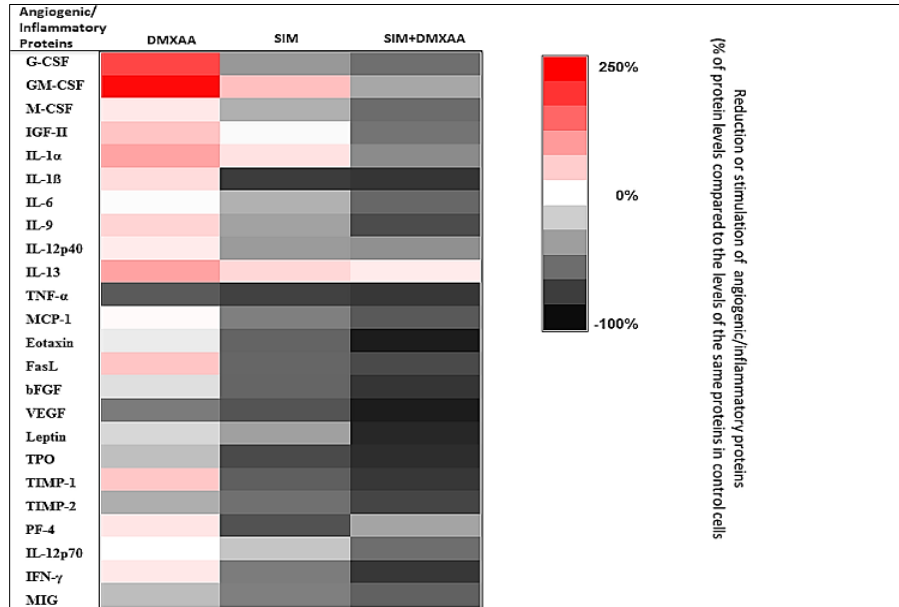
Deoarece conținutul de melanină modulează stresul oxidativ (Denat și colab., 2014) și fenotipul agresiv al celulelor canceroase, au fost evaluate efectele tratamentelor asupra acestei producții specifice de pigmenți în modelul de co-cultură. Rezultatele noastre au arătat că numai tratamentul combinat a stimulat producția de melanină în celulele B16.F10 din co-cultură (**Figura 8**). Astfel, co-cultura celulară incubată simultan cu SIM și DMXAA a prezentat un nivel de melanină de 7,5 ori mai mare decât în co-cultura celulelor control ( $P < 0,01$ ).



**Figura 8: Efectele diferitelor tratamente asupra producției de melanină în co-cultură.** Rezultatele sunt exprimate ca media ± deviația standard a două măsurători independente. Control= celule netratate în co-cultură; DMXAA: co-cultura incubată cu 100 μM DMXAA; SIM: co-cultura incubată cu 3.5 μM SIM, SIM+DMXAA: co-cultura incubată cu 3.5 μM SIM administrat în combinație cu 100 μM DMXAA.

### 3.5. Suprimarea capacității angiogenice a micromediului tumoral în co-cultură

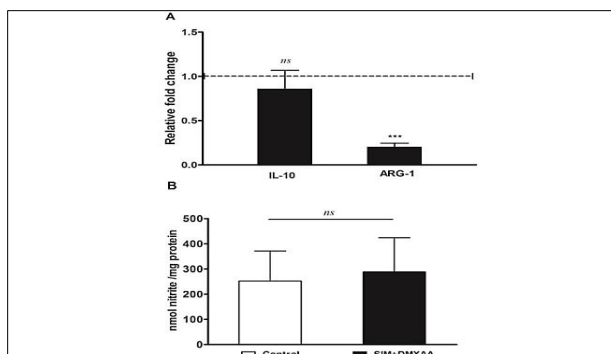
Pentru a evalua efectele tratamentelor asupra capacității angiogenice a micromediului din co-cultură în condiții de mimare a efectelor a hipoxiei, s-a efectuat o selecție pentru 24 de proteine angiogenice / inflamatorii folosind tehnica „array” pentru proteine, iar rezultatele sunt prezentate în **figura 9**.



**Figura 9: Efectele diferitelor tratamente asupra producției de proteine angiogenice și inflamatorii în co-cultura reprezentată de celulele B16.F10 și TAMs.** Producția de proteine după diferite tratamente a fost comparată cu producția de proteine din co-cultura control netratată. Datele sunt prezentate ca % de reducere (-) în intervalul 0% (alb) -100% (negru) sau stimulare (+) 0% (alb) to +250% (rosu) a producției de proteină comparată cu producția aceleiași protein în celulele netratate. DMXAA: co-cultura incubată cu 100  $\mu$ M DMXAA; SIM: co-cultura incubată cu 3.5  $\mu$ M SIM, SIM+DMXAA: co-cultura incubată cu 3.5  $\mu$ M SIM administrat în combinație cu 100  $\mu$ M DMXAA.

### 3.6. Tratamentul combinat induce “reeducarea” parțială a TAMs

Pentru a investiga dacă efectele supresive asupra principalelor procese tumorale coordonate de TAMs pot fi legate de capacitatea de „reeducare” a tratamentului combinat, expresia markerilor specifici pentru M2 (ARG-1 și IL-10) (Sica și colab., 2006), precum și pentru fenotipul M1 (nivelul de nitriți - produsul final al metabolismului oxidului nitric rezultat din activitatea iNOS) (Mills et al., 2000) au fost evaluate. Datele noastre au arătat că numai nivelul de exprimare al ARG-1 a fost puternic redus cu 80% după incubarea TAMs cu tratamentul combinat (**Figura 10 A-B**).



**Figura 10: Efectele tratamentului combinat asupra polarizării macrofagelor. (A) Efectele co-administrației SIM și DMXAA asupra exprimării ARNm pentru ARG-1 și IL-10 în BMDMs tratate cu IL-4 în condiții care mimează efectele hipoxiei. ARNm a fost cuantificat prin RT-qPCR iar rezultatele sunt prezentate ca și “coeficient de modificare” pe baza calculării CT. Celule netratate au fost folosite ca și control. Rezultatele sunt exprimate ca media  $\pm$  deviația standard a trei măsurători independente. (B) Nivelul de nitriți în BMDMs tratate cu IL-4 și incubate cu SIM+DMXAA în condiții care mimează efectele hipoxiei. Rezultatele sunt exprimate ca media  $\pm$  deviația standard a două măsurători independente. Control = macrofage polarizate IL-4 netratate; SIM+DMXAA = macrofage polarizate IL-4 tratate cu 3.5  $\mu$ M SIM și 100  $\mu$ M DMXAA (ns,  $P > 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).**

## 4. Concluzii

Datele noastre au demonstrat că administrarea combinată de SIM și DMXAA în cocultura reprezentată de celulele de melanom murin B16.F10 și TAM în condiții care mimează efectele hipoxiei are potențialul de a deveni o terapie țintită pentru micromediul tumoral, bazată pe un puternic efect antioxidant și pe suprimarea concomitentă a fenotipului agresiv caracteristic celulelor de melanom malign.

## Capitolul VI. Co-administrarea agenților simvastatină și DMXAA încapsulați în liposomi perturbă mecanisme moleculare cu rol cheie în progresia melanomului malign

*Acest capitol este un manuscris în lucru: Valentin-Florian Rauca, Laura Pătraș, Lavinia Lupuț, Emilia Licărete, Vlad Toma, Alina Porfire, Augustin C. Moț, Alina Sesărman, Elena Rakosy-Tican, Manuela Banciu. Co-administration of liposome-encapsulated agents simvastatin and DMXAA disrupts key molecular mechanisms of malignant melanoma progression.*

### 1. Introducere

Activarea aberantă a unor multiple căi de semnalizare interconectate reprezintă un impediment major în calea elucidării mecanismelor dezvoltării și progresiei melanomului. Pe de

altă parte, faptul că acestui tip de cancer îi este specific procesul de reconfigurare a căilor uzuale de semnalizare celulară, poate constitui un indiciu în favoarea unui potențial succes al terapiilor moleculare țintite în tratamentul melanomului. Studiile noastre anterioare *in vitro* au demonstrat că administrarea simultană a agentului citotoxic SIM (simvastatină) și a agentului de rupere a vaselor de sânge cu efecte secundare imunomodulatoare DMXAA (acidul 5,6-dimetilxantenon-4-acetic) reduce agresivitatea celulelor B16.F10 de melanom metastatic murin în cultură mixtă cu macrofage. Așadar, scopul prezentului studiu a fost acela de a administra cele două substanțe terapeutice încapsulate în lipozomi cu timp de circulație prelungit pe un model *in vivo* de melanom murin, în vederea elucidării mecanismelor de acțiune antitumorală ale tratamentului combinat.

## 2. Materiale și metode

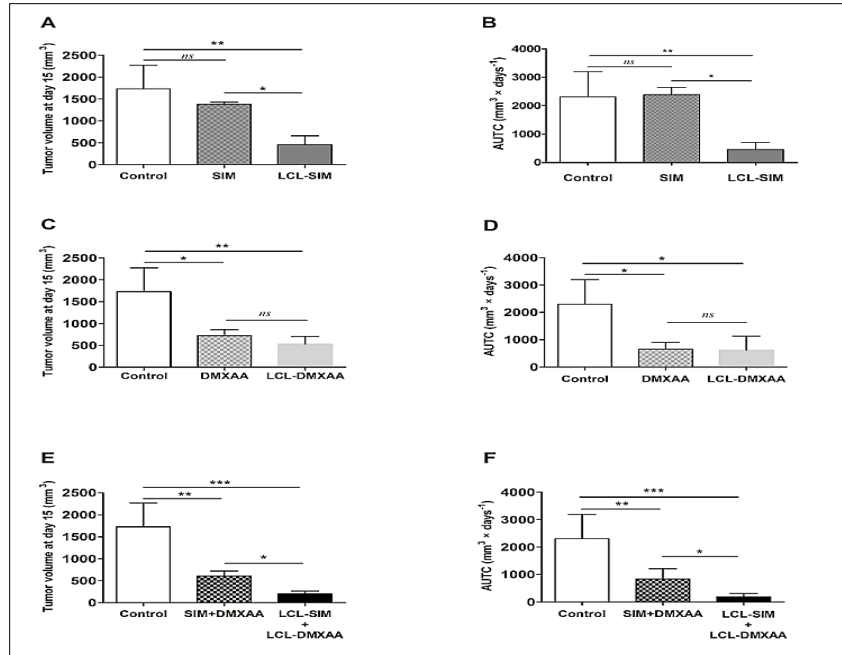
Pentru elucidarea mecanismelor moleculare de acțiune ale tratamentului combinat s-au folosit tehnici de imunohistochimie, western blot, PCR cantitativ și calitativ, tehnica “array pentru proteine”, zimografie în gel pentru măsurarea activității metaloproteinazelor matriceale, analiza HPLC (lichid cromatografie de înaltă performanță), tehnici enzimatică și non-enzimatică de determinare a nivelului stresului oxidativ din tumori.

## 3. Rezultate și discuții

### 3.1. Terapia liposomală combinată a redus cel mai eficient creșterea tumorală.

Pentru a măsura eficacitatea administrării liposomale combinate de 5 mg / kg SIM și 14 mg / kg DMXAA în comparație cu monoterapia liposomală fie de 5 mg / kg SIM sau 14 mg / kg DMXAA, medicamentele au fost injectate intravenos în zilele 11 și 14 de la inocularea celulelor tumorale. Agenții terapeutici au fost administrați, de asemenea, sub formă liberă în aceleași doze și conform aceluiași grafic. Efectele medicamentelor libere și încapsulate în lipozomi asupra creșterii tumorii au fost evaluate prin măsurarea volumului tumorii în ziua sacrificării (**Figura 11 A, C, E**) și a zonei de sub curba de creștere a tumorii (AUTC) (**Figura 11 B, D și F**).

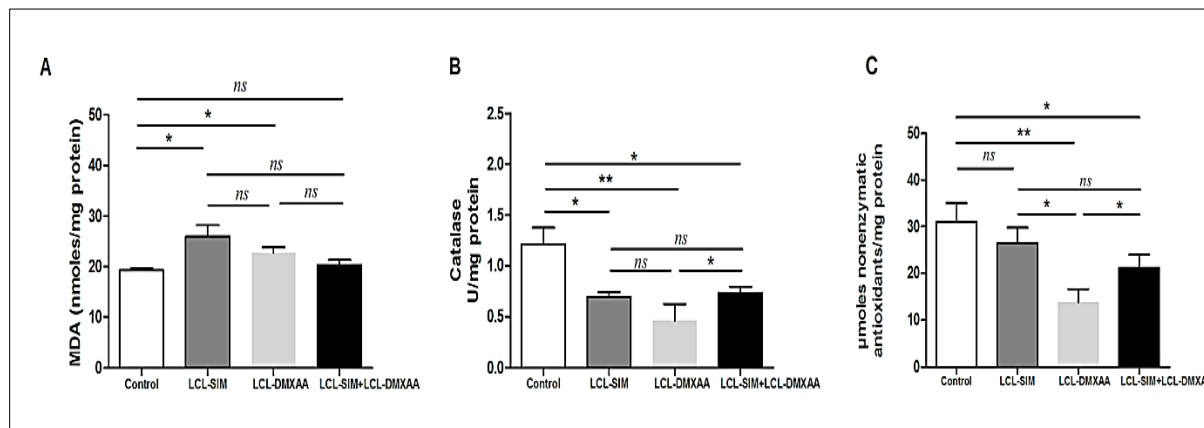




**Figura 11. Efectele administrării combinate de SIM și DMXAA încapsulate în formă liberă sau încapsulată în lipozomi asupra creșterii tumorii de melanom B16.F10 inoculată s.c.** Șoarecii au primit *i.v.* două injecții conținând agenții terapeutici în ziua 11 și ziua 14 după inocularea celulelor canceroase. Volumele tumorale după diferite tratamente din ziua 15 (când au fost uciși șoarecii) sunt prezentate în panourile (A), (C) și (E). AUC-urile după diferite tratamente sunt prezentate în panourile (B), (D) și (F). Control - grup tratat cu LCL; SIM - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM în formă liberă; LCL-SIM - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM ca formă încapsulată în lipozomi; DMXAA - grup experimental tratat cu DMXAA în formă liberă de conc. 14 mg / kg; LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în lipozomi; SIM + DMXAA - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM în formă liberă și 14 mg / kg DMXAA în formă liberă; LCL-SIM + LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM și 14 mg / kg DMXAA încapsulate în lipozomi. Rezultatele au fost comparate cu grupul de control și exprimate ca medie ± SD a volumelor tumorale a 6 șoareci. A fost efectuat testul ANOVA cu corecție Bonferroni pentru comparații multiple în vederea analizei diferențelor dintre efectele tratamentelor asupra creșterii tumorale (ns,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

### 3.2. Efecte modulatorie ale terapiei liposomale combinate asupra stresului oxidativ în cadrul miromediului tumoral

Pentru a corela proprietățile anti-tumorale ale terapiei liposomale cu eventuale modificări ale parametrilor stresului oxidativ, nivelurile unor markeri specifici ai stresului oxidativ în micromediul tumoral (MDA, Catalază și TAC) au fost determinate în lizate din țesut tumoral obținute de la toate grupurile experimentale (**Figura 12**).

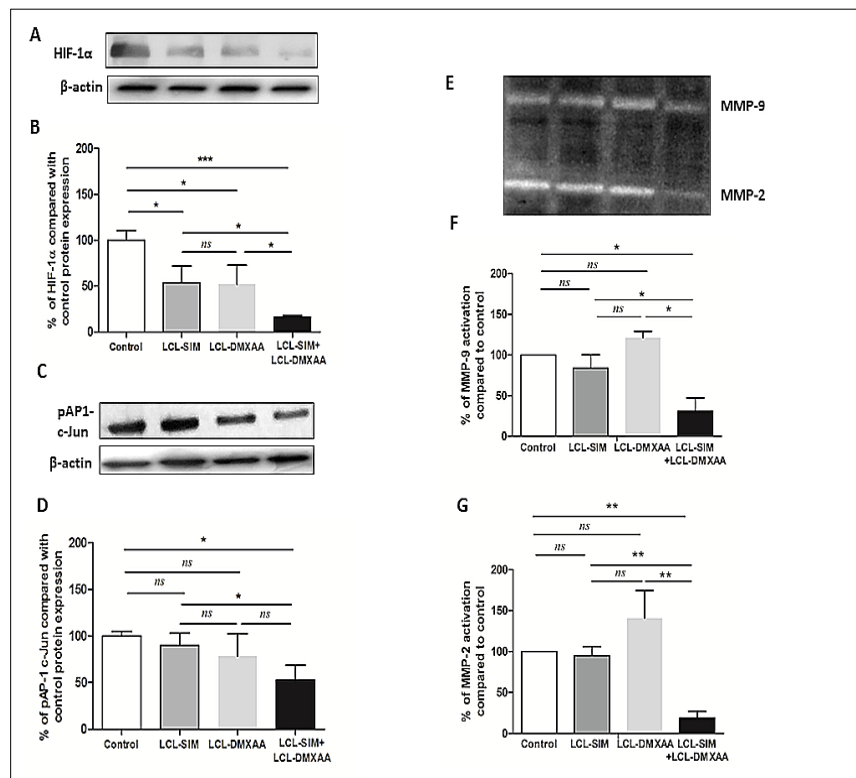


**Figura 12: Efectele diferitelor tratamente liposomale cu SIM și DMXAA asupra parametrilor stresului oxidativ intratumoral.** (A) Producția de MDA exprimată sub formă de nmoli MDA / mg proteină; (B) Activitatea catalazei exprimată sub formă U / mg de proteină; (C) TAC exprimat sub formă de μmoli antioxidanți nonenzimatici / mg proteină. Toți parametrii au fost măsurați din lizate tumorale de la șoareci tratați cu LCL-SIM și LCL-DMXAA ca terapie unică sau combinată. Datele reprezintă media ± SD a măsurătorilor în duplicat sau triplicat (ns,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). Control - grup tratat cu LCL; LCL-SIM - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM ca formă încapsulată în liposomi; LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi; LCL-SIM + LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM și 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi.

Datele noastre au sugerat că ambele terapii liposomale au indus o stare pro-oxidativă slabă reprezentată de nivelurile crescute de MDA ( $P < 0.05$ , **Figura 12 A**), în timp ce terapia combinată nu a afectat nivelul MDA ( $P > 0.05$ , **Figura 12 A**). În plus, o reducere proporțională a sistemelor antioxidante enzimatică (catalază) și non-enzimatică (TAC) a fost observată în lizate tumorale din grupurile tratate cu LCL-SIM ( $P < 0.05$ ), LCL-DMXAA ( $P < 0.01$ ) și terapie combinată ( $P < 0.05$ ) (Figura 12 B, C), care a indicat lipsa unui răspuns adaptiv al celulelor tumorale la starea pro-oxidantă indusă de medicamente.

### 3.3. Efect inhibitor al terapiei liposomale combinate asupra producției unor promotori ai proceselor de invazie și metastazare

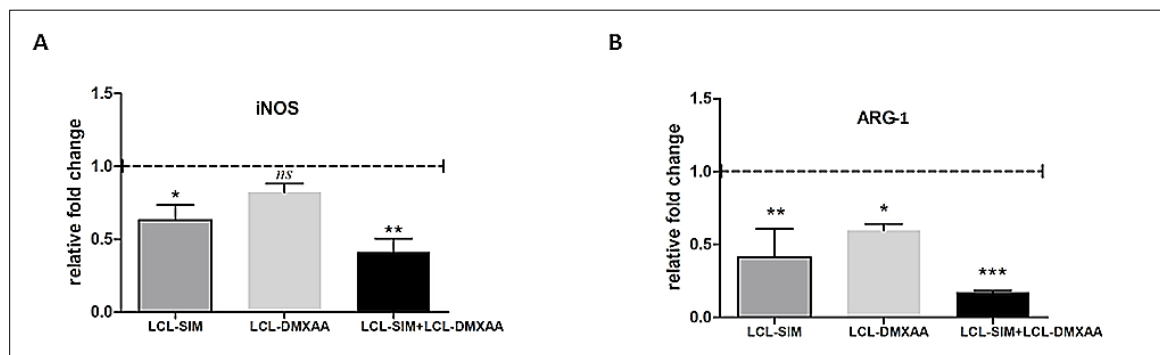
Studiile anterioare au raportat o amplificare a capacității de invazie a celulelor tumorale ca urmare a instalării rezistenței la acțiunea inhibitorilor căii de semnalizare prin VEGF (Bergers și Hanahan, 2008). Acest aspect ne-a determinat să analizăm în continuare efectul tratamentelor noastre asupra mai multor promotori ai capacității de invazie și de metastazare în melanom (**figura 13**).



**Figura 13: Efectele formelor liposomale ale SIM și DMXAA asupra producției intratumorale de promotorilor-cheie ai invaziei și metastazării.** (A), (C) Analiza Western blot care arată efectele diferitelor tratamente asupra nivelului intratumoral de HIF-1α și respectiv pAP-1 c-Jun. β-actina a fost utilizată ca proteină control. (B), (D) Producția de HIF-1α și pAP-1 c-Jun în lizate tumorale din grupurile tratate exprimate ca procent din producția aceluiași factori în grupul control tratat cu LCL. Datele reprezintă media ± SD a două măsurători independente. A fost efectuat un test ANOVA cu corecție Bonferroni pentru comparații multiple pentru a analiza diferențele dintre efectele tratamentelor asupra proteinelor implicate în modularea capacității de invazie (*ns*,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). (E), (F), (G) - Efectele diferitelor tratamente asupra activității metaloproteinazelor din micromediul tumoral. (E) Zimografie în gel din lizate tumorale de la șoareci tratați cu diverse terapii SIM și DMXAA libere sau încapsulate în liposomi. Colorarea albastru Coomassie evidențiază activitatea gelatinolitică corespunzătoare formelor active ale MMP-9 și MMP-2. (F), (G) Procentul activității MMP-9 și MMP-2 în lizate tumorale de la șoareci tratați cu monoterapii liposomale și terapii liposomale combinate de SIM și DMXAA comparativ cu controlul tratat cu LCL. Datele reprezintă media ± SD a două măsurători independente. A fost efectuat un test ANOVA cu corecție Dunnett pentru a analiza diferențele dintre efectele diferitelor tratamente asupra nivelurilor MMP-9 și MMP-2 în comparație cu grupul de control tratat cu LCL (*ns*,  $P > 0,05$ ; \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ). Control – grup experimental tratat cu LCL; LCL-SIM - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM ca formă încapsulată în liposomi; LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi; LCL-SIM + LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM și 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi.

### 3.4. Efect modulator al terapiilor singulare și combinate asupra nivelului de exprimare a două enzime cu rol-cheie în metabolizarea argininei: iNOS și Arg-1

Rezultatele noastre au indicat faptul că terapia combinată LCL-SIM + LCL-DMXAA a indus cea mai puternică reducere a nivelurilor de expresie iNOS (**Figura 14 A**,  $P < 0,01$ ) și ARG-1 (**Figura 14 B**,  $P < 0,001$ ).



**Efectele monoterapiilor și terapiei combinate LCL-SIM și LCL-DMXAA asupra metabolismului argininei din TME prin intermediul exprimării arginazei și a sintetazei inductibile a oxidului nitric.** (A), (B) Efectele administrării liposomale SIM și DMXAA asupra nivelurilor de exprimare ale iNOS și ARG-1. ARNm a fost cuantificat prin RT-qPCR și rezultatele sunt exprimate ca și “coeficient de modificare” pe baza calculării CT. Grupul tratat cu LCL a fost utilizat ca și control. Rezultatele au fost exprimate ca medie  $\pm$  SD a trei măsurători independente. Control – grup experimental tratat cu LCL; LCL-SIM - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM ca formă încapsulată în liposomi; LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi; LCL-SIM + LCL-DMXAA - grup experimental tratat cu 5 mg / kg SIM și 14 mg / kg DMXAA ca formă încapsulată în liposomi (*ns*,  $P > 0,05$ ; \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

## Capitolul VI: Concluzii

Rezultatele **primului studiu** au indicat faptul că diferențele de activitate biologică între speciile de *Ajuga* testate prin intermediul extractelor analizate au fost în concordanță cu variațiile în conținutul de compuși polifenolici din fiecare specie, confirmând ipoteza efectelor anticancerose sinergice exercitate de către combinații de compuși flavonoidici. O puternică activitate antiinflamatoare și un efect de „săbie cu două tăișuri” asupra parametrilor de stres oxidativ au fost observate în special în cazul extractelor aplicate pe celulele de melanom murin B16.F10.

**Cel de-al doilea studiu** a raportat efecte antiproliferative sinergice ale tratamentului combinat constând din SIM și DMXAA, care a generat o creștere a producției de melanină, ceea ce a dus la un switch antioxidant în micromediul din co-cultură, fiind cauza principală pentru suprimarea simultană a factorilor de transcriere și a proteinelor implicate în progresia tumorii și angiogeneză.

**Cel de-al treilea studiu** a raportat efecte anti-angiogenice și pro-apoptotice puternice, precum și o reducere a capacității antioxidante enzimatică și non-enzimatică a micromediului tumoral, sugerând că această combinație terapeutică nouă care constă din LCL-SIM și LCL-DMXAA ar putea fi capabilă să exploateze vulnerabilitatea celulelor tumorale la presiunea pro-oxidantă declanșată înainte și în timpul diseminării metastatice

## **Bibliografie selectivă**

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., et al. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8(1), 102. doi: 10.1186/1556-276x-8-102.
- 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 Lett* 356(2 Pt B), 946-952. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.010.
- Baguley, B.C. (2003). Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol* 4(3), 141-148. doi: 10.1016/s1470-2045(03)01018-0.
- Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 23), 5591-5596. doi: 10.1242/jcs.116392.
- Banciu, M., Metselaar, J.M., Schiffelers, R.M., and Storm, G. (2008). Antitumor Activity of Liposomal Prednisolone Phosphate Depends on the Presence of Functional Tumor-Associated Macrophages in Tumor Tissue. *Neoplasia* 10(2), 108-117.
- Casanovas, O. (2012). Cancer: Limitations of therapies exposed. *Nature* 484(7392), 44-46. doi: 10.1038/484044a.
- Casian, T., and Iurian, S. (2017). QbD for pediatric oral lyophilisates development: risk assessment followed by screening and optimization. 43(12), 1932-1944. doi: 10.1080/03639045.2017.1350702.
- Chen, X., Song, M., and Zhang, B. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. 2016, 1580967. doi: 10.1155/2016/1580967.
- Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., and Hideg, E. (2016). Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules* 21(2). doi: 10.3390/molecules21020208.
- Denat, L., Kadarko, A., Marrot, L., Leachman, S., and Abdel-Malek, Z. (2014). Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *J Invest Dermatol* 134(6), 1512-1518. doi: 10.1038/jid.2014.65.

- Dianzani, C., Zara, G.P., Maina, G., Pettazzoni, P., Pizzimenti, S., Rossi, F., et al. (2014). Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *Biomed Res Int* 2014, 895986. doi: 10.1155/2014/895986.
- Downey, C.M., Aghaei, M., Schwendener, R.A., and Jirik, F.R. (2014). DMXAA causes tumor site-specific vascular disruption in murine non-small cell lung cancer, and like the endogenous non-canonical cyclic dinucleotide STING agonist, 2'3'-cGAMP, induces M2 macrophage repolarization. *PLoS One* 9(6), e99988. doi: 10.1371/journal.pone.0099988.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18(6), 884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37(4), 277-285. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
- Falleni, M., Savi, F., Tosi, D., Agape, E., Cerri, A., Moneghini, L., et al. (2017). M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 27(3), 200-210. doi: 10.1097/cmr.0000000000000352.
- Glasauer, A., and Chandel, N.S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 92(1), 90-101. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.017.
- Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S., and Aggarwal, B.B. (2010). Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy. *Biochim Biophys Acta* 1799(10-12), 775-787. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.05.004.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., et al. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 14(8), 821-830. doi: 10.1038/ni.2638.
- Israili, Z.H., and Lyoussi, B. (2009). Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak J Pharm Sci* 22(4), 425-462.
- Itakura, E., Huang, R.R., Wen, D.R., Paul, E., Wunsch, P.H., and Cochran, A.J. (2011). IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* 24(6), 801-809. doi: 10.1038/modpathol.2011.5.
- Jassar, A.S., Suzuki, E., Kapoor, V., Sun, J., Silverberg, M.B., Cheung, L., et al. (2005). Activation of tumor-associated macrophages by the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid induces an effective CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated antitumor immune response in murine models of lung cancer and mesothelioma.
- Kessler, M., Ubeaud, G., and Jung, L. (2003). Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* 55(1), 131-142. doi: 10.1211/002235702559.
- Liang, C.C., Park, A.Y., and Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2), 329-333. doi: 10.1038/nprot.2007.30.
- Liou, G.Y., and Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44(5), 479-496. doi: 10.3109/10715761003667554.
- Lopez-Bergami, P., Fitchman, B., and Ronai, Z. (2008). Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochem Photobiol* 84(2), 289-306. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00254.x.

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205.
- Mills, C.D. (2001). Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 21(5), 399-425.
- Orsolic, N., Kunstic, M., Kukolj, M., Gracan, R., and Nemrava, J. (2016). Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. *Chem Biol Interact* 256, 111-124. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.027.
- Porfire, A., Tomuta, I., Muntean, D., Luca, L., Licarete, E., Alupeii, M.C., et al. (2015). Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *J Liposome Res* 25(4), 261-269. doi: 10.3109/08982104.2014.987787.
- Redondo, P., Lloret, P., Idoate, M., and Inoges, S. (2005). Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 30(5), 541-545. doi: 10.1111/j.1365-2230.2005.01849.x.
- Tasdogan, A., Faubert, B., Ramesh, V., Ubellacker, J.M., Shen, B., Solmonson, A., et al. (2020). Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature* 577(7788), 115-120. doi: 10.1038/s41586-019-1847-2.

