

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Efectul modulator al unor produși naturali în terapia fotodinamică a tumorilor experimentale

Doctorand **István-Péter Laszló**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Adriana Mureșan**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

“Nu zi niciodată NU SE POATE, ci începe cu SĂ VEDEM”
Nicolae Iorga

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Laszló I-P, Laszló MR, Toma V, Baldea I, Olteanu D, David L, Moldovan B, Ion RM, Moldovan R, Filip GA, Kacso G, Cainap C, Clichici S, Muresan A. The *in vivo* modulatory effects of Cornus mas extract on photodynamic therapy in experimental tumors. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020; 30: article number 101656. *ISI Factor de Impact - 3,631 (studiu cuprins în capitolul 5)*
2. Laszló, I-P, Laszló M, Popescu T, Toma V, Ion R, Moldovan R, Filip A, Cainap C, Clichici S, Muresan A. The comparative effects of Resveratrol and Curcumin in combination with photodynamic therapy. Medicine and Pharmacy Reports. 2022;95(2):165-178. *CNCSIS C (studiu cuprins în capitolul 5)*

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Stadiul actual al cunoașterii	17
1.2. Definiții de bază și metode de tratament ale cancerului	17
1.2. Terapia fotodinamică	18
1.2.1. Scurt istoric	18
1.2.2. Definiția terapiei fotodinamice și principiul de tratament	20
1.2.3. Componentele fotochimice și principiile terapiei fotodinamice	22
1.2.4. Mecanismele de acțiune ale terapiei fotodinamice	26
1.2.5. Mecanismele vasculare	27
1.2.6. Mecanismele imunologice	27
1.2.7. Fotosensibilizatorii - elementele cheie ale terapiei fotodinamice	28
1.2.8. Potențiali fotosensibilizatori naturali cu aplicații în terapia oncologică	31
1.2.9. Curcumina	32
1.2.10. Resveratrolul	34
1.2.11. Fructul de Cornus mas	37
1.2.12. Avantajele și dezavantajele terapiei fotodinamice în cancer	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
1. Ipoteza de lucru	43
1.1. Obiective	43
1.1.1 Generale	43
1.1.2 Specifice	43
2. Metodologia generală a cercetării	45

3. Studiu 1. Efectele modulatoroare in vivo ale extractului natural de Cornus mas asupra terapiei fotodinamice in tumori experimentale la șobolani Wistar	51
3.1. Introducere	51
3.2. Obiective	52
3.3. Material și metode	52
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	68
4. Studiu 2. Efectele asocierii Curcuminei la terapia fotodinamică în tumori experimentale	71
4.1. Introducere	71
4.2. Obiective	72
4.3. Material și metode	72
4.4. Rezultate	74
4.5. Discuții	84
4.6. Concluzii	86
5. Studiu 3. Efectele modulatoroare in vivo ale Resveratrolului asupra terapiei fotodinamice cu TSPP în tumori experimentale	87
5.1. Introducere	87
5.2. Obiective	88
5.3. Material și metode	88
5.4. Rezultate	90
5.5. Discuții	100
5.6. Concluzii	103
6. Concluzii generale	105
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

ABREVIERI UTILIZATE IN TEXT

TFD	Terapie fotodinamică
TFDA	Terapie fotodinamică antimicrobiană
FS	Fotosensibilizator
SRO	Specii reactive de oxigen
SNC	Sistem nervos central
HpD	Derivat al hematoporfirinei
CpD	Derivați de clorofilă
RPN	Răspuns proteic nepliat
ERS	Perturbarea reticulului endoplasmic
IHC	Imunohistochimie
MDA	Malondialdehidă
GSH	Glutation redus
GSSG	Glutation oxidat
TPC	Conținutul total de polifenoli
TAC	Conținutul total de antociani
AA	Activitatea antioxidantă
IR	Iradiere
CM	Cornus mas
SD	Deviație standard
CUR	Curcumina
CMC	Carbomexitil celuloză
HE	Hematoxilină eozină
GAE	Acid galic
RES	Resveratrol
WB	Western Blot
ADN	Acid dezoxiribonucleic
NOS2	Nitric oxid sintaza 2
COX-2	Ciclo-oxigenaza 2
TSPP	5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

GADPA

Gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenaza

γH2AX

Phosphorylated H2A histone family member X

INTRODUCERE

Patologia oncologică este tot mai des întâlnită, astfel încât, din păcate aproape în fiecare familie începe să existe câte un membru suferind de această boală.

Ca urmare a frecvenței acestei boli, a faptului că este o mare problemă de sănătate publică atât națională, cât și pe plan mondial, a impactului social, psihologic, economic considerăm studiul de față un pas important în dezvoltarea unor noi metode de tratament cu un cost redus, fără toxicități și cu un mare potențial curativ.

Rata de vindecare este mai mare în țările dezvoltate comparativ cu țările în curs de dezvoltare ca urmare a costurilor în ceea ce privește tratamentele, screening-ul și accesul la servicii medicale.

Pe de altă parte, deși cercetarea în domeniul terapiilor împotriva neoplaziilor este în plin avânt, uneori anumite tumori sunt refractare la orice tratament existent, pacienții se confruntă cu multiple toxicități (care nu permit administrarea de tratamente cu toxicități mai mult sau mai puțin cunoscute) lucru care cere în mod implicit cercetarea și găsirea unor alternative viabile.

Deoarece în literatura de specialitate nu sunt numeroase studii care folosesc terapie fotodinamică, alături de compuși naturali, am decis efectuarea unui asemenea studiu. Obiectivul principal a fost acela de a observa și documenta efectul sinergic sau aditiv asupra țesutului tumoral cu consecințe reduse asupra țesutului normal, peritumoral.

**STADIUL
ACTUAL
AL
CUNOAȘTERII**

1. Stadiul actual al cunoașterii

1.2. Definiții de bază și metode de tratament ale cancerului

La ora actuală, la nivel mondial, cancerul reprezintă una dintre cele mai frecvente boli, atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, fiind caracterizată prin creșterea necontrolată a celulelor și dezvoltarea celulelor anormale, din cauza modificărilor genetice sau a expunerii la substanțe cancerigene. Mutația celulelor normale duce la proliferarea celulară anormală, astfel că se dezvoltă tumora, care poate să fie benignă, premalignă (necanceroasă) sau malignă (canceroasă)¹.

Cancerul cunoscut sub denumirea științifică de tumoră malignă sau neoplasm malign, reprezintă o denumire generică, pentru un grup de boli ce implică dezvoltarea anormală a celulelor cu potențial de a invada sau a se răspândi în alte părți ale corpului, prin sânge sau prin sistemul limfatic, literatura de specialitate descriind mai multe tipuri de cancer. *Carcinomul* debutează în piele sau în țesuturile care acoperă organele interne. *Sarcomul* este un cancer care debutează în oase, cartilaj, grăsime, mușchi, vase de sânge sau în alt țesut conjunctiv, sau de susținere. *Leucemia* debutează în țesutul care formează sângele, cum ar fi măduva osoasă, provocând formarea mai multor celule sanguine anormale. *Limfomul* și *mielomul multiplu* sunt cancere care încep în celulele sistemului imunitar, iar cancerele sistemului nervos central (SNC) sunt cancere care încep în țesuturile creierului și ale măduvei spinării².

Cu toate că, în ultimii ani, în medicină s-au făcut progrese semnificative, cancerul rămâne o problemă de sănătate mondială, principalele cauze de deces fiind determinate de recurență și de metastaze. Acestea sunt caracterizate printr-un proces secvențial și complex, în timpul căruia, celulele canceroase invadează anumite organe, inclusiv plămânii, ficatul, creierul și oasele. De cele mai multe ori, leziunile metastatice sunt multiple și rezistente la terapiile convenționale, dificil de tratat pe cale chirurgicală, prin chimioterapie sau radioterapie³.

În ciuda eforturilor enorme care se fac cu scopul de a descoperi medicamente, cancerul continuă să fie una dintre principalele cauze de deces la nivel mondial. Dificultatea în tratarea acestei boli se datorează naturii sale **multifactoriale și poligenice**, implicând mai multe organe, țesuturi și căi biochimice. Prin urmare, ca și în cazul multor alte boli, complexe, tratamentul standard cu un singur medicament s-a dovedit a fi ineficient în timp⁴.

În prezent, în tratamentul cancerului sunt utilizate chirurgia, radioterapia și chimioterapia, fie ca monoterapie, fie ca tratamente combinate dar, cu toate acestea, tratamentele determină frecvent efecte secundare redundante¹.

Pentru a depăși natura multifactorială a acestei boli se iau în considerare strategiile care prevăd administrarea terapiei complexe (amestecuri de medicamente) sau a terapiei combinate, respectiv medicamente în raport de dozare fixă, care vizează diferite ținte cu scopul de a obține un efect sinergic reducând rezistența la medicamente⁴. În ultimii ani, strategia de combinare s-a mutat spre „strategia hibridă”, și anume proiectarea unei noi entități moleculare (molecula hibridă), care conține două sau mai multe molecule biologic active⁴. Strategia hibridă (de unde termenul hibrid) implică faptul că, această nouă entitate terapeutică are caracteristici superioare, în comparație cu componentele individuale (de exemplu, toxicitate și biodisponibilitate)⁴.

1.2. Terapia fotodinamică

1.2.1. Scurt istoric

Încă din antichitate, lumina a fost utilizată pentru tratarea anumitor boli de piele, de către civilizațiile egiptene, indiene și chineze. La începutul secolului al XX-lea, respectiv în 1903, Niels Finsen primește *Premiul Nobel* pentru fiziologie^{3,5}, pentru descoperirea conform căreia lumina soarelui sau lumina de la o lampă cu arc de carbon ar putea fi folosită pentru a trata *Lupus vulgaris*, o afecțiune tuberculoasă a pielii. Această descoperire a marcat începutul fototerapiei moderne⁵.

În urmă cu 4000 de ani, lumina a fost utilizată pentru tratarea bolii *Vitiligo*⁶. Civilizațiile antice, indiene și chineze utilizau lumina în combinație cu substanțele chimice reactive, de mai bine de 3000 de ani, pentru tratamentul diferitelor boli cum ar fi *Vitiligo*, *Psoriazisul* și cancerul de piele³.

În 1900 studentul german la medicină, O. Raab, a raportat pentru prima dată moartea celulară indusă de interacțiunea luminii cu substanțele chimice, în timp ce profesorul H. von Tappeiner din München, a descris efectul letal al combinației dintre lumină și roșul de acridină, pe protozoare, prezicând potențialele aplicații ale viitoarelor substanțe fluorescente în medicină⁷. Toxicitatea a apărut ca un rezultat al fluorescenței cauzate de transferul de energie de la lumină, la substanța chimică. În același an, neurologul francez J. Prime a descoperit că pacienții cu epilepsie, tratați cu eozină, administrată pe cale orală, au dezvoltat dermatită în zonele expuse la lumina soarelui. În 1903, H. von Tappeiner și A. Jesionek au tratat tumorile cutanate cu aplicații de eozină și lumină albă, în 1904, H. von Tappeiner și A. Jodlbauer au identificat că oxigenul este o componentă integrantă în reacțiile de fotosensibilizare, iar în 1907 au introdus termenul de „acțiune fotodinamică”, pentru a descrie acest fenomen⁶.

În 1841, H. Scherer a produs pentru prima dată hematoporfirina, în timp ce investiga natura sângelui. Proprietățile sale fluorescente nu au fost descrise până în 1867, iar această substanță a primit numele de hematoporfirina abia în 1871. În 1911, W. Hausmann a raportat efectele hematoporfirinei și luminii asupra protozoarelor și celulelor sanguine, descriind reacțiile pielii la șoarecii expuși la lumină, după administrarea de hematoporfirină⁶.

În 1913, F. Meyer-Betz s-a injectat cu 200 mg de hematoporfirină, pentru a determina dacă ar putea fi induse efecte similare în organismele umane și a raportat durerea prelungită și edemul zonelor expuse la lumină. În 1960, R. Lipson și S. Schwartz au inițiat conceptul de terapie fotodinamică (TFD) la Clinica Mayo, descoperind efectele diagnostice și terapeutice ale unui derivat al hematoporfirinei (HpD), administrat prin injectare, în cazul cancerului. Utilizarea clinică a TFD anticancer a început la Institutul de Cancer din Roswell Park, în anii 1970⁶.

În 1975, T. Dougherty a raportat că administrarea derivatului de HpD și activarea acesteia cu lumină roșie a eradicat complet creșterea tumorii mamare la șoareci⁶. Dr. Dougherty a tratat cu succes cancerul folosind TFD în modele preclinice⁷. În același an, J. F. Kelly a demonstrat eliminarea carcinomului vezicii urinare la șoareci, prin activarea HpD cu lumină. În 1975, a avut loc un alt eveniment major, în dezvoltarea TFD, când J. F. Kelly și M. E. Snell au realizat primul studiu uman al efectelor TFD în tratarea cancerului de vezică, utilizând HpD^{6,8}.

În 1978, Dougherty și colaboratorii au raportat primul caz clinic, tratat prin TFD la un pacient cu cancer de sân, metastatic la piele^{9,10}.

Ulterior, tehnica TFD a fost aplicată și în tratamentul patologiilor tractului gastrointestinal, fiind folosită prima dată în 1984 de J. S. McCaughan, care a tratat pacienții cu cancer esofagian¹¹. Un an mai târziu, Y. Hayata a folosit aceeași tehnică pentru a trata pacienții cu carcinom gastric⁶.

În 1987, Lee și colab. au raportat un nou fotosensibilizator (FS), constând din derivați de clorofilă (CpD), care poate fi obținut din surse naturale, inclusiv din plante. Ulterior, eficacitatea fotosensibilizantă a CpD a fost comparată cu cea a HpD, arătând că CpD au fost la fel de eficienți ca și HpD pentru TFD, in vivo⁷.

Dougherty și colegii săi au purificat HpD și au produs *Photofrin*, care a fost prima moleculă fotosensibilizantă aprobată de US Food and Drug Administration (FDA) în 1995, pentru tratamentul cancerului^{5,7,9}.

Furuse și colaboratorii au efectuat studii clinice, de faza II, folosind *Photofrin* (porfimer de sodiu), pentru cancerul pulmonar, în stadiu incipient, între iunie 1989 și februarie 1992, acesta fiind aprobat în 1998, pentru tratamentul cancerului pulmonar precoce fără celule mici⁹, în prezent fiind utilizat pentru tratarea cancerelor de esofag, adenocarcinom pulmonar și pentru cancerul pulmonar (endobronșic)⁷.

Un alt FS care a fost explorat pentru efectul antitumoral a fost hipericina, izolată din *Hypericum perforatum* L. în 1939, iar acțiunea clinică a hipericinei ca și fotosensibilizator a fost raportată pentru prima dată în 1996, de Koren și colaboratorii,

pentru tratamentul mezenteliomului malign, ulterior aplicațiile acestea fiind extinse pentru diferite tumori de piele⁷.

De atunci, TFD a evoluat continuu, fiind aplicată în diferite studii clinice și extinsă și în alte domenii, în afară de tratamentul tumorilor. Ulterior Dr. M. Weber devine pionierul terapiei moderne cu laser, aplicând TFD pentru a trata boli bacteriene, virale și parazitare, denumind terapia fotodinamică antimicrobiană (TFDA) și dezvoltând Tehnologia Weberneedle®⁵. În prezent, eforturile s-au concentrat pentru identificarea de noi compuși izolați din plante, cu potențial fotodinamic, mulți dintre ei fiind considerați metaboliți secundari, de exemplu seva galbenă lăptoasă (latex) de la rostopască (*Chelidonium majus L.*), care a fost folosită în tradiția populară, de secole, pentru a trata afecțiunile pielii, cum ar fi negii, condiloamele și papiloamele, datorită conținutului bogat de compuși biologic activi, precum alcaloizii protoberberine cu acțiune de inhibiție a creșterii unor linii variate de celule canceroase, după iradierea cu lumină. Studiile actuale se axează pe exploatarea și identificarea celor mai eficiente și mai sigure plante, care ar putea fi o potențială sursă pentru FS⁷.

1.2.2. Definiția terapiei fotodinamice și principiul de tratament

TFD reprezintă o abordare nouă, promițătoare pentru eradicarea și controlul diferitelor tipuri de cancer³.

Inițial, TFD a fost utilizată pentru tratarea leziunilor benigne, dar pe măsură ce studiile au evoluat, acest tip de terapie a început să fie utilizată și pentru tratarea leziunilor maligne, fiind un tratament promițător, datorită avantajelor sale exprimate prin minimalizarea efectelor adverse, comparativ cu cele induse de terapiile clasice. În același timp, TFD este o metodă de direcționare multiplă, Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente enumerând TFD ca fiind noua metodă de tratament, pentru terapia clinică a pacienților cu cancer, aplicată independent sau combinată cu intervențiile chirurgicale, și/sau chimioterapie, fiind aplicată pe scară largă, la nivel mondial¹².

Tratamentul prin TFD constă în administrarea unui fotosensibilizator (topic sau intravenos), care se acumulează selectiv în țesutul tumoral (în timpul unui interval medicament-lumină), urmată de fotoactivarea acestuia, prin expunerea ulterioară la o sursă de lumină, cu o lungime de undă adecvată (în general roșu spectral, în regiunea, $\lambda \geq 600$ nm). FS în sine, nu reacționează cu biomoleculele. Prin iluminare se transferă energie de la lumină, la oxigenul molecular, pentru a genera specii reactive de oxigen (SRO)¹, citotoxice¹³, cum ar fi oxigenul singlet (1O_2), radicalul superoxid ($O_2^{\cdot-}$), radicalul hidroxil ($HO^{\cdot}$), și peroxidul de hidrogen (H_2O_2), fotoproduși citotoxici, care produc o cascadă de evenimente biochimice, care pot induce deteriorarea și moartea țesutului țintă⁵, ducând la moartea celulei³. Această reacție are ca rezultat oxidarea macromoleculelor celulare din jurul celulelor tumorale, exercitând un efect anticancerigen prin apoptoză, necroză¹³ și autofagie a celulelor canceroase¹.

Principalele tipuri de surse de lumină utilizate în TFD sunt laserele, diodele emițătoare de lumină și lămpile, alegerea sursei fiind influențată de locația țintei, de spectrul de absorbție al FS utilizat și de doza de lumină necesară pentru activarea FS¹³.

Protocolul de consens pentru TFD topică, convențională, în dermatologie, recomandă o anumită pregătire a leziunilor pentru a crește absorbția FS și penetrarea luminii. Tratamentul topic, tipic, prin TFD presupune parcurgerea următorilor pași⁵:

- Spălarea zonei de tratat cu apă și săpun;
- Îndepărtarea oricărui reziduu și ulei rămas, cu un tifon înmuiat în acetonă sau alcool;
- Aplicarea uniformă a FS pe întreaga zonă de tratat, ulterior aplicându-se un al doilea strat de FS, după ce primul s-a uscat;
- Incubarea FS timp de 0,5–4 ore;
- Activarea FS cu sursa de lumină corespunzătoare;
- Spălarea zonei tratate cu apă și săpun, pentru a îndepărta orice FS rezidual;
- Evitarea expunerii la lumina directă a soarelui, timp de 48 de ore;
- Repetarea operațiunilor, după cum este necesar, după 2-3 săptămâni.

Proprietățile citotoxice ale TFD sunt datorate oxidării unei game largi de biomolecule din celule, inclusiv acizi nucleici, lipide și proteine, ceea ce duce la o alterare severă a cascadelor de semnalizare celulară sau a expresiei genelor, în sens activator sau inhibitor^{3,14,15}.

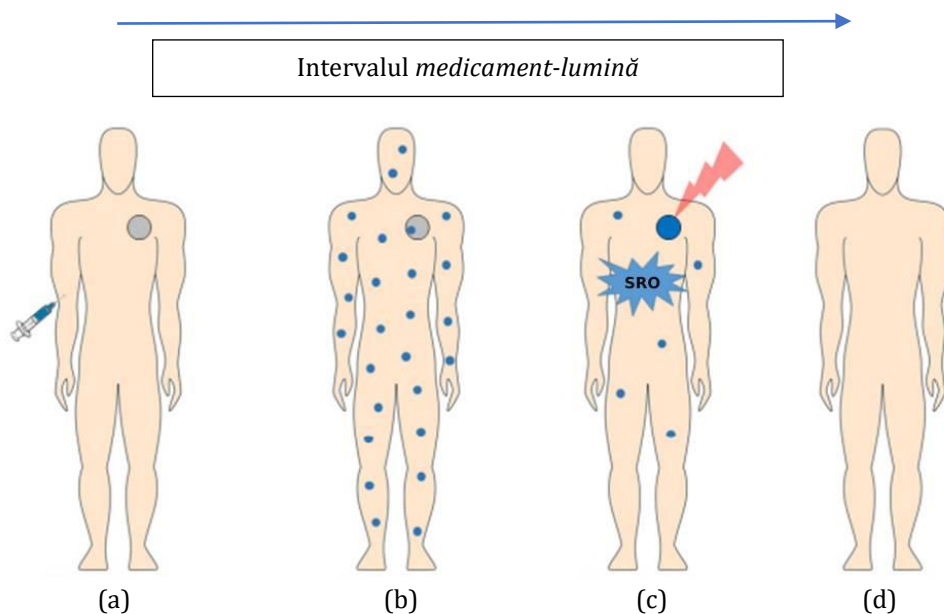


Fig. 1. Reprezentarea aplicării clinice a tratamentului bazat pe TFD, în cazul unor tumori solide localizate⁵: administrarea fotosensibilizatorului (a), distribuirea fotosensibilizatorului (b), iradierea tumorii (c) și distrugerea acesteia (d)

1.2.3. Componentele fotochimice și principiile terapiei fotodinamice

TFD a câștigat popularitate printre tipurile de terapii, bazându-se pe interacțiunea benefică dintre lumină, compușii fotosensibili numiți FS și oxigenul molecular (Figura 2)^{5,13}.

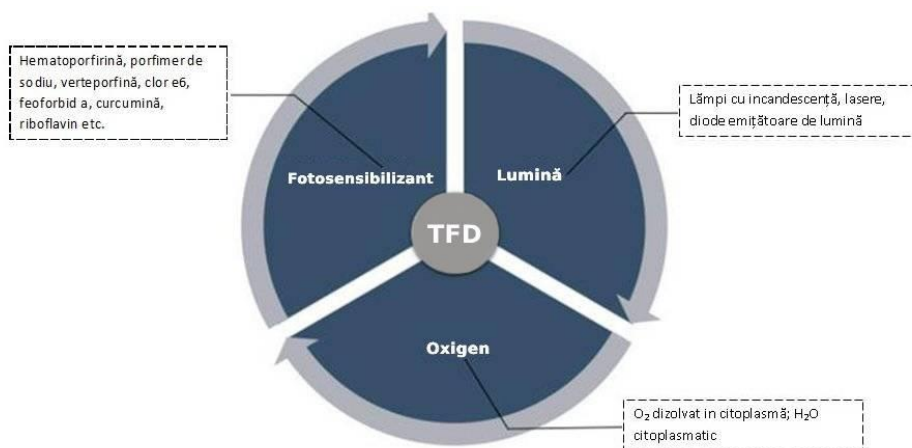


Fig. 2. Componentele terapiei TFD: FS, lumina și oxigenul¹³

Principalele surse de lumină utilizate în TFD sunt laserele, diodele care emit lumină și lămpile, alegerea fiind făcută în funcție de locația țintei, de spectrul de absorbție al fotosensibilizatorului utilizat și de doza de lumină necesară^{13,16}. Au fost dezvoltate tehnologii bazate pe LED-uri și lasere cu diode, care au permis îmbunătățirea fluxului de lumină cu o portabilitate mai mare și cu un design de precizie al fibrei optice^{7,17}. Alegerea sursei de lumină se face luând în considerare următoarele aspecte: natura FS, spectrele de absorbție ale acestuia, locația, dimensiunea și caracteristicile țesutului afectat¹.

Sub acțiunea luminii, compusul fotosensibil, numit F netoxic, plasat la locul țintă este activat, putând absorbi și transfera electroni, în timp ce moleculele de oxigen, găsite *in situ*, acționează ca electroni acceptori. Prin urmare, sunt generate specii reactive de oxigen citotoxice, producând daune ireversibile microorganismelor și țesuturilor țintă, prin ruperea membranei celulare, provocând moartea celulelor prin necroză sau apoptoză^{13,18}.

Există două tipuri principale de SRO, fiecare corespunzând unui mecanism distinct al TFD (Figura 3). Prin transferul de electroni se produc radicali de oxigen (de exemplu, anionul superoxid, O₂•⁻, radicalul hidroxil HO•, radicalul hidroperoxid HOO•), în timp ce, prin transfer de energie, se obține oxigen singlet (¹O₂)¹³. Oxigenul

singlet este extrem de reactiv și poate interacționa cu un număr mare de substraturi biologice, inducând daune oxidative și, în cele din urmă moartea celulară⁵.

Mecanismul de tip I presupune tranziția moleculelor FS de la starea fundamentală, la starea excitată singlet și la starea excitată triplet. Apoi, prin transferul de electroni, aceste molecule fotosensibilizante, excitate, interacționează cu substratul pentru a se forma radicali liberi¹³.

În schimb, în reacția fotodinamică de tip II, moleculele FS excitate transferă energie la oxigenul molecular pentru a produce oxigen singlet foarte activ, care interacționează în continuare cu lipidele, proteinele și acizii nucleici, provocând moartea celulelor prin necroză sau apoptoză¹³.

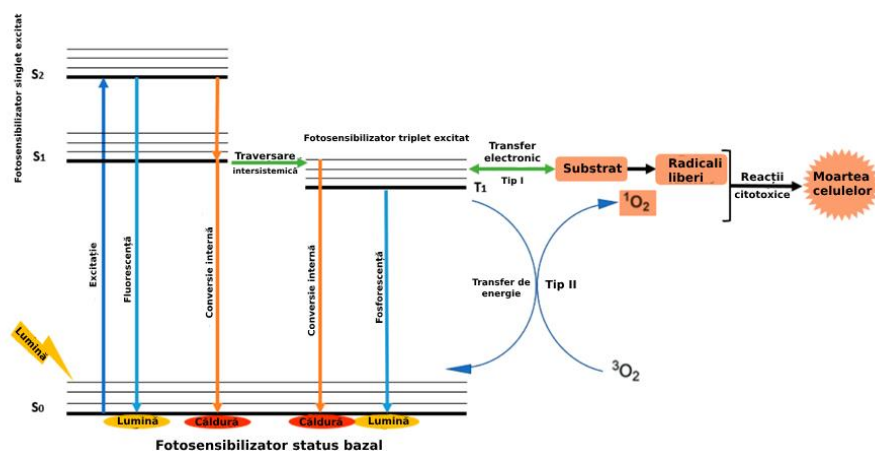


Fig. 3. Reprezentarea schematică a TFD¹³

Principiile și componentele fotochimice ale TFD, implică oxidarea fotosensibilizantă a biomoleculelor și poate fi realizată prin două mecanisme. În cadrul primului mecanism (Figura 4), energia luminoasă trece de la moleculele excitate la biomolecule, prin transfer de electroni/hidrogen în reacții de contact direct, determinând deteriorarea specifică a biomoleculelor și inițierea reacțiilor radicale în lanț³.

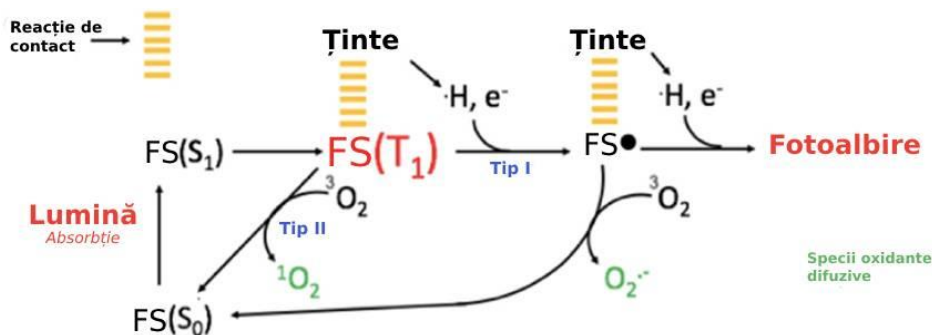


Fig. 4. Mecanismele de fotosensibilizare³

FS este o moleculă capabilă să absoarbă o anumită lungime de undă a luminii. Odată excitat, FS tranzitează de la starea sa fundamentală $PS(S_0)$, la stările excitate $PS(S_1)$ de singlet și $PS(T_1)$ de triplet. În acest moment, starea excitată de triplet $PS(T_1)$ poate reacționa direct cu biomoleculele, cum ar fi proteinele sau lipidele (ținte), prin reacția fotochimică de tip I, rezultând formarea de radicali, cum ar fi $PS\bullet$, capabili să inițieze reacții în lanț. În caz contrar, $PS(T_1)$ poate reacționa cu oxigenul molecular 3O_2 , prin reacția fotochimică de tip II. Ambele generează specii oxidante difuzive precum superoxidul radical, $O_2^{\bullet-}$, și oxigenul singlet, 1O_2 , prin tipul I și respectiv II³.

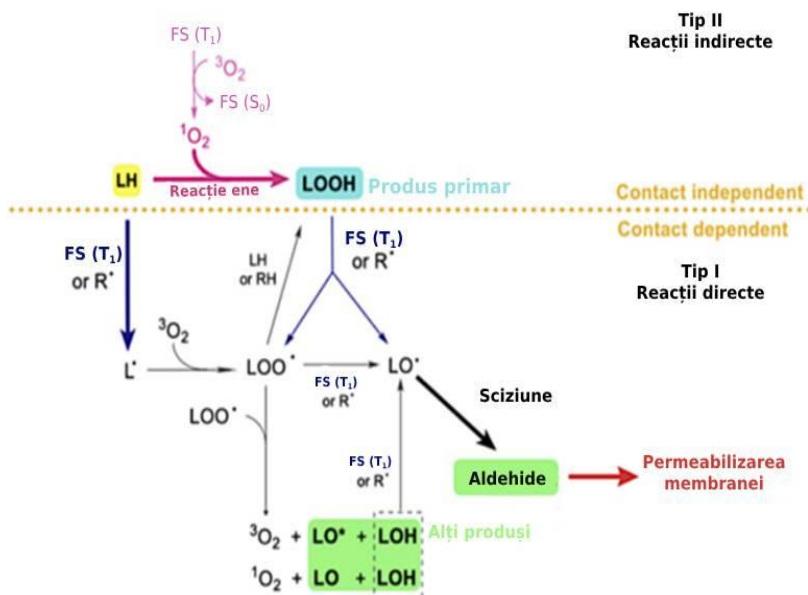


Fig. 5. Mecanismele fotoinduse, de deteriorare a membranei³

Expunerea unui fotosensibilizator la lumină, cu o lungime de undă adecvată, determină absorbția de energie și trecerea din statusul bazal S_0 , la un status excitat S_1 (singlet), și apoi la un status cu energie mai mare T_1 (triplet), cu durată de viață mai lungă, ceea ce permite ca ulterior să transfere energie, sau electroni, către diferite molecule și ulterior să se întoarcă la statusul bazal S_0 (Figura 6).

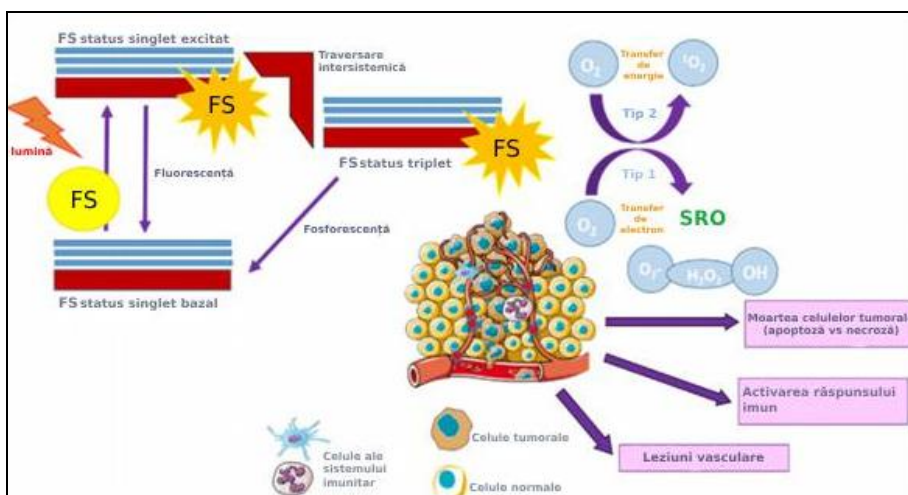


Fig. 6. Mecanismul de excitare a FS și generarea SRO, după iradierea cu lumină⁷.

Sunt ilustrate și leziunile celulare asociate cu TFD

Aceste procese sunt descrise comprehensiv în diagrama Jablonski¹⁹ (Figura 7).

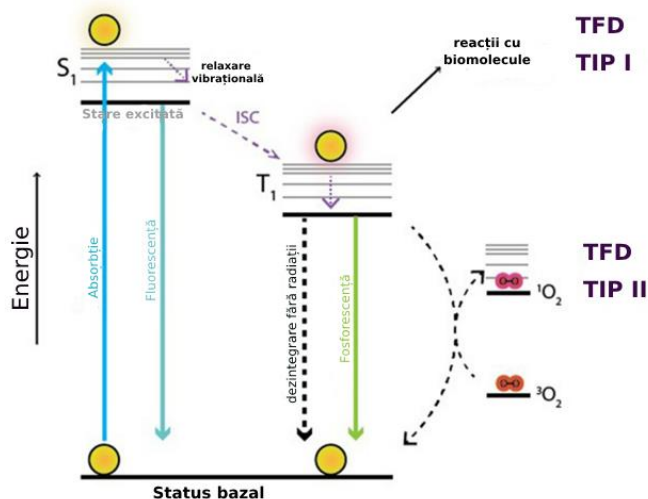


Fig. 7. Diagrama nivelelor energetice Jablonski, prezentând procesele fotofizice ale generării singletelor de oxigen¹⁹

Produsele rezultate în urma reacțiilor de tip I și de tip II, sunt responsabile pentru moartea celulară și terapeutică. Reacțiile de tip I și de tip II pot apărea simultan, raportul dintre aceste procese fiind dependent de FS, substrat, concentrația de oxigen, și afinitatea de legare a sensibilizatorului la substrat. În cazul tratamentului prin TFD, predomină reacția de tip II, iar oxigenul singlet este principalul agent citotoxic responsabil pentru efectele biologice⁵.

Alte studii¹² au evidențiat faptul că, activarea permeabilității mitocondriale crește nivelurile de tranziție ale substanțelor azotate reactive, cum ar fi oxidul de azot, pe când studiile anterioare raportau că ADN-ul a fost considerat o țintă importantă a TFD, deoarece rupturile ADN-ului dublu catenar reprezintă cea mai letală formă de deteriorare a celulelor tumorale.

Concentrația de oxigen din țesuturi este crucială pentru producerea speciilor reactive de oxigen, în timpul TFD²⁰. Concentrația de oxigen variază semnificativ în tumori, dar și în diferite regiuni ale aceleiași tumori, în funcție de densitatea sistemului vascular. Tumori mai profunde, solide, caracterizate printr-un mediu anoxic, din cauza lipsei de oxigen, limitează producția SRO. În cazul în care tumora este iradiată cu o anumită fluență a luminii, are loc o epuizare locală, temporară a oxigenului, ceea ce va determina întreruperea producției SRO. Epuizarea oxigenului are loc atunci când rata consumului de oxigen, prin reacție fotodinamică este mai mare decât viteza de difuziune a oxigenului, în zona iradiată. TFD poate provoca și ocluzia vasculară a tumorii, prin reducerea fluxului de sânge către țesutul tumoral, crescând astfel hipoxia^{5, 21}.

Reacțiile adverse și citotoxicitatea, rezultate în urma tratamentului ce implică utilizarea TFD depind de tipul agentului fotosensibilizant, localizarea acestuia (intracelulară sau extracelulară), doza totală administrată, cantitatea de lumină (fluentea luminii), rata fluentei luminii, disponibilitatea oxigenului, timpul de administrare al FS și expunerea la lumină^{22,23}. De asemenea, eficiența TFD depinde și de tipul tumorilor, astfel că, în cazul celor superficiale și mai oxigenate se produce o cantitate mai mare de SRO, pe când în cazul celor profunde și hipoxice, pătrunderea luminii în țesut este mai dificilă, motiv pentru care și concentrația de oxigen este mai scăzută, ceea ce va determina o abordare mai dificilă prin intermediul TFD^{5,22}.

1.2.4. Mecanismele de acțiune ale terapiei fotodinamice

În literatura de specialitate^{24,25,26} sunt descrise trei mecanisme principale (Figura 8), prin care SRO, produse de reacțiile fotochimice, provoacă distrugerea celulelor, prin intermediul **apoptozei** și **necrozei** sau pot provoca distrugerea vaselor asociate tumorii și a vaselor sănătoase din jur, ducând la o întrerupere a furnizării de oxigen și de nutrienți, și în consecință la moartea celulară indirectă, datorată **hipoxiei**. În ultimul caz, TFD poate induce un răspuns inflamator, care activează un răspuns imunitar împotriva celulelor tumorale^{27,28}. Rezultatul tratamentului prin TFD depinde

de toate mecanismele, contribuția fiecăruia fiind determinată de tipul de tratament utilizat.

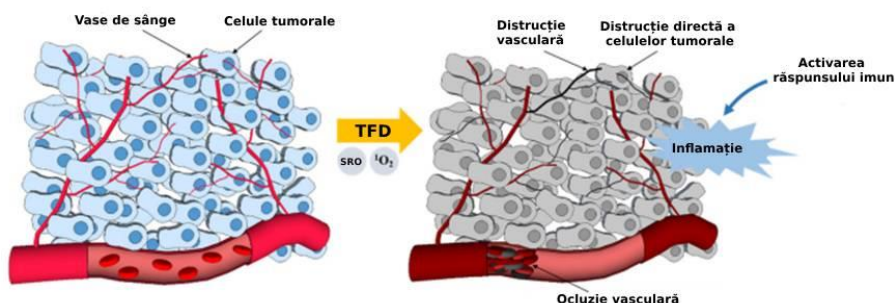


Fig. 8. Mecanismele de acțiune ale TFD⁵

Distrugerea tumorii poate avea loc prin căi programate (apoptotice), autofagice²⁹ și prin căi neprogramate (necrotice). Apoptoza este inițiată în cazul unor doze scăzute de lumină, fiind dependentă de energie. Morfologic, apoptoza este caracterizată prin condensarea cromatinei, scindarea ADN-ului cromozomial în fragmente internucleozomale, contracția celulară, încrețirea membranei, ruperea și formarea de corpuri apoptotice, fără citoplasmă³⁰. În cazul apoptozei nu apare un răspuns imun, deoarece nu se elimină substanțe toxice. Dacă intensitatea luminii este ridicată, celulele tumorale sunt ablate prin necroză, mecanism rapid al morții celulare, caracterizat prin vacuolizarea citoplasmei și defalcarea membranei celulare, rezultând un răspuns inflamator datorat evacuării conținutului citoplasmatic și mediatorilor pro-inflamatori în mediul extracelular³¹.

1.2.5. Mecanismele vasculare

Aplicarea TFD conduce atât la distrugerea celulară cât și a microvascularizației tumorale. Celulele endoteliale ale sistemului vascular pot concentra FS pentru a crea radicali liberi, atunci când sunt activate cu o lumină adecvată. Perturbarea pereților vasculari duce la întreruperea alimentării tumorii cu oxigen și nutrienți, ceea ce determină moartea celulelor tumorale. Efectul vascular al TFD, care folosește FS plasați local, în sistemul vascular, ce se elimină rapid din organism, s-a dovedit a fi foarte important pentru eficacitatea terapiei pe termen lung și poate fi îmbunătățită prin utilizarea unui interval scurt medicament-lumină (timpul dintre momentul injectării FS și iluminare)^{5,26,32}

1.2.6. Mecanismele imunologice

La început, TFD a fost considerată drept tratament cu efect localizat asupra celulelor și vascularizației tumorale. Recent, studiile au demonstrat că această terapie influențează adaptativ răspunsul imun, stimulându-l sau suprimându-l, eficacitatea terapiei pe termen lung fiind dependentă de inducerea imunității antitumorale³³. În

timpul inducerii necrozei tumorale și a vascularizației acesteia apare și o cascadă imună, iar modificarea integrității țesuturilor și a homeostaziei declanșează un răspuns inflamator acut, inițiat de eliberarea unor mediatori proinflamatori, care includ citokine, factori de creștere și proteine. Acești mediatori atrag celulele imune înăscute ale gazdei (neutrofilele, mastocitele, macrofagele și dendritele), care infiltrază țesutul deteriorat în scopul restabilirii homeostaziei în regiunea afectată. Macrofagele fagocitează celulele canceroase deteriorate prin TFD și prezintă proteinele de la aceste tumori, la celulele T helper CD4, care apoi activează limfocitele T citotoxice CD8, care pot recunoaște și distruge în mod specific celulele tumorale, putând circula perioade lungi, în întregul organism, asigurând un răspuns imun antitumoral sistemic^{5,26,29,33}.

1.2.7. Fotosensibilizatorii - elementele cheie ale terapiei fotodinamice

Fotosensibilizatorii (FS) sunt molecule care ar trebui să se acumuleze în tumori, cu randament cuantic de oxigen singlet ridicat, cu activitate scăzută în absența luminii, ce trebuie eliminate rapid din corpul pacientului, conținând compuși chimici cu proprietăți hidrofile și lipofile (mafiile), având maximul de absorbție al luminii aproximativ între 600 nm și 800 nm^{34,35}. Lungimile de undă mai mici decât 800nm nu produc reacții fotodinamice. Fotosensibilizatorii sunt compuși naturali sau chimici, conjugați cu un grup cromofor, care absoarbe lumina vizibilă cu o absorbantă chimică puternică³⁶.

FS ideal ar trebui să fie pur din punct de vedere chimic, cu compoziție uniformă, generator eficient de specii reactive de oxigen, să se acumuleze selectiv în țesutul țintă, să fie inofensiv, lipsit de toxicitate în absența radiațiilor, să absoarbă lumina în zona lungimilor de undă ale spectrului situate între 600–850 nm, (interval numit „fereastră fototerapeutică”), stabil în soluție, ser sau plasmă, ușor de eliminat din organism¹³, solubil și stabil în compuși apoși, cu randament cuantic mare pentru formarea stării de triplet, producerea oxigenului singlet și a altor specii reactive de oxigen, să se lege de locațiile intracelulare, care sunt foarte sensibile la deteriorarea oxidativă, fără efecte toxice asupra țesuturilor și organelor sănătoase, cu proprietăți farmacocinetice optime^{1,37}.

Literatura de specialitate trece în revistă o multitudine de FS chimici^{3,5,6,9,13,38} cât și potențiali FS naturali^{1,7,39,40,41,42}, clasificându-i în trei generații^{5,43}.

Din prima generație fac parte porfimersodium și hematoporfirina HpD⁵, Fotosensibilizatorul de prima generație Photofrin®Axcen Pharma, Mont-Saint-Hilaire, QC, Canada¹³, un amestec de derivați oligomerici de hematoporfirine, a fost aprobat pentru tratarea cancerului de plămân fără celule mici, esofagian, de creier și vezică urinară¹³, cu lumină roșie (630 nm), în 1993, în Canada, și rămâne cel mai utilizat fotosensibilizant, în ciuda selectivității sale slabe pentru cancer, a absorbției scăzute a luminii roșii și a fotosensibilității pe termen lung⁶. În 1970, Dr. Thomas Dougherty și colegii săi au testat „hematoporfirina derivat” (HpD), un amestec solubil în apă de

hematoporfirina, protoporfirina, deuteroporfirina, derivații acestora, monomerii, dimerii, oligomerii și esterii acestora^{10,13}.

Fotosensibilizatorii din a doua generație au apărut pentru a depăși unele dezavantaje ale celor din prima generație, legate de absorbția luminii într-o anumită regiune spectrală. Din categoria fotosensibilizatorilor de a doua generație fac parte derivații de clor, bacterioclorine și ftalocianine, care pot avea o acțiune mai puternică asupra regiunilor tumorale, datorită absorbției lor puternice în profunzimea regiunii roșii⁵. Acidul 5-aminolevulinic (Levulan®)^{1,6}, un precursor cheie pentru biosinteza protoporfirinei IX, și derivatul său metil aminolevulinat (Metvix®), sunt sintetizate cu ușurință, la puritate ridicată și aprobați de FDA ca fotosensibilizatori de a doua generație. Astfel, derivații de clor Foscan®^{1,6}, Radachlorin® și Laserphyrin® au fost aprobați pentru TFD clinică cu lumină roșie (lungimea de undă de cca. 660 nm), iar derivatul bacterioclorin Redaporfin, în faza clinică 2, poate fi activat cu lumină infraroșie, cu lungimea de undă de 749 nm⁶. Alte studii încadrează în categoria fotosensibilizatorilor de generația a doua și Alasens®¹. Cu toate că aceste molecule sunt utilizate pe scară largă pentru diferite tratamente împotriva cancerului, utilizarea lor clinică este limitată din cauza unor neajunsuri, cum ar fi lipsa purității chimice, un timp de înjumătățire mai lung, acumularea în țesuturi și capacitatea slabă de penetrare, în raport cu adâncimea țesuturilor¹.

Aceste dezavantaje ale fotosensibilizatorilor actuali implică nevoia de a studia ca agenți anticancerigeni, fotosensibilizatori din resurse naturale, compuși cu proprietăți farmacologice anticipate și cu aplicare clinică¹.

FS de generația a treia au apărut în principal cu scopul îmbunătățirii strategiei de țintire, amintind aici nano purtătorii fotosensibilizatorilor direcționați de anticorpi și fotosensibilizatorii încărcăți. Aceste abordări au fost dezvoltate pentru a crește puterea și eficiența TFD, permițând lărgirea tipurilor de țesuturi bolnave care ar putea fi tratate³. FS din generația a treia sunt molecule cu selectivitate îmbunătățită pentru regiunile tumorale, datorită conjuncției cu molecule de țintire, sau prin încapsulare în diferiți purtători (nanoparticule de aur, nanoparticule de silice, puncte cuantice, nanotuburi de carbon), pentru a-i ghida la tumori⁵. FS din generația a treia prezintă o specificitate tumorală mai mare, datorită activării cu surse de lumină, cu o anumită lungime de undă, fiind încă într-un stadiu incipient de cercetări preclinice și clinice⁷.

Munyandi și colaboratorii¹ raportează identificarea a peste 300 de compuși chimici, potențiali candidați pentru a fi utilizați drept FS. Dintre aceștia, câțiva au fost autorizați pentru aplicare clinică, în tratamentele prin TFD, alții au fost evaluați medical, în timp ce restul sunt încă în curs de examinare.

Fotosensibilizatorii pot fi legați covalent de mai multe biomolecule (anticorpi, proteine, carbohidrați), care au afinitate cu tumorile⁵.

Succesul terapiei cu fotosensibilizatori depinde în mare măsură de alegerea corectă a acestora. Un FS puternic și eficient ar trebui să aibă capacitatea de a iniția o reacție fotodinamică după iradiere cu lumini de 600-800 nm, și nu ar trebui să

provoacă nicio toxicitate în condiții de întuneric. În același timp, FS ar trebui să fie ușor de identificat de organism, să nu prezinte efecte secundare fototoxice sau acestea să fie minime¹.

TFD distruge celulele canceroase prin trei căi fundamental diferite, și anume, prin deteriorarea celulelor canceroase în timp, prin deteriorarea țesuturilor vasculare care furnizează oxigen celulelor și, în final, prin activarea sistemelor de răspuns imunitar al gazdei, inducând reacții inflamatorii în leziunea iluminată. Datorită fotochimiei lor, proprietăților și eficienței de absorbție, doar câțiva FS au aprobare oficială în întreaga lume pentru a fi utilizați clinic. Pentru tratamentul cancerului, fotosensibilizatorii aprobați sau aflați în studii clinice raportați de Correia⁵ sunt ilustrați în Tabelele I și II.

Tabel I. Fotosensibilizatorii utilizați în TFD clinică⁵

Denumire comercială (clasă)	Formulă moleculară	Lungime undă de excitație (nm)	Randament cuantic	Coefficient molar de extincție ($M^{-1} cm^{-1}$)	Aplicații principale
Fotofrin® (porfirină)	$C_{34}H_{38}N_4NaO_5^+$	630	0.01 în PBS	3.0×10^3 în PBS	Cancer esofagian, pulmonar și endobronșic
Ameluz® (porfirină)	$C_5H_9NO_3HCl$	630	-	-	Cheratoză actinică și carcinom cu celule bazale
AlaCare® (porfirină)	$C_5H_9NO_3$	630	-	-	Cheratoză actinică
Levulan® (porfirină)	$C_5H_9NO_3$	635	0.56	5.0×10^3	Cheratoză actinică
Hexvix® (porfirină)	$C_{11}H_{21}NO_3$	635	-	$<1.0 \times 10^3$	Cancer de vezică
Foscan® (clor)	$C_{44}H_{32}O_4N_4$	652	0.43 în metanol	3.0×10^4 în metanol	Cancer din sfera ORL
Laserfirin® (clor)	$C_{38}H_{37}N_5O_9$	664	0.77 în PBS	4.0×10^4 în PBS	Cancer esofagian și pulmonar și tumori cerebrale
Metvix® (porfirină)	$C_6H_{11}NO_3$	570-670	-	$<1.0 \times 10^3$	Carcinom cu celule bazale, boala Bowen și cheratoză actinică
Visudyne® (porfirină)	$C_{82}H_{84}N_8O_{16}$	690	0.7 în metanol	3.4×10^4 în metanol	Degenerescență maculară legată de vârstă
Redaporfină® (LUZ11) (bacterioclorină)	$C_{48}H_{38}F_8N_8O_8S_4$	749	0.43 în etanol	140×10^3 în etanol	Cancer de tract biliar

Tabel II. Fotosensibilizatori aflați în studii clinice, pentru utilizarea în TFD⁵

Denumire comercială	Formulă moleculară	Lungime undă de excitație (nm)	Randament cuantic	Coefficient molar de extincție ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Aplicații principale
Radaciorină® (clor)	$C_{34}H_{36}N_4O_6$ $C_{33}H_{34}N_4O_5$ $C_{33}H_{34}N_4O_6$	662	0.52-0.62	3.42×10^4	Cancer de piele
Fotoclor® (cloruri)	$C_{39}H_{48}N_4O_4$	664	0.48 în CH_2Cl_2	4.75×10^4 în 1% între 80 miceli	Cancer din sfera ORL
Purlytin® (purpurină)	$C_{37}H_{42}Cl_2N_4O_2Sn$	664	0.7 în acetonitril	2.8×10^4	Degenerescență maculară legată de vârstă
Fotolon® (clor)	$C_{34}H_{36}N_4O_6$	665	0.63 în dimetilformamidă	5.0×10^4 în dietileter	Sarcom nazofaringian
Lutrin® (texafirină)	$C_{52}H_{72}LuN_5O_{14}$	732	4.2×10^4 în metanol	0.11 în metanol	Boală arterială coronariană
TOOKAD® (WST09) (bacterioclorină)	$C_{37}H_{41}K_2N_5O_9PdS$	762	0.99 în solvent organic	8.85×10^4	Cancer de prostată

În ultimele decenii au fost efectuate mai multe studii pentru a caracteriza mai bine eficiența FS și selectivitatea. Unele dintre ele s-au concentrat pe dezvoltarea agenților cu lungimi de undă ce facilitează absorbția mai mari, permițând pătrunderea mai adâncă a luminii livrate de către sursele de lumină, la țesuturile tumorale³.

1.2.8. Potențiali fotosensibilizatori naturali cu aplicații în terapia oncologică

Produsele naturale au fost utilizate pentru tratamentul și prevenirea unor patologii cronice variate, inclusiv cancer. La ora actuală există un interes crescut pentru compușii derivați din plante, în special pentru compușii polifenolici, cunoscuți pentru proprietățile lor de promovare a sănătății, care au atras atenția ca agenți antitumorali promițători, fiind capabili să acționeze ca agenți multifuncționali⁴.

Recent au fost raportați pentru activitatea lor anticanceroasă un număr mai mare de compuși pe bază de plante, fiind importanți din punct de vedere farmaceutic pentru dezvoltarea medicamentelor puternice. La ora actuală există un interes crescut pentru studiul compușilor fotoactivi naturali, potențiali fotosensibilizatori de generația a treia, cu aplicare prospectivă în tratamentele cancerului¹.

Polifenolii, curcumina și resveratrolul posedă caracteristici fizico-chimice unice bine-cunoscute pentru spectrul lor larg de activități biologice, inclusiv pentru proprietățile anticancerigene^{4,44}.

Polifenolii pot fi clasificați în principal în flavonoide și nonflavonoide⁴⁵. Scheletul de bază al flavonoidelor (flavonoli, flavone, flavan-3-ol, antocianidine, flavanone și izoflavone) poate avea numeroși substituenți, iar solubilitatea în apă a flavonoidelor crește odată cu prezența zaharurilor și grupărilor hidroxil ca substituenți pe schelet⁴.

Nonflavonoidele includ diverse clase de **polifenoli**, cum ar fi *stilbenele* și *curcuminoidele*. Curcuminoidul *curcuma* și stilbenul *resveratrol*, reprezentanți ai grupului de polifenoli cu biodisponibilitate slabă, au fost studiați pe larg pentru proprietățile lor benefice împotriva cancerului⁴.

Polifenolii, în funcție de solubilitate și permeabilitatea membranei, pot fi în general clasificați în trei categorii:

- (1) solubilitate ridicată și permeabilitate slabă a membranei celulare,
- (2) solubilitate scăzută și permeabilitate slabă a membranei celulare și
- (3) solubilitate scăzută și permeabilitate ridicată a membranei celulare, curcumina și resveratrolul aparținând tipurilor 2 și 3⁴.

1.2.9. Curcumina

Curcumina este un compus terapeutic izolat din rizomul plantei *Curcuma longa* din familia Zingiberaceae. Curcuminoidul reprezintă compusul bioactiv cel mai amplu studiat. Începând cu anii 1980, potențialul fotobiologic al curcuminei a fost de mare interes, studiile descriind acest compus ca un fotosensibilizator foarte promițător, datorită faptului că este sigură din punct de vedere biologic chiar și la doze mai mari și poate fi produsă cu ușurință la scară largă^{46,47}.

Curcumina (diferuloilmetan) este una dintre componentele bioactive ale *Curcuma longa*, a cărei aplicabilitate pentru gestionarea a multiple boli este limitată din cauza solubilității scăzute în apă și plasmă, instabilității chimice în condiții alcaline, absorbției orale slabe și metabolismul rapid.

Din punct de vedere chimic, curcumina este un diaril-heptanoid, făcând parte din clasa curcuminoidelor (fenoli naturali colorați). Este un compus ce prezintă tautomerie ceto-enolică (Figura 9).

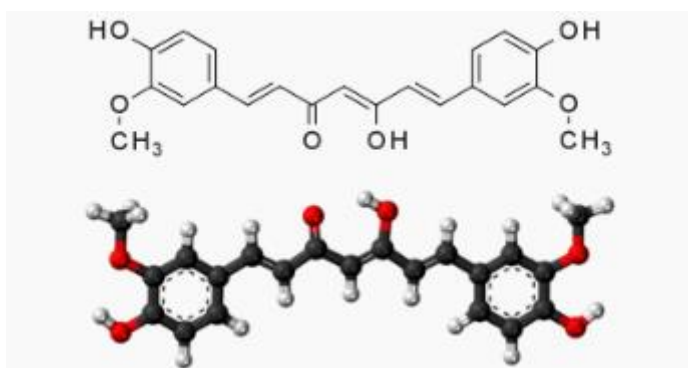


Fig. 9. Structura *Curcuminei*. Conține două nuclee aromatice de tip fenolic, acestea fiind legate prin intermediul a două grupe carbonilice α, β -nesaturate. Grupa dicetonică formează un enol stabil, care poate fi foarte ușor deprotonat cu formare de ion enolat. Grupele carbonilice sunt acceptori Michael și suferă reacții de adiție nucleofilă⁴⁸

Curcumina este insolubilă în apă rece, fiind susceptibilă la degradarea chimică în soluții apoase alcaline ($\text{pH} \geq 7,0$)⁴. *Curcumina* a fost caracterizată printr-un spectru de absorbție între 300-500 nm cu un coeficient de extincție ridicat, ceea ce sugerează că poate induce o reacție fototoxică puternică chiar și la concentrații mai mici. *Curcumina* este considerată un potențial agent anticancerigen^{49,50} care inhibă proliferarea celulelor canceroase în cancerele de sân, plămâni, colon, rinichi, ovar și ficat. Activitatea anticanceroasă in vitro și in vivo a *curcuminei*^{51,52} a fost dovedită prin inhibarea diferiților factori de transcripție precum: NF- κ B, AP-1, VEGF, NOS2, COX-2, 5-LOX, MMP-2, MMP-9 și IL-8, care sunt în principal responsabili pentru angiogeneză și creșterea tumorii. Administrarea de *curcumină* a redus semnificativ expresia complexului CDK4/ciclină D1 prin inhibarea expresiei p53, determinând procesul apoptotic prin inducerea generării SRO⁵³. Mai mult, activitatea antitumorală îmbunătățită a fost observată după iradierea UVB a *curcuminei*^{54,55} prin activarea caspazei pe celulele HaCaT (celule keratinocite umane). De asemenea, a fost eficientă împotriva celulelor canceroase de sân MCF-7 la 30 J/cm². *Curcumina* poate acționa ca un agent anticancer puternic prin prevenirea progresiei, migrației și invaziei cancerului⁵⁶. *Curcumina*, potrivit lui Dovigo și colaboratorilor săi are o capacitatea de absorbție a luminii ce se situează în intervalul de 300 și 500 nm, cu o absorbție maximă la 430 nm, produce efecte fototoxice puternice^{1,41}, fiind astfel un compus potrivit pentru utilizare ca FS.

Capacitatea de inducere a SRO și efectul anticancerigen al *curcuminei* susțin interesul sporit pentru studierea acesteia ca și potențial fotosensibilizator natural. Chan și Wu au observat natura fotoactivă a *curcuminei*, pe celulele carcinomului epidermic uman A431⁵⁷. Cantitatea mai mare de *curcumină* afectează, de asemenea, penetrarea luminii în vederea iradierii. Iradierea *curcuminei* sub o sursă de lumină UVB de 290-320 nm, cu o fluență de 100 mJ/cm² a indus apoptoza în keratinocitele HaCaT¹.

Curcumina este un agent natural care induce apoptoza într-o varietate de linii a diferitelor celule tumorale. *Curcumina* activează de asemenea, reacțiile redox în celule, inducând producția de SRO ce contribuie la reglarea receptorilor de apoptoză, de pe membrana celulelor tumorale. *Curcumina* poate regla, de asemenea, expresia și activitatea p53 care inhibă proliferarea celulelor tumorale și crește apoptoza. În plus, *curcumina* are un efect inhibitor puternic asupra activității NF- κ B și COX-2, care sunt implicate în supraexprimarea genelor antiapoptoză, cum ar fi Bcl-2. De asemenea, poate atenua reglarea semnalizării PI3K antiapoptoză și poate crește expresia MAPK-urilor pentru a induce producția endogenă a SRO⁵⁸.

Literatura de specialitate evidențiază efectele anticancerigene, antiinflamatorii și antioxidante ale *curcuminei*⁴² și *resveratrolului*, polifenoli naturali intens studiați în ultima perioadă, atât separat cât și în combinație, demonstrându-se efectul citotoxic al acestora, proprietate ce pot ajuta la proiectarea unor strategii terapeutice noi⁵⁹.

Flavonoidul *curcumina* provenit *Curcuma longa* are atât proprietăți de prevenire a apariției tumorilor, cât și proprietăți citotoxice împotriva cancerelor, inclusiv a celor care sunt Her-2/neu pozitive. Printre mecanismele prin care *curcumina* poate reduce supraviețuirea celulelor canceroase se numără modularea SRO, deși atât reducerea acestor specii cât și creșterea contribuie la efectele lor anti-cancer mediate. Cu toate acestea se știe că SRO trebuie să fie bine echilibrate pentru a menține celulele în viață, deoarece reducerea sau creșterea lor poate perturba homeostazia celulară⁵⁹.

Alți autori raportează și alte caracteristici ale *curcuminei*, care determină efecte antiinflamatorii, antitumorale, antioxidante, antibacteriene și chimioterapeutice, iar datorită capacității de a produce SRO *curcumina* poate fi folosită ca și agent antimicrobian, în TFDA³⁹.

1.2.10. Resveratrolul

Resveratrolul (trans-3,5,4'-trihidroxistilben) se găsește în mod natural în multe alimente, cum ar fi strugurii, vinul, nucile, fructele de pădure și multe altele⁶⁰. În plus, polifenolul *resveratrol* (3,4',5-trans-trihidroxistilben) - fitoalexină stilbenică (figura 10 și figura 11) cu solubilitate apoasă scăzută și stabilitate chimică slabă - este produsă de mai multe specii de plante, posedând o mare varietate de proprietăți biologice studiate pe larg atât *in vitro*, cât și *in vivo*⁴. Se găsește în concentrații mari în struguri și vin roșu, similar *curcuminei*, exercitând funcții benefice multiple, inclusiv cea anticancerigenă, mecanismele moleculare implicate fiind mai puțin clarificate⁵⁹.

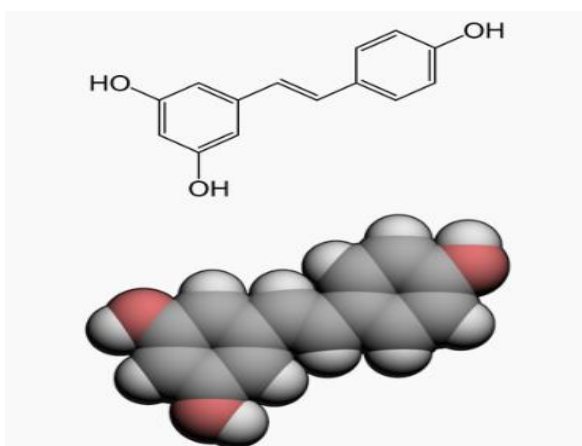


Fig. 10. Resveratrolul (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-stilbenul) este un compus organic ce face parte din categoria fitoalexinelor⁶¹

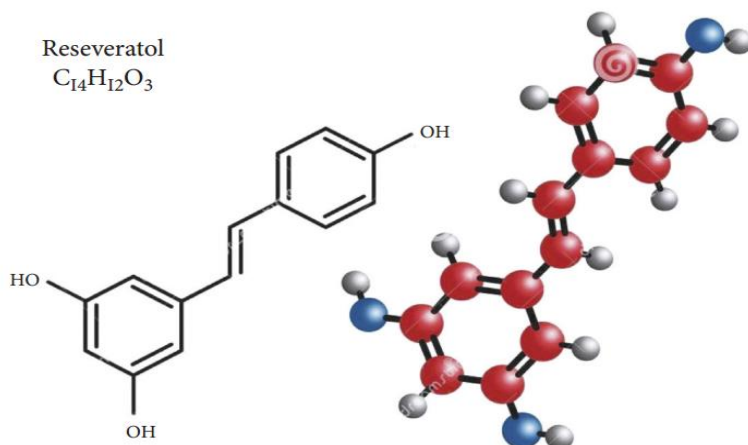


Fig. 11. Structura *resveratrolului* ^{60,62}. Scheletul molecular al resveratrolului este compus din două inele fenolice, unul cu o grupare para hidroxil, iar celălalt cu grupări hidroxil duble

Cele două inele benzenice sunt conectate printr-o legătură dublă care dă izomeri cu configurație *cis* și *trans* (Figura 12).

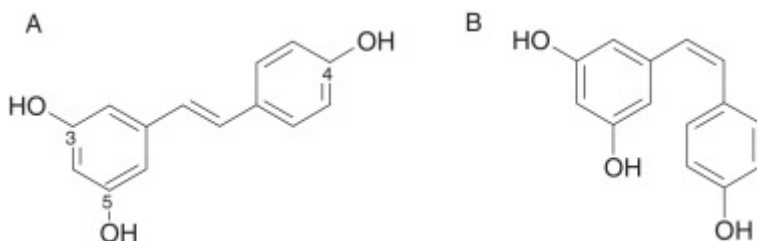


Fig. 12. Structura chimică a *trans*- (A) și *cis*-resveratrolului (B)

De obicei, cel mai folosit este izomerul *trans*, compusul cel mai abundent și activ din punct de vedere biologic.

Resveratrolul aparține unui grup de fitoalexine, având o greutate moleculară de 228,247 g/M și un punct de topire de 254°C, fiind identificat pentru prima dată în 1939⁶². Este stabil la un pH acid, în timp ce degradarea sa crește exponențial la un pH peste 6,8⁴.

Resveratrolul apare adesea ca o pulbere albă⁶⁰ cu solubilitate moderată în apă (0,03 mg/ml)^{60,62}. Se dizolvă bine atât în etanol, cât și în acetonă (50 mg/ml)⁶². S-a confirmat că *resveratrolul*, ca polifenol natural, are o gamă largă de efecte biologice, inclusiv antiinflamatorii, anti-oxidante, anti-virale, anti-fungice și anti-îmbătrânire^{60,63}.

Cu toate că *resveratrolul* are aceste efecte benefice, datorită proprietăților sale (solubilitatea slabă în apă, fotosensibilitatea ridicată și stabilitatea oxidativă scăzută), posibilitățile de aplicare ale acestuia sunt limitate⁶⁴.

Resveratrolul este utilizat în TFD pentru tratarea carcinomului de piele cu celule scuamoase⁶². Alte studii evidențiază rolul *resveratrolului* în inhibarea proliferării celulare, odată cu creșterea numărului de celulele apoptotice (cel puțin parțial prin calea de semnalizare Wnt⁶⁵. Alți autori au raportat că *resveratrolul* poate preveni apariția, dezvoltarea și progresia tumorii, activitatea antitumorală fiind evaluată în cazul mai multor tipuri de tumori, cum ar fi cancerul colorectal, de prostată, hepatic și de sân⁶⁴.

Principala problemă cu utilizarea clinică a acestor compuși naturali este biodisponibilitatea lor scăzută și, prin urmare, studiile în desfășurare sunt concentrate pe depășirea acestei probleme. S-a demonstrat că *resveratrolul* exercită un efect citotoxic împotriva cancerelor Her-2/neu și, în combinație cu curcumina, citotoxicitatea acestuia poate fi chiar potențată, fie *in vitro*, fie *in vivo*, într-un model transgenic Her-2/neu⁵⁹.

Conform datelor din literatură, *curcumina* și *resveratrolul* posedă proprietăți anticancerigene semnificative, datorită capacității lor de a acționa ca agenți multifuncționali⁴. Cu toate acestea, în cazul *resveratrolului*, mecanismele moleculare implicate sunt și mai puțin clarificate⁵⁹. Utilizarea acestor molecule naturale este puternic încurajată de capacitatea lor de a contracara disfuncția imunitară indusă de tumori, prin restabilirea răspunsului imun, necesar pentru eradicarea completă a tumorii⁵⁹.

Atât *resveratrolul*, cât și *curcumina* pot interfera cu autofagia, un proces degradative, care reglează diferențierea celulară, ajutând la combaterea deficitului de nutrienți și a stresului derivat din terapiile anticancer. De asemenea, s-a raportat că *resveratrolul* și *curcumina* perturbă homeostazia reticulului endoplasmatic, activând răspunsul proteic nepliat (RPN), proces strict interconectat cu autofagia⁵⁹. RPN are trei scopuri: restabilirea funcției normale a celulei prin oprirea translației proteinelor, degradarea proteinelor pliate greșit și activarea căilor de semnalizare care duc la creșterea producției de chaperone moleculare implicate în pliarea proteinelor. Dacă aceste obiective nu sunt atinse într-un anumit interval de timp, sau perturbarea reticulului endoplasmic este prelungită (endoplasmic reticulum stres, ERS), RPN vizează apoptoza⁶⁶. *Resveratrolul* are numeroase proprietăți și activități biologice, inclusiv antioxidantă, antiinflamatorie, antiobezitate, antidiabetică și antiischemică. Are de asemenea și efecte benefice potențiale asupra funcției cognitive și a sănătății ficatului, rinichilor și plămânilor. Datele și dovezile clinice sunt încă puține, ceea ce înseamnă că e imperativ necesar a se continua cercetările pentru înțelegerea efectelor *resveratrolului* asupra ERS la oameni⁶⁶.

1.2.11. Fructul de *Cornus mas*

Cornus mas (cornul) este o plantă fructiferă ce aparține familiei Cornaceae⁶⁷, cu fructe mai puțin utilizate sau chiar uitate, care alături de dud, căpșune sălbatice, primesc multă atenție în rândul consumatorilor datorită beneficiilor pentru sănătate⁶⁸.

Studiile fitochimice efectuate pe fructele de *Cornus mas* (coarne) indică prezența a numeroase ingrediente bioactive, valoroase, din grupul compușilor polifenolici, în principal antociani, flavonoide și acizi fenolici, triterpenoide și pectină⁶⁷. Rezultatele cercetării științifice indică faptul că extractele naturale, respectiv compușii fenolici, prezenți în fructele, frunzele și florile de *Cornus mas*, influențează creșterea celulelor neoplazice *in vitro*, prin inhibarea proliferării celulelor neoplazice (efectul citostatic) și prin reducerea supraviețuirii acestora, datorită inducerii apoptozei (efectul citotoxic), ceea ce determină proprietățile antitumorale și citotoxice ale *Cornus mas*^{69,70}.

Cornus mas este o sursă importantă de antociani, efectul antioxidant puternic fiind atribuit compușilor săi bioactivi, cum ar fi compușii fenolici, inclusiv acizii fenolici, flavonoidele, taninurile și antocianii⁷¹.

În ciuda activității protectoare a polifenolilor, aplicarea lor în medicină este limitată din cauza sistemelor lor de livrare ineficiente și a biodisponibilității slabe. Se crede că antocianii sunt absorbiți nemodificați la nivelul intestinului subțire, fiind biodisponibili datorită capacității de a traversa suprafața epitelială a tractului gastro-intestinal, trecând prin ficat și intrând în circulația sistemică. Studiile recente raportează că între 10%–25% și 30%–50% din antociani sunt degradați în stomac și respectiv în intestinul subțire. Polifenolii ar putea funcționa ca un agent chimiopreventiv al cancerului⁷¹.

Fructul de *Cornus mas* (corn) este bine cunoscut datorită activității antioxidante; cu toate acestea, toxicitatea sa împotriva cancerelor umane trebuie abordată. Câteva studii au confirmat activitatea antioxidantă ridicată a extractului din fructele de *Cornus mas*, datorită conținutului său ridicat de flavonoide. Citotoxicitatea selectivă a extractului de *Cornus mas* a fost studiată pe o serie de cancere la om, inclusiv celule de cancer ovarian (SKOV3), de sân (celule de adenocarcinom mamar, MCF-7), adenocarcinom de prostată (celule PC-3) și cancer pulmonar fără celule mici (A549)^{67, 68}.

Rezultatele studiilor au evidențiat potențialul anumitor genotipuri de *Cornus mas*, ca sursă valoroasă de antioxidanți naturali⁶⁸, fructele colorate ale *Cornus mas* fiind bogate în antioxidanți naturali, cum ar fi flavonoli, vitamina C, antociani, taninuri și fenoli. Dintre compușii fenolici totali, identificați în fructele de *Cornus mas* a fost raportat acidul galic la 100g fructe proaspete.

Dintre vitaminele identificate în *Cornus mas*, vitamina C are o importanță deosebită deoarece organismul uman nu o poate sintetiza. Este o vitamină vitală pentru întărirea sistemului imunitar și joacă un rol important, esențial, în protejarea

împotriva bolilor cardiovasculare. În comparație cu alte fructe bogate în vitamina C, fructele de *Cornus mas* conțin mai multă vitamina C decât fructele de kiwi, lămâi, portocale. Celelalte substanțe bioactive importante găsite în fructele de *Cornus mas* sunt compușii fenolici, coarnele fiind bogate în substanțe fenolice ce contribuie la valoarea antioxidantă a acestora⁶⁸.

De asemenea, alte studii au raportat că fructul *Cornus mas* s-a dovedit a avea mai multe efecte biologice benefice, precum antimicrobiene, antihistaminice și antitumorale⁷².

Studiile farmacologice moderne au arătat că *Cornus mas* posedă o serie de caracteristici biologice precum efect antidiabetic, hipolipemiant, antioxidant, antiinflamator, antibacterian, anticancer⁷³, anticoagulant, antiparazitar și efect protector asupra funcției hepatice și renale, a sistemului cardiovascular și a factorilor sanguini. Coarnele sunt surse bogate de antociani, compuși fenolici, flavonoide, acid ascorbic, acid tartric, acid malic, acid citric, acid galic, loganina și acid clorogenic, cantitatea acestor compuși fiind diferită în funcție de genotipul plantelor, condițiile meteorologice și geografice și maturitatea fructelor. Compușii antioxidanți găsiți în *Cornus mas* includ butilhidrogoanina, butil-hidroxil-toluen, butil-hidroxi-anizol și flavonoide. *Cornus mas* conține antocianine precum pelargonidin 3-o-rutinozid, cianura 3-o-galactoside, pelargonidin 3-o-glucoside, delphinidin 3-o- β -galactopyranoside, delphinidin 3-o-rutinosid și peonidin 3-o-glucoside. Aceste antocianine sunt compușii care previn bolile cardiovasculare, neurologice și canceroase. Antocianinele au capacitate de captare a radicalilor liberi și capacitate de a reduce riscul de boli cardiace și cancer. Extractul din fructe de *Cornus mas* este o sursă bogată de antioxidanți⁷⁴ inclusiv flavonoide, antociani și acid ascorbic. Aceste componente protejează proteinele, lipidele și ADN-ul împotriva radicalilor liberi. Antocianinele din coarne au efecte antiproliferative, inhibând creșterea tumorii de colon uman 116 (HCT-116), MCF1 (sân), a celulelor canceroase NCL-H460 (plămân), SF-268 (sistem nervos central), AGS (stomac). Extractul de *Cornus mas* are o activitate citotoxică împotriva liniilor celulare Hela și LS174. Yousefi a evaluat citotoxicitatea diferitelor doze de *Cornus mas* L (extract hidroalcoolic) față de celulele canceroase umane: A549 (cancer pulmonar fără celule mici), MCF-7 (sân, adenocarcinom), celule SKOV3 (cancer ovarian) și PC-3 (adenocarcinom de prostată)^{73,75}.

Unele studii, cum este cel al lui Szczepaniak, au demonstrat și un efect genoprotector al fructelor de *Cornus mas*⁷⁶. Genoprotecția este un aspect rar al proprietățile funcționale ale alimentelor, fiind vital, deoarece rezultatele unor astfel de studii pot ajuta la pregătirea suplimentelor alimentare noi și a medicamente pe bază de plante, care vor putea ajuta persoane sub chimioterapie. De obicei, testele de genoprotecție se bazează pe analizele monitorizării SRO sau observând fragmentarea ADN-ului în electroforeză. Studiul⁷⁶ a evidențiat că nu toate speciile de *Cornus mas* investigate au aceleași proprietăți genoprotectoare, acestea fiind influențate și de

conținutul individual al fenolilor, precum și de energia diferită de interacțiune dintre aceștia și nucleotidele modelate.

1.2.12. Avantajele și dezavantajele terapiei fotodinamice în cancer

Comparativ cu tratamentele tradiționale (chirurgie, radioterapie, chimioterapie), TFD prezintă o serie de **avantaje**^{7, 13,38,77,78} :

- prezintă selectivitate spațio-temporală, ce permite controlul iradierii în termeni de poziție și timp, o precizie de administrare crescută și evitarea efectelor adverse de tipul celor induse de chimioterapie;
- este minim invazivă (mai puțin invazivă decât chirurgia);
- este minim toxică la nivel sistemic, cu tulburări de funcționalitate minime;
- este bine tolerată de către pacienți, fără morbidități pe termen lung (în condiții de utilizare corectă);
- durata ședinței de tratament este scurtă și, cel mai adesea, poate fi administrată în ambulator;
- poate fi aplicată în mod repetat în același loc (spre deosebire de radioterapie);
- după vindecare, cicatricile sunt minime sau inexistente;
- dacă apar leziuni în urma tratării țesuturilor interne, ținută, acestea sunt ușoare;
- păstrează fertilitatea, nu afectează sarcina și nici nașterea;
- activarea are loc doar în momentul livrării luminii adecvate, caracteristică remarcabilă în comparație cu tratamentele convenționale;
- costurile sunt mai reduse comparativ cu alte terapii anti-tumorale.

Chiar dacă TFD este o strategie de tratament promițătoare și benefică pentru multiple boli, ea are și **dezavantaje**^{13,79}:

- este aplicabilă doar în regiunile ce pot fi iluminate (piele, imediat subcutanat, suprafața organelor accesibile sursei de lumină);
- nu poate fi utilizată în tratarea cancerelor voluminoase, profunde și / sau metastazate;
- necesitatea efectuării unor proceduri multiple;
- necesitatea monitorizării stricte și strânse a pacienților după terapie, datorită problemelor de fotosensibilitate care persistă câteva săptămâni după tratament;
- este contraindicată persoanelor care prezintă anumite patologii (porfirie, lupus eritematos sistemic, dermatoze fotosenzitive);

Din cauza acestor impedimente, se impune dezvoltarea unei noi generații de fotosensibilizatori, în vederea standardizării terapiei fotodinamice pentru practica clinică. De asemenea, este de mare actualitate și mult studiată în prezent posibilitatea combinării TFD cu alte tipuri de terapie: imunoterapie, chimioterapie, terapie

fototermală (Figura 13). În acest fel, avantajele fiecărui tip de tratament ar putea fi exploatate, în timp ce dezavantajele acestora ar putea fi compensate. De exemplu, tratamentul prin TFD în combinație cu imunoterapia ar putea crește răspunsul imun antitumoral¹³.

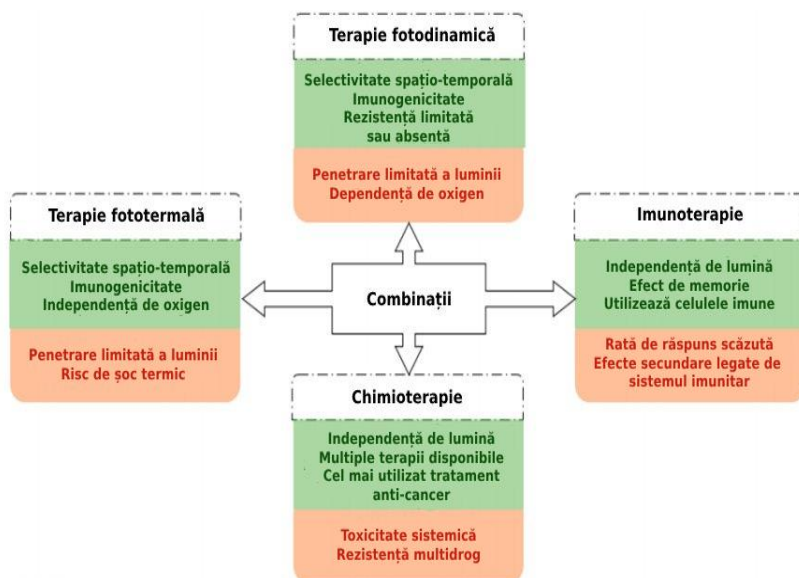


Fig. 13. Combinații posibile între TFD și alte strategii terapeutice¹³. Sunt prezentate avantajele (cu verde) și dezavantajele (cu roșu) fiecărui tip de terapie

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru

Terapia fotodinamică (TFD) este un tratament oncolitic în care administrarea unui agent fotosensibilizant determină o secvență de procese fotochimice și fotobiologice care duc la deteriorarea selectivă a țesutului țintă^{80,81}. Este un tratament promițător în tumorile maligne, datorită avantajelor sale în ceea ce privește efectele secundare, mai mici față de alte terapii, și lipsa de rezistență la tratament^{13,82}. De asemenea, specificitatea non-invazivitatea și vindecarea cu cicatrici minime, sau chiar absente, sunt alte beneficii care merită menționate^{13,38,82}.

Totuși, lipsa studiilor de faza a treia nu poate face din TFD un competitor independent al chirurgiei, chimioterapiei sau radioterapiei. Din acest motiv, s-au făcut numeroase încercări de îmbunătățire a terapiei, prin găsirea de noi fotosensibilizatori, combinarea acestora, descoperirea de noi modalități de a spori acumularea lor în țesut, modificarea administrării prin TFD metronomic, blocada citoprotectoare, combinarea TFD cu alte terapii sau adăugarea de noi medicamente / substanțe ca adjuvanți ai terapiei³⁴.

Pentru optimizarea TFD este importantă combinarea acestora cu compuși ce exercită un efect cumulativ citotoxic asupra celulelor tumorale. Anumiți compuși naturali, în combinație cu TFD, cresc eficiența terapiei antitumorale și, în același timp, protejează țesuturile sănătoase din jur.

1.1. Obiective

1.1.1 Generale

- Optimizarea TFD ca tratament al cancerului, prin combinarea FS cu compuși ce au efect cumulativ toxic asupra celulelor tumorale;
- Îmbunătățirea terapiei prin găsirea de noi FS, combinarea acestora, descoperirea de noi modalități de a spori acumularea lor în țesutul țintă, în vederea creșterii efectului antitumoral.

1.1.2 Specifice

Evaluarea efectelor TFD în combinație cu diferiți compuși naturali extrași din plante (*Cornus mas*, *Curcuma longa* și *Resveratrol*) asupra tumorilor experimentale Walker, ca metode alternative de optimizare a TFD în tumorile maligne.

2. Metodologia generală a cercetării

Activitățile de cercetare experimentală s-au efectuat în Laboratorul de culturi celulare al Disciplinei de Fiziologie, din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca; Laboratorul experimental pentru Studiul Stresului Oxidativ de la Disciplina de Fiziologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca; Disciplina de Biologie, Facultatea de Biologie, Universitatea "Babeș Bolyai" Cluj-Napoca.

Reactivi

O-phthalaldehida, glutathionul redus și reactivul Bradford au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich Chemicals GmbH (Munchen, Germania) iar EDTANa2 și acidul 2-thiobarbituric de la Merck KGaA (Darmstadt, Germania). Etanolul absolut, peroxidul de hidrogen și n-butanolul au fost obținuți de la Chimopar (București, România). Kitul TUNEL folosit pentru cuantificarea apoptozei a provenit de la Millipore Corporation (Billerica, USA) anticorpul polyclonal de capră IgG pentru COX-2, NOS2, anticorpul secundar anti-capră și gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) de la Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). TSPF a fost primit ca donație, de la Dna. Profesor Rodica-Mariana Ion de la ICECHIM, București, România.

Loturile de studiu

Cercetarea experimentală cuprinde studii pe șobolani masculi, rasa Wistar alb, cu greutatea de 280-300 grame, proveniți din Biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Animalele au fost adăpostite timp de zece zile în Centrul pentru Animale al Departamentului de Fiziologie pentru aclimatizare înainte de tratament. Hrana a fost furnizată de două ori pe zi (peletă standard) și apa a fost furnizată ad libitum. Înainte de începerea oricărui experiment animal, Comisia de Etică pentru bunăstarea animalelor din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca a aprobat protocolul de studiu prin decizia nr. 143/30.03.2017, în conformitate cu legislația română aplicată de Uniunea Europeană (UE) Directiva 2010/63 / UE și cu Autoritatea Națională Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor.

Fiecare șobolan a fost inoculat subcutanat (s.c.), în coapsa dreaptă, cu fragmente de carcinosarcom Walker 256, prin intermediul unui trocar și sub anestezie cu ketamină și xylazină. Tratamentul a început când volumul tumorii a atins 1 cm³.

Animalele au fost grupate în următoarele loturi:

- Lotul I (control) – grup netratat, martor, cu tumora Walker;
- Lotul II – administrare de: extract natural de Cornus mas 15 mg/kg sau Curcumin 50mg/kg sau Resveratrol 10mg/kg;
- Lotul III – administrare extract natural de Cornus mas 15 mg/kg sau Curcumin 50mg/kg sau Resveratrol 10mg/kg plus TFD cu durata de 15 minute;
- Lotul IV – administrare TSPP (10 mg/kg corp, doză unică, gavaj oral);
- Lotul V - administrare TSPP și iradiere timp de 15 minute;
- Lotul VI - extract natural de Cornus mas 15 mg/kg sau Curcumin 50mg/kg sau Resveratrol 10mg/kg, administrate 1 săptămână înainte de TFD;
- Lotul VII - extract natural de Cornus mas 15 mg/kg sau Curcumin 50mg/kg sau Resveratrol 10mg/kg, administrate 1 săptămână după TFD.

Administrarea tratamentelor

Iradieră s-a efectuat sub anestezie, la 24 de ore după administrarea extractului natural sau a 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrinei (TSPP) și a fost administrată prin intermediul unui laser terapeutic D-58, utilizând următorii parametri de iradiere: $\lambda = 685$ nm, putere medie: 25 W/cm², doză: 50 J/cm², frecvență: 10 Hz, diametrul spotului: 10 mm, durată: 15 min.

Antioxidanții s-au administrat zilnic prin gavaj orofaringian în doză specifică în mg/kg corp.

Anestezia generală s-a realizat cu ajutorul unei combinații de 10% ketamină și 2% xilazină. Probele de sânge și fragmentele de țesut tumoral au fost recoltate la 24 de ore, după ultimul tratament pentru analiză histopatologică, imunohistochimică (IHC) și biochimică. La terminarea experimentului, animalele au fost eutanasiate tot în anestezie generală cu ketamină și xylazină.

Izolarea probelor de tumoră și obținerea omogenatelor

Pentru efectuarea analizelor biochimice, tumorile recoltate au fost izolate de țesutul conjunctiv adiacent și omogenizate pe gheață, cu un omogenizator Polytron (Brinkman Kinematica, Elveția) timp de 3 minute, în PBS (pH 7,4), raport 1: 4 masă / volum. Pentru obținerea fracției citosolice, suspensia ulterioară a fost centrifugată timp de 5 minute la 3000 rot / min și 4 °C. Măsurarea proteinelor în omogenizate a urmat protocolul Bradford.

Pentru examinare histopatologică, o parte din tumorile recoltate au fost fixate în 10% formalină tamponată neutră și păstrate timp de 18-24 ore la 4 °C. Țesutul fixat a fost ulterior deshidratat în concentrații crescătoare de etanol (70%, 95%, 100%),

spălat cu xilen și încorporat în parafină. S-au realizat secțiuni seriate de 5 μm și s-au prelucrat probele pentru: (1) colorații convenționale cu hematoxină-eozină; (2) colorații imunohistochimice pentru COX2, NOS2 și (3) pentru testul TUNEL.

Metode de evaluare a stresului oxidativ și nitrozativ

Pentru a cuantifica dezechilibrul redox indus de TFD și impactul compușilor naturali asupra eficienței TFD, au fost evaluate nivelul malondialdehidei (MDA) și raportul între glutationul redus/glutationul oxidat (GSH / GSSG).

Nivelul malondialdehidei (MDA) a fost determinat folosind metoda fluorimetrică Conti⁸³, cu acid 2-tiobarbituric. Pentru dozare, probele de plasmă sau omogenatul tisular (50 μl) au fost fierte timp de o oră, pe baie de aburi, împreună cu o soluție de acid tiobarbituric 10 mmoli în K₂HPO₄ 75 mmoli, pH 3 (1 ml). Amestecul s-a răcit brusc, iar produsul de reacție a fost extras în n-butanol și apoi centrifugat până la separarea supernatantului de faza organică. Concentrația a fost determinată din faza organică. Intensitatea emisiei a fost cuantificată la o lungime de undă (λ) de 534 nm, cu ajutorul unui spectrofotometru Perkin Elmer, în sistemul de fluorescență sincronă, la o diferență de lungime de undă ($\Delta\lambda$) de 14 nm, între excitație și emisie. Concentrația de MDA a fost apreciată prin utilizarea unei curbe de etalonare, obținută cu concentrații cunoscute de MDA și care au fost prelucrate în același mod. Rezultatele obținute au fost exprimate în nmoli/ml pentru probele de ser și în nmoli/mg de proteină, pentru probele tisulare.

Glutationul redus (GSH) și oxidat (GSSG) au fost determinate prin metoda Hu Miao Lin⁸⁴. În urma reacției cu o-ftalaldehida, glutationul redus are proprietatea de fluorescență și astfel concentrația sa poate fi măsurată prin metoda fluorimetrică în ser, sau în omogenatul tisular. Pentru determinare s-a centrifugat un volum de supernatant amestecat cu acid tricloracetic, de concentrație 10%, la 10 minute după crearea amestecului. S-au adăugat 1,7 ml de tampon fosfat pH 8 și 1 ml o-ftalaldehidă peste supernatantul separat, iar după 15 minute a fost măsurată intensitatea emisiei, la o lungime de undă de 420 nm și o excitație de 350 nm. Pentru determinarea concentrației GSH, s-a utilizat o curbă de calibrare obținută cu concentrații de glutation redus prelucrate în același mod. Determinarea concentrației glutationului oxidat s-a realizat în urma reacției acestuia cu o-ftalaldehida, utilizând metoda fluorimetrică. Înregistrarea fluorescenței s-a efectuat la intensitatea emisiei de 420 nm și a excitației de 350 nm.

Valorile obținute din probele de ser sunt exprimate în nmol/ml, iar cele din probele tisulare în nmoli/mg proteină.

Tehnici de histopatologie și imunohistochimie

Secțiuni provenite de la 5 probe de țesut au fost incubate peste noapte la 4 °C cu anticorpi policlonali primari de capră anti-NOS2 și anticorpi IgG anti-COX2 (Santa Cruz, CA, SUA) în concentrații de 1: 200 și respectiv 1: 300. Secțiunile au fost apoi tratate cu

un kit LSAB® peroxidază (K0679) - kit HRP (Dako Agilent, CA, SUA), iar produșii de reacție au fost detectați printr-o reacție cu DAB. Reactivitatea IHC a fost evaluată având la bază un sistem ce cuantifică amplitudinea și intensitatea reacției pozitive, astfel: 0, reacție negativă; 0,5-1 +, reacție pozitivă scăzută; 2+, reacție pozitivă moderată; 3+, reacție pozitivă intensă; 4+, reacție pozitivă foarte intensă. Pentru a verifica specificitatea testelor de imunohistochimie, țesuturile în care anticorpii primari au fost omiși din incubarea inițială au fost folosite ca martor negativ. Toate probele au fost examinate orb de doi morfopatologi care nu au avut informații despre condițiile de tratament, utilizând microscopul Optika B-383LD2, cu aparat foto prevăzut cu senzor CCD. Pentru a calcula indicele apoptotic, s-a calculat procentul de celule TUNEL pozitive împărțit la numărul total de celule din fiecare secțiune. Pentru detectarea necrozei, s-a efectuat colorația convențională cu hematoxină-eozină. Pentru dimensionarea câmpului microscopic s-a utilizat scara Weibel, fiecare câmp având o suprafață de 7,56 mm². S-a calculat procentul de celule necrotice din numărul total de celule pe 3 câmpuri microscopice alese aleatoriu și s-a determinat procentul de celule necrotice/mm² la mărirea x200.

Tehnica Western Blot

Pentru analiza Western Blot, probele de tumoră recoltate au fost congelate rapid, apoi omogenizate în tampon de liză conținând Igepal-nonidet 1% și complex inhibitor de proteaze în PBS 1%, timp de 1 h, pe gheață, după metoda descrisă anterior de Popescu și colaboratorii⁸⁵. Probele (20 μg proteina/godeu) au fost expuse la SDS-PAGE în condiții reductive, conform metodei descrise anterior⁸⁴. Benzile au fost blocate cu lapte degresat 5% în PBS, cu 0,1 % Tween 20, timp de 1 h după care s-au incubat cu anticorpi (1:1000) anti-COX-2, anti-NOS2 și GAPDH urmat de anticorp secundar cuplat cu peroxidază (1:1500). Ca și control endogen s-a folosit GAPDH. Vizualizarea și detecția proteinelor s-au realizat cu un substrat chemiluminescent Supersignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) și un sistem de prelucrare a imaginilor GelDoc Imaging System, echipat cu o cameră XRS. După măsurarea intensității benzilor prin densitometrie (Quantity One analysis software, Biorad), rezultatele s-au normalizat la GAPDH.

Analiza statistică

Pentru variabilele cantitative s-a utilizat analiza statistică descriptivă, sub forma de medii ± deviații standard. Indexul necrotic și cel apoptotic sunt prezentate în procente ± deviația standard. Pentru calcularea diferenței statistice între loturi s-a utilizat testul one-way ANOVA și posttestul pentru comparații multiple Turkey's (dimensiunea loturilor fiind aceiași). Testele Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk s-au folosit pentru a testa normalitatea datelor cu ajutorul software-ului statistic SPSS 17.0.

Valorile obținute au fost prelucrate statistic folosind programul GraphPad Prism versiunea 5.03 pentru Windows (San Diego, CA, SUA). Nivelul de semnificație prag p fost considerat $p < 0.05$ (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ comparativ cu lotul tratat cu TSPP și iradiere (TSPP + IR)).

3. Studiu 1. Efectele modulatorie *in vivo* ale extractului natural de *Cornus mas* asupra terapiei fotodinamice în tumori experimentale la șobolani *Wistar*

3.1. Introducere

Ca modalitate terapeutică neinvazivă, terapia fotodinamică (TFD) s-a dezvoltat în ultimele decenii lărgindu-și spectrul aplicațiilor clinice. De mare interes este utilizarea sa în tratamentul tumorilor maligne, datorită capacității de a induce moarte celulară, stres oxidativ, modificări vasculare și reacții inflamatorii la nivelul țesutului țintă.

Eficiența terapiei fotodinamice în tumorile solide este însă limitată din cauza unor dezavantaje specifice TFD: profunzime limitată a penetrației luminii în țesuturi, dependența de oxigen și gradul redus de selectivitate tumorală. Ca urmare, există un mare interes pentru identificarea unor modalități de optimizare a terapiei fotodinamice, fie prin combinarea acestora cu alte modalități terapeutice, fie prin utilizarea de compuși cu efecte citotoxice suplimentare asupra celulelor tumorale.

Studii pe scară largă au arătat că anumiți compuși naturali, în combinație cu TFD, au crescut eficiența terapiei antitumorale, protejând în același timp țesuturile sănătoase (galatul de epigallocatechină, curcumină, etc). Identificarea de noi fotosensibilizatori, care să exercite un efect de potențare a terapiei fotodinamice, reprezintă o direcție de cercetare importantă la nivel global, ca strategie terapeutică în diferite patologii, inclusiv în cancer.

Fructele cornului european (*Cornus mas*) conțin cantități mari de polifenoli, flavonoizi și antocianine cu proprietăți biologice antioxidante, antiinflamatoare și citotoxice dovedite, ca urmare fiind un candidat bun pentru combinarea cu TFD în vederea potențării acțiunii acestora.

O combinație între TFD și extractul din fructele de *Cornus mas* pare a fi o opțiune terapeutică interesantă și promițătoare. Dincolo însă de identificarea unui posibil efect aditiv sau sinergic și a mecanismelor implicate, este important a se studia și identifica cea mai bună modalitate de asociere din punct de vedere al dozelor și secvențialității.

Studiul de față reprezintă o cercetare minuțioasă și detaliată a efectelor asocierii TFD cu extractul natural de *Cornus mas* în tumorile solide, atât în ce privește mecanismele de acțiune implicate cât și importanța factorului timp, respectiv identificarea momentului optim de administrare a FS în raport cu TFD.

Este o abordare complexă care, dincolo de aportul științific adus de explorarea și identificarea mecanismelor și a moleculelor implicate, aduce o contribuție la optimizarea dozei și a regimului de administrare a acestui extract natural în tratamentul tumorilor maligne. Tema abordată reprezintă astfel un pas înainte pentru identificarea beneficiului real și a modalității optime de administrare și asociere a acestei terapii combinate, informații ce pot fi exploatare în designul trialurilor clinice ce abordează aplicațiile biomedicale ale acestei terapii. Cercetarea noastră aduce o contribuție științifică și cu posibile aplicații clinice într-o boală atât de gravă și frecventă cum este cancerul, înscriindu-se în arsenalul de măsuri destinate ameliorării raportului terapeutic: maximum de distrucție tumorală cu minim de toxicitate la nivelul țesuturilor sănătoase.

3.2. Obiective

Evaluarea efectelor TFD combinată cu extract din fructe de *Cornus mas* și a secvențialității acestei asocieri asupra tumorilor *Walker* experimentale, prin cuantificarea markerilor de stres oxidativ, a inflamației și a apoptozei în țesutul tumoral.

3.3. Material și metode

Prepararea și caracterizarea extractului de Cornus mas

Fructele de *Cornus mas* (corn) au fost procurate de la o piață locală din Cluj-Napoca, fiind autentificate de Prof. Dr. Mircea Tamas de la Departamentul de Botanică al Facultății de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca, România.

Fructele proaspete au fost spălate bine, cu apă curentă și apoi cu apă distilată. După îndepărtarea sâmburilor, fructele au fost tocate cu un tocător tip mixer. 75g de fructe tocate au fost amestecate apoi cu 200 ml acetonă timp de 1h, la temperatura camerei. Mixture obținută s-a trecut prin hârtie de filtru Whatman nr. 1. Extractul obținut s-a concentrat la 40°C cu ajutorul unui evaporator rotativ până la îndepărtarea completă a acetonei, obținându-se un volum de 42 ml de extract concentrat.

Conținutul total de polifenoli, din extract s-a determinat cu ajutorul metodei spectrofotometrice Folin-Ciocalteu (FC) descrisă de Singleton și colaboratorii⁸⁶ cu mici modificări. Ca standard s-a utilizat acidul galic, iar rezultatele s-au exprimat ca mg echivalenți acid galic (GAE)/l. Absorbanța s-a măsurat cu ajutorul unui spectrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Cuantificarea antocianilor prezenți în extract s-a realizat prin metoda pH-ului diferențial⁸⁷. Concentrația în antociani s-a exprimat ca mg cyanidin-3-gucozid/l de extract. Activitatea antioxidantă a extractului s-a determinat prin metoda ATBS descrisă de Arnao et al.⁸⁸ Rezultatele au fost exprimate pe baza unei curbe de calibrare, în μ moli echivalenți Trolox/l de extract, folosind ca și standard Trolox.

Designul studiului

Studiul s-a desfășurat pe 35 șobolani Wistar albi grupați în 7 loturi:

- Lotul I (control) – grup netratat, martor, cu tumora Walker, fără tratament;
- Lotul II – administrare extract de Cornus mas 15 mg/kg corp, timp de 7 zile;
- Lotul III – administrare extract de Cornus mas 15 mg/kg corp, timp de 7 zile, urmat de iradiere (TFD);
- Lotul IV – administrare TSPP (10 mg/kg corp), doză unică;
- Lotul V - administrare TSPP și iradiere (TFD);
- Lotul VI - extract de Cornus mas 15 mg/kg corp, timp de 7 zile, urmat de TSPP și iradiere (TFD);
- Lotul VII – TSPP și iradiere (TFD) urmate de administrare de extract de Cornus mas 15 mg/kg corp, timp de 7 zile.

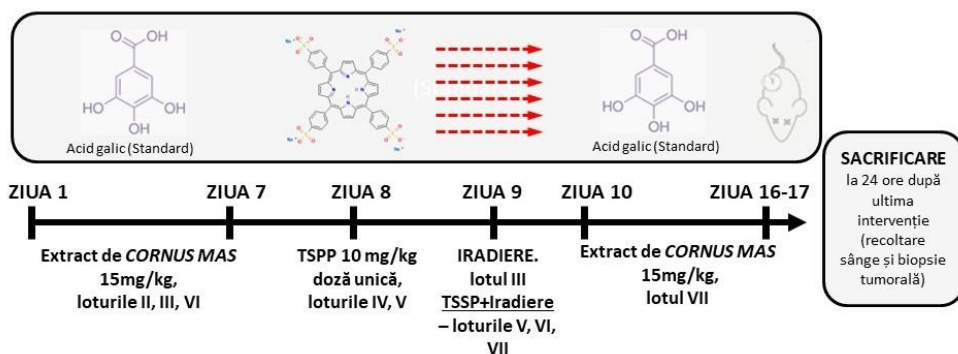


Fig. 1. Designul studiului pentru loturile care au fost tratate cu extract de *Cornus mas*, TSPP și TFD

Determinarea stresului oxidativ, a inflamației și factorilor de transcripție

Pentru realizarea determinărilor biochimice, țesutul tumoral recoltat a fost prelucrat cu ajutorul unui omogenizator Polytron (Brinkman Kinematica, Elveția. Concentrația de proteine din probe s-a determinat prin metoda Bradford [27].

Pentru cunatificarea stresului oxidativ, s-au determinat nivelul malondialdehidei (MDA), al glutationului redus (GSH) și oxidat (GSSG), în ser și în omogenatele tumorale.

MDA s-a determinat prin metoda fluorimetrică cu acid 2-tiobarbituric descrisă de Conti⁸³, fiind exprimată în nmoli/mg proteină. Nivelele de GSH și GSSG au fost determinate tot prin fluorimetrie folosind o-ftalaldehidă, rezultatele exprimându-se sub forma de raport GSH/GSSG⁸⁹.

Expresiile COX-2 și NOS2 s-au evaluat atât prin imunohistochimie (IHC) cât și prin tehnica Western Blot (WB).

Histologie și imunohistochimie

Secțiunile tumorale în parafină au fost colorate cu hematoxină-eozină (HE) și imunohistochimic pentru detecția COX2 și NOS2. S-a efectuat de asemenea testul TUNEL pentru evidențierea apoptozei, utilizând kitul In Situ Cell Death Detection Light (Roche, Mannheim, Germania). Indicele apoptotic s-a calculat prin împărțirea procentului de celule TUNEL pozitive la numărul total de celule de pe fiecare secțiune examinată.

Pentru cuantificarea necrozei s-a folosit în colorația cu hematoxină-eozină o scară Weibel, fiecare câmp având suprafața de 7,30 mm². Pe baza procentului de celule necrotice, din numărul total de celule numărate pe 3 câmpuri microscopice alese la întâmplare, s-a calculat procentul de celule necrotice pe mm², la o mărire de 200x.

Pentru evidențierea NOS2 și COX2 prin imunohistochimie, secțiuni în parafină de 5 μm au fost incubate peste noapte la 4°C, cu anticorpi policlonali anti-NOS2 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) și anticorpi anti-COX2 (1:300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), fiind apoi prelucrate cu un kit LSAB-HRP (Dako North America, Inc. CA, SUA, K0679). Producții rezultați s-au detectat prin reacția DAB. Intensitatea colorației imunohistochimice s-a cuantificat printr-un sistem care consideră scor 0 - reacție negativă, scor 0,5-1+ reacție slabă, 2+ reacție moderată, 3+ reacție intensă și 4+ reacție foarte intensă. Pentru verificarea specificității colorației s-au folosit probe de control, în care s-au omis anticorpii primari în prima fază de incubare. Examinările microscopice au fost făcute de către doi anatomopatologi care nu au cunoscut condițiile de tratament, cu ajutorul unui microscop Optika B-383LD2 echipat cu o camera CCD.

Analiza statistică

Semnificația statistică a diferențelor dintre loturi s-a analizat prin one-way ANOVA, urmată de Testul de comparativ Multiplu Tukey cu ajutorul softului de analiza GraphPad 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). O valoare a p mai mică de 0.05 a fost considerată semnificativă statistic.

3.4. Rezultate

Caracterizarea extractului

Pentru caracterizarea extractului de *Cornus mas* obținut, s-au determinat conținutul total de polifenoli (TPC), conținutul total de antociani (TAC) precum și activitatea antioxidantă (AA). Conținutul total de TPC, determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, a fost de 8290.6 ± 265.2 mg GAE/l. Conținutul total de TAC, determinat prin metode pH-ului diferențial, a fost de 660.8 ± 23.4 mg Cy-3-Glu/l. Valorile mari ale TPC și TAC au indicat faptul că extractul analizat este o sursă bună de compuși fenolici și antociani, compuși responsabili pentru activitatea antioxidantă. Aceasta, determinată prin testul ABTS, a fost de 2415.4 ± 91.8 μ mol Trolox/l.

Markerii de stres oxidativ și apărare antioxidantă

Evaluarea statusului oxidativ/antioxidativ s-a realizat prin determinarea nivelelor MDA, GSH și GSSG în țesutul tumoral și respectiv în ser.

MDA. Nivelurile MDA cuantifica acțiunea speciilor oxidative de oxigen asupra lipidelor membranare. Valorile obținute în omogenate tumorale și în ser sunt prezentate în Tabelul I.

Tabel I. Valorile MDA tumoral și seric în loturile studiate

Grup	tMDA [nmoli/mg proteină]	sMDA [nmoli/ml]
	Media $\pm$ Deviația Standard	Media $\pm$ Deviația Standard
Control	0.18 ± 0.07	0.18 ± 0.07
CM	0.30 ± 0.10	2.39 ± 0.94
CM+IR	0.38 ± 0.07	2.20 ± 0.47
TSPP	0.71 ± 0.11	2.36 ± 0.51
TSPP+IR	0.70 ± 0.19	3.49 ± 0.92
CM+TSPP+IR	0.21 ± 0.02	2.03 ± 0.27
TSPP+IR+CM	0.47 ± 0.06	1.68 ± 0.31

Legenda: MDA = malondialdehida; tMDA = MDA în celule tumorale; sMDA = MDA în ser; CM = extract de *Cornus mas*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

În omogenatele tumorale, peroxidarea lipidică a fost crescută la lotul tratat cu TSPP și iradiat, comparativ cu lotul de control și cu loturile tratate cu extract de *Cornus mas* (CM) sau cu extract și iradiere (0.70 ± 0.19 nmoli/mg proteina, $p < 0.001$, vs 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteină (control); 0.30 ± 0.10 nmoli/mg proteină vs 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteină și 0.38 ± 0.07 nmoli/mg proteină față de 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteină) (Fig. 2). Asocierea CM cu TFD a dus la scăderea nivelului de MDA comparativ cu TFD singură. (Fig. 2a). Astfel, în lotul tratat cu CM administrat înaintea TFD s-a evidențiat nivelul cel mai scăzut de stres oxidativ cuantificat prin MDA (0.30 ± 0.10

nmoli/mg proteină, $p < 0.001$, comparativ cu lotul de control 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteină). Administrarea CM după efectuarea TFD a menținut nivelul scăzut de MDA în tumoră (0.47 ± 0.06 nmoli/mg proteină; $p < 0.05$), semnificativ mai mare comparativ cu lotul tratat cu CM+TSPP+IR (0.21 ± 0.025 nmoli/mg proteină $p < 0.01$). CM singur și CM + IR nu au dus la generarea de peroxizi lipidici în țesutul tumoral (0.30 ± 0.10 nmoli/mg proteină și 0.38 ± 0.07 nmoli/mg proteină, $p > 0.05$).

În ser, nivelul MDA a crescut semnificativ după TFD cu TSPP (3.49 ± 0.92 nmoli/ml; $p < 0.05$ comparativ cu lotul de control 2.39 ± 0.94 nmoli/ml) și a scăzut semnificativ în ambele loturi tratate cu regimurile combinate; cel mai scăzut nivel al MDA s-a obținut pentru lotul tratat cu CM după TFD. (1.68 ± 0.31 nmoli/ml; $p < 0.01$, comparativ cu lotul de control 2.39 ± 0.94 nmoli/m) (Fig. 2b).

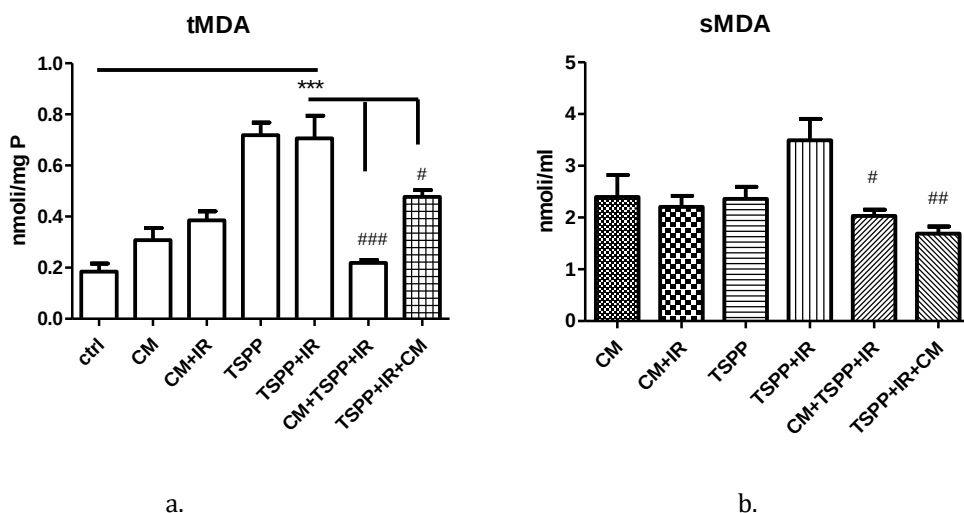


Fig 2. Nivelurile MDA în omogenatele tumorale și ser, în grupurile tratate cu extract CM și TFD cu TSPP. TFD cu TSPP a crescut nivelul MDA în țesutul tumoral (a) și în ser (b). Regimul care a asociat CM după TFD a redus nivelurile de MDA în tumoră și ser. Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SD. Analiza statistică a fost efectuată printr-o ANOVA unidirecțională, cu comparațiile multiple ale lui Tukey posttest (* $p < 0,05$ în comparație cu grupul de control și # $p < 0,05$ în comparație cu grupul TFD)

GSH și **GSSG** sunt parametri biochimici utilizați pentru evaluarea capacității antioxidante. În cazul generării excesive a radicalilor liberi, GSSG crește și raportul GSH/GSSG se reduce. Valorile măsurate pentru acești parametri sunt prezentate în tabelele II și III.

Tabel II. Valorile GSH tumoral și seric în loturile studiate

Grup	tGSH [nmoli/mg proteină]	sGSH [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	12.01 ± 2.11	5.51 ± 1.56
CM	13.43 ± 2.08	4.79 ± 0.90
CM+IR	15.84 ± 1.13	5.52 ± 1.58
TSPP	17.80 ± 2.29	3.90 ± 0.35
TSPP+IR	14.14 ± 3.07	6.12 ± 0.36
CM+TSPP+IR	18.32 ± 0.64	5.09 ± 2.26
TSPP+IR+CM	18.98 ± 1.04	5.49 ± 1.72

Legenda: tGSH = Glutation redus în țesutul tumoral; sGSH = Glutation redus în ser; CM = extract de *Cornus mas*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Table III. Valorile GSSG tumoral și seric în loturile studiate

Grup	tGSSG [nmoli/mg proteină]	sGSSG [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	1.21 ± 0.08	0.82 ± 0.09
CM	1.43 ± 0.05	0.76 ± 0.07
CM+IR	1.43 ± 0.09	0.96 ± 0.09
TSPP	1.47 ± 0.12	0.63 ± 0.09
TSPP+IR	1.43 ± 0.05	0.75 ± 0.08
CM+TSPP+IR	1.30 ± 0.06	0.80 ± 0.06
TSPP+IR+CM	1.32 ± 0.08	1.05 ± 0.20

Legenda: tGSSG = Glutation oxidat în țesutul tumoral; sGSSG = Glutation oxidat în ser; CM = extract de *Cornus mas*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Nivelul GSH a crescut la loturile tratate cu ambele regimuri combinate (CM înainte și respectiv după TFD), comparativ cu lotul tratat doar cu TFD (18.32 ± 0.64 nmoli/mg proteină și 18.98 ± 1.04 nmoli/mg proteină; $p < 0.05$, comparativ cu 15.84 ± 1.13 nmoli/mg proteină; $p < 0.01$) (Fig. 3a și b). Nivelul GSH la animalele tratate doar cu TFD sau CM sau CM+IR, nu a prezentat diferențe semnificative între loturi (13.43 ± 2.08 nmoli/mg proteină și 15.84 ± 1.13 nmoli/mg proteină; $p > 0.05$).

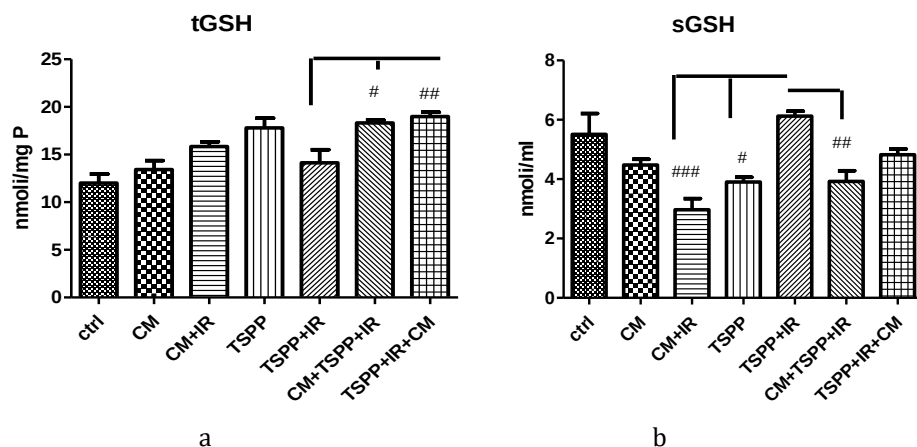


Fig. 3. Nivelurile GSH în omogenatele tumorale și ser, în grupurile tratate cu extract CM și TFD cu TSPP. TFD cu TSPP scăzut GSH (a) în omogenatele tumorale. În plus, TFD a îmbunătățit nivelurile de GSH în ser (b). Regimul care a asociat CM după TFD a crescut nivelurile de GSH în tumori (2) ($p < 0,01$). Analiza statistică a fost efectuată printr-o ANOVA unidirecțională, cu comparațiile multiple ale lui Tukey posttest (* $p < 0,05$ în comparație cu grupul de control și $p < 0,05$ în comparație cu grupul TFD)

Valorile GSSG în omogenatele tumorale au crescut semnificativ după CM, CM + IR, TSPP și TFD cu TSPP (1.438 ± 0.05 nmoli/mg proteină, 1.432 ± 0.09 nmoli/mg proteină, 1.473 ± 0.12 nmoli/mg proteină, respectiv 1.438 ± 0.0515 nmoli/mg proteină) comparativ cu grupul de control (1.21 ± 0.08 nmoli/mg proteină) ($p < 0.01$), (Fig. 4a). În ser, valorile GSSG au crescut după tratamentul cu TSPP + IR + CM (1.05 ± 0.20 nmoli/ml) comparativ cu lotul tratat cu TFD (0.96 ± 0.09 nmoli/ml) ($p < 0.01$), (Fig. 4b).

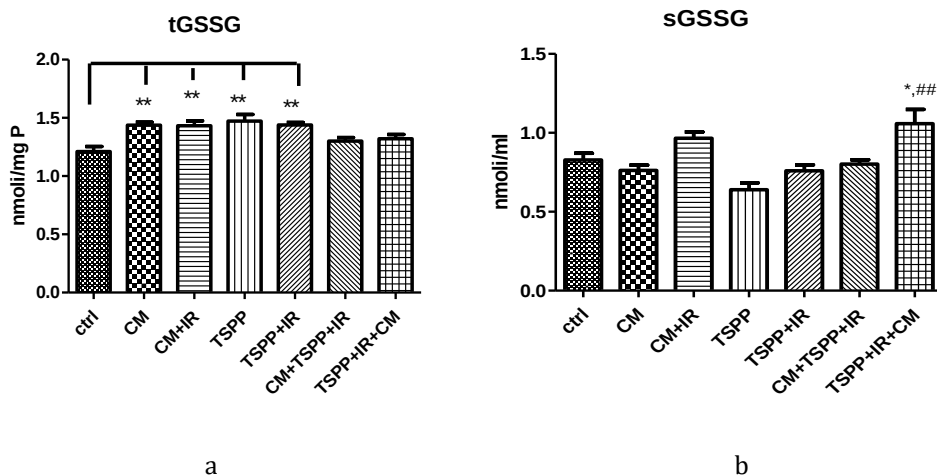


Fig. 4. Nivelurile GSSG în omogenatele tumorale și ser în grupurile tratate cu extract CM și TFD cu TSPP. În plus, TFD a îmbunătățit nivelurile tGSSG (a). Administrarea CM înainte de TFD a diminuat nivelurile de tGSH ($p < 0,05$). Regimul care a asociat CM după TFD a crescut nivelurile GSSG în ser (b). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ SD. Analiza statistică a fost efectuată printr-o ANOVA unidirecțională, cu comparațiile multiple ale lui Tukey posttest (* $p < 0,05$ în comparație cu grupul de control și # $p < 0,05$ în comparație cu grupul TFD)

Evaluarea inflamației și a leziunilor ADN în țesutul tumoral

Expresiile COX-2, NOS2 și γ H2AX (tabelul IV) au fost evaluate în țesutul tumoral, după administrarea ambelor regimuri terapeutice, prin analiza Western blot (Fig 5a). Pentru NOS2 și COX2, pe țesuturile înglobate în parafină, s-au efectuat colorații cu hematoxilina - eozina și colorații imunohistochemice. De asemenea, apoptoza apărută ca urmare a tratamentelor s-a apreciat prin testul TUNEL pe secțiuni parafinate.

Tabel IV. Expresiile COX-2, NOS2 și γ H2AX în țesutul tumoral

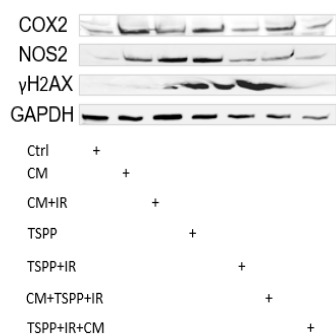
Grup	Expresie COX2 [%]	Expresie NOS2 [%]	Expresie γ H2AX [%]
	Media $\pm$ Dev. Standard	Media $\pm$ Dev. Standard	Media $\pm$ Dev. Standard
Control	0.87 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.05
CM	2.64 $\pm$ 0.13	3.14 $\pm$ 0.35	2.06 $\pm$ 0.02
CM+IR	1.54 $\pm$ 0.05	1.79 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.08
TSPP	1.58 $\pm$ 0.06	2.52 $\pm$ 0.07	2.95 $\pm$ 0.10
TSPP+IR	1.12 $\pm$ 0.07	1.19 $\pm$ 0.03	2.06 $\pm$ 0.05
CM+TSPP+IR	1.43 $\pm$ 0.06	2.14 $\pm$ 0.09	5.93 $\pm$ 0.08
TSPP+IR+CM	1.11 $\pm$ 0.06	2.30 $\pm$ 0.10	1.61 $\pm$ 0.06

Legenda: COX2 = ciclo-oxigenaza 2; NOS2 (nitric-oxid sintaza 2); γ H2AX = H2A din familia histonelor X; CM = *Cornus Mas*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

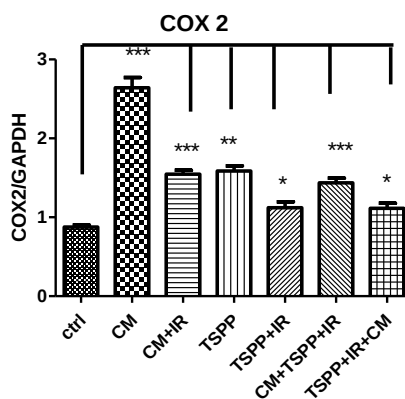
Expresia **COX-2** în omogenatele tumorale a crescut semnificativ la loturile tratate cu CM (2.64 ± 0.13 %; $p < 0.001$ comparativ cu 0.87 ± 0.02 %), CM + IR (1.54 ± 0.05 %; $p < 0.001$ comparativ cu 0.87 ± 0.02 %) și CM + TSPP + IR (la 1.43 ± 0.06 %; $p < 0.001$ vs. 0.87 ± 0.02 %) comparativ cu controlul (Fig. 5b). În grupurile TSPP + IR și TSPP + IR + CM expresia COX-2 a crescut de asemenea în raport cu controlul, dar mai puțin intens (1.20 ± 0.07 % și 1.11 ± 0.06 %; $p < 0.05$ față de 0.87 ± 0.02 %). Valorile COX-2 au scăzut semnificativ la toate loturile tratate cu tratament combinat față de lotul ce a primit CM (1.43 ± 0.06 % față de 2.64 ± 0.13 %, $p < 0.001$ și 1.11 ± 0.06 %; $p < 0.05$).

Expresia **NOS2** a crescut semnificativ ($p < 0.01$) la loturile tratate cu CM, CM + IR și TSPP, la 3.14 ± 0.35 % vs. 0.85 ± 0.05 %, la 1.79 ± 0.05 % vs. 0.85 ± 0.05 % și la 2.52 ± 0.07 % vs. 0.85 ± 0.05 %, $p < 0.01$) (Fig. 5c). Ambele regimuri de tratament care au asociat CM cu TFD au dus la nivele crescute ale expresiei NOS2 în țesutul tumoral, în comparație cu controlul (2.14 ± 0.09 % față de 0.85 ± 0.05 % și 2.3 ± 0.10 %; $p < 0.001$), fără însă a avea diferențe semnificative între ele ($p > 0.05$).

Expresia **γ H2AX** (indicator a leziunilor ADN) a crescut în toate grupurile care au primit tratament comparativ cu controlul (la 2.06 ± 0.02 % față de 0.47 ± 0.05 %, la 0.74 ± 0.87 % față de 0.47 ± 0.05 %, la 2.95 ± 0.1 %, față de 0.47 ± 0.05 % și la 2.06 ± 0.05 % față de 0.47 ± 0.05 %, $p < 0.001$), cele mai mari valori obținându-se la lotul tratat cu CM înaintea TFD (5.93 ± 0.08 %; $p < 0.001$) (Fig. 5d). La lotul ce a primit CM după TSPP + IR leziunile ADN au scăzut semnificativ față de lotul ce a primit tratamentul cu CM înaintea TFD (la 1.61 ± 0.06 % față de 5.93 ± 0.08 %; $p < 0.001$).



a



b

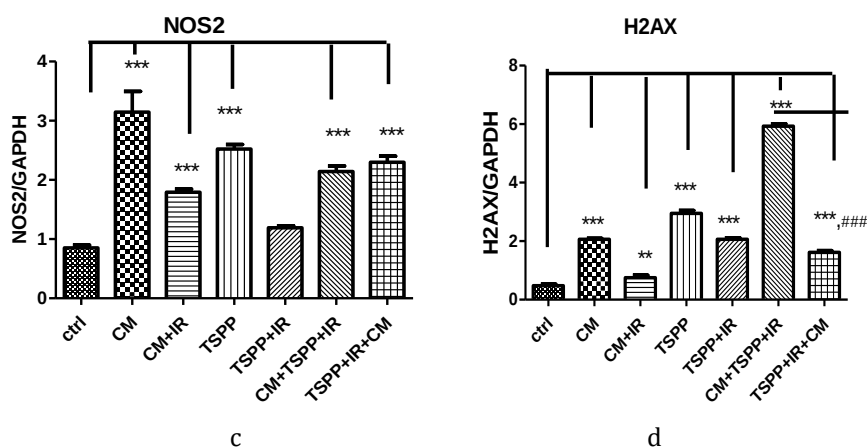


Fig. 5. Expresiile COX-2, NOS2 și γ H2AX în omogenatele tumorale din grupurile tratate cu extract CM și TFD cu TSPP. Expresiile COX-2, NOS2 și γ -H2AX în omogenatele tumorale au fost detectate prin western blot folosind anti-COX-2, anti-NOS2, anti- γ -Anticorpul H2AX la diluții 1:1000 și anticorpi anti-GAPDH. Imagini reprezentative ale Western blot pentru COX-2, NOS2, γ -H2AX și GAPDH sunt prezentate în panoul a. Panourile b, c și d arată rezultatele analizei statistice pentru raportul dintre proteinele COX-2, NOS2 și γ -H2AX și expresia GAPDH în țesutul tumoral. Pentru analiza statistică a fost utilizat ANOVA unidirecțional cu comparații multiple ale lui Tukey posttest (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparativ cu grupul de control și ### $p < 0,001$ comparativ cu grupul TFD).

Evaluarea imunohistochimică a inflamației, apoptozei și necrozei

Valorile indexurilor apoptotic și necrotic în loturile studiate sunt prezentate în Tabelul V.

Tabel V. Index apoptotic și necrotic în loturile studiate

Grup Cornus Mas	Index apoptotic [%]	Index necrotic [%]
	Media $\pm$ Deviația Standard	Media $\pm$ Deviația Standard
Control	3.62 $\pm$ 0.32	28.03 $\pm$ 1.55
CM	4.14 $\pm$ 0.12	39.17 $\pm$ 0.72
CM+IR	5.18 $\pm$ 0.04	44.93 $\pm$ 0.70
TSPP	5.08 $\pm$ 0.07	50.00 $\pm$ 3.00
TSPP+IR	8.03 $\pm$ 0.15	64.27 $\pm$ 1.70
CM+TSPP+IR	18.54 $\pm$ 0.57	80.07 $\pm$ 1.20
TSPP+IR+CM	7.60 $\pm$ 0.26	48.13 $\pm$ 4.15

Legenda: CM = *Cornus Mas*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Cele mai importante modificări histologice ce indică **apoptoza** au fost observate la lotul ce a primit CM + TSPP + IR, observându-se frecvenți nuclei hipercromi, karioliza-kariorrhexis, picnoze frecvente, vacuolizări nucleare (Fig. 6) și apoptoză intensă (Fig. 7) (***). În acest grup, imunoreactivitatea COX-2 (Fig. 8) și NOS2 (Fig. 9) în celulele tumorale nu s-a corelat pozitiv cu modificările histologice. Astfel, COX-2 nu s-a modificat semnificativ, în vreme ce expresia NOS2 a crescut (***) comparativ cu controlul (Fig. 9). Indicele necrotic calculat pentru 3 câmpuri microscopice alese aleator (200x) a avut o valoare importantă în grupul cu tratament combinat CM + TFD (80.07 ± 1.20 %) comparativ cu grupul de control (28.03 ± 1.55 %, $p < 0.001$) și cu grupul tratat cu TSPP și IR (64.27 ± 1.75 %; $p < 0.001$). Celule TUNEL moderat pozitive au fost evidențiate la loturile TSPP + IR + CM și respectiv TSPP + IR (Fig. 7). În celelalte grupuri experimentale, reacția TUNEL pozitivă nu a fost semnificativ modificată față de control. Carioliza intensă și vacuolizările nucleare frecvente, cu infiltrat inflamator moderat, s-au evidențiat la grupul TSPP+IR (Fig.6), unde a existat și o expresie redusă a moleculelor COX-2 (*) (Fig. 8) și NOS2 (Fig. 9). Pe de altă parte, reactivitatea COX-2 și NOS2 în grupul CM+IR au fost moderat crescute (Fig. 8 și Fig. 9) (**).

Aspectul histologic al tumorilor din grupul CM + IR a fost reprezentat de nuclei hipercromi și câteva picnoze (Fig. 6). Procentul celulelor necrotice /mm² (la magnificație de 200x) a crescut semnificativ la lotul CM+IR față de control ($44,93 \pm 0,70$ % $p < 0.001$, față de $28.03 \pm 1,55$ %). În grupul TSPP + IR + CM, evaluarea histologică a relevat frecvenți nuclei picnotici, rare vacuolizări nucleare și absența infiltratului inflamator. În timp ce COX-2 a avut o expresie scăzută (*) (Fig. 8), expresia NOS2 (Fig.9) a fost semnificativ mărită (***) comparativ cu controlul. În grupul TSPP, modificările histologice (Fig. 6) sunt reprezentate prin karioliza și picnoza frecvente, infiltrat inflamator important, imunoreactivitate mare pentru COX-2 (***) (Fig. 8) și NOS2 (***) (Fig. 9). În grupul CM s-a observat o expresie crescută a COX-2 (***) (Fig. 8) și NOS2 (***) (Fig. 9), asociate cu infiltrat inflamator tumoral (Fig. 6). De asemenea, în grupul CM s-au observat celule active cu nuclei giganți și câteva necroze focale.

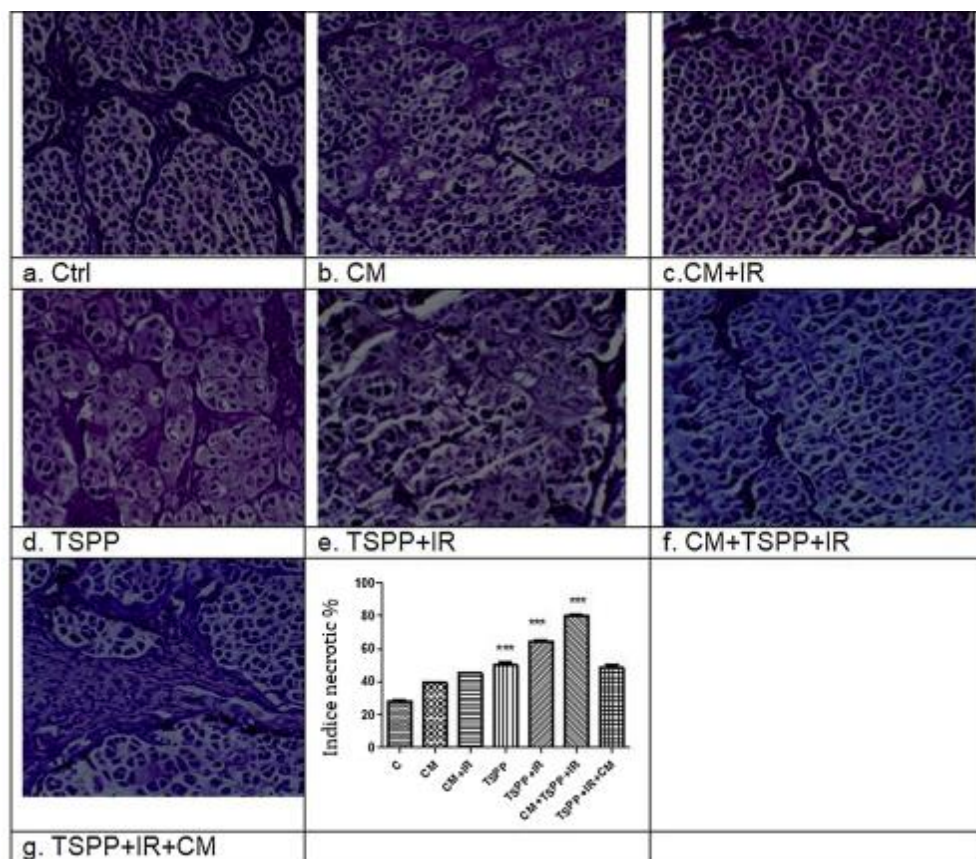


Fig. 6. Indicele necrotic în tumorile colorate cu hematoxină și eozină, 200 ×. Fotomicrografii reprezentative (colorare HE) ale secțiunilor tumorale de la animale tratate cu b - CM, c - CM + IR, d - TSPP, e - TSPP + IR, f - CM + TSPP + IR și g - TSPP + IR + CM și a - Control. Mărire 200 x, scala 20 μm

Grupul CM + TSPP + IR a prezentat frecvent nuclei hiperchromi, carioli-zariorrhexis, frecvent picnoză, vacuolizări nucleare și apoptoză intensă. În grupul TSPP + IR s-au observat carioli-ză intensă și vacuolizare nucleară frecventă cu infiltrat inflamator moderat. Efectul terapeutic a fost determinat prin evaluarea procentului de celule necrotice, din numărul total de celule, pe 3 câmpuri microscopice alese aleatoriu, sub mărire de 200x. Cel mai mare indice necrotic a fost observat la lotul tratat cu CM + TSPP + IR.

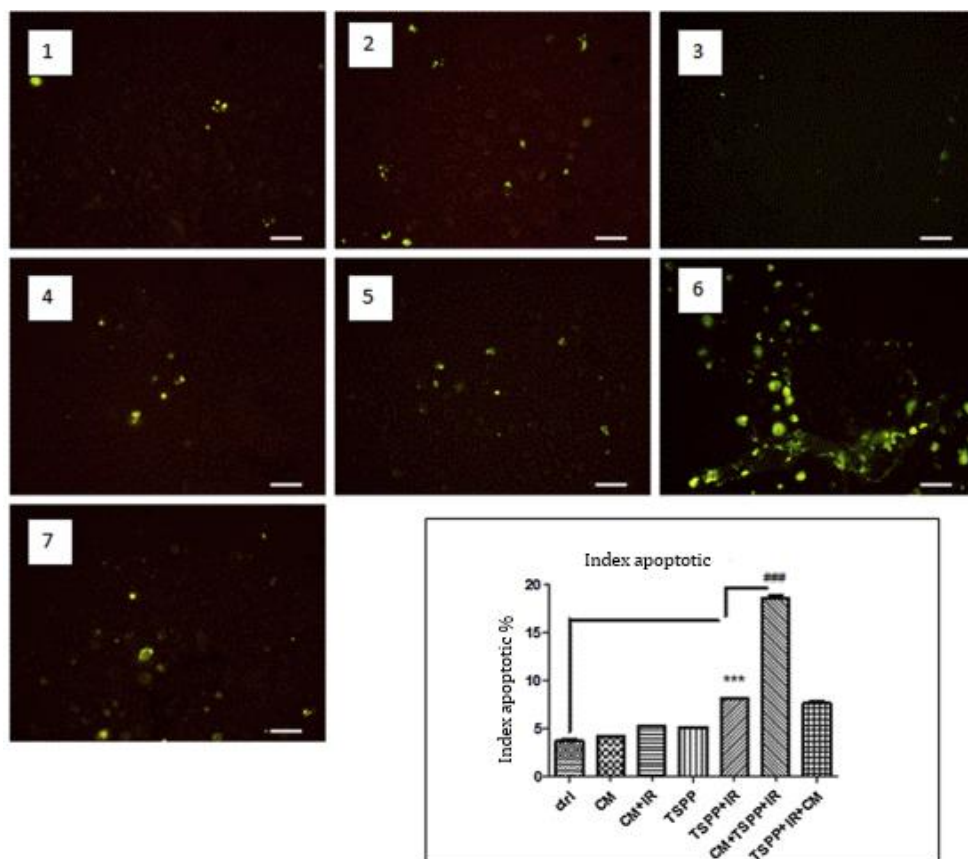


Fig. 7. Testul TUNEL în grupurile de control și experimentale, x200. Se observă nuclei apoptotici (verde aprins) la microscopia cu fluorescență (1 – ctrl, 2 – CM, 3 – CM + IR, 4 – TSPP, 5 – TSPP + IR, 6 – CM + TSPP + IR, 7 – TSPP + IR, 7 – TSPP + IR + CM). Mărire 200 x, scala 20 μ m

Cuantificarea celulelor TUNEL- pozitive din tumoră a arătat că CM + TSPP + TFD a crescut semnificativ procentul de celule TUNEL- pozitive în comparație cu controlul ($p < 0,001$). Celule moderat pozitive TUNEL au fost identificate în grupul TSPP + IR + CM, precum și în TSPP + IR. Rezultatele sunt exprimate ca medie $\pm$ SD. Analiza statistică a fost efectuată printr-o ANOVA unidirecțională cu posttestul de comparații multiple al lui Tukey ($***p < 0,001$ în comparație cu grupul de control și $###p < 0,001$ în comparație cu grupul TFD).

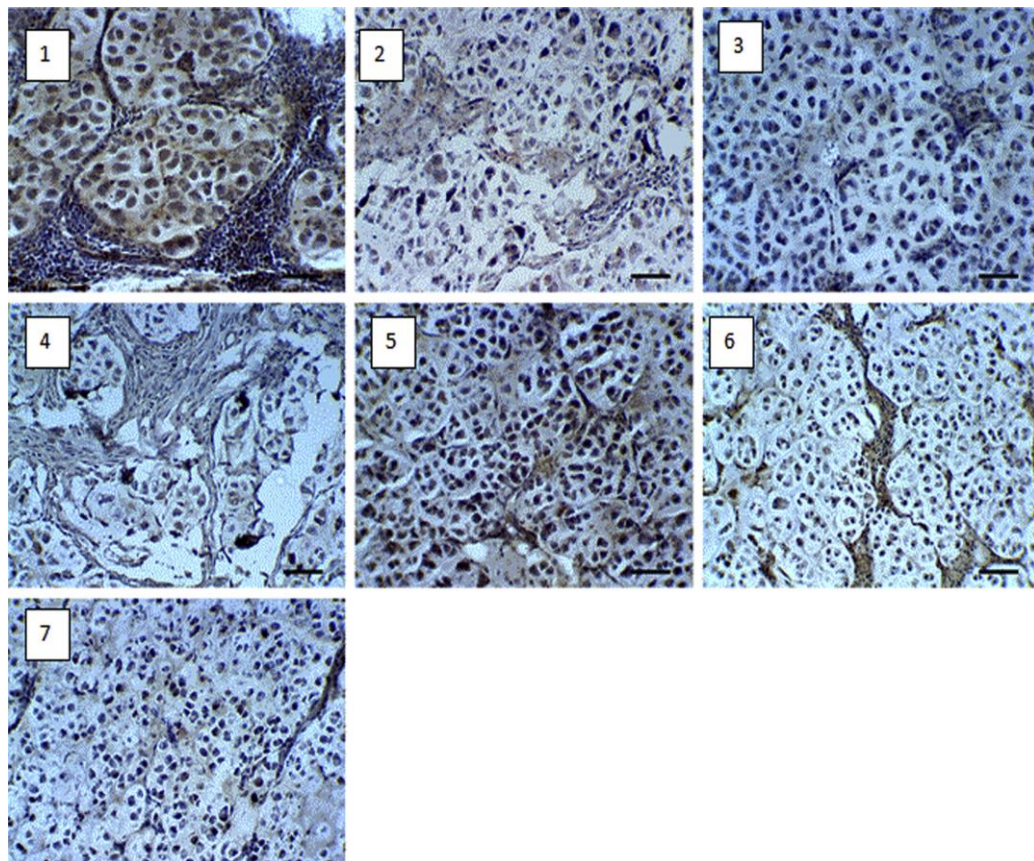


Fig. 8. Testul de imunoreacție COX-2 în grupurile de control și experimentale, x200. Fotomicrografia colorației imunohistochimice COX-2 în secțiunea tumorii din fiecare grup experimental a fost prezentată (1 – ctrl, 2 – CM, 3 – CM + IR, 4 – TSPP, 5 – TSPP + IR, 6 – CM + TSPP + IR, 7 – TSPP + IR + CM). Mărire 200 x, scala 20 μ m

În grupul TSPP + IR s-a identificat o expresie scăzută a COX-2 (*) (grupul 5), în timp ce în grupul CM+IR (3), reactivitatea COX-2 a fost moderat crescută (**). În grupul M + TSPP + IR (6), imunoreactivitatea COX-2 nu a fost modificată semnificativ în comparație cu grupul de control, în timp ce la TSPP + IR + CM (grupul 7) imunoreactivitatea a fost mai mică. Administrarea CM a indus imunoreactivitate ridicată pentru COX-2 (***) asociată cu infiltratul inflamator tumoral.

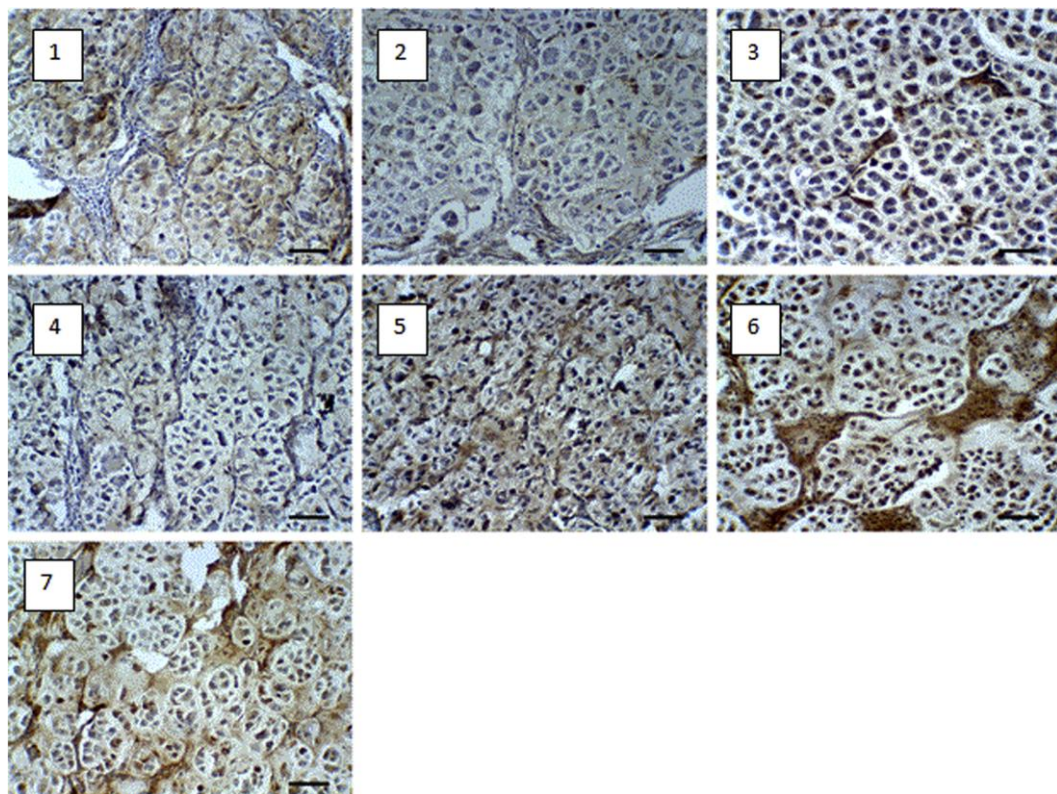


Fig. 9. Testul de imunoreacție NOS2 în grupurile de control și experimentale, x200. Fotomicrografia colorației imunohistochemice NOS2 în secțiunea tumorală din fiecare grup experimental a fost prezentată (1 – ctrl, 2 – CM, 3 – CM + IR, 4 – TSPP, 5 – TSPP + IR, 6 – CM + TSPP + IR, 7 – TSPP + IR + CM). Mărire 200 x, scala 20 μ m

În lotul TSPP + IR (5), se observă exprimarea scăzută a NOS2 (*), în timp ce, în grupul CM + IR (3), reactivitatea NOS2 a fost moderat crescută (**). În grupurile CM + TSPP + IR (6) și TSPP + IR + CM (7), expresia NOS2 a fost semnificativ îmbunătățită (***) în comparație cu martorul.

3.5. Discuții

Pentru a spori eficiența terapiei fotodinamice (TFD) în cancer au fost încercate diferite strategii terapeutice, care combină TFD cu diverși compuși antitumorali, rezultate remarcabile obținându-se la asocierea curcuminei, silimarinei sau epigallocatechingalat-ului^{90,91,92}.

Extractul obținut din fructele de *Cornus Mas* (CM) are proprietăți nutraceutice remarcabile: anti-inflamatoare, anti-oxidante, anti-bacteriene, etc. Efectele benefice se

datorează conținutului de polifenoli și antociani, prezenți în cantitate mare în fructele de corn și care au efect antioxidant⁷³, antiinflamator⁹³, anti-bacterian⁹⁴ și citotoxic^{73,75} demonstrat.

Pornind de la aceste date, care sugerează că o combinație între extractul de CM și TFD poate fi o opțiune terapeutică de interes, am evaluat efectele TFD cu 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin (TSPP) în combinație cu extract de CM, asupra tumorilor experimentale *Walker*. Efectele administrării TFD singură, a extractului de CM singur, precum și a combinației între extract și TFD (administrat înainte și după iradiere) au fost comparate, evaluarea făcându-se prin cuantificarea markerilor de stres oxidativ, inflamație și apoptoză, în țesutul tumoral.

În experimentul nostru, stresul oxidativ și capacitatea antioxidantă au fost cuantificate prin nivelul malonaldehidei (MDA) și a nivelurilor de glutatation redus (GSH) și oxidat (GSSG), atât în țesutul tumoral cât și în ser. Nivelul MDA în tumoră, indicator al peroxidării lipidelor și stresului oxidativ, a fost mai redus în cazul regimului combinat CM și TFD, mai ales în cazul administrării extractului de corn înainte de TFD. În ser, nivelul MDA a fost de asemenea scăzut în ambele grupuri cu terapie combinată, dar nivelul cel mai redus s-a obținut la administrarea extractului natural de corn, după TFD. Rezultate asemănătoare tot în tumori *Walker* au fost obținute de alți autori utilizând silimarina ca și compus natural⁹⁵.

Capacitatea antioxidantă a fost evaluată prin nivelurile de GSH și GSSG și raportul între acestea. GSH a crescut în grupurile cu tratament combinat, indiferent de secvențialitatea administrării, în timp ce GSSG a crescut semnificativ în situația administrării extractului înaintea TFD. Aceste rezultate sunt în acord cu date din literatură, care au arătat ca antocianinele din fructul de corn produc efecte antioxidante și antibacteriene⁹⁴.

Evaluarea inflamației induse de TFD, a modulării acesteia prin asocierea extractului natural de corn și a influenței cronologiei acestei administrări, au fost făcute prin determinarea expresiei COX-2 și NOS2 în omogenatele tumorale prin tehnica *Western blot* și prin colorații cu hematoxilina-eozina și imunohistochimice cu anticorpi specifici.

Nivelul cel mai înalt de expresie a COX-2 a fost întâlnit în grupul tratat doar cu extract de CM, asocierea TFD în regimurile combinate ducând la scăderea acesteia. Expresia NOS2 a crescut semnificativ față de control în grupurile cu tratament combinate, dar fără a exista diferențe în funcție de momentul administrării extractului de corn (înainte, respectiv după TFD). Analiza histologică a evidențiat că administrarea extractului de CM a indus o puternică imunoreactivitate pentru NOS2 și COX-2 în carcinosarcomul *Walker*, în special când extractul a fost administrat înaintea TFD. COX este o enzimă-cheie implicată în conversia acidului arachidonic în lipide bioactive, inclusiv tromboxani și prostaglandine^{96,97}. COX-1 este exprimată în majoritatea țesuturilor și este implicată în funcțiile homeostatice, în timp ce COX-2 este o genă de răspuns precoce implicată în inflamație și mitogeneză. Este cunoscut faptul că TFD este

un inductor potent al COX-2, un mecanism posibil fiind activarea NF- κ B, un factor de transcripție implicat în carcinogeneza indusă de inflamație^{98,99}. Rezultatele noastre sunt în acord cu aceasta și, în plus, arată că extractul de CM posedă la rândul său capacitatea de a induce supraexpresia COX-2. Datele din literatură privind rolul supraexpresiei COX-2 în TFD asociată cu extracte naturale sunt neclare și contradictorii. Unele studii susțin că inflamația indusă amplifică efectul terapeutic, prin acțiune citotoxică asupra celulelor tumorale și recrutarea de celule imune ce la rândul lor recunosc și distrug celulele tumorale în localizările țintă^{81,100}. Altele, dimpotrivă, susțin că supraexpresia COX-2 și producția de prostaglandine indusă de aceasta sunt asociate cu creșterea tumorală și pot exercita un efect de evaziune a tumorii de sub controlul imun¹⁰¹. Datele noastre susțin ipoteza că extractul de CM este un agent antioxidant și antiinflamator care, în combinație cu TFD, a potențat acțiunea pro-inflamatorie a acestuia, cu deosebire atunci când a fost administrat înaintea TFD.

Apoptoza indusă de TFD și extractul de CM a fost determinată prin testul TUNEL efectuat pe secțiuni histologice din tumoră, înglobate în parafină. Cele mai importante modificări histologice corelate cu apoptoză intensă au fost observate în grupul de terapie combinată în care extractul de CM a precedat administrarea TFD. Efectul pro-apoptotic identificat în studiul nostru se corelează cu cel al altor extracte naturale (*Epigallocatechin galat*, *Photofrin*, *Curcumin*) în combinație cu TFD, după cum arată datele din literatură^{102,103, 104}.

În intenția de a studia mecanismul prin care se produce moartea celulară (apoptoza) s-a determinat expresia γ H2AX, un indicator al leziunilor ADN de tipul rupturilor dublu- catenare, utilizat frecvent pentru evaluarea atât a inducției cât și a reparării leziunilor ADN^{105,106}. Rezultatele noastre arată că, focare γ H2AX s-au format rapid după tratament și au persistat până la 24 de ore. Nivelul a fost crescut în toate grupurile care au primit tratament comparativ cu controlul, cele mai mari valori obținându-se la lotul tratat cu extract de CM înaintea TFD, sugerând că extractul de CM asociat TFD a amplificat generarea rupturilor duble ireparabile de ADN. Acesta ar putea reprezenta un alt mecanism de producere a morții celulare programate (apoptoza), independent de calea caspazelor¹⁰⁷, ce poate explica indexul apoptotic crescut în grupul respectiv.

3.6. Concluzii

1. În experimentul nostru, terapia fotodinamică a generat stres oxidativ, apărare antioxidantă endogenă redusă și răspuns inflamator.
2. Administrarea extractului de *Cornus mas* a indus o creștere a expresiei NOS2 și o scădere a expresiei COX-2 în carcinosarcomul *Walker*.
3. Tratamentul cu extract de *Cornus mas* înainte de administrarea TFD a indus reacții inflamatorii mai intense, leziuni ADN mai numeroase și apoptoză semnificativ crescută, comparativ cu administrarea după TFD.

4. Datele obținute de noi în acest studiu sugerează că tratamentul combinat a dus la activarea unor mecanisme diferite ce duc la moarte celulară: inflamație, leziuni ADN și apoptoză.
5. Momentul administrării extractului natural din fructe de corn, în raport cu TFD în regimul combinat, este extrem de important și reprezintă un punct cheie în designul unui tratament antitumoral eficient.

4. Studiu 2. Efectele asocierii *Curcuminei* la terapia fotodinamică în tumori experimentale

4.1. Introducere

În ciuda progreselor științifice și tehnologice extraordinare din ultimele decenii, care au crescut arsenalul de strategii, metode, tehnici și molecule utilizate în tratamentul cancerului, rămân încă anumite situații în care administrarea tratamentelor încetățenite (de tipul chimio-, radio-, imunoterapiei) nu este eficientă sau posibilă. Exemple ar fi chimioterapia la pacienții tăriți, cu indice de performanță prost sau patologii asociate grave, sau radioterapia în cazul în care pacientul a fost deja iradiat în regiunea respectivă.

În asemenea situații, terapia fotodinamică (TFD) poate reprezenta o modalitate binevenită și eficientă de tratament a cazurilor pentru care există indicații (spre exemplu tumori cutanate sau superficiale). Este o modalitate terapeutică neinvazivă, ale cărei avantaje și mecanisme de acțiune (capacitatea de a induce moarte celulară, stres oxidativ, modificări vasculare și reacții inflamatorii la nivelul țesutului țintă) o recomandă ca modalitate terapeutică și în tumori maligne.

TFD are însă și anumite dezavantaje, care îi limitează eficiența și indicațiile: penetrația luminii în țesuturi este redusă, prezența unei oxigenări adecvate este necesară, selectivitatea tumorală este redusă. De aceea, se impune identificarea unor modalități de modulare și optimizare a terapiei fotodinamice, cum ar fi potențarea acțiunii sale prin utilizarea de compuși cu acțiune de fotosensibilizare a celulelor țintă. Studiarea și identificarea de asemenea compuși, care să exercite un efect de potențare a terapiei fotodinamice, reprezintă o direcție de cercetare importantă în diferite patologii, inclusiv în cancer.

Anumiți compuși naturali, în combinație cu TFD, au crescut eficiența terapiilor antitumorale, protejând în același timp țesuturile sănătoase. Este și cazul *Curcuminei*, agent natural izolat din rizomul plantei *Curcuma longa*, cu efecte antiinflamatorii, antioxidante și antibacteriene cunoscute. Pe lângă acestea însă, acest compus natural poate acționa și ca un agent anticancer puternic, atât prin activarea reacțiilor redox și inducerea apoptozei celulelor maligne, cât și prin prevenirea progresiei, migrației și invaziei cancerului.

Combinăția între TFD și *curcumină* este o opțiune terapeutică logică și promițătoare, motiv pentru care a și fost și continuă să fie studiată pe scară largă. Cercetarea noastră se înscrie în această linie și caută să identifice existența și amploarea efectului potențator al *curcuminei* asupra TFD, mecanismele și moleculele implicate, precum și modalitatea optimă de asociere (din punct de vedere a dozajului, cronologiei și secvențialității) în cazul tumorilor solide.

Rezultatele acest studiu își găsesc utilitate atât științifică cât și practică, prin furnizarea de informații privind particularitățile modului de acțiune a acestui agent, în raport cu alți compuși naturali, precum și prin exploatarea datelor obținute pentru elaborarea în continuare a unor trialuri clinice de calitate. Ca finalitate, translația în clinică va lărgi spectrul modalităților de tratament în cancer, pentru situațiile și la pacienții cu indicații pentru acest tip de terapie.

4.2. Obiective

Evaluarea efectelor asocierii *Curcuminei* (CUR) la TFD și a secvențialității acestei asocieri asupra tumorilor *Walker* experimentale, prin determinarea parametrilor de stres oxidativ și nitrosativ, a nivelelor de inflamație și a apoptozei în țesutul tumoral.

4.3. Material și metode

Reactivi

Curcumina a fost achiziționată de la Sigma Aldrich, sub formă de substanță pură (Sigma-Aldrich Chemicals GmbH, Munich, Germania). Au mai fost utilizați: O-phthalaldehidă, glutation redus, reactiv Bradford, EDTA-Na₂ și acid 2-thiobarbituric (Merck KgaA, Darmstadt, Germania); etanol absolut, peroxid de hidrogen și n-butanol (Chimopar, București, România), kit trusă de testare TUNEL (Roche, Mannheim, Germania); anticorpi policlonali anti-NOS2 (1:200) și anti-COX2 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), LSAB-HRP kit (Dako, North America, Inc. CA, USA, K0679). 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin (TSPP) a fost donată de doamna Rodica-Mariana Ion de la Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie – ICECHIM, București, România.

Designul studiului

Studiul s-a desfășurat pe 42 șobolani Wistar albi, grupați în 7 loturi:

- Lotul I (control) – grup netratat, martor, cu tumora Walker;
- Lotul II – Curcumină 50 mg/kgcorp, dizolvat în 0,5 ml carbomexitil celuloză (CMC) 0,5%, administrat 7 zile prin gavaj;
- Lotul III – administrare Curcumină 50 mg/kg corp și iradiere (TFD);
- Lotul IV – administrare TSPP (10 mg/kg corp), doză unică;
- Lotul V - administrare TSPP și iradiere (TFD);

- Lotul VI – Curcumină 50 mg/kg corp administrată timp de 7 zile, urmată de iradiere (TFD);
- Lotul VII – TSPP și iradiere (TFD) urmate de administrare de Curcumină 50 mg/kg corp timp de 7 zile.

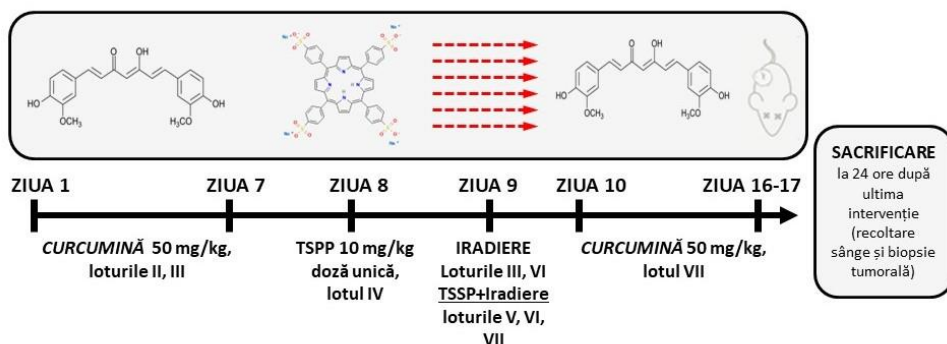


Fig. 10. Designul studiului pentru loturile care au fost tratate cu *Curcumină*, TSPP și TFD

Determinarea parametrilor de stres oxidativ și nitrosativ

Pentru a cuantifica dezechilibrul redox indus de TFD și impactul CUR asupra eficienței TFD, au fost evaluate nivelele malondialdehidei (MDA) și raportului glutatation redus/oxidat (GSH/GSSG). Nivelele MDA au fost determinate prin metoda fluorimetrică cu acid 2-tiobarbituric Conti⁸³ și rezultatele au fost exprimate în nmoli/mg proteină⁸⁵.

Glutationul redus și oxidat (GSH și GSSG) s-au determinat prin metoda fluorimetrică bazată pe o-phthalaldehidă⁸⁴.

Aceste metode au fost descrise în detaliu la capitolul „Metode generale”.

Evaluarea histopatologică și imunohistochimică a inflamației (COX2, NOS2)

După incubarea peste noapte, la 4°C, cu anticorpii primari policlonali de capră anti-NOS2 (1:200) și anti-COX2 IgG (1:300), secțiunile de 5μm au fost tratate cu un kit de peroxidază LSAB® (K0679)-HRP, iar produșii de reacție au fost identificați prin reacție DAB. Cuantificarea reacțiilor IHC s-a făcut pe baza extinderii și intensității colorației pozitive, (Toma et al. 2017; Grover et al. 2015) astfel: 0, reacție negativă; 0.5-1+, reacție slabă; 2+, reacție moderată; 3+, reacție intensă; 4+, reacție foarte intensă. Pe post de control negativ au fost folosite țesuturi care nu au fost incubate cu anticorpii primari (pentru a confirma specificitatea IHC). Probele au fost examinate de doi specialiști anatomopatologi, în sistem simplu-orb, utilizând un microscop Optika B-383LD2 cu cameră CCD.

Evaluarea histopatologică și imunohistochimică a apoptozei și necrozei

Indexul apoptotic a fost exprimat procentual, raportând numărul de celule TUNEL-pozitive la numărul total de celule, de pe fiecare secțiune. Necroza a fost detectată prin colorație convențională cu hematoxilină-eozină. Pentru dimensionarea câmpului microscopic s-a folosit scara Weibel. Suprafața fiecărui câmp a fost de 7.56 mm². S-a determinat procentul celulelor necrotice din totalul de celule din 3 câmpuri aleator alese și s-a raportat procentul (%) de celule necrotice/mm², la magnificație x200 (Bolfi et al. 2013; Hanahan and Weinberg 2011). Probele au fost examinate de doi specialiști anatomopatologi în sistem simplu-orb, utilizând un microscop Optika B-383LD2 cu camera CCD.

Analiza statistică

Pentru variabilele cantitative s-a utilizat analiza statistică descriptivă, sub forma de medii $\pm$ deviații standard. Indexul necrotic și cel apoptotic sunt prezentate în procente $\pm$ deviația standard. Pentru calcularea diferenței statistice între loturi s-a utilizat testul one-way ANOVA și posttestul pentru comparații multiple Turkey's (dimensiunea loturilor fiind aceeași). Testele Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk s-au folosit pentru a testa normalitatea datelor cu ajutorul software-ului statistic SPSS 17.0. Valorile obținute au fost prelucrate statistic folosind programul GraphPad Prism versiunea 5.03 pentru Windows (San Diego, CA, SUA). Nivelul de semnificație prag p fost considerat $p < 0.05$ (** $p < 0.001$; * $p < 0.01$; * $p < 0.05$, comparativ cu grupul de control; ## $p < 0.01$ și ### $p < 0.001$ comparativ cu grupul TSPP + IR și grupul TFD).

4.4. Rezultate

Markeri de stres oxidativ și nitrozativ

Nivelurile MDA descriu acțiunea speciilor reactive ale oxigenului asupra lipidelor. Valorile obținute pentru tMDA și sMDA în fiecare din grupurile de experiență sunt prezentate în Tabelul VI.

În țesutul tumoral, peroxidarea lipidelor a crescut în lotul tratat cu TFD (iradiat, IR) față de grupul de control, netratat (tMDA: 0.70 ± 0.19 nmoli/mg proteina vs. 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteina; $p < 0.001$) (Figura 11a). La lotul tratat cu CUR pre-TFD, tMDA a crescut comparativ cu controlul (0.28 ± 0.12 nmoli/mg proteină vs. 0.18 ± 0.07 nmoli/mg proteină) și cu lotul la care s-a administrat CUR singură (0.28 ± 0.12 nmoli/mg proteină vs. 0.18 ± 0.01 nmoli/mg proteină). În schimb, nivelele tMDA au fost în mod invariabil mai reduse la loturile supuse terapiei combinate față de lotul tratat cu TFD singură (TSPP+IR), indiferent de secvențialitatea administrării: 0.28 ± 0.12 nmoli/mg proteină vs. 0.70 ± 0.19 nmoli/mg proteina atunci când CUR a fost administrată înaintea TFD, respectiv 0.24 ± 0.05 nmoli/mg proteină atunci când CUR a fost administrată după TFD.

Tabel VI. Nivelurile MDA tumoral și seric în loturile tratate cu *Curcumină*, cu sau fără TFD

Grup	tMDA [nmoli/mg proteină]	sMDA [nmoli/ml]
	Media± Deviația Standard	Media± Deviația Standard
Control	0.18 ± 0.07	1.58 ± 0.07
CUR	0.18 ± 0.01	1.68 ± 0.29
CUR+IR	0.41 ± 0.08	1.55± 0.17
TSPP	0.71 ± 0.11	2.36 ± 0.51
TSPP+IR	0.70± 0.19	3.49 ± 0.92
CUR+TSPP+IR	0.28 ± 0.12	1.78 ± 0.26
TSPP+IR+CUR	0.24± 0.05	0.68 ± 0.41

Legendă: MDA = malondialdehida; tMDA = MDA în celule tumorale; sMDA = MDA în ser; CUR = *curcumina*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

În *ser* (Figura 11b), valorile cele mai crescute sMDA s-au înregistrat după TFD singură (3.49 ± 0.92 nmoli/mg proteină). Asocierea *Curcuminei*, în ambele secvențe de administrare, a determinat reducerea sMDA, cu valorile cele mai scăzute în cea de a doua situație (0.68 ± 0.41 nmoli/mg protein), în care Curcumina a fost administrată după TFD ($p < 0.001$).

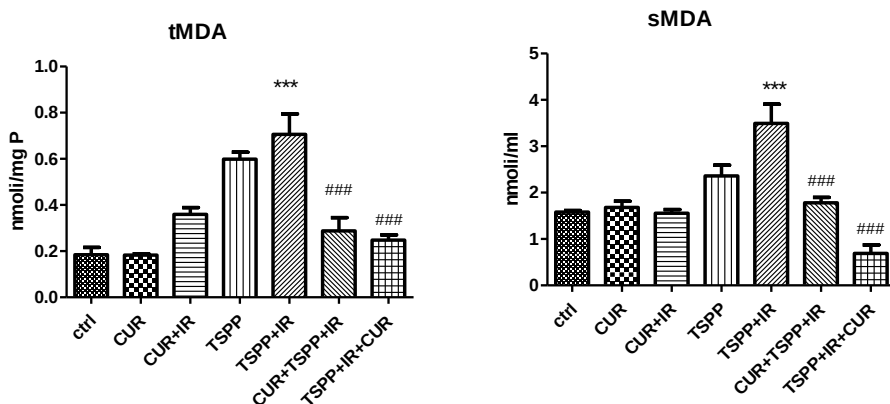


Fig. 11. Reprezentare grafică a valorilor malonaldehidei în țesutul tumoral (tMDA) și ser (sMDA), pentru loturile tratate cu Curcumina, cu sau fără TFD
 Legenda: tMDA = malonaldehida în țesutul tumoral; sMDA = malonaldehida în ser; CUR = curcumina; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Nivelurile glutationului redus (GSH) și oxidat (GSSG) în țesutul tumoral și în ser, obținute pentru fiecare din loturile studiate și în diferite combinații și secvențialități, sunt prezentate în tabelele VII (pentru GSH) și VIII (pentru GSSG).

Tabel VII. Nivelurile de GSH tumoral și seric în loturile tratate cu *Curcumină*, cu sau fără TFD

Grup	tGSH [nmoli/mg proteină]	sGSH [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	12.01 ± 2.11	5.51 ± 1.56
CUR	15.80 ± 1.32	4.79 ± 0.90
CUR+IR	16.05 ± 2.31	5.52 ± 1.58
TSPP	17.80 ± 2.29	3.90 ± 0.35
TSPP+IR	14.14 ± 3.07	6.12 ± 0.36
CUR+TSPP+IR	16.77 ± 2.72	5.09 ± 2.26
TSPP+IR+CUR	18.38 ± 1.54	5.49 ± 1.72

Legendă: tGSH = Glutation redus în țesutul tumoral; sGSH = Glutation redus în ser; CUR = curcumină; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Tabel VIII. Nivelurile GSSG tumoral și seric în loturile tratate cu *Curcumină*, cu sau fără TFD

Grup	tGSSG [nmoli/mg proteină]	sGSSG [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	1.84 ± 0.08	0.82 ± 0.09
CUR	1.19 ± 0.08	0.66 ± 0.20
CUR+IR	1.48 ± 0.11	0.76 ± 0.17
TSPP	1.47 ± 0.12	0.63 ± 0.09
TSPP+IR	1.43 ± 0.05	0.75 ± 0.08
CUR+TSPP+IR	1.41 ± 0.08	0.53 ± 0.10
TSPP+IR+CUR	1.29 ± 0.05	0.74 ± 0.07

Legendă: tGSSG = Glutation oxidat în țesutul tumoral; sGSSG = Glutation oxidat în ser; CUR = *curcumină*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Reprezentarea grafică a valorilor obținute în cadrul acestui experiment este înfățișată în figurile 12 (pentru glutationul redus, GSH, în țesutul tumoral și ser) și 13 (pentru glutationul oxidat GSSG din țesutul tumoral și din ser).

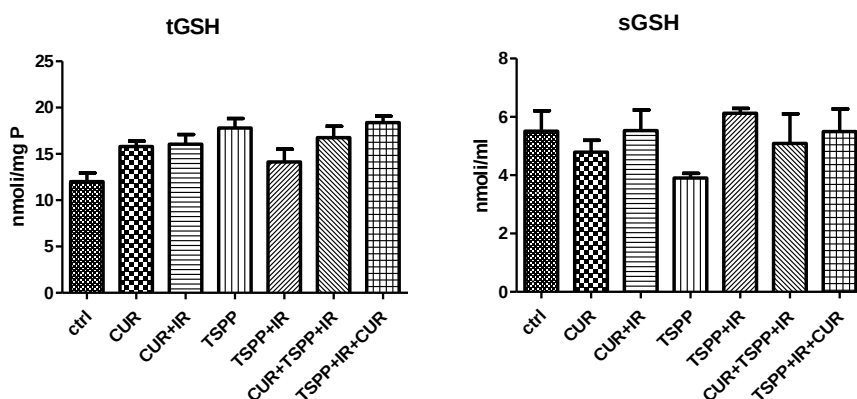


Fig. 12. Reprezentare grafică a valorilor glutationului redus în țesutul tumoral (tGSH) și ser (sGSH), pentru loturile tratate cu Curcumină, cu sau fără TFD. Legenda: tGSH = Glutation redus în țesutul tumoral; sGSH = Glutation redus în ser; CUR = curcumină; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

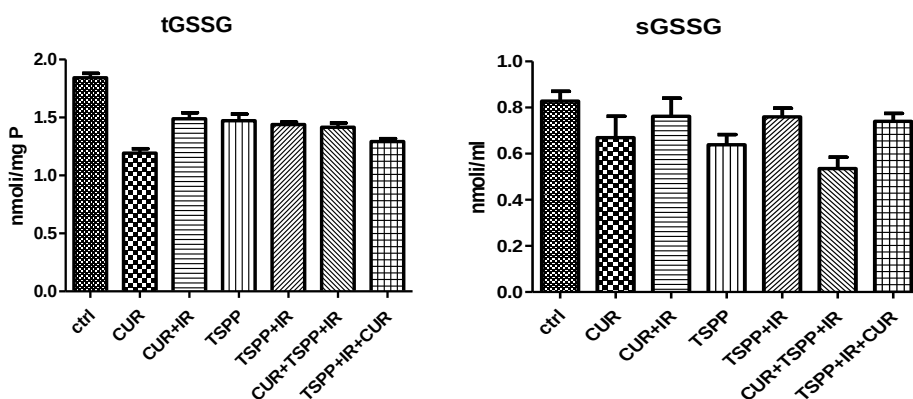


Fig. 13. Reprezentare grafică a valorilor glutationului oxidat în țesutul tumoral (tGSSG) și în ser (sGSSG), pentru loturile tratate cu Curcumină, cu sau fără TFD. Legenda: tGSSG = Glutation oxidat în țesutul tumoral; sGSSG = Glutation oxidat în ser; CUR = curcumină; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

După cum reiese din figurile 12 și 13, nu s-au identificat diferențe semnificative statistic între nivelurile GSH și GSSG în țesutul tumoral și în ser la grupele care au primit CUR, în comparație cu cele care au primit TFD, indiferent de secvențialitatea administrării.

Evaluarea imunohistochimică a COX2 și NOS2

Nivelurile de expresie IHC a COX2 și NOS2 în lotul tratat cu Curcumină, cu sau fără TFD, sunt prezentate în Tabelul IX.

Tabel IX. Expresia IHC a COX2 și NOS2 în lotul tratat cu Curcumină, cu sau fără TFD

Grup	Expresie COX2 [%]	Expresie NOS2 [%]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	3.66 ± 0.57	3.76 ± 0.49
CUR	2.53 ± 0.05	3.03 ± 0.15
CUR+IR	1.97 ± 0.07	1.00 ± 0.01
TSPP	2.43 ± 0.20	2.06 ± 0.21
TSPP+IR	4.03 ± 0.15	3.96 ± 0.05
CUR+TSPP+IR	2.96 ± 0.15	2.46 ± 0.05
TSPP+IR+CUR	3.50 ± 0.30	2.10 ± 0.17

Legendă: COX2 = ciclo-oxigenaza 2; NOS2 (nitric-oxid sintaza 2); CUR = *Curcumină*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

COX2

În figura 14 sunt prezentate aspectele imunohistochimice pentru fiecare din loturile examinate- control (a) și experimentale (b-g), precum și reprezentarea grafică a valorilor obținute (h).

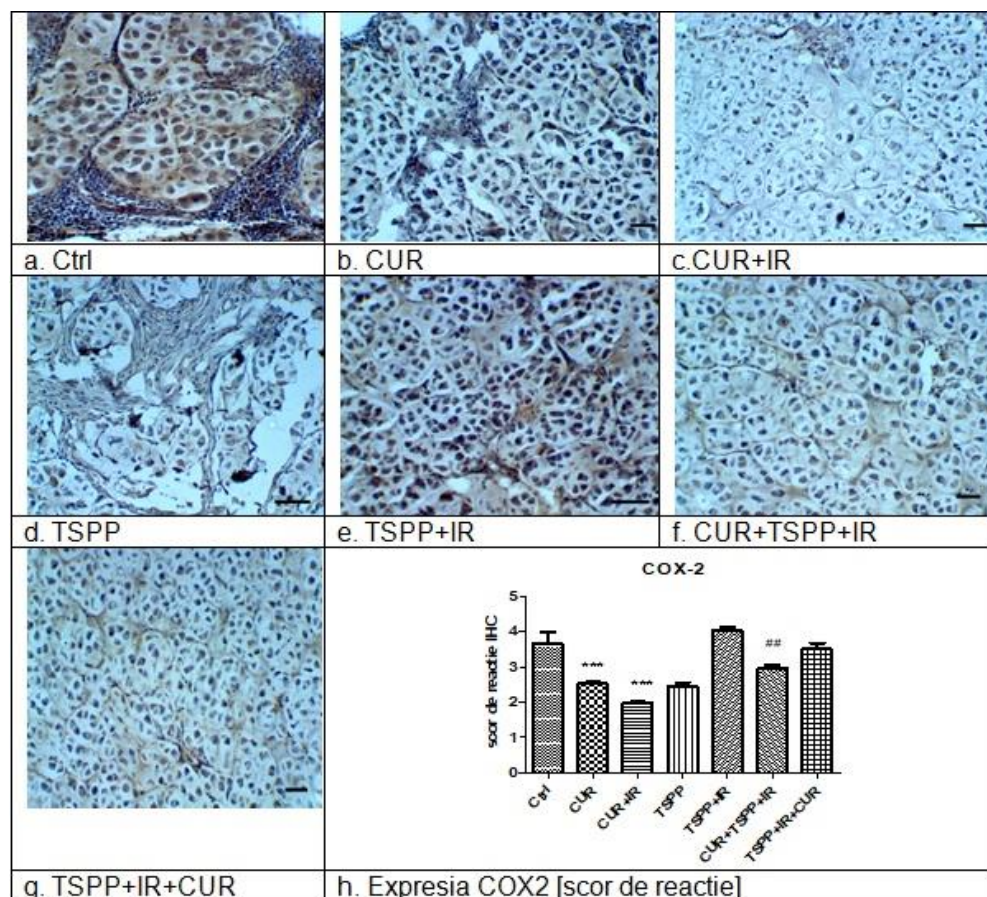


Fig. 14. Imunohistochimie pentru COX2 în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor scorului de reacție (h), exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001 comparativ cu grupul de control și ##p<0.001 comparativ cu grupul TSP + IR (TFD)

Atât la lotul tratat cu CUR singură (grupul b) cât și la lotul iradiat (grupul c) s-a observat o scădere semnificativă a expresiei COX2 față de control (2.53 ± 0.05 % și 1.97 ± 0.07 %, versus 3.66 ± 0.57 %, $p < 0.001$). Expunerea la TSP urmată de iradiere (lotul e) nu a modificat semnificativ expresia COX2 în tumori experimentale. Adiția CUR la TFD a redus semnificativ COX2 comparativ cu lotul tratat cu TFD (loturile f-g vs. lotul e), în special când agentul antioxidant a fost administrat înainte de TFD (la 2.97 ± 0.15 %, și la 3.50 ± 0.30 % față de 4.03 ± 0.15 %, $p < 0.001$) (Figura 14 h).

NOS2. Aspectul imunohistochimic pentru NOS2 în secțiunile examinate pentru fiecare din loturi este prezentat în Figura 16.

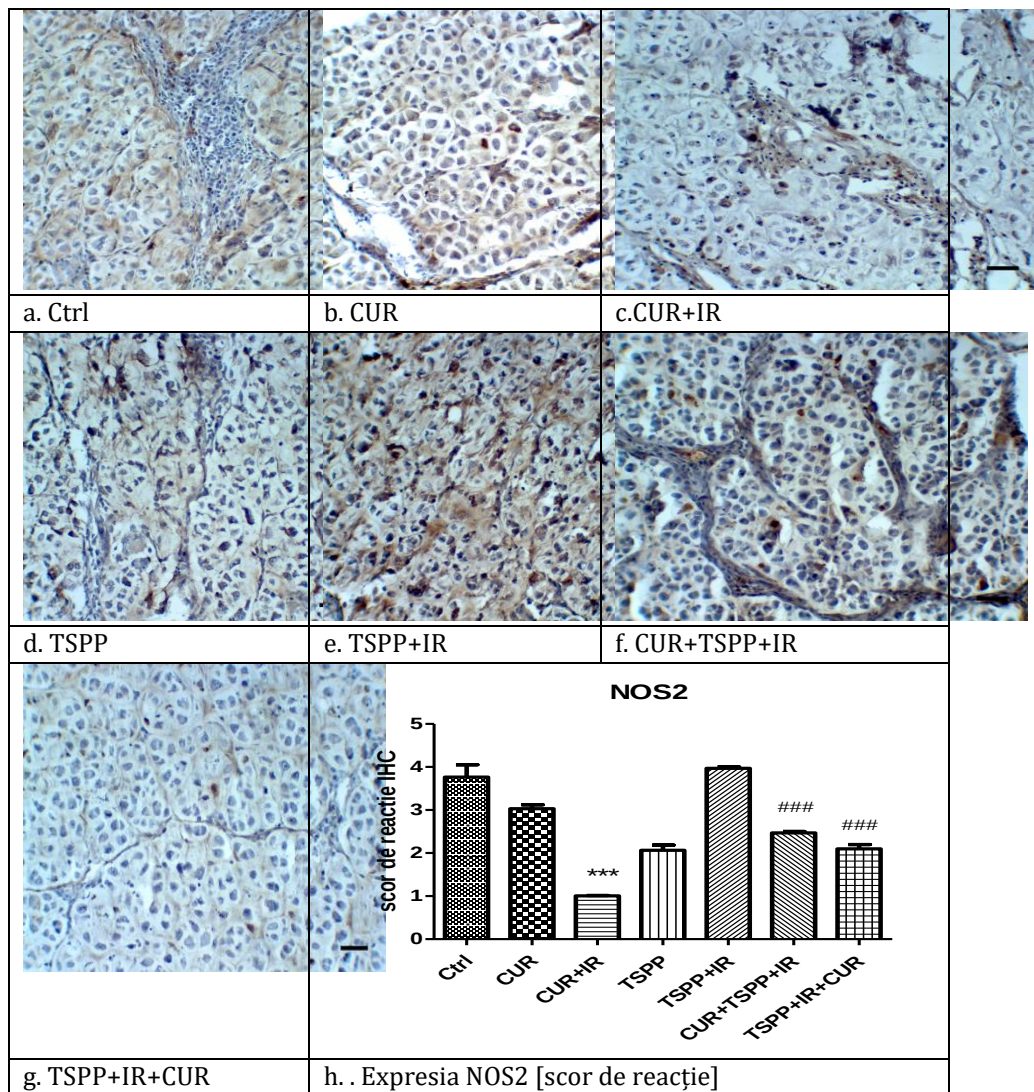


Fig. 15. Imunohistochimia pentru NOS2 în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor scorului de reacție (h) , exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001, comparativ cu grupul de control și ####p<0.001 comparativ cu grupul TSPP + IR (TFD)

Expresia NOS2 s-a redus semnificativ la lotul care a primit CUR + IR (grupul c). După administrarea de CUR și iradiere, expresia NOS2 s-a redus semnificativ în comparație cu lotul de control (la $1.00 \pm 0.01\%$ comparativ cu $3.76 \pm 0.49 \%$, $p < 0.001$). Terapiile combinate (grupele f-g) au determinat o scădere semnificativă a NOS2 comparativ cu TFD singură ($2.46 \pm 0.05 \%$ și $2.10 \pm 0.17\%$ comparativ cu $1.00 \pm 0.01\%$; $p < 0.001$) (Figura 15 h).

Evaluarea necrozei și apoptozei

Necroza a fost detectată prin colorație convențională cu hematoxină-eozină, indexul necrotic fiind calculat pe 3 câmpuri microscopice alese aleator. Apoptoza a fost cuantificată ca index apoptotic, care a fost exprimat procentual, raportând numărul de celule TUNEL-pozitive la numărul total de celule de pe fiecare secțiune. Valorile obținute pentru fiecare index în loturile evaluate sunt prezentate în tabelul X.

Tabel X. Index apoptotic și necrotic în loturile studiate

Grup	Index apoptotic [%]	Index necrotic [%]
	Media $\pm$ Deviația Standard	Media $\pm$ Deviația Standard
Control	3.63 ± 0.32	4.23 ± 0.12
CUR	3.72 ± 0.21	5.65 ± 0.33
CUR+IR	11.74 ± 0.20	7.69 ± 0.28
TSPP	5.08 ± 0.07	34.33 ± 1.26
TSPP+IR	8.03 ± 0.15	64.27 ± 1.75
CUR+TSPP+IR	8.10 ± 0.17	6.27 ± 0.08
TSPP+IR+CUR	11.53 ± 0.11	15.31 ± 0.30

Legendă: CUR = *Curcumină*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Necroza

Evaluarea histologică prin colorație convențională cu hematoxină-eozină (Figura 16) a arătat că administrarea CUR (grupul b) a indus modificări în structura tumorală după cum urmează: carioliză fără infiltrat inflamator, picnoză, nuclei spongioși și hipercromi și citoplasmă cu tendința spre degenerare vacuolară. CUR și iradierea (lotul c) au indus karyorrhexis focal asociat cu nuclei hipercromi. La lotul tratat cu TSPP+IR+CUR (grupul g), examinarea histologică a descris arii extinse de necroză, citoplasmă difuză, carioliză frecventă, fără infiltrat inflamator. În tumorile supuse la CUR+TSPP+IR (grupul f), examinarea histologică a descris nuclei vacuolați hipercromi, citoplasmă clară, necroză frecventă și carioliză, celule în faze post-mitotice frecvente (celule cu doi nuclei în aceeași celulă și displazie nucleică).

Indexul necrotic (calculat pe 3 câmpuri microscopice alese aleator) a fost mult crescut la lotul e, ce a primit TFD ($64.27 \pm 1.75 \%$) comparativ cu lotul a, de control

($4.23 \pm 0.12\%$, $p < 0.001$) (Figura 16 h). Administrarea CUR după TFD a crescut numărul de celule necrotice pe mm^2 ($15.31 \pm 0.30\%$) comparativ cu lotul de control ($p < 0.001$), însă aceste valori au fost semnificativ mai reduse comparativ cu cele obținute după TFD (Figura 16 h).

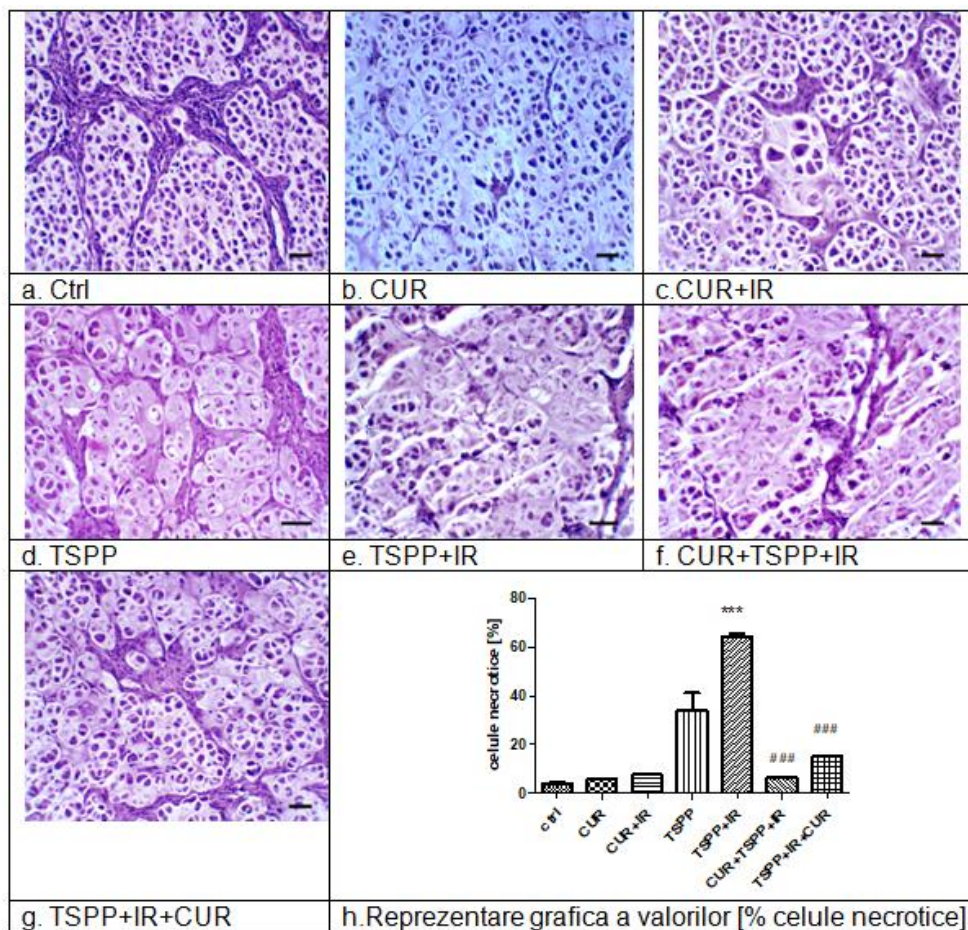


Fig. 16. Examinarea histopatologică a secțiunilor tumorale pentru evaluarea necrozei în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20 μm . Reprezentarea grafică a valorilor scorului de reacție (h), exprimate ca medie $\pm$ SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple *** $p < 0.001$ comparativ cu grupul de control și ### $p < 0.001$ comparativ cu grupul TSPP + IR (TFD)

Apoptoza

Apoptoza a fost evaluată prin testul TUNEL și cuantificată ca index apoptotic, care a fost exprimat procentual, raportând numărul de celule TUNEL-pozitive, la numărul total de celule de pe fiecare secțiune. Examinarea histopatologică a secțiunilor

tumorale este prezentată în figura 17, iar valorile indexului apoptotic sunt înfățișate în tabelul X, pentru fiecare din loturile studiate.

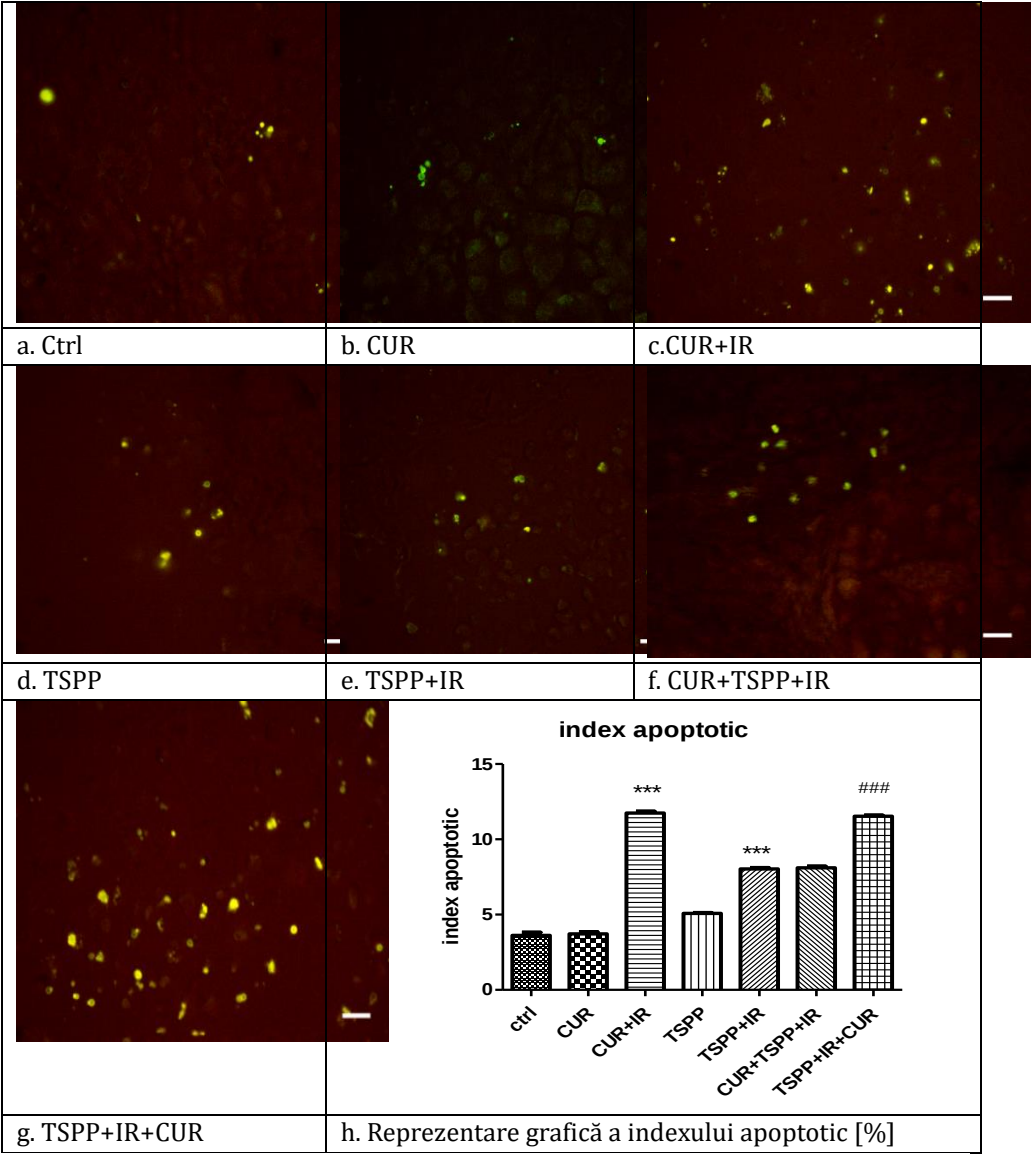


Fig. 17. Examinarea histopatologică a secțiunilor tumorale pentru evaluarea apoptozei în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor indexului apoptotic (h), exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001, comparativ cu grupul de control și ###p<0.001 comparativ cu grupul TSPP + IR (TFD)

Testarea TUNEL a identificat un efect pro-apoptotic pentru pentru TFD (lotul e) și mai ales pentru CUR, în combinație cu iradierea (grupul c): 11.74 ± 0.20 vs 3.63 ± 0.32 (control). CUR administrată după TFD (lotul g) a amplificat efectul acesteia până la un nivel similar cu valorile obținute cu CUR + IR (index apoptotic 11.53 ± 0.11 vs. 3.63 ± 0.32 în lotul de control și vs $8.03 \pm 0.15\%$ în grupul TFD, $p < 0.001$) (Figura 17 h).

4.5. Discuții

În ultimele decenii terapia fotodinamică (TFD) a câștigat tot mai mult teren ca modalitate de tratament a tumorilor maligne, singură sau în combinație cu alte metode de tipul chimioterapiei, radioterapiei, imunoterapiei. Caracterul său non-invaziv și non-toxic o recomandă ca metodă terapeutică, iar utilizarea ei s-a extins treptat în multiple patologii. Rezultatele sunt bune dar există anumite dezavantaje ce îi limitează eficiența în tratamentul tumorilor solide: selectivitate redusă, dependența de oxigen sau gradul limitat de penetrație în profunzimea țesuturilor^{13,79}.

Ca urmare se încearcă identificarea unor modalități de creștere a eficienței TFD, printre cele mai cunoscute și studiate fiind asocierea de agenți fotosensibilizatori (FS). Au fost descoperiți și astăzi sunt cunoscuți numeroși compuși cu proprietăți de fotosensibilizare, de mare interes fiind cei de origine naturală. FS naturali derivați din plante posedă selectivitate asupra celulelor maligne și toxicitate scăzută sau absentă asupra celor normale, și ca urmare se înscriu ca o abordare modernă, ecologică, în terapia cancerului, fiind candidați redutabili pentru combinarea cu TFD.

Un asemenea agent FS este *Curcumina* (CUR), compus natural extras din planta de curcuma (*Curcuma longa*), descrisă ca având proprietăți antimicrobiene, antiinflamatorii și antitumorale^{108,109,110}. Este un compus intens studiat, de multă vreme și pe scară largă, ca agent anticancerigen dar se utilizează și ca adjuvant și potențator în TFD.

Curcumina este considerată un potențial agent anticancerigen^{49,50} care inhibă proliferarea celulelor canceroase în cancerule de sân, plămâni, colon, rinichi, ovar și ficat. Activitatea anticanceroasă *in vitro* și *in vivo* a *curcuminei*^{51,52} a fost dovedită prin efectul de inhibare a diferiți factori de transcripție precum: NF-κB, AP-1, VEGF, NOS2, COX-2, 5-LOX, MMP-2, MMP-9 și IL-8, care sunt în principal responsabili pentru angieneză și creșterea tumorii. De asemenea, *curcumina* poate acționa ca un puternic agent antitumoral prin prevenirea progresiei, migrației și invaziei cancerului⁵⁶.

În ce privește rolul său de FS, datele din literatura de specialitate sunt numeroase dar contradictorii și există încă neclarități privind mecanismele de acțiune, moleculele implicate în acestea, modul optim de asociere cu terapia fotodinamică și, ca atare, indicațiile specifice în cancer. Din aceste motive am desfășurat un studiu în care am evaluat mecanismele de acțiune, aspectul metronomic și eficiența asocierii *Curcuminei*, ca agent FS, la TFD, în tumora Walker.

Pentru a evalua dezechilibrul redox indus de TFD și impactul CUR asupra acestuia au fost determinate malonaldehida (MDA) și raportul între glutatationul redus (GSH) și cel oxidat (GSSG), în țesutul tumoral și în ser. *Curcumina* a diminuat generarea de MDA și a crescut capacitatea antioxidantă în tumoră, mai ales când a fost administrată înaintea TFD. Nivelul scăzut al MDA tumorale și serice, ca surogat al leziunilor induse de SRO pe lipidele de membrană în grupurile supuse regimurilor combinate (CUR asociat TFD), pot fi interpretate coroborat cu o creștere a capacității celulare antioxidante, așa cum arată și nivelul GSH obținut la aceleași loturi. Aceste rezultate sunt asemănătoare cu cele obținute de Kumari și colab.¹¹¹ care au arătat că CUR a redus parametri de stres (oxid nitric, MDA) și a crescut protecția antioxidantă după administrarea intranazală în inflamația pulmonară. Pentru GSH și GSSG, atât cel tumoral cât și seric, nu s-au identificat diferențe semnificative statistic între grupurile ce au primit CUR (în comparație cu grupul TFD), indiferent de secvențialitatea administrării. În literatură, datele raportate privitor la acești parametri sunt contradictorii, unele fiind similare cu rezultatele noastre, altele însă au arătat că raportul GSH/GSSG este un bun surogat pentru statusul redox și marker al stresului oxidativ în cancer¹¹².

Modularea inflamației a fost studiată prin determinarea COX-2 și NOS2 prin imunohistochimie cu anticorpi specifici. Adăugată la TFD, indiferent de secvența de administrare, CUR a scăzut inflamația tumorală și a redus expresia COX-2 și mai ales a NOS2, ceea ce demonstrează că CUR scade stresul oxidativ și nitrosativ indus de TFD. Studiul lui Kumari¹¹¹ a adus dovezi suplimentare în acest sens, arătând că în inflamația pulmonară acută, *curcumina* a redus nivelul oxidului nitric, un indicator al stresului oxidativ. Acest parametru biochimic este produsul final al activității NOS2 și pare a avea o acțiune duală în tumori: pe de o parte exercită un efect anti-tumoral prin interacțiunea cu generarea de superoxid și peroxinitrit, iar pe de altă parte induce vasodilatație care favorizează nutriția tumorii, inhibă expresia moleculelor de adeziune și împiedică răspunsul imun¹¹³.

Efectul antitumoral al TFD și CUR au fost studiate prin evaluarea histologică a apoptozei și necrozei în secțiuni de țesut tumoral. Un procent mai mare de celule necrotice a fost identificat la loturile supuse regimului combinat, TFD asociat cu CUR, în special când aceasta a fost administrată după TFD. Indicele apoptotic a fost de asemenea semnificativ crescut în cazul acestui tratament combinat. Aceste rezultate, coroborate cu un NOS2 diminuat, susțin ideea efectului antitumoral al stresului nitrosativ, mai degrabă decât activitatea sa de protecție. Efectul pro-apoptotic al CUR, identificat în studiul nostru, este confirmat de datele din literatură pe numeroase tipuri de tumori. În carcinomul cervical, Moustapha et al. au identificat apoptoza indusă de CUR și au descris interacțiunea între aceasta și autofagie¹¹⁴, iar Singh M. a descris efectul proapoptotic al CUR prin supraexpresia BAX și activarea caspazelor 3 și 9¹¹⁵. În carcinomul nazofaringian, CUR a redus viabilitatea celulară la 5% atunci când a fost utilizată ca fotosensibilizator în terapia fotodinamică¹¹⁶. În cancerul mamar, de

asemenea, CUR a exercitat un efect pro-apoptotic, mecanismele identificate fiind inhibarea expresiei p53 cu reducerea expresiei complexului CDK4/ciclină D1 și inducerea generării de SRO⁵³. Au fost identificate și alte mecanisme de favorizare sau inducție a apoptozei în cancer de către *curcumină*, cum sunt inhibarea activității NF-κB și COX-2 (implicate în supraexprimarea genelor antiapoptotice, cum ar fi Bcl-2), inhibarea căii de semnalizare antiapoptoză PI3K, creșterea expresiei MAPK-inazelor pentru a induce producția endogenă de SRO⁵⁸.

4.6. Concluzii

1. Administrată asociat terapiei fotodinamice, în special anterior acesteia, *curcumina* a determinat creșterea capacității celulare antioxidante în tumoră.
2. Adăugată la TFD, indiferent de secvența de administrare, CUR a scăzut inflamația tumorală și stresul oxidativ și nitrosativ indus de TFD.
3. *Curcumina* a dus la creșterea apoptozei și necrozei în țesutul tumoral, în special când a fost administrată după TFD.
4. Rezultatele noastre confirmă efectul potențial antitumoral al *curcuminei*, ca și cel de modulare a efectelor TFD, în special în administrare ulterioară acesteia.

5. Studiu 3. Efectele modulatorie in vivo ale *Resveratrolului* asupra terapiei fotodinamice cu TSPP în tumori experimentale

5.1. Introducere

Terapia fotodinamică (TFD), ca modalitate terapeutică neinvazivă, își lărgeste treptat spectrul aplicațiilor clinice, pe măsură ce rezultatele cercetării științifice aduc tot mai multe dovezi privind eficiența și avantajele sale în patologii din cele mai diverse.

Descifrarea cu succes a unora dintre mecanismele sale de acțiune (inducerea apoptozei și morții celulare, inducerea stresului oxidativ, a reacțiilor inflamatorii și a modificărilor vasculare) face ca această metodă să fie testată pe scară din ce în ce mai largă și inclusă între modalitățile de tratament a cancerului.

Există însă și unele dezavantaje, ce țin de proprietățile fizice și chimice ale TFD, care limitează eficiența și indicațiile acestuia în tumorile maligne: profunzime limitată de penetrare în țesuturi, selectivitate redusă și necesitatea existenței unei oxigenări adecvate a țesuturilor țintă. Aceasta face ca identificarea unor modalități de optimizare a acestui tip de terapie să fie nu doar necesară ci și urgentă, iar asocierea cu factori/compuși fotosensibilizatori (FS) pare a fi una dintre cele mai logice și promițătoare abordări. Aceștia absorb radiația luminoasă cu o anumită lungime de undă și declanșează reacții fotochimice și fotofizice ce, în final, potențează acțiunea terapiei fotodinamice.

Există un număr tot mai mare de asemenea compuși, majoritatea de origine naturală, care sunt testați pe scară largă în vederea asocierii cu terapia fotodinamică. Avantajul unor asemenea compuși, cum sunt spre exemplu *curcumina*, silimarina și epigallocatechina, constă în faptul că, dincolo de potențarea efectului citotoxic al TFD asupra tumorilor maligne, exercită o acțiune protectivă la nivelul țesuturilor sănătoase din jur.

Cercetarea în domeniul terapiei fotodinamice, cu deosebire în ce privește aplicațiile acestuia în cancer, implică nu doar identificarea de noi produși fotosensibilizatori ci și studii aprofundate pentru descifrarea mecanismelor de acțiune ale asocierii agenților fotosensibilizatori cu TFD, a modulării pe care aceștia o exercită

asupra TFD și a modului și momentului optim de administrare în raport cu iradierea, astfel încât eficiența asocierii să fie maximă.

Unul dintre compușii care s-a impus deja în arsenalul terapeutic al mai multor patologii este *Resveratrolul*, un polifenol natural cu o gamă largă de efecte biologice (anti-inflamatorii, anti-oxidante, anti-virale, anti-fungice, anti-îmbătrânire) și funcții benefice multiple. El posedă și acțiune anti-cancerigenă, fiind cunoscut potențialul său anti-metastatic și anti-angiogenic, unele studii raportând că poate preveni apariția, dezvoltarea și progresia tumorală. Este utilizat împreună cu TFD pentru tratarea carcinomului cutanat cu celule scuamoase și este în curs de evaluare în terapia mai multor tipuri de tumori, cum sunt cancerul colorectal, prostatic, mamar sau hepatic.

Cu toate acestea, în cazul *Resveratrolului*, mecanismele moleculare de acțiune sunt încă mai puțin clarificate iar descifrarea acestora ar face posibilă combinarea judicioasă cu TFD. Studiul de față aduce o contribuție în acest sens, investigând moleculele și căile importante implicate în efectul anti-tumoral al terapiei asociate TFD-*Resveratrol*, ca și secvențialitatea optimă a administrării compusului natural în raport cu TFD. Această abordare, dincolo de importanța științifică, aduce un aport important în ce privește optimizarea regimului de administrare a terapiei combinate în tumorile maligne și constituie o bază științifică valoroasă ce poate fi exploatată în continuare în trialuri clinice de evaluare a eficienței TFD în cancer.

5.2. Obiective

Evaluarea efectelor asocierii *Resveratrolului* la TFD și a secvențialității acestei asocieri asupra tumorilor *Walker* experimentale, prin determinarea parametrilor de stres oxidativ și nitrosativ, a nivelelor de inflamație și a apoptozei.

5.3. Material și metode

Reactivi

Resveratrolul a fost achiziționat ca atare, sub forma de substanță pură (Sigma-Aldrich Chemicals GmbH, Munich, Germania). Au mai fost utilizați: O-phthalaldehidă, glutation redus, reactiv Bradford, EDTA-Na₂ și acid 2-thiobarbituric (Merck KgaA, Darmstadt, Germania); etanol absolut, peroxid de hidrogen și n-butanol (Chimopar, București, România), kit de testare TUNEL (Roche, Mannheim, Germania); anticorpi policlonali anti-NOS2 (1:200) și anti-COX2(1:300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), LSAB-HRP kit (Dako, North America, Inc. CA, USA, K0679). 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin (TSPP) a fost donată de doamna Rodica-Mariana Ion de la Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie-ICECHIM, București, România.

Designul studiului

Studiul s-a desfășurat pe 42 șobolani Wistar albi grupați în 7 loturi:

- Lotul I (control) – grup netratat, martor, cu tumora Walker;
- Lotul II - Resveratrol 10 mg/kg corp, dizolvat în 0,5 ml carbomexitul celuloză (CMC) 0,5%, administrat 7 zile prin gavaj;
- Lotul III – administrare Resveratrol 10 mg/kg corp și iradiere;
- Lotul IV – administrare TSPP (10 mg/kg corp), doză unică;
- Lotul V - administrare TSPP și iradiere;
- Lotul VI – Resveratrol 10 mg/kg corp administrat 7 zile înainte de iradiere;
- Lotul VII – TSPP și iradiere (TFD) urmate de administrare de Resveratrol 10 mg/kg corp timp de 7 zile.

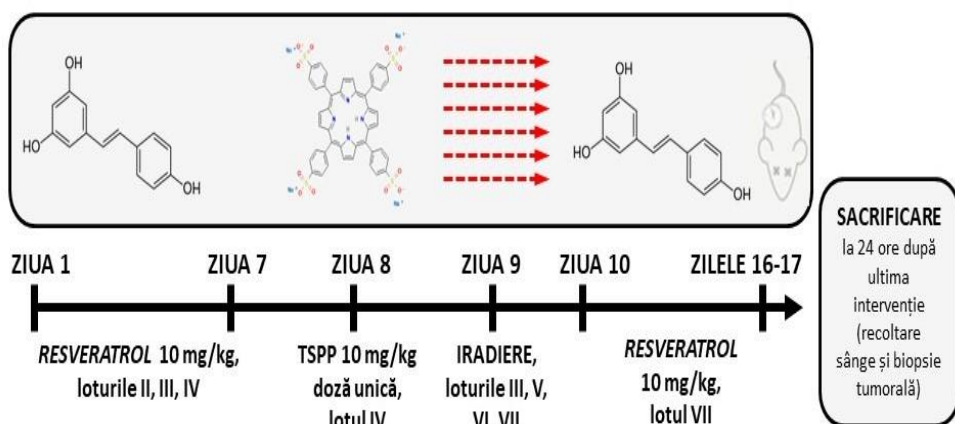


Fig. 18. Designul studiului pentru loturile care au fost tratate cu *Resveratrol* și TFD

Determinarea parametrilor de stres oxidativ și nitrosativ

Pentru a cuantifica dezechilibrul redox indus de TFD și impactul RES asupra eficienței TFD, au fost evaluate nivelul malondialdehidei (MDA) și raportul glutatión redus/oxidat (GSH/GSSG). Nivelul MDA a fost determinat prin metoda fluorimetrică cu acid 2-thiobarbituric și rezultatele au fost exprimate în nmoli/mg proteină. Glutatióul redus și oxidat (GSH și GSSG) s-au evaluat prin metoda fluorimetrică având la bază reacția cu o-phthalaldehidă.

Evaluarea histopatologică și imunohistochimică a apoptozei și necrozei

Pentru evaluarea apoptozei, secțiuni tumorale de 5μm au fost incubate cu anticorpi primari policlonali de capră anti-NOS2 și anti-COX2 IgG (în concentrații de 1:200 și respectiv 1:300), peste noapte, la temperatura de 4°C. Ulterior, secțiunile au fost tratate cu un kit de peroxidază LSAB® (K0679)-HRP și produșii de reacție au fost identificați prin reacție DAB. Reacțiile IHC au fost notate luând în considerare extinderea și intensitatea colorației pozitive, după cum urmează: 0- reacție negativă;

0.5-1+, reacție scăzută; 2+, reacție moderată; 3+, reacție intensă; 4+, reacție foarte intensă. Pe post de control negativ (pentru a verifica specificitatea IHC) au fost folosite țesuturi care nu au fost incubate cu anticorpii primari. Toate probele au fost examinate de doi anatomopatologi în sistem simplu-orb, utilizând un microscop Optika B-383LD2 cu camera CCD. Indexul apoptotic s-a exprimat procentual raportând numărul de celule TUNEL-pozitive la numărul total de celule de pe fiecare secțiune.

Pentru detecția necrozei s-a utilizat colorația convențională cu hematoxilină-eozină. Pentru dimensionarea câmpului microscopic s-a folosit scara Weibel. Suprafața fiecărui câmp a fost de 7.56 mm². S-a determinat procentul celulelor necrotice din totalul de celule din 3 câmpuri aleator alese și s-a raportat procentul (%) de celule necrotice/mm² la magnificație x200.

5.4. Rezultate

Markerii de stres oxidativ și nitrozativ

Nivelurile MDA. Valorile obținute pentru MDA tumoral și seric în fiecare grup studiat sunt prezentate în Tabelul XI.

Tabel XI. Valorile MDA tumoral și seric în loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Grup	tMDA [nmoli/mg proteină]	sMDA [nmoli/mg proteină]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	0.18 ± 0.07	1.58 ± 0.07
RES	0.22 ± 0.03	1.73 ± 0.12
RES+IR	0.27 ± 0.06	1.73 ± 0.12
TSPP	0.71 ± 0.11	2.36 ± 0.51
TSPP+IR	0.70 ± 0.19	3.49 ± 0.92
RES+TSPP+IR	0.30 ± 0.11	2.04 ± 0.33
TSPP+IR+RES	0.26 ± 0.04	1.72 ± 0.55

Legendă: MDA = malondialdehidă; tMDA = MDA în celule tumorale; sMDA = MDA în ser; RES = *Resveratrol*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

În țesutul tumoral (figura 19 a), peroxidarea lipidelor a crescut în grupul cu TFD față de lotul de control, netratat (tMDA: 0.70±0.19 nmoli/mg proteină vs. 0.18±0.07 nmoli/mg proteină; p<0.001). Administrarea *Resveratrolului* (RES), atât pre- cât și post-TFD, a redus semnificativ nivelul MDA în tumoră (tMDA) (0.30±0.11 nmoli/mg proteină și respectiv 0.26±0.04 nmoli/mg proteină) comparativ cu nivelul obținut la lotul tratat cu TFD (0.70±0.19 nmoli/mg proteină, p<0.001 în ambele situații).

Aceeași observație s-a făcut și pentru nivelurile serice ale MDA (sMDA) (Figura 19 b), unde TFD a indus formarea de peroxizi lipidici (3.49±0. nmoli/ml vs. 1.58±0.07 nmoli/ml în lotul de control). Regimurile combinate, cu RES administrat pre- și post-

TFD, au redus valorile semnificativ, la 2.04 ± 0.33 nmoli/ml (RES+TFD) și 1.72 ± 0.55 nmoli/ml (TFD+RES), comparativ cu lotul tratat doar cu TFD ($p < 0.01$ și respectiv $p < 0.001$).

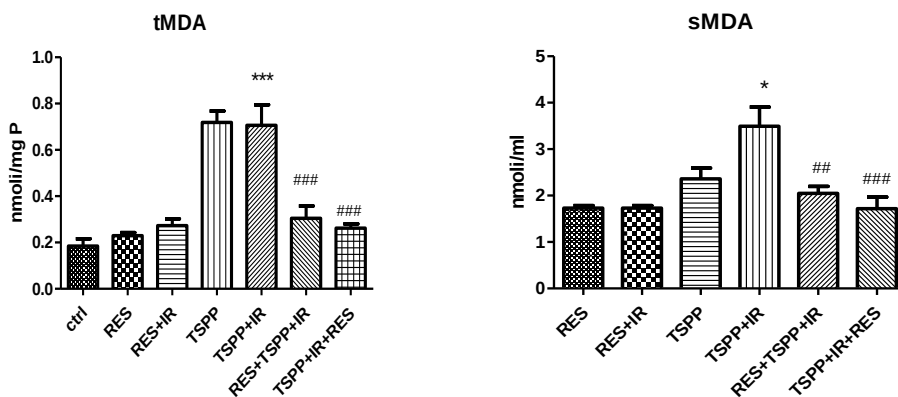


Fig. 19. Reprezentare grafică a valorilor malonaldehidei în țesutul tumoral, (tMDA) și ser, (sMDA) pentru loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Legendă: tMDA = malonaldehida în țesutul tumoral; sMDA = malonaldehida în ser; RES = *Resveratrol*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Nivelurile glutationului redus (GSH) și oxidat (GSSG) în țesutul tumoral și în ser, obținute pentru fiecare din loturile studiate și în diferite combinații și secvențialități, sunt prezentate în tabelele XII (pentru GSH) și XIII (pentru GSSG).

Tabel XII. Nivelurile GSH tumoral și seric în loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Grup	tGSH [nmoli/mg proteină]	sGSH [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	12.01 ± 2.11	5.51 ± 1.56
RES	23.50 ± 2.41	6.25 ± 0.69
RES+IR	23.50 ± 2.41	5.78 ± 0.45
TSPP	17.80 ± 2.29	3.90 ± 0.35
TSPP+IR	14.14 ± 3.07	6.12 ± 0.36
RES+TSPP+IR	21.64 ± 5.26	5.39 ± 0.68
TSPP+IR+RES	16.56 ± 1.92	7.53 ± 2.25

Legendă: tGSH = Glutation redus în țesutul tumoral; sGSH = Glutation redus în ser; RES = *resveratrol*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin.

Tabel XIII. Nivelurile GSSG tumoral și seric în loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Grup	tGSSG [nmoli/mg proteină]	sGSSG [nmoli/ml]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	1.64 ± 0.08	0.82 ± 0.09
RES	1.48 ± 0.03	0.68 ± 0.10
RES+IR	1.44 ± 0.10	0.61 ± 0.06
TSPP	1.47 ± 0.12	0.63 ± 0.09
TSPP+IR	1.43 ± 0.05	0.75 ± 0.08
RES+TSPP+IR	1.30 ± 0.04	0.78 ± 0.12
TSPP+IR+RES	1.40 ± 0.03	0.97 ± 0.14

Legendă: tGSSG = Glutation oxidat în țesutul tumoral; sGSSG = Glutation oxidat în ser; RES = *Resveratrol*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Reprezentarea grafică a valorilor obținute în cadrul acestui experiment este înfățișată în figurile 20 (pentru glutationul redus GSH și cel oxidat GSSG, în țesutul tumoral) și 21 (pentru glutationul redus GSH și oxidat GSSG din ser).

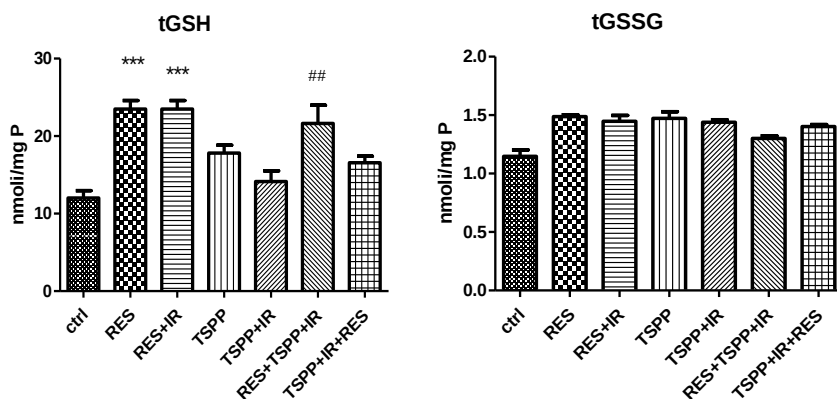


Fig. 20. Reprezentarea grafică a valorilor din țesutul tumoral pentru glutationul redus (tGSH) și oxidat (tGSSG) în loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Legenda: tGSH = Glutation redus în țesutul tumoral; tGSSG = Glutation oxidat în țesutul tumoral; RES = *Resveratrol*; IR = iradiere; TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

În țesutul tumoral (figura 20), administrarea RES și RES + IR a crescut nivelul glutationului redus GSH (23.50 ± 2.41 nmoli/ml) comparativ cu lotul de control, netratat (12.01 ± 2.11 nmoli/ml; $p < 0.001$). Administrarea RES înainte de TFD a crescut nivelul GSH în omogenatul tumoral (21.64 ± 5.26 nmoli/ml) comparativ cu lotul tratat doar cu TFD (14.14 ± 3.07 nmoli/ml; $p < 0.01$) (figura 20 a). În schimb, nu s-au identificat diferențe statistic semnificative în ce privește nivelele tGSSG între grupele care au primit RES în comparație cu grupa TFD, indiferent de secvențialitatea administrării (figura 20 b).

În ser (figura 21), administrarea RES atât înainte cât și după TFD nu a fost urmată de modificări semnificative statistic ale glutationului redus sGSH (figura 21 a) și oxidat sGSSG (figura 21 b).

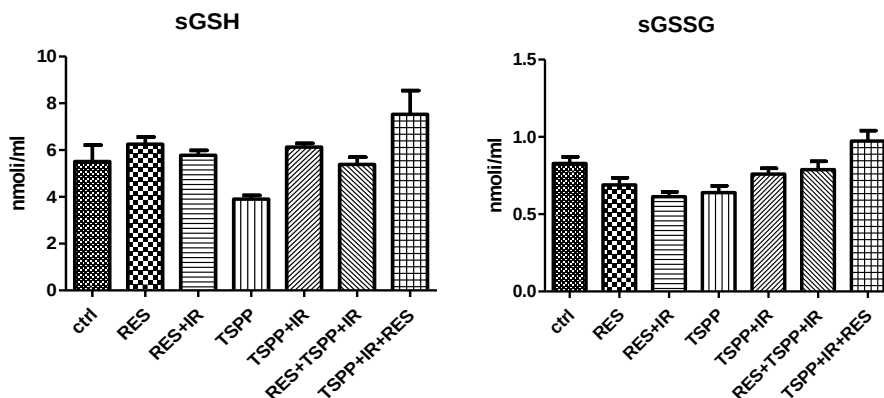


Fig. 21. Reprezentarea grafică a valorilor glutationului redus (sGSH) și oxidat (sGSSG) în ser, pentru loturile tratate cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD

Legendă: sGSH = Glutation redus în ser; sGSSG = Glutation oxidat în ser; RES = *Resveratrol*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Evaluarea imunohistochimică a COX2 și NOS2

Nivelurile de expresie IHC a COX2 și NOS2 în lotul tratat cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD, sunt prezentate în Tabelul XIV.

Tabel XIV. Expresia IHC a COX2 si NOS2 în lotul tratat cu *Resveratrol*, cu sau fără TFD.

Grup	Expresie COX2 [%]	Expresie NOS2 [%]
	Media $\pm$ Deviația Standard	Media $\pm$ Deviația Standard
Control	3.36 $\pm$ 0.56	3.76 $\pm$ 0.49
RES	1.53 $\pm$ 0.25	1.40 $\pm$ 0.10
RES+IR	1.97 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.01
TSPP	2.43 $\pm$ 0.20	2.06 $\pm$ 0.21
TSPP+IR	4.03 $\pm$ 0.15	3.96 $\pm$ 0.05
RES+TSPP+IR	2.40 $\pm$ 0.19	2.96 $\pm$ 0.05
TSPP+IR+RES	3.38 $\pm$ 0.19	4.00 $\pm$ 0.10

Legendă: COX2 = ciclo-oxigenaza 2; NOS2 (nitic-oxid sintaza 2); RES = *Resveratrol*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP =5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

COX2. În figura 22 sunt prezentate aspectele imunohistochimice pentru fiecare din loturile examinate- control (a) și experimentale (b-g), precum și reprezentarea grafică a valorilor obținute (h).

Administrarea RES (lotul b) a indus o scădere semnificativă, la jumătate, a expresiei COX2 comparativ cu controlul (lotul a): 1.53 $\pm$ 0.25% față de 3.36 $\pm$ 0.56. De asemenea, în combinație cu iradierea (grupul c), RES a indus o scădere semnificativă a expresiei COX2, la 1.97 $\pm$ 0.07% față de 3.36 $\pm$ 0.56 la control ($p < 0.001$) (Figura 22 h).

Expunerea la TSPP urmată de iradiere (lotul e) nu a modificat semnificativ expresia COX2 în tumorile experimentale. În schimb, adiția RES la TFD a redus semnificativ COX2 comparativ cu lotul tratat doar cu TFD (2.40 $\pm$ 0.19 % vs. 3.36 $\pm$ 0.56%, $p < 0.001$), atunci când agentul antioxidant a fost administrat înainte de TFD (lotul f) (Figura 22 h).

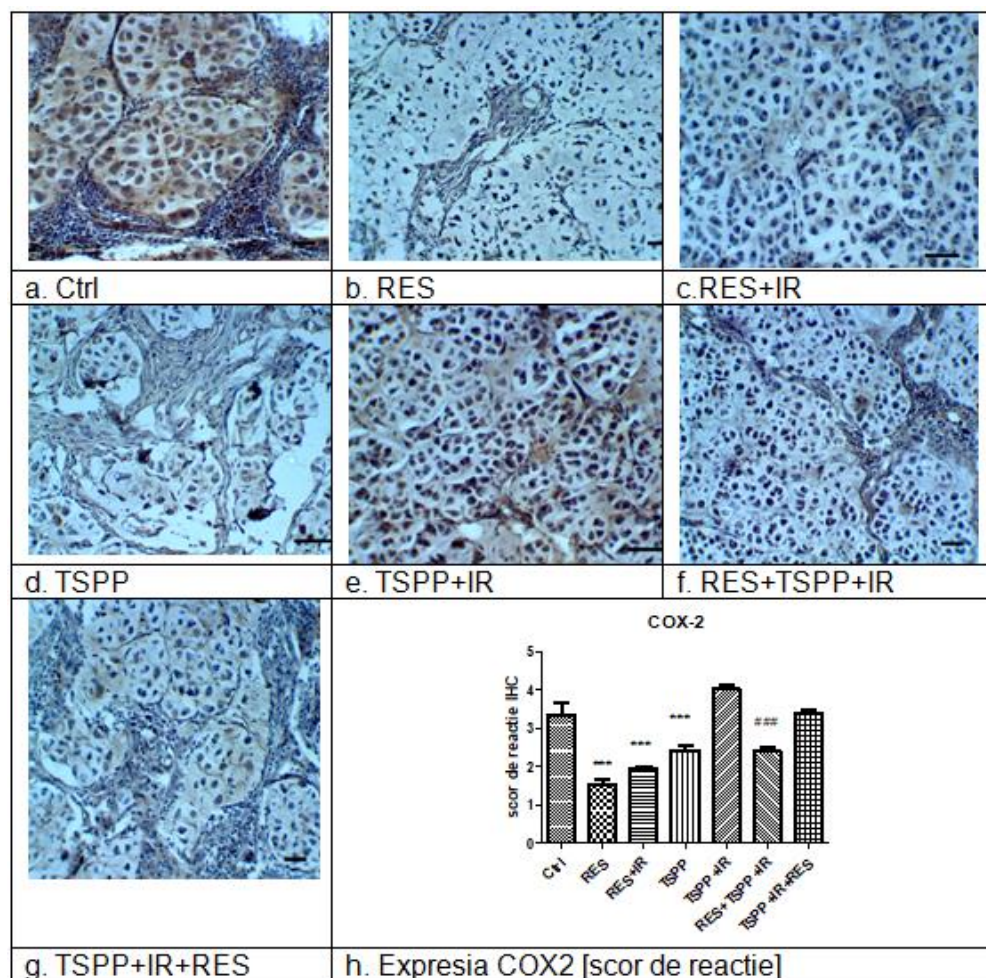


Fig. 22. Imunohistochimia pentru COX2 în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20 μ m. Reprezentarea grafică a valorilor scorului de reacție (h), exprimate ca medie $\pm$ SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001 comparativ cu grupul de control și ****p<0.001 comparativ cu grupul TSP + IR (TFD)

NOS2. Aspectele imunohistochimice pentru din loturile examinate - cel de control (a) și cele experimentale (b-g) - precum și reprezentarea grafică a valorilor obținute (h) sunt prezentate în Figura 23.

Expresia NOS2 s-a redus semnificativ la loturile care au primit RES și RES+IR, de la $3.76 \pm 0.49\%$ (control, lotul a) la $1.40 \pm 0.10\%$ (RES singur, lotul b) și chiar 1.00 ± 0.01 (RES+IR, lotul c). Terapia combinată, cu RES administrat înainte de TFD (lotul f) și după TFD (lotul g) a produs o creștere semnificativă a NOS2 comparativ cu RES + IR (lotul c), la 2.96 ± 0.05 respectiv 4.00 ± 0.10 vs. $1.00 \pm 0.01\%$ (Figura 23 h).

Comparativ cu TFD singură (lotul e) însă, RES administrat după aceasta (lotul g) nu a fost urmat de modificarea semnificativă a imunoreactivității NOS2 (Figura 23 h).

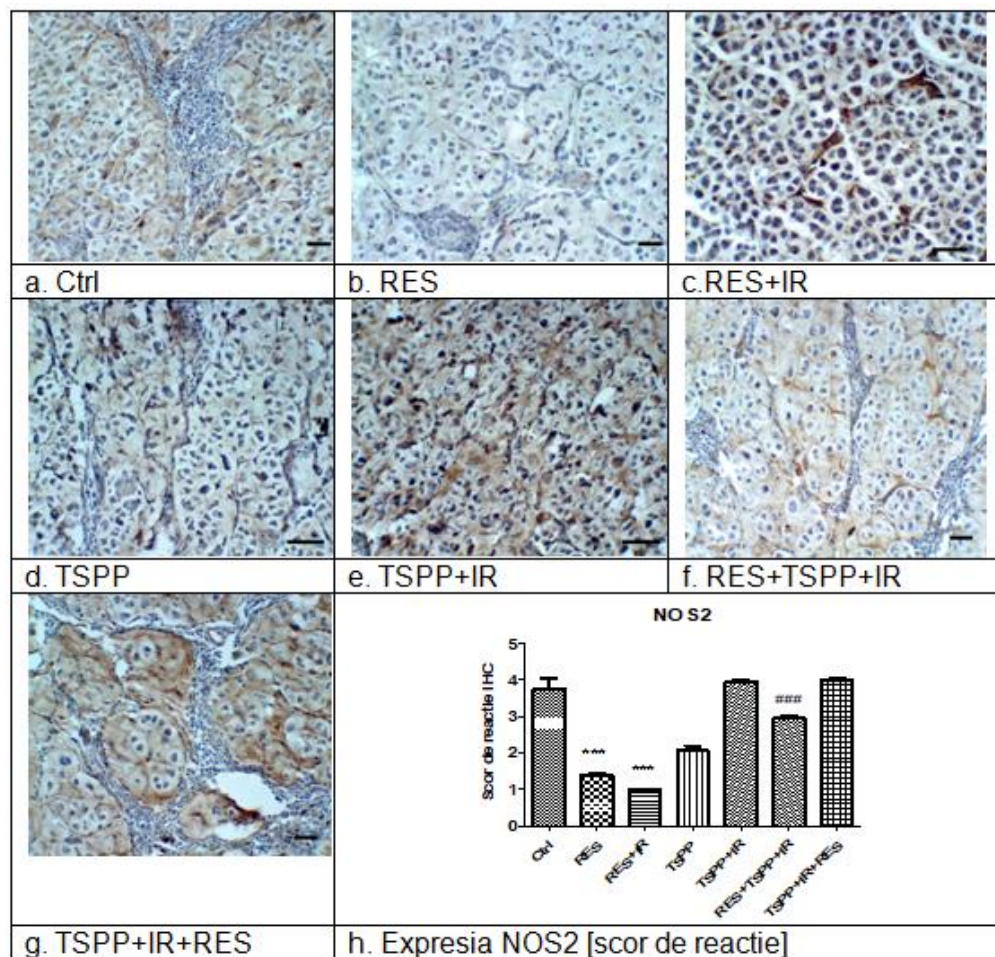


Fig. 23. Imunohistochimia pentru COX2 în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor scorului de reacție (h), exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001 comparativ cu grupul de control și ***p<0.001 comparativ cu grupul RES și RES + IR

Evaluarea apoptozei și necrozei

Apoptoza a fost evaluată folosind testul TUNEL și cuantificată procentual, ca index apoptotic, reprezentând raportul între numărul de celule TUNEL-pozitive și numărul total de celule de pe fiecare secțiune examinată.

Necroza a fost detectată prin colorație convențională cu hematoxilină-eozină și exprimată ca index necrotic calculat pe 3 câmpuri microscopice alese aleator.

Valorile obținute pentru fiecare index, apoptotic și necrotic, în loturile evaluate sunt prezentate în Tabelul XV.

Tabel XV. Index apoptotic și necrotic în loturile studiate

Grup	Index apoptotic [%]	Index necrotic [%]
	Media ± Deviația Standard	Media ± Deviația Standard
Control	3.62 ± 0.32	4.23 ± 0.12
RES	9.28 ± 0.02	5.48 ± 0.22
RES+IR	8.61 ± 0.55	5.36 ± 0.74
TSPP	5.08 ± 0.07	34.33 ± 1.26
TSPP+IR	8.03 ± 0.15	64.27 ± 1.75
RES+TSPP+IR	4.76 ± 0.25	6.49 ± 0.44
TSPP+IR+RES	5.85 ± 0.05	5.33 ± 0.41

Legenda: RES = *Resveratrol*; IR = iradiere (terapie fotodinamică); TSPP = 5,10,15,20-tetra-sulphonato-phenyl-porphyrin

Apoptoza

Apoptoza a fost evaluată prin testul TUNEL și cuantificată ca index apoptotic (tabel XV), care a fost exprimat procentual, raportând numărul de celule TUNEL- pozitive la numărul total de celule de pe fiecare secțiune.

Aspectele histopatologice ale secțiunilor tumorale și reprezentarea grafică a valorilor indexului apoptotic sunt prezentate în figura 24.

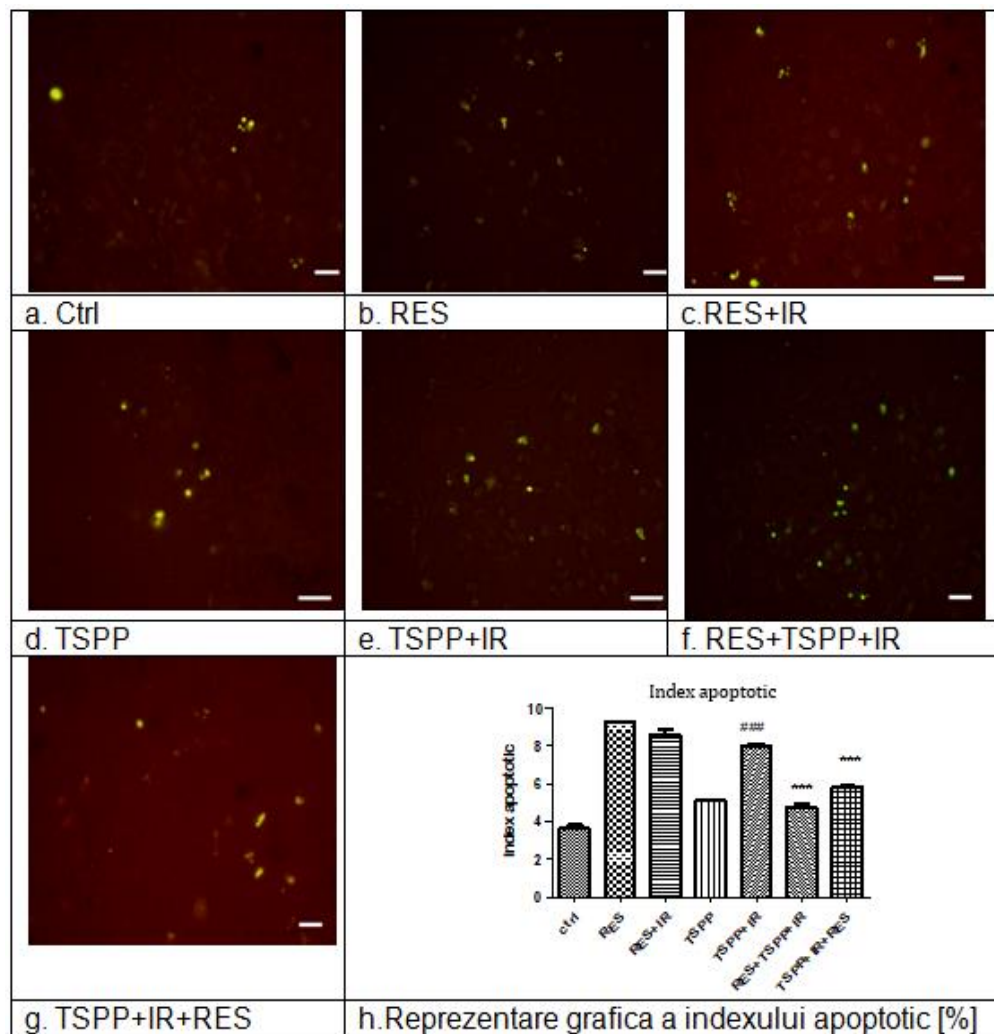


Fig. 24. Examinarea histopatologică a secțiunilor tumorale pentru evaluarea apoptozei în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor indexului apoptotic (h), exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001 comparativ cu grupul de control și ###p<0.001 comparativ cu grupul TSPP + IR (TFD)

Administrarea RES singur (lotul b) sau în combinație cu iradierea (lotul c) au determinat un nivel crescut de apoptoză comparativ cu lotul de control (a): $9.28 \pm 0.02\%$ respectiv $8.61 \pm 0.55\%$, versus $3.62 \pm 0.32\%$. La fel și terapia fotodinamică administrată singură (lotul e): 8.03 ± 0.15 vs. $3.62 \pm 0.32\%$ la control. În schimb, combinarea RES cu TFD nu a fost urmată de un efect aditiv sau sinergic, valorile indexului apoptotic pentru aceste asocieri (loturile f și g), chiar dacă mai mari decât ale controlului, fiind mai reduse decât pentru cele două terapii luate separat (tabel XV, figura 24 h).

Necroza

Necroza a fost evaluată histologic, prin colorație convențională cu hematoxilină-eozină (Figura 25) și calcularea unui index necrotic, exprimat în procente, pentru fiecare din loturile studiate (tabel XV).

Administrarea RES (grupul b) a indus următoarele efecte în structura tumorală: modificări nucleare (nuclei hipercromi, picnoza și carioliză fără infiltrat inflamator) și citoplasmatică (degenerare vacuolară). După administrarea RES asociat cu iradierea (lotul c) s-au identificat nuclei hipercromi. La lotul tratat cu TSPP + IR + RES (grupul g), examinarea histologică a descris prezența de nuclei picnotici, condensare nucleolară și rare arii necrotice. După administrarea RES înainte de TFD (grupul f) s-au identificat nuclei hipercromi și vacuolați, displazie nucleică, necroză frecventă și carioliză.

Gradul cel mai înalt de necroză s-a înregistrat în lotul supus TFD (lotul e), unde indexul necrotic a fost mult crescut atât comparativ cu controlul cât și cu grupurile ce au primit RES și RES + IR: $64.27 \pm 1.75\%$ comparativ cu $4.23 \pm 0.12\%$ la control ($p < 0.001$), $5.48 \pm 0.22\%$ la grupul cu RES și $5.36 \pm 0.74\%$ în grupul cu RES + IR (tabel XV, figura 25 h).

Asocierea RES la TFD, indiferent de secvențialitatea administrării, a determinat un grad de necroză mult redus comparativ cu TFD singură, la un nivel asemănător celui produs de RES și RES + IR (Tabel XV, Figura 25 h).

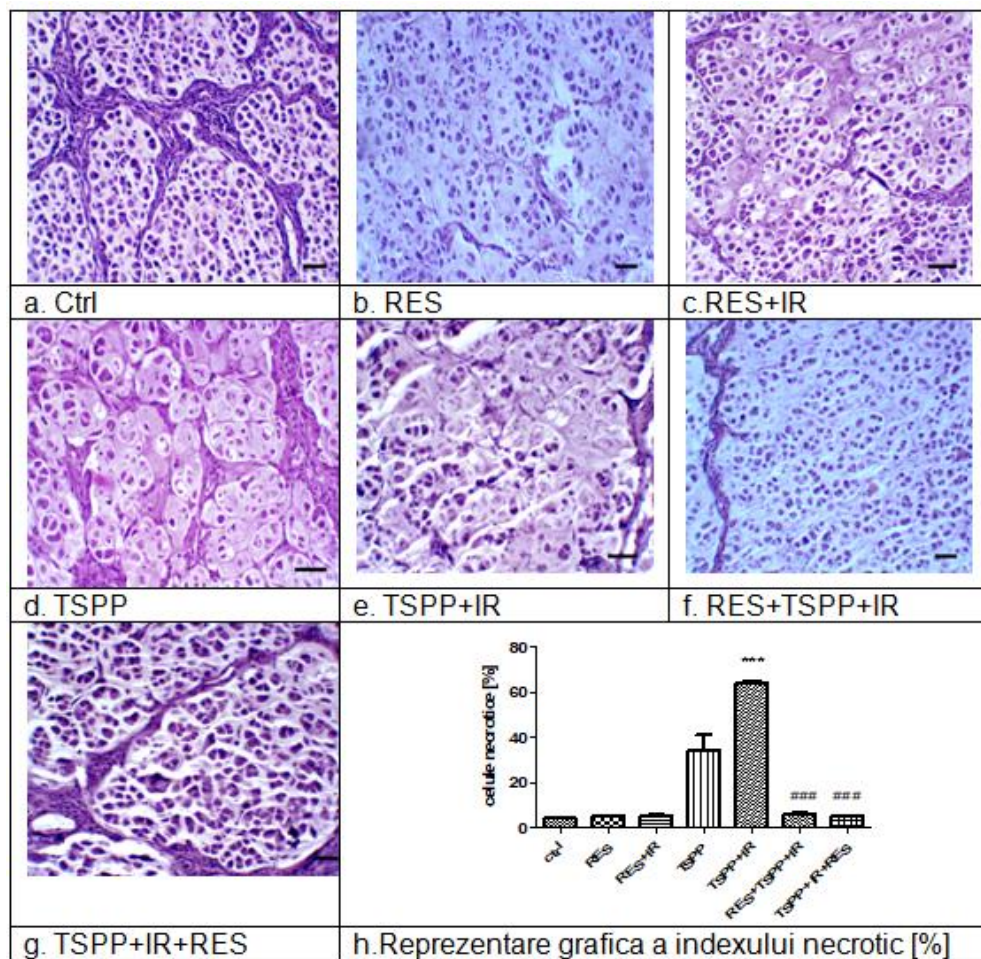


Fig. 25. Aspectul histopatologic al secțiunilor tumorale colorate cu HE pentru evaluarea necrozei în lotul de control (a) și cele experimentale (b-g), x200, scala 20μm. Reprezentarea grafică a valorilor indexului necrotic (h), exprimate ca medie ±SD. Analiza statistică s-a făcut cu one-way ANOVA, folosind posttestul Tukey's pentru comparații multiple ***p<0.001 comparativ cu grupul de control și # # #p<0.001 comparativ cu grupul TSP + IR (TFD)

5.5. Discuții

Terapia fotodinamică (TFD) este o metodă terapeutică utilizată pe scară tot mai largă în diverse patologii, inclusiv în cancer, în principal datorită avantajelor oferite de invazivitatea și toxicitatea reduse. În tratamentul tumorilor solide însă, indicațiile sunt limitate la un număr relativ scăzut de localizări tumorale datorită penetrației reduse în

profundzimea țesuturilor, selectivității scăzute și necesității existenței unui grad suficient de oxigenare tumorală^{13,79}.

Creșterea eficienței TFD și lărgirea spectrului său de indicații în cancer reprezintă o preocupare continuă și tot mai intensă, activitatea de cercetare în domeniu adresându-se identificării unor asocieri sau agenți cu efect potențator asupra TFD. Agenții fotosensibilizatori (FS) sunt o resursă logică și la îndemână, cu deosebire compușii naturali, derivați din plante. Selectarea lor ca și candidați la asocierea cu TFD este esențială pentru succesul terapiei, fiind necesar să îndeplinească anumite cerințe cum sunt: capacitatea de a iniția o reacție fotodinamică după iradiere cu anumite lungimi de undă, să fie ușor de identificat de către organism, să posede un grad de selectivitate pentru celulele tumorale și să nu prezinte efecte secundare fototoxice sau acestea să fie minime¹.

Un asemenea compus este *Resveratrolul* (RES), un polifenol produs de mai multe specii de plante și care posedă o varietate de proprietăți biologice studiate *in vitro* și *in vivo*⁴. Între funcțiile benefice ale acestui compus natural se înscrie și cea anticancerigenă, fiind utilizat de multă vreme în prevenția cancerului, datorită faptului că poate preveni apariția, dezvoltarea și progresia tumorii în cancerul colorectal, de prostată, hepatic și de sân⁶⁴.

În ce privește utilizarea sa în scop terapeutic în cancer, studiile sunt însă limitate, destul de puține, iar mecanismele moleculare încă incomplete clarificate⁵⁹. Aceasta se explică în mare măsură prin unele proprietăți specifice, care îi limitează aplicabilitatea: solubilitatea slabă în apă, fotosensibilitatea ridicată și stabilitatea oxidativă scăzută⁶⁴.

Cu toate acestea, am considerat oportun să evaluăm activitatea acestui compus în combinație cu TFD în tumorile solide experimentale *Walker*, pentru a aduce plus de informație în ce privește existența sau nu a capacității de potențare a TFD, modul optim de asociere cu această terapie din punct de vedere al cronologiei administrării, precum și descifrarea mecanismelor moleculare implicate.

Pentru a studia impactul RES asupra dezechilibrului redox indus de TFD au fost determinate malonaldehida (MDA) și raportul între glutationul redus (GSH) și cel oxidat (GSSG), în țesutul tumoral și în ser. Administrarea RES a diminuat producerea MDA, a crescut capacitatea antioxidantă și a redus inflamația în tumoră. Tipul de efect obținut este similar cu cel produs de alt agent natural fotosensibilizator (*curcumina*), și, la fel ca la aceasta, magnitudinea lui a fost crescută atunci când a fost administrat înainte de TFD, după cum arată un studiu anterior publicat de noi¹¹⁷. Nivelul redus al MDA seric și tumoral, în aceste grupuri, ca surogat a leziunilor induse de speciile reactive ale oxigenului asupra lipidelor membranei celulare, poate fi interpretat în contextul creșterii capacității antioxidante celulare, demonstrate și de nivelul GSH la loturile ce au primit terapii combinate (RES asociat cu TFD). Spre deosebire de rezultatele obținute pentru CUR și RES, un studiu anterior publicat de noi și care a investigat regimul combinat TFD și extract natural de *Cornus mas* a avut rezultate ușor

discordante: nivelul MDA în tumoră a fost de asemenea redus în cazul regimului combinat CM și TFD, dar, în ser, nivelul cel mai redus s-a obținut la administrarea extractului natural de corn după TFD¹¹⁸.

Efectul de modulare a inflamației tumorale a fost evaluat prin determinarea expresiei COX-2 și NOS2, prin colorații imunohistochemice pe secțiuni tumorale la parafină. Adiția RES la TFD a redus inflamația tumorală și expresia COX2 și NOS2, indiferent dacă a fost administrat înainte sau după TFD.

Efectul antitumoral al RES a fost studiat prin evaluarea histochimică a apoptozei și necrozei și calcularea indexului apoptotic și necrotic în țesutul tumoral. Indexul apoptotic a scăzut în tratamentul combinat TFD+RES. Alte studii au avut rezultate contrarii, arătând că RES a amplificat efectul TFD asupra proliferării și apoptozei celulare. Spre exemplu, RES asociat cu ALA-PDT a amplificat efectul PDT asupra apoptozei celulelor A431, iar expresia p-ERK, p53 și a caspazei-3 au crescut în urma terapiei combinate, sugerând un efect mediat de calea de semnalizare p38/MAPK¹¹⁹. Inclusiv studiile anterioare publicate de noi, ce au evaluat asocierea extractului natural de coarne, respectiv a *curcuminei*, cu TFD, au găsit o creștere a indicilor apoptotic și necrotic în țesutul tumoral^{117, 118}.

Efectul redus al RES asupra morții celulare poate fi explicat prin prisma unei noi perspective spațiale asupra speciilor reactive ale oxigenului, ROS¹²⁰: capacitatea antioxidantă intrinsecă crescută a celulelor tumorale anihilează leziunile ROS la distanță, în același timp permițând ROS să stimuleze proliferarea și supraviețuirea celulară. În acest context, antioxidanții din dietă pot forma o rezervă de antioxidanți cu acțiune la distanță, în timp ce nivelele locale tumorigenice ale ROS rămân relativ neschimbate. Acest model a fost raportat și într-un studiu efectuat pe același tip de celule tumorale ca și în cazul nostru (linii celulare de carcinosarcom *Walker* la șobolani), și în care silimarina administrată înainte de TFD a inhibat generarea de ROS și apoptoza⁹⁵.

Dacă efectul pro-apoptotic al RES nu este cu certitudine clarificat, efectul asupra morții celulare poate fi explicat și prin prisma unei interferențe cu autofagia, proces degradativ care reglează diferențierea celulară ajutând la combaterea deficitului de nutrienți și a stresului derivat din terapiile anticancer, un fenomen prezent și în cazul CUR. *Resveratrolul* și *curcumina* pot de asemenea perturba homeostazia reticulului endoplasmatic, activând RPN, proces strict interconectat cu autofagia⁵⁹. RPN are trei scopuri: restabilirea funcției normale a celulei prin stoparea translației proteinelor, activarea căilor de semnalizare implicate în plierea proteinelor și degradarea proteinelor pliate greșit. Dacă aceste obiective nu sunt atinse într-un anumit interval de timp, sau perturbarea reticulului endoplasmic este prelungită, RPN vizează apoptoza⁶⁶. Aceasta este o ipoteză recentă, iar dovezile sunt încă puține, fiind imperativ necesar a se continua cercetările pentru înțelegerea efectelor *resveratrolului* asupra ERS și a importanței acestui mecanism.

5.6. Concluzii

1. Administrarea RES a redus generarea de specii reactive de oxigen și a crescut capacitatea antioxidantă endogenă, mai ales în administrarea anterioară terapiei fotodinamice.
2. Adiția RES la TFD a redus inflamația tumorală și expresia COX2 și NOS2, indiferent dacă a fost administrat înainte sau după TFD.
3. Administrate separat, atât RES cât și TFD au indus un înalt nivel de apoptoză.
4. Combinarea RES cu TFD nu a fost urmată de creșterea indexului apoptotic, sugerând că alte mecanisme ar putea fi implicate în efectul antitumoral (interferența cu autofagia, perturbarea homeostaziei reticulului endoplasmic)

6. Concluzii generale

1. Terapia fotodinamică (TFD) a generat stres oxidativ, apărare antioxidantă endogenă redusă și răspuns inflamator în tumora Walker.
2. Extractul de *Cornus mas* a modulat dezechilibrul redox indus de TFD, a indus reacții inflamatorii, leziuni ADN și apoptoză în țesutul tumoral, efecte a căror intensitate a fost semnificativ mai mare în cazul administrării extractului anterior efectuării TFD.
3. *Curcumina* asociată TFD a exercitat efecte modulatorie asupra acestora de o manieră variabilă în funcție de tipul de efect și de secvențialitatea asocierii: a indus creșterea capacității antioxidante în tumoră atunci când a precedat TFD, a determinat creșterea semnificativă a apoptozei și necrozei în administrare ulterioară TFD și a indus scăderea stresului oxidativ și nitrosativ indiferent de cronologia administrării.
4. *Resveratrolul* administrat anterior TFD a redus stresul oxidativ și a crescut capacitatea antioxidantă endogenă. De asemenea, a diminuat inflamația tumorală dar acest efect a fost independent de secvențialitatea administrării. Combinarea sa cu TFD nu a determinat creșterea apoptozei, date ce pledează pentru efectul sau protector pentru celulele tumorale.
5. Administrarea de compuși naturali fotosensibilizatori (FS) asociat terapiei fotodinamice a modulat efectele acestora de o manieră și amploare specifice fiecărui agent FS.
6. Adiția agenților FS la TFD a dus la activarea unor mecanisme implicate în moartea celulară (leziuni ADN, apoptoză, inflamație), într-un mod specific fiecăruia dintre ei și cu o magnitudine variabilă în funcție de momentul administrării în raport cu TFD.
7. Rezultatele confirmă potențialul antitumoral al acestor compuși și efectul lor de potențare a terapiei fotodinamice, în special pentru *Cornus mas* și *Curcumină*, confirmând importanța lor ca adjuvanți în tratamentul tumorilor maligne. Rezultatele obținute oferă premise pentru inițierea și desfășurarea de studii și trialuri clinice care să investigheze eficiența și securitatea lor în cancer.
8. În regimul combinat, momentul administrării compușilor naturali FS în raport cu TFD este foarte important și reprezintă un punct cheie, în designul unui tratament antitumoral eficient.

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cancerul reprezintă o problemă importantă de sănătate publică în România și la nivel global, prin incidența crescută, gravitatea și prognosticul adesea nefavorabil. Modalitățile de tratament și agenții antitumorali utilizați sunt în continuă creștere și diversificare dar, în ciuda progreselor științifice, tehnologice și terapeutice, boala canceroasă continuă să aibă un prognostic infaust.

Pe de o parte unele tumori sunt refractare la tratamentele standard și alte opțiuni terapeutice, iar pe de altă parte invazivitatea multora dintre terapii face ca o parte importantă a supraviețuitorilor să prezinte sechele și o calitate a vieții scăzută. Identificarea de noi metode terapeutice în oncologie, eficiente și cu toxicitate redusă, este prin urmare o necesitate stringentă.

Cercetarea noastră se adresează unei metode neinvazive, terapia fotodinamică (TFD), care, în ultimele decenii și-a lărgit spectrul aplicațiilor clinice și în tumori maligne, datorită capacității de a induce distrucție tumorală. Eficiența ei în tumorile solide este însă limitată de anumite caracteristici specifice: grad redus de selectivitate tumorală, penetrație limitată în țesuturi, dependența de oxigen. Ca urmare, se impune identificarea unor modalități de optimizare a TFD. O direcție promițătoare în acest sens este utilizarea de compuși cu acțiune de fotosensibilizare a celulelor țintă, care să potențeze acțiunea TFD.

Teza de față prezintă rezultatele studiilor ce au evaluat asocierea a 3 compuși naturali, administrați în diferite secvențialități, cu terapia fotodinamică în tumorile experimentale *Walker*.

Originalitatea tezei constă în abordarea complexă a acestor asocieri. Dincolo de identificarea unui posibil efect aditiv sau sinergic al asocierii, am investigat multiple mecanisme de acțiune și molecule implicate în acestea, ca și modalitatea optimă de asociere din punct de vedere al dozelor și secvențialității. În cazul unora dintre acești compuși (cum este spre exemplu *Cornus mas* investigat de noi), pentru care există un număr redus de studii în patologia malignă și mecanismele moleculare de acțiune sunt încă neclarificate, descifrarea lor ar face posibilă combinarea judicioasă cu TFD. De asemenea, din cunoștințele noastre, datele privind importanța factorului timp, respectiv identificarea momentului optim de administrare a FS în raport cu TFD, sunt extrem de sărace și sunt puține studii care să investigheze din punct de vedere metronomic eficiența asocierilor. Studiul reprezintă astfel un pas înainte în

identificarea beneficiului real și a modalității optime de administrare a acestei terapii combinate în tumori solide.

Rezultatele obținute își găsesc utilitate atât științifică cât și practică, prin furnizarea de informații privind particularitățile modului de acțiune – interacțiune a agenților studiați cu TFD, precum și prin exploatarea datelor pentru elaborarea în continuare a unor trialuri clinice de calitate în diferite localizări tumorale. Ca finalitate, translația în clinică va lărgi spectrul modalităților de tratament într-o boală atât de gravă și frecventă cum este cancerul, pentru situațiile și la pacienții cu indicații pentru acest tip de terapie. Având marele avantaj al absenței sau lipsei de toxicitate, TFD asociată cu administrarea de agenți naturali se înscrie în arsenalul de măsuri ce cu siguranță pot ameliora raportul terapeutic: distrucție tumorală maximă, cu toxicitate minimă la nivelul țesuturilor sănătoase.

Dincolo de impactul științific și clinic, această terapie, aplicată în situațiile în care își găsește indicație, va avea și un impact economic și social important, datorită costurilor scăzute în raport cu alte modalități terapeutice în oncologie și datorită prezervării unei bune calități a vieții pacienților, prin lipsa efectelor adverse.

REFERINȚE

1. Muniyandi K, George B, Parimelazhagan T, Abrahamse H. Role of Photoactive Phyto-compounds in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* 2020;25: 4102.
2. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>
3. dos Santos AF, de Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat* 2019;5:25.
4. Micale N, Molonia MS, Citarella A, Cimino F, Saija A, Cristani M, Speciale A. Natural Product-Based Hybrids as Potential Candidates for the Treatment of Cancer: Focus on Curcumin and Resveratrol. *Molecules* 2021;26:4665.
5. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* 2021;13: 1332.
6. Shi H, Sadler PJ, How promising is phototherapy for cancer? *British Journal of Cancer* 2020;123:871–873
7. Foresto E, Gilardi P, Ibarra L, SOI Cagno I. Light-activated green drugs: How we can use them in Photodynamic therapy and mass-produce them with biotechnological tools, *Phytomedicine Plus* 2021;1:100044
8. Kelly J, Snell M, Berenbaum M. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1975;31: 237–244
9. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer – A Review of the Current Clinical Status. *Front. Chem.* 2021;9:686303.
10. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978;38: 2628–2635.
11. McCaughan JS Jr, Hicks W, Laufman L, May E, Roach R. Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. *Cancer*. 1984;54(12):2905-10..
12. Zhang ZJ, Wang KP, Mo JG, Xiong L, Wen Y. Photodynamic therapy regulates fate of cancer stem cells through reactive oxygen species. *World J Stem Cells*. 2020;12(7):562-584.
13. Niculescu AG, Grumezescu AM. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Appl. Sci.* 2021; 11: 3626.
14. Broekgaarden M, Weijer R, van Gulik TM, et al. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev* 2015;34:643–690

15. Aniago EC, George BP, Abrahamse H. Molecular Effectors of Photodynamic Therapy-Mediated Resistance to Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13182
16. Kim MM, Darafsheh A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology.* 2020;96(2):280-294.
17. Mordon S, Thécu E, Ziane L, et al. Light emitting fabrics for photodynamic therapy: Technology, experimental and clinical applications. *Translational Biophotonics.* 2020; 2:e202000005.
18. Dąbrowski JM. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: Mechanisms of their generation and potentiation. *Adv. Inorg. Chem.* 2017; 70: 343–394
19. Siewert B, Stuppner H. The photoactivity of natural products - An overlooked potential of phytomedicines? *Phytomedicine.* 2019;60:152985.
20. Ming L, Cheng K, Chen Y, Yang R, Chen D. Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. *Cancer Med.* 2021;10(1):257-268.
21. Wang W, Moriyama LT, Bagnato VS. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. *Lasers Phys. Lett.* 2013 ;10(2): 10 023001
22. Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract.* 2015;24 (Suppl 1):14-28.
23. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy - Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem.* 2021;9:691697.
24. Dolmans DEJGJ; Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 380–387
25. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6 : 535–545
26. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin. Endosc.* 2013, 46, (1): 24-29
27. Kousis PC, Henderson BW, Maier PG, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Res.* 2007;67:10501–10510
28. Beltrán Hernández, I, Yu Y, Ossendorp F, Korbelik M, Oliveira S. Preclinical and Clinical Evidence of Immune Responses Triggered in Oncologic Photodynamic Therapy: Clinical Recommendations. *J. Clin. Med.* 2020; 9: 333.
29. Falk-Mahapatra R, Gollnick SO. Photodynamic Therapy and Immunity: An Update; *Photochemistry and Photobiology,* 2020; 96: 550–559
30. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):5-17.
31. Kessel D, Oleinick NL. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol,* 2018;94: 213-218.
32. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Research.* 2001;21(6B):4271-4277.
33. Wachowska M, Muchowicz A, Demkow U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(4):481-5..

34. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 2016; 473:347–364
35. Simões JCS, Sarpaki S, Papadimitroulas P, Therrien B, Loudos, G. Conjugated photosensitizers for imaging and PDT in cancer research. *J. Med. Chem.* 2020; 63: 14119–14150.
36. Hofmann GA, Weber B. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, potential mechanisms and clinical consequences. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2021;19(1):19-29.
37. Mansoori B, Mohammadi A, Amin Doustvandi M, Mohammadnejad F, Kamari F, Gjerstorff MF, Baradaran B, Hamblin MR. Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:395-404.
38. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez, F, et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008;10:148–154
39. Afrasiabi S, Partoazar A, Chiniforush N, Goudarzi R. The Potential Application of Natural Photosensitizers Used in Antimicrobial Photodynamic Therapy against Oral Infections. *Pharmaceuticals* 2022; 15: 767.
40. Barani M, Sabir F, Rahdar A, Arshad R, Kyzas GZ. Nanotreatment and Nanodiagnosis of Prostate Cancer: Recent Updates. *Nanomaterials* 2020; 10 :1696.
41. Dascalu LM, Moldovan M, Sarosi C, et al. Photodynamic Therapy with Natural Photosensitizers in the Management of Periodontal Disease Induced in Rats. *Gels* 2022; 8: 134.
42. Mansoori B, Mohammadi A, Amin Doustvandi M, Mohammadnejad F, Kamari F, Gjerstorff MF, Baradaran B, Hamblin MR, Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:395-404.
43. Cramer SW, Chen CC. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. *Frontiers in surgery*, 2020;6: 81.
44. Cháirez-Ramírez MH, de la Cruz-López KG, García-Carrancá A. Polyphenols as Antitumor Agents Targeting Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways. *Front. Pharmacol.* 2021;12:710304.
45. Singla RK, Dubey AK, Arung G, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures, *Journal of AOAC International* 2019 ;102(5): 1397–1400
46. Nardo L, Andreoni A, Másson M, Haukvik T, Tønnesen HH. Studies on Curcumin and Curcuminoids. XXXIX. Photophysical Properties of Bisdemethoxycurcumin. *J. Fluoresc.* 2010; 21: 627–635
47. Nardo L, Andreoni A, Bondani M, Másson M, Haukvik T, Tønnesen HH. Studies on Curcumin and Curcuminoids. XLVI. Photophysical Properties of Dimethoxycurcumin and Bis-dehydroxycurcumin. *J. Fluoresc.* 2011; 22: 597–608
48. <https://ro.wikipedia.org/wiki/Curcumin%C4%83>
49. Ojo OA, Adeyemo TR, Rotimi D, Batiha GE-S, Mostafa-Hedeab G, Iyobhebhe ME, Elebiyo TC, Atunwa B, Ojo AB, Lima CMG and Conte Junior CA. Anticancer Properties of Curcumin Against Colorectal Cancer: A Review. *Front. Oncol.* 2022;12: 881641.

50. Hui-Tien L, Yuan-Soon H. Anticancer effect of curcumin on breast cancer and stem cells ; Food Science and Human Wellness 2018;7: 134–137
51. Mansouri K, Rasoulpoor S, Daneshkhah A, et al. Clinical effects of curcumin in enhancing cancer therapy: A systematic review. BMC Cancer 2020; 20; 791
52. Melessa Salem, Sohrab Rohanib Elizabeth R. Gillies. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties , bioactivity and approaches to cancer cell delivery; RSC Adv., 2014;, 4: 10815
53. Song X, Zhang M, Dai E and Luo Y: Molecular targets of curcumin in breast cancer (Review). Mol Med Rep 2019; 19: 23-29,
54. Deng H, Wan M, Li H, Chen Q, Li R, Liang B, Zhu H. Curcumin protection against ultraviolet-induced photo-damage in Hacat cells by regulating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. Bioengineered. 2021; 12(2): 9993-10006 810050.
55. Kang Shun-AI, Guo Cai-xia, Wang Zhi-Cheng,. Protective effect of curcumin on damage of HaCaT cells irradiated with UVB[J]. Chinese Journal of Public Health, 2009; 25(4): 422-423.
56. Li Y, Sun W, Han N, et al. Curcumin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis of retinoblastoma cell lines through modulation of miR-99a and JAK/STAT pathway. BMC Cancer 2018; 18: 1230
57. Chan WH, Wu CC, Yu JS. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. J Cell Biochem. 2003; 90(2): 327-38.
58. Wu M-F, Huang Y-H, Chiu, L-Y, Cherng S-H, Sheu G-T, Yang T-Y. Curcumin Induces Apoptosis of Chemoresistant Lung Cancer Cells via ROS-Regulated p38 MAPK Phosphorylation. Int. J. Mol. Sci. 2022;, 23: 8248.
59. Arena A, Romeo MA, Benedetti R, Masuelli L, Bei R, Gilardini Montani MS, Cirone M. New Insights into Curcumin- and Resveratrol-Mediated Anti-Cancer Effects. Pharmaceuticals (Basel). 2021; 14(11): 1068.
60. Xiao Q, Zhu W, Feng W, Lee SS, Leung, AW, Shen J, Gao L, Xu C. A Review of Resveratrol as a Potent Chemoprotective and Synergistic Agent in Cancer Chemotherapy. Frontiers in pharmacology, 2019; 9: 1534.
61. <https://ro.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
62. Wen S, Zhang J, Yang B., Elias PM, Man MQ. Role of Resveratrol in Regulating Cutaneous Functions. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2020, 24: 16837.
63. Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniienė J: Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. Medicina 2016; 52 (3): 148-155.
64. Arabzadeh A, Mortezaazadeh T, Aryafar T, Gharepapagh E, Majdaeen M, Farhood B. Therapeutic potentials of resveratrol in combination with radiotherapy and chemotherapy during glioblastoma treatment: a mechanistic review. Cancer Cell Int. 2021; 21(1): 391.
65. Mineda A, Nishimura M, Kagawa T, Takiguchi E, Kawakita T, Abe A and Irahara M. Resveratrol suppresses proliferation and induces apoptosis of uterine sarcoma cells by inhibiting the Wnt signaling pathway. Experimental and therapeutic medicine 2019; 17(3): 2242–2246.

66. Ahmadi A, Hayes AW, Karimi G. Resveratrol and endoplasmic reticulum stress: A review of the potential protective mechanisms of the polyphenol. *Phytotherapy Research* 2021;35(10): 5564– 5583.
67. Nawrot K, Polak-Szczybyło E, Stępień AE. Characteristics of the health-promoting properties of *Cornus mas*. *Eur J Clin Exp Med*. 2022;20(2):217–223
68. Skender A, Hadžibulić S, Ercisli S, Hasanbegović J, Dedić S, Almeer R, Sayed AA, Ullah R, Assouguem A. Morphological and Biochemical Properties in Fruits of Naturally Grown Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Genotypes in Northwest Bosnia and Herzegovina. *Sustainability* 2022; 14: 4579.
69. Lewandowski Ł, Bednarz-Misa I, Kucharska AZ, Kubiak A, Kasprzyk P, Sozański T, Przybylska D, Piórecki N, Krzystek-Korpacka M. Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Extracts Exert Cytotoxicity in Two Selected Melanoma Cell Lines - A Factorial Analysis of Time-Dependent Alterations in Values Obtained with SRB and MTT Assays. *Molecules*. 2022;27(13):4193.
70. Hosseini FS, Noroozi Karimabad M, Hajizadeh MR, Khoshdel A, Khanamani Falahati-Pour S, Mirzaei MR, Mirmohamadi SM, Mahmoodi M. Evaluating of Induction of Apoptosis by *Cornus mas* L. Extract in the Gastric Carcinoma Cell Line (AGS). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(1):123-130.
71. Radbeh Z, Asefi N, Hamishehka, H, Roufegarinejad L, Pezeshki A. Novel carrier sensuring enhanced anti-cancer activity of *Cornus mas* (cornelian cherry) bioactive compounds, *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2020;125: 109906
72. Perde-Schrepler M, David L, Olenic L, Potara M, Fischer-Fodor E, Virag P, Imre-Lucaci F, Brie I, Florea A. Gold Nanoparticles Synthesized with a Polyphenols-Rich Extract from Cornelian Cherry (*Cornus mas*) Fruits: Effects on Human Skin Cells, *Journal of Nanomaterials* 2016:6986370
73. Hosseinpour-Jaghdani F, Shomali T, Gholipour-Shahraki S, Rahimi-Madiseh M, Rafieian-Kopaei M. *Cornus mas*: a review on traditional uses and pharmacological properties. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*. 2017;14
74. Tiptiri-Kourpeti A, Fitsiou E, Spyridopoulou K, Vasileiadis S, Iliopoulos C, Galanis A, Vekiari S, Pappa A, Chlichlia K. Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Properties of *Cornus mas* L. Fruit Juice. *Antioxidants* 2019; 8: 377.
75. Yousefi B, Abasi M, Abbasi MM, Jahanban-Esfahlan R. (). Anti-Proliferative Properties of *Cornus mas* Fruit in Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. *APJCP* 2015;16(14): 5727–5731.
76. Szczepaniak O, Ligaj M, Stuper-Szablewska K, Kobus-Cisowska J. Genoprotective effect of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) phytochemicals, electrochemical and ab initio interaction study. *Biomedicine&pharmacotherapy*, 2022;152 :113216.
77. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1098-1107.

78. Tampa M, Sarbu MI, Matei C, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, Constantin C, Neagu M, Georgescu SR. Photodynamic therapy: A hot topic in dermato-oncology. *Oncol Lett.* 2019;17(5):4085-4093.
79. Wan MT, Lin JY. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:145-63.
80. Bonnett R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy Gordon and Breach Science, Amsterdam, 2000.
81. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update *CA Cancer J. Clin.* 2011; 61(4):250–281.
82. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment *Lancet Oncol.* 2004; 5(8):497–508
83. Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malonaldehyde, *Clin. Chem.* 1991;37: 1273–1275.
84. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma *Methods Enzymol.* 1994; 233:380-5.
85. Popescu T, Nenu I, Aldea MD, et al. The effect of TSPP-mediated photodynamic therapy and Parecoxib in experimental tumours, *Life Sci.* 2014;117:75–83.
86. Singleton VR, Orthofer R, Lamuela-Raventos M, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 1999;299:152–178.
87. Giusti MM, Wrolstad RE. UNIT F1.2 Characterization and measurement of an thocyanins by UV-Visible spectroscopy, *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 2001
88. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* 2001;73:239–244.
89. Baldea GE, Costin Y, Shellmann K, et al. Biphasic pro-melanogenic and pro-apop- totic effects of all-trans-retinoic acid (ATRA) on human melanocytes: time-course study, *J. Dermatol. Sci.* 2013;72:168–176.
90. Raish M, Husain SZA, Bae SM, Han SJ, Park CH, Shin JC, Ahn WS. Photodynamic therapy in combination with green tea polyphenol EGCG enhances antitumor efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells, *J.Appl. Res.* 2010;10:58–67.
91. Nenu I, Popescu T, Aldea MD, Craciun L, Olteanu D, et al, Metformin associated with photodynamic therapy—a novel oncological direction, *J. Photochem. Photobiol. B* 5 2014; 138:80–91.
92. Mun ST, Bae DH, Ahn WS., Epigallocatechin gallate with photodynamic therapy enhances anti-tumor effects in vivo and in vitro, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2014;11:141–147
93. Popovic BM, Stajner D, Slavko K, Sandra B, Antioxidant capacity of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) – comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods, *Food Chem.* 2012;134:734–741.
94. David L, Moldovan B. Extraction, characterization and potential health benefits of bioactive compounds from selected *Cornus* fruits, in: J.P. Owen (Ed.), *Fruits and Pomace Extracts: Biological Activity, Potential Applications and Beneficial Health Effects*, 2015:157–188.

95. Dionisie V, Clichici S, Ion RM, Danila OO, et al. In vivo silymarin's antioxidant and anti-apoptotic effects on photodynamic therapy's responsiveness, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2017;21:1–9.
96. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:145–182.
97. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, et al. Adenoma prevention with Celecoxib (APC) study investigators, Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention, *N. Engl. J. Med.* 2005;352:1071–1080.
98. Song J, Wei Y, Chen Q, Xing D. Cyclooxygenase 2-mediated apoptotic and inflammatory responses in photodynamic therapy treated breast adenocarcinoma cells and xenografts, *J of Photochem Photobiol, B, Biology* 2014;134:27–36.
99. Mao Y, Wang L, Xu C, Han S. Effect of photodynamic therapy combined with Celecoxib on expression of cyclooxygenase-2 protein in HeLa cells, *Oncol. Lett.* 2018;15: 6599–6603.
100. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells, *Trends Immunol.* 2009;30:531A–537A.
101. Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity, *Cancer Cell Int.* 2015;5:15 106.
102. Ferrario M, Luna N, Rucker S, Wong CJ. Gomer, Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness, *Lasers Surg. Med.* 2011;43:644–650.
103. Ellerkamp V, Bortel N, Schmid E, Kirchner B, Armeanu-Ebinger S, Fuchs J. Photodynamic therapy potentiates the effects of curcumin on pediatric epithelial liver tumor cells, *Anticancer Res.* 2016;36:3363–3372.
104. Ahn JC, Kang JW, Shin JI, Chung PS. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMCHN3 cells, *Int. J. Oncol.* 2012;41:2184–2190.
105. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA doublestrand break repair: strengths, limitations and optimization, *Cell Cycle* 2010;9:662–669.
106. Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. Use of the γ H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research, *Cancer Lett.* 2012;327:123–133.
107. Cucinotta FA, Pluth JM, Anderson JA, Harper JV, O'Neill P. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining, *Radiat. Res.* 169 2008; 214–222.
108. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:96–101.
109. Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-treated human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells. *Oral Dis.* 2005;11:236–242.

110. Khorsandi K, Chamani E, Hosseinzadeh G, Hosseinzadeh R. Comparative study of photo-dynamic activity of methylene blue in the presence of salicylic acid and curcumin phenolic compounds on human breast cancer. *Lasers Med Sci.* 2019;34:239-246.
111. Kumari A, Tyagi N, Dash D, Singh B. Intranasal curcumin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation.* 2015;38:1103-1112.
112. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 2012;4:1247-1253.
113. Korbelik M, Parkins CS, Shibuya H, Cecic I, Startford MR, Chaplin DJ. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 2000;82:1835-1843
114. Moustapha A, Pérétout PA, Rainey NE, Sureau F, Geze M, Petit JM, et al. Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. *Cell Death Discov.* 2015;1:15017.
115. Singh M, Singh N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2009;325:107-119
116. Ahn JC, Kang JW, Shin JI, Chung PS. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. *Int J Oncol.* 2012;41:2184-2190
117. Laszló IP, Laszló MR, Popescu T, Toma V, Ion RM, Moldovan R, Filip GA, Cainap C, Clichici S, Muresan A. The comparative effects of Resveratrol and Curcumin in combination with photodynamic therapy. *Med Pharm Rep.* 2022 Apr;95(2):165-178. doi: 10.15386/mpr-2497. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35721041; PMCID: PMC9176312.
118. Laszló IP, Laszló MR, Toma V, Baldea I, Olteanu D, David L, Moldovan B, Ion RM, Moldovan R, Filip GA, Kacso G, Cainap C, Clichici S, Muresan A. The in vivo modulatory effects of Cornus mas extract on photodynamic therapy in experimental tumors. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Jun;30:101656. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101656. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31926344.
119. Zhang X, Liu X, Kang S, Liu C, Hao Y. Resveratrol enhances the effects of ALA-PDT on skin squamous cells A431 through p38/ MAPK signaling pathway. *Cancer Biomark.* 2018;21:797-803
120. Chandel NS, Tuveson DA. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *N Engl J Med.* 2014;371:177-178