

Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” - Timișoara
Departamentul III Științe Funcționale - Fiziopatologie



CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTELE *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* ALE UNUI DERIVAT DE ACID MASLINIC

REZUMAT

Doctorand: PAVEL M. IOANA ZINUCA

Coordonatori științifici:

Prof. Dr. Danina M. MUNTEAN

Prof. Dr. René CSUK

Timișoara, 2017

CUPRINS

Lista articolelor publicate.....	VIII
Lista abrevierilor.....	IX
Indexul figurilor.....	XII
Indexul tabelelor.....	XVII
Mulumiri	XIX
INTRODUCERE	XXI

PARTEA GENERALĂ

1. Cancerul cutanat	1
1.1. Incidență și mortalitate.....	1
1.2. Factori de risc.....	1
1.3. Carcinomul bazocelular	3
1.4. Carcinomul celular scuamos.....	3
1.5. Melanomul malign	4
2. Mitocondriile	5
2.1. Mitocondriile în celulele normale vs. celulele tumorale	5
2.2. Efectul Warburg.....	5
2.3. Rolul speciilor reactive de oxigen în cancer.....	6
2.4. Apoptoza mediată de mitocondrii în celulele tumorale	7
3. Strategii de tratament	9
3.1. Terapiile clasice utilizate în cancer	9
3.2. Rolul SRO în terapia antitumorală	9
3.3. Triterpene pentaciclice - acidul maslinic	10
3.3.1. Proprietățile anti-cancerigene și mecanismele ce stau la baza acestora	11
3.3.2. Activitățile antioxidantă și cardioprotectoare ale acidului maslinic	14
3.3.3. Efectele antimicrobiene ale acidului maslinic	16
3.4. Rolul zincului la nivel cutanat.....	17

PARTEA SPECIALĂ

Studiul 1: Caracterizarea fizico-chimică a derivatului de benzilamidă al acidului

maslinic	18
1.1. Scopul studiului	18
1.2. Motivația studiului	18
1.3. Materiale și metode	19
1.3.1. Reactivi și produse chimice	19
1.3.2. Sinteza chimică a EM2	19
1.3.3. Microscopie electronică de transmisie (TEM).....	20
1.3.4. Microscopie electronică de scanare (SEM) și analiza elementală prin difracție de raze x cu energie dispersivă (EDAX).....	20
1.3.5. Analiza termogravimetrică (TG) și cea calorimetrică cu scanare diferențială (DSC)	20
1.3.6. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	20
1.3.7. Spectroscopie de absorbție RAMAN (FT-RAMAN)	20
1.4. Rezultate și discuții.....	21
1.4.1. Analiza TEM a EM2	21
1.4.2. Analiza SEM a EM2.....	22
1.4.3. Analiza EDAX a EM2.....	22
1.4.4. Analiza TG-DSC a EM2.....	23

1.4.5. Analiza FITR a EM2.....	24
1.4.6. Spectrul FT-RAMAN a EM2.....	25
1.5. Concluzii.....	26
Studiul 2: Evaluarea capacității antioxidante a compusului EM2 si a zincului.....	27
2.1. Scopul studiului.....	27
2.2. Motivația studiului.....	27
2.3. Materiale și metode.....	28
2.3.1. Reactivi și produse chimice.....	28
2.3.2. Radicali de stress oxidativ prin metoda DPPH.....	28
2.3.3. Analiza statistică.....	29
2.4. Rezultate.....	29
2.4.1. Activitatea antioxidantă a EM2 si clorurii de zinc.....	29
2.5. Discuții.....	32
2.6. Concluzii.....	33
Studiul 3: Evaluarea activității antimicrobiene și antifungice a compusului EM2 și a zincului.....	34
3.1. Scopul studiului.....	34
3.2. Motivația studiului.....	34
3.3. Materiale și metode.....	35
3.3.1. Reactivi și produse chimice.....	35
3.3.2. Metoda de difuziune în agar.....	35
3.3.3. Analiza statistică.....	36
3.4. Rezultate.....	36
3.4.1. Evaluarea proprietăților antimicrobiene și antifungice ale EM2.....	36
3.5. Discuții.....	38
3.6. Concluzii.....	39
Studiul 4: Evaluarea activității antiproliferative și citotoxice a compusului EM2 și a zincului.....	40
4.1. Scopul studiului.....	40
4.2. Motivația studiului.....	40
4.3. Materiale și metode.....	41
4.3.1. Reactivi și produse chimice.....	41
4.3.2. Cultivarea liniilor celulare.....	41
4.3.3. Testul MTT.....	43
4.3.4. Testul de proliferare celulară.....	44
4.3.5. Analiza statistică.....	44
4.4. Rezultate.....	44
4.4.1. Caracterizarea proprietăților citotoxice ale EM2 și zincului.....	44
4.4.2. Evaluarea efectelor antiproliferative ale EM2 asupra celulelor tumorale și asupra keratinocitelor umane.....	52
4.5. Discuții.....	56
4.6. Concluzii.....	57
Studiul 5: Evaluarea efectelor antiangiogenice ale compusului EM2 la nivelul membranei corioalantoide.....	58
5.1. Scopul studiului.....	58
5.2. Motivația studiului.....	58
5.3. Materiale și metode.....	59

5.3.1. Reactivi și produse chimice	59
5.3.2. Testul membranei corioalantoide (CAM).....	59
5.4. Rezultate	60
5.4.1. Efectele EM2 pe CAM normală.....	60
5.4.2. Efectele EM2 pe CAM tumorală - model experimental de melanom cu celule SK-MEL-2	61
5.5. Discuții	63
5.6. Concluzii.....	63
Studiul 6: Metoda de dozare simultană a EM2 și a metabolitului său din sânge de șobolan prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă	64
6.1. Scopul studiului	64
6.2. Motivația studiului	64
6.3. Materiale și metode	65
6.3.1. Reactivi și produse chimice	65
6.3.2. Echipament	65
6.3.3. Cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă	65
6.3.4. Soluții standard	65
6.3.5. Prepararea probelor.....	66
6.3.6. Validarea metodei.....	66
6.3.7. Aplicarea metodei	67
6.4. Rezultate	68
6.4.1. Metoda analitică	68
6.5. Discuții	72
6.6. Concluzii.....	73
Studiul 7: Evaluarea proprietăților compusului EM2 pe un model experimental de inflamație sistemică acută	75
7.1. Scopul studiului	75
7.2. Motivația studiului	75
7.3. Materiale și metode	75
7.3.1. Reactivi și produse chimice	75
7.3.2. Modelul experimental de inflamație acută indus prin administrare de terebentină	75
7.3.3. Evaluarea stresului oxidativ	76
7.3.4. Analiza statistică	77
7.4. Rezultate	78
7.4.1. Caracterizarea efectului antioxidant al derivatului de acid maslinic pe un model experimental de inflamație acută.....	78
7.4.1.1. Evaluarea stresului oxidativ	78
7.5. Discuții	82
7.6. Concluzii.....	83
Studiul 8: Evaluarea efectelor compusului EM2 și ale zincului pe un model experimental de inflamație acută locală	84
8.1. Scopul studiului	84
8.2. Motivația studiului	84
8.3. Materiale și metode	84
8.3.1. Reactivi și produse chimice	84
8.3.2. Prepararea formulărilor cu EM2 și zinc	85
8.3.3. Modelul experimental de inflamație acută indus prin aplicare de TPA.....	85

8.3.4. Evaluarea histopatologică.....	86
8.4. Rezultate.....	87
8.4.1. Eficacitatea aplicării topice a formulărilor cu EM2 și ZnCl ₂	87
8.4.2. Aspectul histopatologic al leziunilor	89
8.5. Discuții	92
8.6. Concluzii.....	93
Studiul 9: Determinarea efectelor compusului EM2 pe modele experimentale de carcinom cutanat indus chimic/fotochimic și la nivelul mitocondriilor hepatice.....	94
9.1. Scopul studiului	94
9.2. Motivația studiului.....	94
9.3. Materiale și metode	95
9.3.1. Reactivi și produse chimice	95
9.3.2. Animale	95
9.3.3. Prepararea hidrogelului cu EM2.....	95
9.3.4. Modelele experimentale de carcinom cutanat induse chimic/fotochimic.....	96
9.3.5. Studii de respirație mitocondrială	97
9.3.6. Evaluarea producției de peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂).....	99
9.3.7. Analiza statistică	99
9.4. Rezultate	99
9.4.1. Modele experimentale	99
9.4.2. Studii de respirometrie.....	101
9.4.3. Evaluarea producției de peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂).....	108
9.5. Discutii	109
9.6. Concluzii.....	111
CONCLUZII FINALE.....	112
REFERINȚE	115
ANEXE	I
ANNEXA I. Scratch assay	I
ANNEXA II. Articole publicate	XV

1. INTRODUCERE

Cancerul reprezintă o cauză majoră de deces la nivel global și se estimează ca numărul cazurilor va înregistra o creștere alarmantă în următorul deceniu.

Cancerul cutanat reprezintă unul dintre cele mai frecvente tipuri de cancer diagnosticate la rasa caucaziană. Clasificarea generală cuprinde două forme majore, cancerul de tip non-melanom și cel de tip melanom. Din punct de vedere anatomo-patologic, cele mai frecvente sunt carcinomul scuamocelular (SCC) și bazocelular (BCC), urmate apoi de melanom, acesta din urmă fiind asociat cu cea mai mare rată de mortalitate. Unul dintre factorii de risc cei mai importanți în dezvoltarea cancerului cutanat este reprezentat de expunerea la radiații ultraviolete B (UVB).

Tratamentul standard pentru pacienții cu cancer (chirurgie, chimio- și radioterapie) conduce la efecte secundare care afectează în grade variabile calitatea vieții acestora. Fitoterapia reprezintă o alternativă terapeutică suport, intens studiată la ora actuală, în vederea caracterizării cât mai complexe a efectelor celulare și subcelulare ale constituenților fitochimici.

Dintre acestea, uleiul de măsline și derivații săi au fost studiați sistematic deoarece reprezintă o sursă bogată de compuși fitochimici cu numeroase efecte terapeutice. În ultimii ani, acidul maslinic a beneficiat de o atenție deosebită, acesta fiind o triterpenă pentaciclică, care se găsește în principal în specia *Olea europaea* L.

Acidul maslinic este cunoscut pentru o multitudine de proprietăți terapeutice: antiinflamatorie, antidiabetică, antioxidantă, antibacteriană, antiparazitară, anti-HIV, precum și cardio- și neuroprotectoare. Mai mult, compusul exercită o importantă activitate antitumorală prin mecanisme complexe, incomplet elucidate. Astfel, efectul antitumoral al acidului maslinic a fost raportat la nivel experimental în cazul a numeroase tipuri de cancer, incluzând carcinomul colorectal, al vezicii urinare, a pancreasului, ficatului, esofagului, plămânului, prostatei și astrocitomului glandelor salivare, precum și pe linii celulare de melanom.

Efectul anticancerigen și chemopreventiv al acidului maslinic implică cel puțin 3 activități dovedite și anume pro-apoptotică, anti-proliferativă și antiangiogenică.

Recent, comunitatea științifică și-a îndreptat atenția asupra derivaților acidului maslinic pentru proprietățile lor antitumorale deoarece unii dintre ei s-au dovedit a avea proprietăți anticancerigene superioare compusului de origine. Derivatizarea este o tehnică utilizată pentru obținerea de noi compuși cu spectru de activitate îmbunătățit.

2. SCOPUL CERCETĂRII

Scopul prezentei lucrări a constat în caracterizarea complexă și evaluarea efectelor unui derivat de benzilamidă al acidului maslinic (Benzil (2 α , 3 β) 2,3-diacetoxi-olean-12-en-28-amidă) sintetizat în laboratorul Prof. Dr. René Csuk (Halle, Germania) și notat în continuare „EM2”, pe diferite modele experimentale *in vitro* și *in vivo*.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

1. Caracterizarea morfologiei și ultrastructurii compusului EM2 (Benzil (2 α , 3 β) 2,3-diacetoxi-olean-12-en-28-amidă) și evaluarea proprietăților *in vitro* a compusului EM2 (efect antioxidantă, antimicrobian, studii de citotoxicitate și anti-proliferare).
2. Evaluarea *in vivo* a proprietăților compusului EM2 pe modele experimentale de inflamație acută și carcinogeneză.

I. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A DERIVATULUI DE BENZILAMIDĂ AL ACIDULUI MASLINIC (EM2)

Scopul primului studiu a constat în caracterizarea derivatului acidului maslinic „EM2” (Benzil (2 α , 3 β) 2,3-diacetoxi-12-olean-28-amidă), pus la dispoziție prin amabilitatea Prof. Dr. René Csuk.

Morfologia compusului a fost evaluată prin microscopie electronică de transmisie (TEM), iar microscopia electronică de scanare și analiza de raze X cu energie dispersivă (SEM-EDAX), au fost efectuate cu scopul de a stabili ultrastructura probei, respectiv elementele conținute de aceasta.

Analizele termogravimetrice (TG) și cele calorimetrice cu scanare diferențială (DSC) au fost efectuate pentru determinarea comportării termice a compusului.

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), respectiv analizele de spectroscopie RAMAN au fost înregistrate pentru a prezenta benzile caracteristice grupărilor/legăturilor chimice din compusul EM2.

Rezultatele obținute indică faptul că, compusul EM2 este constituit din particule sferice neregulate ce pot forma aglomerate. Dimensiunea particulelor este de ordinul micronilor, acest lucru putând explica fenomenul de aglomerare din probă. Analiza elementală a arătat faptul că, compusul EM2 este constituit din 3 elemente, și anume: carbon (C), oxigen (O) și azot (N). Mai mult decât atât, analizele termice au arătat faptul că compusul a suferit un efect exoterm la 414.4°C, efect însoțit de o importantă pierdere de masă de 91.8% înregistrată pe curba termogravimetrică (TG), efect ce poate fi atribuit degradării oxidative a compusului EM2.

În urma analizelor FT-IR înregistrate, pot fi observate atât benzile înregistrate la numărul de undă de 1741.72 cm⁻¹, benzi ce sunt atribuite grupărilor C=O; cât și benzile de vibrație de întindere înregistrate la numărul de undă de 3425.58 cm⁻¹, specifice grupărilor NH.

II. EVALUAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE A COMPUSULUI EM2 ȘI A ZINCULUI

Acest studiu a urmărit să investigheze efectele antioxidante ale compusului EM2, ale ZnCl₂ și respectiv ale asocierii compusului EM2 cu ZnCl₂. Zincul este un oligoelement cu un rol important în biologia cutanată datorită efectelor anti-inflamatoare și antimicrobiene precum și rolului în vindecarea plăgilor. Expunerea la radiații UVB este urmată de eliberarea zincului ceea ce ar putea potența proprietățile antioxidante ale compusului EM2.

Pentru a evalua capacitatea antioxidantă a EM2 și ZnCl₂ au fost utilizată metoda DPPH. Au fost preparate nouă soluții etanolice de derivat de acid maslinic, cu următoarele concentrații (200 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M), iar concentrațiile pentru ZnCl₂ au fost 300 μ M, 200 μ M și 100 μ M. Acidul ascorbic a fost utilizat ca etalon pentru activitatea antioxidantă.

Rezultatele noastre au arătat că toate cele nouă concentrații ale EM2 au prezentat o activitate antioxidantă (aproximativ 25%) mult mai scăzută decât a acidului ascorbic folosit ca etalon (95%). Când EM2 a fost administrat concomitent cu ZnCl₂, activitatea antioxidantă a probelor a înregistrat o scădere odată cu creșterea concentrației de ZnCl₂. De asemenea, testarea doar a ZnCl₂ a indus o scădere a activității antioxidante odată cu creșterea concentrației.

În concluzie, asocierea EM2 cu ZnCl₂ determină o scădere a activității antioxidante a compusului (și nu o creștere așa cum am presupus inițial) la concentrațiile mari de ZnCl₂. Comparând activitatea antioxidantă a compusului EM2 în monoterapie și în asociere cu ZnCl₂, putem afirma că, la cea mai mică concentrație de ZnCl₂ utilizată (100 μ M), există o ușoară creștere a efectului antioxidant.

III. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE ȘI ANTIFUNGICE A COMPUSULUI EM2 ȘI A ZINCULUI

Scopul studiului a fost de a evalua activitatea antimicrobiană și antifungică a compusului EM2 (10 mM) ± ZnCl₂ (100 μM și 10 mM) pe mai multe tulpini bacteriene (*B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*; *K. pneumoniae*; *P. mirabilis*; *P. aeruginosa*; *S. pneumoniae*; *S. pyogenes*; *Y. enterocolitica*; *S. flexneri*; *S. enterica*) și fungii (*C. albicans*; *C. parapsilosis*).

Activitatea antimicrobiană și antifungală a fost determinată prin metoda de difuziune în agar. Ca și control au fost utilizate gentamicină (10 μg) pentru bacili și stafilococi, gentamicină (120 μg) pentru streptococi și enterococi și fluconazol (25 μg) pentru *Candida*. Zona de inhibiție a antibioticelor și a agentului antifungic a fost raportată în milimetri și a fost cuprinsă între 16-19 mm.

Rezultatele au arătat că EM2 a avut o activitate antibacteriană puternică împotriva *Streptococcus pyogenes* (zona de inhibiție 20 ± 0,26 mm) și respectiv, redusă asupra *Staphylococcus aureus*, cu o zonă de inhibiție de 13 ± 0,19 mm.

Administrarea concomitentă a EM2 + ZnCl₂ la cea mai mică concentrație testată (100 μM) a crescut zona de inhibiție pentru *Enterococcus faecalis* (14,05 ± 0,39 mm). Creșterea concentrației de ZnCl₂ (10 mM) a determinat reducerea efectului antimicrobian asupra acestei tulpini bacteriene (zona de inhibiție 11 ± 0,15 mm). Pe restul tulpinilor bacteriene testate compușii nu au prezentat efect antimicrobian. De asemenea, atât administrarea EM2 în monoterapie cât și în asociere cu ZnCl₂ nu a avut proprietăți antifungice.

În concluzie, EM2 a avut efect antibacterian în principal împotriva infecțiilor cu bacterii de tip coci. Administrarea ZnCl₂ (100 μM) în asociere cu EM2 s-a dovedit a fi benefică împotriva bacteriei *E. faecalis*.

IV. EVALUAREA ACTIVITĂȚII ANTIPROLIFERATIVE ȘI CITOTOXICE A COMPUSULUI EM2 ȘI A ZINCULUI

Acest studiu a avut ca scop evaluarea efectelor citotoxice și antimigratorii ale compusului EM2 și ZnCl₂ la nivelul keratinocitelor normale (HaCaT) și respectiv, asupra diferitelor linii tumorale (A375, B164A6, B16F0, MDA-MB-231, MCF7, HepG2). Activitatea citotoxică a fost determinată prin intermediul testului MTT iar capacitatea de proliferare a fost examinată prin utilizarea tehnica "scratch". Pentru a evalua efectul citotoxic, celulele au fost stimulate timp de 24, 48 și 72 ore cu concentrații diferite de EM2 (1, 5, 10, 25 și 50 μM), cu ZnCl₂ (100 μM) sau cu EM2 + ZnCl₂ în asociere (100 μM).

Datele obținute au arătat că EM2 este un compus citotoxic pe celulele tumorale (dependent de doză și de durata administrării), fără a avea efecte toxice pentru keratinocitele normale. Cel mai puternic efect citotoxic a fost observat la 72 de ore după stimularea celulelor tumorale. De asemenea, capacitatea antimigratorie a celulelor tumorale a fost redusă după stimularea cu EM2, în timp ce la nivelul liniei de keratinocite umane normale de tip HaCaT, compusul a stimulat proliferarea celulară la toate concentrațiile testate.

În concluzie, EM2 exercită un efect citotoxic maxim asupra liniilor de celule canceroase la 72 de ore după stimulare. Un aspect important îl constituie faptul că acest compus nu a prezentat nicio activitate citotoxică asupra keratinocitelor sănătoase, indicând selectivitatea sa față de celulele tumorale.

V. EVALUAREA EFECTELOR ANTIANGIOGENICE ALE COMPUSULUI EM2 LA NIVELUL MEMBRANEI CORIOALANTOIDE

Scopul prezentului studiului a fost de a determina toxicitatea potențială și de a investiga efectele anticanceroase și antiangiogenice ale compusului EM2 (100 μ M) pe o linie celulară de melanom folosind metoda *in vivo* a membranei corioalantoide (CAM). Materialul biologic utilizat pentru testul CAM constă în ouă fertilizate de găină (*Gallus gallus domesticus*).

Efectele compusului EM2 asupra membranei corioalantoide normale în curs de dezvoltare au fost evaluate după aplicarea zilnică timp de 5 zile a compusului. Proprietățile compusului EM2 au fost în continuare investigate pe un model experimental de melanom folosind testul CAM după ce celulele de melanom, SK-MEL-2 au fost inoculate în interiorul unui inel steril plasat anterior pe CAM.

Rezultatele au indicat că, după administrarea a câte o doză de EM2 pe parcursul a 5 zile pe CAM în curs de dezvoltare normală, nu s-au înregistrat semne de toxicitate. Aplicarea compusului EM2 a prezentat o bună tolerabilitate, având rate similare de supraviețuire ca și grupul de control. Efecte similare cu cele asupra vascularizației alantoide normale, s-au înregistrat după administrarea compusului EM2 pe un model experimental de celule melanomatoase SK-MEL-2, unde, de asemenea, compusul nu a indus efecte toxice, viabilitatea probelor fiind similară cu cea a probelor netratate și a celor non-tumorale.

O observație importantă privind efectul EM2 asupra celulelor de melanom în curs de dezvoltare SK-MEL-2, este faptul că nu au fost formate tumori secundare; doar câteva celule dispersate au fost observate în apropierea inelului de aplicare în ziua 5, comparativ cu probele de control, fapt care indică un posibil potențial antimetastatic al compusului EM2.

În concluzie, compusul EM2 nu prezintă toxicitate atunci când este aplicat *in vivo*, pe țesuturi normale și tumorale, ceea ce îl face un bun candidat ca agent terapeutic. Induce limitarea *in vivo* a invazivității tumorilor de melanom cu mutație N-RAS în testul CAM, prin potențialul antiangiogenic și perturbator la nivelul micromediului din cadrul melanomului, dar fără a influența semnificativ indicele de proliferare tumorală.

VI. METODA DE DOZARE SIMULTANĂ A EM2 ȘI A METABOLITULUI SĂU DIN SÂNGE DE ȘOBOLAN PRIN CROMATOGRAFIE LICHIDĂ CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ

Acest studiu a avut ca scop evaluarea nivelului sanguin al compusului EM2 și al metabolitului său prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS / MS) după administrarea orală respectiv intraperitoneală (i.p.) a acestuia.

Derivatul acidului maslinic (50 mg/kg corp) a fost administrat pe cale orală și intraperitoneală la șobolani. Sângele a fost colectat automat utilizând sistemul Culex. Probele au fost analizate utilizând metoda analitică validată și s-a dozat derivatul și metabolitul acestuia din sânge.

Rezultatele obținute au arătat că EM2 a avut o concentrație maximă la 4 ore după administrarea orală și respectiv, la 5 ore după administrarea i.p. Compusul a prezentat o biodisponibilitate mai scăzută după administrarea orală comparativ cu administrarea intraperitoneală.

Metoda analitică dezvoltată pentru analiza simultană a derivatului de acid maslinic și a metabolitului acestuia a prezentat o specificitate bună datorită cuplării cu spectrometria de masă (MS/MS).

În concluzie, metoda LC-MS/MS dezvoltată și validată în această lucrare are o durată scurtă de rulare, o tehnică simplă și necostisitoare de preparare a probelor și este robustă, toate caracteristicile necesare pentru metodele cu performanțe ridicate utilizate în studiile privind biodisponibilitatea.

VII. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR COMPUSULUI EM2 PE UN MODEL EXPERIMENTAL DE INFLAMAȚIE SISTEMICĂ ACUTĂ

Scopul acestui studiu a constat în caracterizarea efectului administrării unei doze zilnice de EM2 asupra stresului oxidativ indus în cadrul unui model experimental de inflamație acută.

Inflamația a fost indusă prin injectarea de ulei de terebentină (6 ml/kg corp, i.m.) la șobolani Wistar-Bratislava. Compusul EM2 a fost administrat pe cale orală prin gavaj (50 mg / kg corp / zi) timp de 10 zile (EM2 a fost administrat atât înainte cât și după inducerea inflamației și, de asemenea, la șobolani cărora nu le-a fost indusă inflamația). Ca și control pentru efectul antiinflamator a fost utilizat dictofenac, administrat pe cale orală timp de 10 zile (20 mg / kg corp / zi).

Stresul oxidativ a fost evaluat prin măsurarea concentrațiilor totale de nitriți și nitrați (NOx), a statusului oxidativ total (TOS), a răspunsului total antioxidant (TAR), a indicelui de stress oxidativ (OSI), a tiolilor (SH) și a malondialdehidei (MDA).

În concluzie, cele mai importante rezultate ale acestui studiu au arătat că EM2 a indus o scădere a parametrilor stresului oxidativ, dar numai atunci când a fost administrat la șobolani sănătoși. Administrarea sa înainte și după inflamația indusă de uleiul de terebentină a avut un efect redus asupra stresului oxidativ. Numai administrarea profilactică a compusului a arătat un efect inhibitor asupra formării MDA comparabil cu cel al diclofenacului.

VIII. EVALUAREA EFECTELOR COMPUSULUI EM2 ȘI ALE ZINCULUI PE UN MODEL EXPERIMENTAL DE INFLAMAȚIE ACUTĂ LOCALĂ

Scopul acestui studiu a constat în caracterizarea efectelor a diferite formulări farmaceutice aplicate topic (hidrogel cu EM2 1%, hidrogel cu zinc (1% și 5%) și hidrogel cu EM2 1% plus zinc (1% și 5%)) pe un model experimental de inflamație acută la nivelul urechii indusă prin aplicarea de 12- O-tetradecanoilforbol-13-acetat (TPA) la șoarecii SKH1.

Modelul experimental de inflamație indus prin aplicarea de TPA este ușor de obținut și oferă rapid informații privind activitatea benefică sau toxică a compușilor nou-obținuți. Pentru a depăși solubilitatea scăzută a compusului EM2 și pentru a îmbunătăți eliberarea acestuia, compusul a fost încorporat într-o formulare de tip hidrogel, fie singur, fie în asociere cu ZnCl₂.

Rezultatele obținute au indicat că aplicarea topică a compusului EM2 a redus inflamația indusă de TPA comparativ cu șoarecii tratați cu hidrogel. Analiza histopatologică a evidențiat faptul că lotul tratat cu hidrogel cu EM2 1% a prezentat vase sanguine cu o ușoară hiperemie + și un edem interstițial moderat ++. La loturile tratate cu ZnCl₂ dermul a fost hialinizat și epidermul a arătat acantoză. Edemul a fost redus și la lotul tratat cu o concentrația mai mare de ZnCl₂ (5%). Loturile tratate cu combinația EM2 + ZnCl₂ au prezentat edem similar cu cel observat la lotul tratat doar cu hidrogel cu EM2, în timp ce hialinizarea dermului a fost similară cu cea observată la loturile tratate cu hidrogel cu ZnCl₂.

În concluzie, aplicarea topică a formulărilor cu EM2 ± ZnCl₂ a determinat un efect anti-inflamator moderat obiectivat prin reducerea edemului local și modificări favorabile la nivelul dermului.

IX. DETERMINAREA EFECTELOR COMPUSULUI EM2 PE MODELE EXPERIMENTALE DE CARCINOM CUTANAT INDUS CHIMIC/FOTOCHIMIC ȘI LA NIVELUL MITOCONDRIILOR HEPATICE

Scopul acestui studiu efectuat pe șoarecii SKH1 a fost acela de a analiza efectele compusului EM2 pe două modele experimentale de carcinom cutanat indus: i) chimic, prin

expunerea la agenții chimici 7,12-dimetilbenzantracen (DMBA) și 12-o-tetradecanoilphorbol-13-acetat (TPA) și respectiv, ii) fotochimic, prin expunerea la agenți chimici (DMBA și TPA) și la radiații ultraviolete B (UVB), urmată de investigarea efectelor asupra parametrilor de respirație mitocondrială și producției de H_2O_2 la nivelul mitocondriilor hepatice.

EM2 a fost aplicat local sub formă de hidrogel 1%, de ori pe săptămână, după apariția papiloamelor. Rezultatele noastre indică o scădere a volumului tumorilor după tratamentul cu EM2 atât în cazul carcinomului cutanat indus chimic, cât și la cel fotochimic.

Un alt obiectiv al acestui studiu a fost investigarea efectului EM2 asupra mitocondriilor hepatice izolate de la șoareci din cele două modele experimentale. Mitocondriile hepatice au fost izolate de la șoareci SKH1 prin tehnica centrifugărilor diferențiate la 4 °C. Studiul ratelor respiratorii mitocondriale a fost efectuat prin măsurarea consumului de oxigen folosind tehnica respirometriei de înaltă rezoluție în prezența substratelor complexului I (glutamat / malat) și a complexului II (succinat, plus rotenonă pentru inhibarea complexului I).

Rezultatele noastre au arătat că la femele cărora le-a fost indus carcinom cutanat chimic, lotul tratat cu hidrogel cu EM2 1% a înregistrat o creștere a tuturor parametrilor respiratori la nivelul complexului I (CI), și anume stadiul 2 (respirația bazală), FosOX (respirația stimulată de ADP) și respirația maximă (titrări succesive cu FCCP, un decuplant clasic), în timp ce la nivelul complexului II (CII) respirația bazală a fost scăzută, iar FosOX și respirația maximă au prezentat o ușoară creștere. Pe de altă parte, masculii cu leziuni cutanate induse chimic au prezentat atât pe CI cât și pe CII o scădere a tuturor ratelor respiratorii după tratamentul cu hidrogel cu EM2 1%.

Femele care au dezvoltat leziuni fotochimice au prezentat la nivelul CI o scădere a respirației bazale și a celei active și o creștere a respirației maxime după aplicarea topică a hidrogelului cu EM2. Mai mult, în ceea ce privește CII, toate ratele respiratorii au fost crescute după tratamentul cu EM2.

Producția de specii reactive de oxigen (SRO) a fost evaluată la nivelul mitocondriilor hepatice izolate folosind metoda Amplex Red. Rezultatele obținute au indicat că la șoarecii cu carcinom cutanat indus chimic, tratamentul cu EM2 a indus o scădere semnificativă a producției de H_2O_2 ca urmare a activării complexului I, efect ce nu a putut fi reprodus și în cazul respirației dependente de complexul II. Mai mult, aplicarea hidrogelului cu EM2 1% la șoarecii cu leziuni induse fotochimic nu a fost urmată de reducerea stressului oxidativ.

În concluzie, datele noastre au indicat că aplicarea topică a hidrogelului cu EM2 1% a avut un efect benefic asupra leziunilor cutanate induse chimic sau fotochimic. În ceea ce privește modificările ratelor respiratorii și ale producției de SRO, datele obținute sunt heterogene, fiind dependente atât de sexul animalelor cât și de substrat și, de asemenea, au variat în funcție de modelul experimental de cancer cutanat. Compusul a atenuat stresul oxidativ în modelul cancerului indus chimic, un efect care nu mai era evident în forma mai severă a cancerului cutanat indus fotochimic.

CONCLUZII FINALE

1. Caracterizarea fizico-chimică a derivatului de benzilamidă al acidului maslinic, EM2, a arătat că acest compus este constituit din particule sferice neregulate ce pot forma aglomerate. Dimensiunea particulelor este de ordinul micronilor, și constă din 3 elemente, și anume C, O și N.
2. EM2 a prezentat o activitate antioxidantă redusă, independentă de concentrație în intervalul 1 - 200 μ M. Activitatea antioxidantă a EM2 a fost potențată ușor de asocierea cu $ZnCl_2$ (în concentrație de 100 μ M).

3. Activitatea antibacteriană a EM2 a fost semnificativă pe tulpinile de cocci. Administrarea ZnCl_2 (100 μM) în asociere cu EM2 s-a dovedit a fi benefică împotriva bacteriei *E. faecalis*.
4. EM2 are un efect citotoxic asupra celulelor tumorale (melanom, carcinom mamar, carcinom hepatocelular) în special la 72 de ore post-stimulare. Efectul citotoxic a fost mai puternic asupra celulelor melanomului uman decât asupra celulelor melanomului murinic. Compusul nu a prezentat activitate citotoxică asupra keratinocitelor sănătoase, indicând selectivitatea sa față de celulele tumorale.
5. EM2 a redus caracterul invaziv *in vivo* al celulelor melanomatoase cu mutație N-RAS la testul CAM, prin potentialul antiangiogenic și perturbator la nivelul micromediului din cadrul melanomului, dar fără un efect important asupra indicelui proliferării celulelor tumorale. Ulterior aplicării compusului EM2 nu au fost formate tumori secundare în cazul celulelor de melanom SK-MEL-2, fapt care indică un posibil potențial antimetastatic al compusului EM2.
6. EM2 a prezentat o biodisponibilitate mai scăzută după administrarea orală comparativ cu administrarea intraperitoneală.
7. EM2 a fost asociat cu un efect antioxidant redus pe modelul de inflamație sistemică acută. Numai administrarea profilactică a compusului a arătat un efect inhibitor asupra formării MDA comparabil cu cel al diclofenacului.
8. EM2 a prezentat un ușor efect antiinflamator pe un model experimental de inflamație locală acută, indusă prin aplicarea soluției de TPA.
9. Pe modele animale de carcinom cutanat induse chimic sau fotochimic, aplicarea topică a hidrogelului cu EM2 a avut efecte benefice asupra leziunilor cutanate.
10. La nivelul mitocondriilor hepatice izolate, compusul EM2 a indus modificările dependente de sex și substrat în ceea ce privește ratele respiratorii; aceste modificări au variat și în funcție de modelul experimental de carcinogeneză.
11. Pe modelul de carcinom cutanat indus chimic (dar nu și în cazul celui fotochimic), compusul EM2 a indus o scădere semnificativă a producției de H_2O_2 în prezența substratelor complexului I al lanțului respirator.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Contribuțiile originale pot fi rezumate după cum urmează:

1. Evaluarea efectelor antioxidante ale derivatului de benzilamida al acidului maslinic administrat izolat și în asociere cu ZnCl_2 .
2. Evaluarea proprietăților antimicrobiene și antifungice ale $\text{EM2} \pm \text{ZnCl}_2$ pe diferite tulpini bacteriene.
3. Evaluarea proprietăților citotoxice și antiproliferative ale EM2 la nivelul unor linii celulare tumorale și keratinocite umane normale.
4. Evaluarea toxicității compusului EM2, a efectelor asupra modelului de melanom SK-MEL-2, precum și implicațiile asupra angiogenezei normale și a melanomului în modelul CAM.
5. Validarea metodei LC-MS / MS pentru cuantificarea derivatului de benzilamidă a acidului maslinic (EM2) și a metabolitului său.
6. Evaluarea efectelor compusului EM2 pe două modele experimentale de inflamație acută sistemică și locală.
7. Evaluarea efectelor compusului EM2 aplicat topic ca hidrogel pe două modele experimentale de carcinogeneză.

8. Evaluarea modificărilor funcției respiratorii și a producției de SRO în mitocondriile hepatice izolate, provocate de procesul malign în prezență față de absența tratamentelor topice.

Cuvinte cheie: derivat al acidului maslinic, cancer cutanat, inflamație, mitocondrii, activitate antioxidantă, activitate antimicrobiană

Studiile din această teză au fost finanțate prin bursa doctorală POSDRU Nr. 159/1.5/S/136893 – DocMed.Net_2.0, prin proiectul intern al UMF Victor Babeș Timișoara pentru tineri cercetători, cod PII-C4-TC-2016-16441-10 și prin proiectul COST Zinc-Net acțiunea TD 1304, Short Term Scientific Mission cod STSM-TD1304-310815-063911.

LISTA ARTICOLELOR PUBLICATE

1. **Ioana Zinuca Pavel**, Corina Danciu, Camelia Oprean, Cristina Adriana Dehelean, Delia Muntean, René Csuk, Danina Mirela Muntean. *In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Ability and Cytotoxicity on Two Melanoma Cell Lines of a Benzylamide Derivative of Maslinic Acid*. **Anal Cell Pathol (Amst)** **2016**; 2787623. doi: 10.1155/2016/2787623. (ISI journal, IF: 1.078)
2. **Ioana Zinuca Pavel**, Cristina Adriana Dehelean, Lenard Farczadi, Dana Maria Muntean, Laurian Vlase, Corina Danciu, René Csuk, Florin Birsasteanu, Danina Mirela Muntean. *Assessment of a Maslinic Acid Derivative and its Metabolite in Rat Blood by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*. **Rev Chem (Bucharest)** **2017**; 68(5), 1089-1094. (ISI journal, IF: 1.232)
3. **Ioana Zinuca Pavel**, Alina Elena Pârvu, Cristina Adriana Dehelean, Laurian Vlase, René Csuk, Danina Mirela Muntean. *Assessment of the Antioxidant Effect of a Maslinic Acid Derivative in an Experimental Model of Acute Inflammation*. **Farmacia** **2017**; 65(3), 390-395. (ISI journal, IF: 1.348)
4. **Ioana Zinuca Pavel**, Oana Andrada Iftode, Iulia Pinzaru, Dorina Coricovac, Alina Moaca, Claudia Farcas, Sebastian Claudiu Simu, Codruta Soica, Cristina Dehelean, Andrei Motoc. *Skin Specific Cells and UVB Damage – An experimental assessment*. **Rev Chem (Bucharest)** **2017**; 68(6), 1227-1331. (ISI journal, IF: 1.232)