

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL V**

MOATĂR AURICA ELISABETA



TEZĂ DE DOCTORAT
STUDIUL POTENȚIALULUI ANTITUMORAL
AL COMPUȘILOR BIOLOGICI ACTIVI ȘI DE
SINTEZĂ ASUPRA CELULELOR
NEOPLAZICE DE COLON

– R E Z U M A T –

Conducător Științific
PROF. DR. DUMITRAȘCU VICTOR

Timișoara
2022

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	V
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI	VI
LISTA FIGURILOR	VIII
LISTA TABELELOR	X
DEDICAȚIE	XI
MULȚUMIRI	XII
INTRODUCERE	XIII
 PARTEA GENERALĂ.....	1
CAPITOLUL 1 CANCERUL COLORECTAL.....	1
1.1. DATE DE EPIDEMIOLOGIE ȘI ETIOPATOGENIE	1
1.2. BIOLOGIA CARCINOGENEZEI COLORECTALE.....	2
1.2.1. CARCINOGENEZA.....	3
1.2.2. SISTEMELE CELULARE TUMORALE 3D <i>IN VITRO</i>	5
1.2.3. INTERLEUKINELE ÎN CANCERUL COLORECTAL	8
1.3. TERAPIA CANCERULUI COLORECTAL.....	10
CAPITOLUL 2 COMPUȘI BIOLOGICI ACTIVI DIN SURSE VEGETALE ȘI DE SINTEZĂ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC	16
2.1. FITOTERAPIA	16
2.1.1. FITOTERAPIA ÎN SĂNĂTATEA UMANĂ.....	16
2.1.2. APLICAȚIILE FITOTERAPIEI ÎN CANCER	19
2.2. <i>MYRMECODIA PENDANS</i>	21
2.2.1. NOȚIUNI DE BOTANICĂ	21
2.2.2. APLICAȚII TERAPEUTICE.....	22
2.3. LICHIDELE IONICE	24
2.3.1. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE.....	24
2.3.2. CLASIFICAREA LICHIDELOR IONICE	27
2.3.3. APLICAȚII BIOMEDICALE ALE LICHIDELOR IONICE	28
2.3.3.1. Activitățile biologice ale lichidelor ionice	28
2.3.3.2. Rolul lichidelor ionice în sinteza compușilor farmaceutici.....	31
 PARTEA SPECIALĂ.....	35
CAPITOLUL 3 STUDIUL POTENȚIALULUI ANTITUMORAL AL EXTRACTELOR DE <i>MYRMECODIA PENDANS</i>.....	35
3.1. EVALUAREA POTENȚIALULUI ANTIPROLIFERATIV AL EXTRACTELOR DE <i>MYRMECODIA PENDANS</i> ASUPRA CELULELOR NEOPLAZICE DE COLON	37
3.1.1. SCOPUL STUDIULUI.....	37
3.1.2. OBIECTIVE	37
3.1.3. IPOTEZE.....	38

3.1.4. MATERIAL SI METODE.....	38
3.1.4.1. Reactivi	38
3.1.4.2. Material vegetal	39
3.1.4.3. Material biologic uman.....	39
3.1.4.4. Extracția materialului vegetal.....	39
3.1.4.5. Analiza activității DPPH	40
3.1.4.6. Tehnica culturilor celulare.....	41
3.1.4.7. Analiza potențialului citotoxic al extractelor.....	41
3.1.4.8. Evaluarea fenotipului celular.....	44
3.1.4.9. Analiza statistică.....	44
3.1.5. REZULTATE	44
3.1.5.1. Activitatea antioxidantă.....	44
3.1.5.2. Proliferarea celulară	45
3.1.5.3. Morfologia celulară	52
3.1.6. DISCUȚII.....	61
3.1.7. CONCLUZII PRELIMINARE	64
3.2. ACTIVITATEA <i>MYRMECODYEI PENDANS</i> ASUPRA SECREȚIEI DE IL-8 ÎN CELULELE NEOPLAZICE DE COLON.....	65
3.2.1. SCOPUL STUDIULUI.....	65
3.2.2. OBIECTIVE	65
3.2.3. IPOTEZE.....	65
3.2.4. MATERIAL ȘI METODĂ.....	66
3.2.5. REZULTATE	67
3.2.6. DISCUȚII.....	68
3.2.7. CONCLUZII PRELIMINARE	70
CAPITOLUL 4 EVALUAREA POTENȚIALULUI ANTITUMORAL AL LICHIDELOR IONICE	71
4.1. SCOPUL STUDIULUI	72
4.2. OBIECTIVE.....	72
4.3. IPOTEZE	72
4.4. MATERIAL ȘI METODE.....	73
4.4.4. ANALIZA CITOTOXICITĂȚII LI ASUPRA SISTEMELOR CELULARE 2D	73
4.4.5. ANALIZA POTENȚIALULUI ANTITUMORAL AL LI, IN VITRO ASUPRA AGREGATELOR CELULARE 3D	74
4.5. REZULTATE	76
4.5.1. EVALUAREA PROLIFERĂRII CELULARE.....	76
4.5.2. EVALUAREA MORFOLOGIEI CELULARE ȘI A SFEROIDELOR 3D.....	84
4.6. DISCUȚII	94
4.7. CONCLUZII PRELIMINARE.....	105
CONCLUZII.....	106
BIBLIOGRAFIE.....	109
ARTICOLELE PUBLICATE <i>IN EXTENSO</i>.....	Error! Bookmark not defined.

REZUMAT

INTRODUCERE

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă una dintre cele mai frecvente cauze de malignitate, fiind al doilea tip de neoplazie în ceea ce privește mortalitatea. Medicațiile actuale, în pofida dezvoltărilor recente, sunt uneori ineficiente, însoțindu-se de fenomenul de rezistență sau recidivă.

Lucrarea de față și-a propus să evalueze potențialul antitumoral al unor compuși biologici și de sinteză, *in vitro*, asupra celulelor neoplazice de colon. Obiectivul general al studiului a fost de a analiza, în ce măsură extractele obținute în diverși solvenți sau substanțele de sinteză, prezintă capacitatea de a influența tumorigeneza, în speță de a acționa ca și agenți cu rol de inhibare a multiplicării celulare, adezivității celulelor neoplazice sau de a determina moartea celulară. În acest sens, am evaluat capacitatea antitumorală a extractelor de *Myrmecodia pendans*, precum și potențialul antineoplazic al unor lichide ionice pe bază de tetrabutilamoniu, tetrahexilamoniu, metilimidazoliu și metilpirimidină. Obiectivele specifice ale acestui studiu au urmărit mai multe ipoteze: cuantificarea potențialului antiproliferativ și analiza capacității antioxidante a extractelor de plantă, efectul extractelor vegetale asupra sintezei de interleukina 8, aprecierea potențialului antiproliferativ și de inhibare a adezivității celulelor neoplazice a lichidelor ionice luate în studiu.

CAPITOLUL 1

CANCERUL COLORECTAL

1.1. DATE DE EPIDEMIOLOGIE ȘI ETIOPATOGENIE

Deși multe sisteme de sănătate publică au instituit programe de screening în ceea ce privește cancerul colorectal (CCR), el reprezintă în continuare una din cauzele principale de malignitate la nivel mondial. În cadrul cancerului colorectal au fost identificate căi moleculare bine definite ce par să joace un rol foarte important în cancerul colorectal sporadic, polipoza adenomatoasă familială și sindromul polipos asociat, cancerul colorectal ereditar non-polipos, dezvoltarea cancerului în boala inflamatorie intestinală, cancerul colorectal familial. Au fost puse în evidență diverse căi biologice ce pot conduce la aceeași expresie fenotipică. Au fost identificați ca factori de risc vârsta înaintată, sexul (mai des întâlnit la bărbați), adipozitatea, consumul de alcool, carnea roșie și produsele din carne procesată, fumatul, activitatea fizică redusă, boala inflamatorie intestinală (colita ulceroasă și boala Crohn), factorul genetic.

1.2. BIOLOGIA CARCINOGENEZEI COLORECTALE

Cancerul colorectal reprezintă o provocare pentru cercetarea științifică. Pe lângă forma sporadică, care de altfel este și cea mai frecventă, acest tip de boală poate fi familial sau ereditar. Factorii ereditari, precum și stilul de viață al individului, contribuie la dezvoltarea acestei boli. Acumularea mutațiilor la nivelul genelor oncogene implicate în repararea ADN-ului sugerează existența diferitelor căi de semnalizare moleculară prin care pot să se instaleze leziuni maligne. Cercetările efectuate la nivel celular și molecular vizează găsirea unor noi alternative terapeutice specifice pentru combaterea cancerului colorectal.

1.2.1. CARCINOGENEZA

Debutază la nivelul mucoasei care suferă modificări la nivel genetic, provocând neoplazie intraepitelială și creșterea leziunilor adenomatoase care pot sau nu pot progresa către cancer invaziv. A fost propus un model, așa-numita secvență adenom-carcinom, care leagă modificările genetice și ordinea lor de instalare, de diferite stadii în dezvoltarea tumorii. Spre deosebire de modelele timpurii, carcinogeneza este acum recunoscută a fi supusă heterogenității.

1.2.2. SISTEMELE CELULARE TUMORALE 3D *in vitro*

Matricea extracelulară (MEC) este o rețea complexă de proteine și glicani care oferă suport arhitectural pentru celule. În plus, proteinele matriciale se leagă de factori de creștere celulară, expunându-i celulelor. În consecință, MEC conferă celulelor, parametrii biofizici și biochimici necesari pentru funcționarea optimă, ceea ce face ca MEC să fie un component major în reglarea comportamentului celular. Datorită defectelor inerente ale culturii tradiționale 2D, aceasta nu reușește să mimeze în mod corect arhitectura și micromediile tumorale *in vivo*, ceea ce face ca celulele cultivate în sisteme 2D să fie diferite de celulele care cresc *in vivo*, în ceea ce privește fenotipul și dezvoltarea celulară, interconexiunile celula-celula și celula-MEC, semnalizarea celulară. Pentru a îmbunătăți aceste simulări ale micromediilor celulare *in vivo*, culturile celulare tridimensionale au devenit următoarea frontieră a cercetării în biologia tumorală.

1.2.3. INTERLEUKINELE ÎN CANCERUL COLORECTAL

Interleukinele (IL) sunt clasificate în mai multe familii, fiecare dintre acestea având aproximativ 40 de membri divizați în subfamilii. Ele pot interacționa cu diverse tipuri celulare care acționează asupra sistemului imunitar în diferite tipuri de cancer. În ultimii ani, IL au atras o atenție deosebită datorită

rolurilor lor distincte în CCR, oferind o strategie nouă și promițătoare pentru managementul CCR. În general, IL facilitează CCR prin promovarea tumorigenezei, dezvoltarea tumorală, vasculogeneză, invazia și metastazarea celulelor canceroase, sustragerea în fața sistemului imun. Pe de altă parte, anumite tipuri de IL inhibă tumorigeneza colorectală acționând asupra diverselor căi de semnalizare celulară prin căi complexe. În cancerul colorectal, la nivelul micromediului tumoral au loc atât imunostimularea, cât și imunosupresia, cu o suprimare imună mai pronunțată în stadii avansate de boală. Profilul citokinelor poate furniza date despre starea imună a micromediului tumoral, contribuind la aprecierea prognosticului.

CAPITOLUL 2

COMPUȘI BIOLOGICI ACTIVI DIN SURSE VEGETALE ȘI DE SINTEZĂ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC

2.1. FITOTERAPIA

2.1.1. FITOTERAPIA ÎN SĂNĂTATEA UMANĂ

Compușii biologic activi derivați din surse naturale au fost utilizați încă din antichitate pentru a trata diferite afecțiuni umane sau animale, în timp ce produsele terapeutice obținute din surse vegetale au reprezentat o alternativă medicamentoasă frecvent utilizată, dominând farmacopeea umană de-a lungul anilor.

2.1.2. APLICAȚIILE FITOTERAPIEI ÎN CANCER

Folosirea produselor pe bază de plante sau alte surse naturale în cancer stă la baza tratamentelor adjuvante în patologia neoplazică. Primii agenți terapeutici introduși în practica medicală antineoplazică au fost alcaloizii vinca: vinblastina și vincristină, obținute din *Catharanthus roseus* G. Don. Între anii 1960 și 1970 au fost dezvoltate strategii terapeutice izolate din speciile din familia Podophyllaceae - etopozidului și a tenipozidului, utilizate pentru tratarea limfoamelor, cancerului bronșic și testicular. Paclitaxelul (taxol) a fost izolat din coaja de *Taxus brevifolia* Nutt (*Taxaceae*). O altă clasă de medicamente chimioterapice este reprezentată de derivații activi ai camptotecinei izolați din *Camptotheca acuminata* Decne (*Nyssaceae*). Din această clasă face parte topotecanul care este utilizat ca antineoplazic în cancerul ovarian și pulmonar, precum și irinotecan administrat în cancerul colorectal.

2.2. MYRMECODIA PENDENS

2.2.1. NOȚIUNI DE BOTANICĂ

Myrmecodya pendans (M. Pendans, Rubiaceae)(MP), cunoscută local sub numele de Sarang Semut sau planta furnicii, face parte din familia Rubiaceae. *Myrmecodia* aparține genului mirmecofitelor epifite sau al plantelor furnice. Face parte alături de *Anthorrhiza*, *Hydnophytum*, *Myrmephytum* și *Squamellaria* din familia Rubiaceae. Este o plantă care își are originile în sud-estul Asiei, în insulele Papua în partea de est a Indoneziei și prezintă multiple proprietăți biologice datorită compușilor săi activi. *Myrmecodya* prezintă 45 de specii.

2.2.2. APLICAȚII TERAPEUTICE

M. Pendans este cunoscută pentru efectul ei antitumoral, anticancerigen. Printre formele de cancer asupra cărora are efect anticancerigen se numără cancerul de colon, ficat, prostată, boli hematologice, sân, creier, col uterin, plămân și piele. De asemenea, este folosită ca tratament pentru boli sistemice ca bolile infecțioase, tuberculoza, leucemia, boli ale inimii, prostatei, rinichilor, hemoroizi, reumatism, migrene, dar și în tratamentul a diverse alergii. Efectul terapeutic al acestei plante este dat de substanțele active, ea conținând flavonoide, tanine, polifenoli cu funcție antioxidantă și glicozide.

2.3. LICHIDELE IONICE

Lichidele ionice (LI) sunt compuși ionici cu numeroase aplicații datorită proprietăților lor fizico-chimice. Prin definiție sunt o clasă de săruri formate din anioni și cationi asimetrice, care au capacitatea de a-și păstra starea lichidă la temperaturi scăzute, sub 100°C. Au atras atenția colectivelor de cercetare încă din anii 1980, în ultimii ani fiind raportate numeroase studii în domeniu, pornindu-se de la ideea că există milioane de combinații cation-anion care vor genera lichidul ionic ideal pentru orice tip de aplicație.

2.3.3. APLICAȚII BIOMEDICALE ALE LICHIDELOR IONICE

2.3.3.1. Activitățile biologice ale lichidelor ionice

Dezvoltarea unor formulări terapeutice inteligente, precum îmbunătățirea sistemelor de livrare a medicamentelor, în paralel cu gestionarea eficientă a patologiilor umane, reprezintă o sarcină dificilă pentru domeniul medico-farmaceutic. Majoritatea produselor farmaceutice aflate în cercetare sau dezvoltare, nu ajung în stadiul de formulare din cauza problemelor legate de

solubilitatea scăzută sau insolubilitatea lor în solvenții acceptați din punct de vedere farmaceutic la ora actuală. Diverse metode farmaceutice au fost elaborate pentru sporirea biodisponibilității: nanoemulsii și nanoparticule, lipozomi, micelizare, complecși de incluziune cu ciclodextrină, dispersii solide. Deși unele dintre aceste abordări și-au dovedit eficacitatea terapeutică, unii solvenți organici utilizați la prepararea lor prezintă efecte secundare importante pentru sistemele biologice. În consecință, tehnicile ecologice, așa numitele tehnologii verzi, sunt de dorit pentru a eficientiza livrarea medicamentelor insolubile, cu efecte adverse minime.

PARTEA SPECIALĂ

CAPITOLUL 3

STUDIUL POTENȚIALULUI ANTITUMORAL AL EXTRACTELOR DE *MYRMECODIA PENDANS*

3.1. EVALUAREA POTENȚIALULUI ANTIPROLIFERATIV AL EXTRACTELOR DE *MYRMECODIA PENDANS* ASUPRA CELULELOR NEOPLAZICE DE COLON

3.1.1. SCOPUL STUDIULUI

Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua capacitatea antioxidantă a extractelor de *Myrmecodia Pendans* în diferiți solvenți, precum și măsura în care aceste extracte influențează creșterea și dezvoltarea celulelor neoplazice de colon.

3.1.2. OBIECTIVE

Obiectivele specifice ale studiului au fost: realizarea extractelor de *Myrmecodia Pendans* în diferiți solvenți, aprecierea capacității efective de inhibiție a radicalilor de DPPH (2,2-dipenil-1-picrilhidrazil), aprecierea potențialului antiproliferativ al extractelor, aprecierea fenotipului celular la celulele neoplazice incubate cu aceste extracte.

3.1.3. IPOTEZE

Ipotezele de lucru de la care a pornit acest studiu sunt: activitatea antioxidantă și antiproliferativă a extractelor de *Myrmecodia Pendans* este diferită în funcție de solvenții utilizați la extracție și de concentrație; există o corelație directă între doza/timpul de incubare și proliferarea celulelor tumorale în cultură.

3.1.4. MATERIAL SI METODE

Material vegetal

Materialul vegetal a fost reprezentat de planta *Myrmecodia Pendans* a fost achiziționat din regiunea Papua.

Material biologic uman

Materialul biologic uman a fost reprezentat de două linii celulare de cancer de colon: linia CaCo2 și HCT116.

Extracția materialului vegetal

Materialul vegetal a fost identificat de un biolog cu experiență. În continuare s-a procedat la măcinarea materialului vegetal și obținerea unei pulberi. După o prealabilă cântărire, s-a efectuat extracția (10g pulbere/100ml solvent). Recipientele sigilate au fost păstrate timp de 24h, la întuneric cu agitare continuă. Extracția s-a realizat în următorii solvenți: apă ultrapură, etanol, metanol, N-hexan.

Ulterior, solvenții au fost evaporați și s-au realizat soluții stoc de 1000μg/ml în DMSO.

Analiza activității DPPH

Capacitatea de captare a radicalilor liberi pentru extractele obținute a fost testată prin testul DPPH. Procentul activității de captare a radicalilor DPPH a fost calculat prin următoarea ecuație:

$$\% \text{ activitate de captare a radicalilor DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Tehnica culturilor celulare

Cele două linii celulare au fost decongelate, iar celule au fost însămânțate în vederea multiplicării. S-a utilizat pasajul 3 pentru linia CaCo2 și, respectiv pasajul 10 pentru linia HCT116. Celulele au fost cultivate în mediu specific (DMEM suplimentat cu FBS 10% și antibiotic, antimicotic 1%), la incubator în atmosferă de 5%CO₂ și 37°C. Când celulele au atins confluința de 80-85%, s-a realizat detașarea acestora de pe substrat și obținerea unei suspensii de celule izolate, prin tripsinizare și centrifugare, etape efectuate după o prealabilă spălare cu PBS. S-a apreciat viabilitatea celulară prin testul albastru de tripan 0,4%, utilizând cititorul automat (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen).

Analiza potențialului citotoxic al extractelor

Celulele au fost cultivate în mediu specific, în plăcuțe de cultură de 96 de godeuri, în concentrație de 2x10⁴/ml în 100μl mediu (2x10³) pentru linia celulară HCT116 și 1,5x10⁴/ml în 100μl mediu (1,5x10³) pentru linia celulară CaCo₂. Pentru fiecare solvent, am realizat mai multe loturi experimentale, testând 5 concentrații diferite (50-150-300-450-600 μg/ml).

Evaluarea fenotipului celular

Aprecierea morfologiei celulare, respectiv a fenotipului celular s-a realizat prin analiza microscopică la microscopul inversat, cu contrast de fază (MCF) Nikon Eclipse TE 2000-U, imaginile microscopice fiind preluate de camera foto Nikon D200.

Analiza statistică

Datele cuantificabile obținute în urma citirilor spectrofotometrice au fost introduse în baze de date Excel și au fost analizate cu testul ANOVA. S-au calculat mediile și deviațiile standard. Semnificația statistică a fost apreciată în funcție de valoare p: * $p \leq 0,001$ semnificativ statistic, ** $p \geq 0,001$ nesemnificativ statistic.

3.1.5. REZULTATE

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ

Capacitatea de inhibare a DPPH scade în următoarea ordine: $E > M > A > H$. Acest rezultat sugerează că în extractele alcoolice (etanolic și metanolic) au fost extrași majoritatea compușilor antioxidanți.

PROLIFERAREA CELULARĂ

La 24h de ore de incubare cu cele cinci concentrații de extracte, pentru fiecare solvent, am observat o reducere semnificativă a proliferării celulare, în special la celulele expuse la extractele etanolice. Diferențele semnificative statistic au fost observate între extractele obținute în cei patru solvenți, pentru aceeași concentrație aplicată ($p \leq 0,001$). După expunerea de 48h, am remarcat același efect privind multiplicarea celulară. Incubarea liniei celulare CaCo2 pe o perioadă de 72h a evidențiat o scădere a ratei de multiplicare dependentă de doză pentru extractul etanolic și o inhibare moderată pentru extractul obținut în N-hexan.

MORFOLOGIA CELULARĂ

Am evidențiat modificări ale fenotipului celulelor CaCo2, în special la celulele expuse la extracte apoase și alcoolice. Leziunile celulare au variat de la modificări minime până la alterări severe celulare și moarte celulară. Modificările morfologice celulare au fost proporționale cu doza de extract și timpul de expunere. După extracție în hexan, soluțiile testate nu au determinat leziuni semnificative celulare.

3.2. ACTIVITATEA *MYRMECODYEI PENDANS* ASUPRA SECREȚIEI DE IL-8 ÎN CELULELE NEOPLAZICE DE COLON

3.2.1. SCOPUL STUDIULUI

Rezultatele obținute anterior au demonstrat că extractele alcoolice și apoase de MP joacă un rol important în procesul de creștere celulară. Scopul studiului a fost de a analiza efectele extractelor etanolice și apoase de *Myrmecodia* asupra producției de IL8.

3.2.2. OBIECTIVE

Obiectivul a fost de a cuantifica secreția de IL8 în celulele neoplazice de carcinom de colon incubate 24h, 48h și 72h cu extracte de *M. pendans*.

3.2.3. IPOTEZE

Ipotezele de lucru au fost:

(I) există corelații între tipul de solvent și efectul antiangiogenic exprimat de sinteza de IL8

(II) extractele de MP afectează celulele carcinomatoase de colon într-o manieră dependentă de doză și timpul de incubare cu extracte

MATERIAL ȘI METODĂ

Analiza sintezei IL8 s-a efectuat prin tehnica Elisa (IL8 Human Elisa Kit, Boster Biological Technology Pleasanton CA, SUA). Pentru cuantificarea nivelurilor de IL8, am realizat curba standard de calibrare (densitate optică vs. concentrație), folosind următoarele soluții de calibratori: 0 - 15,6 - 31,2 - 62,5 - 125 - 250 - 500 - 1000 pg/mL. Domeniul de testare pentru această metodă a fost cuprins între 15,6pg/ml și 1000,0 pg/mL. Densitatea optică a fost măsurată la 450 nm, folosind cititorul de microplăci Tecan.

REZULTATE

Deși am demonstrat efectele antioxidante și antiproliferative ale extractelor etanolice și apoase de *M. pendans*, activitatea acestor extracte asupra celulelor CaCo2 nu a produs modificări semnificative statistic asupra sintezei de IL8. Nivelul de IL8 din supernatantul obținut după centrifugarea suspensiilor celulare, nu a fost semnificativ diferit față de control, în pofida concentrațiilor sau perioadelor de incubare cu extracte. În schimb, la expunerea celulelor HCT116 la diferitele concentrații de extracte, am obținut valori semnificative statistic între loturile experimentale comparativ cu lotul control (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ și *** $p \leq 0,001$).

CAPITOLUL 4

EVALUAREA POTENȚIALULUI ANTITUMORAL AL LICHIDELOR IONICE

4.1. SCOPUL STUDIULUI

Realizarea de investigații cu privire la aplicațiile lichidelor ionice (LI) pe bază de amoniu, hexilamoniu, metilimidazoliu, metilpirimidină (clorura de tetrabutil amoniu, bromura de 1butil-3metilimidazoliu, clorura de 1butil-4metilpirimidina, bromura de tetrahexilamoniu), în medicină în ceea ce privește acțiunea lor asupra procesului de dezvoltare celulară și tumorigeneză.

4.2. OBIECTIVE

Obiectivul general al acestui studiu a fost acela de a evidenția potențialul LI în aplicațiile biomedicale, respective de a evalua activitatea lor în cancerul de colon, având în vedere că LI pot fi adaptate pentru a satisface o gamă largă de necesități medico-farmaceutice. Obiectivele specifice au fost: analiza potențialului citotoxic al LI asupra celulelor neoplazice de colon CaCO₂ în sisteme standard de cultură celulară 2D (bidimensional), stabilirea concentrației minime inhibitorii, generarea constructelor 3D, analiza efectelor LI asupra procesului de adezivitate celulară în sisteme celulare 3D (tridimensionale).

4.3. IPOTEZE

Ipotezele de lucru au urmărit: structura LI, respectiv lungimea lanțului alchilic și ionul atașat, influența efectului citotoxic, dacă concentrația și timpul de incubare afectează tumorigeneza.

4.4. MATERIAL ȘI METODE

Materialul biologic a fost reprezentat de linia celulară de adenocarcinom de colon, linia CaCo2 (human colon adenocarcionoma)(ATCC cell line). Materialele și consumabilele pentru cultura celulară au fost obținute de la producătorul Invitrogen și ThermoScientific. Lichidele ionice au fost achiziționate de la furnizorul Sigma-Aldrich. Celulele liniei CaCo₂ au fost cultivate *in vitro* în vederea multiplicării. După atingerea confluenței au fost însămânțate în mediu specific și incubate cu concentrații diferite de lichide ionice.

Analiza citotoxicității LI asupra sistemelor celulare 2D: celulele au fost incubate cu LI 24h, 48h și 72h. Ulterior am evaluat proliferarea celulară și fenotipul celular.

Analiza potențialului antitumoral al LI, *in vitro* asupra agregatelor celulare 3D

4×10^4 celule/ml în 100 μ l de mediu (4×10^3 celule/godeu) au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri (NunclonSphera, Thermo Fisher Scientific, Inc.). După 4 zile și după adăugarea de mediu specific proaspăt cu diferite concentrații de IL, plăcile au fost menținute într-un incubator la 37°C cu 5% CO₂ timp de 72 de ore. Toate determinările au fost efectuate în triplicat. Pentru a determina efectele LI asupra proliferării celulelor Caco-2, am realizat testul cu Alamar albastru. Morfologia celulară a fost analizată utilizând microscopul inversat cu contrast de fază Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss), iar imaginile au fost preluate cu camera video Axio Cam 1CC1. Analiza statistică a fost efectuată cu programul Medcalc v20:015.

4.5. REZULTATE

Evaluarea proliferării celulare

Am evaluat capacitatea antitumorală *in vitro* a LI, asupra celulelor neoplazice de colon CaCo2. Celulele au fost tratate cu concentrații diferite, variind de la 1mM până la 10mM, soluții obținute prin diluția în mediu de cultură specific a TBAC_LI, [BMIM][BR]_LI, 4MBPC_LI și THABr_LI. Celule au fost inițial cultivate în sistem 2D, în monostrat. La 24h, 48h și respectiv 72h post-tratament, am analizat rata de proliferare/inhibiție a proliferării celulare prin testul MTT.

După o incubare de 24h, am remarcat scăderea proliferării celulare dependentă de doza aplicată pentru LI1 și IL4. Pentru celelalte lichide, am remarcat o scădere a multiplicării celulare independent de doza aplicată. Rata de inhibiție a fost marcată la doza de 10mM a LI1 (aproximativ 40%). Pentru celelalte lichide, la toate concentrațiile aplicate proliferarea celulară a fost peste 50%.

La 48h, inhibiția proliferării celulare a fost mai marcată, însă pentru LI2 și LI3, la dozele mici aplicate (1mM-0.1mM) nu s-a evidențiat o scădere semnificativă a înmulțirii celulelor neoplazice. O scădere marcată a ratei de proliferare ($\leq 50\%$) a fost observată la concentrațiile cuprinse între 10mM – 0.5mM LI1, respectiv 10mM pentru IL2, IL3 și IL4. La incubarea de 72h, s-a remarcat un pattern similar al ratei de inhibiție.

Evaluarea morfologiei celulare și a sferoidelor 3D

Aprecierea morfologiei celulare s-a realizat la microscopul cu contrast de fază. La 24h de incubare, am observat leziuni celulare severe la loturile expuse la clorura de tetrabutil amoniu, în special la dozele de 10mM și 5mM. Dacă la incubarea cu doze mai scăzute de TBAC_IL am evidențiat leziuni minime de

degenerescență celulară, la concentrațiile menționate anterior am observat frecvente leziuni de agonie și moarte celulară, evidențiate prin apoptoze și leziuni necrotice. Pentru aceeași perioadă de incubare, la loturile expuse la bromura de 1butil-3 metilimidazoliu și clorura de 1butil-4metilpirimidina, am observat un comportament celular similar, respectiv, la dozele crescute de lichid ionic leziunile observabile microscopic au fost ocazionale la doza minimă de incubare și moderate la celelalte doze utilizate în studiul experimental. La grupurile experimentatele tratate cu bromura de tetrahexilamoniu, la 24h de expunere la LI, celulele au exprimat alterări morfologice moderate, în cea mai mare parte reduse ca și intensitate. În cazul tratării celulelor liniei de adenocarcinom de colon CaCo2, timp de 24h cu clorura de tetrabutilamoniu, pentru dozele cu prinse între 10mM și 0.5mM, am observat alterări severe și frecvente ale morfologiei celulare: numeroase celule flotante, alungirea celulelor, corpi apoptotici, precum și liză și fragmentare celulară. Același patern a fost observat la expunerea de 48h, la doza de 10mM cu bromura de 1butil-3 metilimidazoliu, clorura de 1butil-4metilpirimidina și bromura de tetrahexilamoniu. Incubarea de 72h cu lichidele ionice a avut drept consecință frecvente alterări severe ale fenotipului celular pentru clorura de tetrabutilamoniu (concentrațiile 10mM-0.5mM) și bromura de tetrahexilamoniu (10mM). La celelalte doze leziunile au fost minime sau similare lotului control.

CONCLUZII

- ✚ Activitatea antioxidantă a fost dependentă de concentrația extractului, fiind în același timp influențată de solventul de extracție. Cea mai mare parte a compușilor antioxidanți au fost obținuți prin extracție cu solvenți alcoolici, urmată de extractele apoase și, în final cele în N-hexan.
- ✚ Extractele de M.P. au determinat o inhibarea a proliferării celulelor CaCo2, într-o manieră dependentă de doza aplicată pentru pentru toți solvenții luați în studiu la expunerea de 24h, pentru extractele apoase și alcoolice la incubarea de 48h, precum și în cazul extractelor etanolice la 72h. Extractul realizat în solventul hexan nu a determinat o inhibiție semnificativă a creșterii celulare. Indicele IC50 a fost atins de extractele apoase și etanolice, pentru concentrațiile crescute, la 48h și 72h ore post-tratament. În cazul loturilor experimentale cu celule HCT116, tratamentul cu extracte alcoolice au avut drept consecință inhibarea semnificativă a proliferării celulare, deși IC50 a fost atins doar în cazul

extractelor metanolice cu concentrație mare la o expunere de 24h și a extractelor apoase cu concentrație mare, la incubare de 72h. În același timp, soluțiile de hexan au determinat o scădere redusă a multiplicării celulelor HCT116.

- ✚ Rezultatele obținute în urma testului MTT se corelează cu cele evidențiate de analiza potențialului antioxidant al extractelor, compușii antioxidanți extrași în solvenții alcoolici și apă determinând scăderea ratei de multiplicare celulară și/sau determinând moarte celulară.
- ✚ Am evidențiat alterări ale fenotipului celulelor neoplazice de adenocarcinom de colon, în special la loturile de celule tratate cu extracte apoase și alcoolice. Modificările fenotipice celulare au variat de la leziuni minime (vacuolări intracitoplasmice, balonizări celulare), ajungând la leziuni mai severe caracteristice fenomenului de moarte celulară, prin necroză și apoptoză. Modificările morfologice celulare au fost proporționale cu tipul și doza de extract, precum și cu timpul de expunere. Extractele obținute în hexan au determinat leziuni minime, în cea mai mare parte imaginile microscopice fiind similare cu cele ale lotului control. Același model l-am evidențiat și la loturile de celule HCT116 modificările morfologice fiind prezente, dar de intensitate mai redusă la loturile incubate cu soluțiile extrase în hexan.
- ✚ Secreția de IL8 nu a fost influențată într-o manieră semnificativă statistic în celulele CaCo2. Cuantificarea sintezei IL8 *in vitro*, în celulele cancerului de colon incubate cu extracte de *M. pendans*, a fost la data publicării primul raport din literatura de specialitate.

Gradul de severitate al leziunilor celulare s-a corelat cu profilul antioxidant și antiproliferativ al extractelor.

TBAC_LI a determinat inhibiția multiplicării celulelor CaCo2 în sistemele 2D, într-o manieră dependentă de timpul de incubare. Dependența de doză a fost observată la 48h, 72h la toate dozele, iar la 24h de ore doar la concentrațiile de 10-5mM. La 24h de expunere la doze de 0.5-0.1mM, inhibiția a fost nesemnificativă. IC50 a fost observat la expunerea de 24h pentru 10mM, la toate celelalte concentrații pentru expunerea de 48h și 72h (cu excepția 0.1mM). Inhibiția a fost independentă de concentrație în sistemele 3D.

În sistemele 2D, expunerea celulelor neoplazice la [BMIM][BR]_LI a avut drept consecință o inhibiție moderată dependentă de concentrație pentru expunerea la LI pe o perioadă de 48h și 72h. IC50 a fost observat la incubare

cu 10mM, 48h. La dozele mici de [BMIM][BR]_LI s-a observat stimularea înmulțirii celulare, la 48h (0.1mM), precum și la 72h (0.5mM și 0.1mM).

4MBPC a determinat reducerea semnificativă statistic la doze de 5-10mM, aplicate la toate intervalele de timp, precum și pentru 1mM la 24h, respectiv 72h. IC50 a fost atins de doza 10mM, timp de expunere 48h. Concentrațiile de 0.1mM (48h) și 0.5mM-0.1mM (72h) au stimulat dezvoltarea culturii celulare neoplazice.

THABr_LI a determinat răspuns dependent de doză și timp, în ceea ce privește rata de multiplicare celulară, inhibarea fiind însă moderată, fără a atinge concentrația minimă inhibitorie.

Analiza loturilor experimentale 3D a evidențiat o reducere moderată a ratei de proliferare celulară la loturile incubate cu TBAC_LI, [BMIM][BR]_LI și THABr_LI și 4MBPC, independent de concentrație cu excepția lotului tratat cu 4MBPC.

Gradul de afectare al fenotipului celular a fost dependent de doza aplicată.

În celulele cultivate în sistemul 3D, LI nu au provocat o inhibare crescută a creșterii celulare (IC50 nu a fost atinsă la nicio concentrație aplicată), cu toate acestea, TBAC_LI și THABr_LI inhibă agregarea celulară în structurile 3D.

Doza de LI care determină o concentrație minimă inhibitorie a variat în funcție de tipul de lichid ionic. Cu toate acestea, valoarea IC50 caracteristică pentru toate lichidele a fost de 10m.

Lichidele ionice cu cation amoniu și anion clorură, au produs efecte citotoxice la celulele tumorale superioare, comparativ cu celelalte lichide.

Lichidele ionice pe bază de amoniu au indus scăderea capacității de adezivitate celulară, cel mai probabil prin alterări structurale ale plasmalemei.

Gradul de noutate al studiului nostru este reprezentat de analiza comparativă a efectelor citotoxice ale lichidelor ionice, în culturi celulare 2D și 3D.