

**„VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT II**

GROSU CRISTINA-DANIELA



ABSTRACT

**PLANT-DERIVED COMPOUNDS IN SKIN
PATHOLOGY: INSIGHTS INTO PHOTODERMATITIS
AND SKIN CANCER THERAPY**

Scientific Coordinator

PROF. UNIV. DR. VLAIA LAVINIA LIA

**Timișoara
2025**

CONTENTS

1. INTRODUCTION	3
2. AIM.....	4
3. RESULTS.....	5
3.1. MYRICETIN-FISETIN COMBINATORIAL TREATMENT AS A POTENTIAL STRATEGY FOR CUTANEOUS MELANOMA	5
3.2. THE ASSOCIATION BETWEEN FISETIN AND RUTIN TRIGGERS AN ENHANCED CYTOTOXICITY IN A431 AND A375 SKIN CANCER CELLS.....	10
4. CONCLUSIONS	14

ABSTRACT

1. INTRODUCTION

Phytophotodermatitis induced by phototoxic plants represents a fascinating intersection between botany, dermatology, and environmental health, with wider implications for both clinical practice and public awareness. Continuing to investigate the complexity of plant-induced phototoxicity through interdisciplinary research may pave the way for innovative approaches to the prevention, diagnosis, and treatment of this dermatological condition.

Recent advancements in our understanding of phytophotodermatitis, a condition caused by phototoxic plants, provide a more nuanced insight into the dual function of natural substances in skin health. When exposed to longwave UVA light, phototoxic substances like psoralens, a class of furocoumarins present in plants like citrus fruits, parsnips, and celery, can create DNA crosslinks, oxidative cellular damage, and inflammatory skin reactions like erythema, blistering, and persistent hyperpigmentation. However, these compounds' photoreactivity has also been utilized therapeutically, most notably in PUVA therapy (psoralen + UVA), which treats vitiligo, psoriasis, and cutaneous T-cell lymphoma by carefully administering psoralen and then exposing the patient to UVA. Additionally, a large number of chemicals produced from plants that have the potential to be phototoxic also have anticancer or chemopreventive qualities, particularly when it comes to skin cancer.

Therefore, research on phototoxic plant compounds not only sheds light on the processes causing skin damage but also suggests that natural compounds may have therapeutic value. It highlights how phototoxic chemicals, when applied carefully, can be used as both effective treatments and diagnostic tools in dermatology and oncology, illuminating the delicate balance between toxicity and benefit.

With its increasing frequency and ongoing treatment limitations, including toxicity and therapeutic resistance, cutaneous melanoma is a major global health concern. Because of their known antiproliferative and pro-apoptotic characteristics, flavonoids such as fisetin (FIS), myricetin (MYR), and rutin (RUT) are potential options for alternative treatment approaches.

2. AIM

The first part of this thesis exposes the complex mechanisms underlying phytophotodermatitis induced by phototoxic plants, emphasizing the pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis, and management of this dermatological condition. Through an in-depth review of the literature, it is evident that the interactions between plant-derived psoralens or furocoumarins and ultraviolet radiation play an essential role in the occurrence of phytophotodermatitis. The second chapter presents the main classes of natural compounds useful in skin cancer.

The special part includes personal contributions, a detailed *in vitro* examination of FIS, MYR, and RUT on skin cancer cellular behavior. The first study evaluated the individual and combined effects of MYR and FIS on the murine melanoma cell line (B164A5), as well as on normal murine epidermal cells (JB6 Cl 41-5a), aiming to determine whether their combination offers enhanced anticancer activity with selectivity toward malignant cells. Further, the second *in vitro* study aimed to investigate whether combining FIS and RUT produces greater cytotoxic effects against human skin cancer cells (epidermoid carcinoma - A431 and malignant melanoma - A375 lines) compared to each compound used separately. Healthy and cancerous cells were treated for 24 hours with varying concentrations of FIS, RUT, MYR, and their combination. Cell viability was measured using the MTT assay, while morphological changes were observed microscopically. The

alterations in nuclei and mitochondria were examined using the Hoechst and MitoTracker methods.

3. RESULTS

3.1. MYRICETIN-FISETIN COMBINATORIAL TREATMENT AS A POTENTIAL STRATEGY FOR CUTANEOUS MELANOMA

As an initial step in examining the impact of the two compounds, as well as their association, cell viability was assessed 24 hours after treatment for both B164a5 cells and healthy epidermal cells - JB6 Cl 41-5a by the MTT technique.

For the treatment of B164a5 cells (Figure 1A), the results showed a dose-dependent decrease for all compounds; thus, for MYR at the highest concentration of 40 μ M, the percentage of viable cells reached about 66%, while for FIS at the same concentration of 40 μ M, the percentage achieved 63%. For the association of the two compounds at 20 μ M, the cell viability was approximately 53%, at 30 μ M it reached 50%, while for the combination of the two highest concentrations of 40 μ M, the percentage of viable cells reached the threshold of approximately 49%. In the case of treatment of healthy epidermal JB6 Cl 41-5a cells (Figure 1B), MYR at concentrations of 20 and 30 μ M showed cell stimulation, while the highest tested concentration of 40 μ M slightly decreased the viability up to about 96 %.

For FIS, the lowest tested concentration (20 μ M) decreased the viability up to 82 %, while the highest tested concentration (40 μ M) reduced the viability of the cells up to about 68 %. When the two compounds MYR and FIS were combined, the decrease in cell viability was also dose-dependent, with the lowest percentage occurring at 40 μ M, i.e., 89%.

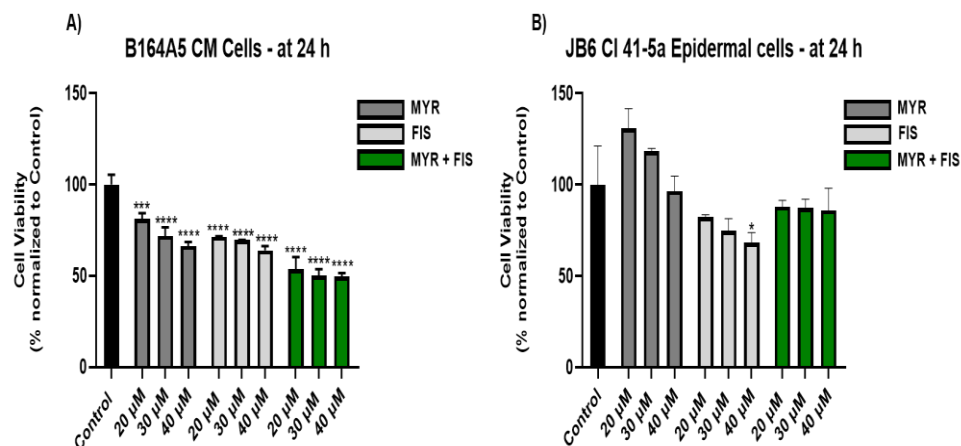


Figure 1. Graphical representation of cell viability percentages 24 hours after treatment of B164A5 cells (A) and JB6 Cl 41-5a cells (B) with MYR (20, 30, 40 μ M), FIS (20, 30, 40 μ M), and the combinations between MYR + FIS (20, 30, 40 μ M).

The obtained results for B164a5 cells (Figure 2A) revealed that in the case of MYR treatment, a dose-dependent decrease in cell confluence was obtained. For FIS treatment, in the same manner, cell confluence decreases in a concentration-dependent manner, and dysmorphologies such as cell elongation, cell shrinkage appear at both 30 μ M and 40 μ M concentrations. For the association between the two compounds, a prominent decline in confluence was noticed from the lowest concentrations (20 and 30 μ M) compared to untreated cells, the reduction being dose-dependent.

Furthermore, for MYR+FIS, frequent dysmorphologies such as cell elongation, cell rounding, and cell shrinkage can be observed starting at the lowest concentrations, and traces of cell debris can be observed at the highest concentration tested (40 μ M). Regarding healthy JB6 Cl 41-5a cells, according to Figure 2B, MYR did not induce any morphological changes, maintaining the specific

appearance of the cells throughout the treatment. For FIS-treated cells, a slight decrease in confluence and signs of debris can be observed starting at the mid concentration of 30 μM . When the two compounds were combined, a slight decrease in confluence could be observed only at the concentration of 40 μM .

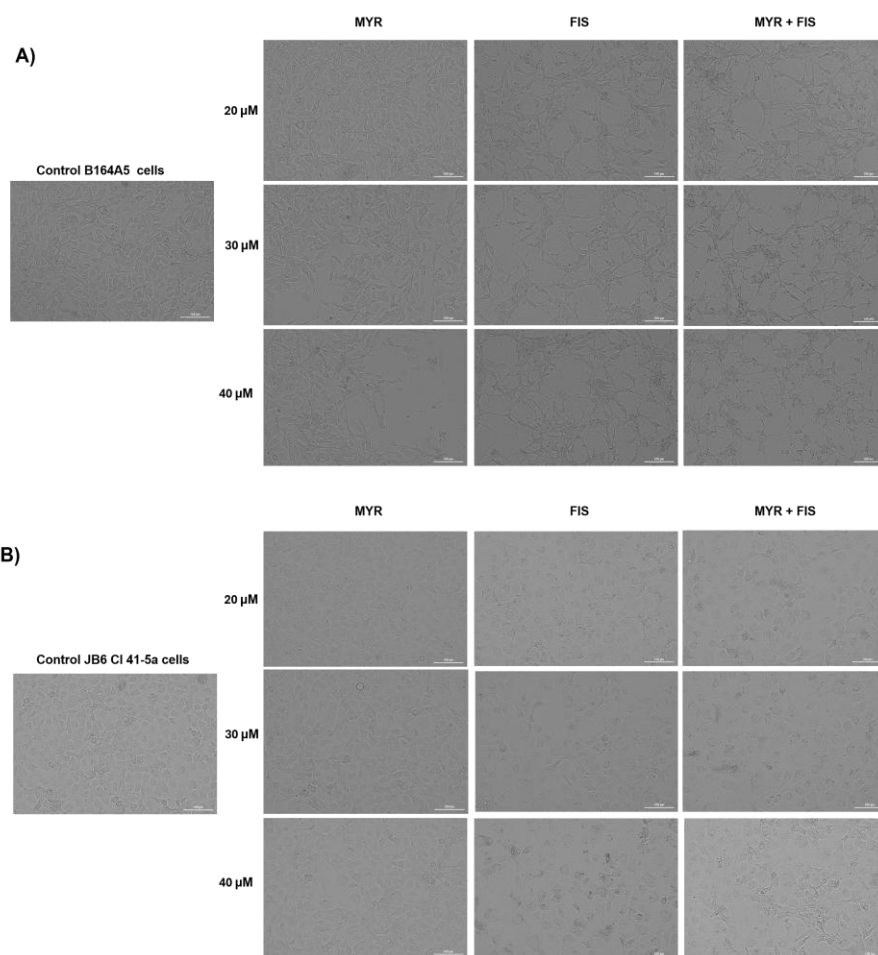


Figure 2. Representative images illustrating the morphological changes observed at 24 h of treatment of B164A5 cells (A) and JB6 Cl 41-5a cells (B) with MYR (20, 30, 40 μM), FIS (20, 30, 40 μM) and the combinations between MYR + FIS (20, 30, 40 μM).

As shown in Figure 3, MYR exhibited no significant nuclear changes, with the cells retaining their nuclear shape similar to those shown in control cells. FIS decreased nuclear confluence and induced dysmorphologies characterized by condensed nuclei with reduced size and shape (white arrows).

The combination of MYR+FIS produced major dysmorphologies, including massive chromatin condensation, nuclear shrinkage, shape irregularities, and a significant reduction in the number of nuclei (white arrows).

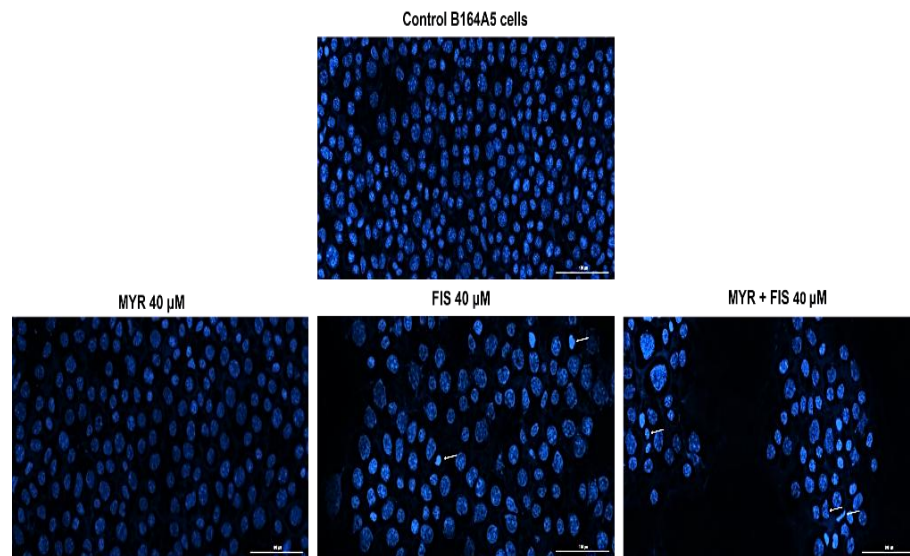


Figure 3. Representative images showing the changes in nuclear morphology at 24 h of treatment of B164A5 CM cells with MYR (40 μ M), FIS (40 μ M), and the combinations between MYR + FIS (40 μ M)

According to Figure 4, MYR 40 μ M did not produce significant effects on mitochondria compared to untreated cells, whereas FIS 40 μ M and the combinatorial treatment (at 40 μ M) produced a massive mitochondrial condensation

(white arrows), mitochondrial damage being more frequent and specific in the case of associative treatment (MYR + FIS).

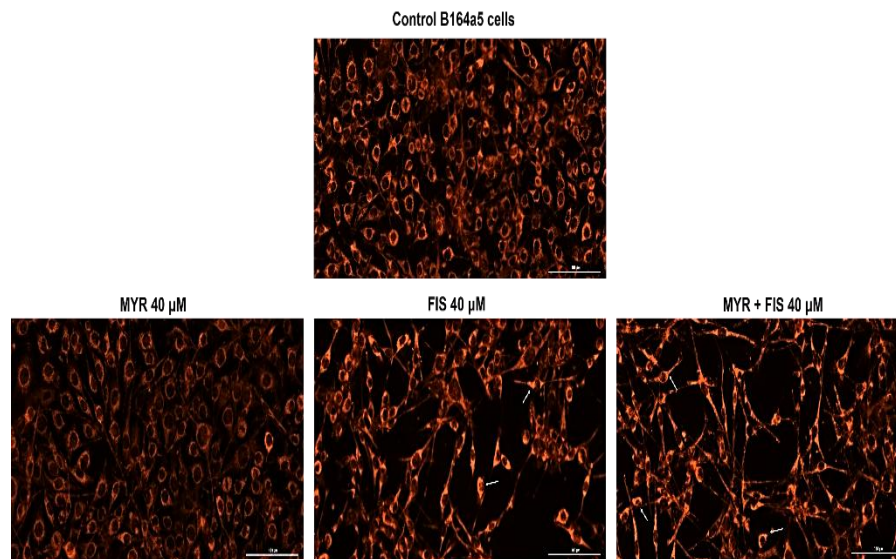


Figure 4. Representative images showing the changes in mitochondrial morphology at 24 h of treatment of B164A5 CM cells with MYR (40 μ M), FIS (40 μ M), and the combinations between MYR + FIS (40 μ M)

3.2. THE ASSOCIATION BETWEEN FISETIN AND RUTIN TRIGGERS AN ENHANCED CYTOTOXICITY IN A431 AND A375 SKIN CANCER CELLS

In the case of treatment of A431 cells with FIS (Figure 5A), the results obtained indicated that cell viability decreased in a concentration-dependent manner, i.e., treatment with 30 μ M FIS reduced cell viability to 40% and the highest concentration tested of 50 μ M produced a decline in cell viability to a threshold of 31%.

Treatment with RUT in A431 cells (Figure 5B) exhibited a dose dependent reduction in cell viability, reaching at the highest concentration tested (50 μ M) a percentage of 64%. The combinatorial treatment between RUT and FIS (Figure 5C) resulted in a decreasing cell viability under the same dose-dependent trend, with the percentages gradually diminishing with increasing dose from 36% (at the lowest concentration of 30 μ M) to 26% (at 50 μ M).

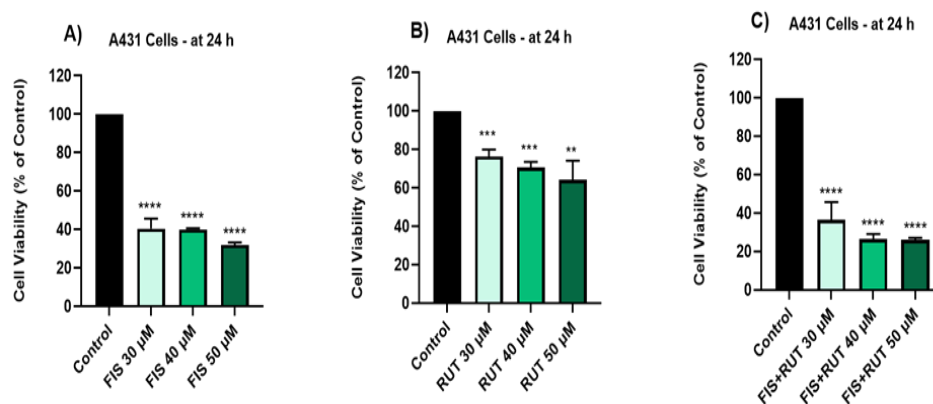


Figure 5. Graphical representation of cell viability percentages 24 hours after treatment of A431 cells with (A) FIS (30, 40, 50 μ M), (B) RUT (30, 40, 50 μ M), and (C) the combinations between FIS and RUT (30, 40, 50 μ M).

For A375 cells, the treatment with FIS (Figure 6A) slightly reduced the cell viability concentration-dependently up to 87%, which was observed at the highest concentration examined, i.e., 50 μM ; and according to Figure 6B, RUT decreased cell viability up to 91%. The associative treatment of FIS + RUT (Figure 6C) provided for the 30 μM treatment a cell viability of 83%, at the 40 μM treatment, the cell viability decreased to 80%, while at the highest concentration of 50 μM , the threshold of about 74% was reached.

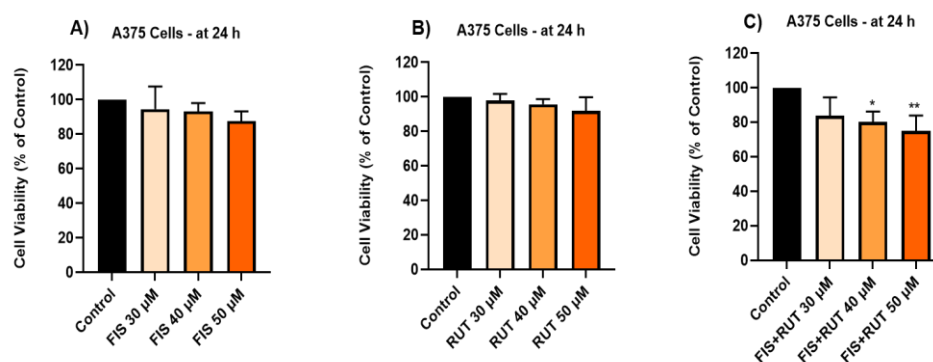


Figure 6. Graphical representation of cell viability percentages 24 hours after treatment of A375 cells with (A) FIS (30, 40, 50 μM), (B) RUT (30, 40, 50 μM), (C), and the combinations between FIS and RUT (30, 40, 50 μM).

The next step of the investigation of FIS, RUT, and FIS+RUT combinatorial treatment after 24 hours of treatment on A431 and A375 cells was to analyze the cell morphology. In the case of A431 cells, as shown in Figure 7, FIS treatment produced a dose-dependent decrease in cell confluence, with the highest concentration of 50 μM showing a massive rounding of the shape and a decrease in size.

Application of RUT treatment decreased cell confluence gradually and produced cell rounding at 50 μM , while the combinatorial treatment between FIS and RUT showed dysmorphologies from the lowest concentration of 30 μM that were accentuated in a dose-dependent manner up to 50 μM , where a massive cell rounding, reduced confluence, and signs of detachment of cells from the plate were noticed.

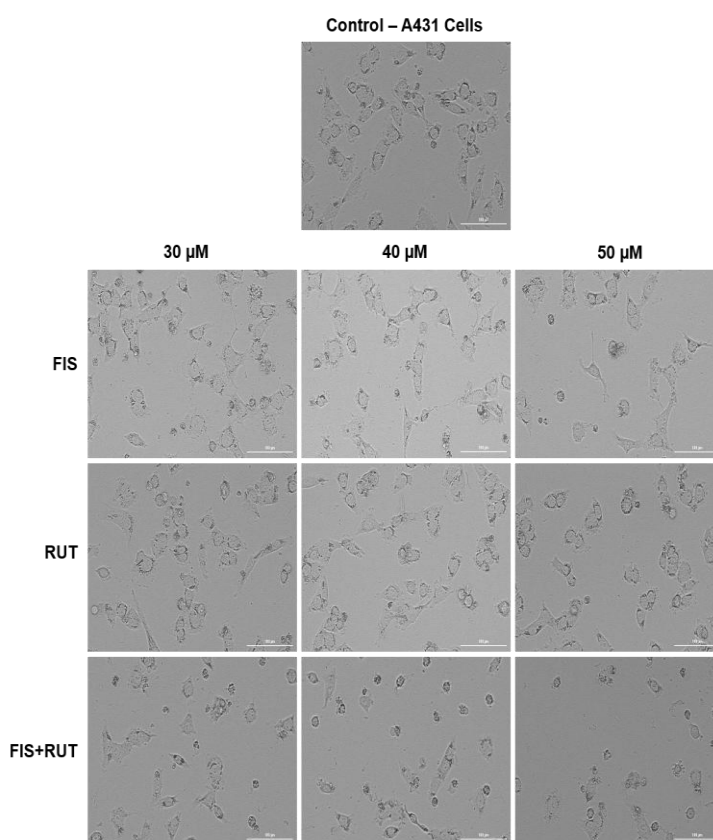


Figure 7. Representative images illustrating the morphological changes observed at 24 h of treatment of A431 cells with FIS (30, 40, 50 μM), RUT (30, 40, 50 μM), and combinations between FIS + RUT (30, 40, 50 μM)

For A375 cells (Figure 8), the 24 h treatment with FIS and RUT did not induce significant changes in cell morphology. In contrast, upon application of the combinatorial treatment between FIS and RUT, at the highest tested concentration of 50 μ M, slight signs of detachment of the cells from the plate and a reduction in confluence could be observed.

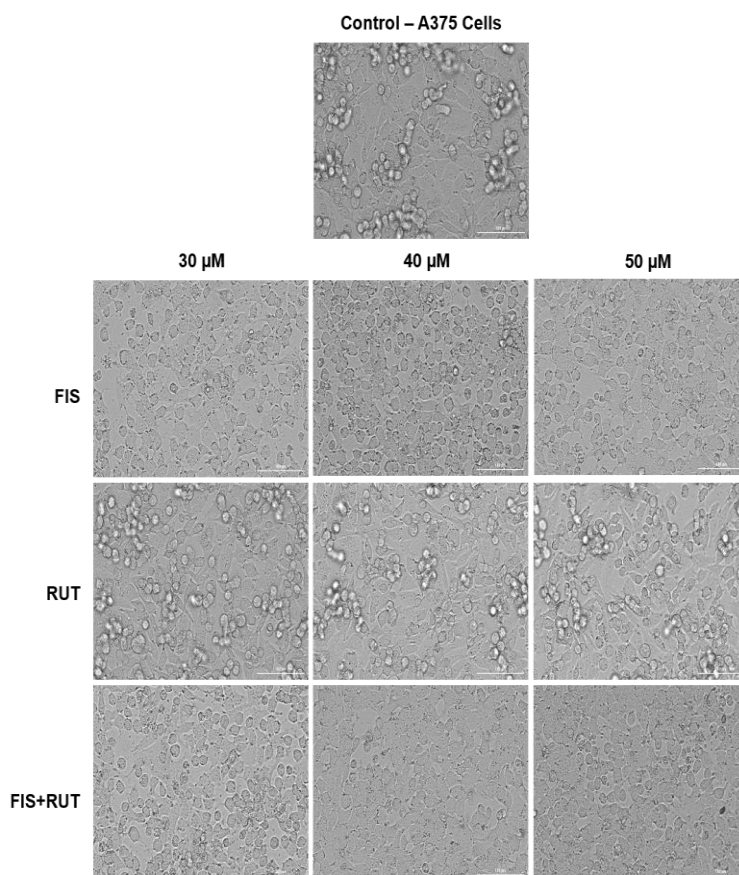


Figure 8. Representative images illustrating the morphological changes observed at 24 h of treatment of A375 cells with FIS (30, 40, 50 μ M), RUT (30, 40, 50 μ M), and combinations between FIS + RUT (30, 40, 50 μ M)

4. CONCLUSIONS

The first study emphasizes the synergistic potential of myricetin and fisetin as a targeted and successful *in vitro* treatment for cutaneous melanoma. This combinatorial treatment provides a strong preclinical basis for further research in melanoma therapy because it not only increases anticancer activity but also protects healthy cells. The combined effects of MYR and FIS were noticeably greater than those of either compound alone when it came to decreasing cell viability. Moreover, significant dysmorphology, reduced cell counts, apoptotic-like nuclei, and mitochondrial damage were all seen in treated B164A5 melanoma cells.

Additionally, in the second research, fisetin and rutin, when combined, exhibited stronger cytotoxic effects than either substance did when used alone. One of the effects was a dose-dependent decrease in cell viability. Significant morphological changes, including variations in cell shape and appearance, were seen in treated cells as the concentration increased.

According to the studies, a combination of FIS and RUT or FIS and MYR may be a promising treatment option for skin cancer, offering increased efficacy compared to monotherapy. However, further studies are needed, focused on elucidating the molecular processes underlying the observed impacts, confirming effectiveness in increasingly intricate 3D model systems, and investigating methods for nanoformulation to increase efficacy and delivery.

**„UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENT II**

GROSU CRISTINA-DANIELA



REZUMAT

**COMPUȘII DERIVAȚI DIN PLANTE ÎN PATOLOGIA
CUTANATĂ: PERSPECTIVE ASUPRA
FOTODERMATITEI ȘI TERAPIEI CANCERULUI DE
PIELE**

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. VLAIA LAVINIA LIA

**Timișoara
2025**

CUPRINS

1. INTRODUCERE	3
2. SCOP	4
3. REZULTATE	5
3.1. TRATAMENT COMBINAT MYRICETIN-FISETIN CA STRATEGIE POTENȚIALĂ PENTRU MELANOMUL CUTANAT	5
3.2. ASOCIEREA DINTRE FISETINĂ ȘI RUTINĂ DECLANSEAZĂ O CITOTOXICITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ ÎN CELULE CANCERULUI DE PIELE A431 ȘI A375.....	10
4. CONCLUZII	15

REZUMAT

1. INTRODUCERE

Fitofotodermatita indusă de plantele fototoxice reprezintă o intersecție fascinantă între botanică, dermatologie și sănătatea mediului, cu implicații mai largi atât pentru practica clinică, cât și pentru conștientizarea publicului. Continuarea investigării complexității fototoxicității induse de plante prin cercetare interdisciplinară poate deschide calea pentru abordări inovatoare pentru prevenirea, diagnosticarea și tratamentul acestei afecțiuni dermatologice.

Progresele recente în înțelegerea fitofotodermatitei, o afecțiune cauzată de plantele fototoxice, oferă o perspectivă mai nuanțată asupra funcției duale a substanțelor naturale în sănătatea pielii. Atunci când sunt expuse la lumina UVA cu undă lungă, substanțele fototoxice precum psoralenii, o clasă de furocumarine prezente în plante precum citricele, păstârnacul și țelina, pot crea legături încrucișate ale ADN-ului, leziuni celulare oxidative și reacții inflamatorii cutanate precum eritem, vezicule și hiperpigmentare persistentă. Totuși, fotoreactivitatea acestor compuși a fost utilizată și terapeutic, în special în terapia PUVA (psoralen + UVA), care tratează vitiligo, psoriazis și limfomul cutanat cu celule T prin administrarea atentă a psoralenului și apoi expunerea pacientului la UVA. În plus, un număr mare de substanțe chimice produse din plante care au potențialul de a fi fototoxice au, de asemenea, calități anticancerigene sau chimiopreventive, în special când vine vorba de cancerul de piele.

Prin urmare, cercetările asupra compușilor vegetali fototoxici nu numai că scot la iveală procesele care cauzează leziuni ale pielii, dar sugerează și că acești compuși naturali pot avea valoare terapeutică. Acestea evidențiază modul în care substanțele chimice fototoxice, atunci când sunt aplicate cu atenție, pot fi utilizate

atât ca tratamente eficiente, cât și ca instrumente de diagnostic în dermatologie și oncologie, evidențiind echilibrul delicat dintre toxicitate și beneficii.

Cu frecvența sa tot mai mare și limitările continue ale tratamentului, inclusiv toxicitatea și rezistența terapeutică, melanomul cutanat reprezintă o problemă majoră de sănătate la nivel global. Datorită caracteristicilor lor antiproliferative și pro-apoptice cunoscute, flavonoidele precum fisetina (FIS), miricetina (MYR) și rutina (RUT) sunt opțiuni potențiale pentru abordări alternative de tratament.

2. SCOP

Prima parte a acestei teze expune mecanismele complexe care stau la baza fitofotodermatitei induse de plantele fototoxice, subliniind fiziopatologia, manifestările clinice, diagnosticul și gestionarea acestei afecțiuni dermatologice. Printr-o analiză aprofundată a literaturii de specialitate, este evident că interacțiunile dintre psoralenii sau furocumarinele derivate din plante și radiațiile ultraviolete joacă un rol esențial în apariția fitofotodermatitei. Al doilea capitol prezintă principalele clase de compuși naturali eficienți în cancerul de piele.

Partea specială include contribuții personale, o examinare *in vitro* detaliată a FIS, MYR și RUT asupra comportamentului celular al cancerului de piele. Primul studiu a evaluat efectele individuale și combinate ale MYR și FIS asupra liniei celulare de melanom murin (B164A5), precum și asupra celulelor epidermice murine normale (JB6 Cl 41-5a), cu scopul de a determina dacă combinația lor oferă o activitate anticancerigenă sporită, cu selectivitate față de celulele maligne. În plus, al doilea studiu *in vitro* a investigat dacă combinarea FIS și RUT produce efecte citotoxice mai mari împotriva celulelor canceroase ale pielii umane (carcinom epidermoid – celule A431 și melanom malign - celule A375) comparativ cu fiecare compus utilizat separat. Celulele sănătoase și canceroase au fost tratate timp de 24 de ore cu concentrații variabile de FIS, RUT, MYR și combinații ale acestora.

Viabilitatea celulară a fost măsurată utilizând testul MTT, în timp ce modificările morfologice au fost observate microscopic. Alterările nucleilor și mitocondriilor au fost examinate utilizând metodele Hoechst și MitoTracker.

3. REZULTATE

3.1. TRATAMENTUL COMBINAT MYRICETINĂ-FISETINĂ CA STRATEGIE POTENȚIALĂ PENTRU MELANOMUL CUTANAT

Ca un pas inițial în examinarea impactului celor doi compuși, precum și a asocierii lor, viabilitatea celulară a fost evaluată la 24 de ore după tratament atât pentru celulele B164A5, cât și pentru celulele epidermice sănătoase - JB6 Cl 41-5a prin tehnica MTT.

Pentru tratamentul celulelor B164a5 (Figura 1A), rezultatele au arătat o scădere dependentă de doză pentru toți compușii; astfel, pentru MYR la cea mai mare concentrație de 40 μ M, procentul de celule viabile a atins aproximativ 66%, în timp ce pentru FIS la aceeași concentrație de 40 μ M, procentul a atins 63%. Pentru asocierea celor doi compuși la 20 μ M, viabilitatea celulară a fost de aproximativ 53%, la 30 μ M a atins 50%, în timp ce pentru combinarea celor două concentrații mai mari de 40 μ M, procentul de celule viabile a atins pragul de aproximativ 49%. În cazul tratamentului celulelor epidermice sănătoase JB6 Cl 41-5a (Figura 1B), MYR la concentrații de 20 și 30 μ M a demonstrat o stimulare celulară, în timp ce cea mai mare concentrație testată de 40 μ M a scăzut ușor viabilitatea până la aproximativ 96%.

Pentru FIS, cea mai mică concentrație testată (20 μ M) a scăzut viabilitatea până la 82%, în timp ce cea mai mare concentrație testată (40 μ M) a redus viabilitatea celulelor până la aproximativ 68%. Când cei doi compuși MYR și FIS au

fost combinați, scăderea viabilității celulare a fost, de asemenea, dependentă de doză, cel mai mic procent înregistrându-se la 40 μ M, adică 89%.

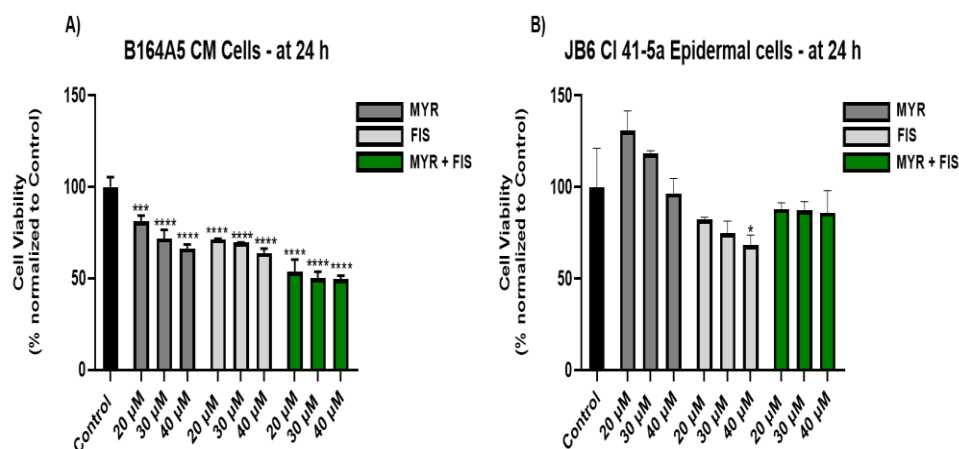


Figura 1. Reprezentare grafică a procentelor de viabilitate celulară la 24 de ore după tratarea celulelor B164A5 (A) și a celulelor JB6 Cl 41-5a (B) cu MYR (20, 30, 40 μ M), FIS (20, 30, 40 μ M) și combinațiile dintre MYR + FIS (20, 30, 40 μ M).

Rezultatele obținute pentru celulele B164a5 (Figura 2A) au relevat că, în cazul tratamentului cu MYR, s-a obținut o scădere dependentă de doză a confluentei celulare.

Pentru tratamentul FIS, în același mod, confluentei celulare scade într-un mod dependent de concentrație, iar dismorfologii precum alungirea celulară, contracția celulară apar atât la concentrații de 30 μ M, cât și la 40 μ M.

În ceea ce privește asocierea dintre cei doi compuși, s-a observat o scădere pronunțată a confluentei de la cele mai mici concentrații (20 și 30 μ M) comparativ cu celulele netratate, reducerea fiind dependentă de doză.

Mai mult, pentru MYR+FIS, se pot observa dismorfologii frecvente, cum ar fi alungirea celulară, rotunjirea celulară și contracția celulară, începând de la cele mai mici concentrații, iar urme de resturi celulare pot fi observate la cea mai mare concentrație testată (40 μ M).

În ceea ce privește celulele JB6 Cl 41-5a sănătoase, conform Figurii 2B, MYR nu a indus nicio modificare morfologică, menținând aspectul specific al celulelor pe tot parcursul tratamentului.

Pentru celulele tratate cu FIS, se poate observa o ușoară scădere a confluentei și semne de resturi începând cu concentrația medie de 30 μ M. Când cei doi compuși au fost combinați, o ușoară scădere a confluentei a putut fi observată doar la concentrația de 40 μ M.

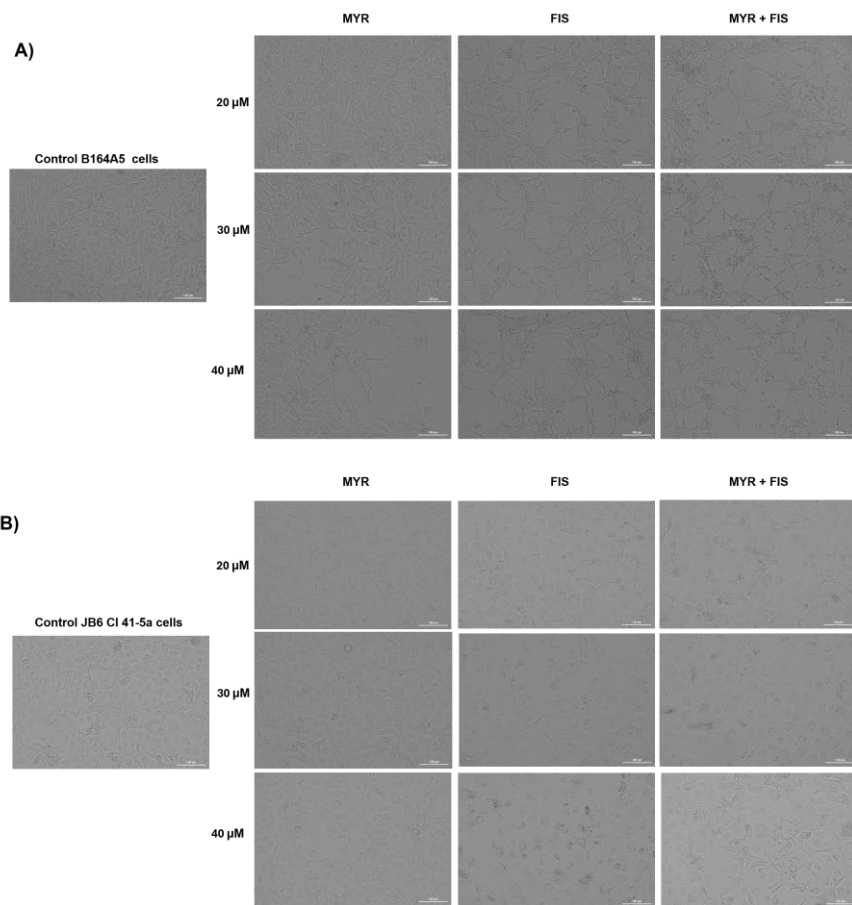


Figura 2. Imagini reprezentative care ilustrează modificările morfologice observate la 24 de ore de tratament al celulelor B164A5 (A) și celulelor JB6 Cl 41-5a (B) cu MYR (20, 30, 40 μM), FIS (20, 30, 40 μM) și combinațiile dintre MYR + FIS (20, 30, 40 μM).

După cum se arată în Figura 3, MYR nu a prezentat modificări nucleare semnificative, celulele păstrându-și forma nucleară similară cu cea prezentată în celulele de control. FIS a redus confluența nucleară și a indus dismorfologii caracterizate prin nucleii condensați cu dimensiuni și forme reduse (săgeți albe). Combinația MYR+FIS a produs dismorfologii majore, inclusiv condensarea masivă

a cromatinei, contracția nucleară, neregularități de formă și o reducere semnificativă a numărului de nuclei (săgeți albe).

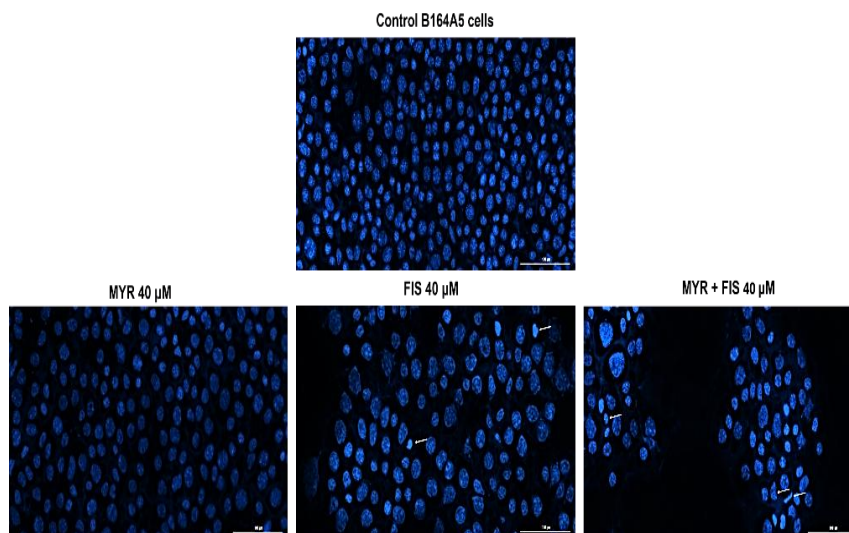


Figura 3. Imagini reprezentative care prezintă modificările morfologiei nucleare la 24 de ore de tratament al celulelor B164A5 CM cu MYR (40 μ M), FIS (40 μ M) și combinațiile dintre MYR + FIS (40 μ M)

Conform Figurii 4, MYR 40 μ M nu a produs efecte semnificative asupra mitocondriilor în comparație cu celulele netratate, în timp ce FIS 40 μ M și tratamentul combinator (la 40 μ M) au produs o condensare mitocondrială masivă (săgeți albe), deteriorarea mitocondrială fiind mai frecventă și specifică în cazul tratamentului asociativ (MYR + FIS).

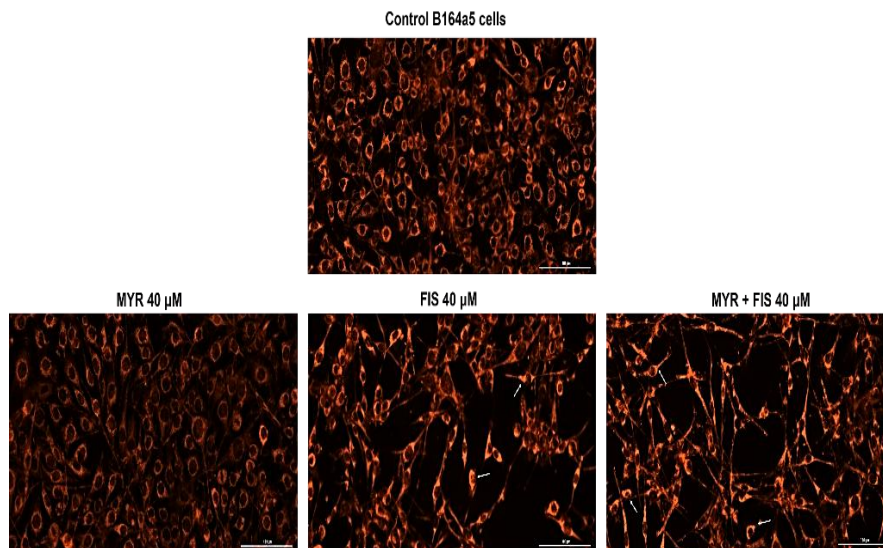


Figura 4. Imagini reprezentative care prezintă modificările morfologiei mitocondriale la 24 de ore de tratament al celulelor B164A5 CM cu MYR (40 μ M), FIS (40 μ M) și combinațiile dintre MYR + FIS (40 μ M)

3.2. ASOCIEREA DINTRE FISETINĂ ȘI RUTINĂ DECLANSEAZĂ O CITOTOXICITATE ÎMBUNĂTĂȚITĂ ÎN CELULE CANCERULUI DE PIELE A431 ȘI A375

În cazul tratamentului celulelor A431 cu FIS (Figura 5A), rezultatele obținute au indicat că viabilitatea celulară a scăzut într-o manieră dependentă de concentrație, adică tratamentul cu 30 μ M FIS a redus viabilitatea celulară la 40%, iar cea mai mare concentrație testată, de 50 μ M, a produs o scădere a viabilității celulare până la un prag de 31%.

Tratamentul cu RUT în celulele A431 (Figura 5B) a prezentat o reducere dependentă de doză a viabilității celulare, atingând la cea mai mare concentrație testată (50 μ M) un procent de 64%. Tratamentul combinat între RUT și FIS (Figura 5C) a dus la o scădere a viabilității celulare sub aceeași tendință dependentă de

doză, procentele scăzând treptat odată cu creșterea dozei de la 36% (la cea mai mică concentrație de 30 μ M) la 26% (la 50 μ M).

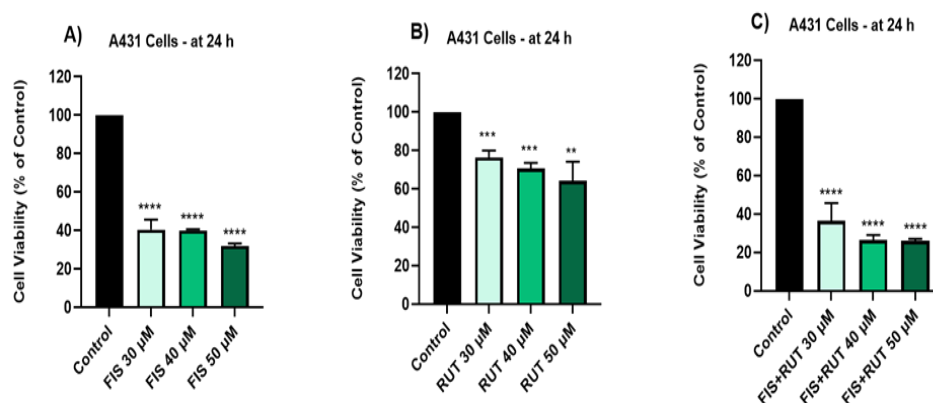


Figura 5. Reprezentare grafică a procentelor de viabilitate celulară la 24 de ore după tratarea celulelor A431 cu (A) FIS (30, 40, 50 μ M), (B) RUT (30, 40, 50 μ M) și (C) combinațiile dintre FIS și RUT (30, 40, 50 μ M).

Pentru celulele A375, tratamentul cu FIS (Figura 6A) a redus ușor viabilitatea celulară dependent de concentrație, până la 87%, ceea ce a fost observat la cea mai mare concentrație examinată, adică 50 μ M; și, conform Figurii 6B, RUT a scăzut viabilitatea celulară cu până la 91%. Tratamentul asociativ FIS + RUT (Figura 6C) a furnizat pentru tratamentul de 30 μ M o viabilitate celulară de 83%, la tratamentul de 40 μ M, viabilitatea celulară a scăzut la 80%, în timp ce la cea mai mare concentrație de 50 μ M, s-a atins pragul de aproximativ 74%.

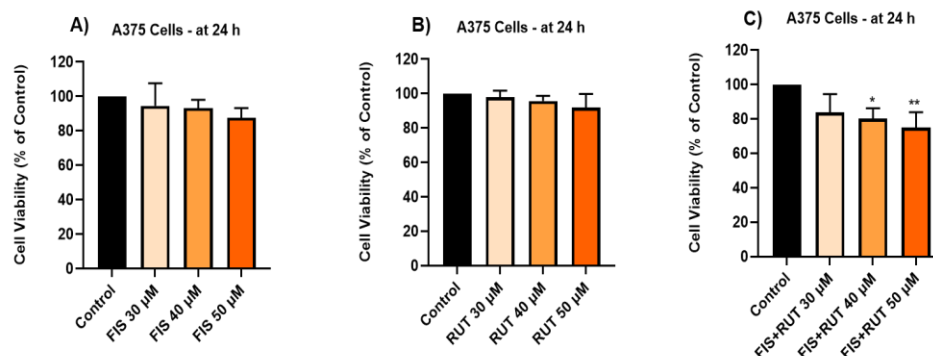


Figura 6. Reprezentare grafică a procentelor de viabilitate celulară la 24 de ore după tratarea celulelor A375 cu (A) FIS (30, 40, 50 μM), (B) RUT (30, 40, 50 μM), (C) și combinațiile dintre FIS și RUT (30, 40, 50 μM).

Următorul pas în investigarea tratamentului combinat FIS, RUT și FIS+RUT după 24 de ore de tratament pe celulele A431 și A375 a fost analiza morfologiei celulare. În cazul celulelor A431, așa cum se arată în Figura 7, tratamentul FIS a produs o scădere dependentă de doză a confluentei celulare, cea mai mare concentrație de 50 μM demonstrând o rotunjire masivă a formei și o scădere a dimensiunii.

Aplicarea tratamentului RUT a redus treptat confluentei celulare și a produs rotunjirea celulelor la 50 μM, în timp ce tratamentul combinator între FIS și RUT a prezentat dismorfologii de la cea mai mică concentrație de 30 μM, care s-au accentuat într-un mod dependent de doză până la 50 μM, unde s-au observat o rotunjire celulară masivă, o confluentei redusă și semne de desprindere a celulelor de pe placă.

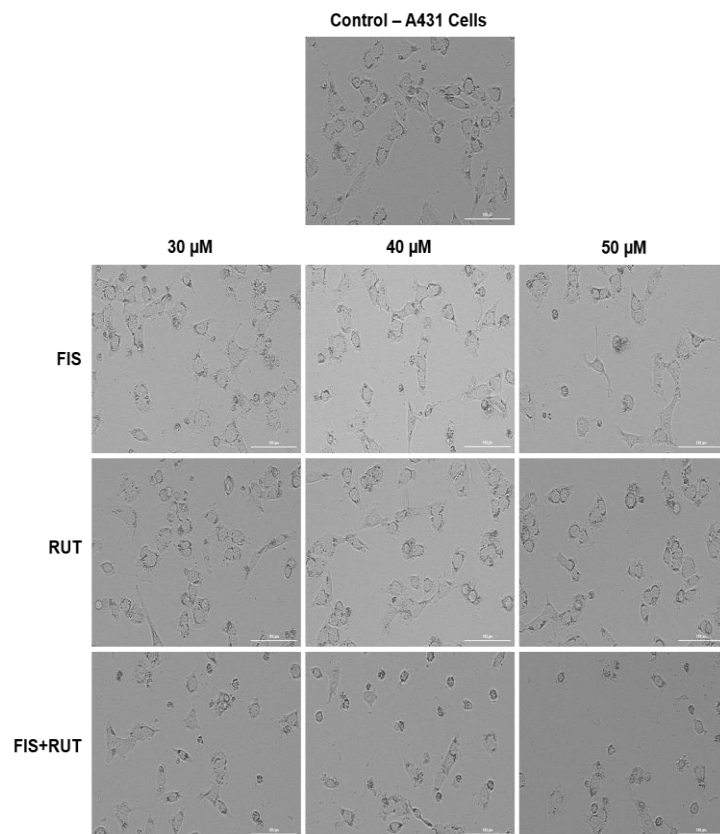


Figura 7. Imagini reprezentative care ilustrează modificările morfologice observate la 24 de ore de tratament al celulelor A431 cu FIS (30, 40, 50 μM), RUT (30, 40, 50 μM) și combinații între FIS + RUT (30, 40, 50 μM)

Pentru celulele A375 (Figura 8), tratamentul de 24 de ore cu FIS și RUT nu a indus modificări semnificative ale morfologiei celulare. În schimb, la aplicarea tratamentului combinator între FIS și RUT, la cea mai mare concentrație testată de 50 μM , s-au putut observa ușoare semne de desprindere a celulelor de pe placă și o reducere a confluentei.

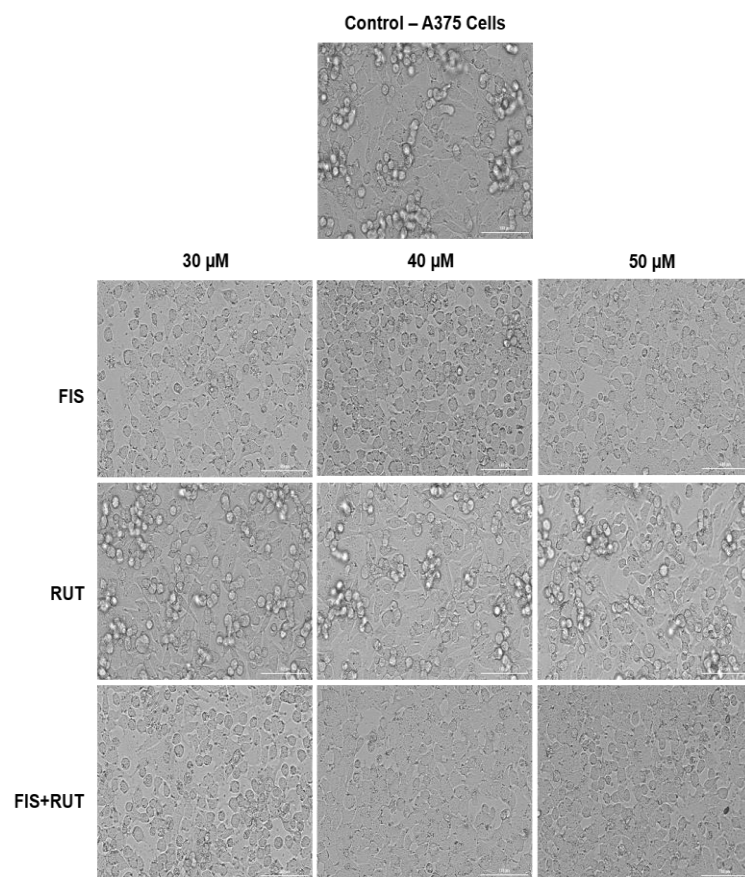


Figura 8. Imagini reprezentative care ilustrează modificările morfologice observate la 24 de ore de tratament al celulelor 375 cu FIS (30, 40, 50 μM), RUT (30, 40, 50 μM) și combinații între FIS + RUT (30, 40, 50 μM)

4. CONCLUZII

Primul studiu subliniază potențialul sinergic al miricetinei și fisetinei ca tratament *in vitro* ținut și de succes pentru melanomul cutanat. Acest tratament combinator oferă o bază preclinică solidă pentru cercetări ulterioare în terapia melanomului, deoarece nu numai că crește activitatea anticancerigenă, dar protejează și celulele sănătoase. Efectele combinate ale MYR și FIS au fost vizibil mai mari decât cele ale oricăruia dintre compuși singuri în ceea ce privește scăderea viabilității celulare. Mai mult, în celulele de melanom B164A5 tratate s-a observat dismorfologie semnificativă, număr redus de celule, nuclei asemănători apoptozei și leziuni mitocondriale.

În plus, în a doua cercetare, fisetina și rutina, atunci când au fost combinate, au prezentat efecte citotoxice mai puternice decât oricare dintre substanțe atunci când au fost utilizate singure. Unul dintre efecte a fost o scădere dependentă de doză a viabilității celulare. Modificări morfologice semnificative, inclusiv variații ale formei și aspectului celulelor, au fost observate în celulele tratate pe măsură ce concentrația creștea.

Conform studiilor, o combinație de FIS și RUT sau FIS și MYR poate fi o opțiune de tratament promițătoare pentru cancerul de piele, oferind o eficacitate crescută în comparație cu monoterapia. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare, axate pe elucidarea proceselor moleculare care stau la baza impactului observat, confirmarea eficacității în sisteme de modele 3D din ce în ce mai complexe și investigarea metodelor de nanoformulare pentru a crește eficacitatea și livrarea rezultatelor.