



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

**Universitatea de Medicină și Farmacie
„Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca**

**Strategii terapeutice complexe utilizând
porfirine, produși naturali și materiale
hibride cu produși naturali în inflamație
și tumori experimentale**

Conf. Dr. Gabriela Adriana Filip

2016

1. REZUMAT

Prezenta teză de abilitare prezintă într-o manieră sintetică, cele mai importante rezultate ale cercetării științifice, profesionale și academice obținute de către autor după susținerea tezei de doctorat, cu scopul de a dovedi calificarea acestuia în vederea obținerii atestatului de abilitare. În această perioadă, cercetarea științifică s-a focusat pe trei domenii principale: terapia fotodinamică cu porfirine sau regimuri combinate, porfirine - antiinflamatoare nesteroidiene, metformin și extracte naturale, în tumori experimentale, chemoprevenția cu produși naturali în expunerea la radiații ultraviolete și terapia cu materiale hibride, nanoparticule metalice funcționalizate cu extracte naturale, în inflamația experimentală. Activitatea de cercetare a autorului a urmărit în principal dezvoltarea unor metode terapeutice noi, țintite, bazate pe cunoștințe moderne privind mecanismele morții celulelor tumorale, care să asigure un efect terapeutic optim. Preocuparea pentru descifrarea mecanismelor patogenetice și a căilor de semnalizare implicate în fotocarcinogeneza cutanată și a modului în care aceste căi pot fi modulate prin compuși naturali a permis identificarea de noi oportunități în fotochemoprevenție. Sinteza de noi biomateriale, pornind de la nanoparticule metalice și extracte naturale, cu aplicabilitate în inflamație, poate oferi o alternativă terapeutică sigură și eficientă într-o patologie frecventă cum este cea inflamatorie.

Rezultatele relevante obținute după susținerea tezei de doctorat sunt structurate în trei capitole principale. Fiecare capitol cuprinde în prima parte cele mai importante studii efectuate în contextul stadiului actual al cercetării științifice internaționale și naționale în domeniu, evidențiind relevanța și originalitatea contribuțiilor personale. În a doua parte sunt trecute în revistă rezultatele semnificative obținute de către autoare în domeniul temei de interes, cu câteva concluzii la sfârșitul fiecărui capitol.

În primul capitol sunt prezentate date privind efectul terapiei fotodinamice cu diferite porfirine de sinteză, pe tumori experimentale și strategii de optimizare a acestei terapii. Au fost alese pentru studiu trei tipuri de fotosensibilizatori diferiți, respectiv acidul deltaaminolevulinic, 5,10,15,20-tetrasulfonato-phenyl-porfirina (TSPP) și macrociclii tetrapirolici, iar efectul lor a fost studiat pe tumora Walker, o tumoră mixtă de tip carcinosarcom, transplantabilă la șobolani, rasa Wistar. Pentru fiecare porfirină

testată, efectul terapeutic a fost cuantificat prin aprecierea markerilor de stres oxidativ, ca mecanism inductor al morții celulare, prin evaluarea inflamației intratumorale, a apoptozei și a activității metaloproteazelor matriciale, în corelație cu nivelul porfirinei în țesutul tumoral și cu scorul de necroză intratumorală. Rezultatele obținute au demonstrat că, atât acidul deltaaminolevulinic cât și TSPP, au indus alterări histologice majore în țesutul tumoral, în paralel cu intensificarea peroxidării lipide și cu activarea metaloproteinazei (MMP)-2 și caspazei-3. Au fost de asemenea studiate efectele terapeutice ale celor două porfirine înglobate în hidrogeluri de chitosan, agent natural biocompatibil, cu proprietăți bioadezive și citotoxice. Asocierea de chitosan la terapia fotodinamică a facilitat acumularea fotosensibilizantului în tumoră și a condus la apariția precoce de celule necrotice în parenchimul tumoral. Terapia fotodinamică cu macrocicli tetrapirolici a determinat moartea celulelor tumorale și în consecință a dus la distrucția tumorii, proces în care au fost implicate mai multe mecanisme: formarea speciilor reactive de oxigen, eliberarea de TNF- α și activarea caspazei-3, respectiv a MMP-2 în țesutul tumoral. Asocierea la terapia fotodinamică a antiinflamatoarelor nesteroidiene și a metforminului a potențat efectul antitumoral în timp ce asocierea curcuminei a avut rezultate variabile, dependente de doza folosită și de regimul de administrare.

În cel de-al doilea capitol sunt prezentate rezultatele obținute în domeniul chemoprevenției cu produși naturali, în expunerea acută și subacută la radiații ultraviolete de tip B, precum și în experimente de fotocarcinogeneză cutanată. După prezentarea mecanismelor implicate în carcinogeneza cutanată, indusă de UVB și a stadiului cunoașterii privind compușii naturali utilizați în chemoprevenție, sunt detaliate rezultatele obținute pe culturi celulare și pe șoareci SKH-1 după administrarea a două extracte naturale, unul obținut din planta *Calluna vulgaris* și altul preparat din semințe de struguri *Vitis Vinifera*, soiul Burgund Mare. Polifenolii din *Calluna vulgaris* au diminuat peroxidarea lipidică și formarea leziunilor ADN induse de expunerea la UVB, în keratinocitele imortalizate HaCaT în timp ce acțiunea lor modulatorie asupra celulelor endoteliale HUVEC a fost dependentă de doza utilizată, la doze mici fiind antioxidantă, protectoare, în timp ce la doze mari este prooxidantă și apoptotică.

In vivo, pe șoareci SKH-1, s-a arătat că aplicarea topică a extractului de *Calluna vulgaris*, anterior expunerii acute la UVB, a redus inflamația și activarea metaloproteazelor matriciale, prin inhibiția activării NF-kB în timp ce în iradierile multiple, efectul protector se datorează inhibării apoptozei și reducerii leziunilor ADN. Extractul obținut din semințe de struguri a avut efect protector superior extractului de *Calluna vulgaris*, atât *in vitro* cât și *in vivo*, atât în ceea ce privește stresul oxidativ și inflamația cât și apoptoza și formarea dimerilor de ciclobutan pirimidină.

Al treilea capitol prezintă principalele rezultate obținute în domeniul sintezei și utilizării materialelor hibride, formate din nanoparticule metalice de aur și argint și extracte naturale, obținute din fructe, pe model experimental de inflamație acută plantară. În prima parte sunt menționate principalele date din literatura de specialitate privind utilizarea nanoparticulelor metalice în medicină și biologie iar în cea de-a doua parte sunt detaliate rezultatele obținute în studiile de toxicitate dermică cu concentrații fixe și în cele de toxicitate sistemică acută cu nanoparticule metalice bioconjugate cu extracte naturale obținute din fructe aparținând familiei *Adoxaceae* și *Cornaceae*. Efectul modulator asupra inflamației experimentale a fost studiat atât în cazul nanoparticulelor de argint cât și a celor de aur, rezultatele obținute arătând că antocianii din fructele de călin, soc și coarne utilizați la funcționalizarea nanoparticulelor de aur au redus edemul inflamator, secreția de citokine și formarea radicalilor liberi, atât imediat cât și tardiv, la 48 ore după inducția inflamației. Nanoparticulele de argint, conjugate cu extract din coarne, au indus inflamație și leziuni ultrastructurale în țesutul cutanat, efecte evidențiate în microscopia electronică de transmisie și la spectroscopia Raman.

Rezultatele celor 12 ani de activitate didactică, de cercetare științifică și profesională dermatologică sunt concretizate în 12 proiecte de cercetare naționale câștigate prin competiție, la 2 dintre ele fiind director de proiect respectiv responsabil partener, în 4 cărți și 4 capitole de carte scrise ca autor și coautor în cărți publicate în edituri internaționale. Activitatea susținută în domeniul fiziodermatologiei și oncologiei cutanate a permis acordarea de către OSIM a două brevete, unul pentru gel și unul pentru cremă cu efect fotochemoprotector și a fost răsplătită cu numeroase premii

naționale și internaționale. După susținerea tezei de doctorat, autoarea a publicat 64 de lucrări științifice, din care 51 articole au fost publicate în reviste indexate ISI, 9 în reviste indexate BDI și 4 în reviste B+. Dintre articolele indexate ISI, 28 articole sunt publicate ca prim-autor și 23 coautor. Indicele Hirsch al autoarei este 10, atât în baza de date ISI cât și SCOPUS. Autoarea și-a desăvârșit pregătirea prin participarea la 17 cursuri în domeniul fiziologiei și dermatologiei și prin participarea la numeroase manifestări științifice interne și internaționale.

Planurile de dezvoltare științifică viitoare ale autoarei, în domeniul fiziodermatologiei experimentale și clinice, se îndreaptă spre aceleași direcții anterior menționate. Pe baza experienței științifice acumulate în ultimii ani, strategia de dezvoltare a carierei științifice va fi orientată spre câteva domenii principale: continuarea studiilor în domeniul oncologiei cutanate, terapiei fotodinamice și utilizării produșilor naturali și nanomaterialelor, atât în dermatologie, în vederea identificării de noi soluții în preventive, cât și în terapia oncologică cutanată. Înființarea de echipe de cercetare interdisciplinare, în special prin încurajarea participării tinerilor cercetători, va contribui la promovarea excelenței în cercetare și la creșterea vizibilității științifice a membrilor Departamentului de Științe Funcționale căruii autoarea îi aparține.

Referitor la activitatea didactică, aceasta va continua să fie una centrată pe student și va urmări, prin folosirea de resurse electronice adecvate, susținerea competiției între studenți, promovarea feedback-ului și a transparenței, cerințe necesare unui învățământ modern de fiziologie. Focusarea în primul rând pe noțiuni privind funcția și reglarea și mai puțin pe înțelegerea unor noțiuni descriptive poate contribui semnificativ la formarea unei judecăți clinice de înalt nivel.

Ținând cont de implicarea didactică și academică, autoarea are în vedere publicarea de cărți de specialitate în domeniul fiziologiei clinice și propunerea de noi cursuri tip master și scoală doctorală, ambele cu scopul de a forma studenții și doctoranzii ca profesioniști în domeniul cercetării fundamentale inovative, cu aplicabilitate în practica clinică.

2. SUMMARY

This habilitation thesis presents in a synthetic manner, the most important results of the scientific, professional and academic research obtained by the author after the presentation of the Ph.D. thesis, in order to prove her qualification to obtain the Certificate of Habilitation. During this period, the scientific research has been focused on three main areas: photodynamic therapy with porphyrins or combined regimens, porphyrins - non-steroidal anti-inflammatory, metformin and natural extracts, in experimental tumors, chemoprevention with natural products in the exposure to ultraviolet radiation and the therapy with hybrid materials, metallic nanoparticles functionalized with natural extracts, in experimental inflammation. The research activity of the author aimed mainly at developing new, targeted therapeutic methods, based on modern knowledge concerning the mechanisms of tumor cell death, which ensure an optimal therapeutic effect. The concern for deciphering pathogenetic mechanisms and signaling pathways involved in skin photocarcinogenicity and how these pathways can be modulated by natural compounds allowed the identification of new opportunities in photochemoprevention. Synthesis of new biomaterials, starting from metallic nanoparticles and natural extracts, applicable in inflammation, can provide a safe and effective therapeutic alternative in a common pathology such as the inflammatory one.

The relevant results obtained after the presentation of the Ph.D. thesis are divided into three main chapters. Each chapter contains in the first part the most important studies carried out in the context of the current state of national and international scientific research in the field, highlighting the relevance and originality of the personal contributions. The second part presents the significant results obtained by the author in the field of the interest topic with some conclusions at the end of each chapter.

The first chapter presents data on the effect of photodynamic therapy with different porphyrin synthesis, on experimental tumors and strategies to optimize this therapy. Three different types of photosensitisers were chosen for the study, respectively delta-aminolevulinic acid, 5,10,15,20 - tetrasulfonato - Phenyl - porphyrin

(TSPP) and tetrapyrrole macrocycles and their effect was studied in Walker tumor, a mixed tumor of carcinosarcoma type, transplantable in Wistar rats. For each tested porphyrin, the therapeutic effect was quantified by assessing the markers of oxidative stress, as a mechanism which induces cell death, by evaluating intratumoral inflammation, apoptosis and the activity of matrix metalloproteinase in correlation with the porphyrin level in the tumor tissue and the score of intratumoral necrosis. The obtained results showed that both delta-aminolevulinic acid and TSPP induced major histological alterations in the tumor tissue and simultaneously increased lipid peroxidation and activated the metalloproteinase (MMP) -2 and caspase-3. There were also studied the therapeutic effects of the two porphyrins incorporated into the chitosan hydrogel, a natural biocompatible agent with bioadhesive and cytotoxic properties. The association of chitosan to the photodynamic therapy facilitated the accumulation of the photosensitizer in the tumor and led to the early apparition of necrotic cells in the tumor parenchyma. Photodynamic therapy with macrocyclic tetrapyrrole caused tumor cell death and consequently led to the destruction of the tumor, a process in which several mechanisms were involved: the formation of reactive oxygen species, the release of TNF- α and activation of caspase-3, respectively MMP 2 in the tumor tissue. The association of non-steroidal anti-inflammatory and metformin to the photodynamic therapy increased the antitumor effect while the association of curcumin had variable results, dependent on the dose used and on the administration regimen.

The second chapter presents the results obtained in the chemoprevention with natural products, in acute and subacute exposure to ultraviolet radiations type B and in the skin photocarcinogenicity experiments. After presenting the mechanisms involved in skin carcinogenesis induced by UVB and the state of knowledge on the natural compounds used in chemoprevention, there are detailed the results, obtained in cell cultures and on SKH-1 mice, of the administration of two natural extracts, one obtained from the plant *Calluna vulgaris* and another one prepared from *Vitis Vinifera* grape seed, Burgund Mare variety. The polyphenols from *Calluna vulgaris* decreased the lipid peroxidation and the formation of DNA lesions induced by UVB exposure in immortalized HaCaT keratinocytes, while their modulating action on the HUVEC endothelial cells was dependant on the dose used, being antioxidant, protector at low

doses while at high doses it is pro-oxidant and apoptotic. *In vivo*, the SKH-1 mice showed that the topical application of the *Calluna vulgaris* extract, prior to acute exposure to UVB, reduced the inflammation and the activation of matrix metalloproteases by inhibiting the NF- κ B activation while in the multiple irradiation the protective effect is due to the inhibition of apoptosis and reduction of the DNA lesions. The extract obtained from grape seed had a superior protective effect to *Calluna vulgaris*, both *in vitro* and *in vivo*, not only in terms of oxidative stress and inflammation but also in apoptosis and formation of cyclobutane pyrimidine dimers.

The third chapter presents the main results achieved in the field of synthesis and use of hybrid materials consisting of metallic nanoparticles of gold and silver and natural extracts, obtained from fruit, on an experimental model of plantar acute inflammation. In the first part are mentioned the main data from the literature concerning the use of metallic nanoparticles in medicine and biology and in the second part are detailed the results obtained in the studies of dermal toxicity with fixed concentrations and in the ones of acute systemic toxicity of the metallic nanoparticles bioconjugated with natural extracts obtained from fruit, belonging to the *Adoxaceae* and *Cornaceae* families. The modulating effects on experimental inflammation was studied both in the case of silver nanoparticles and the golden ones, the results obtained showing that the anthocyanins from guelder rose, elderberry and cornus used in the functionalization of gold nanoparticles reduced the inflammatory edema, the cytokine secretion and the formation of free radicals, both immediately after the induction of inflammation and 48 hours later. Silver nanoparticles conjugated with cornus fruit extract induced inflammation and various degrees of ultrastructural lesions in the skin tissue, the effects being highlighted at the transmission electron microscopy and at Raman spectroscopy.

The results of 12 years of teaching, research and professional dermatology are embodied in 12 national research projects won through competition, for 2 of them being project manager respectively responsible partner, 4 books and 4 book chapters written as author and co-author in books published by international publishing houses. Sustained activity in the field of physiology and dermatology and cutaneous oncology

has enabled the granting of two patents by OSIM (The State Office for Inventions and Trademarks), one for the gel and one for the cream with photochemoprotective effect and has been rewarded with numerous national and international awards. After the presentation of the Ph.D. thesis, the author published 64 scientific papers, out of which 51 articles were published in ISI indexed journals, 9 in BDI indexed journals and 4 in B + journals. Among the ISI indexed articles, 28 articles are published as first author and 23 as co-author. The Hirsch index of the author is 10, both in the ISI database and in SCOPUS. The author has perfected her training by attending 17 courses in the physiology and dermatology field and by participating in numerous national and international scientific meetings. Future scientific development plans of the author in the field of experimental and clinical physiology and dermatology are headed towards the same directions previously mentioned. On the basis of scientific experience accumulated in recent years, the development strategy of the scientific career will be oriented to several main areas: continuing education in the field of cutaneous oncology, photodynamic therapy and use of natural products and nanomaterials both in dermatology, to identify new prevention solutions, and in cutaneous oncology therapy. The setting up of interdisciplinary research teams, especially by encouraging the participation of young researchers, will contribute to promoting excellence in scientific research and increasing the scientific visibility of the members of the Department of Functional Sciences, to whom the author belongs. Regarding her teaching activity, it will continue to be a student-centered one and will follow, through proper use of electronic resources, the support of competition between students, promoting feedback and transparency, which are necessary requirements for a modern education in physiology. The focus first of all on concepts concerning the function and regulation and less on understanding some descriptive concepts would significantly contribute to the formation of a high level clinical judgment. Given the didactic and academic involvement, the author considers the publishing of specialty books in the field of clinical physiology and proposes new courses for the Master's programs and Doctoral School, both in order to form students and Ph.D. students as professionals in the field of innovative fundamental research, with application in clinical practice.