
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Mecanisme patogenetice în tumori ale
sferei genitale feminine.
Studiu experimental

Doctorand **Elisabeta-Ioana Chera**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Patriciu Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Inflamația în carcinogeneză	19
1.1 Introducere	19
1.2 Inflamația cronică și cancerul	20
1.2.1 Mutageneza	22
1.2.2 Proliferarea celulară	22
1.2.3 Angiogeneza	22
1.2.4 Inhibiția apoptozei	22
1.2.5 Inflamația și speciile reactive de oxigen	23
2. Stresul oxidativ în carcinogeneză	25
2.1 Generalități	25
2.2 Radicalii liberi și stresul oxidativ	26
2.2.1 Surse de radicali liberi în timpul inflamației	26
2.2.2 Specii reactive de oxigen	28
2.2.2.1 Superoxid, peroxid de hidrogen și radicalul hidroxil	28
2.2.2.2 Peroxinitritul	29
2.2.2.3 Acidul hipocloros	29
2.3 Antioxidanții dietetici	29
2.4 Antioxidanții și chimioterapia	30
3. Estrogenii în tumorile genitale feminine	31
3.1 Tumorile sferei genitale feminine	31
3.2 Rolul estrogenului și al receptorilor estrogenici în cancer	32
3.3 Rolul RE beta în cancerele ginecologice	34
3.3.1 RE beta în cancerul ovarian	35
3.3.2 RE beta în cancerul endometrial	35
3.4 Cancerul ovarian și estrogenii	36
3.5 Expunerea la estrogenii exogeni și riscul de dezvoltare a cancerului ovarian	37
3.6 Terapia de substituție hormonală	38
4. Fitoestrogenii	41
4.1 Introducere	41
4.2 Mecanism de acțiune	41
4.3 Fitoestrogenii în practica medicală	43
4.4 Compușii fitochimici din semințele de in	44
4.4.1 Lignanii	44
4.4.1.1 SDG-ul	45
4.4.1.2 Pinoresinolul	46
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	47
1. Ipoteza de lucru	49
2. Studiu 1. Analiza fitochimică a extractului etanolic de semințe de in	53
2.1. Introducere	53
2.2. Material și metodă	54
2.2.1. Reactivi	54
2.2.2 Prepararea extractului din semințe de in	54
2.2.3 Analiza fitochimică a polifenolilor	54
2.2.3.1 Conținutul total de polifenoli	54
2.2.3.2 Conținutul total de flavonoide	54

2.2.3.3	Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin HPLC-DAD-ESI MS	55
2.2.3.4	Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici prin FTIR	55
2.3.	Rezultate	55
2.4.	Discuții	56
2.5.	Concluzii	60
3.	Studiul 2. Evaluarea efectelor antioxidante ale extractului alcoolic din semințe de IN <i>in vitro</i>	61
3.1.	Introducere	61
3.2.	Material și metodă	62
3.2.1.	Reactivi	62
3.2.2.	Testul DPPH	62
3.2.3.	Testul FRAP	63
3.2.4.	Testul de îndepărtare a H ₂ O ₂	63
3.2.5.	Testul de îndepărtare a oxidului nitric	63
3.2.6.	Analiza statistică	64
3.3.	Rezultate	64
3.3.1.	Activitatea antioxidantă <i>in vitro</i>	64
3.4.	Discuții	67
3.5.	Concluzii	69
4.	Studiul 3. Evaluarea efectelor antioxidante și anti-inflamatorii ale extractului alcoolic din semințe de In <i>in vivo</i>	71
4.1.	Introducere	71
4.2.	Material și metodă	72
4.2.1.	Reactivi	72
4.2.2.	Inflamația experimentală	72
4.2.2.1.	Animalele experimentale	72
4.2.2.2.	Inflamația experimentală și protocolul de studiu	72
4.2.3.	Evaluarea efectului antiinflamator și antioxidant <i>in vivo</i>	74
4.2.3.1.	Determinarea NF-kB și 3NT prin metoda ELISA	74
4.2.3.2.	Determinarea nitriților și nitraților serici totali	75
4.2.3.3.	Determinarea capacității antioxidante totale	75
4.2.3.4.	Determinarea statusului oxidativ total seric	76
4.2.3.5.	Calcularea indicelui de stres oxidativ	77
4.2.3.6.	Determinarea malondialdehidei	77
4.2.3.7.	Determinarea tiolilor serici totali	77
4.2.4.	Analiza statistică	77
4.3.	Rezultate	77
4.3.1.	Efectele antiinflamatorii	77
4.3.2.	Efectele antioxidante <i>in vivo</i>	79
4.4.	Discuții	84
4.5.	Concluzii	87
5.	Studiul 4. Efectele antiproliferative ale extractului etanolic din semințe de IN <i>in vitro</i>	89
5.1.	Introducere	89
5.2.	Materiale și metodă	90
5.2.1.	Liniile celulare umane utilizate	90
5.2.2.	Testul de viabilitate MTT	91
5.3.	Rezultatele testării citotoxicității	91
5.4.	Discuții	95
5.5.	Concluzii	96
6.	Studiul 5. Efectele antiproliferative ale extractului etanolic din semințe de IN <i>in vivo</i>	97
6.1.	Introducere	97
6.2.	Materiale și metode	98

6.2.1 Modelul experimental	98
6.2.3 Evaluarea activității anti-inflamatorii și antioxidante sistemice	99
6.2.4 Viabilitatea celulelor tumorale EAC	99
6.2.5 Analiza statistică	100
6.3 Rezultate	100
6.3.1 Efectele tratamentului cu extract de semințe de in asupra greutatea corporale, volumului ascitei și numărului de celule viabile/neviabile la șoarecii purtători de ascită de tumoră/carcinom Ehrlich (EAC)	100
6.3.2 Efectele antiinflamatorii și antioxidante in vivo	101
6.4 Discuții	108
6.5 Concluzii	111
7. Concluzii generale	113
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
REFERINȚE	117
Anexa 1 – Lista tabelelor	127
Anexa 2 – Lista figurilor	129

Cuvinte cheie: cancer, extract etanolic semințe de in, antitumoral, antioxidant, antiinflamator, carcinomul ascitic Ehrlich

INTRODUCERE

În ultimele două decenii, au apărut tot mai multe dovezi care constată faptul că majoritatea bolilor cronice (inclusiv cancerul), la nivel molecular, sunt cauzate de un răspuns inflamator dereglat. Acest răspuns inflamator accentuat poate fi generat de o multitudine de factori, precum fumatul, stresul, obezitatea, alcoolul, agenții infecțioși, radiațiile, factorii de mediu etc. Aceștia reprezintă împreună peste 90% din cauzele apariției acestor maladii cronice. În unele tipuri de cancer, afecțiunile inflamatorii sunt prezente înainte de apariția unei modificări maligne. În schimb, în alte tipuri de cancer, o modificare oncogenă induce un micromediu inflamator care favorizează dezvoltarea tumorilor. Indiferent de originea sa, inflamația care „mocnește” în micromediul tumoral are multe efecte de promovare a tumorogenezei, prin stimularea proliferării, inhibarea apoptozei și promovarea angiogenezei.

În rândul femeilor, cancerul este a doua cauză de deces la nivel mondial. Mai mult decât atât, povara acestei patologii maligne se extinde și devine tot mai grea din cauza creșterii și îmbătrânirii populației. Femeile reprezintă aproximativ 49,5% din populația lumii; cu toate acestea, ele formează o proporție mai mare a populației cu vârsta de peste 60 de ani, unde cancerul are prevalența cea mai mare, din cauza diferențelor în speranța de viață și a principalelor cauze de mortalitate. În ceea ce privește tumorile sferei genitale feminine, principalele tipuri de cancer sunt reprezentate de cancerul de sân, col, corp uterin și ovar.

Medicamentele care vizează inflamația asociată cancerului au potențialul de a remodela un infiltrat inflamator, care favorizează apariția și progresia tumorii, sau de a preveni migrarea unor astfel de celule la locul tumorii. Acest potențial de a inversa inflamația care susține dezvoltarea tumorală ar putea fi începutul unei noi ere interesante pentru terapiile anticancer.

Recent, s-a constatat că polifenolii au o activitate intensă de captare a speciilor reactive de oxigen, inhibând apariția cancerului prin stimularea apoptozei celulelor tumorale. Totodată, datorită capacității lor antioxidante puternice, polifenolii ar putea limita acțiunea radicalilor liberi dăunători, prin interacțiunea cu proteinele pro-oxidante sau cu ionii metalici și radiațiile.

Prin urmare, putem afirma că inflamația este un mecanism critic al cancerului. Agenții antiinflamatori ar trebui explorați atât pentru prevenție, cât și pentru tratamentul cancerului. Deși numeroase studii pe culturi de celule și animale au identificat mai mulți agenți antiinflamatori, adevăratul lor potențial va fi recunoscut doar prin studii clinice bine controlate.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Pentru a înțelege mai bine unele din mecanismele patogenetice care stau la baza acestor cancere, acest capitol al tezei cuprinde, în detaliu, principalii factori declanșatori ce țin de inflamație și stresul oxidativ, deoarece mediatorii și efectorii celulari ai inflamației sunt constituenți importanți ai mediului tumoral. De asemenea a fost descris și rolul estrogenilor în tumorile sferei genitale feminine, iar spre final s-au prezentat mecanismele prin care fitoestrogenii interacționează cu procesul de oncogeneză precum și utilitatea lor în terapia antitumorală.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiectivele studiului

Studiul de față și-a propus:

1. Să analizeze compoziția extractului etanolic din semințe de in și a efectelor antioxidante *in vitro*;
2. Să evalueze activitatea antiinflamatorie și antioxidantă *in vivo* în inflamația acută experimentală
3. Să evalueze efectele antiproliferative ale extractului etanolic de semințe de in asupra liniilor celulare tumorale;
4. Evaluarea activității antiproliferative, antiinflamatorii și antioxidante *in vivo* în ascita experimentală asociată carcinomului Ehrlich.

Studiul 1. Analiza fitochimică a extractului etanolic de semințe de in

Scopul studiului. Studiul de față a urmărit realizarea analizei fitochimice a extractului etanolic de semințe de in.

Material și metodă. Pentru prepararea extractului etanolic din semințe de in, s-au măcinat 50 g de semințe de in, iar materialul obținut s-a extras cu etanol 70% folosindu-se o metodă de repercolare Squibb modificată. Conținutul total de polifenoli (TPC) și flavonoide ale extractului de semințe de in a fost măsurat folosind metoda Folin-Ciocalteu. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici s-a făcut prin HPLC-DAD-ESI MS, o cromatografie lichidă de înaltă performanță (Agilent 1200 HPLC) cu detecție DAD, care a fost cuplată la un spectrofotometru de masă (Agilent 6110 MS), precum și prin folosirea unui spectrofotometru FTIR.

Rezultate. Totalul de polifenoli din extractul etanolic de semințe de in a fost de 690,2 mg GAE/g. Conținutul total de flavonoizi a fost 28.61 mg QE/100g material vegetal. HPLC-DAD-ESI a identificat concentrații semnificative de acizi hidroxibenzoici, acizi hidroxicinamici și lignani. În ceea ce privește subclasele de polifenoli identificați, s-au pus în evidență patru lignani (Secoisolariciresinol-diglucoside (SDG), Secoisolariciresinol, Pinoresinol, Matairesinol), trei acizi hidroxibenzoici (acidul hidroxibenzoic, acidul galic și acidul siringic) și trei acizi hidroxicinamici (acidul cafeic, acidul sinapic, acidul ferulic).

Concluzii

1. Extractul etanolic de semințe de in testat este bogat în compuși polifenolici și flavonoizi, compuși cu potențial antiinflamator, antioxidant și antiproliferativ.
2. Dintre compușii chimici măsurați în extractul etanolic de semințe de in, lignanii se regăsesc în concentrația cea mai mare.
3. Alți compuși fenolici, precum acidul hidroxibenzoic, au fost identificați în concentrații mari, în timp ce acidul galic și acidul siringic au fost în cantități mai mici în extractul etanolic de in studiat
4. Derivații acidului hidroxicinamic, cum sunt acidul cafeic, acidul sinapic și acidul ferulic, au fost găsiți în concentrații mici în extractul etanolic de in studiat
5. Compoziția fitochimică a extractului etanolic de in studiat a sugerat o potențială activitate antioxidantă, antiinflamatorie și antiproliferativă, ceea ce poate reprezenta un tratament patogenetic în tumori ale sferei genitale feminine.

Studiul 2. Evaluarea efectelor antioxidante ale extractului etanolic din semințe de *IN in vitro*

Scopul studiului. Deoarece analiza fitochimică a evidențiat prezenta unor compuși cu potențial antioxidant, studiul de față a investigat activitatea antioxidantă *in vitro* a extractului etanolic de semințe de in, prin diferite metode.

Material și metodă. Pentru a evalua capacitatea antioxidantă a extractului investigat, s-au utilizat următoarele metode: **1. metoda de îndepărtare a radicalilor liberi de DPPH** (1,1-difenil-2-picrilhidrazil); **2. testul FRAP** (*ferric reducing antioxidant power*) – prin care s-a măsurat capacitatea semințelor de in de reducere ferică; **3. testul de îndepărtare a H₂O₂** – prin care se testează capacitatea semințelor de in de a capta peroxidul de hidrogen și **4. testul de îndepărtare a oxidului nitric** – prin care se testează capacitatea extractului de a capta radicalii de oxid nitric. Toate rezultatele au fost exprimate ca medie ± deviație standard (SD) a trei repetiții. Un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ statistic. Analiza corelațiilor dintre parametrii fiecărui grup a fost efectuată cu testul Pearson. Rezultatele testului de îndepărtare a radicalilor liberi de DPPH au fost exprimate ca activitate antioxidantă IC₅₀ (adică concentrația de probă necesară pentru îndepărtarea a 50% din radicalii liberi DPPH) în echivalenți Trolox (TE). Rezultatele testului FRAP, a testului de îndepărtare a H₂O₂ și a testului de îndepărtare a oxidului nitric au fost și ele exprimate ca IC₅₀ în TE.

Rezultate. Extractul etanolic de semințe de in a demonstrat că deține o bună activitate de reducere a radicalului stabil DPPH. FRAP IC₅₀ și DPPH IC₅₀ pentru semințele de in au fost semnificativ mai mari decât cele ale trolox. IC₅₀ a activității de captare a H₂O₂ de semințe de in a fost peste cea a troloxului, dar cu o semnificație mai mică. Activitatea de captare a IC₅₀ a semințelor de in NO a fost mult mai mică decât pentru trolox. Analiza corelației dintre TPC și testele antioxidante *in vitro* a relevat faptul că DPPH ($r = 0,8907$), FRAP ($r = 0,9076$) și H₂O₂ ($r = 0,8201$) au fost corelate semnificativ cu TPC.

Concluzii

1. Prin testele efectuate *in vitro*, a fost demonstrată activitatea antioxidantă a extractului etanolic din semințe de in.
2. Rezultatele noastre indică faptul că extractul etanolic de semințe de in studiat a dovedit o capacitate de a reduce ionul feric (Fe³⁺) la ionul feros (Fe²⁺) mai mare decât activitățile de captare a DPPH, H₂O₂ și NO.
3. În comparație cu Troloxul, capacitățile de captare ale extractului de semințe de in a DPPH, FRAP și H₂O₂ au fost mai bune.
4. Fiindcă analiza corelației dintre testele antioxidante *in vitro* și polifenolii totali a fost foarte semnificativă, activitatea antioxidantă a extractului etanolic de semințe de in poate fi atribuită compușilor fenolici.

Studiul 3. Evaluarea efectelor antioxidante și antiinflamatorii ale extractului etanolic din semințe de *In in vivo*.

Scopul studiului. Studiul de față a investigat potențialul antiinflamator și antioxidant *in vivo* ca tratament curativ, dar și ca și tratament profilactic al extractului de semințe de in în inflamația acută experimentală indusă de terebentină.

Material și metodă. Experimentul desfășurat în cadrul acestui studiu a fost efectuat pe șobolani femele. Inflamația acută a fost indusă prin intermediul unei doze unice de terebentină. Pentru evaluarea activităților profilactice și terapeutice antiinflamatorii și antioxidante ale semințelor de in, au fost utilizate 9 grupuri (n=5) de șobolani femele. Extractele au fost administrate oral (100%, 50%, 25%) timp de șapte zile înainte de inducerea inflamației acute în evaluarea efectului profilactic al extractului precum și după inducerea inflamației acute în evaluarea efectului curativ al extractului. Efectele au fost comparate cu cele ale diclofenacului. Experimentele au fost aprobate atât de Comitetul de Etică de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, cât și de Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor din România. Evaluarea efectului antiinflamator și antioxidant *in vivo* a fost efectuat prin măsurarea factorului nuclear-κB seric (NF-κB), a 3-nitrotirozinei (3NT), a nitraților și nitraților totali (NOx). Markerii serici de stres oxidativ, măsurați prin utilizarea testelor colorimetrice. au fost: reactivitatea antioxidantă totală (TAC), statusul oxidativ total (TOS), indicele de stres oxidativ (OSI), tiolii totali (SH) și malondialdehida (MDA).

Rezultate. Activitatea antiinflamatoare a extractului din semințe de in a fost evaluată prin măsurarea nivelurilor serice de NOx, 3NT și NF-kB. S-a constatat că în grupul de inflamație a crescut NOx și 3NT ($p < 0,001$). Tratamentul profilactic și terapeutic cu extractul din semințe de in a scăzut și concentrația de NOx într-o manieră dependentă de doză, dar tratamentul terapeutic a fost mai eficient decât profilaxia. Tratamentele profilactice și terapeutice au crescut TAC, cel profilactic având un efect antioxidant mai bun.

Concluzii

1. Acest studiu a indicat faptul că extractul etanolic de semințe de in are efecte antioxidante și antiinflamatorii *in vivo*, ceea ce îl recomandă pentru terapia patogenetică a asocierii inflamației și stresului oxidativ cu cancerul sferei genitale feminine.
2. În urma rezultatelor cercetării, se poate afirma că extractul etanolic de semințe de in ar putea fi un potențial candidat al terapiei antioxidante și antiinflamatorii în carcinogeneză.
3. Administrarea profilactică și terapeutică a extractului etanolic de semințe de in a avut un efect inhibitor bun în inflamația acută indusă de terebentină.
4. Activitatea antiinflamatorie a extractului a fost mai bună în scop terapeutic decât în cel profilactic, și a constat în reducerea NO, 3NT și NF- κ B în mod dependent de doză.
5. Observație importantă este că efectul antiinflamator terapeutic a extractului etanolic din semințe de in a fost mai bun decât cel al diclofenacului.
6. La analizarea activității antioxidante, extractul etanolic din semințe de in a avut efecte diferite asupra speciilor reactive de oxigen și a antioxidantilor.
7. Speciile reactive de oxigen au fost reduse mai bine în administrarea terapeutică, iar TOS și SH au fost crescute mai mult prin administrarea profilactică.
8. Concentrația de 100% a extractului etanolic din semințe de in a avut cea mai bună activitate antiinflamatoare și antioxidantă și a fost mai eficient decât diclofenacul.
9. Cumulate, aceste rezultate sugerează că profilaxia cu extractul în concentrație de 100% crește activitatea antioxidantă, această terapie având activități antiinflamatorii și antioxidante prin reducerea NF- κ B, RNS și ROS.

Studiul 4. Efectele antiproliferative ale extractului etanolic din semințe de IN *in vitro*

Scopul studiului. Studiul de față a avut ca scop testarea capacității antiproliferative și citotoxice a extractului etanolic din semințe de in asupra unor linii celulare umane

Material și metodă. Pentru evaluarea activității antiproliferative a extractului etanolic din semințe de in s-a efectuat testul de viabilitate MTT pe diverse linii celulare umane: linia celulară de adenocarcinom ovarian uman (NIH:OVCAR-3), linia celulară de adenocarcinom ovarian A2780, linia celulară de adenocarcinom ovarian A2780cis rezistentă la cisplatină, linia celulară de adenocarcinom endometrial, Ishikawa, linie de celule fibroblaste umane normale și o linie de celulele endoteliale ale venei ombilicale umane. Viabilitatea celulară a fost evaluată după 24 de ore de expunere la extractul etanolic din semințe de in.

Rezultate. Linia celulară umană A2780 de carcinom ovarian epitelial și linia celulară A2780Cis, derivată, rezistentă la cisplatin, au prezentat răspunsuri diferite la diferite concentrații de extract etanolic de semințe de in. La o concentrație de 180mg/ml și 120mg/ml s-a observat o scădere a viabilității celulare pentru ambele linii. A fost observat faptul că concentrațiile mai mici de extract au indus o creștere a proliferării celulare a liniei celulare rezistente la cisplatină. Această creștere a proliferării celulare la tratamentul cu extract de semințe de in în doză mică a fost observată și în linia celulară OVCAR3, care, de asemenea, a răspuns mai puțin la dozele de 180 și 120 mg/ml de extract de in. În schimb, linia celulară de adenocarcinom endometrial Ishikawa s-a dovedit a fi mai sensibilă chiar și la doze mai mici de extract de semințe de in. Fibroblastii umani și celulele endoteliale umane din vena ombilicală au prezentat, totodată, un comportament diferit: celulele endoteliale s-au dovedit a fi mai sensibile în ceea ce privește citotoxicitatea chiar și la doze mai mici de extract.

Concluzii

1. Această etapă a studiului a demonstrat că extractul etanolic din semințe de in poate fi utilizat în terapia patogenetică a tumorilor ovariene și endometriale, deoarece a avut o activitate antiproliferativă

- semnificativă.
2. Efectul patogenetic antitumoral a fost dovedit prin inhibarea diferențiată a proliferării celulelor maligne cultivate, respectiv, celulele de carcinom ovarian epitelial A2780, variantă derivată a acestor celule ovariene rezistente la cisplatin A2780cis și celule de carcinom endometrial Ishikawa, au fost inhibitate într-o manieră dependentă de doză, dar extractul etanolic din semințe de in nu a avut un efect semnificativ asupra celulelor de adenocarcinom ovarian uman NIH:OVCA-3.
 3. Celulele nonmaligne au prezentat sensibilitate diferită față de extractul etanolic din semințe de in: celulele endoteliale s-au dovedit a fi mai sensibile în ceea ce privește citotoxicitatea chiar și la doze mai mici de extract de semințe de in, în timp ce fibroblastii umani nu au fost influențați.
 4. Va fi necesar ca studiile viitoare să găsească mai multe detalii patogenetice despre mecanismul molecular implicat în efectul diferit antiproliferativ al extractului etanolic din semințe de in pe celule maligne și nonmaligne

Studiul 5. Efectele antiproliferative ale extractului etanolic din semințe de IN *in vivo*

Scopul studiului. Acest studiu și-a propus să evalueze activitatea antiproliferativă, antioxidantă și antiinflamatorie a extractului etanolic din semințe de in *in vivo*, pe un de carcinom ascitic Ehrlich (EAC).

Materiale și metodă. Soareci femele BALB/c au fost utilizați pentru a evalua efectul semințelor de in asupra EAC. Experimentele au primit aprobare etică atât din partea Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, cât și a Naționalului Sanitar Veterinar și Alimentar din România. Șoarecii au fost împărțiți în trei grupuri (n = 10), după cum urmează: 1. grupul martor negativ (CONTROL) a primit soluție salină (5 ml/kg 0,9% NaCl g/v p.o); 2. grupul EAC a primit 4×10^6 celule EAC/șoarece în cavitatea peritoneală cu un volum de 0,2 mL în PBS și cel de al-3lea grup (EAC-FLAX) care a primit 4×10^6 celule EAC/șoarece în cavitatea peritoneală, cu un volum de 0,2 ml în PBS, iar din ziua 8 extractul etanolic a fost administrat prin gavaj (5 ml/kg greutate corporală po) timp de 10 zile consecutive. În ziua întâi și în ziua a 17-a a fost măsurată greutatea corporală (BW) (mg). În a 18-a zi animalele au fost sacrificate și au fost recoltate probe de sânge periferic pentru evaluarea răspunsului inflamator și a stresului oxidativ. De asemenea s-a recoltat și lichidul de ascită din cavitatea peritoneală și a fost măsurat volumul (mL) pentru evaluarea viabilității celulelor tumorale EAC.

Rezultate. La animalele EAC a existat un stres oxidativ seric ridicat în comparație cu grupul de CONTROL. În grupul EAC nu a existat o modificare importantă a TAC, în schimb s-a înregistrat o scădere semnificativă a SH, o creștere importantă a TOS, OSI și MDA. Tratamentul cu extractul de semințe de in a determinat o reducere a stresului oxidativ seric, reflectată într-o scădere semnificativă a TOS, OSI și MDA, plus o creștere importantă a SH. Markerii de stres oxidativ au fost măsurați și în lichidul de ascită. Tratamentul cu extractul etanolic din semințe de in a redus stresul oxidativ în ascită. Indicele OSI a scăzut moderat semnificativ în lichidul de ascită după administrarea extractului de semințe de in față de lotul martor ($p < 0,01$). În ser, EAC a determinat o creștere foarte semnificativă a NOx, 3NT și NF-kB. Tratamentul cu extractul etanolic de semințe de in a indus o reducere foarte importantă a 3NT și NF-kB, dar doar o mică scădere a Nox. În lichidul de ascită, tratamentul cu semințele de in a scăzut în mod constant NOx, 3NT și NF-kB.

Concluzii

1. Această etapă de studiu a demonstrat activitatea antitumorală, antiinflamatorie și antioxidantă a extractului etanolic din semințe de in, ca potențială variantă de terapie patogenetică în carcinomul ascitic Ehrlich.
2. Cercetarea dovedește că extractul etanolic din semințe de in are activitate antitumorală și *in vivo* la șoareci cu tumoră Ehrlich, reducând numărul celulelor viabile din lichidul de ascită.
3. În tumora Ehrlich la șoarece, extractul etanolic de semințe de in are activitate antioxidantă sistemică și locală prin reducerea SRO, fără a avea un efect semnificativ pe antioxidanți.
4. Totodată, în tumora Ehrlich la șoarece, extractul etanolic de semințe de in are activitate anti-inflamatorie sistemică și locală prin reducerea Nox, 3NT și NF-kB.
5. Acest efect poate fi atribuit modificărilor micromediului tumoral, induse de efectele combinate antioxidante și anti-inflamatorii, sistemice serice și locale în lichidul de ascită.

6. E necesar ca studiile viitoare să găsească mai multe detalii moleculare despre mecanismele patogenetice implicate în efectul antitumoral, antioxidant și antiinflamator *in vivo* al extractului de etanol din semințe de in.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

1. Demersul științific al tezei de doctorat a evaluat, în premieră cel puțin la nivel național, efectul extractului etanolic din semințe de in asupra unor mecanisme patogenetice importante din cancerle sferei genitale feminine, respectiv, acțiunea antiproliferativă corelată cu acțiunea antiinflamatorie și antioxidantă. Revendicăm o asemenea întâietate deoarece, după cum constatăm, studiile anterioare au analizat *doar* efectele semințelor de in, a făinei din semințele de in, a uleiului din semințele de in și ale unor compuși izolați din semințele de in. Avantajul efectiv al utilizării extractului etanolic din semințe de in este dat de concentrația mai mare în principii active într-un volum mai mic de produs, fiind astfel mai ușor de administrat.
2. Analiza fitochimică a confirmat faptul că extractul etanolic din semințe de in are o compoziție care depinde de condițiile de mediu și de cele tehnice.
3. Efectul antioxidant al extractului etanolic din semințe de in a fost demonstrat printr-o evaluare complexă, adică: *in vitro*, prin măsurarea capacității de a îndepărta H₂O₂, NO, DPPH și FRAP și *in vivo* în inflamația acută experimentală și în carcinomul ascitic Ehrlich.
4. Activitatea antioxidantă *in vivo* a asociat și efecte antiinflamatorii semnificative.
5. Cercetarea a demonstrat efectele antiproliferative ale extractului etanolic din semințe de in, *in vitro* și *in vivo*.
6. Caracterul inovativ al tezei de doctorat este conferit în fapt de evidențierea activității simultane antiproliferative, antiinflamatorii și antioxidante a extractului etanolic din semințe de in, ceea ce permite combaterea simultană a trei mecanisme patogenetice din cancerle sferei genitale feminine.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Pathogenetic mechanisms in tumors of the female genital tract. Experimental study

PhD Student **Elisabeta-Ioana Chera**

PhD Supervisor Prof.dr. **Patriciu Achimaş-Cadariu**

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Inflammation in carcinogenesis	19
1.1 Introduction	19
1.2 Chronic inflammation and cancer	20
1.2.1 Mutagenesis	22
1.2.2 Cell proliferation	22
1.2.3 Angiogenesis	22
1.2.4 Inhibition of apoptosis	22
1.2.5 Inflammation and reactive oxygen species	23
2. Oxidative stress in carcinogenesis	25
2.1 Generalities	25
2.2 Free radicals and oxidative stress	26
2.2.1 Sources of free radicals during inflammation	26
2.2.2 Reactive oxygen species	28
2.2.2.1 Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical	28
2.2.2.2 Peroxynitrite	29
2.2.2.3 Hypochloric acid	29
2.3 Dietary antioxidants	29
2.4 Antioxidants and chemotherapy	30
3. Estrogens in female genital tumors	31
3.1 Tumors of the female genital tract	31
3.2 The role of estrogen and estrogen receptors in cancer	32
3.3 The role of beta ER in gynecological cancers	34
3.3.1 Beta ER in ovarian cancer	35
3.3.2 Beta ER in endometrial cancer	35
3.4 Ovarian cancer and estrogen	36
3.5 Exogenous estrogen exposure and the risk of developing ovarian cancer	37
3.6 Hormone replacement therapy	38
4. Phytoestrogens	41
4.1 Introduction	41
4.2 Mechanism of action	41
4.3 Phytoestrogens in medical practice	43
4.4 Phytochemical compounds from flax seeds	44
4.4.1 Lignans	44
4.4.1.1 SDG	45
4.4.1.2 Pinosesinol	46
PERSONAL CONTRIBUTION	47
1. Working hypothesis	49
2. Study 1. Phytochemical analysis of ethanolic flax seed extract	53
2.1. Introduction	53
2.2. Materials and methods	54
2.2.1. Chemicals	54
2.2.2 Preparation of flaxseed extract	54
2.2.3 Phytochemical analysis of polyphenols	54
2.2.3.1 Total Polyphenols Content	54

2.2.3.2 Total Flavonoids Content	54
2.2.3.3 Identification and quantification of polyphenolic compounds by HPLC-DAD-ESI MS	55
2.2.3.4 Identification and quantification of polyphenolic compounds by FTIR	55
2.3. Results	55
2.4 Discussions	56
2.5 Conclusions	60
3. Study 2. <i>In vitro</i> evaluation of antioxidant effects of ethanolic flaxseed extract	61
3.1 Introduction	61
3.2 Materials and methods	62
3.2.1 Chemicals	62
3.2.2 DPPH Analysis	62
3.2.3 FRAP Analysis	63
3.2.4 H ₂ O ₂ Analysis	63
3.2.5 NO Analysis	63
3.2.6 Statistical analysis	64
3.3 Results	64
3.3.1 In vitro antioxidant activity	64
3.4 Discussion	67
3.5 Conclusion	69
4. Study 3. <i>In vivo</i> evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanolic flaxseed extract	71
4.1 Introduction	71
4.2 Materials and methods	72
4.2.1 Chemicals	72
4.2.2 Experimental inflammation	72
4.2.2.1 Experimental animals	72
4.2.2.2 Experimental inflammation and study protocol	72
4.2.3 Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effect in vivo	74
4.2.3.1 Determination of NF- κ B and 3NT by ELISA method	74
4.2.3.2 Determination of nitrites and total serum nitrates	75
4.2.3.3 Determination of total antioxidant capacity	75
4.2.3.4 Determination of total serum oxidative status	76
4.2.3.5 Calculation of the oxidative stress index	77
4.2.3.6 Determination of malondialdehyde	77
4.2.3.7 Determination of total serum thiols	77
4.2.4 Statistical analysis	77
4.3 Results	77
4.3.1 Anti-inflammatory effects	77
4.3.2 In vivo antioxidant effects	79
4.4 Discussion	84
4.5 Conclusion	87
5. Study 4. <i>In vitro</i> antiproliferative effects of ethanolic flaxseed extract	89
5.1 Introduction	89
5.2 Materials and methods	90
5.2.1 Human cell lines	90
5.2.2 MTT Cytotoxicity Test	91
5.3 Results of MTT Cytotoxicity Test	91
5.4 Discussion	95
5.5 Conclusion	96

6. Study 5. <i>In vivo</i> antiproliferative effects of ethanolic flaxseed extract	97
6.1 Introduction	97
6.2 Materials and methods	98
6.2.1 Experimental model	98
6.2.3 Evaluation of systemic anti-inflammatory and antioxidant activity	99
6.2.4 EAC tumor cell viability	99
6.2.5 Statistical analysis	100
6.3 Results	100
6.3.1 Flaxseeds Extract Treatment Effects on the Body Weight, Ascites Volume, and Viable/Nonviable Cell Count in EAC-Bearing Mice	100
6.3.2 <i>In vivo</i> anti-inflammatory and antioxidant effects	101
6.4 Discussion	108
6.5 Conclusion	111
7. General conclusions	113
8. Originality and innovative contributions of the thesis	115
REFERENCES	117
Annex 1 - List of tables	127
Annex 2 - List of figures	129

Keywords: cancer, flaxseed ethanolic extract, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, Ehrlich ascitis carcinoma

INTRODUCTION

Over the past two decades, there has been growing evidence that most chronic diseases (including cancer), at a molecular level, are caused by an disordered inflammatory response. This severe inflammatory response can be caused by a variety of factors, such as smoking, stress, obesity, alcohol, infectious agents, radiation, environmental factors, and so on. Together, they account for over 90% of the causes of these chronic diseases. In some cancers, inflammatory conditions are present before a malignant change occurs. In contrast, in other cancers, an oncogenic change induces an inflammatory microenvironment that promotes tumor growth. Regardless of its origin, the inflammation that "lies" in the tumor microenvironment has many tumorigenic promoting effects, by stimulating cell proliferation, inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis.

Among women, cancer is the second leading cause of death worldwide. Moreover, the burden of this malignant pathology is expanding and becoming heavier due to population growth and aging. Women make up about 49.5% of the world's population; however, they make up a larger proportion of the population over the age of 60, where cancer has the highest prevalence, due to differences in life expectancy and the leading causes of mortality.

Drugs that target cancer-associated inflammation have the potential to reshape an inflammatory infiltrate that promotes the appearance and progression of the tumor, or to prevent the migration of such cells to the tumor site. This potential to reverse the inflammation that supports tumor development could be the beginning of an exciting new era for anticancer therapies.

Recently, it has been found that polyphenols have an intense activity of capturing reactive oxygen species, inhibiting the appearance of cancer by stimulating the apoptosis of tumor cells. At the same time, due to their strong antioxidant capacity, polyphenols could limit the action of harmful free radicals, by interacting with pro-oxidant proteins or with metal ions and radiation.

Therefore, we can say that inflammation is a critical mechanism of cancer. Anti-inflammatory agents should be explored for both cancer prevention and treatment. Although numerous studies on cell

and animal cultures have identified several anti-inflammatory agents, their true potential will only be recognized by well-controlled clinical trials.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

In order to better understand some of the pathogenetic mechanisms underlying these cancers, this chapter of the thesis points out the main triggers of inflammation and oxidative stress, presenting the involvement of the mediators of inflammation in oncogenesis. The role of estrogens in tumors of the female genital tract is also described and the last chapter presents the main mechanisms by which phytoestrogens interact with the oncogenesis process as well as their usefulness in antitumor therapy.

PERSONAL CONTRIBUTION

Purpose and aims of the study

The present study aimed to:

1. Analyze the composition of the ethanolic flaxseed extract and also the *in vitro* antioxidant effects;
2. Evaluate the *in vivo* anti-inflammatory and antioxidant activity in an experimental acute inflammation model;
3. Evaluate the antiproliferative effects of ethanolic flaxseed extract on tumor cell lines;
4. Evaluate the *in vivo* antiproliferative, anti-inflammatory and antioxidant activity of the ethanolic flaxseed extract in experimental ascites associated with Ehrlich's carcinoma.

STUDY 1. Phytochemical analysis of ethanolic flaxseed extract

Aim of the study. The present study aimed to perform the phytochemical analysis of the ethanolic flaxseed extract.

Material and methods. To prepare the ethanolic flaxseed extract, 50 g of flaxseed were ground, and the resulting material was extracted with 70% ethanol using a modified Squibb repercolation method. The total polyphenol (TPC) and flavonoid content of flaxseed extract was measured using the Folin-Ciocalteu method. The identification and quantification of the polyphenolic compounds were performed by HPLC-DAD-ESI MS, a high-performance liquid chromatography (Agilent 1200 HPLC) with DAD detection, which was coupled to a mass spectrophotometer (Agilent 6110 MS), and also measured by using an FTIR spectrophotometer.

Results. The total polyphenol count in the flaxseed ethanolic extract was 690.2 mg GAE / g. The total flavonoid content was 28.61 mg QE / 100g plant material. HPLC-DAD-ESI has identified significant concentrations of hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids and lignans. For the subclasses of polyphenols identified, four lignans (Secoisolariciresinol-diglucoside (SDG), Secoisolariciresinol, Pinoresinol, Matairesinol), three hydroxybenzoic acids (hydroxybenzoic acid, gallic acid, syringic acid) and three hydroxycinnamic acids (caffeic acid, synaptic acid, ferulic acid) were described.

Conclusions

1. The ethanolic flaxseed extract is rich in polyphenolic compounds and flavonoids, compounds with anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative potential.
2. Of the chemical compounds measured in the flaxseed ethanol extract, lignans are found in the highest concentration.
3. Other phenolic compounds, such as hydroxybenzoic acid, were identified in high concentrations, while gallic acid and syringic acid were found in smaller amounts in the studied flaxseed ethanolic extract.
4. Hydroxycinnamic acid derivatives, such as caffeic acid, synaptic acid and ferulic acid, were found in low concentrations in the studied flaxseed ethanolic extract.

5. The phytochemical composition of the studied flaxseed ethanolic extract suggested a potential antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activity.

STUDY 2. In vitro evaluation of antioxidant effects of ethanolic flaxseed extract

Aim of the study. Because the phytochemical analysis revealed the presence of compounds with antioxidant potential, the present study investigated the *in vitro* antioxidant activity of flaxseed ethanolic extract by various methods.

Material and methods. To evaluate the antioxidant capacity of the investigated extract, the following methods were used: **1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging method;** **2. FRAP test (ferric reducing antioxidant power)** - which measured the capacity of flaxseeds for ferric reduction; **3. the H₂O₂ removal test** - which tests the ability of flaxseed to capture hydrogen peroxide and **4. the nitric oxide removal test** - which tests the ability of the extract to capture nitric oxide radicals. All results were expressed as mean ± standard deviation (SD) of three repetitions. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. The analysis of the correlations between the parameters of each group was performed with the Pearson test. DPPH free radical scavenging test results were expressed as IC₅₀ antioxidant activity (meaning the sample concentration required to remove 50% of DPPH free radicals) in Trolox (TE) equivalents. The results of the FRAP and nitric oxide analysis were also expressed as IC₅₀ in TE.

Results. Flaxseed ethanolic extract has been shown to have a good DPPH radical scavenging activity. FRAP IC₅₀ and DPPH IC₅₀ for flaxseeds were significantly higher than those of Trolox. The IC₅₀ of the H₂O₂ uptake activity of flaxseed was higher than that of the Trolox, but with less significance. The IC₅₀ uptake activity of NO flaxseed was much lower than that of the Trolox. Analysis of the correlation between TPC and *in vitro* antioxidant tests revealed that DPPH ($r = 0.8907$), FRAP ($r = 0.9076$) and H₂O₂ ($r = 0.8201$) were significantly correlated with TPC.

Conclusions

1. *In vitro* tests have demonstrated the antioxidant activity of ethanolic flaxseed extract.
2. Our results indicate that the studied ethanolic flaxseed extract has been shown to have a higher capacity to reduce ferric ion (Fe³⁺) to ferrous ion (Fe²⁺) than DPPH, H₂O₂ and NO capture activities.
3. Compared to Trolox, the uptake capabilities of DPPH, FRAP and H₂O₂ flaxseed extract were better.
4. Because the analysis of the correlation between *in vitro* antioxidant tests and total polyphenols was very significant, the antioxidant activity of flaxseed ethanolic extract can be attributed to phenolic compounds.

STUDY 3. In vivo evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory effects of ethanolic flaxseed extract

Aim of the study. The present study investigated the *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory activity of flaxseed ethanolic extract in an experimental model of acute inflammation induced by turpentine oil in rats.

Material and methods. The experiment in this study was performed on female rats. Acute inflammation was induced by a single dose of turpentine oil. For the evaluation of the prophylactic and therapeutic anti-inflammatory and antioxidant activities of flaxseeds, 9 groups ($n = 5$) of female rats were used. The extracts were administered orally (100%, 50%, 25%) for seven days before the induction of acute inflammation in the evaluation of the prophylactic effect of the extract as well as after the induction of acute inflammation in the evaluation of the curative effect of the extract. The effects were compared with those of diclofenac. The experiments were approved both by the Ethics Committee of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca and by the National Sanitary Veterinary and Food Safety Authority of Romania. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effect *in vivo* was performed by measuring serum nuclear-κB (NF-κB), 3-nitrotyrosine (3NT), nitrates and total nitrates (NO_x). Serum markers of oxidative stress, measured using colorimetric tests, were: total antioxidant

capacity (TAC), total oxidative status (TOS), oxidative stress index (OSI), total thiols (SH) and malondialdehyde (MDA).

Results. The anti-inflammatory activity of flaxseed extract was assessed by measuring serum NOx, 3NT and NF- κ B levels. It was found that NOx and 3NT increased in the inflammation group ($p < 0.001$). Prophylactic and therapeutic treatment with flaxseed extract also decreased the NOx concentration in a dose-dependent manner, but the therapeutic treatment was more effective than prophylaxis. Prophylactic and therapeutic treatments have increased TAC, the prophylactic one having a better antioxidant effect.

Conclusions

1. This study indicated that flaxseed ethanolic extract has antioxidant and anti-inflammatory effects in vivo, which recommends it for the pathogenetic therapy of cancers of the female genital tract.
2. Following the results of the research, it can be stated that ethanolic flaxseed extract could be a potential candidate for antioxidant and anti-inflammatory therapy in carcinogenesis.
3. Prophylactic and therapeutic administration of flaxseed ethanolic extract had a good inhibitory effect on acute inflammation induced by turpentine.
4. The anti-inflammatory activity of the extract was better for therapeutic than prophylactic purposes, and consisted of dose-dependent reduction of NO, 3NT and NF- κ B.
5. It is important to note that the therapeutic anti-inflammatory effect of flaxseed ethanolic extract was better than that of diclofenac.
6. When analyzing antioxidant activity, flaxseed ethanolic extract had different effects on reactive oxygen species and antioxidants.
7. Reactive oxygen species have been better reduced in therapeutic administration, and TOS and SH have been further increased by prophylactic administration.
8. The 100% concentration of flaxseed ethanolic extract had the best anti-inflammatory and antioxidant activity and was more effective than diclofenac.
9. Taken together, these results suggest that prophylaxis with the extract in 100% concentration increases the antioxidant activity, this therapy has anti-inflammatory and antioxidant activities by reducing NF- κ B, RNS and ROS.

Study 4. In vitro antiproliferative effects of ethanolic flaxseed extract

Aim of the study. The present study aimed to test the antiproliferative and cytotoxic capacity of ethanolic flaxseed extract on human cell lines.

Material and methods. To evaluate the antiproliferative activity of ethanolic extract from flaxseed, the MTT viability test was performed on various human cell lines: human ovarian adenocarcinoma cell lines (NIH: OVCAR-3), ovarian adenocarcinoma cell lines A2780, adenocarcinoma cell lines A2727cis resistant to cisplatin, endometrial adenocarcinoma cell lines Ishikawa, normal human fibroblast cell line, and a human umbilical vein endothelial cell line. Cell viability was assessed after 24 hours of exposure to flaxseed ethanolic extract.

Results. Human cell line A2780 of epithelial ovarian carcinoma and cell line A2780Cis showed different responses to different concentrations of flaxseed ethanolic extract. At a concentration of 180mg/ml and 120mg/ml, a decrease in cell viability was observed for both lines. It was observed that lower concentrations of the extract induced an increase in cell proliferation of the cisplatin-resistant cell line. This increase in cell proliferation with low-dose flaxseed extract treatment was also observed in the OVCAR3 cell line, which also responded less to doses of 180 and 120 mg/ml flaxseed extract. In contrast, the Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line has been shown to be more sensitive to even lower doses of flaxseed extract. Human fibroblasts and human endothelial cells in the umbilical vein also exhibited different behavior: endothelial cells have been shown to be more sensitive to cytotoxicity even at lower doses of the extract.

Conclusions

1. Flaxseed ethanolic extract can be used in the pathogenetic therapy of ovarian and endometrial tumors because it has significant antiproliferative activity.

2. The antitumor pathogenetic effect of flaxseed extract has been demonstrated by differentiated inhibition of cultured malignant cell proliferation, namely A2780 cell line, A2780cis, and Ishikawa endometrial carcinoma cells, that were inhibited in a dose-dependent manner, but no significant effect was shown on NIH human ovarian adenocarcinoma cells: OVCAR-3.
3. Non-malignant cells have shown different sensitivity to flaxseed ethanolic extract: endothelial cells have been shown to be more sensitive to cytotoxicity even at lower doses of flaxseed extract, while human fibroblasts were not influenced.
4. Future studies will need to find more pathogenetic details about the molecular mechanism involved in the different antiproliferative effects of the ethanolic extract of flaxseed on malignant and non-malignant cells.

STUDY 5. *In vivo* antiproliferative effects of ethanolic flaxseed extract

Aim of the study. This study aimed to evaluate the *in vivo* antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic flaxseed extract in an Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) model.

Materials and methods. Female BALB/c mice were used to evaluate the effect of flaxseed on EAC. The experiments received ethical approval from both the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, and the National Sanitary Veterinary and Food in Romania. The experimental animals were divided into three groups (n = 10) as follows: 1. the negative control group (CONTROL) received saline (5 ml/kg 0.9% NaCl w / v p.o); 2. the EAC group received 4×10^6 EAC / mouse cells in the peritoneal cavity with a volume of 0.2 mL in PBS and the 3rd group (EAC-FLAX) which received 4×10^6 EAC/mouse cells in the peritoneal cavity, with a volume of 0.2 ml in PBS, and from day 8 the ethanolic extract was administered by gavage (5 ml/kg body weight PO) for 10 consecutive days. Body weight (BW) (mg) was measured on day one and day 17. On the 18th day, the animals were slaughtered and peripheral blood samples were taken to assess the inflammatory response and oxidative stress. Ascites fluid from the peritoneal cavity was also collected and volume (mL) was measured to assess the viability of EAC tumor cells.

Results. In EAC animals, there was a high serum oxidative stress compared to the CONTROL group. In the EAC group was no significant change in TAC, instead there was a significant decrease in SH, a significant increase in TOS, OSI and MDA. Treatment with flaxseed extract resulted in a reduction in serum oxidative stress, reflected in a significant decrease in TOS, OSI and MDA, plus a significant increase in SH. Oxidative stress markers were also measured in ascites fluid. Treatment with flaxseed ethanolic extract reduced oxidative stress in ascites. The OSI index decreased moderately significant in ascites fluid after administration of flaxseed extract, compared to the control group ($p < 0.01$). In serum, EAC caused a very significant increase in NOx, 3NT and NF-kB. Treatment with ethanolic flaxseed extract induced a very significant reduction in 3NT and NF-kB, but only a small decrease in NOx. In ascites fluid, flaxseed treatment consistently decreased NOx, 3NT, and NF-kB.

Conclusions

1. This study demonstrated the antitumor, anti-inflammatory and antioxidant activity of flaxseed ethanolic extract as a potential variant of pathogenetic therapy in Ehrlich ascitic carcinoma.
2. Research shows that flaxseed ethanol extract has *in vivo* antitumor activity in mice with Ehrlich's tumor, reducing the number of viable cells in the ascites fluid.
3. In mice with Ehrlich's tumor, flaxseed ethanolic extract has systemic and local antioxidant activity by reducing ROS, without having a significant effect on antioxidants.
4. At the same time, in mice with Ehrlich's tumor, flaxseed ethanolic extract has systemic and local anti-inflammatory activity by reducing Nox, 3NT and NF-kB.
5. This effect can be attributed to changes in the tumor microenvironment, induced by the combined local and systemic antioxidant and anti-inflammatory effects in the ascites fluid.
6. Future studies need to find more molecular details about the pathogenetic mechanisms involved in the *in vivo* antitumor, antioxidant and anti-inflammatory effect of flaxseed ethanol extract.

Originality and innovative contributions of the thesis

1. The scientific approach of the doctoral thesis evaluated, for the first time at least at a national level, the effect of ethanolic flaxseed extract on important pathogenetic mechanisms in female genital cancers, respectively, antiproliferative action correlated with anti-inflammatory and antioxidant action. We claim such a primacy because, as we have seen, previous studies have looked only at the effects of flaxseed, flaxseed flour, flaxseed oil, and isolated flaxseed compounds. The advantage of using flaxseed ethanol extract is the higher concentration of active ingredients in a smaller volume of product, making it easier to administer.
2. The phytochemical analysis confirmed that the ethanolic flaxseed extract has a composition that depends on environmental and technical conditions.
3. The antioxidant effect of flaxseed ethanolic extract has been demonstrated by a complex evaluation, namely: *in vitro*, by measuring the ability to remove H₂O₂, NO, DPPH and FRAP and *in vivo* in an acute experimental inflammation and ascites Ehrlich carcinoma model.
4. *In vivo* antioxidant activity has also been associated with significant anti-inflammatory effects.
5. Research has demonstrated the antiproliferative effects of ethanolic extract from flaxseed, *in vitro* and *in vivo*.
6. The innovative character of the doctoral thesis is conferred by the simultaneous antiproliferative, anti-inflammatory and antioxidant activity of the ethanolic extract from flaxseed.