

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
CAROL DAVILA BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ**

*Acizii grași ca modulatori ai potențialului de proliferare și
migrare al celulelor tumorale*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. HINESCU MIHAIL EUGEN**

**Student-doctorand:
DUDĂU MARIA**

ANUL 2022

CUPRINS

Lista cu lucrări științifice publicate.....	7
Lista cu abrevieri și simboluri.....	9
Introducere	12
I. Stadiul actual al cunoașterii.....	17
1.1. Structura acizilor grași	17
1.2. Sursele de acizi grași.....	19
1.3. Metabolizarea acizilor grași.....	20
1.4. Date generale despre cătină	21
1.4.1. Compoziția biochimică a cătinei.....	22
1.5. Rădăcinile și scoarța cătinei.....	22
1.6. Frunzele de cătină	23
1.7. Fructele, pulpa și semințele de cătină	23
1.8. Acizi grași prezenți în cătină	24
1.8.1. Enumerare și rol fiziologic	24
2. Efectele biologice ale acizilor grași.....	25
2.1. Acidul palmitic	25
2.2. Activitatea regenerativă și tumorigenă a acidului palmitic	26
2.3. Acidul linoleic.....	27
2.4. Activitatea regenerativă a acidului linoleic.....	28
3. Acidul palmitoleic	29
3.4. Acțiunea acidului palmitoleic în carcinogeneză	30
4. Acizii grași - rol anti-proliferativ, pro-tumoral sau antimetastatic?	31
4.1. Efectul acizilor grași în afecțiunile tumorale ale pielii	31
4.2. Metabolismul acizilor grași în melanom	34
4.3. Rolul acizilor grași în carcinogeneză.....	35
4.4. Rolul acizilor grași în inflamație – afecțiuni și tumori cutanate	36

4.5.	Receptorul CD36 și acizii grași	37
4.6.	Acizii grași ca modulatori epigenetici	39
II.	Contribuții personale	42
1.	Ipoteza de lucru și obiective generale.....	42
2.	Materiale și metode	44
2.1.	Culturi celulare	44
2.2.	Realizarea soluțiilor experimentale	47
2.3.	Protocol de iradiere a celulelor aderente	47
2.4.	Colorație Oil Red pentru celule aderente.....	48
2.5.	Teste de viabilitate și citotoxicitate celulară.....	48
2.6.	Monitorizarea celulară în timp real - platforma xCELLigence	51
2.7.	Monitorizarea celulară în timp real- Videomicroscopie BioStation IM	53
2.8.	Obținerea lizatului celular.....	56
2.9.	Western Blot (WB)	56
2.10.	Extragerea ADN-ului genomic	58
2.11.	Determinarea gradului de metilare 5-mC a ADN genomic prin ELISA ...	58
2.12.	Imunofluorescență pentru detectarea 5 metil-citozinei (5-mC).....	58
2.13.	Determinări de tip Multiplex cu platforma Luminex.....	59
2.14.	Tehnica ELISA	60
2.15.	Analiza statistică	60
3.	STUDIUL 1 - Evaluarea potențialului proliferativ al uleiului de cătină asupra keratinocitelor normale și displazice - în condiții bazale și după iradiere UVA	61
3.1.	Ipoteză de lucru și obiective	61
3.2.	Rezultate	62
3.2.1.	Evaluarea viabilității și a citotoxicității uleiului de cătină asupra keratinocitelor normale și displazice	62

3.2.2. Evaluarea efectului uleiului de cătină asupra migrării keratinocitelor normale și displazice – wound healing	67
3.2.3. Evaluarea aderării keratinocitelor normale și displazice în condiții bazale/iradiere UVA după tratamentul cu ulei de cătină	69
3.2.4. Evaluarea efectului proliferativ al uleiului de cătină asupra keratinocitelor normale și displazice în condiții bazale și după iradiere UVA.....	70
3.2.5. Analiza acumulării lipidice în keratinocitele normale și displazice în condiții bazale și după iradiere UVA	72
3.2.6. Analiza expresiei CD 36 în keratinocitele normale și displazice în condiții bazale și după iradiere UVA	75
3.2.7. Discuții.....	78
4. STUDIUL 2 - Evaluarea proliferării, migrării și inflamației după tratamentul cu fracțiile purificate din uleiul de cătină a keratinocitelor și fibroblastelor dermale normale	79
4.1. Ipoteză de lucru și obiective	79
4.2. Rezultate	81
4.2.1. Evaluarea viabilității și citotoxicității fracțiilor purificate asupra keratinocitelor epidermale normale	81
4.2.2. Analiza acumulării lipidice în keratinocitele epidermale normale după tratamentul cu fracțiile purificate.....	86
4.2.3. Analiza morfologiei și migrării celulare după tratamentul cu fracțiile purificate	87
4.2.4. Evaluarea efectului proliferativ al fracțiilor purificate asupra keratinocitelor	90
4.2.5. Analiza profilului inflamator al keratinocitelor și fibroblastelor epidermale normale după tratamentul cu fracțiile purificate.....	92
4.2.6. Evaluarea expresiei VEGF în keratinocitele și fibroblastele dermale normale după tratamentul cu fracțiile purificate	95
4.2.7. Discuții.....	97

5. STUDIUL 3 - Evaluarea proliferării, migrării și metilării ADN-ului genomic după tratamentul cu acizi grași al liniei tumorale de melanom uman	99
5.1. Ipoteză de lucru și obiective	99
5.2. Rezultate	101
5.2.1. Evaluarea viabilității și a citotoxicității acizilor grași asupra fibroblastelor normale și celulelor de melanom uman de tip fibroblastic	101
5.2.2. Analiza acumulării lipidice în celulele tumorale de melanom uman după tratamentul cu acizi grași	104
5.2.3. Evaluarea efectului acizilor grași asupra migrării celulelor de melanom uman de tip fibroblastic – wound healing.....	105
5.2.4. Evaluarea efectului proliferativ al acizilor grași asupra fibroblastelor normale și celulelor de melanom uman de tip fibroblastic	109
5.2.5. Evaluarea efectului acizilor grași asupra migrării și invazivității celulelor de melanom uman de tip fibroblastic.....	113
5.2.6. Analiza metilării ADN-ului genomic în fibroblaste normale și celule de melanom uman de tip fibroblastic după tratamentul cu acizi grași	116
5.2.7. Discuții.....	118
6. Concluzii și contribuții personale	122
Bibliografie.....	126

Prezentarea generală a lucrării

Acizii grași sunt un grup de lipide esențiale tuturor organismelor vii, grupați în acizi grași saturați și acizi grași nesaturați. Acizii grași ω -3 și ω -6 sunt acizi grași polinesaturați (PUFA) recunoscuți ca molecule ce reglează o varietate de funcții biologice. Aceștia servesc ca sursă de energie, componentă a membranelor celulare și acționează ca molecule de semnalizare, implicate în diferite procese, inclusiv expresia genică. În ciuda faptului că sunt necesari pentru menținerea homeostaziei, lipsa enzimelor responsabile de sinteza endogenă a acizilor grași ω -3 și ω -6 face necesar aportul alimentar constant, de aceea acidul linoleic și acidul α -linolenic sunt numiți acizi grași esențiali (EFA) (1, 2). Multiple studii se concentrează pe evaluarea modificărilor sistemice ale expresiei genelor cauzate de compușii naturali, la diferite niveluri (transcriptomic, proteomic și metabolomic) pentru a desluși procesele biologice și mecanismele de acțiune. Deși efectul ω -6 și ω -3 asupra sănătății a fost parțial elucidat fiind prezentate în continuarea tezei efectele acestora, nu este încă clar, care este modul de acțiune ca molecule care promovează sănătatea, atât în condiții patologice, cât și fiziologice.

În ultimii ani, interesul pentru cercetarea compușilor naturali a fost revitalizat, cu scopul de a identifica noi molecule cu rol anti-tumoral dar și antibiotice pentru combaterea rezistenței antimicrobiene (3). Deși componente importante ale compușilor bioactivi extrași din cătină, acizii grași (FA) au fost mai puțin explorați în ceea ce privește efectele biologice. Uleiul de cătină este îmbogățit în acizi grași saturați și nesaturați, cu o concentrație mare de acid palmitoleic (POA) printre altele, cu efecte benefice dovedite asupra pielii (4). Acesta prezintă efecte antioxidante și antitumorale pe linii celulare normale și tumorale, printre care cele displazice cutanate (5-7). Există puține studii legate de efectul acizilor grași, extrași din cătină sau cei din alte surse naturale, privind regenerarea și proliferarea celulară, majoritatea publicațiilor din literatura de specialitate analizează efectul polifenolilor sau efectul global al uleiului obținut din cătină sau alte surse naturale.

Activitate de cercetare care a stat la baza rezultatelor prezentate a fost desfășurată în cadrul Institutul Național De Cercetare-Dezvoltare În Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș” București, Laboratorul de Biochimie- Proteomică din care fac parte din 2018 ca asistent de cercetare. Obiectivul general a fost reprezentate de implicarea directă în îmbunătățirea de tehnologii și produse din domeniul biotehnologiilor biomedicale și

farmaceutice, asigurarea transferului tehnologic rapid și eficient către industria implicată în producerea și comercializarea de bioproduse pentru sănătate dar și integrarea acestora în produse noi sau optimizate. Astfel, proiectele PNIII.P2-2.1-PED-2019-3141, numărul 382/2020, PN 19.29.01.04 și COP A 1.2.3./ grant ID:P_40_197/2016 au susținut cercetarea în cadrul laboratorului din Institutul Național „Victor Babeș” din București, unde a existat un interes mărit pentru studiul compușilor naturali. Proiectele au urmărit dezvoltarea biotehnologiilor medicale bazate pe proteomică, epigenetică, imunotoxicologie și imagistică pentru terapii regenerative, bioterapeutice dar și nanobiotehnologii. Au fost investigate bazele moleculare ale eficacității terapeutice și semnăturilor biochimice asociate acestor compuși, urmărind dezvoltarea de biofarmaceutice prin țintirea unor procese biochimice specifice, explorarea de noi compuși dar și sisteme de livrare la nivel celular și intracelular. De asemenea, a fost realizată testarea preclinică și pregătirea testării clinice a produselor, sistemelor și metodelor bazate pe biotehnologii.

Scopul general al cercetării în cadrul lucrării de doctorat este de a evalua *in vitro* efectul uleiului de cătină și a acizilor grași asupra proliferării și inflamației în celulele normale și tumorale precum și a modificărilor epigenetice induse, de la testarea citotoxicității și viabilității celulare până la analiza morfologiei celulelor tratate, expresiei de receptori implicați în transport, modulării migrării, reparării tisulare precum și a inflamației și metilării ADN-ului celulelor tumorale.

Ipotezele generale ale lucrării de doctorat sunt următoarele:

- I. Uleiul din semințe de cătină este o sursă potrivită de acizi grași cu proprietăți regenerative asupra pielii;
- II. Uleiul din semințe de cătină este o sursă potrivită de acizi grași cu proprietăți anti-inflamatorii asupra pielii;
- III. Uleiul din semințe de cătină este o sursă potrivită de acizi grași cu proprietăți regenerative asupra pielii după expunerea la radiații ultraviolete A (UVA)
- IV. Acizii grași saturați au efect pro-tumoral asupra celulelor tumorale de melanom
- V. Acizii grași ω -3 au efect anti-proliferativ asupra celulelor tumorale de melanom
- VI. Acizii grași modulează metilarea ADN-ului genomic în celulele tumorale de melanom

Obiectivele generale ale lucrării de doctorat și ale cercetării realizate sunt:

- Evaluarea viabilității și a citotoxicității celulare după tratamentul cu acizii grași

- Evaluarea efectului regenerativ al uleiului de cătină pe linii celulare normale și displazice
- Evaluarea efectului anti-inflamator al uleiului de cătină pe linii celulare normale și displazice
- Evaluarea efectului anti-proliferativ al acizilor grași pe fibroblaste normale de origine epidermală și tumorale de melanom
- Analiza metilării globale a ADN-ului celulelor tumorale și a activității enzimatică a DNMT-urilor după tratamentul cu acizi grași saturați și polinesaturați

În această lucrare sunt prezentate datele experimentale obținute legate de proprietățile regenerative ale acizilor grași extrași din cătină și analiza efectelor modulatorie ale acestora privind inflamația dar și tumorigeneza, pe linii celulare normale, displazice și tumorale de la nivel cutanat. Pentru realizarea acestor obiective, au fost realizate culturi celulare de fibroblaste/keratinocite normale, keratinocite displazice și melanom conform indicațiilor producătorului, teste de citotoxicitate și viabilitate celulară MTS și LDH, analiza morfologiei și a incluziunilor lipide ale celulelor tratate și a celor iradiate utilizând colorația Oil Red și microscopie în contrast de fază/filtru UV/TxRed, analiza proliferării și migrării celulare utilizând Nikon Biostation și platforma xCelligence RTCA DP, metode xMAP și ELISA pentru detectarea interleukinelor și a factorilor de creștere, extracția ADN-ului genomic și evaluarea metilării globale ale 5-mc prin ELISA și Imunofluorescență, dar și evaluarea activității enzimate a DNMT-urilor implicate în metilarea globală după tratament.

Utilizând metodele de cercetare și metodologia prezentată, rezultatele generale ale tezei de doctorat vor fi prezentate prin intermediul figurilor de mai jos comentate.

Primul studiu a presupus evaluarea potențialului proliferativ al uleiului de cătină asupra keratinocitelor normale și displazice - în condiții bazale și după iradiere UVA. Rezultatele obținute sunt:

- i. Uleiul de cătină stimulează proliferarea keratinocitelor normale și displazice
- ii. Uleiul de cătină inhibă migrarea keratinocitelor normale și displazice
- iii. Keratinocitele normale nu exprimă CD 36 în condiții bazale
- iv. Iradierea UV a keratinocitelor normale și displazice crește expresia receptorului CD36

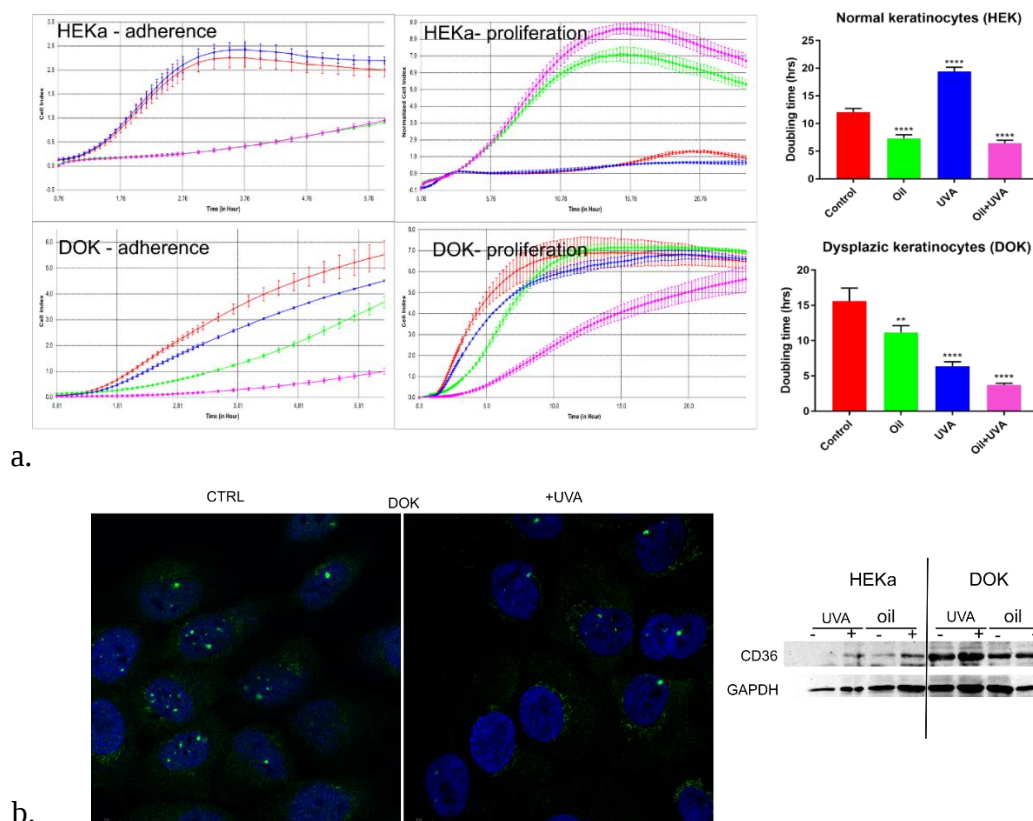


Figura 1. a) Iradierea UVA a keratinocitelor normale inhibă proliferarea, însă tratamentul cu ulei stimulează proliferarea în condiții bazale dar și după iradiere. Uleiul stimulează proliferarea keratinocitelor displazice, fără ca acest tratament să prezinte efecte benefice. Monitorizare impedență celulară prin xCelligence. b) CD36 este prezent în keratinocitele displazice, dar nu în cele normale, iar expresia crește după iradiere.

Imunofluorescență și Western Blot pentru CD36.

Studiul compară efectul uleiului din semințe de cătină asupra keratinocitelor umane normale și displazice, pornind de la premisa că pielea normală este alcătuită din ambele tipuri celulare, ale căror proporție se schimbă odată cu vârsta și cu expunerea la factorii de mediu nocivi.

S-a demonstrat că acizii grași de cătină au capacitatea de a îmbunătăți răspunsul post-inflamator rezultat din expunerea la UV. Mai mult decât atât, aceștia ar putea atenua efectele arsurilor solare, activând procesele regenerative ale pielii (8). Expunerea UVA afectează în mod diferit aceste populații de celule din punct de vedere proliferativ și ar migrării în zonele afectate. Anterior s-a demonstrat că keratinocitele displazice sunt mai puțin capabile să migreze în zona denudată decât keratinocitele normale, fiind mai afectate decât acestea din urmă de tratamentul UVA (9). În ceea ce privește proliferarea celulară, expunerea la UVA a indus

oprirea ciclului celular pentru keratinocitele normale (10, 11); acest rezultat, discutat în (182), poate duce la o creștere a timpului de dublare celulară, modificare observată în urma experimentelor de videomicroscopie în timp real și impedanță celulară. Celulele displazice nu prezintă acest caracter protector; sunt predispuse proliferării în urma iradierii UV, iar tratamentul cu ulei din semințe de cătină stimulează acest comportament nociv. Un mecanism posibil implicat în stimularea proliferării celulelor displazice după tratamentul cu ulei din semințe de cătină ar putea fi absorbția lipidică mediată de CD36. Transportatorii de acizi grași, inclusiv CD36, sunt supraexpresați în țesuturile cu un metabolism crescut al acizilor grași (12). Acizii grași sunt capabili să activeze receptorii PPAR (184), factori de transcriere care activează transcrierea genei CD36 (13). S-a demonstrat anterior că celulele tumorale își modifică metabolismul lipidic (14) pentru a favoriza supraviețuirea și proliferarea celulelor. Un studiu realizat de Pascual și colab. a arătat că celulele CD36+ sunt în directă legătură cu dieta bogată în lipide iar potențialul metastatic are la bază metabolismul lipidic. În acest studiu, celulele CD44+ izolate de la nivelul carcinoamele orale umane au exercitat o capacitate distinctivă de a supraexpresa atât genele receptorilor acizilor grași CD36, cât și genele implicate în metabolismul lipidic, accelerând astfel prpgresia metastazelor (14).

Concluzie de etapă: uleiul integral de cătină, deși considerat în literatură ca având efecte benefice asupra pielii, poate agrava proliferarea celulelor displazice și le poate proteja de efectul iradierii cu UVA, posibil prin creșterea expresiei receptorului CD36.

Cel de al doilea studiu a presupus evaluarea proliferării, migrării și inflamației după tratamentul cu fracțiile purificate din uleiul de cătină a keratinocitelor și fibroblastelor dermale normale. Rezultatele obținute sunt următoarele:

- i. Frația bogată în acid palmitic stimulează proliferarea celulară a keratinocitelor normale și a fibroblastelor dermice normale
- ii. Frația bogată în acid palmitic are efect anti-inflamator asupra keratinocitelor normale și a fibroblastelor dermice normale
- iii. Frația bogată în acid palmitic stimulează expresia VEGF în keratinocitele normale într-o manieră dependentă de timp

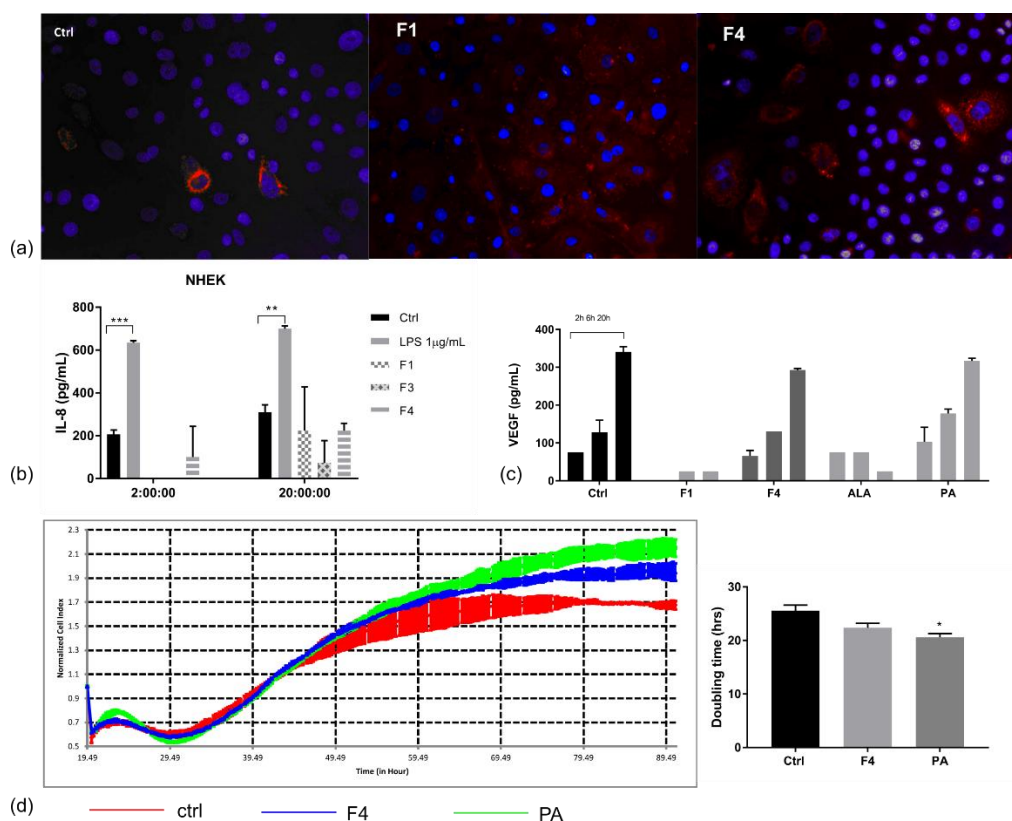


Figura 2. a) Keratinocitele normale preiau fracțiile purificate bogate în ALA și PA evaluate prin Oil Red. b) Tratamentul cu fracțiile purificate nu induce un răspuns inflamator, evaluat prin valoarea IL-8 tehnica ELISA. c) Expresia VEGF evaluată prin tehnica xMAP arată că F4 și PA stimulează factorul de creștere într-o manieră dependent de timp, comparative cu controlul. d) PA stimulează proliferarea keratinocitelor normale prin scăderea timpul de dublare celulară prin xCelligence.

Uleiul din semințe de cătină are multe efecte benefice raportate cu privire la sănătatea pielii, cum ar fi vindecarea rănilor (15, 16), reglarea cantității de sebum și îmbunătățirea afecțiunilor din dermatita atopică (4). Unele dintre aceste beneficii sunt atribuite acidului palmitoleic, un acid gras nesaturat, care se găsește în pulpa și coaja de cătină dar absentă în semințe (15, 17). Cu toate acestea, alți acizi grași din uleiul de cătină pot contribui, de asemenea, la sănătatea pielii. De exemplu, acidul palmitic, găsit într-o cantitate mare în semințele de cătină, este cunoscut a fi abundente în pielea umană sănătoasă; el contribuie la o bariera lipidică eficientă în modelele *in vitro* ale pielii și este utilizat de celule ca precursor pentru mai mult tipuri de acizi grași cu lanț saturat. Acesta este utilizat în produse cosmetice pentru piele și considerate sigure pentru administrare. Cu toate acestea, acizii grași nu sunt studiați, fiind trecuți trecute cu vederea, cele mai multe studii se concentrează pe acizii grași nesaturați (ω -3 și ω -6). De asemenea, compoziția în acizi grași a diferitelor derivate de cătină variază în funcție de suprafață, de sezonul de recoltare și chiar de la cultivare la cultivare

(menționat în partea generală a lucrării). Indiferent de acestea variații, în studiu sunt prezentate date legate de metoda de purificare a uleiului din semințe de cătină în fracții îmbogățite cu acizi grași saturați și nesaturați ale căror efecte asupra proliferării celulelor epidermale au fost testate. Au fost separate patru fracții, îmbogățite în acid α -linolenic , acid linoleic, acid oleic și acid palmitic, fracții care nu afectează viabilitatea celulară la o concentrație scăzută la nivel de micromolar (50 μ M sau mai puțin) precum și preluarea acestora la nivel celular. În studiu se demonstrează că fracțiile purificate, în afară de acidul palmitoleic, pot fi utilizate pentru a dezvolta produse legate de îngrijirea pielii, în ciuda variațiilor în compozițiile chimice ale uleiului.

Dintre cele patru fracții purificate, ALA și PA – fracțiile îmbogățite nu au modificat morfologia celulară a keratinocitelor normale și nu a determinat inflamație în keratinocite normale și fibroblaste dermice (evaluată prin eliberarea în mediul celular a citokinelor inflamatorii - IL-6 și TNF α). Producția de IL-8 a fost remarcată în ambele tipuri de celule la niveluri similare cu controlul. Se știe că keratinocitele sunt o sursă bogată de IL-8, care stimulează migrarea, și este util pentru a induce vindecarea rănilor (18).

O altă citokină asociată cu proliferarea celulară este VEGF, de asemenea, produse de keratinocite, care acționează prin semnalizare autocrină și stimulează proliferarea keratinocitelor. Este de remarcat faptul că supraexpresia VEGF este asociată cu psoriazisul și patologia tumorală (19) prin urmare, o expresie echilibrată este de dorit în urma aplicării unui tratament. Frația îmbogățită în acid palmitic a redus expresia VEGF, prin urmare, această fracția nu afectează mecanismul precizat mai sus. În cele din urmă, dintre cele două fracții, fracțiunea îmbogățită cu PA sprijinită keratinocite și proliferarea fibroblastelor, eventual prin susținerea metabolismului celular. Acest efect a devenit evident după aproximativ 30 h de incubare, cu efect pregnant la 48 h.

Concluzie de etapă: dintre fracțiile purificate din uleiul din semințe de cătină, fracția bogată în acid palmitic susține proliferarea celulară, fără a stimula inflamația sau sinteza de VEGF. Această fracție este potrivită pentru un tratament destinat pielii, necesitând teste suplimentare *in vivo* . În ciuda imposibilității de a extrage acidul palmitoleic separat de acidul α -linolenic din semințele de cătină, am demonstrat că alte fracții pot fi utilizate pentru a dezvolta produse legate de îngrijirea pielii.

Cel de al treilea studiu a presupus evaluarea proliferării, migrării și metilării ADN-ului genomic după tratamentul cu acizi grași al liniei tumorale de melanom uman. Rezultatele obținute sunt următoarele:

- i. Acidul docosaheptaenoic are efect antiproliferativ puternic asupra melanomului și a fibroblastelor normale epidermale
- ii. Acidul palmitic inhibă migrarea liniei tumorale de melanom
- iii. Acidul palmitic are efect antiproliferativ asupra melanomului dar și a fibroblastelor normale epidermale
- iv. Acidul palmitic crește nivelul de metilare al ADN-ului, fără modificarea activității DNMT-urilor
- v. Acidul α -linoleic are efect antiproliferativ tumoral și nu influențează fibroblastele normale epidermale
- vi. Acidul α -linoleic scade nivelul de metilare al ADN-ului, cu scăderea activității DNMT-urilor

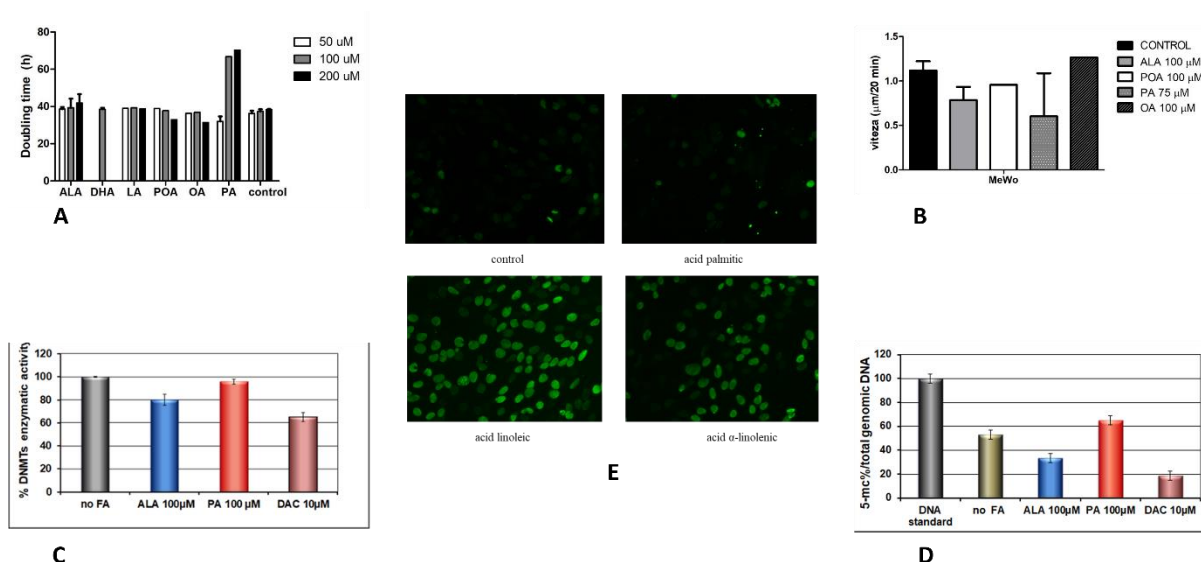


Figura 3. a) Acidul palmitic inhibă proliferarea melanomului dependent de concentrație evaluat prin măsurarea impedenței celulare la xCelligence. b) Acidul palmitic scade migrarea frontului celular evaluat prin scratch test. c) Acidul palmitic nu modifică activitatea DNMT-urilor. d) și e) Acidul palmitic crește metilarea ADN-ului celulelor canceroase evaluat prin ELISA și Imunofluorescență.

Concluzie de etapă: Acidul palmitic are efect antiproliferativ asupra liniei tumorale de melanom, acționând prin inhibarea proliferării și migrării frontului celular, precum și prin scăderea posibilității de migrare/metastazare. Mecanismul posibil propus este de creștere a metilării globale, metilare care nu este generată de activarea DNMT-urilor. Efectul antiproliferativ apare însă și la linia celulară normală, însă la concentrații mari, fără să moduleze metilarea ADN-ului.

Componente importante ale compușilor bioactivi extrași din cătină, acizii grași au fost mai puțin explorați în ceea ce privește efectele biologice. Uleiul de cătină este îmbogățit în acizi grași saturați și nesaturați, având efecte benefice dovedite asupra pielii normale, dar și după expunerea UV. Acest studiu prezintă datele obținute după testarea uleiului de cătină și a acizilor grași componenți asupra regenerării celulare și a pielii, inflamației și modulării epigenetice a celulelor tumorale de melanom. Uleiul din semințe de cătină stimulează proliferarea keratinocitelor normale și displazice în condiții bazale dar și după iradiere UVA, iradierea ducând la creșterea expresiei CD36. Frațiunile purificate din uleiul din semințe de cătină bogate în acid palmitic au efect proliferativ asupra celulelor normale epidermale. Astfel, a fost testat preclinic efectul acestui ulei și a fracțiilor asupra liniilor celulare fiind pregătită testarea clinică a acestor posibile produse cu utilizare în cosmetologie dar și ca suplimente. De asemenea, acidul α -linoleic este un nutrient bioactiv cu posibilă capacitate de modulator pozitiv epigenetic, spre deosebire de acidul palmitic. Apare necesară evaluarea în studii viitoare a expresiei ARNm a DNMT-urilor implicate în metilarea ADN-ului, precum și analiza modificărilor post-transcripționale ale histonelor H3 și H4 pentru investigarea mecanismului de acțiune al acizilor grași ca modulatori epigenetici.

Concluzii și contribuții personale

Prezenta lucrare și-a propus investigarea efectelor pe care anumiți compuși naturali i-ar putea avea asupra proliferării celulare, cu scopul de a identifica posibili candidați cu activitate anti-neoplazică *in vitro*. Pornind de la stadiul actual al cunoașterii, vast și bine documentat pe anumite domenii (de exemplu: acțiunile polifenolilor din extractele de plante, activitatea antioxidantă a unor compuși sau amestecuri extrase din plante), am identificat acizii grași, saturați și polinesaturați, acidul palmitic, acidul oleic, acidul linoleic, acidul α -linolenic, acidul palmitoleic și acidul docosahexanoic, mai puțin studiați în relație cu activitatea antiproliferativă. Foarte multe studii legate de acizii grași exploatează rolul în inflamație, parțial mediat de un receptor membranal capabil să preia din mediul extern acizi grași cu lanț lung de carbon și să îi introducă în celulă - CD36. Ca urmare, a fost selectat uleiul de cătină, un compus derivat dintr-o plantă care este răspândită și la noi în țară, bogată în acizi grași și a cărei compoziție a fost studiată în mod repetat ca sursă de compuși cu acțiune regenerativă. Ca model de lucru am ales celule cu origine epidermală, deoarece rezultatele obținute *in vitro* au cea mai rapidă translatabilitate către o aplicare topică *in vivo*.

Activitatea de cercetare originală a fost structurată pe trei niveluri:

- i) studiul uleiului integral,
- ii) studiul separat al efectelor acizilor grași componenți pe celule normale și displazice;
- iii) studiul efectelor antiproliferative ale acestor acizi grași pe celule tumorale.

Rezultatele au confirmat inițial datele din literatură, referitoare la efectele regenerative ale uleiului de cătină pentru celulele epiteliale, dar au evidențiat în plus răspunsul aberant al celulelor displazice la aceleași condiții experimentale, bazal și după iradiere. În continuare, a fost necesar să fie testat dacă efectele obținute sunt datorate amestecului de compuși activi din uleiul de cătină sau doar a unui compus anume, de aceea au fost testate toate fracțiunile de acizi grași purificați din uleiul de cătină. Astfel, acidul palmitic prezintă efecte proliferative pe keratinocitele normale, în acord cu literatura și, în plus, nu stimulează producerea de citokine pro-inflamatorii. Acest studiu a fost extins către celulele dermice normale, fibroblastele, care după tratamentul cu acid palmitic în concentrații sub 100 μ M migrează mai rapid, proliferază și pot în acest fel să contribuie la vindecarea unei răni. În schimb, la concentrații crescute (între 100-200 μ M) apare un efect inhibitor, care se menține și în cazul celulelor de melanom. Ca parte de investigare a mecanismului de acțiune, a fost demonstrat că tratamentul cu acid palmitic crește metilarea ADN-ului, fără să modifice acțiunea proteinelor care catalizează transferul unei grupări metil de pe donori pe citozină. În final, am comparat aceste efecte ale acidului, un acid gras saturat, cu cele ale unor acizi grași nesaturați, menționați frecvent în literatură ca având printre altele efecte benefice cardiovasculare, care au putut fi purificați din uleiul de cătină. Dintre acizii grași testați, acidul α -linoleic a avut la concentrații mari un efect inhibitor asupra proliferării celulelor de melanom, însă a favorizat migrarea transmembranară scăzând metilarea globală a ADN-ului. În concluzie, din punct de vedere al comportamentului celular agresiv, malign, poate fi necesară o schimbare de paradigmă în ceea ce privește acizii grași esențiali, în care sunt de luat în considerare acizii grași saturați ca având efecte benefice, pe anumite linii celulare în funcție de fenotipul celular și de distribuția receptorilor implicați în metabolismul lipidic. Luând însă în considerare efectele sistemice, utilitatea actuală este limitată la aplicări topice, însă biodisponibilitatea largă, efectul anti-tumoral și lipsa de toxicitate pe celulele normale susțin avansarea cercetării pe sferoizi și organoizi dar și modele *in vivo*, ca direcții viitoare.

În continuare sunt prezentate rezultatele studiului în funcție de ipotezele prezentate în cadrul lucrării:

- i. Uleiul de cătină stimulează proliferarea keratinocitelor normale și displazice

- ii. Uleiul de cătină are efect important de inhibare a migrării keratinocitelor displazice
- iii. Uleiul de cătină inhibă migrarea keratinocitelor normale
- iv. Tratatamentul cu ulei de cătină crește proliferarea keratinocitelor normale iradiate UV
- v. Tratatamentul cu ulei de cătină crește proliferarea keratinocitelor displazice iradiate UV
- vi. Iradierea nu afectează preluarea și formarea de incluziuni lipidice
- vii. Keratinocitele normale nu exprimă CD 36 în condiții bazale
- viii. Iradierea UV a keratinocitelor normale și displazice crește expresia receptorului CD36
- ix. Frațiile purificate din uleiul din semințe de cătină bogate în acizi acid palmitic respectiv acid α -linolenic nu prezintă citotoxicitate, similar cu acizi grași standard utilizați
- x. Frația bogată în acid palmitic stimulează proliferarea celulară a keratinocitelor normale și a fibroblastelor dermice normale
- xi. Frația bogată în acid palmitic are efect anti-inflamator asupra keratinocitelor normale
- xii. Frația bogată în α -linolenic nu stimulează expresia VEGF în keratinocitele normale și fibroblastele dermice normale
- xiii. Frația bogată în acid palmitic modulează expresia VEGF într-o manieră dependentă de timp, similar situației bazale în keratinocitele normale și fibroblastele dermice normale
- xiv. Frațiile selectate scad secreția IL-8 în keratinocitele normale
- xv. Frațiile selectate nu modifică secreția IL-8 în fibroblastele dermice normale
- xvi. Frația bogată în acid palmitic stimulează tardiv migrarea fibroblastelor dermice normale
- xvii. Acizii grași formează incluziuni lipidice perinuclear în linia tumorală de melanom
- xviii. Acidul docosahexaenoic are efect antiproliferativ puternic asupra melanomului și a fibroblastelor normale epidermale
- xix. Acizii grași, cu excepția acidului linoleic, stimulează migrarea frontului liniei de fibroblaste normale
- xx. Acidul palmitic inhibă migrarea frontului liniei tumorale de melanom cu afectarea morfologiei celulare
- xxi. Acidul oleic stimulează migrarea frontului liniei tumorale de melanom
- xxii. Acidul palmitic are efect antiproliferativ asupra melanomului dar și a fibroblastelor normale epidermale dependent de concentrație
- xxiii. Acidul palmitic inhibă migrarea transmembranară a celulelor tumorale de melanom

- xxiv. Acidul palmitic crește nivelul de metilare al ADN-ului, fără modificarea activității DNMT-urilor
- xxv. Acidul α -linoleic are efect antiproliferativ tumoral dependent de concentrație și nu influențează fibroblastele normale epidermale
- xxvi. Acidul α -linoleic scade nivelul de metilare al ADN-ului, cu scăderea activității DNMT-urilor

În urma expunerii rezultatelor obținute, apare necesară continuarea experimentelor cu evaluării activității enzimatice a DNMT-urilor prin metoda ELISA precum și a expresiei DNMT-urilor prin imunofluorescență și Western Blot, evaluarea ARNm a DNMT-urilor prin q-RT-PCR, precum și analiza modificărilor post-transcripționale ale histonelor H3 și H4 (ELISA, imunofluorescență și Western Blot) pentru investigarea mecanismului de acțiune al acizilor grași ca modulatori epigenetici. De asemenea, este necesară testarea pe modele *in vitro*, inclusiv obținerea unor sferoizi pentru linia tumorală de melanom sau a unor organoizi de piele pe care să fie testate în continuare efectele anti-inflamatorii, anti-proliferative dar și ca adjuvanți în tratamentul formării metastazelor. Expresie receptorului CD36 poate fi de asemenea inhibată prin utilizarea sulfo-N-succinimidil Oleat și studiat efectul tratamentului cu acid palmitic, dar și cum este modulată metilarea în aceste condiții, experimente preliminare în acest sens fiind efectuate pe linii de monocite dar și pe linia tumorală de melanom. Având în vedere formarea dobândită pe parcursul anilor de doctorat, se pot genera linii celulare tumorale, inclusiv de melanom, care pot fi editate genic prin sistemul CRISPR-Cas9, pentru CD36 K.O. ce permit studiul funcției acestui receptor în proliferare și migrare transmembranară.

Bibliografie selectivă

1. Panda SS, Jhanji N. Natural Products as Potential anti-Alzheimer Agents. *Curr Med Chem*. 2019.
2. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012;308(10):1024-33.
3. Sala-Vila A, Calder PC. Update on the relationship of fish intake with prostate, breast, and colorectal cancers. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(9):855-71.
4. Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS, Biswas P, Thorpe GC, Moore HJ, et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;7:CD003177.
5. Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3) *Int J Vitam Nutr Res*. 1998;68(3):159-73.
6. Brenna JT. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(2):127-32.
7. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008;233(6):674-88.
8. Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP. Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):44-53.
9. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(1):135-49.
10. Griffin BA. How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular disease risk? Evidence from the OPTILIP study. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(1):57-62.
11. Hyde CA, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(6):701-15.
12. Smith WL. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(2):174-82.
13. Calviello G, Serini S, Piccioni E. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. *Curr Med Chem*. 2007;14(29):3059-69.
14. Fetterman JW, Jr., Zdanowicz MM. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(13):1169-79.
15. Rodriguez-Cruz M, Serna DS. Nutrigenomics of omega-3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. *Nutrition*. 2017;41:90-6.
16. Pancione M, Forte N, Sabatino L, Tomaselli E, Parente D, Febbraro A, et al. Reduced beta-catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase 2, and patient outcome. *Hum Pathol*. 2009;40(5):714-25.
17. Pancione M, Sabatino L, Fucci A, Carafa V, Nebbioso A, Forte N, et al. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome. *PLoS One*. 2010;5(12):e14229.
18. Cho Y, Turner ND, Davidson LA, Chapkin RS, Carroll RJ, Lupton JR. Colon cancer cell apoptosis is induced by combined exposure to the n-3 fatty acid docosahexaenoic acid and butyrate through promoter methylation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014;239(3):302-10.
19. Voisin S, Almen MS, Moschonis G, Chrousos GP, Manios Y, Schiöth HB. Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(5):654-62.

Lista cu lucrări științifice publicate

Articole publicate ca Prim Autor

1. **Dudau, M.**, Codrici, E., Tarcomnicu, I., Mihai, S., Popescu, I. D., Albulescu, L., Constantin, N., Cucolea, I., Costache, T., Rambu, D., Enciu, A. M., Hinescu, M. E., & Tanase, C. (2021). A Fatty Acid Fraction Purified From Sea Buckthorn Seed Oil Has Regenerative Properties on Normal Skin Cells. *Frontiers in pharmacology*, 12, 737571. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.737571> IF:5.8
2. **Dudau, M.**, Vilceanu, A. C., Codrici, E., Mihai, S., Popescu, I. D., Albulescu, L., Tarcomnicu, I., Moise, G., Ceafalan, L. C., Hinescu, M. E., Enciu, A. M., & Tanase, C. (2021). Sea-Buckthorn Seed Oil Induces Proliferation of both Normal and Dysplastic Keratinocytes in Basal Conditions and under UVA Irradiation. *Journal of personalized medicine*, 11(4), 278. <https://doi.org/10.3390/jpm11040278> IF:4.945
3. **Dudău, M.**, Codrici, E., Tanase, C., Gherghiceanu, M., Enciu, A. M., & Hinescu, M. E. (2020). Caveolae as Potential Hijackable Gates in Cell Communication. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 581732. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.581732> IF:6.684

Articole publicate Co-autor

1. Sabo, A. A., **Dudau, M.**, Constantin, G. L., Pop, T. C., Geilfus, C. M., Naccarati, A., & Dragomir, M. P. (2021). Two Worlds Colliding: The Interplay Between Natural Compounds and Non-Coding Transcripts in Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, 12, 652074. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.652074> IF:5.811
2. Tanase, C., Enciu, A. M., Codrici, E., Popescu, I. D., **Dudau, M.**, Dobri, A. M., Pop, S., Mihai, S., Gheorghisan-Gălățeanu, A. A., & Hinescu, M. E. (2022). Fatty Acids, CD36, Thrombospondin-1, and CD47 in Glioblastoma: Together and/or Separately?. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 604. <https://doi.org/10.3390/ijms23020604>
3. Tătaru, C. P., Tătaru, C. I., **Dudău, M.**, Moșu, A., Luca, L., Maria, B., Bancu, A., & Curcă, P. F. (2021). Traumatic Intralenticular Neovascularization in a HLA B27+ Pediatric Patient. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1493. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081493> IF:3.706

4. Chirică, I. M., Enciu, A. M., Tite, T., **Dudău, M.**, Albulescu, L., Iconaru, S. L., Predoi, D., Pasuk, I., Enculescu, M., Radu, C., Mihalcea, C. G., Popa, A. C., Rusu, N., Niță, S., Tănase, C., & Stan, G. E. (2021). The Physico-Chemical Properties and Exploratory Real-Time Cell Analysis of Hydroxyapatite Nanopowders Substituted with Ce, Mg, Sr, and Zn (0.5-5 at.%). *Materials* (Basel, Switzerland), 14(14), 3808. <https://doi.org/10.3390/ma14143808> IF:3.623

5. Dobri, A. M., **Dudău, M.**, Enciu, A. M., & Hinescu, M. E. (2021). CD36 in Alzheimer's Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting. *Neuroscience*, 453, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.003> IF:3.59

6. Albulescu, R., Popa, A. C., Enciu, A. M., Albulescu, L., **Dudau, M.**, Popescu, I. D., Mihai, S., Codrici, E., Pop, S., Lupu, A. R., Stan, G. E., Manda, G., & Tanase, C. (2019). Comprehensive In Vitro Testing of Calcium Phosphate-Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications. *Materials* (Basel, Switzerland), 12(22), 3704. <https://doi.org/10.3390/ma12223704> IF:3.623

7. Preda P, Enciu Am, Avram M, Tanase C, **Dudau M**, Mihalache I, Tutunaru O, Stan D, Fikai A. Cytotoxicity evaluation and physicochemical properties of collagen isolated from silver carp tails as potential biomaterial. *Rom Biotechnol Lett*. 2021; 26(4): 2808-2817. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.4/2808-2817> IF:0.404