

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL MEDICINĂ**

**STUDII PRIVIND EFECTUL UNOR POLIFENOLI ASUPRA UNOR LINII  
CELULARE TUMORALE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. GANEA CONSTANȚA**

**Student-doctorand:**

**CIOLAC (Căs. HAZAPARU) OANA-ALINA**

**ANUL 2020**

## Cuprins

Introducere .....	4
Stadiul actual al cunoașterii .....	5
Curcumina .....	5
Galatul de 3-O-epigallocatechină .....	6
Contribuții personale .....	7
Ipoteza de lucru și obiectivele generale .....	7
Metodologia generală a cercetării .....	7
Rezultate .....	12
Studiul I: Analiza efectelor administrării curcuminei și EGCG-ului asupra liniei celulare de carcinom epidermoid A-431 .....	12
Efectul sinergic obținut prin co-administrarea curcuminei și EGCG asupra clonogenității, în linia celulară A-431 .....	12
Colapsul potențialului membranelor mitocondrial în linia celulară A-431, după co-administrarea curcuminei cu EGCG. ....	13
Efectul curcuminei asupra viabilității/proliferării celulare prin metoda WST-1 .....	13
Curcumina induce stres oxidativ, în timp ce EGCG demonstrează un efect anti-oxidativ într-o manieră dependentă de doză .....	14
Efectul co-tratamentului curcumină și EGCG asupra viabilității celulelor tumorale din linia celulară A-431 .....	15
Efectul curcuminei și al EGCG asupra ciclului celular.....	16
Efectul curcuminei și al EGCG asupra apoptozei.....	16
Studiul II: Analiza efectului curcuminei și EGCG asupra liniei celulare de fibroblaste dermice normale CCD-1070Sk.....	17
Efectele curcuminei și ale EGCG asupra viabilității/proliferării liniei celulare CCD-1070Sk. 17	
Studiul III: Comparații privind efectul administrării combinate sau individuale a EGCG și a curcuminei asupra liniei celulare A-431 .....	18
Comparații privind evaluarea supraviețuirii clonogene după tratamentul combinat, respectiv individual al curcuminei și al EGCG asupra liniei celulare A-431 .....	18
Diferențe în evaluarea potențialului membranelor mitocondrial după co-administrarea curcuminei cu EGCG și administrarea curcuminei individual în linia celulară de adenocarcinom epidermoid A-431 .....	19
Evaluarea fazelor ciclului celular în urma co-administrării curcuminei și EGCG comparativ cu expunerea individuală la curcumină în linia de carcinom epidermoid A-431 .....	20

Studierea efectului curcuminei și al EGCG-ului după utilizarea curcuminei în mod individual și a tratamentului combinat dintre curcumină și EGCG asupra viabilității celulare în cazul carcinomului epidermoid folosind citometria în flux.....	21
Concluzii.....	22
Lista lucrărilor științifice publicate în reviste cotate ISI.....	26
Lista abrevierilor.....	28
Bibliografie selectivă.....	30

## Introducere

Experimentele din această lucrare au fost realizate pentru demonstrarea proprietăților anti-cancerigene ale unor compuși naturali, polifenolii. În cadrul temei propuse pentru elaborarea acestei lucrări s-a avut în vedere studierea efectelor anti-proliferative a doi polifenoli, curcumina și EGCG-ul. Cercetarea a fost structurată în trei studii care s-au referit la investigarea efectului sinergic al celor doi polifenoli în linia celulară de adenocarcinom epidermoid A-431, investigarea efectelor toxice ale EGCG-ului și curcuminei într-o linie celulară de fibroblaste dermice normale CCD-1070Sk, cât și analiza comparativă a administrării simultane a celor doi compuși polifenolici.

Primul studiu a fost realizat plecând de la date din literatură care au demonstrat rolul citotoxic al co-tratamentului dintre curcumină și EGCG-ului asupra unor linii celulare tumorale maligne. Somers-Edgar și colaboratorii au demonstrat efectul sinergic citotoxic al celor doi compuși în tratamentul administrat în linia celulară MDA-MB-231 (Somers-Edgar et al., 2008). Același efect a fost observat și asupra liniilor celulare de cancer pulmonar A549 și NCI-H460 (Zhou et al., 2013). Astfel, un prim obiectiv al tezei a fost evaluarea efectelor sinergic/ absența acestor efecte după administrarea co-tratamentului reprezentat de concentrații diferite de curcumină și EGCG asupra liniei celulare de adenocarcinom epidermoid A-431.

În al doilea studiu s-a investigat în ce măsură curcumina și EGCG-ul au efect citotoxic asupra liniei celulare netransformate malign CCD-1070Sk, având ca obiectiv specific evaluarea proliferării/viabilității celulare utilizând metoda WST-1.

În vederea atingerii obiectivelor propuse, au fost folosite cele două linii celulare (A-431 și CCD-1070Sk) și au fost utilizate tehnici specifice de analiză (citometria în flux), protocoale și metode specifice (teste de evaluare a supraviețuirii clonogene, WST-1), cât și diferiți fluorofori (iodură de propidiu, anexina V-APC, carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, JC-1).

Al treilea studiu a avut drept scop compararea datelor obținute în urma utilizării tratamentului reprezentat de curcumină și EGCG, comparativ cu utilizarea individuală a curcuminei. Rezultatele obținute au indicat un efect inhibitor mai puternic al curcuminei împotriva dezvoltării celulelor maligne, atât în prezența EGCG-ului cât și la administrarea individuală a acesteia, indiferent de experiment.

Biodisponibilitatea redusă a curcuminei împiedică utilizarea acesteia ca agent terapeutic însă datele de literatură au raportat existența unor agenți chimici ce pot influența pozitiv (piperina) absorbția și metabolizarea acesteia. Asemenea curcuminei, EGCG-ul este un polifenol care este binecunoscut pentru efectele benefice asupra organismului, fiind principalul ingredient activ din ceaiul verde.

## **Stadiul actual al cunoașterii**

### ***Curcumina***

Curcumina este ingredientul activ din turmeric, extras din rădăcina plantei *Curcuma longa* și este un agent sigur, accesibil și eficient. Curcumina este un polifenol lipofil, insolubil în apă, dar stabil în acidul gastric. Studiile au demonstrat metabolizarea rapidă a curcuminei, dar și biodisponibilitatea sistemică limitată, din cauza eliminării rapide din organism (Ravindran et al., 2009). Curcumina este singurul antioxidant ce conține o varietate de grupuri funcționale, inclusiv grupări de tipul  $\beta$ -dicetone, legături duble C-C și grupări fenil ce conțin cantități variabile de substituenți hidroxil și metoxi (Aggarwal et al., 2007). Curcumina prezintă proprietăți anticancerigene datorită trăsăturilor chimice distincte ce permit interacțiunea acesteia cu numeroase molecule extracelulare și intracelulare, inhibând astfel progresia cancerului (Anand et al., 2008). Administrarea curcuminei a demonstrat normalizarea peroxidării lipidice, dar și a schimbărilor realizate în țesuturile cobailor Wistar (Singh and Sharma, 2011). Doi cercetători, Kaur și Meena, au observat un efect adjuvant al curcuminei împreună cu piperina și quercetina, în tratamentul hiperlipidemieii (Kaur and Chintamaneni, 2013).

Proprietatea antioxidantă a curcuminei a fost demonstrată prin administrarea orală a unei concentrații de 90 de mg de curcumină sau sub formă de placebo într-un interval de 2 ore, înainte și după efectuarea unui efort fizic. După administrarea curcuminei s-a observat o atenuare a stresului oxidativ indus de efort prin creșterea capacității antioxidante din sânge (Takahashi et al., 2014).

Una dintre proprietățile cele mai importante ale curcuminei, este activitatea antitumorală a acesteia, demonstrată de-a lungul anilor în numeroase studii. Datorită solubilității scăzute a curcuminei în apă, Ha și colab. au dezvoltat diferite formule de nanoparticule de curcumină încapsulate, sub formă de copolimeri solubili pentru utilizarea acestora în terapia antitumorală (Bhullar et al., 2013). S-a demonstrat rolul curcuminei de a induce, în mod selectiv, apoptoza în

celulele tumorale, în faza G2 prin reglarea expresiei genei *TP53* și a inițierii căii apoptotice mitocondriale prin creșterea expresiei genei *BAX* și a eliberării citocromului C (Wilken et al., 2011).

În ciuda efectelor pozitive ale curcuminei, în momentul utilizării acesteia în studii clinice *in vivo* s-a demonstrat biodisponibilitatea scăzută din cauza absorbției reduse, a metabolismului accelerat și a eliminării rapide din organism (Anand et al., 2007, Lopresti, 2018). Biodisponibilitatea slabă a curcuminei a fost determinată de nivelurile scăzute de glucuronid și sulfat. Rezultatul obținut în urma administrării a 8 g de curcumină zilnic, a indicat un răspuns clinic în cazul a doi pacienți, iar la un pacient s-a înregistrat o ușoară regresie tumorală concomitent cu creșterea nivelului de citokine IL-6, IL-8, IL-10 și IL-1, în ser. Pe de altă parte, curcumina a reglat expresia factorului nuclear NF-κB, COX-2 și a proteinei STAT3 (lb. engl. *signal transducer and activator of transcription 3*), în celulele mononucleare din sângele periferic obținute de la pacienți. Curcumina a fost administrată cu un repaus la fiecare două luni. (Dhillon et al., 2008).

### **Galatul de 3-O-epigallocatechină**

Galatul de 3-O-epigallocatechină (EGCG) reprezintă 38-40% din totalul de catechine prezente în ceaiul verde, fiind și cea mai abundentă (Singh et al., 2011). Catechinele din ceaiul verde fac parte din familia flavonoidelor ce prezintă activitate antioxidantă puternică asupra organismului uman (Du et al., 2012). Din punct de vedere chimic, galatul de 3-O-epigallocatechină conține trei inele heterociclice A, B, C și două structuri aromatice. Cele două structuri aromatice sunt unite cu inelul B prin trei structuri de carbon (C6-C3-C9), de tip punte, împreună cu gruparea hidroxil (Sharifi-Rad et al., 2020).

Biodisponibilitatea scăzută a EGCG-ului trebuie luată în considerare în momentul extrapolării rezultatelor obținute *in vitro* la experimente *in vivo*. Pentru administrarea unor doze corecte și eficiente de EGCG, este necesară luarea în considerare a parametrilor farmacocinetici (Mereles and Hunstein, 2011). Ingredientul activ din piperul negru, piperina, reprezintă un potențial modulator la biodisponibilității EGCG, prin inhibarea glucuronoconjugării acesteia în intestinul subțire, precum și inhibarea tranzitului gastrointestinal, ceea ce poate duce la creșterea absorbției (Lambert et al., 2004).

Conform studiilor realizate de-a lungul timpului, EGCG-ul posedă numeroase proprietăți anti-cancerigene datorită abilităților acestuia de a distruge radicalii liberi, evitând distrugerea

structurii celulare cauzată de aceștia (Granja et al., 2017, Farhan et al., 2016). Efectele benefice pe care le manifestă EGCG-ul nu se realizează printr-un singur mecanism, acesta acționând prin mai multe căi de semnalizare (Chowdhury et al., 2016). Prin consumul de ceai verde s-a raportat efecte benefice asupra sistemului gastro-intestinal, prin îmbunătățirea nivelului de EGCG din sânge, ceea ce a dus la inhibarea absorbției celulare a glucozei (Park et al., 2014, Zuo et al., 2014).

## **Contribuții personale**

### ***Ipoteza de lucru și obiectivele generale***

În studiile efectuate s-a plecat de la ipoteza că administrarea combinată a compușilor polifenolici poate inhiba proliferarea celulelor maligne, în timp ce administrarea aceluiași compuși nu va induce modificări semnificative asupra celulelor netransformate malign. În consecință, scopul cercetării a fost investigarea efectelor curcuminei și ale EGCG-ului asupra celulelor maligne din linia celulară A-431 comparativ cu linia celulară netransformată malign CCD-1070Sk. Astfel, partea de contribuții personale a fost structurată sub forma a trei obiective generale:

- a. Analiza efectelor administrării curcuminei și EGCG-ului asupra liniei celulare de carcinom epidermoid A-431.**
- b. Studiul efectului curcuminei și EGCG asupra liniei celulare netransformate malign CCD-1070Sk.**
- c. Comparații privind efectul administrării combinate sau individuale a curcuminei și a EGCG-ului asupra liniei celulare A-431**

### ***Metodologia generală a cercetării***

#### ***Culturi celulare***

Culturile celulare implică izolarea unor celule din mediul natural *in vivo* și creșterea ulterioară a acestora într-un mediu controlat în condiții artificiale (*in vitro*). Pentru îndeplinirea acestui lucru primul pas este obținerea unei culturi primare ajunsă la confluența necesară, prin formarea monostratului de celule într-un flask de cultură suplimentat cu factorii și nutrienții necesari. După obținerea confluenței sunt realizate pasaje a celulelor până la stabilirea unei linii celulare continue.

Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate următoarele linii celulare: linia celulară de carcinom epidermoid A-431 (ATCC) și linia celulară netransformată malign CCD-1070Sk (ATCC). Din cauza duratei mari de timp necesare proliferării celulare, linia celulară CCD-1070Sk a fost utilizată doar pentru realizarea experimentului de evaluare a viabilității prin tehnica WST-1. Celulele au fost crescute în mediu DMEM cu 10% FBS inactivat (Sigma, Saint Louis, MO), 1% Penicilină/Streptomicină (ThermoFisher Scientific/Gibco, Carlsbad, CA), și 2 mM L-glutamină (ThermoFisher Scientific/Gibco, Carlsbad, CA) și incubate la 37 °C și 5% CO<sub>2</sub> în atmosferă umedă.

### *Viabilitatea și proliferarea celulară*

Evaluarea viabilității/proliferării celulare a presupus efectuarea unui test WST-1 (water soluble tetrazolium salt; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Testul WST-1 se bazează pe reducerea sării de tetrazoliu WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) la formazan în celulele viabile, datorită activității de dehidrogenare mitocondrială (Filippi et al., 2018). Celulele aderente au fost însămânțate în plăci cu 96 godeuri și au fost tratate fie cu o concentrație constantă de 25 μM curcumină și concentrații variabile de EGCG de la 5 – 100 μM, fie cu aceeași concentrație de EGCG și concentrații diferite de curcumină, cuprinse între 5 – 100 μM. După tratament, probele au fost incubate 48 h la 37°C în atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. După 48 h tratamentele au fost înlăturate și s-a adăugat WST-1 în fiecare godeu, după care plăcile au fost incubate pentru 1 h la 37°C, în 5% CO<sub>2</sub>. Absorbanta formazanului a fost măsurată la lungimea de undă de 450 nm și corectată la 620 nm prin scăderea valorii absorbanței măsurate. Măsurătorile au fost efectuate cu ajutorul spectrofotometrului Infinite 200 PRO microplate reader.

### *Tratamente*

În funcție de experimentul efectuat s-au pregătit în condiții sterile concentrații diferite de EGCG și curcumină variind între 0,1 – 100 μM. Curcumina și EGCG au fost dizolvate în DMSO și au fost pregătite în ziua experimentului (nu au fost folosite soluții stock congelate). Toate tratamentele s-au efectuat la întuneric din cauza sensibilității curcuminei la lumină. După administrarea tratamentului perioada de incubare a variat între 48 – 72 h. Pentru testele de evaluare a supraviețuirii clonogene s-au pregătit în condiții sterile diferite concentrații de curcumină și EGCG dizolvate în DMSO: 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM și 10 μM dar și probe control.



Cu excepția acestor teste, pentru realizarea experimentelor s-au folosit următoarele concentrații de curcumină și EGCG: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M și probe control. Concentrația de DMSO a fost de maxim 0.1-0.2%. Tratamentele au fost pregătite în ziua experimentului (nu din probe congelate). Perioada de incubare a variat între 48 – 72 h.

### *Citometria în flux*

Citometria în flux este o metodă de analiză calitativă și cantitativă utilizată în prezent pe scară largă pentru a diferenția și caracteriza diverse particule aflate în suspensie (celule, biomarkeri, fragmente celulare) prin evaluarea purității subpopulațiilor interogate dar și prin analiza dimensiunii celulare, a granularității și a intensității fluorescenței.

### *Viabilitatea celulară*

Viabilitatea celulelor tumorale din linia celulară A-431 s-a evaluat prin folosirea citometrului în flux și a iodurii de propidiu (BD Biosciences, 556463). Iodura de propidiu este un colorant fără permeabilitate membranară pentru celulele vii, însă în cazul celulelor moarte acesta poate traversa membrana celulei și se leagă specific de ADN-ul dublu catenar. În soluții apoase, iodura de propidiu are maximum de excitație la 493 nm, iar cel de emisie la 636 nm.

### *Potențialul membranelor mitocondriale*

În analiza potențialului membranelor mitocondriale s-a folosit fluoroforul 5.5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1), un colorant carbocianin cationic care se acumulează în mitocondrii. Fluorescența emisă poate fi verde (JC-1 monomer) sau roșie (JC-1 agregat) și depinde numai de diferența de potențial membranelor mitocondriale și nu de mărimea, forma și densitatea mitocondriilor.

### *Specii reactive de oxigen*

Producerea de specii reactive de oxigen a fost analizată tot cu ajutorul citometrului în flux prin colorarea probelor cu diacetat de 5-(și-6)-carboxi-2',7'-diclor-dihidrofluoresceină (carboxi- $H_2$ DCFDA). Fluoroforul carboxi- $H_2$ DCFDA este utilizat frecvent deoarece poate reacționa cu mai multe specii reactive de oxigen incluzând peroxidul de hidrogen, radicalii hidroxil și peroxinitrit. Diacetatul de 5-(și-6)-carboxi-2',7'-diclor-dihidrofluoresceină este o formă acetilată redusă chimic de fluoresceină folosită ca indicator pentru speciile reactive de oxigen (lb. engl. *reactive oxygen species, ROS*).

### *Ciclul celular*

Una dintre cele mai cunoscute aplicații ale citometrului în flux este reprezentată de analiza ciclului celular prin cuantificarea conținutului de ADN pentru identificarea celulelor ce se află în diferite faze ale ciclului celular. Înainte de analiza ciclului celular, celulele sunt tratate cu un colorant fluorescent ce se fixează la nivelul de ADN, de exemplu iodura de propidiu. Intensitatea fluorescenței este corelată cu cantitatea de ADN, iar modificările ciclului celular sunt observate cu ajutorul histogramelor.

### *Apoptoza*

Citometria în flux a fost utilizată și în analiza apoptozei pentru linia celulară A-431. Pentru a evalua efectul curcuminei și al EGCG-ului asupra celulelor tumorale am urmărit colorarea acestora cu anexină V marcată cu alofococianină (APC), un pigment fotosintetic ce se găsește în mod natural în algele albastre-verzi. Alofococianina are 6 cromofori de ficocianobilină pentru fiecare moleculă, devenind un fluorocrom luminos ceea ce îl face foarte potrivit pentru aplicațiile în citometrie în flux. Anexina V marcată cu APC (maxim de excitație: 650 nm, maxim de emisie: 660 nm) caracterizează pierderea integrității membranare ceea ce este specific morții celulare datorate proceselor de apoptoză.

### *Supraviețuire clonogenă*

Tehnica de evaluare a supraviețuirii clonogene este un test celular *in vitro* și evidențiază capacitatea unei singure celule de a forma colonii. Pentru a se realiza o analiză corectă, colonia trebuie să conțină cel puțin 50 de celule. Acest test evidențiază capacitatea fiecărei celule de a se divide fără limită (Franken et al., 2006). Testul de clonogenicitate s-a folosit pentru a demonstra eficacitatea celulelor tumorale din linia celulară A-431, de a forma colonii după ce au fost administrate tratamentele cu diferite concentrații de curcumină și EGCG, individual sau împreună. Numărarea și analiza coloniilor s-a realizat automat cu programul ImageJ v. 1.48 (NIH, SUA).

### *Statistică*

Analiza datelor a fost realizată diferit în funcție de fiecare experiment. Astfel, pentru testele de evaluare a supraviețuirii clonogene au fost efectuate fotografiile ale plăcilor cu godeuri iar imaginile au fost analizate utilizând ImageJ v. 1.48 (NIH, SUA). Datele obținute prin citometrie în flux au fost analizate utilizând programul Flowing Software 2.5.1 (University of Turku, Finlanda). Pentru reprezentarea grafică și determinarea semnificației statistice s-a utilizat softul

GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., SUA), iar prelucrarea datelor numerice s-a realizat utilizând Microsoft Excel 2013 (Microsoft Inc., SUA).

Există două metode de analiză statistică: parametrică și nonparametrică. Metodele parametrice se referă la tehnici de analiză statistice în care se definește distribuția variabilelor de probabilitate și se fac deducții despre parametrii distribuției (Kim, 2015). Testele nonparametrice sunt implementate în cazul în care nu se poate defini distribuția probabilității.

Testul t-Student este o metodă parametrică și se utilizează atunci când eșantioanele utilizate îndeplinesc condițiile de normalitate, intervale egale de variație și independență. Testul t-Student este un tip de test statistic de comparare a două medii din două eșantioane diferite. Testul t-Student se împarte în două categorii: testul t independent, pentru eșantioane diferite, și testul t pentru eșantioane pereche (Kim, 2015).

Pentru semnificația statistică a fost utilizat testul t-Student și testul Anova one way cu post-testul Dunnett's atunci când au fost comparate mai multe seturi de date. Semnificația statistică a fost stabilită prin setarea pragului de semnificație  $p < 0,05$ . Cu excepția testului Anova one way, pentru reprezentarea grafică a ROS (1) și a potențialului membranelor mitocondrial (2) s-a utilizat analiza regresia neliniară pentru reprezentarea curbei doză-efect și aflarea valorii IC50/EC50 utilizând formulele:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) * \text{HillSlope})}) \quad (1)$$

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})}) \quad (2)$$

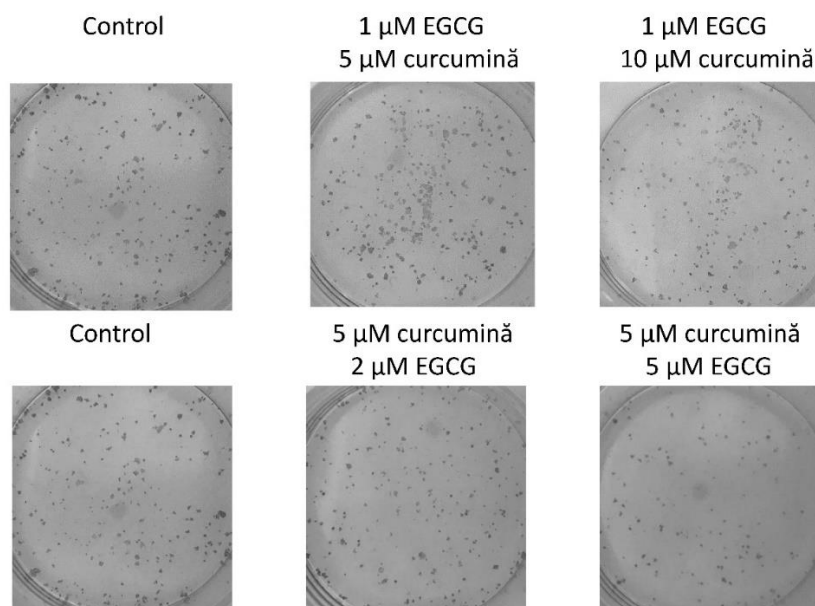
unde, X reprezintă logaritm cu baza 10 a concentrației de EGCG, LogIC50/LogEC50 este logaritm cu baza 10 a concentrației pe jumătate maximă inhibitoare/efective, Y reprezintă intensitatea fluorescentă pentru carboxi- $H_2$ DCFDA și JC-1 iar "top" și "bottom" reprezintă valorile platourilor.

## Rezultate

### Studiul I: Analiza efectelor administrării curcuminei și EGCG-ului asupra liniei celulare de carcinom epidermoid A-431

#### *Efectul sinergic obținut prin co-administrarea curcuminei și EGCG asupra clonogenității, în linia celulară A-431*

Linia celulară A-431 a fost tratată cu o concentrație fixă de curcumină de 5  $\mu\text{M}$  și concentrații diferite de EGCG, cuprinse între 0,1 – 5  $\mu\text{M}$ , fie cu o concentrație constantă de 1  $\mu\text{M}$  EGCG și concentrații cuprinse între 0,1 – 10  $\mu\text{M}$  curcumină, incubate pentru 48 de ore. Prin co-administrarea curcuminei cu EGCG se observă inhibarea proliferării celulare de la concentrații de 5  $\mu\text{M}$  curcumină + 2  $\mu\text{M}$  EGCG, comparate cu proba control. Expunerea celulelor la co-tratamentul format din concentrația de 1  $\mu\text{M}$  EGCG și concentrații de 5 – 10  $\mu\text{M}$  curcumină, indică un rol protector al EGCG-ului împotriva inhibiției supraviețuirii clonogene induse de curcumină (Figura 1).

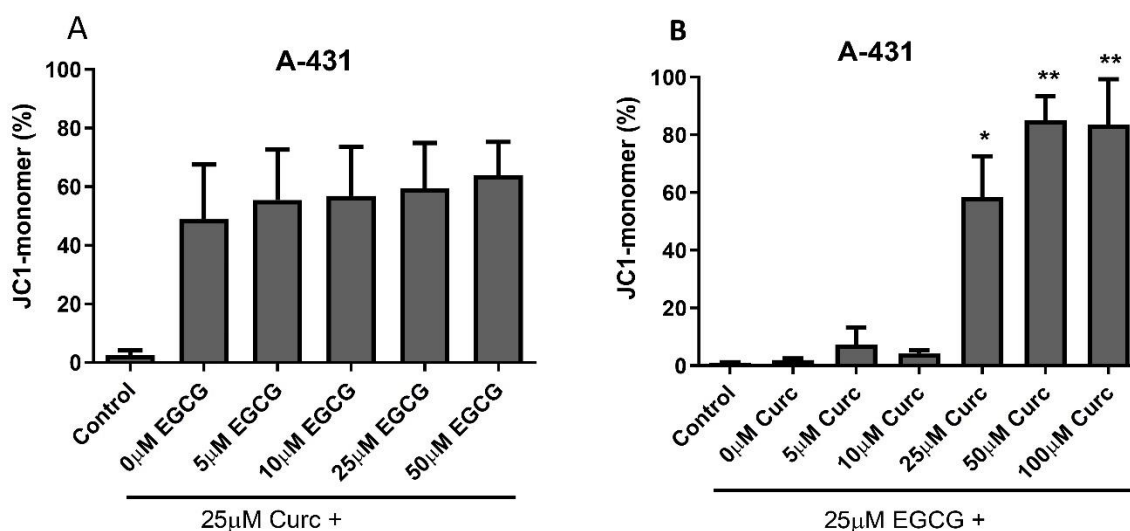


**Figura 1. Testul de clonogenitate la 48 de ore de la administrarea tratamentului. Godeuri reprezentative în urma colorării cu violet de gențiană, se observă o scădere a numărului și dimensiunilor coloniilor de cu aproximativ 50% la administrarea concentrației de 1  $\mu\text{M}$  EGCG + 5 curcumină. Același**

efect de inhibiție se observă și la expunerea celulelor la concentrația de 5  $\mu\text{M}$  curcumină + 2  $\mu\text{M}$  EGCG cu scăderea numărului de celule concomitent cu creșterea concentrațiilor de EGCG.

### **Colapsul potențialului membranar mitocondrial în linia celulară A-431, după co-administrarea curcuminei cu EGCG.**

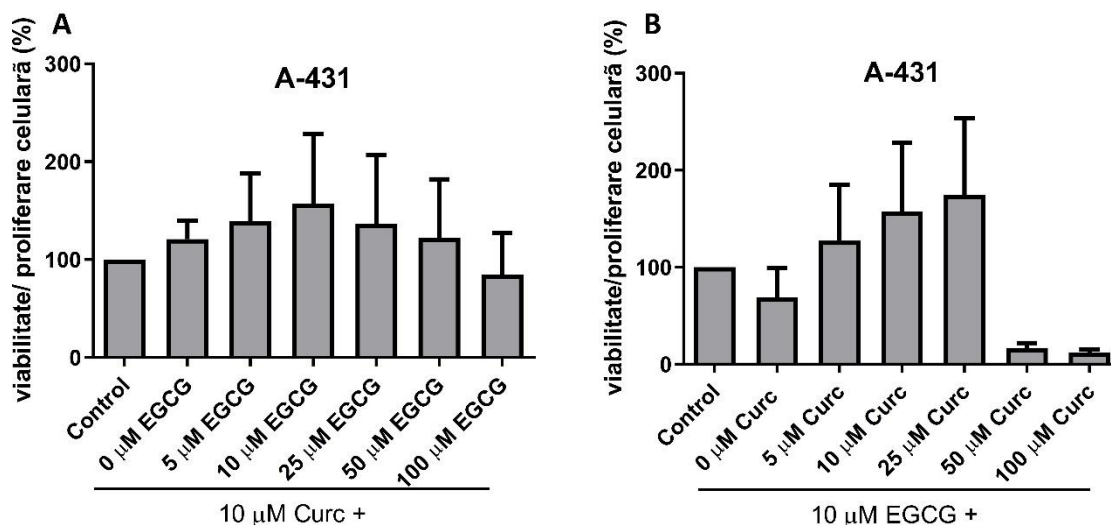
În urma varierii concentrațiilor de curcumină între 25 și 100  $\mu\text{M}$  în prezența concentrației de 25  $\mu\text{M}$  EGCG s-a constatat colapsul potențialului membranar mitocondrial în mod dependent de doză (Figura 2).



**Figura 2. Analiza potențialului membranar mitocondrial cu JC-1, la 48 de ore de la administrarea unor concentrații de EGCG și curcumină cuprinse între 0 – 100  $\mu\text{M}$ . A. Comparativ cu proba control se observă o creștere a numărului de celule depolarizate datorat doar administrării curcuminei (25  $\mu\text{M}$ ), iar adăugarea unor concentrații de EGCG în prezența curcuminei, nu modifică substanțial acest efect. B. Se observă o creștere a numărului de celule cu potențial membranar mitocondrial scăzut concomitent creșterii concentrației de curcumină de la 25 – 100  $\mu\text{M}$  în prezența concentrației de 25  $\mu\text{M}$  EGCG.**

### **Efectul curcuminei asupra viabilității/proliferării celulare prin metoda WST-1**

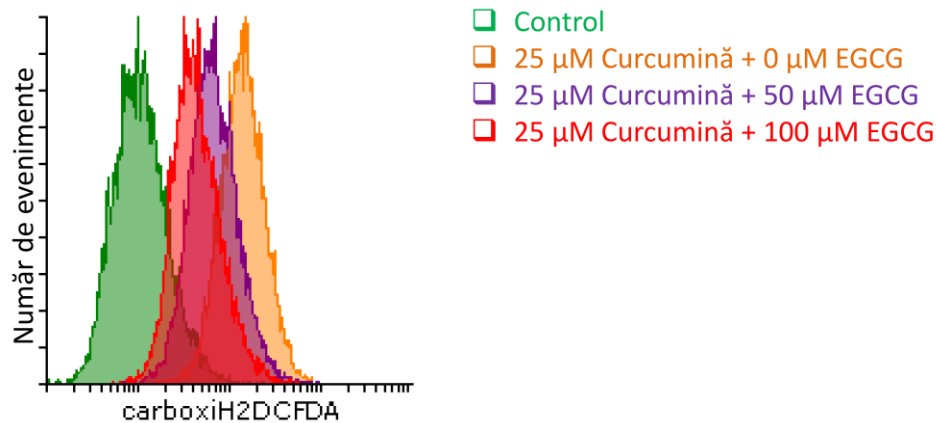
Administrarea combinată a polifenolilor la concentrații de 0 – 10  $\mu\text{M}$  urmată de expunerea la concentrații 50 – 100  $\mu\text{M}$  a indus apariția unui efect bifazic asupra proliferării celulare, respectiv concentrațiile mici au condus la creșterea proliferării celulare în timp ce utilizarea unor concentrații mari a indus apariția de efecte citotoxice (Figura 3).



**Figura 3. Analiza viabilității/proliferării celulare la 48 de ore de la expunerea celulelor la concentrații de 5 – 100 μM curcumină și EGCG.** A. După expunerea la concentrații de curcumină de 10 μM și la concentrații diferite de EGCG cuprinse în intervalul 0 – 100 μM, se observă o creștere a proliferării celulare pentru concentrații de 5 și 10 μM EGCG concomitent cu o scădere a proliferării la creșterea concentrațiilor de EGCG. B. În cazul aplicării tratamentului reprezentat de concentrații de 0 – 100 μM curcumină în prezența concentrației de 10 μM EGCG, rezultatul obținut a demonstrat o tendință în creșterea proliferării celulare la administrarea unor concentrații scăzute de curcumină concomitent cu o scădere a proliferării celulare la creșterea concentrațiilor de 50 – 100 μM curcumină.

**Curcumina induce stres oxidativ, în timp ce EGCG demonstrează un efect anti-oxidativ într-o manieră dependentă de doză**

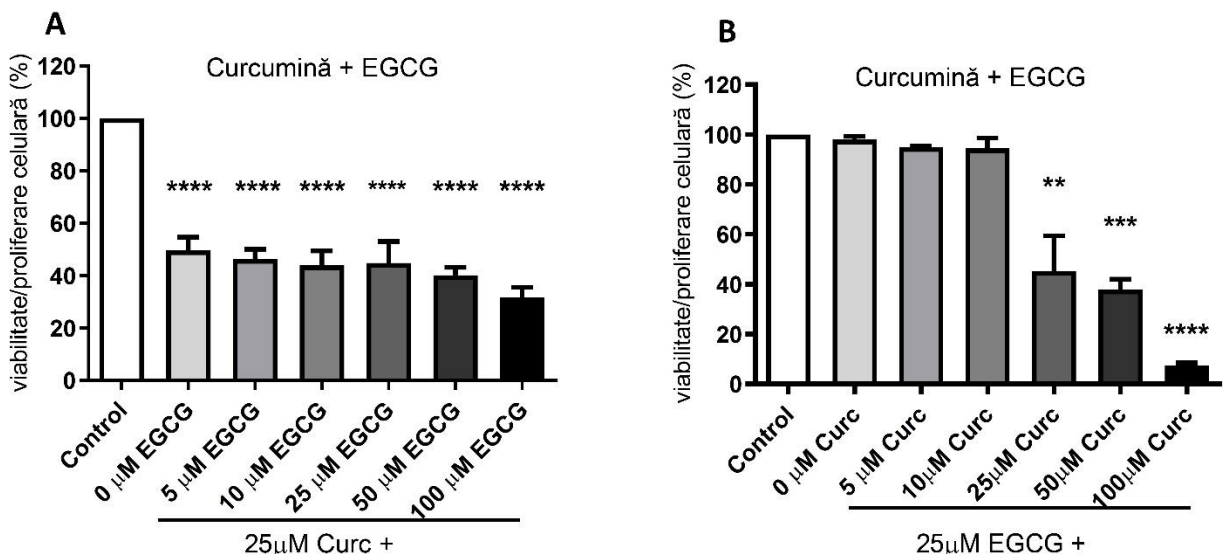
Stresul oxidativ a fost indus prin producerea speciilor reactive de oxigen la administrarea concentrației de 25 μM curcumină individual concomitent cu inhibarea formării de ROS la adăugarea concentrațiilor de 25 – 100 μM EGCG (Figura 4).



**Figura 4.** Curcumina induce producerea de specii reactive de oxigen, iar EGCG are un efect anti-oxidativ în linia celulară tumorală A-431. Histograme reprezentative suprapuse pentru probele control și probele tratate cu 25  $\mu\text{M}$  curcumină și diferite concentrații de EGCG pentru 48 h. Se observă o inhibare a producerii de ROS la 25  $\mu\text{M}$  curcumină și concentrații variabile de EGCG peste 50  $\mu\text{M}$ .

#### **Efectul co-tratamentului curcumină și EGCG asupra viabilității celulelor tumorale din linia celulară A-431**

În cadrul acestui studiu s-a demonstrat scăderea viabilității celulare după administrarea combinată a celor doi polifenoli (Figura 5).

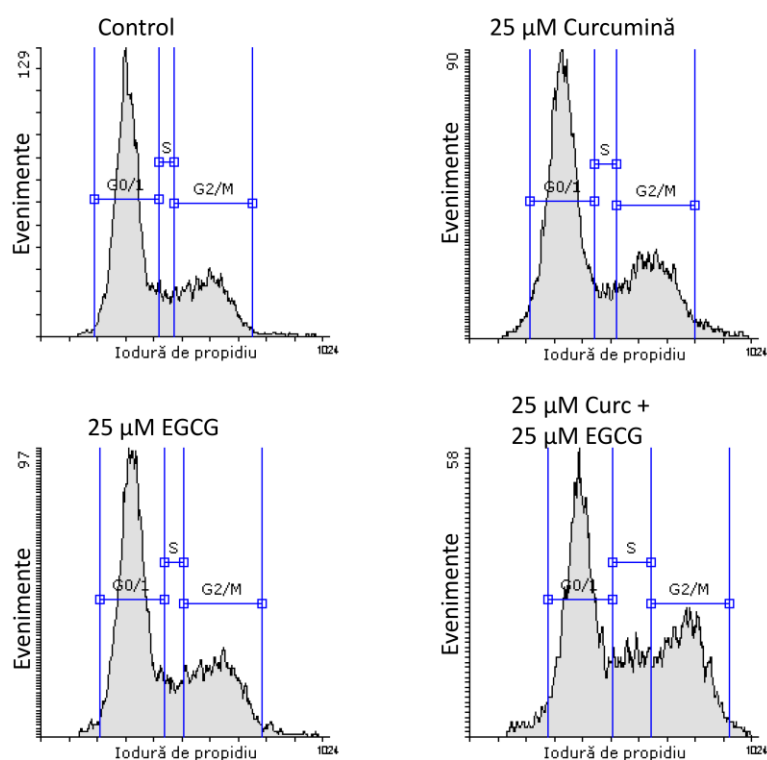


**Figura 5.** Colorarea celulelor A-431 cu iodură de propidiu după incubarea acestora pentru 48 de ore cu diferite concentrații de curcumină și EGCG. A. Se observă o scădere a viabilității celulare în momentul administrării a 25  $\mu\text{M}$  curcumină cu o menținere acestor valori și după administrarea unor

concentrații variabile de EGCG, până la 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*). B. Se observă o scădere a viabilității celulare începând cu administrarea concentrației de 25  $\mu\text{M}$  curcumină în prezența EGCG-ului, iar administrarea unor concentrații de 50 – 100 curcumină reduce viabilitatea celulară considerabil (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### ***Efectul curcuminei și al EGCG asupra ciclului celular***

În ceea ce privește fazele ciclului celular, la utilizarea concomitentă a curcuminei și al EGCG-ului, s-a observat o dublare a celulelor A-431 în faza S, o creștere moderată a celulelor în faza G2/M asociate cu o scădere a celulelor în faza G0/G1 (Figura 6).

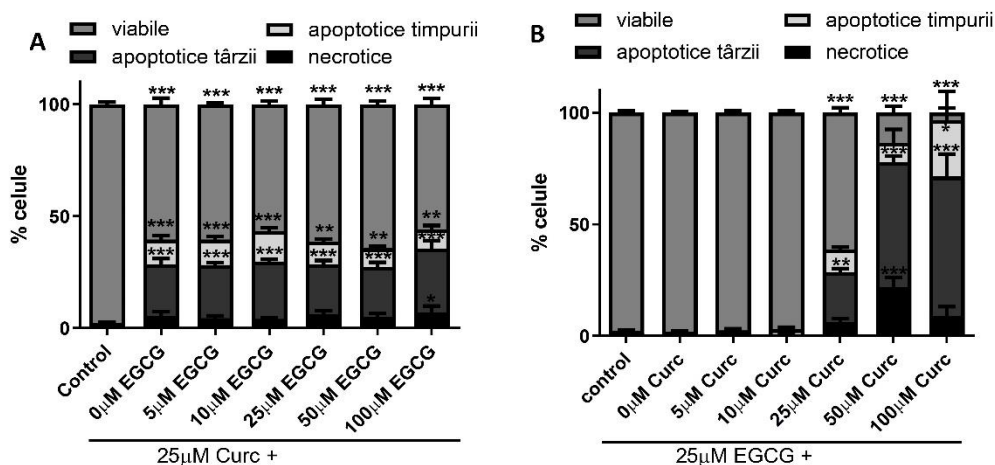


**Figura 6. Histograme reprezentative ale intensității fluorescenței iodurii de propidiu pentru proba martor și probele tratate cu 25  $\mu\text{M}$  curcumină/EGCG administrate împreună sau individual.**

### ***Efectul curcuminei și al EGCG asupra apoptozei***

Apoptoza a fost indusă la expunerea celulelor A-431 la concentrația de 25  $\mu\text{M}$  curcumină, în prezența sau absența concentrațiilor de EGCG. S-a constatat că principalul polifenol responsabil de efectele citotoxice asupra liniei celulare de adenocarcinom epidermoid este curcumina, în timp ce efectele EGCG sunt moderate (Figura 7).



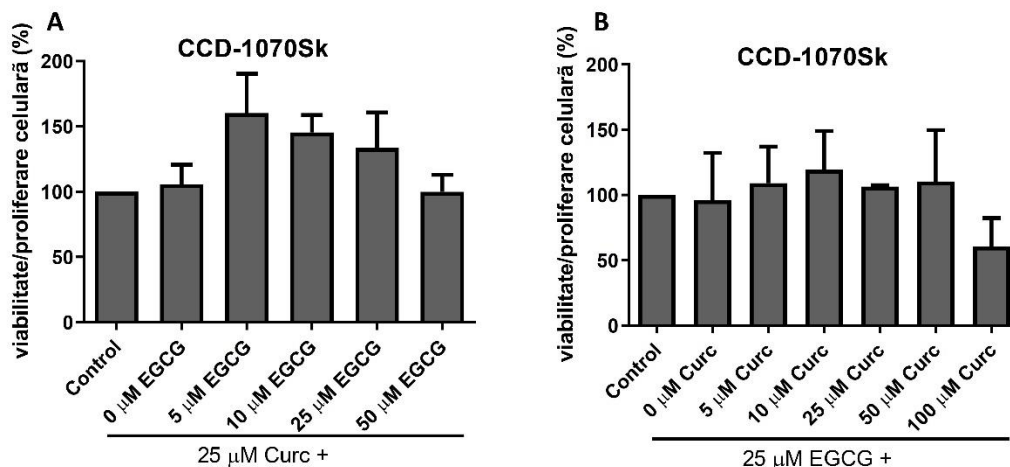


**Figura 7. Curcumina induce apoptoza în cazul celulelor A-431 în prezența sau absența EGCG.** A. S-au observat diferențe între proba control și probele tratate, începând cu expunerea la concentrația de 25 μM curcumină individual. Adăugarea concentrațiilor de EGCG, nu a schimbat cu mult acest rezultat. B. Curcumina induce apoptoza în cazul celulelor A-431 începând cu 25 μM curcumină în prezența concentrației de 25 μM EGCG, iar creșterea concentrației de curcumină determină o scădere a celulelor viabile, concomitent cu o creștere a celulelor apoptotice și a celulelor necrotice.

## Studiul II: Analiza efectului curcuminei și EGCG asupra liniei celulare de fibroblaste dermice normale CCD-1070Sk

### Efectele curcuminei și ale EGCG asupra viabilității/proliferării liniei celulare CCD-1070Sk

Rezultatele obținute au demonstrat absența citotoxicității celor doi polifenoli asupra liniei celulare de fibroblaste normale CCD-1070Sk, cu excepția expunerii la concentrația maximă de curcumină, respectiv 100 μM în prezența a 25 μM EGCG. Totodată s-a observat și o ușoară creștere a proliferării celulare după expunerea la cei doi polifenoli în concentrații reduse, dar rezultatele obținute nu au avut semnificație statistică. Astfel, se observă că administrarea curcuminei și a EGCG-ului nu a avut efecte negative asupra fibroblastelor din linia celulară CCD-1070Sk (Figura 8).

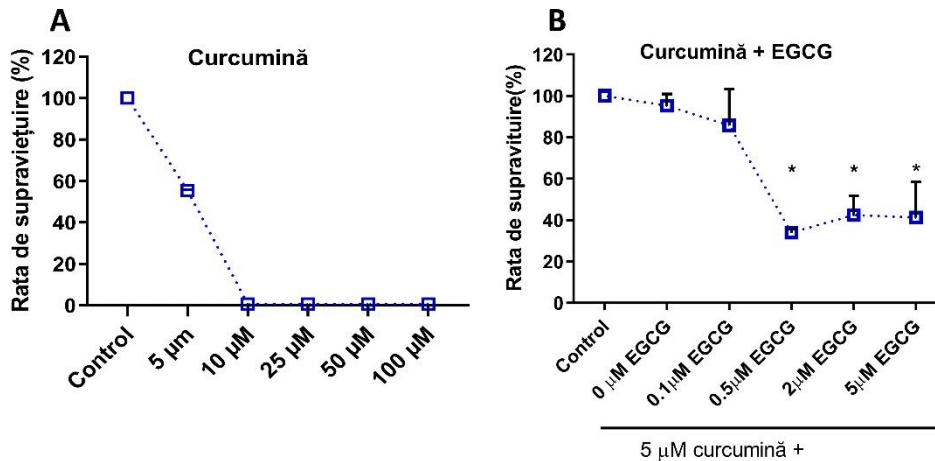


**Figura 8. Analiza viabilității/proliferării la 48 de ore de la administrarea tratamentului. A. Administrarea simultană a 25 μM curcumină și a 50 μM EGCG (concentrația maximă utilizată în aceste experimente) nu a scăzut viabilitatea celulară comparativ cu proba control. B. Administrarea unei concentrații constante de 25 μM EGCG și a unor concentrații variabile de curcumină nu au indus modificări semnificative ale viabilității celulare, cu excepția probei în care a fost utilizată concentrația cea mai mare de curcumină, respectiv 25 μM EGCG și 100 μM curcumină**

### **Studiul III: Comparații privind efectul administrării combinate sau individuale a EGCG și a curcuminei asupra liniei celulare A-431**

#### ***Comparații privind evaluarea supraviețuirii clonogene după tratamentul combinat, respectiv individual al curcuminei și al EGCG asupra liniei celulare A-431***

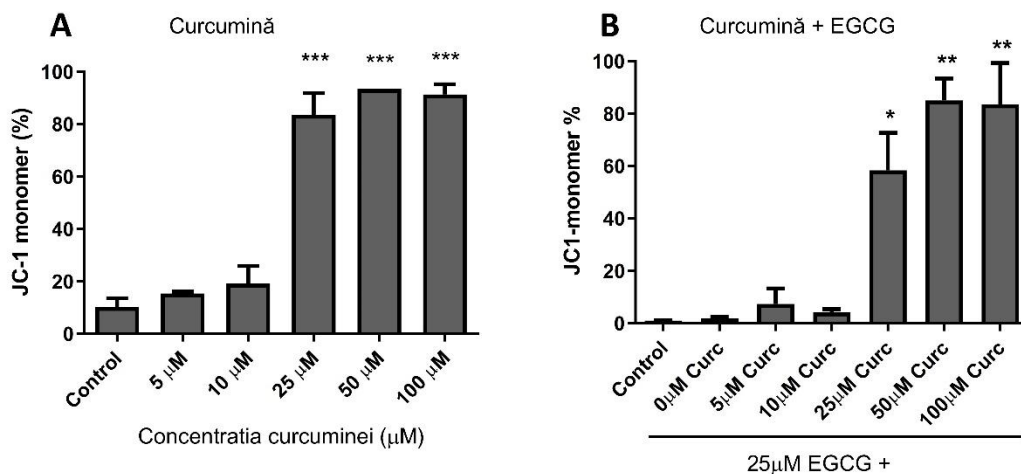
Comparațiile din cadrul acestui studiu, au fost obținute datorită experimentelor realizate anterior, utilizând diferite concentrații de curcumină și linia celulară de carcinom epidermoid A-431. Rezultatele privind abilitatea celulelor tumorale de a forma colonii au indicat o inhibiție parțială după administrarea a 5 μM curcumină, iar expunerea la 10 μM curcumină a indus inhibiția totală a supraviețuirii clonogene. După administrarea concomitentă a concentrației de 5 μM curcumină cu 0,5 – 5 μM EGCG, s-a observat efectul sinergic al celor doi compuși comparativ cu administrarea individuală a 5 μM curcumină (Figura 9).



**Figura 9.** Supraviețuirea clonogenă după administrarea curcuminei individual sau în prezența concentrațiilor de 0,1 – 5 μM EGCG. *A.* Concentrațiile de 5 – 100 μM curcumină induc inhibiția parțială a celulelor A-431 de la concentrația de 5 μM, iar concentrația de 10 μM induce inhibiția totală. *B.* Administrarea a 5 μM curcumină în prezența concentrațiilor de 0,5 μM EGCG indică efectul sinergic al celor doi compuși, conducând la inhibiția supraviețuirii clonogene, iar expunerea la 0,1 μM EGCG demonstrează un efect protector.

***Diferențe în evaluarea potențialului membranelor mitocondriale după co-administrarea curcuminei cu EGCG și administrarea curcuminei individual în linia celulară de adenocarcinom epidermoid A-431***

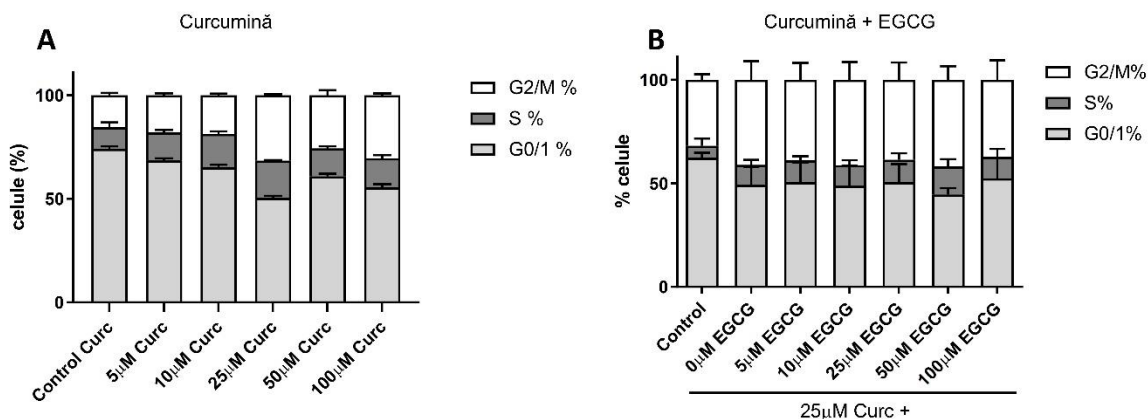
În privința potențialului membranelor mitocondriale s-a observat o creștere a numărului de celule depolarizate la administrarea unor concentrații crescute de curcumină începând cu 25 μM indiferent de prezența sau absența EGCG. Efecte asupra potențialului membranelor mitocondriale s-au observat la menținerea concentrației de 25 μM EGCG constante și utilizarea unor concentrații diferite de 25 – 100 μM curcumină ceea ce a crescut numărul de celule depolarizate în mod dependent de doză (Figura 10).



**Figura 10. Curcumina duce la creșterea procentului de celule A-431 care au pierdut  $\Delta\Psi_m$  în prezența sau absența concentrației de 25  $\mu\text{M}$  EGCG. A. Creșterea numărului de celule cu depolarizare mitocondrială după expunerea la diferite concentrații de curcumină (0 – 100  $\mu\text{M}$ ). B. Creșterea procentului de celule cu depolarizare mitocondrială după expunerea la 25  $\mu\text{M}$  EGCG + 25  $\mu\text{M}$  curcumină până la atingerea unor maxime după adăugarea curcuminei în concentrație de 50 și 100  $\mu\text{M}$  (concentrația de 25  $\mu\text{M}$  EGCG a fost menținută constantă).**

***Evaluarea fazelor ciclului celular în urma co-administrării curcuminei și EGCG comparativ cu expunerea individuală la curcumină în linia de carcinom epidermoid A-431***

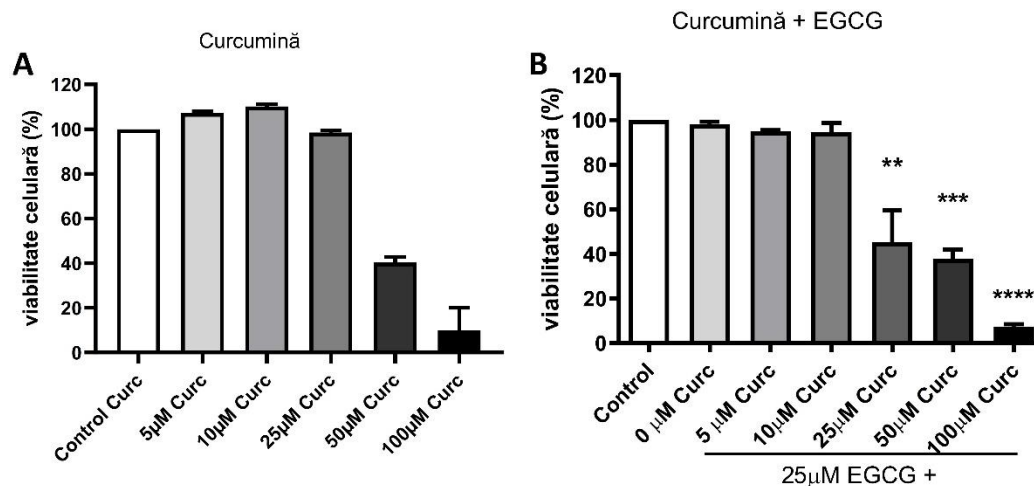
În cazul ciclului celular, după administrarea curcuminei individual, s-a observat scăderea populației celulare A-431 în faza G0/G1 în prezența concentrațiilor de 5 – 100  $\mu\text{M}$ , concomitent cu blocarea ciclului celular în faza G2/M. În cazul co-tratamentului, concentrații de 0 – 100  $\mu\text{M}$  EGCG și 25  $\mu\text{M}$  curcumină scad numărul de celule în faza G0/G1 concomitent cu dublarea numărului de celule în faza S și creșterea numărului de celule în faza G2/M (Figura 11). Rezultate asemănătoare s-au obținut și după administrarea simultană a 25  $\mu\text{M}$  EGCG și a concentrațiilor variabile de curcumină.



**Figura 11. Grafic comparativ în urma analizei ciclului celular după administrarea celor două tratamente asupra liniei celulare A-431. A. La administrarea unor concentrații de 25  $\mu$ M, respectiv 100  $\mu$ M curcumină se observă o scădere a populației celulare în faza G0/G1 concomitent cu blocarea ciclului celular în faza G2/M. B. Se observă o scădere a numărului de celule aflate în faza G0/G1 a ciclului celular concomitent cu dublarea numărului de celule în faza S, la administrarea concentrației de 25  $\mu$ M curcumină în prezența sau absența EGCG-ului.**

**Studierea efectului curcuminei și al EGCG-ului după utilizarea curcuminei în mod individual și a tratamentului combinat dintre curcumină și EGCG asupra viabilității celulare în cazul carcinomului epidermoid folosind citometria în flux**

În ceea ce privește viabilitatea celulară, curcumina a indus o scădere a numărului de celule viabile A-431, atât în prezența EGCG-ului cât și în lipsa acestuia, cu observarea efectului sinergic dintre curcumină și EGCG la concentrații de 25  $\mu$ M EGCG + 25 curcumină (Figura 12).



**Figura 12. Grafic comparativ în urma analizei viabilității celulelor A-431 după administrarea celor două tratamente.** A. Concentrații de curcumină începând cu 50 μM au indus scăderea numărului de celule viabile. Datele obținute au fost normalizate la proba control B. Se observă o scădere a viabilității celulare de la administrarea concentrației de 25 μM EGCG și concentrații 25 – 100 μM curcumină. Se observă efectul sinergic al tratamentului combinat comparativ cu administrarea curcuminei individual.

## Concluzii

Experimentele realizate în această teză au avut ca drept scop observarea efectelor citotoxice ale curcuminei și EGCG-ului asupra liniei celulare de adenocarcinom epidermoid A-431, prin administrarea acestora concomitent sau individual. Curcumina și EGCG-ul sunt doi compuși naturali ce au fost examinați de-a lungul timpului prin publicarea diferitor studii ce au avut ca și scop descoperirea unui potențial tratament natural împotriva cancerului.

Pentru a demonstra în ce măsură concentrațiile de polifenoli utilizate influențează dezvoltarea celulelor normale, același tratament reprezentat de combinații de curcumină și EGCG a fost administrat liniei celulare de fibroblaste normale, CCD-1070Sk.

În cadrul experimentelor din primul studiu, intitulat „Analiza efectelor administrării curcuminei și EGCG-ului asupra liniei celulare A-431”, s-a demonstrat efectul citotoxic sinergic al curcuminei și EGCG-ului prin inhibarea supraviețuirii clonogene la administrarea co-tratamentului reprezentat de curcumină și concentrații variabile de 0,5 – 5 μM EGCG, în timp ce concentrația de 1 μM EGCG a avut un rol protector împotriva inhibiției supraviețuirii clonogene induse de curcumină. În urma varierii concentrațiilor de curcumină între 25 și 100 μM în combinație cu administrarea unei concentrații de 25 μM EGCG s-a constatat colapsul potențialului

membranal mitocondrial în mod dependent de doză. Administrarea combinată unor concentrații scăzute de polifenoli (0-5  $\mu\text{M}$ ) urmată de expunerea la concentrații mari ale acestora (50-100  $\mu\text{M}$ ) a indus apariția unui efect bifazic asupra proliferării celulare, respectiv concentrațiile mici au condus la creșterea proliferării celulare în timp ce utilizarea unor concentrații mari a indus apariția de efecte citotoxice. Stresul oxidativ a fost indus prin producerea speciilor reactive de oxigen la administrarea concentrației de 25  $\mu\text{M}$  curcumină concomitent cu inhibarea formării de ROS la adăugarea concentrațiilor de 25 – 100  $\mu\text{M}$  EGCG. În cadrul acestui studiu s-a demonstrat și scăderea viabilității celulare după administrarea curcuminei și a EGCG-ului, dar și inducerea morții celulare prin apoptoză. În ceea ce privește fazele ciclului celular, la utilizarea concomitentă a concentrației de 25  $\mu\text{M}$  curcumină constant și a concentrațiilor variabile de EGCG, s-a observat o dublare a numărului de celule A-431 în faza S, o creștere moderată a numărului de celule în faza G2/M asociate cu o scădere a numărului de celule în faza G0/G1. Rezultatele obținute pe parcursul primului studiu au demonstrat rolul eficace al curcuminei și EGCG-ului în scăderea potențialului clonogenic, în reducerea viabilității, în inducerea colapsului membranal mitocondrial, în inducerea ROS și în blocarea ciclului celular în faza S în linia celulară A-431 prin administrarea acestora concomitent. Totodată s-a constatat că principalul polifenol responsabil de efectele citotoxice asupra liniei celulare de adenocarcinom epidermoid este curcumina, în timp ce efectele EGCG sunt moderate. Mai mult decât atât, EGCG a demonstrat un rol anti-oxidativ în prezența curcuminei.

În studiul al doilea, intitulat “*Analiza efectului citotoxic al curcuminei și EGCG asupra liniei celulare de fibroblaste normale CCD-1070Sk*”, s-a evaluat efectul pe care îl au curcumina și EGCG-ul într-o linie celulară netransformată malign, utilizând linia celulară CCD-1070Sk. Rezultatele obținute au demonstrat absența citotoxicității celor doi polifenoli asupra liniei celulare de fibroblaste normale CCD-1070Sk, cu excepția expunerii la concentrația maximă de curcumină, respectiv 100  $\mu\text{M}$  în prezența a 25  $\mu\text{M}$  EGCG. Totodată s-a observat și o ușoară creștere a proliferării celulare după expunerea la cei doi polifenoli în concentrații reduse, dar rezultatele obținute nu au avut semnificație statistică. În concluzie, se observă că administrarea curcuminei și al EGCG-ului nu a avut efecte negative asupra fibroblastelor din linia celulară CCD-1070Sk.

În cadrul celui de-al treilea studiu, “*Comparații privind efectul administrării combinate sau individuale a EGCG și a curcuminei asupra liniei celulare A-431*”, s-a evaluat în ce măsură

administrarea concomitentă a curcuminei și a EGCG-ului are un efect distinct asupra liniei celulare A-431, comparativ cu administrarea individuală a curcuminei. Comparațiile din cadrul acestui studiu, au fost obținute datorită experimentelor realizate anterior, utilizând diferite concentrații de curcumină și linia celulară de carcinom epidermoid A-431. Rezultatele privind abilitatea celulelor tumorale de a forma colonii au indicat o inhibiție parțială după administrarea a 5  $\mu\text{M}$  curcumină, iar expunerea la 10  $\mu\text{M}$  curcumină a indus inhibiția totală a supraviețuirii clonogene. După administrarea concomitentă a concentrației de 5  $\mu\text{M}$  curcumină cu 0,5 – 5  $\mu\text{M}$  EGCG, s-a observat efectul sinergic al celor doi compuși comparativ cu administrarea individuală a 5  $\mu\text{M}$  curcumină. După administrarea 0,1 – 10  $\mu\text{M}$  curcumină plus 1  $\mu\text{M}$  EGCG, s-a observat un rol protector al EGCG-ului împotriva inhibiției supraviețuirii clonogene induse de curcumină.

În privința potențialului membranelor mitocondrial s-a observat o creștere a numărului de celule depolarizate după administrarea unor concentrații crescute de curcumină începând cu 25  $\mu\text{M}$  indiferent de prezența sau absența EGCG. Efecte asupra potențialului membranelor mitocondrial s-au observat la menținerea concentrației de 25  $\mu\text{M}$  EGCG constante și utilizarea unor concentrații diferite de 25 – 100  $\mu\text{M}$  curcumină ceea ce a crescut numărul de celule depolarizate în mod dependent de doză. După utilizarea concentrației constante de 25  $\mu\text{M}$  curcumină și adăugarea unor concentrații variabile de 5 – 50  $\mu\text{M}$  EGCG nu s-au observat modificări ale potențialului membranelor mitocondrial.

În cazul ciclului celular, după administrarea curcuminei individual, s-a observat reducerea populației celulare A-431 în faza G0/G1 în prezența concentrațiilor de 5 – 100  $\mu\text{M}$ , concomitent cu blocarea ciclului celular în faza G2/M. În cazul co-tratamentului, concentrații de 0 – 100  $\mu\text{M}$  EGCG și 25  $\mu\text{M}$  curcumină scad numărul de celule în faza G0/G1 concomitent cu dublarea numărului de celule în faza S și creșterea numărului de celule în faza G2/M. Rezultate asemănătoare s-au obținut și după administrarea simultană a 25  $\mu\text{M}$  EGCG și a concentrațiilor variabile de curcumină.

În ceea ce privește viabilitatea celulară, curcumina a indus o scădere a numărului de celule viabile A-431, atât în prezența EGCG-ului cât și în lipsa acestuia, cu observarea efectului sinergic dintre curcumină și EGCG la concentrații de 25  $\mu\text{M}$  EGCG + 25  $\mu\text{M}$  curcumină. Prin realizarea acestor experimente s-a demonstrat efectul diferit al curcuminei și EGCG-ului în funcție de concentrația administrată, dar și de testele efectuate.



Concluzionând, în urma experimentelor efectuate s-a observat rolul citotoxic al curcuminei mai pronunțat în comparație cu cel al EGCG-ului, atât în cazul expunerii celulelor maligne A-431 la curcumină în mod individual cât și în prezența EGCG-ului. Obiectivele cercetării științifice au avut drept scop evidențierea efectelor citotoxice a celor doi polifenoli, evaluarea efectului sinergic al curcuminei și EGCG-ului, precum și evidențierea absenței citotoxicității curcuminei și EGCG-ului asupra unei linii celulare normale.

Pentru obținerea unor rezultate suplimentare în ceea ce privește evaluarea efectului sinergic dintre curcumină și EGCG, se pot efectua experimente în care să se utilizeze mai multe concentrații ale celor doi polifenoli. De asemenea, deși experimentele realizate în cadrul acestei teze contribuie la o îmbunătățire a cunoașterii modului de acțiune al celor doi polifenoli *in vitro*, este esențială realizarea unor studii *in vivo*, urmate de studii clinice, în scopul descoperirii unui tratament anticancerigen bazat pe compuși fitochimici, cunoscut fiind faptul că aceștia nu prezintă efecte secundare nocive asupra organismului uman.

## Lista lucrărilor științifice publicate în reviste cotate ISI

### Articole publicate în cadrul cercetărilor doctorale (3 articole ISI, 2 ca prim autor):

1. **Oana-Alina Ciolac**, Alexandru Filippi, Nicoleta Măru, Marcela Popa, Carmen Mariana Chifiriuc, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu *Reduction of the clonogenic potential and collapse of the mitochondrial membrane potential in A-431 epidermoid carcinoma cell line induced by curcumin*. Vol. 22, No. 6, 2017, Romanian Biotechnological Letters, factor de impact **0,404 (Prim autor)**  
Disponibil online la adresa: [https://www.rombio.eu/vol22nr6/7\\_Ciolac\\_et\\_al.pdf](https://www.rombio.eu/vol22nr6/7_Ciolac_et_al.pdf)
2. Teodora Costea, Ariana Hudiță, **Oana-Alina Ciolac**, Bianca Gălățeanu, Octav Ginghină, Marieta Costache, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu *Chemoprevention of colorectal cancer by dietary compounds*. Vol.19, No. 12, 2018, International Journal of Molecular Sciences, factor de impact **4,183**  
Disponibil online la adresa: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3787>
3. Alexandru Filippi, **Oana-Alina Ciolac**, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu, *ErbB Proteins as Molecular Target of Dietary Phytochemicals in Malignant Diseases*. Journal of Oncology, volumul 2017, Factor de impact **4,528. (Prim autor)**  
Disponibil online la adresa: <https://doi.org/10.1155/2017/1532534>

### Lista lucrărilor științifice în curs de publicare

4. **Oana-Alina Hazaparu**, Alexandru Filippi, Oana-Cezara Vlad, Carmen-Mariana Chifiriuc, Constanta Ganea, Maria-Magdalena Mocanu, Curcumin and EGCG co-treatment has both cytotoxic and cytoprotective effects in A-431 cancer cell line, Romanian Biotechnological Letters, under review, factor de impact **0,765 (Prim autor)**

**Participări la congrese sau conferințe:**

1. **Oana-Alina Ciolac**, Nicoleta Măru, Alexandru Filippi, Carmen Mariana Chifiriuc, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu, Curcumin induces the collapse in mitochondrial membrane potential and the reduction of the clonogenic potential in epidermoid carcinoma cell line A-431, International Summer School and Joint Symposium on Flow Cytometry, poster (best poster award – third place), 6-9 iunie 2017, Bucuresti, SBN 978-606-93974-4-2. **(Poster - Premiul III)**
2. **Oana-Alina Ciolac**, Alexandru Filippi, Oana-Cezara Vlad, Constanța Ganea, Maria-Magdalena Mocanu, Studies regarding curcumin and EGCG co-treatment in A-431 cancer cell line, The 12<sup>th</sup> National Congress of Cytometry, 30-31 mai 2019, București **(Poster)**
3. **Oana-Alina Hazaparu**, Alexandru Filippi, Oana-Cezara Vlad, Constanța Ganea, Maria-Magdalea Mocanu, Curcumin and EGCG co-treatment has both cytotoxic and cytoprotective effects in A-431 cancer cell line, Congresul Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, Ediția a VII-a, 10 – 12 octombrie 2019, **(Poster)**.

## Lista abrevierilor

ATP	Adenozintrifosfast
ADP	Adenozindifosfat
BCC	Carcinom bazocelular
carboxi- H2DCFDA	diacetat de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceină
CDK	Kinaze Dependentă de Ciclină
CCND1	Ciclina D1
Cmax	Concentrația maximă
COX2	Ciclooxygenaza-2
DMEM	Mediu Eagle Modificat de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfoxid
EDTA	Acidul Etilendiaminotetraacetic
EGFR	Receptorul factorului de creștere epidermal
EGCG	Galat de 3-O-Galat de 3-O-epigalocatehină
EC50	Concentrația eficientă la 50% din efect
FBS	Ser Fetal Bovin
GTC	Catechine din ceaiul verde
IC50	Concentrația inhibitorie la 50% din efect
IL	Interleukina
JC-1	Iodură de 1H-Benzimidazoliu, 5,6-dicloro-2-[3-(5,6-dicloro-1,3-dietil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-iliden)-1-propenil]-1,3-dietil
LOX	Lipoxigenaza
MOMP	Permeabilitatea Mitocondrială a Membranei Externe
MPT	Tranziția Permeabilității Mitocondriale
MFIR	Raportul Intensității Medii a Fluorescenței
NADH	Nicotiamidă Adenin Dinucleotid
NF-κB	Factorul Nuclear Kappa B
Nrf2	Factorul Nuclear Eritroid-2
iNOS	Sinteza Inductibilă de Oxid Nitric
NP	Nanoparticule
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Iodură de Propidiu
PLGA	Acid poli-lacto-co-glycolic
ROS	Specii Reactive de Oxigen
RNS	Specii Reactive de Nitrogen
SSC	Carcinom cu celule scuamoase
SCC	Detector pentru împrăștierea lateral
STAT3	Transductorul de Semnal și Activator de Transcripție 3
TNF	Factorul de Necroză Tumorală

TRAIL	Ligandul Inductor de Apoptoză legat de TNF
UV	Raze ultraviolete
VEGF	Factorul de Creștere Endotelial Vascular
WST-1	Sare de Tetrazoliu Solubilă în Apa
$\Delta\Psi_m$	Potențial membranar mitocondrial

## Bibliografie selectivă

- AGGARWAL, B. B., SUNDARAM, C., MALANI, N. & ICHIKAWA, H. 2007. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, 595, 1-75.
- ANAND, P., KUNNUMAKKARA, A. B., NEWMAN, R. A. & AGGARWAL, B. B. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 4, 807-18.
- ANAND, P., SUNDARAM, C., JHURANI, S., KUNNUMAKKARA, A. B. & AGGARWAL, B. B. 2008. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*, 267, 133-64.
- BHULLAR, K. S., JHA, A., YOUSSEF, D. & RUPASINGHE, H. P. 2013. Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules*, 18, 5389-404.
- CHOWDHURY, A., SARKAR, J., CHAKRABORTI, T., PRAMANIK, P. K. & CHAKRABORTI, S. 2016. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomed Pharmacother*, 78, 50-59.
- DHILLON, N., AGGARWAL, B. B., NEWMAN, R. A., WOLFF, R. A., KUNNUMAKKARA, A. B., ABBRUZZESE, J. L., NG, C. S., BADMAEV, V. & KURZROCK, R. 2008. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 4491-9.
- DU, G. J., ZHANG, Z., WEN, X. D., YU, C., CALWAY, T., YUAN, C. S. & WANG, C. Z. 2012. Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, 4, 1679-91.
- FARHAN, M., KHAN, H. Y., OVES, M., AL-HARRASI, A., REHMANI, N., ARIF, H., HADI, S. M. & AHMAD, A. 2016. Cancer Therapy by Catechins Involves Redox Cycling of Copper Ions and Generation of Reactive Oxygen species. *Toxins (Basel)*, 8, 37.
- FILIPPI, A., PICOT, T., AANEI, C. M., NAGY, P., SZOLLOSI, J., CAMPOS, L., GANEA, C. & MOCANU, M. M. 2018. Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SK-BR-3 breast cancer cell lines. *Int J Food Sci Nutr*, 69, 584-597.
- FRANKEN, N. A., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. & VAN BREE, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1, 2315-9.
- GRANJA, A., FRIAS, I., NEVES, A. R., PINHEIRO, M. & REIS, S. 2017. Therapeutic Potential of Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems. *Biomed Res Int*, 2017, 5813793.
- KAUR, G. & CHINTAMANENI, M. 2013. Evaluation of Anti-hyperlipidemic Potential of Combinatorial Extract of Curcumin, Piperine and Quercetin in Triton-induced Hyperlipidemia in Rats. *Science International*, 1, 57-63.
- KIM, T. K. 2015. T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol*, 68, 540-6.
- LAMBERT, J. D., HONG, J., KIM, D. H., MISHIN, V. M. & YANG, C. S. 2004. Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *J Nutr*, 134, 1948-52.
- LOPRESTI, A. L. 2018. The Problem of Curcumin and Its Bioavailability: Could Its Gastrointestinal Influence Contribute to Its Overall Health-Enhancing Effects? *Adv Nutr*, 9, 41-50.
- MERELES, D. & HUNSTEIN, W. 2011. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *Int J Mol Sci*, 12, 5592-603.

- PARK, J. H., BAE, J. H., IM, S. S. & SONG, D. K. 2014. Green tea and type 2 diabetes. *Integr Med Res*, 3, 4-10.
- RAVINDRAN, J., PRASAD, S. & AGGARWAL, B. B. 2009. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J*, 11, 495-510.
- SHARIFI-RAD, M., PEZZANI, R., REDAELLI, M., ZORZAN, M., IMRAN, M., AHMED KHALIL, A., SALEHI, B., SHAROPOV, F., CHO, W. C. & SHARIFI-RAD, J. 2020. Preclinical Pharmacological Activities of Epigallocatechin-3-gallate in Signaling Pathways: An Update on Cancer. *Molecules*, 25.
- SINGH, B. N., SHANKAR, S. & SRIVASTAVA, R. K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 82, 1807-21.
- SINGH, R. & SHARMA, P. 2011. Hepatoprotective Effect of Curcumin on Lindane-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats. *Toxicol Int*, 18, 124-9.
- SOMERS-EDGAR, T. J., SCANDLYN, M. J., STUART, E. C., LE NEDELEC, M. J., VALENTINE, S. P. & ROSENGREN, R. J. 2008. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER alpha-breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 122, 1966-71.
- TAKAHASHI, M., SUZUKI, K., KIM, H. K., OTSUKA, Y., IMAIZUMI, A., MIYASHITA, M. & SAKAMOTO, S. 2014. Effects of curcumin supplementation on exercise-induced oxidative stress in humans. *Int J Sports Med*, 35, 469-75.
- WILKEN, R., VEENA, M. S., WANG, M. B. & SRIVATSAN, E. S. 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 10, 12.
- ZHOU, D. H., WANG, X., YANG, M., SHI, X., HUANG, W. & FENG, Q. 2013. Combination of low concentration of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and curcumin strongly suppresses the growth of non-small cell lung cancer in vitro and in vivo through causing cell cycle arrest. *Int J Mol Sci*, 14, 12023-36.
- ZUO, X., TIAN, C., ZHAO, N., REN, W., MENG, Y., JIN, X., ZHANG, Y., DING, S., YING, C. & YE, X. 2014. Tea polyphenols alleviate high fat and high glucose-induced endothelial hyperpermeability by attenuating ROS production via NADPH oxidase pathway. *BMC Res Notes*, 7, 120.