

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

---

# **Studii privind efectele antioxidante și antitumorale ale retro-carotenoidelor în cancer de piele**

Doctorand **Daria-Antonia Dumitraș**

---

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Sanda Andrei**

---





## INTRODUCERE

Rolul important al carotenoidelor în diferite procese multifactoriale din organismele animale și umane, precum și capacitatea acestora de a interacționa cu speciile active de oxigen, reducând astfel efectul lor negativ corelat cu apariția și dezvoltarea mai multor afecțiuni printre care se numără și un număr important de neoplasme, este bine cunoscut în lumea științifică. Cunoscut și sub denumirea de Tisă europeană sau engleză, *Taxus baccata* este un conifer originar din Europa. Carotenoidele, în special cele cu o structură retro cum este rodoxantina, dar și lycopina și zeaxantina, au fost menționate ca fiind unele dintre componentele esențiale ale fructelor de *Taxus baccata*, numite aril (TABASZEWSKA și colab., 2021; DUMITRAȘ și colab., 2022b).

În ciuda repetatelor încercări de înțelegere și tratare a cancerului de piele, această afecțiune este tot mai frecvent diagnosticată, devenind una dintre cele mai importante cauze de deces, atât în rândul omului cât și al animalelor. În ceea ce privește animalele, există numeroase studii care raportează dezvoltarea în mod spontan a melanomului la specii variate. Din păcate, metodele actuale de tratament au multiple limitări datorită unui număr crescut de efecte secundare pe care le pot provoca, dobândirea rezistenței la terapie și nu în ultimul rând, costul ridicat. La momentul actual este necesară o atenție crescută și un studiu eficient al metodelor alternative de prevenție și terapie a melanomului cutanat la animale pentru stabilirea efectelor biologice, a mecanismelor de acțiune și a eficacității unor substanțe fitoterapeutice precum sunt carotenoidele.

## IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, 25% din medicamentele utilizate în medicina modernă provin din plante, fiind bazate pe fitocompușii conținuți de acestea (KHAN și AHMAD, 2019). Datorită marelui avantaj pe care fitocompușii îl oferă, și anume, un număr redus de efecte adverse în comparație cu tratamentul chimioterapic utilizat în terapia diverselor tipuri de neoplasme, un studiu aprofundat al plantelor cu compoziție bogată în compuși cu un posibil efect anti-tumoral este necesar.

În ultimii ani s-au acumulat foarte multe studii care au demonstrat relația directă dintre acumularea SRO, stresul oxidativ și dezvoltarea cancerului. În studiile de specialitate, un interes deosebit a fost acordat rolului antioxidant al pigmentilor carotinoidici, formulându-se ipoteza ca aceștia pot avea o acțiune antitumorală. Rodoxantina, pigment carotenoidic puțin studiat în literatura de specialitate, este din punct de vedere chimic o xantofilă cu un sistem polienic de tip retro. *Taxus baccata* și *Potamogeton natans* sunt singurele plante din România care sunt bogate în pigmenți carotinoidici cu un sistem polienic de tip retro: rodoxantina, eșolxantina și eșolxantona (ANDREI și colab., 2005).

**Obiectivul general** al prezentei teze a fost studiul profilului compușilor biologici activi conținuți de aril și realizarea unor studii *in vitro* și *in vivo* cu scopul stabilirii efectului antioxidant, respectiv antitumoral al rodoxantinei izolate din arilul de *Taxus baccata*.

Pentru atingerea obiectivului principal formulat cercetarea a fost divizată în **3 studii distincte**, fiecare dintre studii urmărind un obiectiv specific:

- ✓ Caracterizarea profilului de carotenoide, compuși fenolici și evaluarea activității antioxidante a extractelor obținute din arilul de *Taxus baccata*:
  - Obținerea extractului total din arilul de *Taxus baccata* pentru evaluarea profilului de carotenoide prin diverse tehnici spectrofotometrice și cromatografice;

- Obținerea unui extract etanolic total din arilul de *Taxus baccata* pentru evaluarea profilului de polifenoli prin diverse tehnici;
  - Determinarea capacității antioxidante a extractului etanolic obținut prin două metode: metoda de reducere a ionilor ferici FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) și metoda de inactivare a radicalilor DPPH;
- ✓ Determinarea *in vitro* a activității citotoxice și antiproliferative a rodoxantinei purificate din arilul de *Taxus baccata*, utilizând cele două linii celulare propuse:
- Evaluarea viabilității celulare a celor două tipuri de celule de interes prin testul MTT în urma expunerii la diferite concentrații de rodoxantină;
  - Evaluarea efectului citotoxic al rodoxantinei în urma expunerii celor două linii celulare la diverse concentrații;
  - Evaluarea posibilului efect protector al rodoxantinei împotriva stresului oxidativ indus la nivelul celulelor luate în studiu în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în diverse concentrații;
- ✓ Determinarea *in vivo* a potențialului efect antitumoral în cazul melanomului B16F10 la șoareci din linia C57BL/6J determinat de suplimentarea dietei cu rodoxantină:
- Inducerea experimentală a melanomului malign murin cu utilizarea liniei celulare B16F10 și a șoarecilor (*Mus musculus*) din linia C57BL/6;
  - Investigarea posibilului efect antitumoral al rodoxantinei;
  - Investigarea din punct de vedere histopatologic a tumorilor;
  - Efectuarea de determinări de hematologie, biochimie și imunochimice în cazul indivizilor utilizați în experiment;

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată “Studii privind efectele antioxidante și antitumorale ale retro-carotenoidelor în cancer de piele” cuprinde 29 de figuri și 17 tabele, fiind structurată conform normelor de tehnoredactare în două părți: **Partea I – Stadiul actual al cunoașterii** și **Partea a II-a – Contribuția personală**.

### Partea I – Stadiul actual al cunoașterii

**Partea I** cuprinde 4 capitole în care este expusă sinteza datelor cunoscute la momentul actual cu privire la stresul oxidativ și rolul acestuia, activitatea anti-tumorală a diverșilor compuși din plante, caracteristicile generale ale *Taxus baccata* și neoplaziile cutanate la animale.

### Partea a II-a – Contribuția personală

**Partea a II-a** cuprinde 6 capitole și reprezintă contribuția personală. În această parte a cercetării se discută ipoteza de lucru și obiectivele cercetării, materialele și metodele utilizate pentru îndeplinirea scopurilor propuse, rezultatele obținute, concluziile desprinse, precum și recomandările și elementele de originalitate ale prezentului studiu.

## REZULTATELE CERCETĂRII

**Caracterizarea profilului de carotenoide, compuși fenolici și evaluarea activității antioxidante a extractelor obținute din arilul de *Taxus baccata***

➤ **Conținutul de compuși bioactivi din arilul de *Taxus baccata***

Rezultatele obținute în cazul determinărilor cantitative a carotenoidelor totale respectiv a fenolilor totali și a conținutului total de flavonoide sunt prezentate în detaliu în Tabelul 1.

Tabel 1

<i>Conținutul de fitonutrienți identificați în arilul de Taxus baccata</i>				
Probe analizate	Carotenoide totale mg/100 g FW	Rodoxantina mg/100 g FW	Polifenoli totali mg GAE/100 g FWF	Flavonoide totale mg QE/100 g FWF
Proba 1	3.384	2.536	146.69	43.95
Proba 2	3.371	2.582	146.64	45.01
Proba 3	3.379	2.575	143.8	45.26
Medie ± DS	<b>3.378 ± 0.0053</b>	<b>2.564 ± 1.0079</b>	<b>145.71 ± 22.3648</b>	<b>44.723 ± 15.4256</b>

Determinarea profilului de carotenoide majoritare din arilul de *Taxus baccata* a fost realizată prin cromatografie HPLC, fiind analizate atât extractele totale cât și fracțiile separate prin cromatografie pe coloana. Cromatogramele HPLC pentru carotenoidele totale extrase din arilul proaspăt (A) și fracțiile separate pe coloană deschisă (B; C; D) sunt prezentate în Figura 1. Au fost identificați cinci compuși: luteina, β-caroten și trei izomeri de rodoxantină.

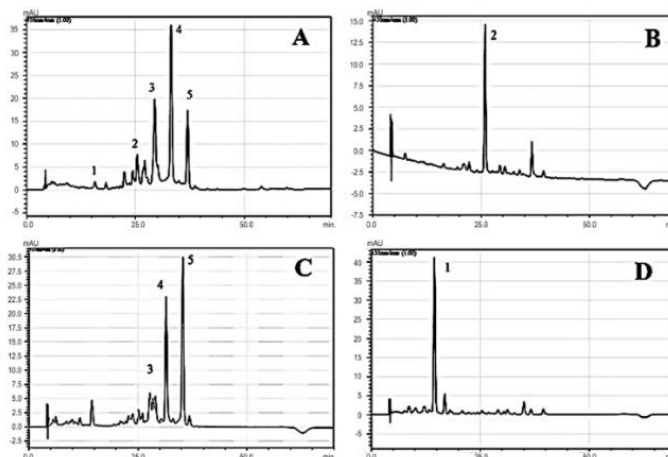


Fig 1. Cromatograma HPLC a carotenoidelor din extractul total obținut de fructele proaspete de *Taxus baccata* (A) și fracții (fracția 1-(B); fracția 2-(C); și fracția 3-(D)). Sunt identificate cinci carotenoide: (1) luteină, (2) β-caroten, (3) și (4) și (5) izomeri de rodoxantină

Determinarea profilului polifenolilor în extractele obținute din aril a evidențiat prezența a 6 compuși din 3 clase diferite și (Tabelul 2): acidul p-cumarinic, acidul protocatehuic, acidul hidroxi-cafeic, acidul cafeic, catechin-glucozida și un alt compus care nu a fost identificat.

Tabel 2

**Cuantificarea și identificarea compușilor fenolici ( $\mu\text{g/g FWA}$ ) prin analiză HPLC-DAD-ESI+**

Pic	Compus	Timp de retenție $R_t$ (min)	UV $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	m/z tranziția de bază [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Subclasă	Concentrație ( $\mu\text{g/g}$ )
1	NI	3.30	230	381, 219		42.2
2	Acid p-cumaric	6.12	320	327, 166	Hydroxycinnamic acid	1046.235
3	Acid protocatecuic	9.62	290	155	Hydroxybenzoic acid	149.49
4	Acid hidroxi-cafeic	12.20	322	197	Hydroxycinnamic acid	49.37
5	Acid cafeic	13.78	322	181	Hydroxycinnamic acid	95.76
6	Catechin-glicozidă	16.45	280	453, 291	Flavanol	131.36

NI- neidentificat

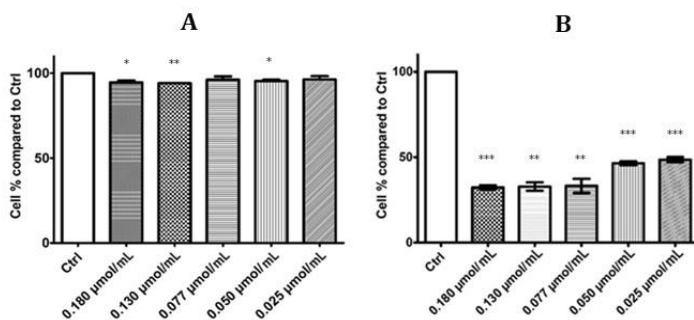
➤ **Activitatea antioxidantă**

Capacitatea antioxidantă *in vitro* a extractului etanolic al arilului care conține compuși fenolici, a fost evaluată prin două metode diferite: testul de captare cu 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH•) și puterea antioxidantă reducătoare a ionilor de fier (FRAP). Activitatea antioxidantă a extractului etanolic obținută prin metoda DPPH, a relevat o valoare  $IC_{50} = 68,46$  mg/ml, valoare care este atribuită unei activități antioxidante moderate. În ceea ce privește datele din literatura de specialitate referitoare la activitatea antioxidantă a compușilor extrași din alte fructe, valorile obținute de cercetători pentru coacăze negre, coacăze roșii, respectiv agrișe sunt mai mici, dar apropiate de valoarea obținută în studiul nostru (LACZKÓ-ZÖLD și colab., 2018). Rezultatul testului FRAP este exprimat în  $\mu\text{M TE}/100$  mL extract. Valoarea obținută de noi pentru aril ( $10,7$   $\mu\text{mol}/100$  mL) este apropiată de valoarea raportată de DOMÍNGUEZ și colab. (2020) pentru fructele de soc ( $10$   $\mu\text{mol}/100$  mL).

**Studii *in vitro* privind efectul citotoxic și antiproliferativ al rodoxantinei purificate din arilul de *Taxus baccata* L.**

➤ **Evaluarea activității citotoxice a rodoxantinei asupra celulelor de melanom murin B16F10 și a keratinocitelor HaCaT umane**

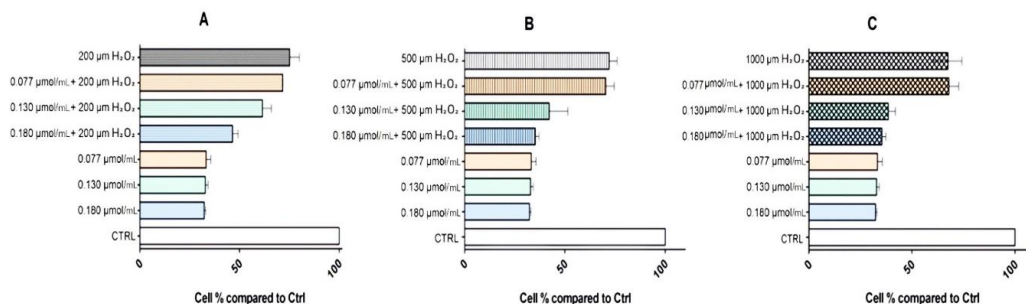
În urma efectuării testului MTT, putem sublinia diferența semnificativă dintre rezultatele obținute în cazul celor două linii celulare testate (Figura 2). Spre deosebire de cazul celulelor din linia HaCAT expuse la rodoxantină unde viabilitatea celulară s-a situat între 94,55% și 96,28%, în cazul celulelor de melanom murin B16F10, variația procentajului de celule viabile în urma tratării cu rodoxantină este semnificativă, comparativ cu proba control, înregistrându-se scăderi majore ale viabilității celulare în urma utilizării tuturor concentrațiilor.



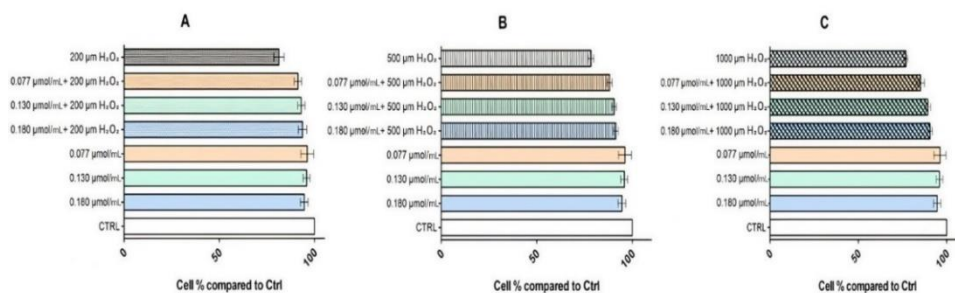
**Fig 2. Efectul inhibitor al rodoxantinei la cinci concentrații diferite (C1-C5) asupra celulelor HaCaT (A) și a celulelor de melanom murin B16F10 (B). Ctrl - celule netratate. Valorile reprezintă media ± DS a trei determinări. Diferențe semnificative statistic între celulele tratate și cele netratate (control): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .**

➤ **Evaluarea efectului citoprotector al rodoxantinei împotriva stresului oxidativ indus de expunerea la peroxid de hidrogen al celulelor de melanom murin B16F10 și a keratinocitelor HaCaT umane**

În cadrul prezentului studiu s-a efectuat un test MTT cu scopul de a explora potențialul de protecție al rodoxantinei pe aceleași linii celulare (HaCaT și B16F10), testând primele trei concentrații menționate anterior (C1 = 0,18 μmol/mL rodoxantină, C2 = 0,13 μmol/mL rodoxantină și C3 = 0,077 μmol/mL rodoxantină). Ca urmare a pre-tratamentului celulelor cu cele 3 concentrații de timp de 24 de ore și a expunerii ulterioare la trei concentrații diferite (200 μm, 500 μm, respectiv 1000 μm) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au rezultat datele prezentate în figurile 3 și 4. Expunerea la peroxid de hidrogen a indus citotoxicitate la nivelul celulelor HaCaT prin reducerea viabilității celulare cu până la 81,30% (200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 78,41% (500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) și 76,89% (1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Tratamentul cu rodoxantină a demonstrat un efect citoprotector asupra celulelor HaCaT expuse la peroxid de hidrogen, toate cele trei concentrații de rodoxantină (C1-C3) crescând viabilitatea celulară cu 12,55%, 13% și, respectiv, 9,66%.

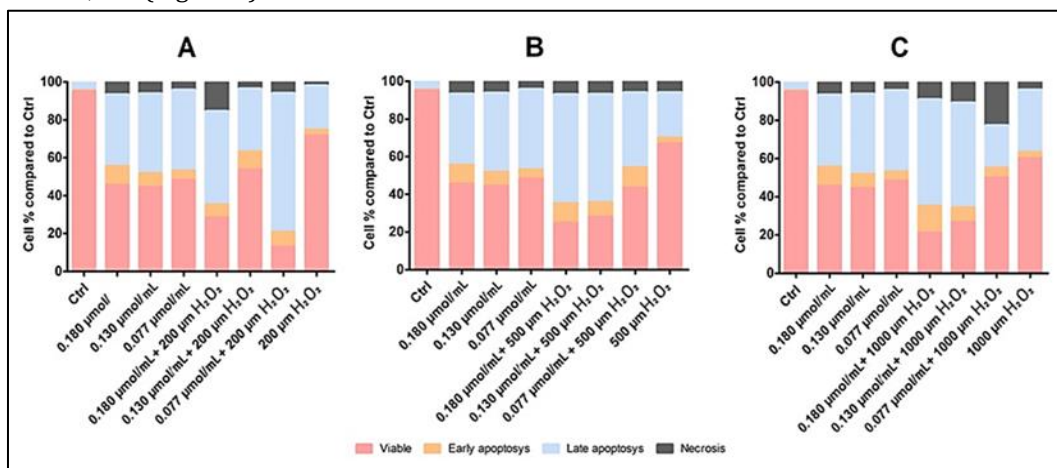


**Fig 3. Efectele pretratării cu rodoxantină asupra modificărilor celulelor B16F10 induse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viabilitatea celulară detectată prin test MTT. Celulele B16F10 expuse la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> timp de 2 ore. Semnificație:  $p < 0,0001$  față de control. Celulele B16F10 expuse la C1-C3 de rodoxantina timp de 24 de ore. Semnificație:  $p < 0,001$ . (A) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 200 μm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (B) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 500 μm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (C) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 1000 μm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,005$ .**



**Fig 4. Efectele pretratării cu rodoxantină asupra modificărilor celulelor HaCaT induse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viabilitatea celulară detectată prin test MTT. Celulele HaCaT expuse la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> timp de 2 ore. Semnificație:  $p < 0,0001$  față de control. Celulele HaCaT expuse la C1-C3 de rodoxantină timp de 24 de ore. Semnificație:  $p < 0,001$ . (A) Celulele HaCaT expuse la C1-C3 și 200  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (B) Celulele HaCaT expuse la C1-C3 și 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (C) Celulele HaCaT expuse la C1-C3 și 1000  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,005$ .**

Analiza prin citometria de flux a relevat, de asemenea, o acțiune sinergică a rodoxantinei și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> împotriva celulelor melanomului B16F10, prin reducerea efectivă a procentului de celule viabile. Rodoxantina a prezentat efecte citotoxice prin reducerea și mai mare a viabilității celulare; cu cât concentrația de rodoxantină este mai mare, cu atât viabilitatea celulelor melanomului este mai mică. Rata de viabilitate în grupul de control B16F10 a fost de 94,9%, rată care a fost redusă după expunerea la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> după cum urmează: 200  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—71,5%, 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—66,8% și 1000  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—60,1%. (Figura 5).



**Fig 5. Analiza citometriei de flux a celulelor B16F10 în urma expunerii la rodoxantină și peroxid de hidrogen. (A) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 200  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (B) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,05$ . (C) Celulele B16F10 expuse la C1-C3 și 1000  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Semnificație:  $p < 0,005$ . Valorile reprezintă media  $\pm$  DS a trei probe.**

## Studiul efectelor rodoxantinei într-un model experimental de inducere a melanomului cutanat la șoareci C57BL/6J

### ➤ Efectul administrării rodoxantinei la șoarecii din linia C57BL/6J

În urma administrării unei doze de 7 mg/kg/zi rodoxantină la șoarecii C57BL/6J cărora li s-au inoculat 10<sup>6</sup> celule B16F10 de melanom malign murin nu s-au observat modificări în ceea ce privește starea generală a indivizilor. Manifestări precum scăderea mobilității, apatia, piloerectia



sau închiderea parțială a ochilor sau efecte adverse precum diareea, comune în experimente similare, nu au fost observate la niciunul dintre indivizi, indiciu faptului că tratamentul cu rodoxantină nu a prezentat efecte adverse, respectiv toxicitate. Ziua 8 a reprezentat prima zi în care au putut fi observate primele semne ale creșterii tumorale la unii dintre indivizi. Tumorile au fost măsurate (lungime și lățime) la interval de două zile până la finalul experimentului. Pe parcursul studiului, am observat că deși numărul de celule inoculat a fost același, creșterea a variat între indivizii din cadrul aceleiași lot.

Cu toate că, atât în cazul grupului melanom cât și în cazul grupului melanom+rodoxantină, creșterea tumorală a fost exponențială, administrarea rodoxantinei a încetinit vizibil această dezvoltare. Astfel, valoarea mediei volumelor tumorale determinate de-a lungul studiului a fost influențată de tratamentul cu rodoxantină printr-o diferență de 42,18% între cele două grupuri majore luate în studiu în favoarea grupului melanom. Rodoxantina a inhibat creșterea tumorală, astfel că media maselor tumorale după excizie, în cazul lotului tratat, a fost cu 15,74% mai mică decât în cazul lotului netratat (Figura 6).

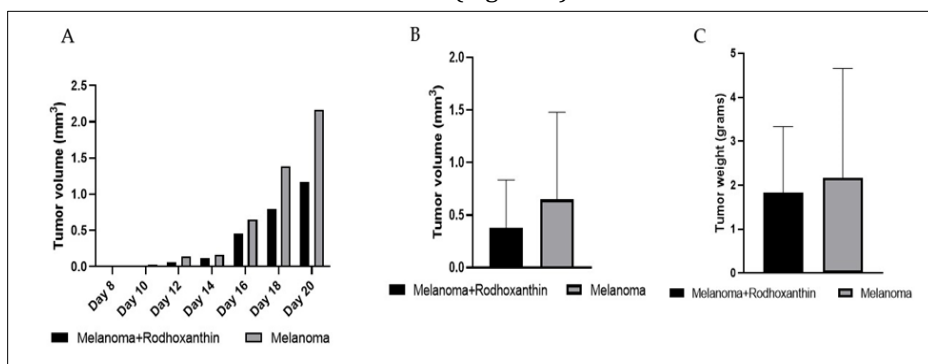


Fig 6. Efectul rodoxantinei asupra creșterii tumorale la șoarecii C57BL/6. (A) Variația volumului tumoral pe parcursul studiului. (B) Inhibarea semnificativă a volumului tumoral dintre grupul netratat ( $0,648 \pm 0,829$ ) și grupul tratat ( $0,376 \pm 0,457$ ). Fiecare valoare reprezintă media  $\pm$  DS,  $n = 8$ ). (C) Inhibarea greutateii tumorale la o valoare de 15,48% înregistrată după administrarea a 7 mg/kg/zi rodoxantină.

### ➤ Analiza hematologică

Variațiile valorilor parametrilor determinați nu au prezentat o diferență statistică, cu câteva excepții (Tabel 3).

Tabel 3

#### Evaluarea hemoleucogramei

Parametri	Lot Control	Lot ulei MCT	Lot Rodoxantină	Lot Melanom	Lot Melanom+Rodoxantină
Leucocite ( $10^9/L$ )	3,603 $\pm$ 0,14	3,977 $\pm$ 0,03	5,056 $\pm$ 0,04	5,777 $\pm$ 0,12	3,626 $\pm$ 0,05
Limfocite ( $10^9/L$ )	3,253 $\pm$ 0,03	3,466 $\pm$ 0,21	4,166 $\pm$ 0,03	4,036 $\pm$ 0,07	2,850 $\pm$ 0,05
Neutrofile ( $10^9/L$ )	0,253 $\pm$ 0,04	0,476 $\pm$ 0,02	0,853 $\pm$ 0,04	1,473 $\pm$ 0,03	0,793 $\pm$ 0,04
Hematii/ ( $10^{12}/L$ )	8,593 $\pm$ 0,03	10,096 $\pm$ 0,02	10,826 $\pm$ 0,06	4,332 $\pm$ 0,05	8,250 $\pm$ 0,05
Hemoglobină (g/dl)	11,210 $\pm$ 0,04	13,876 $\pm$ 0,08	14,486 $\pm$ 0,09	10,943 $\pm$ 0,05	11,260 $\pm$ 0,03
Hematocrit (%)	38,926 $\pm$ 0,41	41,713 $\pm$ 0,28	44,210	33,916 $\pm$ 0,13	35,010 $\pm$ 0,11
Trombocite ( $10^9/L$ )	252,12 $\pm$ 1,42	231,943 $\pm$ 0,41	184,5 $\pm$ 0,51	91,333 $\pm$ 1,52	230,643 $\pm$ 0,66

### ➤ Analiza biochimică

Cu toate că celulele tumorale sunt producătoare de cantități mari de specii reactive de oxigen, valoarea enzimelor antioxidante de la nivelul celulelor tumorale este în general mai scăzută datorită capacității mai reduse a acestora de a se apăra împotriva radicalilor liberi, astfel că la acest nivel se menține un dezechilibru oxidanți-antioxidanți, și anume starea de stres oxidativ. În Tabelul 4 și 5 sunt prezentate valorile activității enzimelor antioxidante determinate din plasma și țesuturile indivizilor luați în studiu.

Tabel 4

#### *Activitatea antioxidantă enzimatică și statusul antioxidant total în plasmă*

Parametri	Lot Control	Lot ulei MCT	Lot Rodoxantină	Lot Melanom	Lot Melanom+Rodoxantină
Catalază(U/mL)	194,02 ± 313,29	203,125 ± 292,08	153,8 ± 150,38	139,3 ± 608,66	110,2 ± 308,46
	71,72 ± 4,76	68,015 ± 7,72	65,22 ± 14,77	89,61 ± 14,89	75,97 ± 1,17
Superoxi-dismutaza(U/mL)	22,86 ± 3,87	21,97 ± 3,93	25,72 ± 5,07	20 ± 6,73	25,34 ± 0,58
Glutation-peroxidaza(nmol/min/mL)	18,31 ± 1,68	17,92 ± 3,5	29,11 ± 0,43	17,30 ± 0,33	30,33 ± 8,16
Activitatea antioxidantă totală(U/mL)					

Tabel 5

#### *Activitatea antioxidantă enzimatică și statusul antioxidant total în țesuturi*

Țesut	CAT (U/mg proteină)	SOD (U/mg proteină)	GPx (nmol/min/mg proteină)	TAS (U/mg proteină)
<b>Piele</b>				
Lot control	1025,11±50,14	48,21±0,21	10,11±0,24	15,21±0,39
Lot ulei MCT	939,16±78,72	46,77±1,18	11,25±2,67	16,03±2,65
Lot Rodoxantină	1491,16±47,12	42,19±1,39	6,47±3,33	15,18±2,44
Lot Melanom	846,23±345,21	46,67±5,11	7,95±2,03	11,19±1,96
Lot Melanom+Rodoxantină	1381,91±250,06	43,37±3,22	5,55±0,40	13,44±0,43
<b>Ficat</b>				
Lot control	113,33±10,05	9,77±0,99	0,46±0,05	1,96±0,10
Lot ulei MCT	150,18±27,23	9,86±1	0,60±0,006	2,14±0,16
Lot Rodoxantină	149,44±48,58	13,27±3,05	1,23±0,06	3,02±0,78
Lot Melanom	308,53±85,11	21,03±9,83	2,90±0,60	1,74±0,81
Lot Melanom+Rodoxantină	237,56±4,51	15,79±9,87	1,00±0,35	3,95±1,46
<b>Tumoră</b>				
Lot Melanom	368,162±178,48	31,99±3,40	3,74±0,60	7,39±2,99
Lot Melanom+Rodoxantină	492,22±108,31	22,93±3,61	5,57±1,09	9,07±1,31

Figurile 7 și 8 prezintă efectul administrării rodoxantinei la indivizii luați în studiu, asupra valorii factorului de creștere epidermală, respectiv a 8-hidroxi-2-deoxiguanozinei. În cazul ambelor determinări s-a observat o descreștere semnificativă, cu valoare statistică ( $p < 0.05$ ), atât la nivelul pielii cât și la nivelul tumorilor în cazul indivizilor tratați cu rodoxantină, comparativ cu valorile probelor de la indivizii netratați. Această scădere a fost regăsită și la nivelul probelor de plasmă analizate. Se poate menționa astfel implicarea rodoxantinei în încetinirea creșterii tumorale, unul dintre mecanisme fiind scăderea nivelului de EGF și modularea nivelului de oxidare al ADN-ului prin scăderea concentrației 8-hidroxi-2-deoxiguanozinei.

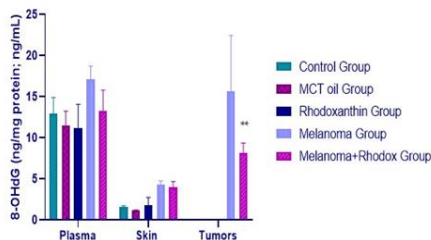
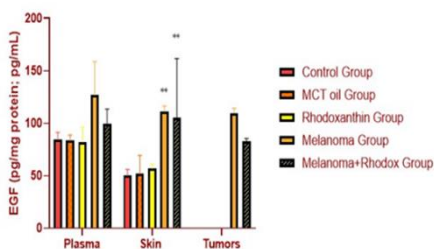


Fig 7. Variația factorului de creștere epidermală în cadrul grupurilor. Nivel de semnificație statistică  $** p < 0,01$

Fig 8. Variația 8-hidroxi-2-deoxiguanozinei în cadrul grupurilor. Nivel de semnificație statistică  $** p < 0,01$

### ➤ Analiza histopatologică

În urma examenului histologic al probelor de natură tumorală prelevate de la indivizii incluși în studiu și colorate prin colorația Tricrom Goldner (TG) în vederea examinării, s-a constatat o formațiune neoplazică malignă, slab diferențiată, cu localizare în hipoderm (Figura 9).

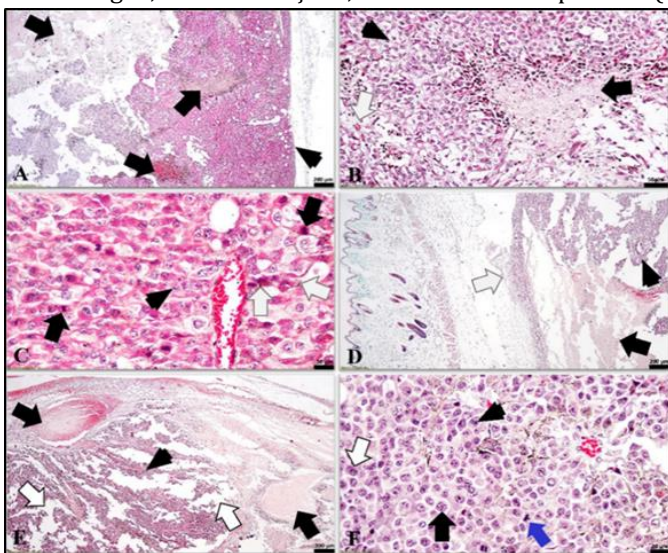


Fig. 9. Melanom anaplazic cutanat la șoareci (colorația tricrom Goldner): (A) (lotul melanom): masă tumorală mare cu zone necrotice extinse (săgeți) și o capsulă discretă (cap săgeată); (B) (lot melanom): caracteristici microscopice ale melanomului sugerând resturi celulare ale zonelor necrozate (săgeată neagră), parenchim tumoral (săgeată) care include un țesut de susținere discret (săgeată albă); (C) (lot melanom): melanom intens celularizat, cu melanocite tumorale care prezintă anizocitoză, nuclee mari și nucleoli (vârf de săgeată), numeroase figuri mitotice (săgeți negre) și granule melanice discrete în citoplasma unor celule tumorale (rânduri

săgeți albe); (D) (lot melanom+rodoxantină): localizarea masei tumorale în hipoderm (vârful săgeții), care prezintă zone necrotice mari (săgeată neagră) și o capsulă infiltrată slab definită (săgeată albă); (E) (lot melanom+rodoxantină): trombuși în masa tumorală (săgeți), un țesut de susținere discret identificat între celulele parenchimului (vârful săgeții) și o aderență intercelulară scăzută sugerată de spațiile intercelulare mari (săgeți albe) care sugerează rapiditatea creșterii tumorale și malignitate ridicată; (F) (lot melanom+rodoxantină): melanom slab diferențiat sugerat de pleiomorfismul celular ridicat, nuclei de mari (săgeată neagră), inclusiv melanocite binucleate (săgeată albă), în multe circumstanțe cu macronucleoli (săgeată), indice mitotic ridicat care include mitoze atipice (săgeată albastră).

Diagnosticul histopatologic stabilit a fost de melanom anaplazic slab melanogen, cu celule polimorfe și numeroase microfocare necrotice intratumorale.

## RECOMANDĂRI

Având în vedere datele limitate disponibile în literatura de specialitate legate de compoziția arilului de *Taxus baccata*, de efectele biologice ale compușilor, dar mai ales de acțiunea rodoxantinei, a potențialului și a valorii sale terapeutice cu scopul înțelegerii în profunzime a valorii rodoxantinei în terapia sau prevenția diverselor afecțiuni, în special a celor neoplazice, recomandăm următoarele:

- ✓ Efectuare de studii suplimentare, *in vitro* prin utilizarea unor diverse tipuri de linii celulare tumorale cu scopul determinării efectelor biologice ale administrării de diverse concentrații de rodoxantină.
- ✓ Efectuarea de studii suplimentare *in vivo* în cazul melanomului murin B16F10 cu scopul determinării dozei optime de rodoxantină ce trebuie administrată și a perioadei optime de administrare a acesteia (ante și pe perioada inducerii melanomului).
- ✓ Efectuarea unor studii suplimentare cu scopul determinării farmacocineticii rodoxantinei.

## BIBLIOGRAFIE

- ANDREI S., PINTEA A., BUNEA A., 2005, Studies regarding retro carotenoids content from *Taxus baccata*, 653-655, XL Croatian symposium on agriculture with international participation, Opatija, Croatia.
- DOMÍNGUEZ, R., ZHANG, L., ROCCHETTI, G., LUCINI, L., PATEIRO, M., MUNEKATA, P. E., & LORENZO, J. M. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food chemistry*, 330, 127266.
- DUMITRAȘ, D. A., BUNEA, A., VODNAR, D. C., HANGANU, D., PALL, E., CENARIU, M., ... & ANDREI, S. (2022). Phytochemical Characterization of *Taxus baccata* L. Aril with Emphasis on Evaluation of the Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activity of Rhodoxanthin. *Antioxidants*, 11(6), 1039.
- KHAN, M.S.A., I. AHMAD, 2019, Chapter 1—Herbal Medicine: Current trends and future prospects. in new look to phytomedicine, Ed. Academic Press: London, UK, pp. 3–13.
- LACZKÓ-ZÖLD, E., KOMLÓSI, A., ÜLKEI, T., FOGARASI, E., CROITORU, M., FÜLÖP, I., ... & VARGA, E. (2018). Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity. *Acta Biologica Hungarica*, 69(2), 156-169.
- TABASZEWSKA, M., ANTONIEWSKA, A., RUTKOWSKA, J., SKOCZYLAS, Ł., SŁUPSKI, J., & SKOCZEŃ-SŁUPSKA, R. (2021). Bioactive components, volatile profile and *in vitro* antioxidative properties of *Taxus baccata* L. red arils. *Molecules*, 26(15), 4474.