

# TEZĂ DE DOCTORAT

Efectul modulator al unor produși naturali în terapia fotodinamică a tumorilor experimentale

## Rezumat

Doctorand **István-Péter Laszló**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Adriana Mureșan**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>13</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>15</b>
<b>1. Stadiul actual al cunoașterii</b>	<b>17</b>
1.2. Definiții de bază și metode de tratament ale cancerului	17
1.2. Terapia fotodinamică	18
1.2.1. Scurt istoric	18
1.2.2. Definiția terapiei fotodinamice și principiul de tratament	20
1.2.3. Componentele fotochimice și principiile terapiei fotodinamice	22
1.2.4. Mecanismele de acțiune ale terapiei fotodinamice	26
1.2.5. Mecanismele vasculare	27
1.2.6. Mecanismele imunologice	27
1.2.7. Fotosensibilizatorii - elementele cheie ale terapiei fotodinamice	28
1.2.8. Potențiali fotosensibilizatori naturali cu aplicații în terapia oncologică	31
1.2.9. Curcumina	32
1.2.10. Resveratrolul	34
1.2.11. Fructul de Cornus mas	37
1.2.12. Avantajele și dezavantajele terapiei fotodinamice în cancer	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>41</b>
<b>1. Ipoteza de lucru</b>	<b>43</b>
1.1. Obiective	43
1.1.1 Generale	43
1.1.2 Specifice	43
<b>2. Metodologia generală a cercetării</b>	<b>45</b>
<b>3. Studiu 1. Efectele modulatorie in vivo ale extractului natural de Cornus mas asupra terapiei fotodinamice in tumori experimentale la șobolani Wistar</b>	<b>51</b>
3.1. Introducere	51
3.2. Obiective	52
3.3. Material și metode	52
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	68
<b>4. Studiu 2. Efectele asocierii Curcuminei la terapia fotodinamică în tumori experimentale</b>	<b>71</b>
4.1. Introducere	71
4.2. Obiective	72
4.3. Material și metode	72

4.4. Rezultate	74
4.5. Discuții	84
4.6. Concluzii	86
<b>5. Studiu 3. Efectele modulatorie in vivo ale Resveratrolului asupra terapiei fotodinamice cu TSPP în tumori experimentale</b>	<b>87</b>
5.1. Introducere	87
5.2. Obiective	88
5.3. Material și metode	88
5.4. Rezultate	90
5.5. Discuții	100
5.6. Concluzii	103
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>105</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>107</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>109</b>

## **Cuvinte cheie**

Terapie fotodinamică, cancer, curcumină, resveratrol, Cornus mas, specii reactive de oxigen, carcinosarcom Walker, apoptoză, stres oxidativ.

## **Stadiul actual al cunoașterii**

La ora actuală, la nivel mondial, cancerul reprezintă una dintre cele mai frecvente boli, atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, fiind caracterizată prin creșterea necontrolată a celulelor și dezvoltarea celulelor anormale, din cauza modificărilor genetice sau a expunerii la substanțe cancerigene. Mutația celulelor normale duce la proliferarea celulară anormală, astfel că se dezvoltă tumora, care poate să fie benignă, premalignă (necanceroasă) sau malignă (canceroasă).

Cancerul cunoscut sub denumirea științifică de tumoră malignă sau neoplasm malign, reprezintă o denumire generică, pentru un grup de boli ce implică dezvoltarea anormală a celulelor cu potențial de a invada sau a se răspândi în alte părți ale corpului, prin sânge sau prin sistemul limfatic, literatura de specialitate descriind mai multe tipuri de cancer.

În prezent, în tratamentul cancerului sunt utilizate chirurgia, radioterapia și chimioterapia, fie ca monoterapie, fie ca tratamente combinate dar, cu toate acestea, tratamentele determină frecvent efecte secundare redundante.

Pentru a depăși natura multifactorială a acestei boli se iau în considerare strategiile care prevăd administrarea terapiei complexe (amestecuri de medicamente) sau a terapiei combinate, respectiv medicamente în raport de dozare fixă, care vizează diferite ținte cu scopul de a obține un efect sinergic reducând rezistența la medicamente.

## **Sinteza contribuției personale**

### **Studiu 1. Efectele modulatorie in vivo ale extractului natural de Cornus mas asupra terapiei fotodinamice în tumori experimentale la șobolani Wistar**

1. În experimentul nostru, terapia fotodinamică a generat stres oxidativ, apărare antioxidantă endogenă redusă și răspuns inflamator.
2. Administrarea extractului de Cornus mas a indus o creștere a expresiei NOS2 și o scădere a expresiei COX-2 în carcinosarcomul Walker.
3. Tratamentul cu extract de Cornus mas înainte de administrarea TFD a indus reacții inflamatorii mai intense, leziuni ADN mai numeroase și apoptoză semnificativ crescută, comparativ cu administrarea după TFD.
4. Datele obținute de noi în acest studiu sugerează că tratamentul combinat a dus la activarea unor mecanisme diferite ce duc la moarte celulară: inflamație, leziuni ADN și apoptoză.
5. Momentul administrării extractului natural din fructe de corn, în raport cu TFD în regimul combinat, este extrem de important și reprezintă un punct cheie în designul unui tratament antitumoral eficient.

### **Studiu 2. Efectele asocierii Curcuminei la terapia fotodinamică în tumori experimentale**

1. Administrată asociat terapiei fotodinamice, în special anterior acesteia, curcumina a determinat creșterea capacității celulare antioxidante în tumoră
2. Adăugată la TFD, indiferent de secvența de administrare, CUR a scăzut inflamația tumorală și stresul oxidativ și nitrosativ indus de TFD.

3. Curcumina a dus la creșterea apoptozei și necrozei în țesutul tumoral, în special când a fost administrată după TFD.
4. Rezultatele noastre confirmă efectul potențial antitumoral al curcuminei, ca și cel de modulare a efectelor TFD, în special în administrare ulterioară acesteia.

### **Studiu 3. Efectele modulatoare in vivo ale *Resveratrolului* asupra terapiei fotodinamice cu TSPD în tumori experimentale**

1. Administrarea RES a redus generarea de specii reactive de oxigen și a crescut capacitatea antioxidantă endogenă, mai ales în administrarea anterioară terapiei fotodinamice.
2. Adiția RES la TFD a redus inflamația tumorală și expresia COX2 și NOS2, indiferent dacă a fost administrat înainte sau după TFD.
3. Administrate separat, atât RES cât și TFD au indus un înalt nivel de apoptoză.
4. Combinarea RES cu TFD nu a fost urmată de creșterea indexului apoptotic, sugerând că alte mecanisme ar putea fi implicate în efectul antitumoral (interferența cu autofagia, perturbarea homeostaziei reticulului endoplasmic).

### **Concluzii generale**

1. Terapia fotodinamică (TFD) a generat stres oxidativ, apărare antioxidantă endogenă redusă și răspuns inflamator în tumora Walker.
2. Extractul de *Cornus mas* a modulat dezechilibrul redox indus de TFD, a indus reacții inflamatorii, leziuni ADN și apoptoză în țesutul tumoral, efecte a căror intensitate a fost semnificativ mai mare în cazul administrării extractului anterior efectuării TFD.
3. Curcumina asociată TFD a exercitat efecte modulatoare asupra acesteia de o manieră variabilă în funcție de tipul de efect și de secvențialitatea asocierii: a indus creșterea capacității antioxidante în tumoră atunci când a precedat TFD, a determinat creșterea semnificativă a apoptozei și necrozei în administrare ulterioară TFD și a indus scăderea stresului oxidativ și nitrosativ indiferent de cronologia administrării.
4. Resveratrolul administrat anterior TFD a redus stresul oxidativ și a crescut capacitatea antioxidantă endogenă. De asemenea, a diminuat inflamația tumorală dar acest efect a fost independent de secvențialitatea administrării. Combinarea sa cu TFD nu a determinat creșterea apoptozei, date ce pledează pentru efectul sau protector pentru celulele tumorale.

5. Administrarea de compuși naturali fotosensibilizatori (FS) asociat terapiei fotodinamice a modulat efectele acestora de o manieră și amplitudine specifice fiecărui agent FS.
6. Adăugarea agenților FS la TFD a dus la activarea unor mecanisme implicate în moartea celulară (leziuni ADN, apoptoză, inflamație), într-un mod specific fiecăruia dintre ei și cu o magnitudine variabilă în funcție de momentul administrării în raport cu TFD.
7. Rezultatele confirmă potențialul antitumoral al acestor compuși și efectul lor de potențare a terapiei fotodinamice, în special pentru Curcumină și Curcumina, confirmând importanța lor ca adjuvanți în tratamentul tumorilor maligne. Rezultatele obținute oferă premise pentru inițierea și desfășurarea de studii și trialuri clinice care să investigheze eficiența și securitatea lor în cancer.
8. În regimul combinat, momentul administrării compușilor naturali FS în raport cu TFD este foarte important și reprezintă un punct cheie, în designul unui tratament antitumoral eficient.

## **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Cancerul reprezintă o problemă importantă de sănătate publică în România și la nivel global, prin incidența crescută, gravitatea și prognosticul adesea nefavorabil. Modalitățile de tratament și agenții antitumorali utilizați sunt în continuă creștere și diversificare dar, în ciuda progreselor științifice, tehnologice și terapeutice, boala canceroasă continuă să aibă un prognostic infaust. Pe de o parte unele tumori sunt refractare la tratamentele standard și alte opțiuni terapeutice, iar pe de altă parte invazivitatea multora dintre terapii face ca o parte importantă a supraviețuitorilor să prezinte sechele și o calitate a vieții scăzută. Identificarea de noi metode terapeutice în oncologie, eficiente și cu toxicitate redusă, este prin urmare o necesitate stringentă. Cercetarea noastră se adresează unei metode neinvazive, terapia fotodinamică (TFD), care, în ultimele decenii și-a lărgit spectrul aplicațiilor clinice și în tumori maligne, datorită capacității de a induce distrucție tumorală. Eficiența ei în tumorile solide este însă limitată de anumite caracteristici specifice: grad redus de selectivitate tumorală, penetrație limitată în țesuturi, dependența de oxigen. Ca urmare, se impune identificarea unor modalități de optimizare a TFD. O direcție promițătoare în acest sens este utilizarea de compuși cu acțiune de fotosensibilizare a celulelor țintă, care să

potențeze acțiunea TFD. Teza de față prezintă rezultatele studiilor ce au evaluat asocierea a 3 compuși naturali, administrați în diferite secvențialități, cu terapia fotodinamică în tumorile experimentale Walker. Originalitatea tezei constă în abordarea complexă a acestor asocieri. Dincolo de identificarea unui posibil efect aditiv sau sinergic al asocierii, am investigat multiple mecanisme de acțiune și molecule implicate în acestea, ca și modalitatea optimă de asociere din punct de vedere al dozelor și secvențialității. În cazul unora dintre acești compuși (cum este spre exemplu Cornus mas investigat de noi), pentru care există un număr redus de studii în patologia malignă și mecanismele moleculare de acțiune sunt încă neclarificate, descifrarea lor ar face posibilă combinarea judicioasă cu TFD. De asemenea, din cunoștințele noastre, datele privind importanța factorului timp, respectiv identificarea momentului optim de administrare a FS în raport cu TFD, sunt extrem de sărace și sunt puține studii care să investigheze din punct de vedere metronomic eficiența asocierilor. Studiul reprezintă astfel un pas înainte în identificarea beneficiului real și a modalității optime de administrare a acestei terapii combinate în tumori solide. Rezultatele obținute își găsesc utilitate atât științifică cât și practică, prin furnizarea de informații privind particularitățile modului de acțiune – interacțiune a agenților studiați cu TFD, precum și prin exploatarea datelor pentru elaborarea în continuare a unor trialuri clinice de calitate în diferite localizări tumorale. Ca finalitate, translația în clinică va lărgi spectrul modalităților de tratament într-o boală atât de gravă și frecventă cum este cancerul, pentru situațiile și la pacienții cu indicații pentru acest tip de terapie. Având marele avantaj al absenței sau lipsei de toxicitate, TFD asociată cu administrarea de agenți naturali se înscrie în arsenalul de măsuri ce cu siguranță pot ameliora raportul terapeutic: distrucție tumorală maximă, cu toxicitate minimă la nivelul țesuturilor sănătoase. Dincolo de impactul științific și clinic, această terapie, aplicată în situațiile în care își găsește indicație, va avea și un impact economic și social important, datorită costurilor scăzute în raport cu alte modalități terapeutice în oncologie și datorită prezervării unei bune calități a vieții pacienților, prin lipsa efectelor adverse.

# The modulatory effects of certain natural products on photodynamic therapy in experimental tumors

## Summary

PhD Student **István-Péter Laszló**

Scientific supervisor Prof.dr. **Adriana Mureşan**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



# SUMMARY

<b>INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>15</b>
<b>1. Current state of knowledge</b>	<b>17</b>
1.2. Basic definitions and cancer treatment methods	17
1.2. Photodynamic therapy	18
1.2.1. Brief history	18
1.2.2. Definition and principles of treatment of photodynamic therapy	20
1.2.3. Photochemical components and principles of photodynamic therapy	22
1.2.4. Action mechanisms of photodynamic therapy	26
1.2.5. Vascular mechanisms	27
1.2.6. Immunological mechanisms	27
1.2.7. Photosensitizers – key elements of photodynamic therapy	28
1.2.8. Potential natural photosensitizers with applications for oncological therapy	31
1.2.9. Curcumin	32
1.2.10. Resveratrol	34
1.2.11. The Cornus mas fruit	37
1.2.12. Advantages and disadvantages of photodynamic therapy in cancer	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>41</b>
<b>1. Working hypothesis</b>	<b>43</b>
1.1. Objectives	43
1.1.1 General objectives	43
1.1.2 Specific objectives	43
<b>2. General research methodology</b>	<b>45</b>
<b>3. Study 1. The in vivo modulatory effects of Cornus mas natural extract on photodynamic therapy in experimental tumors of Wistar rats</b>	<b>51</b>
3.1. Introduction	51
3.2. Objectives	52
3.3. Material and methods	52
3.4. Results	55
3.5. Discussion	66
3.6. Conclusion	68
<b>4. Study 2. The effects of associating Curcumin with photodynamic therapy in experimental tumors</b>	<b>71</b>
4.1. Introduction	71
4.2. Objectives	72

4.3. Material and methods	72
4.4. Results	74
4.5. Discussion	84
4.6. Conclusion	86
<b>5. Study 3. The in vivo modulatory effects of Resveratrol on photodynamic therapy with TSSP in experimental tumors</b>	<b>87</b>
5.1. Introduction	87
5.2. Obiectives	88
5.3. Material and methods	88
5.4. Results	90
5.5. Discussion	100
5.6. Conclusion	103
<b>6. General conclusions</b>	<b>105</b>
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>107</b>
<b>REFERECES</b>	<b>109</b>

## Key words

Photodynamic therapy, cancer, curcumin, resveratrol, Cornus mas, reactive oxygen species, Walker carcinosarcoma, apoptosis, oxidative stress.

## Current state of knowledge

Cancer is currently one of the most frequently encountered diseases worldwide, both in developed as well as in developing countries and it is characterized by uncontrolled cell growth and the development of abnormal cells due to genetic changes or exposure to carcinogens. Normal cell mutations lead to abnormal cell proliferation, followed by the development of tumors, which can be benign, premalignant (non-cancerous) or malignant (cancerous).

Cancer, scientifically known as a malignant tumor or malignant neoplasm, is a generic name used for a group of diseases involving the abnormal development of cells with the potential to invade or spread to other parts of the body through the blood or lymphatic system, whereby several types of cancer are described in the literature.

Today, surgery, radiotherapy and chemotherapy are used in the treatment of cancer, either as monotherapy or as combination therapies. However, these treatments frequently cause redundant side effects.

Strategies involving the administration of complex therapy (mixing drugs) or combination therapy, namely fixed dose combinations having various targets, with the aim of achieving a synergistic effect by reducing drug resistance are being considered to overcome the multifactorial nature of this disease.

## **Synthesis of personal contribution**

### **Study 1. The in vivo modulatory effects of the *Cornus mas* natural extract on photodynamic therapy in experimental tumors of Wistar rats**

1. In our experiment, photodynamic therapy generated oxidative stress, reduced endogenous antioxidant defense and inflammatory response.
2. The administration of the *Cornus mas* extract induced increased NOS2 expression and decreased COX-2 expression in Walker carcinosarcoma.
3. The treatment with *Cornus mas* extract prior to the administration of PDT led to more intense inflammatory responses, a higher number of DNA lesions and significantly increased apoptosis compared to the administration after PDT.
4. The data obtained by us in this study suggest that the combination treatment resulted in the activation of different mechanisms leading to cell death: inflammation, DNA lesions and apoptosis.
5. The time of administration of the natural Cornelian cherry fruit extract in the context of combined PDT is extremely important and a key component in designing an effective anti-tumoral treatment.

### **Study 2. The effects of associating *Curcumin* with photodynamic therapy in experimental tumors**

1. When administered in combination with photodynamic therapy, especially prior to it, curcumin led to increased antioxidant cellular capacity in the tumor.
2. Added to PDT, regardless of the administration sequence, curcumin decreased tumor inflammation and PDT-induced oxidative and nitrosative stress.

3. Curcumin led to increased apoptosis and necrosis in the tumor tissue, especially when administered after PDT.
4. Our results confirm the potentially anti-tumoral effect of curcumin, as well as that of modulating PDT effects, especially in post PDT administration.

### **Study 3. The in vivo modulatory effects of *resveratrol* on photodynamic therapy with TSSP in experimental tumors**

1. RES administration reduced the production of reactive oxygen species and increased the endogenous antioxidant capacity, especially when administered before the photodynamic therapy.
2. Adding RES to PDT reduced tumor inflammation and COX2 and NOS2 expression, whether administered before or after PDT.
3. Administered separately, both RES and PDT induced high levels of apoptosis.
4. Combining RES with PDT did not lead to an increased apoptotic index, which suggests that other mechanisms might be involved in the antitumor effect (interference with autophagy, disruption of endoplasmic reticulum homeostasis).

### **General conclusions**

1. Photodynamic therapy (PDT) generated oxidative stress, reduced endogenous antioxidant defense and inflammatory response in the Walker tumor.
2. The Cornus mas extract modulated the PDT-induced redox imbalance, induced inflammatory responses, DNA lesions and apoptosis in the tumor tissue. The intensity of these effects was significantly greater when the extract was administered before PDT.
3. Curcumin associated with PDT exerted variable modulatory effects on PDT. Depending on the type of effect and sequentiality in the course of association: it induced increased antioxidant capacity in the tumor in pre-PDT administration, it significantly increased apoptosis and necrosis in post-PDT administration and induced decreased oxidative and nitrosative stress regardless of administration chronology.
4. Resveratrol administered before PDT reduced oxidative stress and increased the endogenous antioxidant capacity. It also decreased tumor inflammation, but this effect was independent of the sequence of administration. When combined with PDT it did not increase apoptosis, which speaks for its protective effect on tumor cells.

5. The administration of natural photosensitizers in combination with photodynamic therapy modulated its effects in a manner and to an extent specific to each natural photosensitizing agent.
6. The addition of photosensitizing agents to PDT resulted in the activation of mechanisms involved in cell death (DNA damage, apoptosis, inflammation) in a manner specific to each of these and with variable magnitude depending on the time of administration in relation to PDT.
7. The results confirm the antitumor potential of these compounds and their potentiating effect on photodynamic therapy, especially for Cornus mas and Curcumin, confirming their importance as adjuvants in the treatment of malignant tumors. The results obtained provide the basis for initiating and conducting studies and clinical trials investigating their efficacy and safety in cancer.
8. In combination therapy, the time of administration of the natural photosensitizing agents in relation to PDT is very important and represents a key component in designing an effective antitumor treatment.

## **Originality and innovative contributions of the thesis**

Cancer represents an important public health issue in Romania and worldwide, given its increased incidence, severity and often poor prognosis. The treatment methods and anti-tumor agents used are constantly developing and diversifying but, despite scientific, technological and therapeutic advances, cancer continues to have a poor prognosis. On the one hand, some tumors don't respond to standard treatments and other therapeutic options, and on the other hand, the invasive nature of many of these therapies results in a significant proportion of survivors experiencing sequelae and poor quality of life. The identification of new, effective and low-toxicity therapeutic methods in oncology is therefore a pressing need. Our research addresses a non-invasive method, photodynamic therapy (PDT), which in recent decades has broadened its spectrum of clinical applications to malignant tumors, due to its ability to induce tumor cell destruction. However, its effectiveness in solid tumors is limited by certain specific features: low tumor selectivity, limited tissue penetration, dependence on oxygen. Therefore, it is required to identify ways to optimize PDT. A promising direction in this regard is the use of compounds with photosensitizing action on target cells to enhance the effects of PDT. This thesis presents the results of studies assessing the

association of 3 natural compounds, administered in different time sequences with photodynamic therapy in experimental Walker tumors. The originality of the thesis lies in the complex approach of these associations. Beyond the identification of a possible additive or synergistic effect of the association, we investigated multiple mechanisms of action and molecules involved, as well as the optimal means of association in terms of dosage and sequentiality. For some of these compounds (like for instance *Cornus mas*, which we investigated), analyzed only in a small number of studies, malignant pathology and molecular mechanisms of action are still unclear, whereby deciphering them would make their unprejudiced combination with PDT possible. Also, to the best of our knowledge, data on the importance of timing, namely the identification of the optimal time of administration of photosensitizing agents in relation to PDT, is extremely poor and there are only very few studies on the efficacy of such associations in metronomic therapies. Therefore, studies represent a step forward in identifying the real benefits and best means of administration of this combination therapy in solid tumors. The results obtained show both scientific and practical benefits, by providing specific information on the action and interaction of the agents studied with PDT, as well as by using the data to further develop high-quality clinical trials for various tumor locations. As an end result, putting this into clinical practice will broaden the spectrum of treatment possibilities for a disease as serious and common as cancer, in situations and patients with indications for this type of therapy. Holding the great advantage of absence or lack of toxicity, PDT associated with the administration of natural agents is part of the set of measures that can certainly improve therapeutic ratio: maximum tumor cell destruction with minimum healthy tissues toxicity. In addition to its scientific and clinical impact, this therapy applied where indicated, will also have a significant economic and social impact given the low costs compared to other therapeutic options in oncology and the ability to maintain a good quality of the patient's life through the lack of side effects.