

**VALORIFICAREA REZIDUURILOR DIN
VINIFICATIE CA ADITIVI ALIMENTARI SI
ANTIOXIDANTI IN INDUSTRIE**

**SINERGISME DE ACTIUNE BIOLOGICA „IN VITRO” IN
PROCESE PROLIFERATIVE CUTANATE CU
APLICABILITATE IN DEZVOLTAREA DE BIOPRODUSE**

Director proiect : CS I, Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu



**Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din
Romania**

RAPORT FINAL – decembrie 2018

Drd. Adil Abdi 

CUPRINS

INTRODUCERE

CAPITOLUL I: MECANISME CELULARE SI MOLECULARE IMPLICATE IN PROGRESIA MELANOMICA

CAPITOLUL II: MODELE EXPERIMENTALE DE EVALUARE A PROGRESIEI MELANOMICE– exemplificare linia celulara B16-F10 (melanom murinic)

- II.1 Model experimental de evaluare a melaninei ca parametru indicator al malignizarii
- II.2 Model experimental de evaluare a indicatorilor de invazivitate: metaloproteinaze (MMP 2 SI 9), VEGF, IL6
- II.3 Model experimental de evaluare a statusului proliferativ si apoptotic in melanom **in conditiile iradierii UV**

CAPITOLUL III: STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTUL EXTRACTULUI BIOACTIV DE STRUGURI (TES) ASOCIAT CU EXTRACTUL DE TRIFOI ROSU (ET) ASUPRA MECANISMELOR IMPLICATE IN PROGRESIA MELANOMICA

- III.1 Evaluarea parametrilor de invazivitate si malignizare in celule de melanom murin B16-F10
- III.2 Modularea statusului proliferativ si inducerea apoptozei in celule de melanom murin in conditii de iradiere UV

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

Studiile experimentale isi propun la finalul acestui proiect sa aprofundeze si sa consolideze activitatea biologica demonstrata in etapele anterioare pentru extractul de struguri obtinut din deseuri de vinificatie, singular si asociat cu extractul de trifoi rosu.

Conceptul experimental se va directiona catre mecanisme celulare si moleculare correlative ce pot sustine efectul antioxidant si antiinflamator la nivel cutanat, cu proiectie in afectiuni grave caracterizate de dereglari hiperproliferative (melanom malign).

Premisele stiintifice care au condus la selectia acestei adresabilitati terapeutice au constat in date de literatura relevante pentru actiunea extractelor vegetale avand compozitie similara (polifenoli, resveratrol, fitoestrogeni, etc) ca protector celulari si modulatori ai disfunctiilor cutanate, confirmate si completate de rezultate concrete obtinute pe linii celulare relevante (keratinocit – HaCaT, fibroblast – HS27, melanoma murin –B16-F10).

Mecanismele tinta pe care ne propunem sa le studiem in completarea profilului citotoxicitate / eficacitate sunt:

- **Melanina** ca parametru indicator al **malignizarii**
- **Invazivitate tumorală** exprimata prin activitatea metaloproteinazelor (MMP 2 si MMP 9), semnalizare inter-celulara prin factorul pro-angiogenic VEGF, si citokina IL6.
- Status **proliferativ si pro-apoptotic** in melanom **in conditiile iradierii UV**

Acestea vor definitiva o prima etapa in dezvoltarea de produs topic, etapa de testare “in vitro”, definitiva pentru aplicatiile medicale ulterioare ce vor conduce la valorificarea superioara a deseurilor de vinificatie si exploatarea potentialului fitoterapeutic din flora indigena.

CAPITOLUL I: MECANISME CELULARE SI MOLECULARE IMPLICATE IN PROGRESIA MELANOMICA

Cancerle de piele sunt cele mai frecvent diagnosticate afecțiuni maligne la pacienții caucazieni la nivel mondial, în timp ce incidența lor continuă să crească datorită expunerii crescute la radiațiile ultraviolete (UV), aceasta caracterizându-se printr-un dezechilibru între apoptoza prea mică sau prea multă proliferare celulară și supraviețuirea celulelor în epidermă [1]. Unul dintre cei mai importanți factori de pronostic la pacienții fără metastaze, reprezintă grosimea tumorii și gradul de invazie. Mai nou, a devenit mai clară necesitatea unui model multifactorial pentru identificarea progresiei tumorale. Diseminarea celulelor tumorale, reprezintă principala cauză a mortalității pacienților. Invazia celulelor tumorale, precum și formarea metastazelor sunt procese complexe, în care celulele tumorale distrug membrana bazală și migrează în țesutul conjunctiv, intravasează în canalele limfatice și vasele mici, și în final formează o tumoră secundară [2].

Ca urmare, membrana bazală și matricea extracelulară (ECM) oferă un micromediu pentru celule, a căror degradare, la rândul lor, poate elibera și să activeze citokinele legate de ECM și fragmentele ECM care modulează creșterea celulelor, migrarea și angiogeneza. Prin urmare, elucidarea modului în care membrana bazală și ECM se degradează este un punct esențial pentru înțelegerea migrării celulelor canceroase, invazia și formarea metastazelor [3].

Deși radiația UV este principala cauză a cancerului de piele, alți agenți cauzali includ viruși, mutageni în produsele alimentare, mutageni în substanțe chimice și susceptibilitate genetică. Cancerul de piele poate fi prevenit prin controlul sau eliminarea acestor agenți cauzali și poate fi îndepărtat eficient prin împiedicarea aprovizionării cu sânge a tumorii (anti-angiogeneza), care împiedică creșterea tumorală și crește rata de supraviețuire a pacientului. Majoritatea celulelor canceroase dezvoltă modalități de evitare a apoptozei sau prezintă mecanisme de apoptoză defectă, permițând astfel dezvoltarea necontrolată a celulelor.

Principalele probleme care există cu agenții chimioterapeutici sunt efectele adverse severe și formarea rezistenței organismului la mai multe medicamente. Au fost încercate diferite strategii pentru depășirea rezistenței la medicamente, cum ar fi utilizarea nanoparticulelor, lipozomilor și vehiculelor de eliberare miceliară a medicamentelor, cu unele succese raportate [4].

Efectele adverse ale chimioterapiei de cancer pot fi tratate simptomatic, dar în unele cazuri astfel de tratamente secundare pot fi foarte toxice, ceea ce este inacceptabil pentru unii pacienți cu cancer. A existat un interes tot mai mare în utilizarea medicamentelor complementare și alternative, datorită dezavantajelor asociate cu chimioterapia cancerului convențional și presupuselor avantaje ale opțiunilor mai naturale de tratament. Compușii fitochimici din extracte de rădăcini, bulbi, scoarțe, frunze, tulpini de plante și altele au arătat potențial promițător ca medicamente anti-cancer sau pentru a servi drept compuși de legatură în sinteza de noi medicamente. Acestea sunt adesea utilizate ca medicamente tradiționale sub formă de tincturi de uz casnic, ceaiuri sau extracte brute. Dezavantajele produselor naturale și medicamentelor tradiționale includ variații în metodele de preparare și prin urmare, de

asemenea, compoziția chimică, determinarea și ajustarea dozelor și calea adecvată de administrare [5].

1. Melanina – sinteza, rol fiziologic in dezvoltarea melanomului cutanat

Cancerul de piele a devenit cel mai frecvent neoplasm în majoritatea tarilor, cauzat în principal de activitățile prelungite în aer liber. Melanomul cutanat, este una dintre cele mai frecvente tumori maligne ce apare în rândul tinerilor, fiind caracterizat prin capacitatea mare de invazie și metastazare [6]. Pielea este cel mai mare organ al corpului, constituind aproximativ 16% din masa corporală. Pielea este organizată în două straturi principale, epiderma și dermul, care împreună sunt compuse din straturile epiteliale, mezenchimale, glandulare și neurovasculare. Epiderma, de origine ectodermică, este stratul exterior și servește ca punct de contact al organismului cu mediul. Ca atare, caracteristicile biologice și fizice epidermice joacă un rol enorm în rezistența la factorii de stres din mediu, cum ar fi agenții patogeni infecțioși, agenții chimici și radiația UV [7].

Keratinocitele sunt cele mai abundente celule din epidermă și se caracterizează prin exprimarea de citokeratine și formarea de desmosomi și joncțiuni strânse între ele pentru a forma o barieră fizico-chimică eficientă. Derma, derivată din mezoderm, stă la baza epidermei și cuprinde structuri cutanate, incluzând foliculii de păr, nervii, glandele sebacee și glandele sudoripare. Derma conține, de asemenea, celule imune și fibroblasti, care participă activ la multe răspunsuri fiziologice ale pielii. Epiderma, delimitată de la nivelul dermei de către o membrană bazală, este organizată în straturi funcționale definite în mare măsură prin caracteristicile keratinocitelor, cum ar fi mărimea, forma, nucleația și expresia keratinei [8].

Keratinocitele epidermice formate ca urmare a diviziunii celulare de către celulele stem din stratul bazal suferă o diferențiere programată pe măsură ce migrează către suprafața pielii spre exterior pentru a forma în cele din urmă corneocite, care sunt strâns legate, dar sunt celule intacte care formează bariera principală a stratului epidermal exterior.

Pe lângă crearea unei bariere fizice foarte eficiente, keratinocitele acumulează pigmenți de melanină pe măsură ce se maturizează, iar melanina epidermică funcționează pentru a bloca pătrunderea radiațiilor UV în piele. Deși melanina poate fi găsită în abundență în keratinocitele epidermale, ea nu este fabricată în aceste celule. Mai degrabă, sinteza melaninei este limitată la melanocit, care este derivat din creasta neurală și reprezintă a doua cea mai abundentă celulă din epidermă. De fapt, melanocitele se găsesc atât în dermă cât și în epidermă. Melanocitele epidermice sunt în general poziționate în stratul bazal deasupra membranei bazale. Melanocitele se regăsesc, de asemenea, în foliculii de păr pentru a conferi pigment părului nativ. Melanocite dermale pot fi găsite în nevi [9]. Deoarece melanocitele sunt singura sursă de pigment în piele, defectele pigmentare moștenite, cum ar fi albinismul, au tendința de a fi cauzate de defectele genetice melanocitare. Prin extensiile dendritice, melanocitele pot intra în contact intim cu cel puțin cincizeci de keratinocite învecinate în ceea ce este cunoscut ca o unitate de melanină-epidermică [10].

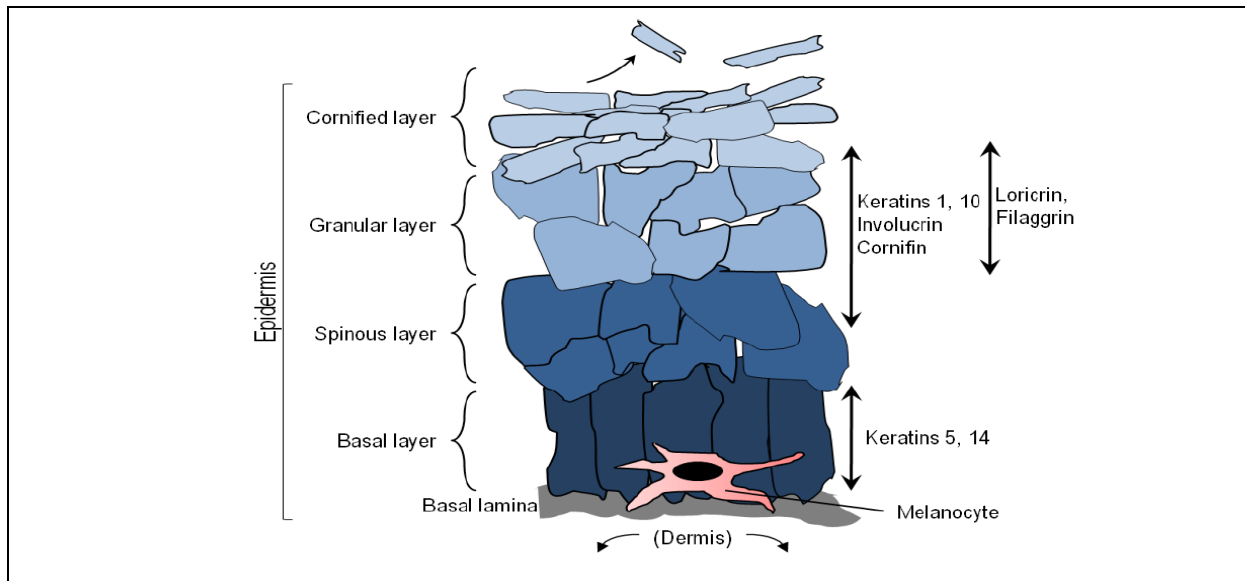


Fig. 1: Structura epidermică și diferențierea keratinocitelor [10]

Există multe interacțiuni dependente de contact și paracrine care apar între keratinocitele și melanocitele din unitatea de melanină epidermică. Pigmentul obținut de melanocite este transferat la keratinocitele adiacente în organele celulare denumite melanozomi prin dendritele melanocitare. Cantitatea și tipul melaninei epidermice este principalul factor care determină aspectul pielii și sensibilitatea la radiații UV. Melanina este un bio-agregat mare compus din subunități de diferite specii de pigmenți formate prin oxidarea și ciclizarea aminoacidului tirozina. Intermediarii melanogenezei pot avea roluri importante de reglementare în piele. Melanina există în două forme chimice principale: (1) eumelanina, un pigment întunecat exprimat abundent în pielea persoanelor cu pigmentare puternică și (2) fenomelanina, un pigment sulfatat de culoare deschisă, rezultat din încorporarea cisteinei în precursori de melanină. Eumelanina este mult mai eficientă la blocarea fotonilor UV decât fenomelanina, astfel cu cât există o cantitate mai mare de eumelanină în piele, cu atât radiația UV este mai puțin permeabilă la nivelul epidermei [11].

Sinteza melaninei, o cale multiplă și foarte bine reglată, reprezintă o funcție diferențiată majoră a melanocitelor normale și maligne. Deși principala funcție a melaninei este de a proteja împotriva leziunilor induse de UV, pigmentul de melanină poate regla și homeostazia epidermică și astfel poate afecta comportamentul melanomului. Recent, Sarna și colab. [12] au început să testeze ipoteza că pigmentul de melanină poate afecta comportamentul celulelor de melanom *in vitro*, arătând că prezența pigmentului de melanină a afectat proprietățile elastice ale celulelor, precum și abilitățile de transmigrație, iar efectele inhibitorii sunt de natură mecanică. Ei au propus ipoteza că elasticitatea celulelor joacă un rol cheie în eficiența răspândirii celulelor melanomice *in vivo* și se așteaptă ca rezultatele lor să contribuie la o mai bună înțelegere a procesului de metastază a melanomului malign. Efectul mecanic (fizic) al încărcării celulelor de melanom cu granule de melanină poate atenua mișcarea melanocitelor maligne spre calea metastatică. Acest lucru ar fi de așteptat pentru melanoamele din stadiul 1 care sunt localizate în epidermă și dermă. Cu toate acestea, alți

parametri, cum ar fi proliferarea celulelor, modificările în citoscheletul celular și motilitatea trebuie să fie investigate în continuare.

Analiza cantitativă a conținutului de melanină în celulele de melanom, obținute de la pacientii cu melanom diagnosticat ar putea facilita determinarea simplă și precisă a fenotipului metastatic celular. Celulele care conțin mai multe granule de melanină ar indica probabil un potențial invaziv mai scăzut. Acest lucru, împreună cu existența metodelor de diagnostic, ar putea duce la un diagnostic al melanomului mai complet. Un astfel de diagnostic ar putea evalua mai bine riscul de a dezvolta tumori metastatice, ajutând la utilizarea unui tratament optimizat.

Este bine cunoscut faptul că conținutul de melanina este variabil în diferite tipuri de melanoame, melanoamele fiind evaluate ca "profund", "puternic", "ușor" pigmentat sau amelanotic. Brozyna și colab. [13] a demonstrat că melanoamele amelanotice au un răspuns mai bun la radioterapie decât cele cu conținut mai mare de melanină. S-a arătat că la subiecții umani, melanomul cu dezvoltare rapidă (asociat de obicei cu un prognostic mai rău) conține un procent mai mare de celule amelanotice. În plus, a fost descrisă recent relația dintre rata mitotică și lipsa de pigment în melanom [14].

Efectele estrogenice în melanocite nu sunt mediate de receptorii de estrogeni nucleari binecunoscuți, dar mai degrabă prin receptorul non-clasic denumit GPER (receptor cuplat cu proteine), care s-a demonstrat recent că este exprimat în melanocite. Această semnalizare non-clasică a estrogenului promovează diferențierea în melanom, inhibă proliferarea celulelor tumorale, și în mod critic, promovează un fenotip care face tumora mai sensibilă la eliminarea pe cale imuna. În concordanță cu aceasta, s-a demonstrat recent că nivelurile de proteine GPER sunt mai mari în melanomul asociat sarcinii în comparație cu melanomul de la femeile non-gravide și că expresia GPER ridicată este asociată cu indicatori favorabili de prognostic, incluzând scăderea ratei mitotice și infiltrarea limfocitelor în tumoare. Receptorul GPER este în mod normal activat de estrogen, care este mai mare la femei, în special în timpul sarcinii. Activarea GPER probabil explică de ce multe femei observă că multe zone ale pielii devin mai întunecate în timpul sarcinii. Studiile anterioare efectuate au arătat că efectele activării GPER sunt complet diferite de efectele semnalului receptorului clasic de estrogen, care este important în cancerul de sân. Cercetătorii au descoperit că melanocitele nu exprimă nici măcar receptorul clasic de estrogen și că toate efectele de estrogen au fost rezultatul GPER. În melanomul specific, odată ce GPER este activat, celula canceroasă devine mai diferențiată. Aceasta înseamnă că se divizează mai puțin frecvent, face mai mult pigment și devine mai vizibil și mai vulnerabil la sistemul imunitar natural. Acest lucru face mai greu ca cancerul să devină rezistent la imunoterapie.

2. Efectul radiației UV în progresia tumorală

Aspectul pielii este printre cei mai importanți factori determinanți ai sensibilității la UV și a riscului de cancer de piele. Determinarea dozei minime eritematoase (MED) este o metodă cantitativă de a raporta cantitatea de UV (în special UVB) necesară pentru a induce arsurile solare în piele la 24-48 de ore după expunere prin determinarea eritemului (roșeață) și a edemelor (umflăturilor) ca puncte finale. Cu cât pielea este mai deschisă la culoare, cu atât

este mai ușor ca radiatia UV să provoace inflamație (arsură la soare). MED, este, prin urmare, mai mare la persoanele cu piele închisă la culoare, deoarece este nevoie de mai multă radiatie UV pentru a "arde" o piele bogată în eumelanină. Dimpotrivă, persoanele cu piele deschisă la culoare a căror piele exprimă predominant feomelanină au valori medii scăzute. Abundența în mediul înconjurător, radiatia UV contribuie la o varietate de maladii ale pielii incluzând inflamația, îmbătrânirea degenerativă și cancerul [7].

De-a lungul timpului, oamenii au fost expuși radiațiilor ultraviolete în principal prin expunerea profesională la lumina soarelui. Cu toate acestea, expunerea la radiații UV, a crescut dramatic în ultimii ani din cauza activităților de agrement în aer liber și a bronzului intenționat în scopuri cosmetice. Fiind componente ai spectrului electromagnetic, fotonii UV se încadrează între lungimile de undă ale luminii vizibile și radiației gamma. Energia UV poate fi subdivizată în componente UV-A, -B și -C pe baza proprietăților electro-fizice, fotonii UV-C având lungimea de undă cea mai scurtă (100-280 nm) și cea mai mare energie, UV-A având cea mai lungă lungime de undă (315- 400 nm), dar cei mai puțini fotoni energetici și UV-B care se încadrează între ele. Fiecare componentă a radiației UV poate exercita o varietate de efecte asupra celulelor, țesuturilor și moleculelor.

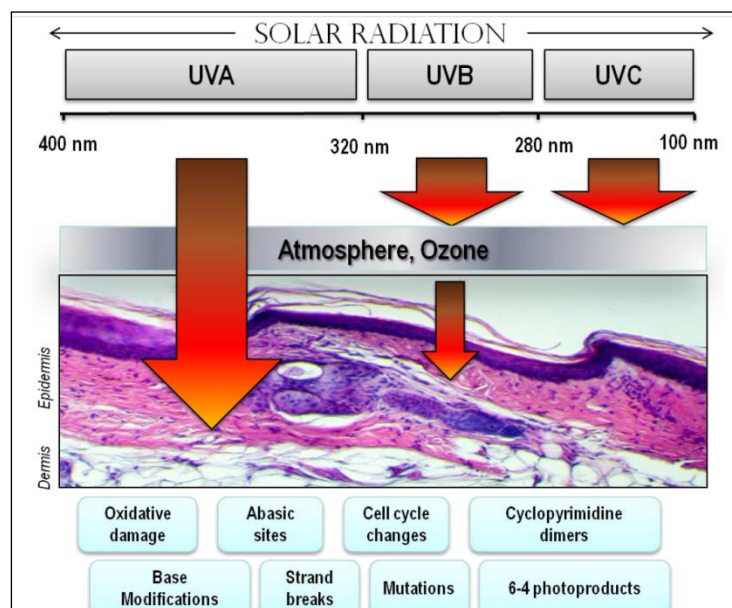


Fig. 2: Spectrul electromagnetic al radiațiilor vizibile și UV și efectele biologice asupra pielii [10].

Radiatia UV are multe efecte asupra fiziologiei pielii, unele consecințe apărând acut și altele într-o manieră întârziată. Unul dintre cele mai evidente efecte acute ale radiației UV pe piele este inducerea inflamației. UVB induce o cascadă de citokine, mediatori vasoactivi și neuroactivi în piele care împreună duc la un răspuns inflamator și cauzează arderea pielii [15].

Dacă doza de UV depășește pragul de agresiune, keratinocitele activează căile apoptotice și mor. Astfel de keratinocite apoptotice pot fi identificate prin nucleele lor

piknotice și sunt cunoscute sub denumirea de "celulele arsurilor solare". UV, de asemenea, duce la o creștere a grosimii epidermale, denumită hiperkeratoză. Prin provocarea leziunilor celulare, UV induce căile de răspuns la leziuni în keratinocite. Semnalele de distrugere, cum ar fi activarea p53, modifică profund fiziologia keratinocitelor, mediază oprirea ciclului celular, activând remodelarea ADN și apoptoza în cazul în care leziunea este suficient de mare. După câteva ore după expunerea la UV și reducerea semnalelor de răspuns la distrugere, keratinocitele epidermale proliferă robust, mediate de o varietate de factori de creștere epidermici. Creșterea diviziunii celulare a keratinocitelor după expunerea la UV conduce la acumularea de keratinocite epidermale care măresc grosimea epidermică. Hiperplazia epidermică protejează mai bine pielea împotriva penetrării UV [16].

UV reglează producția și acumularea de pigment melanina în piele. Acest răspuns fiziologic important protejează pielea împotriva deteriorării UV ulterioare, iar efectele în sunt legate de susceptibilitatea la cancer. Inflamarea pielii mediată de radiația UV este, de fapt, bifazică, cu colorarea inițială a pielii care apare din redistribuiri și/sau modificări moleculare la pigmentii de melanina epidermici existenți. Creșterile întârziate ale gradului de colorare a pielii, mediate de reglarea actuală în sinteza melaninei și transferul către keratinocite, încep de la câteva h până la zile după expunerea la UV. Melanizarea adaptivă este probabil un răspuns fiziologic complex care implică mai multe tipuri de celule cutanate care interacționează într-o varietate de moduri. Radiația UV are multe alte efecte asupra pielii, incluzând inducerea unei stări imunodepresive sau imunosupresoare și producerea de vitamina D prin conversia directă a 7-dehidrocolesterolului în vitamina D3 (colecalfiferol). Lumina soarelui, în cea mai mare parte, este un amestec de UVA și UVB, dar fiecare componentă UV poate avea efecte diferite și distincte asupra pielii. UVB, de exemplu, este un stimulent puternic al inflamației și formării de fotoleziuni la nivelul ADN (cum ar fi dimerii mutagenici ai timinei), în timp ce UVA este mult mai puțin activ în aceste zone, dar în schimb este un potențial precursor al leziunilor cauzate de radicalii liberi oxidativi asupra ADN- și alte macromolecule. Astfel, fiecare poate contribui la carcinogeneza prin mecanisme diferite [17, 18].

3. Cascade proteolitice implicate în progresia tumorală

Degradarea și remodelarea matricei extracelulare (ECM) este o etapă esențială în migrarea celulelor tumorale, invazie și metastazare. Acest proces este mediat în principal de enzimele proteolitice - matrix metaloproteinaze (MMP) [19].

Matrix metaloproteinazele (MMP) sunt o familie de endopeptidaze ce contin in situsul activ ioni de zinc, fiind inrudite din punct de vedere structural si functional. Acestea sunt secretate într-o formă inactivă (latentă), care se numește zymogen sau pro-MMP. Aceste MMP-uri latente necesită o activare înainte de a putea scinda componentele matricei extracelulare (ECM). Activitatea MMP este reglementată de mai multe tipuri de inhibitori, dintre care inhibitorii de țesut ai metaloproteinazelor (TIMP) sunt cei mai importanți. Echilibrul între MMP și TIMP este responsabil de controlul degradării proteinelor ce alcatuiesc matricea extracelulară. MMP-urile sunt implicate în remodelarea țesuturilor în timpul dezvoltării embrionare, migrarea celulelor, vindecarea rănilor și dezvoltarea dinților. În orice caz, o dereglare a echilibrului dintre MMP și TIMP este o caracteristică a diverselor

condiții patologice, cum ar fi artrita reumatoidă și osteoartrita, progresia cancerului, boli cardiovasculare acute și cronice [20].

Familia MMP umane este formată din 23 de forme diferite care sunt împărțite în șase grupuri. Pentru a clasifica MMP-urile, este esențială cunoașterea caracteristicilor lor. A fost arătat că fiecare MMP constă dintr-o secvență de domenii specifice. Această secvență include peptida semnal, domeniul propeptida, domeniul catalitic și domeniul C-terminal al hemopexinului, care sunt prezente în aproape toate MMPs. Cu toate acestea, mai multe MMPs au domenii suplimentare cum ar fi un domeniu transmembranar sau un domeniu citoplasmatic. Organizarea MMP pe domenii, împreună cu specificitatea de substrat a acestora și similitudinea secvenței, definesc clasificarea MMP. Se pot distinge șase grupuri (tabelul 1; subgrupele 1-6).

(1.) Grupul collagenazelor include MMP-1, MMP-8 și MMP-13 (54kDa). Acestea sunt în general capabile de a scindeza colagenul interstițial tip I, II și III. Collagenazele sunt, de asemenea, capabile să scindeze și alte proteine matriceale sau proteine care nu intra în structura ECM.

(2.) Grupul gelatinazelor, care constă din MMP-2 (72kDa) și MMP-9 (92kDa), în principal acționează asupra gelatinei, forma denaturată a colagenului.

(3.) Stromelizinele, MMP-3 (54kDa) și MMP-10 (57kDa), digeră componente ale ECM cum ar fi colagenul IV și fibronectina. MMP-11 este, de asemenea, numită stromelysin-3, dar secvența și specificitatea substratului sunt diferite de cele ale MMP-3 și MMP-10. Prin urmare, MMP-11 este de obicei plasată în subgrupul heterogen al MT-MMP (a se vedea subgrupul 6 - MMP transmembranare).

(4.) Matrilysinele, MMP-7 și MMP-26, care sunt clasificate diferit printre subgrupurile MMP de către alți autori. Ambele matrilysine digeră mai multe componente ale ECM, cum ar fi fibronectina și gelatina. Lipsesc C-terminal al hemopexinului prezent în toate celelalte MMP și sunt, prin urmare, de asemenea numite MMP-uri cu domeniu minim.

(5.) Matrix metaloproteinazele membranare (MT-MMP), dintre care șase forme sunt cunoscute, pot digeră un număr de proteine ECM ca gelatină, fibronectină și laminină. Mai mult, majoritatea MT-MMP-urilor pot activa pro-MMP-2.

(6.) MMP-urile rămase sunt adunate într-un subgrup heterogen datorită specificității lor substrat diferite, secvenței de aminoacizi sau organizării domeniului. Acest grup include MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 și MMP-28, care scindează substraturi cum ar fi elastina și agrecanul [21].

Activitatea MMP este reglementată la niveluri multiple, cum ar fi la nivel de transcripție genetică și sinteza de pro-MMPs. Mai mult decât atât, activarea proenzimelor și inhibarea MMP de către TIMP sunt procese de reglementare importante. MMP sunt secretate într-o formă latentă, ca proMMP, care necesită activare. În domeniul propeptidic al MMPs, un rest de cisteină (Cys73) este prezent, care funcționează ca stabilizator al proenzimei inactive. În domeniul catalitic, un situs activ cu Zn^{2+} este prezent, care formează legătură cu reziduul de cisteina. Atunci când această legătură Cys73- Zn^{2+} este intactă, MMP este inactiv. Activarea MMP-urilor implică o rupere a legăturii dintre situsul activ Zn^{2+} și reziduul de cisteina. Acest mecanism a fost menționat ca fiind "comutatorul cisteinei". O moleculă de apă apoi se leagă la ionul de Zn^{2+} și înlocuiește reziduul de cisteina după disociere. Zincul non-catalitic este apoi trecut la unul catalitic, care rezultă într-o enzimă intermediară activă. În plus, pro-

domeniul MMP este eliminat de către scindarea autolitică sau de alte proteaze. Această scindare provoacă reducerea masei moleculare și rezulta o enzimă pe deplin activă. Reducerea de masă este în general în intervalul 8-10 kDa. In vivo, MMP-urile sunt în general activate de alte proteaze. In vitro, MMP-urile sunt, de asemenea, activate de substanțe chimice și agenți fizici, cum ar fi aminofenilmerucicacetat (APMA), pH-ul scăzut și tratamentul termic.

Numeroase afecțiuni patologice sunt cauzate de întreruperea echilibrului între MMP și TIMP. MMP sunt, de asemenea, implicate în creșterea tumorală și metastazare. În aproape toate cancerurile umane, expresia MMP și activitatea sunt crescute. În cancerul de colon, în special MMP-7 este supraexprimat. Multe MMP-uri sunt implicate în remodelarea țesuturilor normale, dar, de asemenea joacă un rol în resorbția tisulară în afecțiuni patologice. Pentru a preveni degradarea țesutului de către un dezechilibru între MMP și TIMP, este important să se știe care MMP și TIMP sunt implicate în procesele specifice ale bolii [22].

În cultura de celule de melanom uman expresiile crescute ale MMP-1, MMP-2 și MMP-9 s-au dovedit a fi corelate cu migrația și invazia. În leziunile melanocitare umane s-a demonstrat o corelație pozitivă între progresia tumorii și expresia MMP-2. Creșterea expresiei MMP-9, pe de altă parte, a fost găsită în principal în faza de creștere radială a melanomului primar, indicând faptul că expresia MMP-9 se corelează cu invazia timpurie a melanomului [23].

4. Rolul VEGF în progresia tumorală

Este bine cunoscut faptul că predicția comportamentului biologic al melanoamelor maligne este dificilă pe baza criteriilor histologice. Melanomul subtire poate dezvolta metastaze și melanoamele groase pot rămâne localizate timp de mulți ani. Interacțiunea dintre tumoare și stromă este considerată critică în carcinogeneza, invazia tumorală și metastazare. Inducerea formării unor noi vase sanguine dintr-un pat vascular preexistent a fost raportată ca un parametru al valorii prognosticului potențial în tumorile solide, ceea ce poate facilita creșterea tumorală și metastazarea. Angiogeneza tumorală este controlată de o varietate de factori angiogenici. Factorul de creștere dominant care influențează angiogeneza este factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) [24].

VEGF este produs de o varietate de tipuri de celule, cuprinde șase proteine diferite, incluzând factorul de creștere placentară, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D și VEGF-ul virusului orf (VEGF-E). Se pare că joacă un rol activ în inducerea, menținerea și creșterea celulelor endoteliale vasculare. S-a demonstrat că VEGF-C și VEGF-D reglează angiogeneza limfatică [25].

Expresia VEGF este absentă în melanocite normale, dar este reglată în celulele melanomului malign. Cu toate acestea, valoarea prognostică potențială a VEGF în melanomul cutanat uman, precum și corelația cu progresia tumorii este încă nerezolvată și unele studii nu au arătat nici o valoare prognostică semnificativă pentru acest marker. Unele dintre aceste rezultate contradictorii ar putea fi explicate prin evaluările nestandardizate ale VEGF. Prezența unei relații semnificative între exprimarea VEGF și progresia tumorii în melanoamele cutanate va face VEGF o țintă bună pentru tratamentele antiangiogenice în melanomul pielii.

5. Rolul IL-6 in dezvoltarea afectiunilor maligne

Încă din 1986, de când au fost descoperite genele care codifică interleukina (IL) -6, au fost legate de ea multe funcții și efecte. Mai multe rapoarte au arătat că un dezechilibru în expresia IL-6 joacă un rol major în afecțiuni asociate bolilor inflamatorii, autoimune, obezității și rezistenței la insulină, septicemie și procesul de îmbătrânire. IL-6 este, de asemenea, implicată în carcinogeneza asociată cu afecțiuni inflamatorii. Progresia tumorală depinde parțial de prezența macrofagelor infiltrate (TAM) și există o corelație între cantități mari de TAM și un prognostic slab. O legătură între inflamație și cancer au fost suspectate de mult timp este postulat faptul că în cel puțin 15% din toate cazurile de cancer se dezvoltă inflamație cronică sau infecție. IL-6 a fost inițial identificat ca un factor de diferențiere a celulelor B, inducând celulelor B producerea de anticorpi, și a fost denumit anterior factorul 2 de stimulare a celulelor B. IL-6 este o glicoproteină, compusă din 184 de aminoacizi, al cărui ADN complementar a fost clonat în 1986 [26].

IL-6 joacă un rol major în patogeneză și dezvoltarea afecțiunilor maligne. Promovează creșterea tumorilor prin inhibarea apoptozei și induce angiogeneza tumorală. IL-6 este disregulat în multe tipuri de cancer și creșterea concentrației plasmatice a IL-6 a fost corelată cu un prognostic mai grav la pacienții cu diferite tipuri de cancer, inclusiv, dar fără a se limita la, mielom multiplu, limfom, cancer ovarian, cancerul de prostată, carcinom renal, cancer mamar și melanom.

Mai multe citokine serice, inclusiv IL-6 joacă un rol important în dezvoltarea și progresia melanomului; cu toate acestea, funcțiile biologice specifice ale IL-6 în progresia melanomului sunt necunoscute. Câteva studii au indicat faptul că IL-6 inhibă creșterea melanocitelor *in vitro*. IL-6 inhibă creșterea celulelor tumorale izolate din melanomul localizat, nemetastatic, în timp ce IL-6 stimulează proliferarea celulelor tumorale izolate din melanomul metastatic, indicând o schimbare de la stimularea paracrină la creșterea autocrină sau crescând rezistența la IL-6 ca regulator de creștere negativă. S-a demonstrat, de asemenea, că celulele metastatice de melanom au expresii mari atât ale IL-6 cât și ale receptorului IL-6, în timp ce celulele melanomului primar subțiri au o expresie mică atât a IL-6, cât și a receptorului său [27, 28, 29].

În plus, lumina ultravioletă (UV) modifică expresia multor gene din liniile celulare din celule scuamoase de carcinom c, cu eliberarea constantă a citokinelor, cum ar fi IL-6, sugerând că expunerea la lumina soarelui ar putea crește nivelurile IL-6 în piele [26].

6. Compuși biologic activi cu rol în dezvoltarea tumorală.

Există o multitudine de resurse naturale pentru uz medicinal, la nivel mondial, dintre care mulți nu au fost încă exploatați pentru posibilă aplicare în industria farmaceutică. Peste 50% din toate medicamentele disponibile pe piață au provenit din surse naturale, dintre care peste 70% din medicamentele anti-cancerigene au originea în surse naturale. Sursele naturale pot fi de origine vegetală, animală sau marină. Plantele sunt cea mai utilizată resursă naturală pentru aplicațiile din domeniul științei farmaceutice și constituie în continuare principala sursă naturală de noi medicamente și compuși de legătură, datorită accesibilității și abundenței

acestora. Până în prezent, pe piață există doar câteva medicamente derivate natural care vizează cancerul legat de piele, dar nici unul nu a fost încă aprobat pentru aplicare locală. Acest lucru poate fi atribuit efectelor secundare cunoscute ale acestor agenți atunci când se aplică local pe piele.

Compușii fitochimici care au proprietăți anti-inflamatorii, imuno-modulatoare și anti-oxidante, au, în general, cel mai mare potențial de a manifesta comportamente chimio-preventive în cancerul de piele. S-au făcut numeroase încercări pentru a găsi corelația dintre proprietățile antioxidante ale fitocompușilor și potențialul lor anti-cancer. Deși nu s-a constatat nici o dovadă concretă a unei astfel de corelații, activitatea antioxidantă a unui fitocompus este considerată ca o indicație a potențialei activități anticancerogene. Carotenoizii, flavonoidele și terpenoidele sunt unele dintre grupurile de fitocompuși cu potențial ridicat anticancerigen [30].

Flavonoidele sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor antioxidante (sau pentru proprietățile de scavenger asupra radicalilor liberi) și pentru proprietățile de chelatare, fiind în permanență investigate pentru a fi utilizate în tratamentul bolilor. Activitatea antioxidantă a flavonoidelor poate acționa atât ca declanșator al tumorigenezei cât și ca inhibitor al tumorigenezei, în funcție de alți factori fiziologici. Nu toate flavonoidele ar fi, prin urmare, utile în chimioterapia cancerului sau în prevenirea chimiorezistenței. Unele flavonoide au demonstrat în plus că absorb radiațiile UV-B (UVB), contribuind astfel la efectul lor fotoprotector în plante, prin comportarea ca filtre UV și prin protejarea elementelor subiacente. Această proprietate fotoprotectoare a flavonoidelor a fost adaptată și investigată în celulele umane și în modelele de șoareci, pentru a determina dacă flavonoidele și derivații lor ar putea fi utilizați ca agenți fotoprotectori la oameni [30, 31].

Carotenoizii sunt pigmenți solubili în grăsimi care se găsesc în mod obișnuit în natură, în special în plante. Acești compuși sunt constituiți din opt izoprenoide C₅ care sunt combinate pentru a forma tetraterpenoizii C₄₀, cu diverse modificări chimice (de exemplu, hidrogenare, izomerizare, dehidrogenare, prezența funcțiilor oxigenului etc.) pentru a forma diferite carotenoide. Au fost întreprinse multe cercetări cu privire la proprietățile medicinale ale carotenoidelor și se crede că sunt potențiali agenți pentru prevenirea cancerului, diabetului și bolilor cardiovasculare. Proprietățile medicinale ale carotenoidelor se presupune că se datorează activităților lor antioxidante care reduc deteriorarea ADN-ului de către radicalii liberi după expunerea la lumina UV, dar și alte mecanisme sunt în curs de investigare [32].

Terpenoidele, de asemenea cunoscute ca terpeni sau izoprenoidele, sunt cel mai mare grup și includ peste 20.000 de compuși naturali. Ele sunt abundente în mușchi, alge, lichenii și alte plante superioare. Primul agent anticancer comercial dezvoltat din terpeni a fost Taxol®, extras din tisa de Pacific (*Taxus brevifolia*). S-a demonstrat că terpenoizii extrași din uleiurile din arborele de ceai (*Melaleuca alternifolia*) sunt capabili să prezinte o anumită activitate anticancerogenă, incluzând carcinoamele celulelor bazale (BCC) și celulele scuamoase (SCC) [33].

Resveratrolul a fost investigat ca agent anti-cancer și s-a constatat că acesta este capabil să inhibe creșterea celulelor melanotice și amelanotice prin inducerea apoptozei.

Potența resveratrolului a fost demonstrată prin capacitatea sa de a induce apoptoza în celulele melanomului murin rezistent la doxorubicină și capacitatea sa de a inhiba creșterea tumorilor melanomului rezistent la doxorubicină la șoareci. Resveratrolul are un potențial anti-metastatic, deoarece s-a raportat că inhibă tranziția epitelială indusă de lipopolizaharide până la tranziția mezenchimală, posibil prin inhibarea semnalizării NF-κB. Există, de asemenea, potențialul de aplicare a resveratrolului ca sensibilizator la radiații în tratamentul melanomului, deoarece s-a observat că celulele melanomului rezistent la radiații au răspuns bine la o combinație de tratament de resveratrol și radiație [34].

CAPITOLUL II: MODELE EXPERIMENTALE DE EVALUARE A PROGRESIEI MELANOMICE– exemplificare linia celulara B16-F10 (melanom murinic)

II.1 Model experimental de evaluare a melaninei ca parametru indicator al malignizarii

Pigmentii melaninici sunt produși la mamifere în special ca protecție față de radiația UV, în special UV-B, direct absorbită de ADN-ul celular. Radiația UV-A acționează în special prin fotosensibilizare, generând specii radicalice ce degradează ADN-ul și alte componente celulare. UV-A penetrează în derm, mai profund decât UV-B, fiind sursa majoră de radiație UV responsabilă de producerea unor anumite tipuri de cancer de piele [35, 36].

Conținutul de melanină a fost determinat în acord cu procedura descrisă de Komiyama [37], care constă în următoarele etape de prelucrare a suspensiei celulare:

- Celulele de melanom murin B16-F10 au fost însemantate în plăci cu 6 godeuri, la o densitate de 25 000 celule/godeu, apoi cultivate timp de 5 zile (2 zile aderare, 3 zile tratare cu substanțele de interes).
- După desprinderea cu tripsina de pe suportul de cultivare, suspensia celulară se centrifughează (10 min / 10 000 xg) și sedimentul se reia în NaOH 2M pt 15min la 60°C.
- Se lasă peste noapte la frigider, iar a doua zi se sonichează 6 min. la treapta 9, la 26°C, apoi se aduce la evaporare la 80°C 30 min.
- Absorbanta pigmentilor melaninici se citește la 450nm (cititor în plăci Berthold – Tristar)

II.2 Model experimental de evaluare a indicatorilor de invazivitate: metaloproteinaze (MMP 2 și 9), VEGF, IL6

II.2.1. Evaluarea activității metaloproteinazelor matriceale (MMP) secretate în mediu de creștere celule de melanom murinic (B16-F10), prin zimografie

Gelatin-zimografia este o metodă de estimare a concentrației de gelatinaze (MMP-2 și MMP-9) din mediul condiționat și se bazează pe capacitatea acestor enzime de a se renatura după migrarea electroforetică în geluri de poliacrilamida-SDS copolimerizate cu gelatina și îndepărtarea SDS prin spălări repetate cu Triton X-100, enzimele exercitându-și astfel activitatea proteolitică asupra substratului copolimerizat pe parcursul a 18 h de incubare la 37°C într-un tampon format din 0,6055g Trizma base și 0,1472 g CaCl₂ (pH=8). Cu toate că în mediul de cultură MMP-urile sunt frecvent asociate cu inhibitorii lor endogeni (TIMP), în timpul electroforezei inhibitorii disociază de proteinezime, astfel acțiunea lor nu interferează în detectia activității enzimatice.

II.2.2. Determinarea VEGF și IL6 ca promotori ai malignizării și metastazării

IL6 este o citokină pleiotropică imunomodulatoare, produsă de diferite tipuri de celule, inclusiv de cele de melanom [38]. IL6 joacă un rol important în patogeneza și dezvoltarea malignizării, promovând creșterea tumorală prin inhibiția apoptozei și inducerea angiogenezei

tumorale. Nivelul bazal de IL6 este perturbat in multe tipuri de cancer iar cresterea acestei citokine in serul pacientilor se coreleaza cu o prognoza agravanta.

VEGF este un factor pro-angiogenic foarte activ, avand valori crescute in tumori de piele. El stimuleaza angiogeneza prin actiuni paracrine asupra celulelor endoteliale. Studii recente au demonstrat si mecanisme de actiune paracrine ale VEGF, prin stimularea macrofagelor pentru producerea factorilor de crestere tumorala.

Determinarea acestor factori solubili se face din mediul extracelular, prin **citometrie in flux – tehnica de detectie cu beads de captura fluorescenti**. Metoda se numeste multiplexare, beads-ii cu anticorpi de detectie fiind configurati pentru analiza simultana a mai multor proteine in functie de intensitatile de fluorescenta in coordonate APC-A.

Materiale si metoda:

- Human IL6 Single Plex Flex Set (BD CBA)
- Human VEGF Single Plex Flex Set (BD CBA)
- Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD CBA)
- *BD* Cytometric Bead Array (CBA) kit - Human Inflammatory Cytokines kit (BD Pharmingen)

Kiturile utilizeaza pentru detectia analitilor solubili particule cu intensitati de fluorescenta diferite. Beads-ii de captura de o anumita intensitate de fluorescenta sunt legati de anticorpi specifici pentru o anumita proteina solubila, in acest caz IL6 si VEGF.

Schema de lucru pentru analiza supernatantului de cultura:

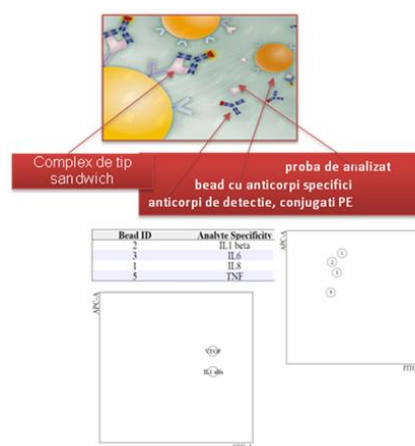


Fig. 3: .Principiul metodei de detectie a proteinelor solubile prin multiplexare cu beads-i fluorescenti

Prepararea standardelor de citokine inflamatorii umane

1. Reconstituirea standardelor de citokine inflamatorii umane (proteine recombinante liofilizate) in diluentul de lucru
2. Diluarea Standardelor prin dilutii seriale, folosind diluentul de lucru



Prepararea amestecului de beads-uri de captura a citokinelor inflamatorii umane

3. Mixarea a 10μl/test din fiecare suspensie de beads-
-uri de captura a citokinelor inflamatorii umane
4. Transferul a 50μl din mixul de beads-uri de captura in fiecare tub de analiza



5. Adaugarea a cate 50 μl/tub din dilutiile standard si probele de analizat (supernatant de cultura) in tubul de analiza corespunzator
6. Adaugarea a 50 μl/tub din reactivul de detectie PE (anticorpi specifici anti-IL-6, VEGF umane, conjugati PE)

Incubare timp de 3 ore la temperatura camerei (ferit de lumina)*



7. Spalarea probelor cu 1 ml de tampon de spalare si centrifugare 200xg, 5 minute. Aspirare supernatant.



8. Adaugarea 300 μl tampon de spalare la fiecare tub de analiza si analizarea probelor

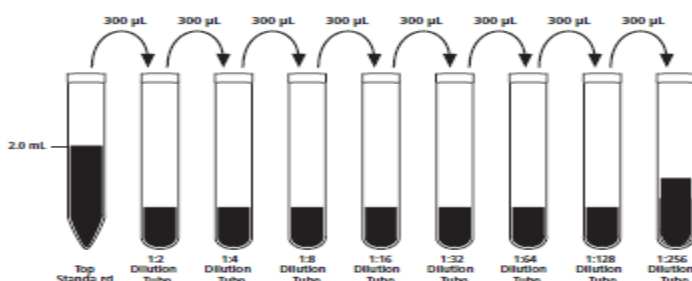
***In timpul incubarii se poate efectua procedura de setup cu beads-uri a citometrului BD FACS CantoII:**

<ul style="list-style-type: none">• Adaugarea a 100μl de beads-uri de setup pentru citometru (vortexare inainte de adaugare) in tubul de setup• Adaugarea a 400μl tampon de spalare in tubul de setup. Mixare.	<ol style="list-style-type: none">1. Ajustare voltaje FSC, SSC2. Ajustare voltaje APC3. Ajustare voltaje PE4. Ajustare voltaje FITC
---	--

Prepararea standardelor de citokine inflamatorii umane:

Standardele de citokine inflamatorii umane sunt liofilizate, necesitand reconstituire si dilutii seriale inainte de mixarea cu beads-urile de captura si reactivul de detectie PE, astfel:

1. Se transfera continutul unui recipient cu citokine inflamatorii umane liofilizate intr-un tub de polipropilena. Se noteaza tubul "Top Standard".
2. Se reconstituie continutul liofilizat cu 2,0 ml diluent de lucru. Standardul reconstituit se lasa cel putin 15 minute pentru echilibrare inainte de efectuarea dilutiilor seriale.
3. Tuburi de 12x75 mm se noteaza si se aranjeaza in urmatoarea ordine: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 si 1:256.
4. Se pipeteaza 300µl de diluent de lucru in fiecare tub.



5. Se efectueaza dilutii seriale prin transferul a 300µl din tubul "Top Standard" in tubul de dilutie 1:2 si se mixeaza. Se continua dilutiile seriale prin transferarea a 300µl din tubul de dilutie 1:2 in tubul de dilutie 1:4 si in acelasi mod pana la tubul de dilutie 1:256, mixandu-se cu pipeta, fara vortexare. Se prepara un tub care contine diluent de lucru pentru a servi ca si control negativ 0pg/ml.

Concentratia aproximativa (pg/ml) a proteinelor recombinante in fiecare tub de dilutie este prezentata in tabelul urmatoare:

Proteina (pg/ml)	Top Standard	Tub Dilutie 1:2	Tub Dilutie 1:4	Tub Dilutie 1:8	Tub Dilutie 1:16	Tub Dilutie 1:32	Tub Dilutie 1:64	Tub Dilutie 1:128	Tub Dilutie 1:256
VEGF umana	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20
IL-6 umana	5000	2500	1250	625	312,5	156	80	40	20

Prepararea amestecului de beads-uri de captura a citokinelor inflamatorii umane din supernatantul de cultura:

Beads-urile de captura sunt conditionate individual si este necesara mixarea lor inainte de adaugarea reactivului de detectie PE, standardelor sau probelor, astfel:

1. Se determina numarul de tuburi de analiza (inclusiv standarde si controale) necesare pentru experiment;
2. Se vortexeaza fiecare suspensie de beads-uri de captura.
3. Se adauga cate 10 μ l din fiecare recipient de beads-uri de captura, pentru fiecare tub de analiza, intr-un singur tub notat "Mix beads-uri de captura".
4. Se vortexeaza amestecul, fiind astfel pregatit pentru a fi transferat la tuburile de analiza (50 μ l mix beads-uri de captura/tub).

In urma prepararii, diluarii standardelor si mixarii beads-urilor de captura, se transfera acesti reactivi impreuna cu probele de testat la tuburile de analiza corespunzatoare in vederea incubarii si analizei, conform schemei de lucru prezentate mai sus.

Analiza rezultatelor si evaluarea cantitativa a interleukinelor prezente se face cu softul FCAP Beads Array.

II.1 Model experimental de evaluare a statusului proliferativ si apoptotic in melanoma in conditiile iradierii UV

Expunerea pielii la radiatia UV este principalul factor declansator al mutatiilor maligne, acumularea acestora ducand la forme extrem de invazive de cancer si cu o evolutie rapida. Desi are o incidenta de 4-5% fata de celelalte tipuri de cancer, induce mortalitate in procent de 71-80% [39]. Impactul radiatiei UV in producerea melanomului se realizeaza prin modificari ale micromediului epidermal la nivel de factori de crestere si interactiuni melanocite – keratinocite – matrice extracelulara, respectiv melanocite – fibroblast – endoteliu. Stressul oxidativ este implicat în dezvoltarea cancerului, și promovează migrarea tumorală, invazivitatea și metastazarea [40].

Bazate pe aceste evidente stiintifice, studiile au urmarit evidentierea principalelor procese implicate in progresia tumorală (apoptoza si secventialitatea ciclului celular) in linia celulara de melanom murin B16-F10, in model experimental de iradiere UV. Mecanismele urmarite in testarea acestor extracte, in cadrul modelului de iradiere, au fost urmatoarele:

- **evaluare a procesului apoptotic**
- **evaluare a statusului proliferativ prin evidentierea generatiilor succesive si a secventialitatii ciclului celular.**

Celulele de melanom murin B10-F16 au fost lasate sa adere 24h inainte de tratare cu extracte pentru inca 48h. Dupa desprinderea cu tripsina au fost marcate pentru apoptoza si ciclul celular conform protocolului descris in Rapoartele de cercetare precedente si analizate

prin citometrie in flux. Pentru cuantificarea succesiunii generatiilor proliferative, celulele s-au marcat cu CFSE (metoda prezentata in Raport de cercetare intermediar) inainte de insamantarea placilor de cultura, apoi tratate si analizate dupa 48h incubare cu extracte.

Expunerea culturii celulare la radiatia **UV-A si UV-B s-a realizat in doze controlate (UV-A - 10J/cm²; UV-B – 1J/cm², system BIOSUN / Vilber Lourmat).**

CAPITOLUL III: STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTUL EXTRACTULUI BIOACTIV DE STRUGURI (TES) ASOCIAT CU EXTRACTUL DE TRIFOI ROSU (ET) ASUPRA MECANISMELOR IMPLICATE IN PROGRESIA MELANOMICA

Studiile experimentale realizate au fost concepute in vederea sustinerii si completarii activitatii biologice demonstrate in etapele anterioare prin metode correlative ce vizeaza procese celulare si moleculare din patologia dereglarilor hiperproliferative: **producerea melaninei**, principal parametru indicator al malignizarii in cancerule de piele, promotori ai caracterului invaziv tumoral: **metaloproteinaze (MMP 2 si 9)**, **factorii solubili VEGF (pro-angiogenic) si IL6** (citokina pleiotropica, modulator al unor cascade de semnalizare inter-celulare ce converg catre un prognostic agravant in melanomul malign), proliferare si apoptoza **in conditiile iradierii UV**.

Linia celulara standardizata utilizata in cadrul modelelor experimentale in vitro este cea de **melanom murin - B16-F10** – cu relevanta si predictibilitate in patologia umana. Celulele au fost cultivate in mediu de cultura DMEM cu 10% ser fetal bovin, 1% solutie antibiotic / antimicotic, in conditii standard (37°C, 95% aer umidificat si 5% CO₂) 24 de ore inainte de tratament si 48 de ore cu substante testate.

Material biologic de testat - prelucrare:

Extract de tescovina – deseuri din vinificatie (TES): Se prepara o solutie stock de 100 mg/ml prin sonicare la treapta 5, 10 minute la temperatura camerei. Se centrifugheaza apoi 20 minute la 3500rpm. Supernatantul se testeaza in modelele experimentale descrise la Capitolul II.

Extract de trifoi rosu (ET), conditionat in Propilen glicol, standardizat in fitoestrogeni, cu urmatorul continut de principii active: Daidzeina = 0.8 mg/ml; Genisteina = 1.1 mg/ml; Biochanina = 1.7 mg/ml

Cele doua extracte de testat s-au combinat in urmatoarele proportii:

Amestec a – TES:ET = 1:9;

Amestec b – TES:ET = 1:5;

Amestec c – TES:ET = 1:3;

Amestec d – TES:ET = 2:9.

Martori pozitivi:

- **Metotrexat 10mg/ml** – agent antiproliferativ cu spectru larg

- **Colchicina 2µM** – antitumoral activ in blocarea ciclului de diviziune celulara

Experimentele s-au realizat in triplicat, datele prezentate fiind media valorilor obtinute in cele 3 serii experimentale succesive.

III.1 Evaluarea parametrilor de invazivitate si malignizare in celule de melanom murin B16-F10

III.1.1. Melanina - parametru indicator al malignizarii

Melanogeneza si pigmentii melaninici afecteaza profilul fiziologic normal, dar si pe cel transformat malign al melanocitelor. Melanina actioneaza in celule netransformate ca un protector celular fata de radiatii, dar si fata de alte agresiuni extreme (stress oxidativ, agenti toxici, etc), dar aceasta proprietate poate atenua eficienta radio si chemoterapiei in cancerule de piele agresive. De asemenea, datorita proprietatilor sale imunosupresive, genotoxice si mutagenice, produce amplificarea cresterii tumorale.

Cultivarea celulelor s-a realizat in conditiile descrie anterior, metoda de evidentiare a continutului de melanina intracelular fiind cea descrisa in capitolul II, Materiale si metode. Rezultatele relevante pentru actiunea compusilor TES si ET, singulari si asociati in proportiile selectate sunt prezentate in tabelul de mai jos:

	Melanina (Absorbanta 450nm)	% variatie fata de martor
Martor	0.152	NA
PG	0.174	14%
ET 0,02%	0.135	-22%
ET 0,01%	0.138	-21%
ET 0,006%	0.135	-22%
TES 2mg/ml	0.134	-12%
TES 4mg/ml	0.15	-1%
TES 8mg/ml	0.183	20%
Comb a 0,2%	0.152	-13%
Comb b 0,2%	0.147	-16%
Comb c 0,2%	0.152	-13%
Comb d 0,2%	0.151	-13%
Comb a 0,1%	0.161	-7%
Comb b 0,1%	0.17	-2%
Comb c 0,1%	0.165	-5%
Comb d 0,1%	0.157	-10%
Mtx 10mg/ml	0.127	-16%
Colchicina 2µM	0.147	-3%

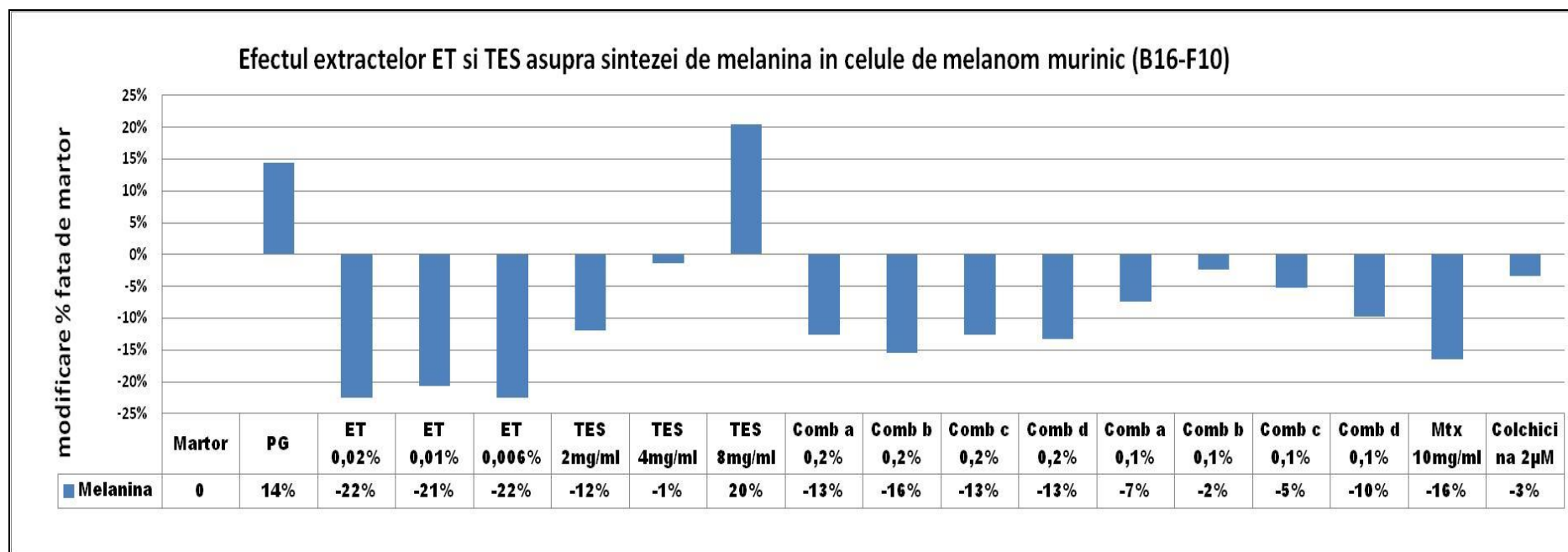


Fig. 4: Determinarea sintezei de melanina secretata de celule B16-F10 in prezenta extractelor ET, TES si combinatiilor. Absorbanta pigmentilor melaninici se citeste la 450nm (cititor in placi Berthold – Tristar)

Compusul TES, cu puternic caracter antioxidant, demonstrat in experimentarile din etapele anterioare, reduce melanina produsa de celulele de melanom doar la cea mai mica doza testata (2mg/ml); concentratiile mai mari produc o amplificare a productiei de melanina, nefavorabila tratamentului anti-tumoral. **Extractul de trifoi rosu**, avand un continut standardizat de fito-estrogeni, scade cantitatea de melanina produsa de celulele de melanom murin B16-F10, printr-o potentiala actiune asupra receptorului estrogenic cuplat la proteina G, una dintre tintele terapeutice recent evidentiata in modularea anti-tumorală. **Combinatiile a, b si c**, cu ET predominant, actioneaza si ele in sensul scaderii melaninei celulare, similar cu martorii pozitivi anti-tumorali.

III.1.2. Evaluarea indicatorilor de invazivitate:

a. Factor pro-angiogenic VEGF; citokina IL6;

Screeningul la nivel de factor pro-angiogenic VEGF si citokina IL6 s-a realizat initial in conditii bazale de dezvoltare in cultura a melanomului din linia celulara B16-F10, conform descrierii anterioare. Rezultatele sunt prezentate in tabelul de mai jos:

	VEGF (pg/ml)	% variatie fata de martor	IL6 (pg/ml)	% variatie fata de martor
Martor	1747.32	NA	12404.5	NA
PG	1667.3	-5%	13993.99	13%
ET 0,02%	1603.33	-4%	10143.02	-28%
ET 0,01%	1638.2	-2%	12868.76	-8%
ET 0,006%	1589.32	-5%	12471.3	-11%
TES 2mg/ml	1673.83	-4%	15628.47	26%
TES 4mg/ml	1707.27	-2%	13299.54	7%
TES 8mg/ml	1650.1	-6%	13124.1	6%
Comb a 0,2%	1672.84	0%	12875.33	-8%
Comb b 0,2%	1644.15	-1%	12783.12	-9%
Comb c 0,2%	1686.64	1%	14167.42	1%
Comb d 0,2%	1591.33	-5%	13325.44	-5%
Comb a 0,1%	1590.82	-5%	11340.32	-19%
Comb b 0,1%	1759.01	6%	14992.39	7%
Comb c 0,1%	1636.21	-2%	14035.07	0%
Comb d 0,1%	1696.47	2%	13544.65	-3%
Mtx 10mg/ml	1779.38	2%	10591.58	-15%
Colchicina 2μM	1553.13	-11%	9815.9	-21%

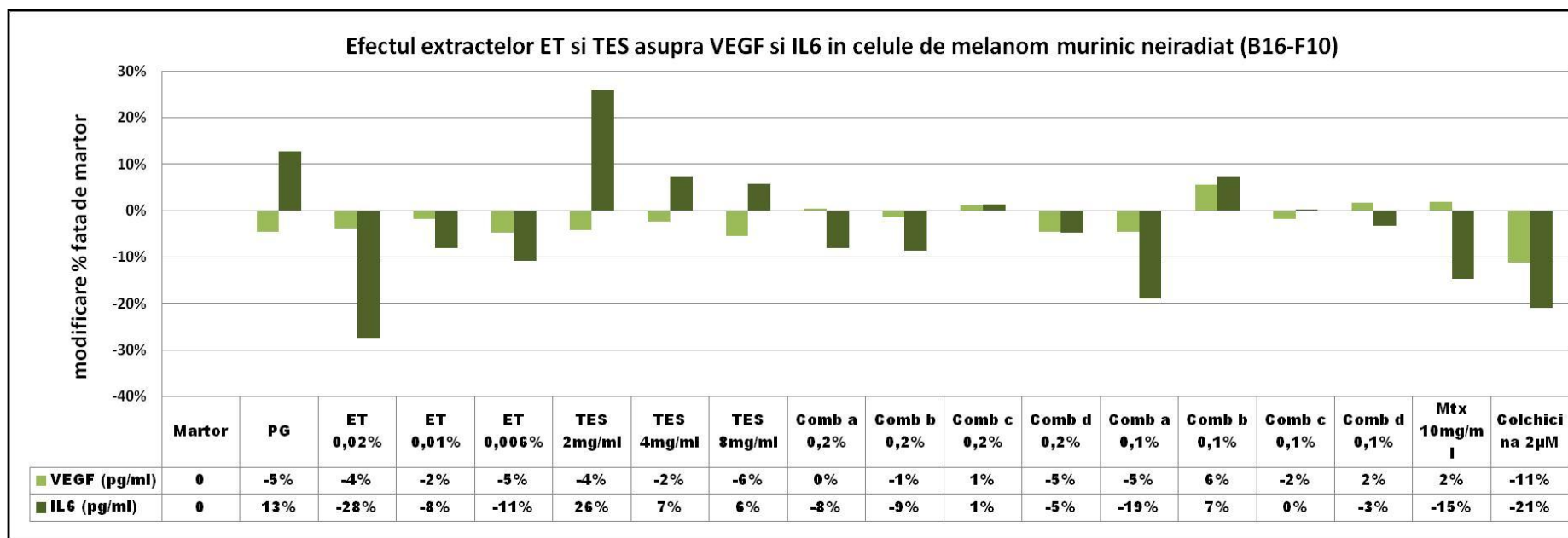


Fig. 5: Determinarea VEGF si IL6 in linia celulara B16-F10 in prezenta extractelor ET, TES si combinatiilor.

Complexul antioxidant TES nu actioneaza la acest nivel, nici ca factor anti-angiogenic, nici asupra citokinei pleiotropice IL6.

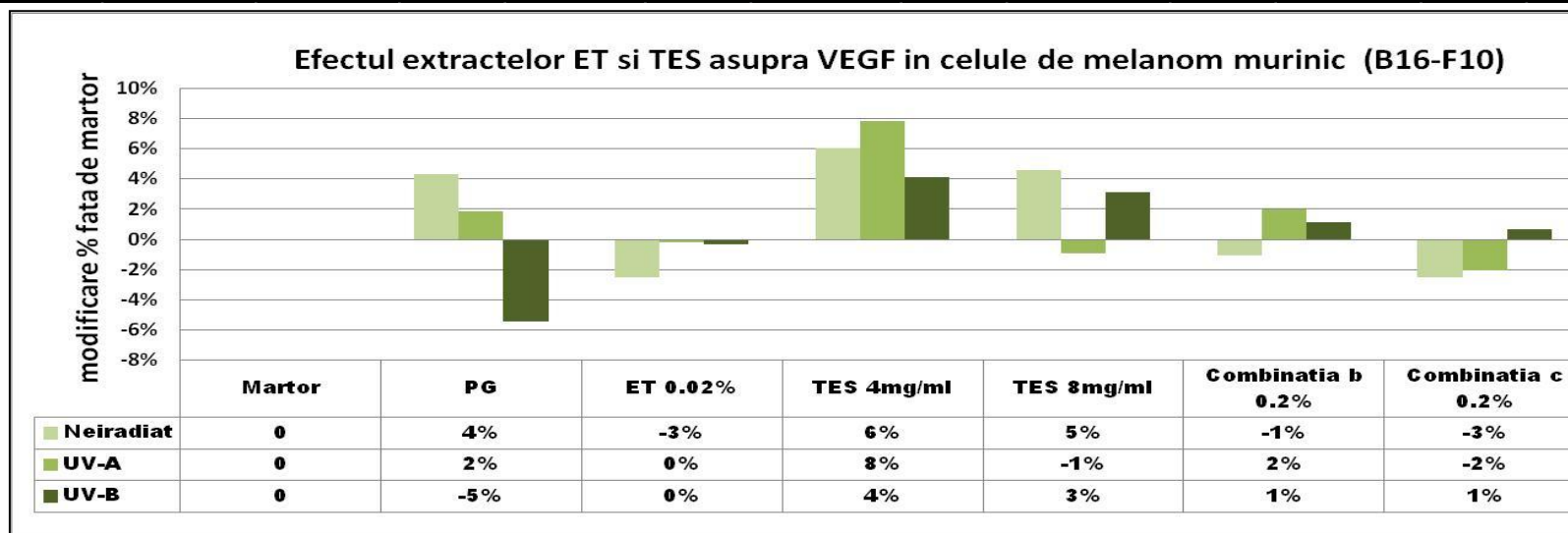
Complexul fitoestrogenic ET actioneaza slab asupra VEGF si IL6, efect directionat in functie de doza aplicata.

Extracetele asociate, in combinatia a inhiba IL 6 cu 19%, iar VEGF scade cu 5%.

Colchicina este singurul agent chimioterapic cunoscut care duce atat la scaderea VEGF cat si a IL6, demonstrand un efect complex anti-melanom.

Efectul compusilor s-a testat ulterior si in conditii de iradiere UV, in doze controlate (UV-A-9J/cm²; UV-B -1J/cm²). Rezultatele sunt prezentate in tabelul de mai jos.:

	celule neiradiate				UV-A				UV-B			
	VEGF (pg/ml)		IL6 (pg/ml)		VEGF (pg/ml)		IL6 (pg/ml)		VEGF (pg/ml)		IL6 (pg/ml)	
		modificare %		modificare %		modificare %		modificare %		modificare %		modificare %
Martor	1575.28	NA	14305.44	NA	1588.32	NA	10706.03	NA	1676.79	NA	10223.21	NA
PG	1643.16	4%	15807.88	11%	1617.8	2%	10908.65	2%	1585.31	-5%	9830.69	-4%
ET 0.02%	1601.33	-3%	13634.44	-14%	1614.31	0%	9992.88	-8%	1580.3	0%	9295.79	-5%
TES 4mg/ml	1670.87	6%	17185.94	20%	1713.15	8%	10830.61	1%	1745.39	4%	10706.03	5%
TES 8mg/ml	1647.13	5%	16081.05	12%	1573.27	-1%	9827	-8%	1728.81	3%	10656.03	4%
Comb b 0.2%	1625.77	-1%	17408.31	10%	1650.1	2%	10523.38	-4%	1603.33	1%	9782.56	0%
Comb c 0.2%	1601.33	-3%	15041.31	-5%	1584.81	-2%	10335.75	-5%	1596.33	1%	9671.12	-2%



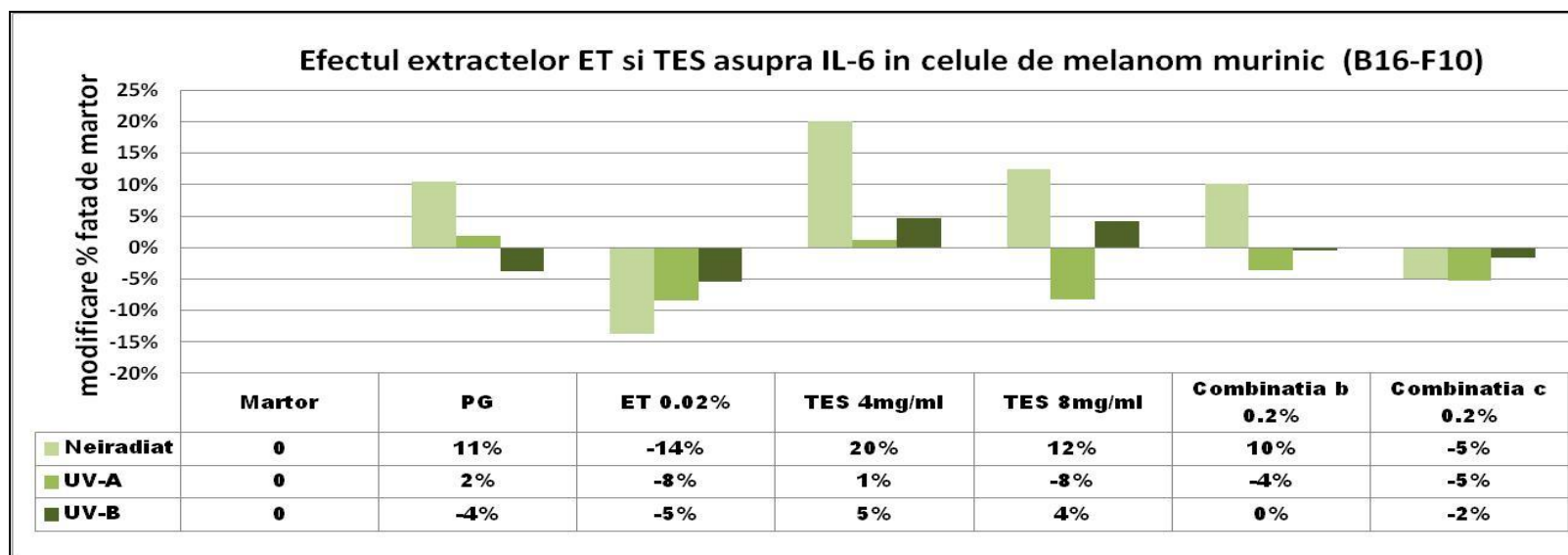


Fig. 6: Determinarea VEGF si IL6 in linia celulara B16-F10 neiradiat/ UV-A/ UV-B in prezenta extractelor ET, TES si combinatiilor.

Factorul pro-angiogenic VEGF nu este influentat de iradierea UV-A si nici de cea UV-B in linia celulara de melanoma murin B16-F10, in schimb IL6 scade in ambele tipuri de iradiere.

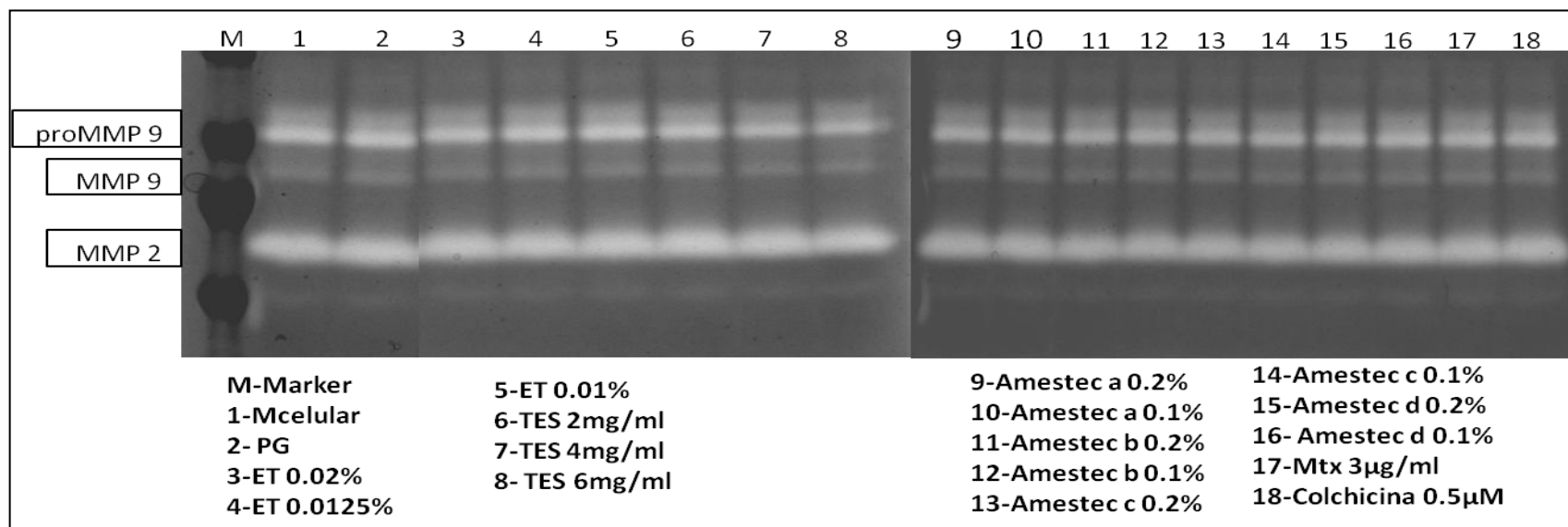
ET 0.02% si TES 8mg/ml intervin doar in conditiile iradierii UV-A in cascadele de propagare tumorala coordonate de IL6, prin inhibarea acestora, extractele nefiind active dupa iradierea UV-B.

b. Evaluarea efectului extractelor ET si TES asupra activitatii enzimaticice a MMP secretate in mediul de cultura B16-F10:

Melanomul cutanat se caracterizează printr-o capacitate mare de invazie și metastază. În acest proces degradarea ECM și membranei bazale cu enzime proteolitice este un pas esențial, în care MMP joacă un rol important. Supraexpresia, MMP-2 și MMP-9 a fost implicat în migrația și invazia celulelor de melanom.

S-a arătat că o activitate crescută a MMP-2 este asociată cu progresia tumorală în mai multe tipuri de tumori (tumori cerebrale, carcinom gastric). În leziunile melanocitare, s-a constatat o corelație între exprimarea metaloproteinazei MMP-2 și slabirea structurii arhitecturale, creștere atipică și metastaze hematogene. Spre deosebire de MMP-2, care a fost asociată cu progresia melanomului, MMP-9 a fost exprimată numai în melanoamele primare avansate și a fost absentă în liniile celulare în etapa incipientă leziunilor primare.

În urma migrării electroforetice, zimogramele au fost scanate și analizate semi-cantitativ cu softul ImageLab prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatică ce apar ca plaje de liza, iar identificarea tipului de MMP s-a realizat pe baza maselor moleculare. Rezultatele sunt reprezentate în graficele de mai jos, ca modificare procentuală față de martorul corespunzător.



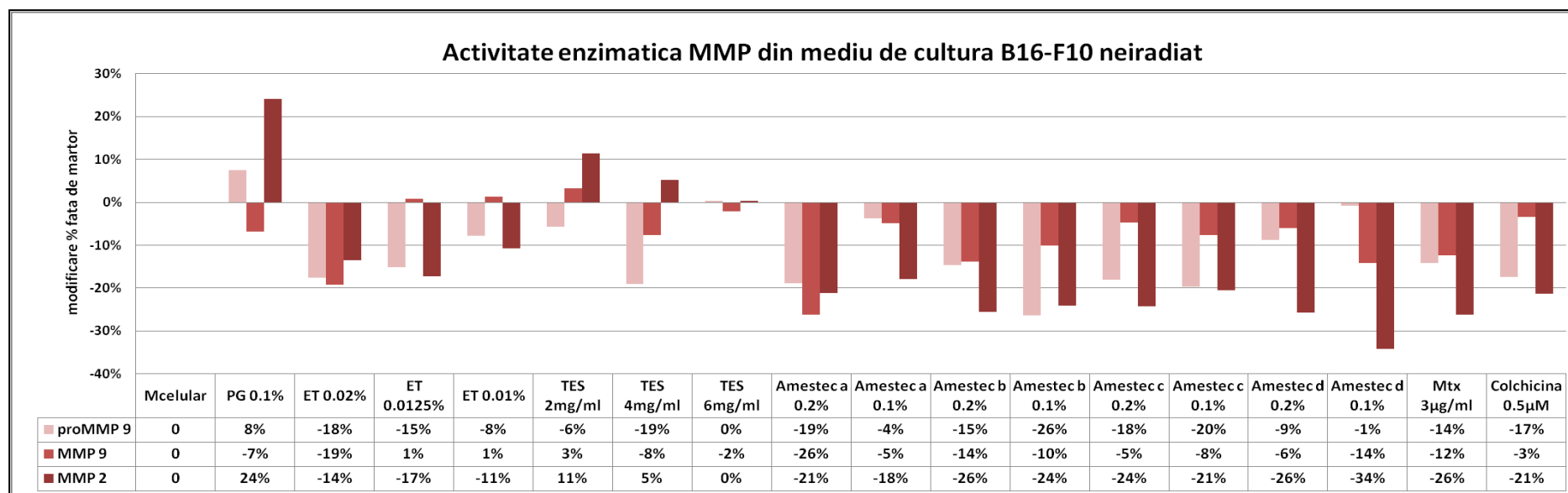


Fig. 7: Determinarea activitatii MMP in linia celulara B16-F10 neiradiat in prezenta extractelor ET, TES si combinatiilor.

In urma cuantificarii benzilor de liza cu softul ImageLab, se observa ca extractul de trifoi (ET) la doza cea mai mare (0,02%), induce o scadere a activitatii enzimatice a metaloproteinazelor secretate in mediul de cultura, astfel: proMMP 9 si MMP 9 scade cu 18% respectiv 19%, iar MMP 2 cu 14%. Extractul TES la concentratia de 4mg/ml, prezinta activitate inhibitorie asupra proMMP 9 si MMP 9, scazand activitatea enzimatica cu 19% si 8%; asupra MMP 2 prezinta un efect usor activator, crescand activitatea cu 5%.

Amestecurile celor doua extracte au un efect inhibitor mai pronuntat asupra activitatii MMP, comportament asemanator cu cel al martorilor testati in paralel (Metrotrexat si Colchicina).

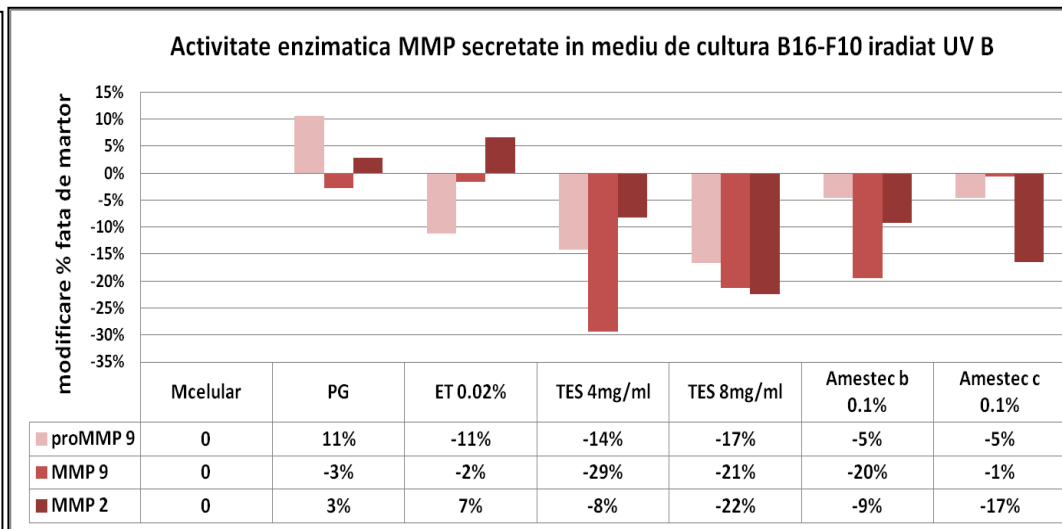
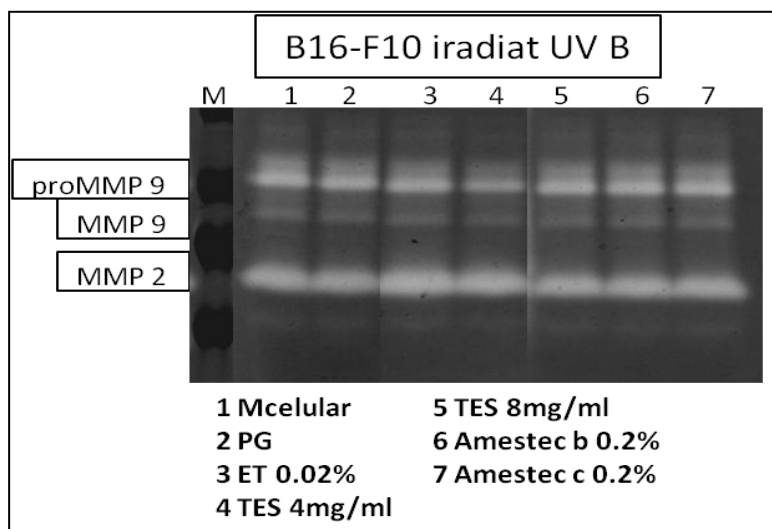
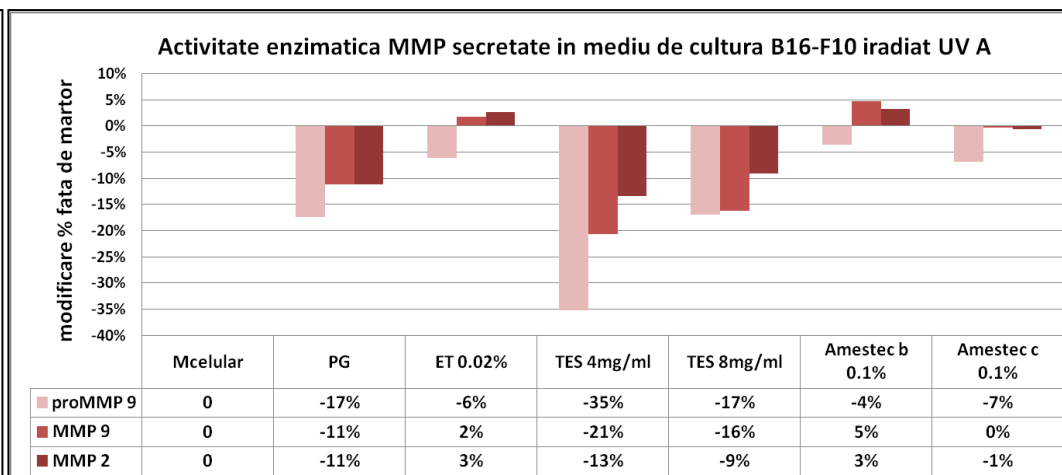
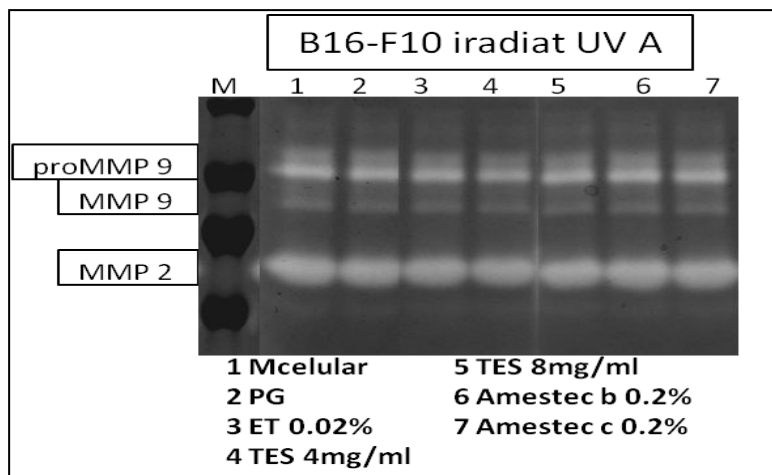


Fig. 6: Determinarea activitatii MMP in linia celulara B16-F10 iradiat cu UV-A/ UV-B in prezenta extractelor ET, TES si combinatiilor.

In urma iradierii UV A si UV B, extractul ET nu influenteaza semnificativ activitatea metaloproteinazelor.

In conditii bazale (fara iradiere), extractul TES scade activitatea MMP, efect mentinut si in urma iradierii UV A si UV B, reusind sa contracareze efectul generator de SRO al radiatiilor UV.

In conditii de iradiere UV, se observa un efect inhibitor mai pronuntat asupra MMP 9 si MMP 2, in cazul celulelor tratate cu cele doua amestecuri de extracte, astfel:

- Amestecul b 0.1%, reduce activitatea proMMP9 si MMP 9 cu 26%, respectiv 10% si MMP 2 cu 24% in cazul celulelor neiradiate. In urma iradierii UV A, efectul inhibitor nu este la fel de semnificativ, se observa o usoara crestere a activitatii metaloproteinazelor, in schimb in urma aplicarii unei doze de radiatii UV B, prezinta un efect protectiv impotriva radiatiilor UVB prin inhibarea activitatii MMP 9 cu 20% si MMP 2 cu 9%, contribuind astfel la atenuarea invaziei tumorale.

- In cazul celulelor tratate cu Amestecul c 0.1%, fara iradiere activitatea metaloproteinazelor este redusa cu 20% (proMMP9), 8%(MMP9), respectiv 9%(MMP2). In prezenta unui flux de radiatii UV B, activitatea MMP scade, atenuand caracterul invaziv al melanomului murin.

III.2. Modularea statusului proliferativ si inducerea apoptozei in celule de melanom murin in conditii de iradiere UV

S-au realizat 3 serii experimentale ce au constat in celule B16-F10 neiradiate, iradiate UV-A (9J/cm²) si UV-B (1J/cm²). Celulele au fost lasate sa adere 24h, apoi tratate cu extractele timp de 6h, iradiate si cultivate inca 24h in prezenta extractelor. Au fost analizate apoptoza si secventialitatea ciclului celuler, conform metodologiilor prezentate in Raportul II al acestui proiect. Rezultatele sunt prezentate in tabelele de mai jos:

	Celule neiradiate					Celule iradiate UV-A					Celule iradiate UV-B				
	% G0/G1	%S	% G2/M	%S+ %G2/M	% decreasing S+G2/M	% G0/G1	%S	% G2/M	%S+ %G2/M	% decreasing S+G2/M	% G0/G1	%S	% G2/M	%S+ %G2/M	% decreasing S+G2/M
Martor	65.94	23.27	10.79	34.06	0	62.86	24.36	12.78	37.14	0	62.5	27.33	10.17	37.5	0
PG	68.98	20.05	10.98	31.03	0	67.53	19.62	12.85	32.47	0	70.31	18.78	10.91	29.69	0
ET 0,02%	64.15	25.45	10.41	35.86	-15.57	63.86	25.7	10.47	36.17	-11.4	66.96	16.11	16.93	33.04	-11.28
TES 4mg/ml	62.43	27.53	10.05	37.58	-10.33	71.67	16.7	11.63	28.33	23.72	53.92	33.43	12.65	46.08	-22.88
TES 8mg/ml	69.66	19.52	10.82	30.34	10.92	70.11	17.98	11.91	29.89	19.52	60.51	27.08	12.4	39.48	-5.28
Comb b 0.2%	68.85	20.19	10.96	31.15	-0.39	69.82	18.77	11.41	30.18	18.74	59.12	28.8	12.1	40.9	-9.07
Comb c 0.2%	67.68	19.27	13.05	32.32	-4.16	69.02	20.3	10.62	30.92	16.75	61.85	24.3	13.85	38.15	-1.73

	Celule neiradiate						Celule iradiate UV-A						Celule iradiate UV_B					
	% celule vii	% Apoptoza timpurie	% Apoptoza tarzie	% Necroza	% Apoptoza totala	% Apoptoz a totala	% celule vii	% Apoptoza timpurie	% Apoptoza tarzie	% Necroza	% Apoptoza totala	% Apoptoza totala	% celule vii	% Apoptoza timpurie	% Apoptoza tarzie	% Necroza	% Apoptoza totala	% Apoptoz a totala
Martor	74.5	5.9	10.6	8.9	16.5	100	51.7	44	3.9	0.4	47.9	100	29.1	65	5.1	0.8	70.1	100
PG	66.6	4.8	6.7	21.9	11.5	100	40.9	55.6	3.2	0.3	58.8	100	27	62.6	9.3	1.1	71.9	100
ET 1/5000	69.8	7.9	13.2	9.1	21.1	183.48	7	88.8	3.8	0.3	92.6	157.48	25.3	67.2	6.6	0.9	73.8	102.64
TES 4mg/ml	74.9	8.4	8.9	7.7	17.3	104.85	59.9	36.4	3.4	0.3	39.8	83.09	44.8	43.1	11.3	0.8	54.4	75.66
TES 8mg/ml	73.2	11	12.2	3.7	23.2	140.61	57.7	35.7	6.5	0.1	42.2	88.1	62.5	27.7	9.4	0.3	37.1	51.6
Comb b 0,2%	64.5	11	15	9.5	26	226.09	49.2	47	3.3	0.6	50.3	85.54	24.4	68	6.7	0.9	74.7	103.89
Comb c 0,2%	64.5	9.5	16.8	9.3	26.3	228.7	44.6	52.3	2.7	0.4	55	93.54	26.6	65.3	6.7	1.4	72	100.14

Secventialitatea ciclului celular nu se modifica in conditiile de iradiere testate, mentinand aceeasi rata de multiplicare accelerata specifica melanomului. In seriile neiradiate, extractul de deseuri de struguri, TES, reduce fazele de diviziune mitotica, inhiband proliferarea, in schimb extractul fitoestrogenic de trifoi rosu, ET, induce apoptoza. Combinatiile de tip b si c asigura un efect concertat de reducere a propagarii tumorale pe cele doua mecanisme mai sus mentionate. In conditii de iradiere, extractele actioneaza doar in cazul UV-A, mentinand tendinta observata in stadiul bazal: TES inhiba procesul de diviziune, iar ET este inductor de apoptoza, combinatiile celor doua complexe asigurand incetinirea progresiei melanomice. Radiatia UV-B este mult mai agresiva, inducand apoptoza in majoritatea populatiei celulare, prin generare de specii de oxygen reactive. In acest context, prin caracterul sau antioxidant, complexul TES protejeaza celula de melanoma murin fata de apoptoza generate de stress oxidative, effect contrar terapiei antitumorale.

CONCLUZII

Screeningul celular si molecular realizat pentru extractul obtinut din deseuri de vinificatie (TES) a fost extins in aceasta etapa prin evidentierea unor actiuni la nivel de celula transformata, completand spectrul de activitate biologica la nivel cutanat cu date stiintifice relevante in perturbari hiperproliferative, exemplificate la nivel de melanoma murin. De asemenea, s-au identificat si alte complexe extractive (extract de trifoi rosu, cu continut standardizat de fitoestrogeni) care completeaza si sustin in anumite proportii bine definite eficacitatea demonstrata "in vitro" pentru compusii TES.

Astfel, au fost evidentiata efecte induse de ambele complexe vegetale, dar si de combinatiile lor in mecanisme definatorii pentru progresia tumorilor de piele:

- **Complexul antioxidant TES** inhiba activitatea MMP, cu relevanta in stoparea invazivitatii tumorale; nu actioneaza la nivelul productiei de melanina, nici la nivelul factorului pro-angiogenic VEGF si nici al citokinei IL6
- **Complexul fitoestrogenic ET** actioneaza complementar cu efectele induse de TES, fiind implicat in procese reglate de productia de melanina, angiogeneza tumorală coordonata de VEGF si IL6.

In conditii de iradiere UV, in special in iradierea UV-A, extractul TES intervine in reducerea fazelor de diviziune mitotica, inhiband proliferarea, in schimb extractul fitoestrogenic de trifoi rosu, ET, induce apoptoza, complementarizand si potentand activitatea biologica.

Centralizarea efectelor "in vitro" demonstrate in cadrul acestui proiect este prezentata in tabelul de mai jos, ca o sinteza a actiunii demonstrate pe cellule normale si cu metabolism hiperproliferativ caracteristice tesutului cutanat, la dozele necitotoxice determinate ca urmare a evaluarii activitatii metabolice specifice:

Keratinocit (HaCaT)		Fibroblast (HS 27)				Melanom (B16 F10)						
Proba	Parametru evaluat	Parametru evaluat				Parametru evaluat						
	Diferențiere	Integrine	Proliferare	Colagen	MMP	Apoptoza	Proliferare	VEGF	IL 6	MMP	Melanina	Impact UV
TES	induce diferențiere keratinocitara	Supraexpresia integrinei $\alpha 1$	stimulare slaba	stimuleaza sinteza colagenului intracelular cu 32%	inhiba activitatea MMP	induce apoptoza	efect antiproliferativ	fara efect	fara efect	inhiba activitatea MMP	reduce melanina la cea mai mica doza testata (2mg/ml)	scade IL6 - iradiere UV A ; scade activitatea MMP -iradiere UV A si UV B reduce proliferarea
ET	fara efect	fara efect	stimulare crescuta	stimuleaza sinteza colagenului cu 23%	inhiba activitatea MMP	induce apoptoza	efect antiproliferativ mai mare fata de TES	fara efect	Scade IL 6	inhiba activitatea MMP	scade cantitatea de melanina	scade IL6 și inductor de apoptoza -iradiere UV A
Combinatia a (TES:ET = 1:9)	fara efect	Supraexpresia integrinei $\alpha 1$	stimulare slaba	fara efect	inhiba activitatea MMP	induce apoptoza	fara efect	Scade VEGF	Scade IL 6	inhiba semnificativ activitatea MMP	scade cantitatea de melanina	fara efect
Combinatia b (TES:ET = 1:5)	fara efect	Supraexpresia integrinei $\alpha 1$	stimulare slaba	stimuleaza sinteza colagenului cu 9%	inhiba activitatea MMP	fara efect	efect antiproliferativ semnificativ	fara efect	fara efect	inhiba semnificativ activitatea MMP	scade cantitatea de melanina	scade activitatea MMP -iradiere UV B; reduc proliferarea si induc apoptoza
Combinatia c (TES:ET= 1:3)	fara efect	Supraexpresia integrinei $\alpha 1$	stimulare slaba	fara efect	inhiba activitatea MMP	fara efect	fara efect	fara efect	fara efect	inhiba semnificativ activitatea MMP	scade cantitatea de melanina	scade activitatea MMP -iradiere UV B; reduc proliferarea si induc apoptoza
Combinatia d (TES:ET = 2:9)	fara efect	Supraexpresia integrinei $\alpha 1$	stimulare slaba	fara efect	inhiba activitatea MMP	fara efect	fara efect	fara efect	fara efect	inhiba semnificativ activitatea MMP	scade cantitatea de melanina	fara efect

Sinergismul si complementaritatea actiunii biologice converg catre o baza stiintifica solida pentru dezvoltarea de produs topic original, cu adresabilitate in regenerarea pielii, dar si ca adjuvant in disfunctii hiperproliferative. Rezultatele obtinute recomanda valorificarea extractului de struguri obtinut din deseuri de vinificatie, singular sau asociat cu extractul de trifoi rosu si deschid perspectiva concreta a transferului de cunostinte si tehnologie catre etapele de formulare si conditionare produs.

Proiectul de cercetare, caracterizat prin studii complexe ce au la baza concepte stiintifice de mare actualitate (ex. terapii tinta anti-melanom bazate pe fitoestrogeni) si studii experimentale ce aplica tehnici moderne, performante si cu raspuns particularizat la nivel de mecanism investigat (ex. citometrie in flux) utilizate in screening de activitate specifica pe linii celulare standardizate relevante (keratinocit, fibroblast, melanoma), se finalizeaza cu diseminarea urmatoarelor rezultate:

- Brandusa G. Dumitriu , Diana M. Ene , Laura Olariu , Natalia Rosoiu, Luiza M. Crăciun, Abdi ADIL, Gina Manda, Toma Papacocea, **Grape pomace and red clover extracts modulate the proliferative response of murine melanoma cells**, prezentare la CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ DE TOAMNĂ a AOSR, Cercetarea științifică în serviciul dezvoltării durabile, 21-22 septembrie 2018, Târgoviște

- Luiza M. Crăciun, Brandusa G. Dumitriu, Laura Olariu, Stefana Jurcoane, Stelica Cristea , Abdi ADIL, Natalia Rosoiu, Raluca Papacocea, **Regenerative and scare healing potential of active compounds from *Camelina sativa* oil and grape pomace, proved by cellular specific mechanisms**, evaluata, in curs de publicare la Romanian Biotechnology Letters / factor de impact ISI

BIBLIOGRAFIE

- [1] T.N. Chinembiri, L.H. du Plessis, M. Gerber, J.H. Hamman and J. du Plessis, Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment, *Molecules* 2014, 19, 11679-11721.
- [2] V.J. Marks, N.W. Hanson, Non-melanoma skin cancer. In *Sauer's Manual of Skin Diseases*; Hall, B.J., Hall, J.C., Eds.; Wolters Kluwer Health: Philadelphia, PA, USA, 2010; Volume 10, pp. 305–312.
- [3] U.B. Hofmann, J.R. Westphal, G.G.P. van Muijen, D.J. Ruiter, Matrix Metalloproteinases in Hujman Melanoma, *J. Invest Dermatol*, 2000; 115: 337 – 344.
- [4] A.K. Iyer, A. Singh, S. Ganta, M.M. Amiji, Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 1784–1802.
- [5] A. Molassiotis, P. Fernandez-Ortega, D. Pud, G. Ozden, J.A. Scott, V. Panteli, A. Margulies, M. Browall, M. Magri, S. Selvekerova, Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. *Ann. Oncol.* 2005, 16, 655–663.
- [6] Y. Chen, Y. Chen, L. Huang, J. Yu, Evaluation of heparanase and matrix metalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma, *Journal of Dermatology* 2012; 39: 339–343.
- [7] A.T. Slominski, M.A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R.M. Slominski, J.D. Steketee, Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2012, 212, v-115.
- [8] E.Fuchs, S. Raghavan, Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 2002, 3, 199–209.
- [9] J.J. Nordlund, The melanocyte and the epidermal melanin unit: An expanded concept. *Dermatol. Clin.* 2007, 25, 271–281.
- [10] J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott, UV Radiation and the Skin, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 12222-12248.
- [11] M.R.Vincensi, M. d'Ischia, A. Napolitano, E.M. Procaccini, G. Riccio, G. Monfrecola, P. Santoianni, G. Prota, Phaeomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: A pilot study. *Melanoma Res.* 1998, 8, 53–58.
- [12] M. Sarna, A. Zadlo, P. Hermanowicz, Z. Madeja, K. Burda, T. Sarna, Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells, *Experimental Dermatology*, 2014, 23, 813–818
- [13] A.A. Brozyna, W. Jozwicki, J.A. Carlson, Melanogenesis Affects Overall and Disease-Free Survival in Patients with Stage III and IV Melanoma, *Hum Pathol.* 2013; 44:2071–2074.

- [14] W. Liu, J.P. Dowling, W.K. Murray, W.A. McArthur, Rate of growth in melanomas. Characteristics and associations of rapidly growing melanomas, (2006) *Arch. Dermatol.* 142, 1551–1558.
- [15] G.J. Clydesdale, G.W. Dandie, H.K. Muller, Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell. Biol.* 2001, 79, 547–568.
- [16] S.G. Coelho, W. Choi, M. Brenner, Y. Miyamura, Y. Yamaguchi, R. Wolber, C. Smuda, J. Batzer, L. Kolbe, S. Ito, Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2009, 14, 32–35.
- [17] T.G. Polefka, T.A. Meyer, P.P. Agin, R.J. Bianchini, Effects of solar radiation on the skin. *J. Cosmet. Dermatol.* 2012, 11, 134–143.
- [18] U.B. Hofmann, J.R. Westphal, E.T. Waas, A.J.W. Zendman, IMHA Cornelissen, D.J. Ruiter, G.N.P. van Muijen, Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression, *British Journal of Cancer* (1999) 81(5), 774–782.
- [19] P.A.M. Snoek-van, Beurden J. W. Von den Hoff, Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *BioTechniques* 38:73-83 (January 2005).
- [20] Y.T. Kontinen, M. Ainola, H. Valleala, J. Ma, H. Ida, J. Mandelin, R.W. Kinne, S. Santavirta, Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58:691-697. 1999.
- [21] H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, M. Seiki A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. (1994) *Nature* 370: 61–65.
- [22] S. Pasco, L. Ramont, F-X. Maquart, J. C. Monboisse, Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49 (2004) 221–233.
- [23] G. Neufeld, S. Tessler, H. Gitay-Goren, T. Cohen, B.Z. Levi, Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5:89–97.
- [24] M.J. Karkkainen, T. Makinen, K. Alitalo, Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol.* 2002;4:E2–5.
- [25] L. Hoejberg, L. Bastholt, H. Schmidt, Interleukin-6 and melanoma, *Melanoma Research* 2012, 22:327–333.
- [26] H. Ludwig, D.M. Nachbaur, E. Fritz, M. Krainer, H. Huber, Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 1991; 77:2794–2795.

- [27] J.F. Seymour, M. Talpaz, F. Cabanillas, M. Wetzler, R. Kurzrock, Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:575–582.
- [28] C. Soubrane, O. Rixe, J.B. Meric, D. Khayat, R. Mouawad, Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res* 2005; 15:199–204.
- [29] N.T. Chinembiri, L. H. du Plessis, M. Gerber, J.H. Hamman, J. du Plessis, Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment, *Molecules* 2014, 19, 11679-11721.
- [30] A. Agrawal, Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 2011, 4, 1394–1398.
- [31] N. Saewan, A. Jimtaisong, Photoprotection of natural flavonoids. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2013, 3, 129–141.
- [32] N.I. Krinsky, E.J. Johnson, Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects. Med.* 2005, 26, 459–516.
- [33] Banthorpe, D.V. Terpenoids. In *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*; Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V., Harbone, J.B., Eds.; Addison Wesley Longman: Edinburgh, UK, 1994; pp. 289–359.
- [34] R.M. Niles, M. McFarland, M.B. Weimer, A. Redkar, Y.M. Fu, G.G. Meadows, Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 2003, 190, 157.
- [35] O. Chiarelli-Neto, A.S. Ferreira, W.K. Martins, C. Pavani, D. Severino, Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial, Cells. *PLoS ONE*, 2014, 9(11):113-266.
- [36] K. Jimbow , S.K. Lee , M.G. King , H. Hara , H. Chen , J. Dakour , H. Marusyk, Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1993;100(3):259S-268S\
- [37] K. Komiyama, S.Takamatsu, Y. Takahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, New inhibitors of melanogenesis. Taxonomy, fermentation, isolation and biological characteristics., *J Antibiot* 1993;46:1520–5.
- [38] L. Hoejberg , L. Bastholt , H. Schmidt , Interleukin-6 and melanoma, *Melanoma Res.*2012; 22(5):327-33.
- [39] Reichrath J, Rass K (2014) Ultraviolet damage, DNA repair and vitamin D in nonmelanoma skin cancer and in malignant melanoma: an update. *Adv Exp Med Biol* 810: 208-233.

[40] S.Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11): 1603–1616)