
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Mecanismele implicate în fotochemoprevenția cu produși naturali

Doctorand **Elena-Diana Olteanu**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL FOTOCARCINOGENEZEI CUTANATE	21
1. Radiațiile ultraviolete	21
2. Carcinogeneza, definiție și etape	23
3. Mecanisme implicate în carcinogeneza indusă de UV	23
3.1. Leziuni la nivelul ADN-ului	23
3.2. Stresul oxidativ	24
3.3. Modularea apoptozei	30
3.4. Modularea semnalizării pe calea NF-kB	31
3.5. Modularea căii de semnalizare AP1	32
4. Chemoprevenția cancerului	34
4.1. Efectul de ecranare „sunscreen” al compușilor naturali	35
4.2. Biomarkeri ai eficienței substanțelor utilizate în fotochemoprevenție	35
4.3. Substanțe cu potențial fotochemopreventiv	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	45
2.1. Material vegetal	45
2.2. Studiul polifenolilor din Cv prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă performanță	46
2.3. Evaluarea activității de scavenger a radicalilor liberi de către extractul de Cv prin metoda rezonanței electronice paramagnetice	52
2.4. Iradierea cu UVB	52
2.5. Modelul experimental in vivo	52
2.6. Model experimental in vitro	54
3. Studiul 1. Studii in vitro pe celule vasculare endoteliale expuse la UVB vizând mecanismele implicate în chemoprevenția cu extractul de Calluna Vulgaris	59
3.1. Materiale și metode	60
3.2. Rezultate	63
3.3. Discuții	69

3.4. Concluzii	71
4. Studiul 2. Aplicarea topică de hidrogel conținând <i>Calluna Vulgaris</i> modulează leziunile ADN și apoptoza în tegumentul șoarecilor SKH-1 expuși la o singură doză de iradiere UVB	73
4.1. Introducere	73
4.2. Materiale și metode	75
4.3. Proliferarea epidermului	77
4.4. Rezultate	79
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	84
5. Studiul 3. Efectul fotochemopreventiv al extractului de <i>Calluna Vulgaris</i> asupra tegumentului șoarecilor nuzi SKH-1 expus la doze multiple de UVB	87
5.1. Introducere	87
5.2. Materiale și metode.	88
5.3. Rezultate	92
5.4. Discuții	96
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

Cuvinte cheie: stres oxidativ, malondialdehidă, apoptoză, chemoprevenție, compuși naturali, leziuni ADN, HUVEC, ultraviolete

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL FOTOCARCINOGENEZEI CUTANATE

Carcinoamele cutanate reprezintă aproximativ 30% dintre cazurile noi de cancer diagnosticate, cu o incidență în continuă creștere, în etiologia cărora radiațiile ultraviolete, în special UVB (ultraviolete B), sunt incriminate în proporție de 90%. În continuă creștere a leziunilor pre-maligne și maligne cutanate, eficiența redusă a cremelor fotoprotectoare, expunerea necontrolată la soare sunt motive pentru care în ultimii ani a crescut interesul pentru descoperirea de metode noi, superioare, de prevenție a neoplaziilor cutanate.

1. Radiațiile ultraviolete

Radiațiile ultraviolete au unele efecte benefice asupra sănătății, cum ar fi formarea de vitamina D3, dar expunerea prelungită la acestea poate avea și efecte dăunătoare, efecte legate de inducția apariției proceselor maligne. Spectrul UV se întinde între 100-400 nm. Radiațiile UV se divid la rândul lor în: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) și UVC (100-280 nm). Stratul de ozon absoarbe eficient radiațiile UV până la o lungime de 310 nm, toate UVC și 95% din UVB, și deloc UVA. Expunerea recreațională la lămpile de bronzare reprezintă de asemenea un carcinogen.

2. Carcinogeneza, definiție și etape

Carcinogeneza este un proces multistadial în care au loc modificări celulare și moleculare ce duc la dezvoltarea tumorilor maligne. Studii experimentale, pe rozătoare, de inducere a carcinogenezei au demonstrat că dezvoltarea tumorală este un proces complex, format din etape distincte, dar strâns legate între ele: inițierea, promoția, progresia tumorală.

3. Mecanisme implicate în carcinogeneza indusă de UV

3.1 Leziuni la nivelul ADN-ului

UVB are atât acțiune directă asupra moleculei de ADN cât și indirectă. În mod direct, ca urmare a interacțiunii fotonilor UV cu moleculele de ADN, acesta trece într-o stare excitată în care se rearanjează electronii și se formează doi fotoproduși cu structură dipirimidinică, dimerul de ciclobutan pirimidină (CPD) și 6-4 pirimidină – pirimidonă (6-4 PP). CPD se formează mai frecvent decât 6-4 PP și reprezintă aproximativ 85% din leziunile primare ale ADN-ului determinate de radiațiile UV, în special de UVB. Formarea de fotoproduși interferează cu replicarea ADN-ului, acesta nu se repară și, în consecință, apar mutații specifice

3.2. Stresul oxidativ

UVB participă și indirect la destrucția macromoleculilor. Determină formarea de radicali liberi ai oxigenului și induce scăderea semnificativă a antioxidanților, împiedicând astfel capacitatea pielii de a se apăra împotriva speciilor reactive ale oxigenului (SRO) generate de expunerea la lumina solară.

3.2.1. Mecanisme de generare a stresului oxidativ în expunerea la UVB

Expunerea tegumentului la UVB determină generarea de specii reactive ale oxigenului în keratinocite și fibroblaste: anionul superoxid (O_2^-), peroxidul de hidrogen (H_2O_2), radicalul hidroxil ($HO\cdot$) și singletul oxigen (1O_2), acestea au efecte nocive la nivelul proteinelor, lipidelor și acizilor nucleici. Dezechilibrul dintre producerea de SRO și capacitatea antioxidantă celulară conduce la stres oxidativ, factor contributiv într-o varietate de patologii, inclusiv în cancer.

3.3. Modularea apoptozei

Termenul de apoptoză a fost introdus în 1972 și descrie un tip special de moarte celulară, diferit de necroză.

Stimularea apoptotică activează cel puțin una dintre cele două căi majore ale apoptozei, cea intrinsecă ori mitocondrială sau cea extrinsecă ori mediată de receptor. Ambele căi activează caspazele efectorie pentru a determina moartea celulară.

Celulele „sunburn” (SC) sunt reprezentate de keratinocite apoptotice. Formarea SC a fost propusă ca un mecanism de eliminare a celulelor cu potențial malign controlat de p53 și care protejează individul de dezvoltarea cancerelor cutanate induse de UV.

3.4. Modularea semnalizării pe calea NF-kB

NF-kB este un factor de transcripție ubiquitar implicat în semnalizarea proliferării celulare și în promoția tumorală și este activat de oxidanți și alți stimuli care generează producția de SRN.

NF-kB are un rol esențial în carcinogeneză deoarece antagonizează funcția proteinei supresoare tumorală p53. Cele mai multe substanțe naturale cu rol chemopreventiv, printre care și curcumina, resveratrolul, EGCG-ul, licopenul, genisteina, luteolina acționează ca inhibitori ai căii NF-kB. Acești compuși pot bloca una sau mai multe etape ale căii de semnalizare a NF-kB.

4. Chemoprevenția cancerului

Chemoprevenția cu ajutorul compușilor naturali, definită ca „folosirea de agenți capabili să amelioreze efectele adverse ale UVB asupra epidermului”, reprezintă un concept nou în efortul de a controla procesul carcinogenezei. Acest concept poate fi înțeles ca o metodă de control a dezvoltării tumorale prin care aceasta este încetinită sau chiar oprită; acest control se realizează prin intermediul administrării de produși naturali sau de compuși chimici sintetizați.

Agenții chemopreventivi reprezentați de substanțe fitochimice pot bloca sau inversa stadiile premaligne (inițierea sau promoția) ale carcinogenezei multistadiale. Pot de asemenea opri sau întârzia dezvoltarea sau progresia celulelor precanceroase în celulele maligne.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

În primul studiu *in vitro* ne-am propus să investigăm efectele UVB și ale extractului de Cv asupra celulelor endoteliale din cordonul ombilical uman (HUVEC) și să demonstrăm pe lângă efectul extractului cercetat și faptul că aceste celule se comportă în ceea ce privește stresul oxidativ, apoptoza și modularea căii NF-kB de către UVB similar cu alte celule de la nivel tegumentar (keratinocite, fibroblaste). Aceste premize ar putea conduce la ideea că celulele endoteliale reprezintă un model ieftin și viabil pentru studiul compușilor naturali cu potențial fotochemopreventiv.

In vivo am ales să studiem efectele extractului de Cv utilizând o nouă metodă de livrare a acestuia la nivel tegumentar, un hidrogel. Am folosit drept model animal șoarecii SKH-1, model recunoscut în literatură. Cel de-al doilea studiu din cadrul tezei urmărește efectul pretratamentului cu un hidrogel ce conține *Calluna Vulgaris* asupra tegumentului șoarecilor SKH-1 expuși la o singură doză de UVB în ceea ce privește stresul nitrozativ, leziunile ADN, apoptoza și proliferarea celulară.

În cel de-al treilea studiu efectuat tot *in vivo* s-a urmărit efectul administrării extractului și iradierii pe o perioadă de 10 zile (recreând expunerea din perioada unui concediu estival). Mai precis, am determinat efectele extractului de Cv asupra stresului oxidativ mediat de UVB, biomarkerilor de inflamație, asupra morfologiei epidermului și apoptozei. Am urmărit, de asemenea, și testarea unui nou hidrogel ca vehicul pentru livrarea de agenți fotochemopreventivi în piele.

Studiul 1. Studii *in vitro* pe celule vasculare endoteliale expuse la UVB vizând mecanismele implicate în chemoprevenția cu extractul de *Calluna Vulgaris*

Studiul de față investighează posibilele efecte protective ale extractului de *Calluna Vulgaris*, *in vitro*, pe culturi de celule endoteliale expuse la diferite doze de radiații UVB, investigând producția de specii reactive ale oxigenului/statusul antioxidant, apoptoza, activarea NF-κB și leziunile ADN.

Iradieră cu UVB a determinat stres oxidativ și apoptoză în celulele endoteliale prin inducerea și activarea NF-κB și deteriorarea ADN într-o manieră dependentă de doză. Extractul de Cv a modulat efectele UVB asupra culturilor de celule endoteliale în funcție de concentrația extractului. În concentrații mici, Cv a acționat ca antioxidant și, parțial, ca agent anti-apoptotic, reducând efectele nocive ale UVB asupra ADN, în timp ce concentrația mai ridicată are un efect pro-oxidant per-se.

Pornind de la efectele pozitive ale extractului și de la faptul că mecanismul declanșat de radiația UVB pare să fie similar în celulele endoteliale ca și în alte celule, sunt necesare studii viitoare mai aprofundate pentru identificarea cu exactitate a căilor de semnalizare intracelulară modulate de extract.

Studiul 2. Aplicarea topică de hidrogel conținând *Calluna Vulgaris* modulează leziunile ADN și apoptoza în tegumentul șoarecilor SKH-1 expuși la o singură doză de iradiere UVB

În acest studiu efectele administrării extractului de *Calluna Vulgaris* (Cv) via hidrogel au fost evaluate pe tegumentul de șoareci SKH-1. S-a vizat explorarea legăturii dintre stresul nitrozativ (dozarea oxidului nitric și evaluarea activității oxid nitric sintetazei inductibile) și inducerea leziunilor ADN (prin dozarea dimerilor de ciclobutan pirimidină), a apoptozei (formarea celulelor „sunburn”) și a hiperplaziei epidermice (antigenul celular nuclear proliferativ – PCNA, numărul de straturi de celule epidermice și grosimea epidermului).

Iradieră cu UVB a tegumentului șoarecilor SKH-1 a determinat o creștere a nivelului unor parametri ai stresului nitrozativ (oxidului nitric și iNOS) și a indus formarea de leziuni ale ADN-ului (creșterea numărului dimerilor de ciclobutan pirimidină) ceea ce a determinat o reacție celulară normală și anume intrarea în apoptoză a celulelor lezate (evidențiat prin numărul crescut de celulele „sunburn”) și în

plus, a intensificat proliferarea la nivelul tegumentului (creșterea PCNA, a grosimii epidermului și a numărului de straturi epidermice).

Aplicarea topică de Cv via hidrogel a redus apoptoza indusă de UVB și a prevenit leziunile ADN, a conservat imunoreactivitatea PCNA în expunerea la UVB și a diminuat grosimea și numărul de straturi din epiderm.

Studiul 3. Efectul fotochemopreventiv al extractului de *Calluna Vulgaris* asupra tegumentului șoarecilor nuzi SKH-1 expus la doze multiple de UVB

Acest studiu și-a propus să studieze efectele extractului de Cv în pielea șoarecilor SKH-1 după expunerea la multiple doze de UVB. Mai precis, am determinat efectele extractului de Cv asupra stresului oxidativ mediat de UVB și asupra biomarkerilor de inflamație, morfologiei epidermului și apoptozei. Am urmărit, de asemenea, și testarea unui nou hidrogel ca vehicul pentru livrarea de agenți fotochemopreventivi în piele.

Expunerile multiple la UVB, fără protecție, au indus leziuni în ADN, efect demonstrat de numărul crescut de celule „sunburn” și CPD pozitive din epiderm. Produsul natural pe care l-am testat a fost capabil să reducă semnificativ formarea de CPD și, în consecință, numărul de celule cu „sunburn”, provocate de leziunile ADN.

S-a arătat că pretratamentul cu extractul Cv în hidrogel are efecte pozitive asupra tegumentului când este administrată înaintea expunerii la UVB. Deși nu a îmbunătățit balanța oxidanți/antioxidanți, a redus inflamația și efectele nocive ale UVB asupra moleculei de ADN, după cum a arătat-o numărul redus de CPD și sunburn. În plus, am demonstrat că hidrogelul este o cale viabilă de administrare în piele a produselor naturale

6. Concluzii generale

1. Iradierea UVB a indus stres oxidativ și apoptoză prin inducerea și activarea NF- κ B și a determinat lezarea ADN-ului într-o manieră dependentă de doză.

2. Extractul de Cv a modulat efectele UVB asupra culturilor de celule endoteliale în funcție de concentrația extractului. În concentrații mici, Cv a acționat ca un antioxidant și, parțial, ca un agent anti-apoptotic, reducând efectele nocive ale UVB asupra ADN-ului, în timp ce concentrația mai ridicată are un efect pro-oxidant per-se.

3. Iradierea unică cu UVB a determinat o creștere a nivelului parametrilor de stres nitrozativ, a indus formarea de leziuni la nivelul ADN-ului și intrarea în apoptoză a celulelor lezate determinând în același timp și proliferarea la nivelul tegumentului.

4. Aplicarea topică de Cv înglobat în hidrogel a redus apoptoza indusă de UVB și a prevenit leziunile ADN, a conservat imunoreactivitatea PCNA și a diminuat grosimea și numărul de straturi din epiderm.

5. *In vivo* expunerile multiple la UVB au dus la leziuni ADN, după cum este demonstrat de numărul crescut de celule „sunburn” și CPD pozitive din epiderm.

6. Extractul de Cv, deși nu a îmbunătățit balanța oxidanți/antioxidanți, a redus inflamația și efectele nocive ale UVB asupra ADN, după cum a arătat-o numărul redus de celule CPD pozitive și sunburn.

7. Hidrogelul este o cale viabilă de administrare topică la nivelul tegumentului a produselor naturale.

8. Administrarea de Cv înglobat în hidrogel poate fi o metodă viabilă de chemoprevenție.

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de doctorat este originală prin cercetarea efectuată atât *in vitro* cât și *in vivo* pe model experimental, și reprezintă un bun model de investigare a efectelor unor compuși naturali cu potențial fotochemopreventiv, subliniind importanța investigării mecanismelor și căilor de semnalizare intracelulară și demonstrând importanța efectuării unor studii aprofundate înainte de a utiliza acești compuși naturali, ce la prima vedere par a fi inofensivi.

Teza demonstrează că efectele radiației UVB asupra celulelor endoteliale (HUVEC) sunt similare cu cele obținute în studiile pe keratinocite *in vitro*, și astfel acest tip de celule pot fi utilizate în viitor pentru studiul compușilor naturali și al efectului fotochemopreventiv al acestora, fiind mai puțin costisitoare și mai ușor de manipulat.

În cadrul tezei s-au investigat, utilizând o echipă multidisciplinară, efectele unui extract nou, despre care nu au existat dovezi concludente asupra eficienței, atât *in vitro* cât și *in vivo*, asupra principalelor căi și mecanisme celulare declanșate de expunerea la UVB.

Rezultatele tezei își au aplicabilitatea atât în preclinic, definind metode eficiente și rapide de testare a compușilor naturali, cât și în clinică, formularea în hidrogel dovedindu-se eficientă pentru aplicarea topică a extractelor naturale. Pe baza datelor obținute putem afirma că extractul de *Calluna Vulgaris* poate fi studiat în continuare în trialuri de fază 1 pentru stabilirea dozei optime și a eficacității la om.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

The Mechanisms Involved in Photochemoprevention with Natural Compounds

PhD Student **Elena-Diana Olteanu**

PhD Supervisor Prof.dr. **Adriana Mureșan**



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	19
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE IN THE FIELD OF CUTANEOUS PHOTOCARCINOGENESIS	21
1. Ultraviolet radiation	21
2. Carcinogenesis, definition and stages	23
3. Mechanisms involved in the UV induced carcinogenesis	23
3.1. DNA Lesions	23
3.2. Oxidative Stress	24
3.3. Apoptosis modulation	30
3.4. NF-kB signaling pathway modulation	31
3.5. AP1 signaling pathway modulation	32
4. Cancer chemoprevention	34
4.1. The sunscreen effect of natural compounds	35
4.2. Efficiency biomarkers of substances used in photochemoprevention	35
4.3. Substances with photochemopreventive potential	35
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Hypothesis / objectives	45
2. General methodology	45
2.1. Vegetal material	45
2.2. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study of polyphenols from Cv	46
2.3. Free radical scavenging activity of Cv extract using electron paramagnetic resonance measurements	52
2.4. UVB irradiation	52
2.5. In vivo experimental model	52
2.6. In vitro experimental model	54
3. Study 1. In vitro studies on the mechanisms involved in chemoprevention using <i>Calluna Vulgaris</i> on vascular endothelial cells exposed to UVB	59
3.1. Materials and methods	60
3.2. Results	63
3.3. Discussions	69
3.4. Conclusions	71

4. Study 2. Topical application of <i>Calluna vulgaris</i> hydrogel modulates DNA damage and apoptosis in SKH-1 hairless mice skin exposed to a single dose of UVB radiation	73
4.1. Introduction	73
4.2. Materials and methods	75
4.3. Epidermis proliferation	77
4.4. Results	79
4.5. Discussions	83
4.6. Conclusions	84
5. Study 3. Photochemoprotective effect of <i>Calluna vulgaris</i> extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice	87
5.1. Introduction	87
5.2. Materials and methods	88
5.3. Results	92
5.4. Discussions	96
6. General conclusions	103
7. Originality and innovative contributions of the thesis	105
REFERENCES	107

Key words: oxidative stress, malondialdehyde, apoptosis, chemoprevention, natural compounds, DNA damage, HUVEC, ultraviolet radiation

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE IN THE FIELD OF CUTANEOUS PHOTOCARCINOGENESIS

Cutaneous carcinoma represent approximately 30% of all new diagnosed cancer cases, with an incidence on the rise and in the etiology of which ultraviolet radiation, especially UVB (ultraviolet B) are incriminated in a proportion of 90%. The continuously increasing number of pre-malignant and malignant cutaneous lesions, the reduced efficiency of photoprotective creams, and the uncontrolled sun exposure are all reasons why there has been increased interest in recent years for the discovery of new, superior methods for the prevention of cutaneous neoplasia.

1. Ultraviolet radiation

Ultraviolet radiation have some beneficial effects on health, such as forming the vitamin D3, but prolonged exposure can also have damaging effects related to inducing the appearance of malignant processes. The UV spectrum ranges from 100-400 nm. In turn, UV radiation is divided in: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) and UVC (100-280 nm). The ozone layer absorbs efficiently UV radiation of wavelengths up to 310 nm, that is all UVC, 95% of UVB and no UVA. Recreational exposure to tanning lamps is also a carcinogen.

2. Carcinogenesis, definition and stages

Carcinogenesis is a multistage process in which cellular and molecular changes take place which lead to the development of malignant tumors. Experimental studies, carried out on rodents, of induced carcinogenesis showed that tumor development is a complex process, composed of distinct but tightly linked stages: tumor initiation, promotion, and progression.

3. Mechanisms involved in UV induced carcinogenesis

3.1 DNA Lesions

UVB acts both directly and indirectly on the DNA molecule. Directly, as a result of UV photon interaction with DNA molecules they move into an excited state in which electrons are rearranged and two photoproducts with dipyrimidinic structure are formed, the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and 6-4 pyrimidine-pyrimidone (6-4 PP). CPD forms more frequently than 6-4 PP and represents approximately 85% of the DNA's primary lesions induced by UV radiation, especially UVB. The formation of photoproducts interferes with DNA replication, it does not repair and, in consequence, specific mutations happen.

3.2. Oxidative stress

UVB is also involved indirectly in macromolecule destruction. It determines the formation of free radicals of oxygen and induces a significant decrease in antioxidants, thus blocking the skin's capacity to protect itself against reactive oxygen species (SRO) generated by exposure to sunlight.

3.2.1. Mechanisms of oxidative stress generation in UVB exposure

Tegument exposure to UVB determines the generation of reactive oxygen species in keratinocytes and fibroblasts: the superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), the hydroxyl radical (HO^-) and the singlet oxygen (1O_2), with noxious effects at the protein, lipid and nucleic acids level. The imbalance between the production of SRO and the cellular antioxidant capacity leads to oxidative stress, a contributive factor in a variety of pathologies, including cancer.

3.3. Apoptosis modulation

The term apoptosis was introduced in 1972 and it describes a special type of cellular death, different of necrosis.

Apoptotic stimulation activates at least one of the two major apoptosis pathways, the intrinsic or mitochondrial one, or the extrinsic or receptor mediated one. Both pathways activate the effector caspases in order to determine cellular death.

The sunburn cells (SC) are represented by the apoptotic keratinocytes. SC formation was proposed as a mechanism to eliminate the cells with the malignant potential controlled by p53 and which protects the individual from developing cutaneous cancers induced by UV.

3.4. Modulation of the NF-kB signaling pathway

NF-kB is a ubiquitous transcription factor involved in the signaling of cell proliferation and in tumor promotion and is activated by oxidants and other stimuli which generate the production of SRN.

NF-kB has an essential role in carcinogenesis as it antagonizes the function of the tumor suppression protein p53. Most of the natural compounds with a chemopreventive role, like curcumine, resveratrol, EGCG, lycopene, genistein, luteolin, act as inhibitors of the NF-kB pathway. These compounds can block one or more of the NF-kB pathway stages.

4. Cancer chemoprevention

Chemoprevention with the help of natural compounds, defined as “the use of agents capable of reducing the adverse effects of UVB on the epidermis”, represents a new concept in the effort to control carcinogenesis. This concept can be understood as a method to control tumor development by slowing it or even stopping it; this control is achieved through the administration of natural or chemically synthesized compounds.

The chemopreventive agents represented by phytochemical substances can block or reverse the premalignant stages (initiation or promotion) of multistage carcinogenesis. They can also stop or delay the development or progression of premalignant cells into malignant cells.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Hypothesis / objectives

In the first *in vitro* study we aimed to investigate the effects of UVB and Cv extract on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and demonstrate, in addition to the effects of the researched extract, that these cells react in a similar fashion to other tegument cells (keratinocytes, fibroblasts) with regards to oxidative stress, apoptosis and the UVB modulation of the NF- κ B pathway. These premises could lead to the idea that endothelial cells represent a cheap and viable way to study natural compounds with photochemopreventive potential.

In vivo we chose to study the effects of Cv extract by using a new delivery method to the tegument, a hydrogel. We used as animal model the SKH-1 mice, a model recognized in the literature. The second study in the thesis follows the effects of pre-treatment with a hydrogel containing *Calluna Vulgaris* on the skin of SKH-1 mice exposed to a single dose of UVB, with regards to nitrosative stress, DNA damage, apoptosis, and cell proliferation.

In the third study, also conducted *in vivo*, the effects of the extract's administration and irradiation over a 10 day period (recreating the exposure of a summer holiday) were researched. More precisely, we determined the effects of the Cv extract on the UVB mediated oxidative stress, on the inflammation biomarkers, on the epidermis morphology, and apoptosis. We also tested a new hydrogel as a delivery vehicle for photochemopreventive agents to the skin.

Study 1. *In vitro* studies on the mechanisms involved in chemoprevention using *Calluna Vulgaris* on vascular endothelial cells exposed to UVB

The current study researches the possible protective effects of a plant extract *C. vulgaris* (Cv), *in vitro*, on endothelial cell cultures exposed to different doses of UVB radiation, with regards to viability, ROS production/antioxidant status, apoptosis, NF-kB activation and DNA damage.

UVB irradiation induced oxidative stress and apoptosis in endothelial cells, through induction and activation of NF-kB and generated DNA damage in a dose dependent manner. The Cv extract modulated the UVB effects on endothelial cell cultures depending on the concentration of the extract. Cv in low concentration acted as an antioxidant and partially anti apoptotic factor, diminishing the UVB damaging effects on DNA, while the high concentration had a pro oxidant effect per se.

Taking into account the above mentioned positive effects of this extract and the fact the mechanism triggered by UVB radiation seems to be similar on endothelial cells, we decided to further test its effectiveness and safety on endothelial cell cultures.

Study 2. Topical application of *Calluna vulgaris* hydrogel modulates DNA damage and apoptosis in SKH-1 hairless mice skin exposed to a single dose of UVB radiation

The effects of the administration of the *Calluna vulgaris* (Cv) extract delivered via a hydrogel on SKH-1 mice skin were evaluated. The purpose of this study was to examine the interaction between nitrosative stress (nitric oxide – NO - dosage and evaluation of inducible nitric oxide synthetase's activity - iNOS) and induced DNA damage (through the dosage of cyclobutane pyrimidine dimers - CPD), apoptosis (sunburn cell formation) and epidermal hyperplasia (proliferating cell nuclear antigen – PCNA, the number of epidermal cell layers and the thickness of the epidermis).

UVB irradiation of SKH-1 mice skin determined an increase in the levels of certain nitrosative stress parameters (NO and iNOS) and it induced DNA damage (increased numbers of CPDs) which determined a normal cell reaction, that is the apoptosis of the damaged cells (highlighted by the increased sunburn cell numbers) and, additionally, it intensified the proliferation in the tegument (increased PCNA, epidermis thickness and number of epidermal layers).

Topical application of Cv via hydrogel reduced apoptosis induced by UVB and prevented the DNA damage, it conserved PCNA immunoreactivity in the exposure to UVB and it reduced the thickness and number of epidermal layers.

Study 3. Photochemoprotective Effect of *Calluna vulgaris* Extract on Skin Exposed to Multiple Doses of Ultraviolet B in SKH-1 Hairless Mice

This study was designed to assess the effects of Cv extract in the skin of SKH-1 hairless mice after exposure to multiple doses of UVB. Specifically, we determined the effects of Cv extract on UVB-mediated oxidative stress, biomarkers of inflammation, the morphology of the epidermal stratum, and apoptosis. We also aimed to test a hydrogel as a new vehicle to see whether it is appropriate for the delivery of photochemopreventive agents to the skin.

Multiple UVB exposures, with no protection, induced DNA damage, as shown by the increased number of sunburn cells and CPDs in the epidermis. The natural product we tested was able to significantly reduce the formation of CPDs and, as a consequence, the number of sunburn cells triggered by DNA damage.

Cv was shown to have positive effects on the skin when administered before UVB exposure. Although it did not improve the oxidant/antioxidant balance, it reduced inflammation and reduced the noxious effects of UVB on DNA, as shown by decreased numbers of CPDs and sunburn cells. In addition, we have demonstrated that a hydrogel is a viable way of delivering natural products to the skin.

6. General conclusions

1. UVB irradiation induced oxidative stress and apoptosis by activating NF- κ B and it determined DNA damage in a dose dependent manner.

2. The Cv extract mediated the effects of UVB on endothelial cell cultures in accordance with its concentration. In low concentrations, Cv acted as an antioxidant and, partially, as an anti-apoptotic agent, reducing the noxious effects of UVB on DNA, while higher concentrations had a pro-oxidant effect per-se.

3. A single irradiation with UVB determined an increase in the levels of nitrosative stress parameters, it induced DNA damage and the apoptosis of damaged cells, while at the same time it determined proliferation in the tegument.

4. Topical application of Cv via hydrogel reduced apoptosis induced by UVB and prevented the DNA damage, it conserved PCNA immunoreactivity in the exposure to UVB and it reduced the thickness and number of epidermal layers.

5. *In vivo* multiple UVB exposures led to DNA damage, as proven by the increased numbers of sunburn and CPD positive cells in the epidermis.

6. The Cv extract, although not improving the oxidant/anti-oxidant balance, reduced the inflammation and the noxious effects of UVB on DNA, as shown by the reduced numbers of sunburn and CPD positive cells.

7. The hydrogel is a viable way for the topical administration of natural compounds to the skin.

8. The administration of Cv via hydrogel can be a viable chemoprevention method.

7. Originality and innovative contributions of the thesis

The PhD thesis is original through the research conducted, both *in vitro* and *in vivo* on experimental models and it represents a good investigative model for the effects of natural compounds with photochemopreventive potential, it highlights the importance of investigating the intracellular mechanisms and signaling pathways, and it demonstrates the importance of conducting in-depth studies before the use of these natural compounds, which at first sight appear to be harmless.

The PhD thesis demonstrates that the effects of UVB radiation on endothelial cells (HUVEC) are similar to the ones obtained in the *in vitro* keratinocyte studies and thus, this type of cells can be used in the future for the study of natural compounds and of their photochemopreventive effect, being less costly and easier to handle.

In the thesis we investigated, using a multidisciplinary team, the effects of a new extract, for the efficacy of which there was no prior conclusive evidence, both *in vitro* and an *in vivo* the main pathways and mechanisms triggered by the exposure to UVB.

The results of this thesis can be applied both in pre-clinical, as they define quick and efficient methods for natural compound testing, and in clinical, the hydrogel formulation being proved efficient for the topical application of natural extracts. Based on the obtained data, we can state that the *Calluna Vulgaris* extract should continue to be studied in phase 1 clinical trials in order to establish the optimal dosage and its efficacy in humans.