

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
" VICTOR BABEȘ " TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul III Științe Funcționale**

LELCU THEIA



REZUMAT

**CONSIDERAȚII PRIVIND DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN
HEMOPATIILE MALIGNE**

Coordonator științific:
PROF. UNIV. MUNTEAN MIRELA-DANINA

Coordonator științific în cotutelă:
PROF. UNIV. BORZA CLAUDIA

**Timișoara
2022**

CUPRINS

LISTA DE PUBLICAȚII.....	VII
LISTA ABREVIERILOR.....	VIII
INDEXUL FIGURILOR.....	X
INDEXUL TABELELOR.....	XII
INTRODUCERE.....	XV
MOTIVAȚIA STUDIULUI ȘI OBIECTIVE.....	XVII
PARTEA GENERALĂ - ANALIZA LITERATURII.....	1
1. PREZENTARE GENERALĂ A HEMOPATIILOR MALIGNE.....	1
1.1 LEUCEMIA ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ PEDIATRICĂ.....	3
1.2 LEUCEMIA MIELOIDĂ ACUTĂ.....	4
1.3 LEUCEMIA LIMFOIDĂ CRONICĂ.....	5
2. DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN CANCER ȘI ÎN HEMOPATII MALIGNE.....	7
2.1. STRUCTURA ȘI FUNȚIA MITOCONDRIILOR.....	7
2.2. DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN CANCER.....	13
2.3. DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN HEMOPATII MALIGNE.....	19
2.3.1. DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN LEUCEMIA MIELOIDĂ ACUTĂ.....	20
2.3.2 DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN LEUCEMIA LIMFOBLASTICĂ ACUTĂ.....	22
2.3.3.3 DISFUNȚIA MITOCONDRIALĂ ÎN LEUCEMIA LIMFOIDĂ CRONICĂ.....	24
3. PREZENTARE GENERALĂ A COMPUȘILOR CARE VIZEAZĂ FUNȚIA MITOCONDRIALĂ.....	27
3.1 COMPUȘI DE TIP SUCCINAT PERMEABIL CELULAR ȘI MITOCONDRIILE.....	27
3.2 ALBASTRUL DE METILEN ȘI MITOCONDRIILE.....	28
3.3 COMPUȘII NATURALI ȘI MITOCONDRIILE.....	29
3.3.1 EUGENOLUL ȘI MITOCONDRIILE.....	31
3.3.2. BROMELAINA.....	32
PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE.....	34
MOTIVAȚIA TEZEI.....	34
OBIECTIVELE LUCRĂRII DE DOCTORAT.....	35
ETICA.....	35
PRELEVAREA DE PROBE DE SÂNGE PERIFERIC.....	36
REACTIVI.....	36
ANALIZA DATELOR.....	36
1. STUDIUL 1 - EVALUAREA DEPENDENȚEI DE VÂRSTĂ A RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE LA COPIII FĂRĂ HEMOPATII MALIGNE.....	37
1.1 SCOPUL STUDIULUI.....	37
1.2 MATERIAL ȘI METODE.....	37
1.2.1 Izolarea trombocitelor.....	37
1.2.2.2 Descrierea tehnicii de respirometrie de înaltă rezoluție.....	38
1.2.3 Protocoale experimentale.....	39
1.3 REZULTATE: INFLUENȚA VÂRSTEI ASUPRA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE LA COPIII SĂNĂTOȘI.....	41
1.4 DISCUȚII PRIVIND DEPENDENȚA VÂRSTEI A RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE LA COPIII SĂNĂTOȘI.....	47
2. STUDIUL 2 - CARACTERIZAREA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE LA PACIENȚII PEDIATRICI CU LEUCEMIE ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ ACUTĂ NOU DIAGNOSTICATĂ.....	50
2.1 SCOPUL STUDIULUI.....	50
2.2 MATERIALE ȘI METODE.....	50
2.3 REZULTATE PRIVIND DISFUNȚIA RESPIRATORIE TROMBOCITARĂ LA COPIII NOU DIAGNOSTICAȚI CU LEUCEMIE ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ.....	52

2.4 DISCUȚII PRIVIND DISFUNCTIA MITOCONDRIALĂ TROMBOCITARĂ LA COPIII NOU DIAGNOSTICAȚI CU LEUCEMIE ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ.....	57
3. STUDIUL 3 - EVALUAREA EFECTELOR SUCCINATULUI PERMEABIL LA UN PACIENT CU LEUCEMIE ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ PEDIATRICĂ ÎN REMISIUNE - UN STUDIU DE CAZ.....	62
3.1 SCOPUL STUDIULUI.....	62
3.2 MATERIAL ȘI METODE.....	62
3.2.1 Protocol experimental.....	63
3.3 REZULTATE PRIVIND RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ TROMBOCITARĂ ÎN FAZA DE REMISIUNE A LEUCEMIEI LIMFOBLASTICE ACUTE.....	65
3.4 REZULTATE: EFECTUL UNUI COMPUS DE TIP SUCCINAT PERMEABIL ASUPRA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE ÎN FAZA DE REMISIUNE A LEUCEMIEI LIMFOBLASTICE ACUTE.....	66
3.5 DISCUȚII PRIVIND RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ TROMBOCITARĂ ÎN FAZA DE REMISIUNE A LEUCEMIEI ACUTE LIMFOBLASTICE ȘI EFECTUL UNUI COMPUS DE TIP SUCCINAT PERMEABIL ÎN CADRUL LEUCEMIEI ACUTE LIMFOBLASTICE PEDIATRICE.....	68
4. STUDIUL 4 - EVALUAREA RESPIRAȚIEI MITOCONDRIALE TROMBOCITARE LA PACIENȚII ADULȚI HEMOPATII MALIGNE (HM) NOU DIAGNOSTICATE - UN STUDIU DE CAZ.....	73
4.1 SCOPUL STUDIULUI.....	73
4.2 MATERIAL ȘI METODE.....	73
4.2.1 Protocol experimental.....	74
4.3 REZULTATE PRIVIND RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ TROMBOCITARĂ LA PACIENȚII ADULȚI CU HEMOPATII MALIGNE.....	76
4.4 DISCUȚII CU PRIVIRE LA RESPIRAȚIA MITOCONDRIALĂ TROMBOCITARĂ ÎN CAZUL TUMORILOR HEMOPATIILOR MALIGNE LA ADULȚI.....	78
5. STUDIUL 5 - EVALUAREA EFECTELOR A DOI COMPUȘI NATURALI ASUPRA BIOENERGETICII MITOCONDRIALE ÎNTR-O LINIE CELULARĂ DE KERATINOCITE UMANE (HaCaT).....	81
5.1 SCOPUL STUDIULUI.....	81
5.2 MATERIAL ȘI METODE.....	81
5.2.1 Prepararea celulelor.....	81
5.2.2.2 Analiza profilului bioenergetic al keratinocitelor (HaCaT).....	82
5.2.3 Protocol experimental.....	82
5.2.4 Analiza statistică.....	83
5.2.5 Pregătirea plăcilor de celule.....	84
5.3 REZULTATE PRIVIND PROFILUL BIOENERGETIC AL KERATINOCITELOR (HaCaT) ÎN PREZENȚA EUGENOLULUI.....	85
5.4 DISCUȚII PRIVIND PROFILUL BIOENERGETIC AL KERATINOCITELOR (HaCaT) ÎN PREZENȚA EUGENOLULUI.....	88
5.5 REZULTATE PRIVIND EFECTUL DEPENDENT DE DOZĂ AL BROMELAINEI ASUPRA PROFILULUI BIOENERGETIC AL KERATINOCITELOR (HaCaT).....	90
5.6 DISCUȚII PRIVIND PROFILUL BIOENERGETIC AL KERATINOCITELOR (HaCaT) ÎN PREZENȚA BROMELAINEI ȘI A ALBASTRULUI DE METILEN.....	91
DISCUȚII GENERALE.....	94
CONCLUZII.....	97
BIBLIOGRAFIE.....	100

Cuvinte cheie: hemopatii maligne, copii, adulți, respirația mitocondrială la nivel trombocitar, respirometrie de înaltă rezoluție, succinat permeabil celular (NV118), eugenol, bromelaină, bioenergetica keratinocitelor umane, analizor de flux extracelular.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Incidența cancerului, inclusiv a hemopatiilor maligne, este în creștere la nivel mondial, în ciuda eforturilor majore de cercetare pentru descoperirea de noi biomarkeri, metode de diagnostic și noi agenți terapeutici. Leucemiile sunt caracterizate printr-o proliferare anormală a precursorilor maligni în măduva osoasă și pot fi clasificate în funcție de debut și de tipul de celule proliferante în: leucemii acute și cronice, respectiv limfoide sau mieloide.

În ultimele decenii, a fost demonstrat faptul că disfuncția mitocondrială reprezintă un mecanism fiziopatologic central și o țintă terapeutică în majoritatea bolilor cronice, inclusiv în toate tipurile de neoplazii. Disfuncția respiratorie mitocondrială este evaluată în prezent prin măsurarea consumului de oxigen la nivelul probelor tisulare și celulare cu ajutorul a două echipamente de cercetare de ultimă generație, oxigraful-2K (Oroboros Instr.) care permite realizarea tehnicii de respirometrie de înaltă rezoluție și analizorul de flux extracelular (Seahorse Bioscience, Agilent), acesta din urmă permițând măsurarea atât a consumului de oxigen, cât și indirect, a glicolizei anaerobe.

În ultimii ani, s-a remarcat interesul comunității științifice pentru evaluarea funcției mitocondriale a elementelor figurate din sângele periferic într-o multitudine de patologii acute și cronice și în special, a funcției respiratorii a trombocitelor, pornind de la premisa că alterarea funcției mitocondriale la nivelul celulelor circulante poate servi ca biomarker al disfuncției mitocondriale de țesut/organ.

Datele din literatura de specialitate referitoare la disfuncția mitocondrială la nivel trombocitar în hemopatiile maligne sunt extrem de limitate. Există un studiu de referință în care a fost raportată disfuncția mitocondrială trombocitară la adulți diagnosticați cu hemopatii maligne și care urmau chimioterapia standard. Nu există date în literatura de specialitate date cu privire la respirația trombocitelor la copiii cu hemopatii maligne.

Disfuncția mitocondrială asociată afecțiunilor maligne este agravată de efectele secundare ale chimioterapiei. În ultimii ani, există o uriașă activitate de cercetare adresată caracterizării compușilor farmacologici cu efect țintit la nivel mitocondrial (agenții mitocondriotropi) care au ca scop susținere restabilirea funcției mitocondriale alterate de maladiile acute și cronice. Dintre acești agenți, o clasă de compuși aflați în curs de evaluare pentru bolile mitocondriale însoțite de defecte ale complexului I, sunt cei de tip succinat permeabil. Studii recente au raportat faptul că un compus de tip succinat permeabil celular, NV118, a ameliorat respirația trombocitară

nu doar în multiple patologii ci și în cadrul disfuncției mitocondriale induse de diferite medicamente, cum ar fi paracetamolul, metforminul, statinele și amiodarona.

În ciuda progreselor majore în îmbunătățirea terapiei și a prognosticului pacienților diagnosticați cu boli neoplazice, inclusiv a celor cu hemopatii maligne, un procent semnificativ de pacienți prezintă afectări multiorgan, inclusiv determinări cutanate. În căutarea unor alternative terapeutice, în literatura de specialitate a patologiei oncologice, au fost cercetați o multitudine de compuși naturali și efectele acestora asupra metabolismului și respirației mitocondriale. În consecință, acești compuși au fost utilizați frecvent în asociere cu chimioterapia sistemică clasică, în diferite tipuri de tumori maligne. Localizarea cutanată a celulelor tumorale circulante determină leziuni infiltrative cunoscute sub numele de *leukemia cutis*, mai frecvent diagnosticate în leucemia mieloidă acută. Mai multe substanțe fitochimice au fost investigate, inclusiv la nivel mitocondrial, pentru efectele lor benefice, anticancerigene, asupra diferitelor linii celulare maligne; cu toate acestea, a fost mai puțin investigat dacă acestea interferează cu funcția bioenergetică mitocondrială a liniilor celulare de keratinocite umane normale.

Bromelaina (BR) reprezintă un amestec enzimatic derivată din tulpina de ananas, *Ananas comosus* L, cu multiple proprietăți care includ: efecte antibacteriene, antifungice, antiagregante, fibrinolitice, antiinflamatorii și antineoplazice.

Eugenolul (EUG) sau 4-alil-2-metoxifenol se găsește în mod obișnuit în uleiul de cuișoare și prezintă mai multe proprietăți benefice: antivirale, antibacteriene, antifungice, antihelmintice, antioxidante, antiinflamatorii și antineoplazice. Eugenolul prezintă un comportament hormetic, dozele reduse fiind protectoare, în timp ce dozele mai mari sunt toxice și induc moartea celulară la nivelul celulelor maligne.

Obiectivele cercetării doctorale au fost următoarele:

1. Caracterizarea dependenței de vârstă a respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate de la copii sănătoși.
2. Caracterizarea respirației mitocondriale trombocitare la debutul leucemiei acute limfoblastice (LAL) pediatrice.
3. Evaluarea efectului unui nou compus de succinat permeabil celular asupra respirației mitocondriale a trombocitelor în faza de remisiune a LAL pediatrice.
4. Caracterizarea disfuncției mitocondriale a trombocitelor prelevate de la pacienți adulți recent diagnosticați cu leucemie acută mieloidă (LAM) și leucemie limfoidă cronică (LLC).

5. Evaluarea efectelor a doi compuși naturali, eugenolul și bromelaina, asupra bioenergeticii liniei de keratinocite umane (HaCaT).

Aceste obiective sunt în concordanță cu direcțiile de cercetare ale Centrului de Cercetare Translațională și Medicina Sistemelor din cadrul Disciplinei de Fiziopatologie din cadrul Departamentului de Științe Funcționale al Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" din Timișoara, unde au fost efectuate experimentele, fiind totodată concordante cu strategia de cercetare a universității noastre.

Studiile incluse în Partea specială a tezei sunt prezentate succint în continuare:

I. Caracterizarea dependenței de vârstă a respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate de la copii fără hemopatii maligne.

Obiectivul primului studiu al prezentei lucrări doctorale a constatat în evaluarea dependenței de vârstă a respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate de la copii sănătoși. Lotul de studiu a fost reprezentat de pacienți pediatrici cu vârste cuprinse între 10-17 ani, la care au fost excluse patologiile ce pot influența respirația mitocondrială, anume patologii infecțioase, inflamatorii și oncologice. Lotul de studiu a fost subdivizat ulterior în 3 grupuri de studiu formate din copii cu vârste cuprinse între 10-11 ani, 13-14 ani și respectiv 16-17 ani.

Rezultatele acestui studiu pilot au evidențiat o scădere influențată de vârstă a respirației mitocondriale trombocitare.

Respirația bazală la copiii cu vârste cuprinse între 10-11 ani a fost semnificativ crescută, comparativ cu respirația la grupul cu vârste cuprinse între 13-14 ani și respectiv, vârste cuprinse între 16-17 ani (Figura 1A, $p < 0.0001$). Nu au fost raportate diferențe semnificative a respirației bazale la copiii cu vârste cuprinse între 13-14 ani și 16-17 ani.

În ceea ce privește respirația activă dependentă de complexul I, nu au fost detectate diferențe semnificative în analiza comparativă a celor trei grupe de vârstă (Figura 1B). Respirația activă maximă dependentă de complexe I și II, a scăzut semnificativ odată cu vârsta, fiind raportate diferențe semnificative între grupul de 10-11 ani și celelalte două grupuri (Figura 1C, $p < 0.01$). Nu au fost raportate diferențe semnificative în ceea ce privește respirația maximă activă dependentă de complexe I și II a grupurilor mai în vârstă.

În ceea ce privește respirația non-fosforilantă dependentă de ambele complexe, a fost observată o scădere semnificativă dependentă de vârstă (Figura 1D, $p < 0.01$).

De asemenea, în cazul respirației maxime decuplate dependente de complexul I și II, a fost constată o scădere semnificativă dependentă de vârstă, fiind obiectivate diferențe semnificative între grupul de 10-11 ani și celelalte două grupuri, de 13-14, respectiv 16-17 ani (Figura 1E, $p < 0.01$). În ceea ce privește respirația maximă decuplată dependentă de complexul II, a fost obiectivată o scădere semnificativă o dată cu vârsta (Figura 1F, $p < 0.05$).

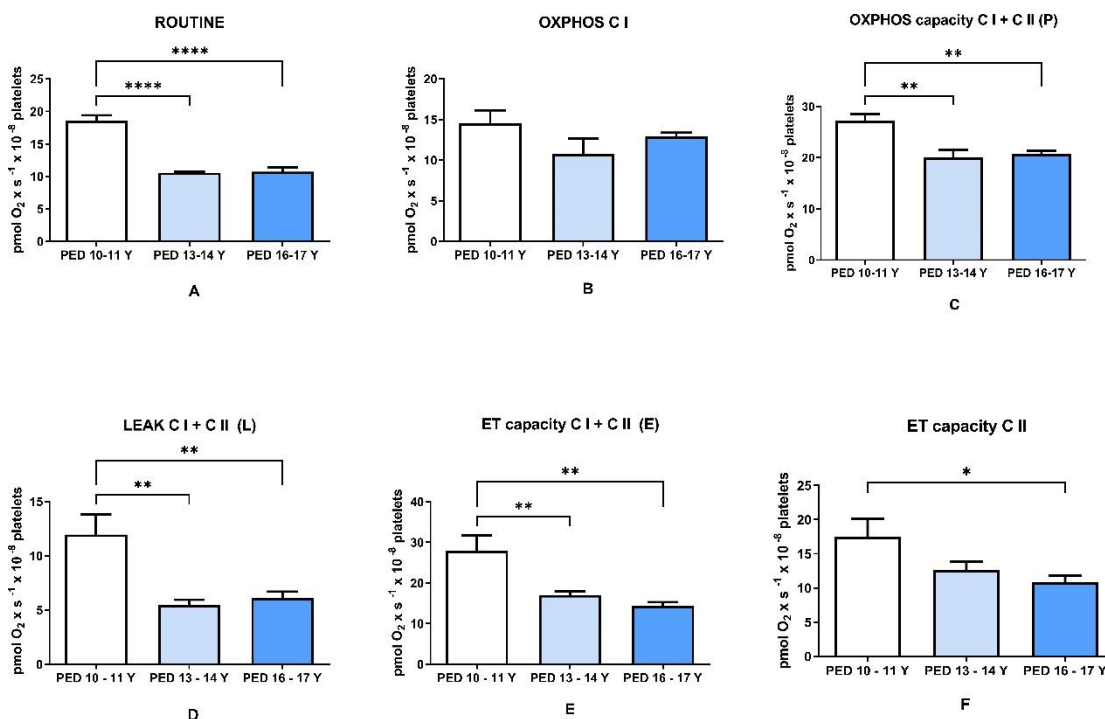


Figura 1. Dependența de vârstă a respirației mitocondriale plachetare la copiii sănătoși.

Ratele respiratorii sunt exprimate în $\text{pmol O}_2 \times \text{s}^{-1} \times 10^{-8}$ celule,

II. Caracterizarea respirației mitocondriale plachetare la debutul LAL pediatrice.

Cel de-al doilea studiu a avut drept scop caracterizarea modificărilor respirației mitocondriale la nivel trombocitar la un lot pilot de pacienți pediatrici nou diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică (LAL), anterior inițierii terapiei chimioterapice, fiind comparate cu lotul de copii sănătoși de aceeași vârstă.

S-a observat o scădere semnificativă a respirației bazale, la copiii nou diagnosticați cu LAL, în comparație cu copiii sănătoși cu vârstă concordantă (Figura 2A, $p < 0.0001$).

Respirația activă dependentă de complexul I a fost semnificativ crescută la debutul LAL (Figure 2B, $p < 0,05$). Cu toate acestea, în ceea ce privește respirația activă dependentă de ambele complexe, nu au fost observate diferențe semnificative între cele două loturi pediatrice (Figure 2C).

La debutul LAL pediatrice, a fost observată o scădere semnificativă a respirației maxime decuplate dependentă de complexul I și II (Figure 2D, $p < 0,05$). De asemenea, în cadrul lotului de pacienți pediatrici nou diagnosticați cu LAL, respirația maximă decuplată dependentă de complexul II a fost semnificativ scăzută comparativ cu cea a lotului pediatric de control (Figure 2E, $p < 0,05$).

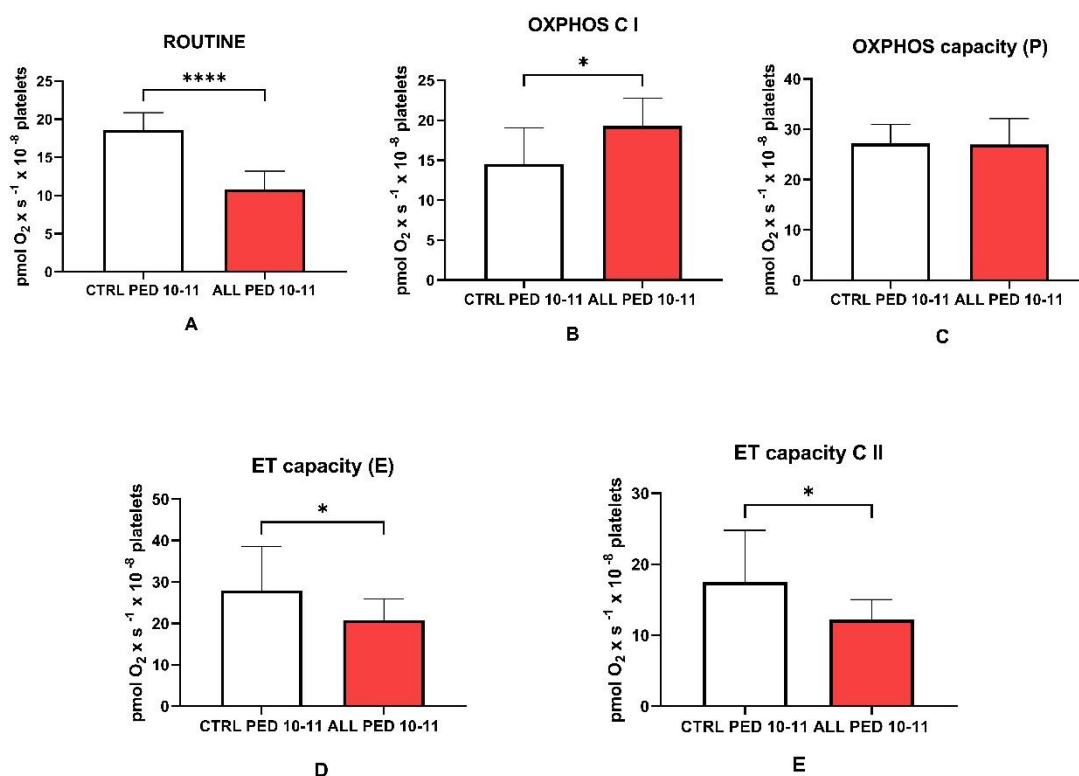


Figura 2. Respirația mitocondrială la nivel trombocitar la pacienți pediatrici nou-diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică.

Ratele respiratorii sunt exprimate în pmol O₂ x s⁻¹ x 10⁻⁸ celule,

III. Evaluarea efectului unui nou compus de tip succinat permeabil asupra respirației mitocondriale plachetare în faza de remisiune a LAL pediatrice.

Cel de-al treilea studiu a fost un studiu de caz ce a avut ca scop evaluarea respirației mitocondriale plachetare în timpul fazei de remisiune a LAL pediatrice și a efectului unui nou compus de tip succinat permeabil celular, NV118 (diacetoxymetil succinat), asupra respirației mitocondriale plachetare în cazul unui pacient pediatric la care s-a finalizat tratamentul chimioterapic și la care a fost confirmată remisiunea bolii.

A fost efectuată analiza comparativă a ratelor respiratorii detectate în cazul aceluiași pacient la debutul bolii și în faza de remisiune, în prezența NV118 (500 μ M) și a DMSO (control).

În perioada de remisiune a LAL pediatrice a fost constată o îmbunătățire a respirației active dependente de complexul I și II. De asemenea, a fost observată o ameliorare a respirației maxime decuplate dependente de ambele complexe.

În ceea ce privește efectul compusului de tip succinat permeabil, NV118, asupra respirației mitocondriale trombocitare în faza de remisiune a LAL, a fost constată o îmbunătățire considerabilă a ratelor respiratorii studiate (Figura 3). Succinatul permeabil a indus o creștere cu 75,96% a respirației bazale. De asemenea, NV118 a indus o creștere cu 96,11%, a respirației non-fosforilante dependente de ambele complexe. Referitor la respirația maximă decuplată dependentă de complexul I și II, succinatul permeabil a determinat o creștere de 187% a acesteia, în timp ce respirația maximă decuplată dependentă de complexul II a prezentat o creștere cu 242 %.

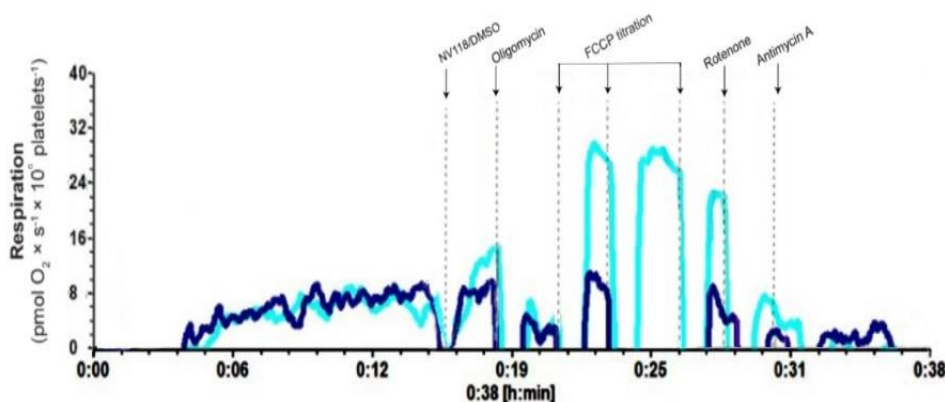


Figura 3. Trasee reprezentative de respirometrie de înaltă rezoluție la trombocitele izolate de la un caz pediatric cu LAL în remisiune, în prezența DMSO (bleumarin) și a NV118 (albastru deschis).

IV. Caracterizarea disfuncției mitocondriale în trombocite prelevate de la pacienți adulți recent diagnosticați cu LAM și LLC.

Acest studiu a avut drept scop caracterizarea respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate de la doi pacienți adulți recent diagnosticați cu HM anterior tratamentului, valorile fiind comparate cu ratele respiratorii observate în cazul unui voluntar adult sănătos.

În cazul pacientului adult nou diagnosticat cu LAM, respirația mitocondrială trombocitară bazală a fost crescută comparativ cu cea a observată în cazul voluntarului adult. În ceea ce privește respirația activă dependentă de complexul I, nu au fost detectate diferențe semnificative între pacientul adult diagnosticat cu LAM și voluntarul sănătos.

Cu toate acestea, respirația maximă activă dependentă de ambele complexe a prezentat un trend descendent în cazul pacientului cu LAM.

Respirația non-fosforilantă dependentă de complexe I și II, detectată la pacientul adult diagnosticat cu LAM a prezentat o creștere comparativ cu cea obiectivată la voluntar.

De asemenea, respirația maximă decuplată dependentă de complexe I și II a fost scăzută în cazul pacientului diagnosticat cu LAM. Aceeași tendință de scădere a fost observată și pentru respirația maximă decuplată susținută de complexul II. În ceea ce privește eficiența de cuplare, mitocondriile de la pacientul cu LAM au prezentat o scădere clară.

În cazul pacientului adult nou diagnosticat cu LLC, respirația activă dependentă de ambele complexe mitocondriale a fost, de asemenea, scăzută la nivelul trombocitelor prelevate de la pacientul cu LLC comparativ cu martorul sănătos. O tendință descendentă majoră a fost observată în respirația maximă decuplată a ambelor complexe, precum și pentru respirația maximă decuplată a complexului II al trombocitelor izolate de la pacientul cu LLC.

V. Evaluarea efectelor a doi compuși naturali, eugenolul și bromelaina, asupra bioenergeticii celulelor HaCaT

În acest ultim studiu au fost evaluate efectele a doi compuși naturali cu efecte anticancerigene cunoscute asupra bioenergeticii mitocondriale a keratinocitelor umane imortalizate (HaCaT) prin evaluarea a 2 parametri, rata de consum a oxigenului (OCR), cât și a ratei acidificării celulare (ECAR).

Efectele dependente de timp ale eugenolului (EUG, 50 μ M) asupra profilului bioenergetic al celulelor HaCaT au fost evaluate la 24, 48 și 72 de ore. Celulele HaCaT pentru acest protocol experimental au fost repartizate în 3 grupuri:

- Grupul 1 (CTRL, celule netratate);
- Grupul 2 (celule tratate cu DMSO 50 μ M, care a fost utilizat pentru a pregăti soluția stoc de EUG);
- Grupul 3 (celule tratate cu 50 μ M EUG).

La 24 de ore de tratament cu eugenol (EUG), nu s-a constatat nicio diferență semnificativă atât în ceea ce privește rate de consum a oxigenului (OCR), cât și a ratei acidificării celulare (ECAR). La 48 de ore de tratament cu eugenol (EUG), a fost detectată o scădere semnificativă atât a OCR (Figura 4A), cât și a ECAR (Figura 4B), $p < 0,0001$. Mai mult, tratamentul cu eugenol al celulelor HaCaT timp de 72 de ore a condus la cele mai scăzute valori ale OCR (Figura 4C) și, respectiv, ECAR (Figura 4D), $p < 0,0001$, sugerând un efect toxic la nivelul celulelor epiteliale normale.

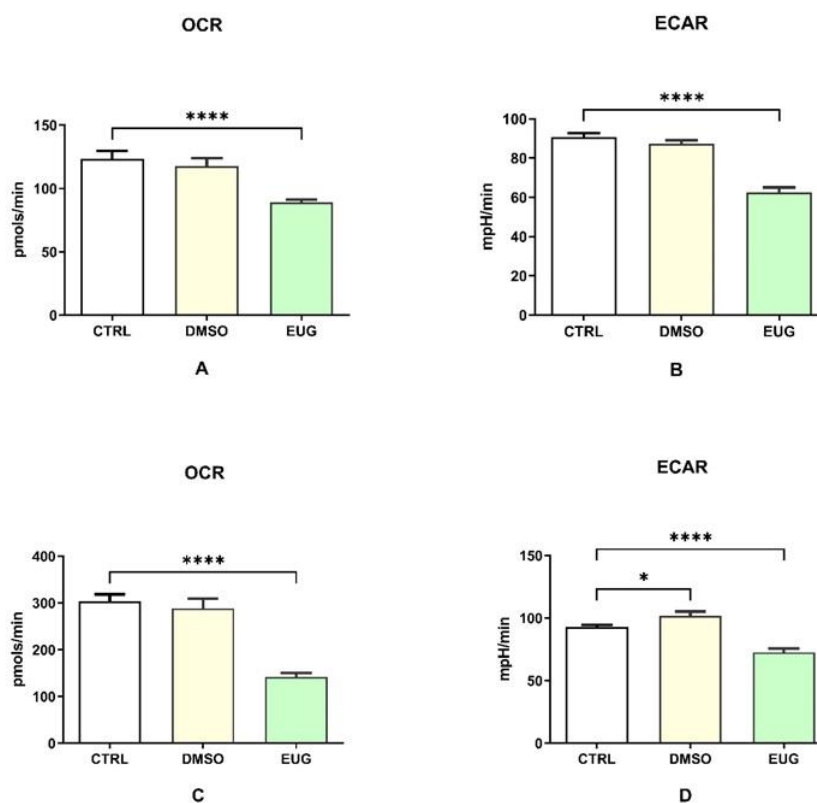


Figura 4. Efectele în funcție de timp ale eugenolului (EUG, 50 μ M) asupra profilului bioenergetic al celulelor HaCaT la 24, 48 și 72 de ore.

De asemenea, efectele dependente de doză ale bromelainei (BR) în concentrații crescânde (0,25 μ g/mL, 2,5 μ g/mL și 25 μ g/mL) asupra bioenergeticii și glicolizei anaerobe pe celulele HaCaT la 24 de ore au fost evaluate și comparate cu cele ale albastrului de metilen (MB, 0,1 μ M).

Keratinocitele HaCaT din acest protocol experimental au fost împărțite în 5 grupuri:

- Grupul 1: grupul de control (celule netratate);
- Grupul 2: celule tratate cu bromelaină în concentrație de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (BR 0,25);
- Grupul 3: celule tratate cu bromelaină în concentrație de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (BR 2,5);
- Grupul 4: celule tratate cu bromelaină în concentrație de 25 $\mu\text{g/mL}$ (BR 25);
- Grupul 5: celule tratate cu albastru de metilen în concentrație de 0,1 μM (MB).

Bromelaina a determinat o creștere dependentă de doză a OCR, cea mai mare doză de bromelaină a indus la cel mai crescut OCR (Figura 5A).

Incubarea cu bromelaină a determinat o scădere corespunzătoare a ECAR, în mod similar, cea mai mare doză de bromelaină a indus cea mai scăzută valoare a ECAR (Figura 5B). În ceea ce privește MB (0,1 μM), nu s-a constatat niciun efect asupra OCR, ci doar o tendință de scădere a ECAR, fără semnificație statistică.

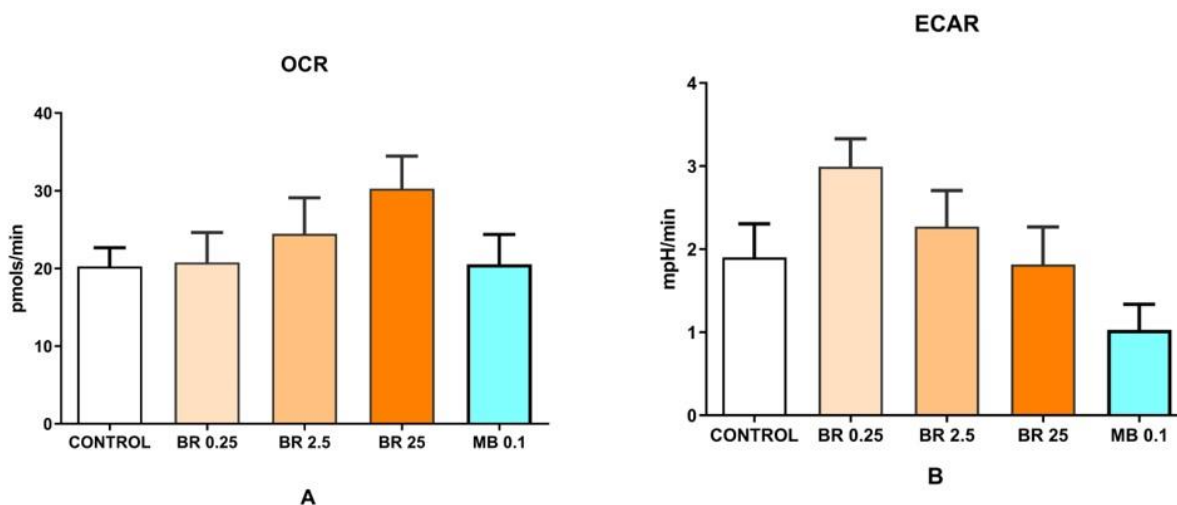


Figura 5. Efectele dependente de doză ale bromelainei asupra profilului bioenergetic al celulelor HaCaT la 24 de ore.

VI. CONCLUZII

1. Modificările dependente de vârstă ale respirației mitocondriale plachetare apar la copiii sănătoși.
2. Modificările au constat într-o scădere semnificativă a respirației active și a respirației maxime decuplate dependente de complexul I și II odată cu vârsta.
3. Modificările dependente de vârstă interesează respirația dependentă de complexul II deoarece nu s-au constatat modificări semnificative pentru parametrii respiratori dependenți de CI .
4. Disfuncția mitocondrială plachetară este prezentă la debutul leucemiei acute limfoblastice pediatrice, anterior inițierii tratamentului.
5. Afectarea respirației plachetare la copiii cu LAL a fost caracterizată de o creștere a respirației active susținute de CI, în timp ce a avut loc o scădere semnificativă a respirației maxime decuplate pentru ambele complexe.
6. Respirația mitocondrială trombocitelor este ameliorată în faza de remisiune a LAL pediatică, în special în ceea ce privește respirația maximă decuplată dependentă de CI și CII.
7. NV118, un compus de tip succinat permeabil, a determinat o creștere semnificativă a tuturor parametrilor respiratori în faza de remisiune a leucemiei acute limfoblastice pediatrice.
8. Disfuncția respiratorie a trombocitelor a fost, de asemenea, constatată la adulții nou diagnosticați cu hemopatii maligne, anterior intervenției terapeutice.
9. Deteriorarea respirației plachetare la adulții cu leucemie mieloidă acută și leucemie limfoidă cronică au fost comparabile cu cele constatate la copii, fiind observate o scădere

semnificativă a respirației maxime active și a respirației maxime decuplate pentru ambele complexe.

10. Eugenolul a determinat o scădere dependentă de timp a markerilor bioenergetici, respectiv a fosforilării oxidative și a glicolizei anaerobe, cu un efect maxim la 72 de ore de tratament la nivelul liniei celulare de keratinocite umane HaCaT.
11. Bromelaina a provocat o modificare dependentă de doză în profilul bioenergetic al keratinocitelor umane, cu o creștere a fosforilării oxidative și o scădere corespunzătoare a glicolizei anaerobe.
12. Albastrul de metilen a provocat un răspuns comparabil, dar mai redus decât bromelaina în ceea ce privește scăderea glicolizei anaerobe la nivelul celulelor HaCaT.

VII. CONTRIBUȚII ORIGINALE

- Caracterizarea în premieră a dependenței de vârstă a respirației mitocondriale la nivelul trombocitelor izolate de la copii sănătoși.
- Identificare în premieră a modificărilor respirației mitocondriale trombocitare la debutul leucemiei acute limfoide (LAL) pediatrice.
- Evaluarea efectelor succinatului permeabil asupra respirației mitocondriale plachetare în faza de remisiune a LAL pediatrice.
- Caracterizarea disfuncției respiratorii mitocondriale la nivelul trombocitelor prelevate de la pacienți adulți recent diagnosticați cu leucemie acută mieloidă și leucemie limfoidă cronică.
- Evaluarea efectelor a doi compuși naturali, eugenolul și bromelaina, asupra bioenergeticii celulelor HaCaT.

VIII. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

- ❖ Investigarea apariției modificărilor dependente de vârstă ale respirației mitocondriale la nivelul celulelor sanguine periferice (trombocite și celule mononucleare) la nivelul unei populații pediatrice semnificative.
- ❖ Caracterizarea efectelor succinatului permeabil asupra profilului bioenergetic a mai multor linii celulare maligne.
- ❖ Evaluarea efectelor bromelainei asupra profilului bioenergetic al celulelor cutanate maligne, singur și în asociere cu medicamentele convenționale prescrise în terapia leucemiei cutanate în vederea evaluării posibilelor interferențe.
- ❖ Evaluarea efectului bioenergetic al nanoformulărilor/nanostructurilor pe bază de compuși fitochimici care țintesc mitocondriile, dezvoltate de colaboratorii din cadrul Facultății de Farmacie și/sau din străinătate.
- ❖ Evaluarea dependenței vârstei a producției de specii reactive de oxigen și a apărării antioxidante la o populație pediatrică cu și fără HM.

IX. PUBLICAȚII ȘTIINȚIFICE

1. **Theia Lelcu**, Anca M. Bîna, Maria D. Dănilă, Calin M. Popoiu, Oana M. Aburel, Smaranda T Arghirescu, Claudia Borza, Danina M. Muntean, *Assessment of Platelet Mitochondrial Respiration in a Pediatric Population: A Pilot Study in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia*, **Children** 2021; <https://www.mdpi.com/2227-9067/8/12/1196> **ISI journal IF 2.863**
2. Oana M. Aburel, Ioana Z. Pavel, Maria D. Dănilă, **Theia Lelcu**, Alexandra Roi, Rodica Lighezan, Danina M. Muntean, Laura C. Rusu, *Pleiotropic Effects of Eugenol: The Good, the Bad, and the Unknown*, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2021, Article ID 3165159, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2021/3165159/> **ISI journal IF 6.543**
3. **Theia Lelcu**, Anca-Mihaela Bîna, Vlad-Florian Avram , Smaranda-Teodora Arghirescu, Claudia Borza, Mirela-Danina Muntean, *Permeable Succinate Improved Platelet Mitochondrial Respiration in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in Remission – Case Report*, **Scripta Medica** 2022; DOI:10.5937/scriptamed53-37038, **BDI journal**