

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL III – ȘTIINȚE FUNCȚIONALE

PROKS R. MARIA CRISTIANA



TEZĂ DE DOCTORAT

BIOSINTEZA ȘI FORMULĂRILE PE BAZĂ DE
EXTRACT DE *THYMUS VULGARIS* ÎN
ABORDAREA CANCERULUI MAMAR: STUDII
EXPERIMENTALE *IN VITRO*

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. PĂUNESCU VIRGIL

Timișoara
2020

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate.....	IX
Lista abrevierilor	X
Indexul Figurilor.....	XII
Indexul Tabelelor	XV
Mulțumiri.....	XVI
INTRODUCERE	XVIII

PARTEA GENERALĂ.....	1
I. CANCERUL MAMAR	1
I.1 Aspecte generale	1
I.2 Factori de risc.....	2
I.3 Incidența și clasificarea cancerului mamar	2
I.4 Progresia cancerului mamar	3
I.5 Mecanisme etiopatogenice implicate în dezvoltarea cancerului mamar	4
I.6 Tratamente actuale și de perspectivă	7
II. COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI	10
II.1 Introducere	10
II.2 Plante medicinale. Stres oxidativ. Activitate antioxidantă. Activitate antitumorală	12
II.2.1 Noțiuni introductive	12
II.2.2 Activitate antioxidantă	12
II.2.3 Activitate antitumorală.....	14
II.3 Plante medicinale utilizate în terapia cancerului mamar.....	19
III. NANOPARTICULE DE ARGINT	23
III.1 Aspecte generale.....	23
III.2 Sinteza nanoparticulelor de argint	25
III.2.1 Sinteza nanoparticulelor de argint pe cale chimică	26
III.2.2 Sinteza nanoparticulelor de argint pe cale fizică	26

III.2.3 Sinteza nanoparticulelor de argint pe cale biologică.....	26
III.3 Activitate farmacologică.....	31
III.3.1 Efecte antibacteriene	31
III.3.2 Efecte antifungice	34
PARTEA SPECIALĂ.....	35
I. BIOSINTEZA ȘI FORMULĂRILE PE BAZĂ DE <i>THYMUS VULGARIS</i>	35
I.1 Prepararea și caracterizarea extractelor de <i>Thymus vulgaris</i>	35
I.1.1 Materiale și metode	35
I.1.1.1 Obținerea extractelor apoase și hidro-alcoolice.....	35
I.1.1.2 Metode de caracterizare fizico-chimice	36
I.1.2 Rezultate și discuții	37
I.2 Încapsularea extractelor în ciclodextrine	41
I.2.1 Materiale și metode	41
I.2.1.1 Obținerea compușilor de incluziune	41
I.2.1.2 Metode fizico-chimice de caracterizare a compușilor de incluziune	42
I.2.2 Rezultate și discuții	43
I.3 Biosinteza nanoparticulelor de argint	48
I.3.1 Materiale și metode	48
I.3.2 Rezultate și discuții	51
I.4 Concluzii parțiale	55
II. TESTE DE EVALUARE <i>IN VITRO</i> . SCREENING AL FORMULĂRILOR PE BAZĂ DE <i>THYMUS VULGARIS</i> PE DIFERITE LINII CELULARE	56
II.1 Protocoale destinate utilizării liniilor celulare	56
II.1.1 Cultivarea liniilor celulare	56
II.1.1.1 Cultivarea liniei celulare HaCaT (keratinocite umane imortalizate)	56
II.1.1.2 Cultivarea liniei celulare MSC (celule stem mezenchimale)	56
II.1.1.3 Cultivarea liniei celulare JB6Cl41-5a (epiderm murinic)	57
II.1.1.4 Cultivarea liniei celulare A431 (carcinom scuamos)	57
II.1.1.5 Cultivarea liniei celulare A375 (melanom uman)	58

II.1.1.6 Cultivarea liniei celulare B164A5 (melanom murinic)	58
II.1.1.7 Cultivarea liniei celulare MCF 7 (carcinom mamar uman)	59
II.1.1.8 Cultivarea liniei celulare MDA-MB-231 (carcinom mamar uman)	60
II.1.2 Pasajul liniilor celulare	60
II.1.3 Evaluarea efectului antiproliferativ prin utilizarea testului de viabilitate Alamar blue.....	62
II.2 Screening al formulărilor pe bază de <i>Thymus vulgaris</i> pe linii celulare sănătoase și tumorale	64
II.2.1 Materiale și metode.....	64
II.2.1.1 Cultivarea și stimularea celulelor.....	64
II.2.1.2 Testul de viabilitate <i>in vitro</i> Alamar blue	64
II.2.2 Rezultate și discuții	65
II.2.2.1 Efectul compușilor asupra liniilor celulare sănătoase	66
II.2.2.2 Efectul compușilor asupra liniilor celulare tumorale.....	72
II.3 Concluzii parțiale	90
III. ACTIVITATEA ANTIPROLIFERATIVĂ A FORMULĂRILOR PE BAZĂ DE <i>THYMUS VULGARIS</i> ASUPRA CELULELOR DE CANCER DE SÂN	91
III.1 Materiale și metode	91
III.1.1 Culturile celulare	91
III.1.2 Evaluarea efectelor antiproliferative <i>in vitro</i> prin testul de viabilitate MTT	92
III.1.3 Evaluarea efectelor la nivelul apoptozei prin citometrie în flux	92
III.1.4 Testul de migrare și proliferare celulară	94
III.2 Rezultate și discuții	95
III.2.1 Viabilitatea celulară prin testul MTT	95
III.2.2 Capacitatea de migrare și proliferare	97
III.2.3 Activitatea apoptotică.....	101
III.3 Concluzii parțiale	111
CONCLUZII	112
BIBLIOGRAFIA	116
ANEXE	I

TEZĂ DE DOCTORAT

BIOSINTEZA ȘI FORMULĂRILE PE BAZĂ DE EXTRACT DE *THYMUS VULGARIS* ÎN ABORDAREA CANCERULUI MAMAR: STUDII EXPERIMENTALE *IN VITRO*

REZUMAT

Cancerul mamar se numără printre cele mai răspândite tipuri de cancere la nivel mondial iar din acest motiv a început să fie din ce în ce mai intens studiat. Datorită diversității morfologice specifice fiecărui tip de cancer, terapiile actuale au devenit tot mai puțin eficiente iar eterogenitatea intratumorală a fost corelată cu o creștere a rezistenței la tratamentele standard. Aceste tratamente prezintă multiple efecte adverse ceea ce conduce de asemenea la necesitatea dezvoltării unor noi tratamente pentru minimalizarea acestora și în vederea creșterii eficacității. În acest sens testarea unor compuși izolați din plante medicinale a devenit de mare interes în vederea modernizării și optimizării tratamentului antitumoral.

În prezent tratamentele naturale și tradiționale pe bază de plante au devenit din ce în ce mai importante reușind să își dovedească valoarea în multe domenii medicale. Evaluarea extractelor vegetale din punct de vedere al activității antitumorale constituie o temă de actualitate în literatură, în special din cauza confruntării cu o creștere a rezistenței agenților terapeutici. Compușii naturali extrași din plantele medicinale reprezintă un punct de plecare promițător în numeroase studii științifice în domeniul medical, în special în sfera antitumorală, prezentând activitate antiproliferativă și proapoptotică, aspecte ce sunt evidențiate în studii *in vitro* și *in vivo* pe diferite tipuri de cancere. Au fost descriși numeroși agenți antitumoral pe diferite tipuri de cancere mamare. Printre cele mai cunoscute plante aromatice se numără speciile de *Thymus*, utilizate încă din trecut ca tratament tradițional și corelate cu o activitate antimicrobiană, antiseptică și mai nou activitate antitumorală.

SCOPUL CERCETĂRII

În lucrarea de față a fost evaluată pe larg identificarea unor noi compuși naturali cu activitate antineoplazică în vederea lărgirii orizontului medicației antitumorale și cu îmbunătățirea tratamentului actual. În acest sens, a fost studiată specia *Thymus vulgaris*, ce aparține de genul *Thymus* și face parte din marea familie Lamiaceae. Prezintă o importantă activitate terapeutică și este o sursă bogată de compuși medicinali (polifenoli, flavonoide, flavonoli și taninuri). A fost testată activitatea citotoxică a extractului apos respectiv hidro-alcoolic total de *Thymus vulgaris* pe linii celulare sănătoase (celule stem mezenchimale, keratinocite umane imortalizate și epiderm murinic) și tumorale (de piele și de sân). Din cauza stabilității și a solubilității scăzute în soluțiile apoase, utilizarea extractelor pure în domeniul farmaceutic este limitat.

Scopul principal al acestei lucrări a constat în evaluarea rolului β - și γ -ciclodextrinelor și a nanoparticulelor de argint în vederea îmbunătățirii proprietăților biofarmaceutice ale extractelor testate.

PARTEA GENERALĂ

Partea generală este structurată în trei capitole importante. Primul capitol prezintă aspecte generale despre tipul de cancer studiat - cancerul mamar și evidențiază statutul actual de cunoaștere în literatură. Pe lângă aspectele generale ce caracterizează această formă tumorală sunt prezentați și factorii de risc, incidența și clasificarea, progresia, mecanismele etiopatogenice implicate în dezvoltarea cancerului mamar precum și aspecte legate de tratamentul actual și de perspectivă. Cel de-al doilea capitol cuprinde date generale despre compușii biologic activi izolați din plantele medicinale și utilizarea acestora în domeniul farmaceutic, continuând apoi cu prezentarea activității antioxidante și antitumorale al acestora pe numeroase linii celulare tumorale. În cele din urmă accentul a fost pus pe activitatea antitumorală în cancerul mamar (au fost studiate două linii de cancer mamar) cu evidențierea efectelor induse la nivel celular *in vitro/in vivo* ale acestor compuși. În ultimul capitol sunt descrise aspecte generale din domeniul nanotehnologiei, mai exact aspecte legate de nanoparticulele de argint, de sinteza chimică, fizică și în special biologică a acestora precum și despre activitatea lor farmacologică în domeniul medical.

PARTEA SPECIALĂ

Partea specială cuprinde partea experimentală în care sunt descrise materialele și metodele utilizate precum și partea de rezultate și discuții. Aceasta este împărțită de asemenea în trei capitole mari. Concluziile sunt prezentate la final.

În primul capitol s-au abordat aspecte legate de biosinteza și caracterizarea diferitelor formulări pe bază de *Thymus vulgaris*: extractul apos și hidro-alcoolic total de *Thymus vulgaris* (TV_AE și TV_HAE), încapsularea extractelor în β și γ ciclodextrine cu formarea compușilor de incluziune (TV_ β CD și TV_ γ CD) și obținerea nanoparticulelor de argint prin biosinteză cu extractele de *Thymus vulgaris* (AgNPs_TV_AE și AgNPs_TV_HAE).

Cele două extracte totale de *Thymus vulgaris* au fost preparate conform unor protocoale bine definite în literatură. Acestea au fost apoi supuse caracterizării fizico-chimice prin metode spectrofotometrice în vederea stabilirii compoziției și evaluării proprietăților biologice active. Prin tehnica cromatografică HPLC-MS au fost detectați compușii polifenolici ai extractelor și s-a demonstrat că acidul rozmarinic, rutozida, kaemferolul dar și acidul cafeic și quercetina au fost identificați ca principali compuși în extractul hidro-alcoolic total de *Thymus vulgaris* spre deosebire de extractul apos, unde acidul rozmarinic este principalul compus, urmat de eriocitrin, luteolin, apigenin, quercetina și unele forme de flavonoide glicozilate.

Compușii de incluziune au fost sintetizați prin încapsularea extractelor în β și γ ciclodextrine în raport molar de 1:2, iar formarea sistemelor supramoleculare a fost confirmată de tehnicile SEM, DSC și FTIR. Deoarece extractul apos a avut o compoziție mai săracă în principii biologice active, s-a recurs la încapsularea doar a extractului hidro-alcoolic total de *Thymus vulgaris* în ciclodextrine. Referitor la sinteza nanoparticulelor de argint cu cele două extracte, s-a utilizat procedura care utilizează produse vegetale - în acest caz extractul apos și hidro-alcoolic de *Thymus vulgaris* - așa numita „sinteză verde”. Formarea și stabilitatea nanoparticulelor a fost confirmată prin trei tehnici de lucru TEM, DLS și potențial Zeta.

Al doilea capitol prezintă screening-ul de evaluare a activității citotoxice a compușilor sintetizați și caracterizați în primul capitol pe diferite linii celulare tumorale: carcinom scuamos (A431), melanom uman (A375), melanom murin (B16 4A5), carcinom mamar uman (MCF 7 și MDA-MB-231) dar și pe trei linii celulare sănătoase: celule

stem mezenchimale (MSC), keratinocite umane imortalizate (HaCaT) și epiderm murinic (JB6Cl41-5a) utilizând diferite concentrații.

Evaluarea efectului antiproliferativ *in vitro* al extractului apos și hidro-alcoolic de *Thymus vulgaris* (la diferite concentrații) și al formulărilor menționate: nanoparticulele de argint obținute prin biosinteză cu ajutorul extractului apos, respectiv alcoolic de cimbru (de asemenea la diferite concentrații) și complexii cu ciclodextrine ai extractului hidro-alcoolic de cimbru s-a realizat după o stimulare de 24 de ore prin testul de determinare a viabilității celulare Alamar blue.

În ceea ce privește liniile celulare sănătoase, s-a dovedit că keratinocitele umane imortalizate nu au fost influențate în manieră semnificativă, asupra celulelor mezenchimale nanoparticulele de argint și complexii cu ciclodextrine ai celor două extracte au exercitat efecte citotoxice la cele mai mari concentrații testate, iar asupra celulelor epidermice murine nanoparticulele de argint tot la cele mai mari concentrații au exercitat efecte citotoxice. De precizat este că nanoparticulele de argint obținute cu extract apos s-au dovedit mai stabile în timp și cu o acțiune constant benefică.

În cazul liniilor tumorale un efectul citotoxic reprezentativ pentru TV_AE s-a remarcat pe linia celulară MCF 7 la cea mai mare concentrație testată, spre deosebire de linia celulară MDA-MB-231 unde viabilitatea nu a fost modificată semnificativ. În schimb, expunerea liniilor celulare la TV_HAE este corelată cu o scădere considerabilă a celulelor viabile pe ambele linii tumorale într-o manieră dozo-dependentă, în special în cazul celulelor MDA-MB-231. Viabilitatea pe liniile celulare A431 și A375 nu a fost afectată în mod vizibil, se remarcă chiar o ușoară creștere a acestora pe linia A375 în urma interacțiunii cu cele două extracte. Un aspect important este că în urma expunerii celulelor MCF 7 la acțiunea nanoparticulelor de argint obținute cu extract apos numărul celulelor viabile a scăzut drastic pentru toate concentrațiile testate, într-o manieră dependentă de doză, însă în cazul liniei celulare MDA-MB-231 nu a prezentat activitate citotoxică. O scădere a procentului de viabilitate a fost remarcat și pentru liniile A431 și A375, dar nu într-un mod semnificativ. Stimularea celulelor cancerului de sân uman cu TV, TV_βCD și TV_γCD a fost efectuată în aceleași condiții ca cea aplicată celulelor normale, pentru a evalua activitatea citotoxică a compușilor (la min. trei concentrații diferite) timp de 24 de ore. Pe linia MDA-MB-231 efectul cel mai pronunțat a fost atribuit complexului TV_γCD. În cazul liniei celulare MCF 7 cel mai intens efect

antiproliferativ a fost obținut pentru TV_βCD.

În ultimul capitol s-a urmărit evaluarea mai detaliată a comportamentului celulelor MCF 7 și MDA-MB-231 în prezența compușilor menționați. În urma utilizării testului MTT procente de viabilitate obținute prin stimularea celulelor cu TV, TV_βCD și TV_γCD nu au prezentat diferențe semnificative comparativ cu procente de viabilitate obținute la utilizarea testului Alamar blue. TV_βCD și TV_γCD au denotat o activitate citotoxică semnificativă asupra celulelor MCF 7 și MDA-MB-231, cu cea mai notabilă activitate a complexului TV_γCD pe celule MDA-MB-231. De asemenea, nanoparticulele de argint contribuie la îmbunătățirea efectului antiproliferativ într-o manieră dependentă de doză asupra liniei celulare MCF 7, în cazul liniei MDA-MB-231 efectul fiind unul stimulator.

Prin expunerea celulelor sănătoase HaCaT în prezența TV și TV_βCD nu s-a observat niciun efect asupra capacității de migrare și proliferare a celulelor, dimpotrivă stimularea acestora cu TV_γCD a intensificat migrarea celulelor *in vitro*. Cu privire la celulele tumorale mamare, se observă că activitatea migratorie a celulelor MCF 7 a fost ușor inhibată de acțiunea TV_βCD, influența compușilor TV și a TV_γCD asupra acestora fiind nesemnificativă. De precizat este faptul că efectul migrator pe linia celulară MDA-MB-231 a fost mai puțin intens după expunerea la TV și TV_βCD comparativ cu controlul, cea mai scăzută rată migratorie remarcându-se pentru compusul TV_γCD. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute la evaluarea viabilității celulelor.

În vederea evaluării gradului apoptotic *in vitro* a celulelor MCF 7 și MDA-MB-231 după tratarea cu TV, TV_βCD și TV_γCD a rezultat un procent apoptotic semnificativ pentru cea mai mare concentrație testată (100 μg / mL), după cum urmează: cel mai pronunțat efect apoptotic a apărut după expunerea celulelor MDA-MB-231 la TV_γCD, în schimb expunerea celulelor MCF 7 la acțiunea TV_βCD este corelată cu un efect apoptotic mai slab.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Rezultatele experimentelor din această teză de doctorat pun în valoare activitatea antitumorală a complexilor cu ciclodextrine ai extractelor de *Thymus vulgaris* cât și a nanoparticulelor de argint biosintetizate. În urma screening-ului s-a observat o activitate crescută a acestora împotriva celulelor de cancer mamar, acestea fiind cele mai

afectate de compușii testați. Aceste formulări prezintă așadar efecte promițătoare asupra celulelor de cancer mamar. În cazul liniilor tumorale testate activitatea citotoxică cea mai pronunțată a fost observată la celulele de cancer de sân (MCF 7 și MDA-MB-231). Extractele au scăzut viabilitatea celulară la cele mai mari concentrații pe ambele linii de adenocarcinom mamar.

În urma stimulării celulelor MCF 7 cu soluția coloidală apoasă de nanoparticule de argint, s-a evidențiat o creștere drastică a efectului antiproliferativ comparativ cu extractul pur pentru toate concentrațiile testate cu valori de viabilitate foarte scăzute.

De asemenea, prin înglobarea extractului hidro-alcoolic total de *Thymus vulgaris* în β - și γ - CD a fost optimizat efectul citotoxic comparativ cu extractul pur pe ambele linii celulare de cancer mamar (MDA-MB-231 și MCF 7). A fost îmbunătățită așadar sensibilitatea și stabilitatea compușilor rezultând totodată optimizarea proprietății antiproliferative *in vitro*. Moleculele extrase din plantele vegetale sunt prin urmare potențiali candidați antineoplazici în tratamentul cancerului mamar. Asocierea compușilor naturali cu chimioterapicele standard constituie o abordare promițătoare în domeniul antitumoral și studii detaliate sunt necesare pentru explorarea potențialului.