

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul XIV: Microbiologie**

POPESCU VERONICA MĂDĂLINA



**EVALUAREA ȘI OPTIMIZAREA UNOR NOI SURSE
TERAPEUTICE DIN COMPUȘI NATURALI**

REZUMAT

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. VLAICU BRIGITHA ELISABETA

**Timișoara
2021**

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	V
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI	VI
LISTA CU FIGURI ȘI TABELE	VIII
MULȚUMIRI	XII
INTRODUCERE	1
PARTEA GENERALĂ	4
CAPITOLUL 1. SĂNĂTATEA POPULAȚIEI CORELATĂ CU RESURSELE NATURALE, PRODUSELE PE BAZĂ DE PLANTE ȘI COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI	4
1.1 Noțiuni introductive	4
1.2 Produsele din plante ca bază pentru medicamente	5
1.3 Resursele naturale și sănătatea populației	7
CAPITOLUL 2. APLICAȚII FARMACOLOGICE ALE TRITERPENELOR	9
2.1 Introducere	9
2.2 Mecanisme asociate activității farmacologice	11
2.2.1 Triterpenele și receptorii	14
2.2.2 Procese biologice de interes influențate de triterpene	16
CAPITOLUL 3. APLICAȚII BIOMEDICALE ALE POLIMERILOR	17
3.1 Introducere	17
3.2 Tipuri de polimeri cu aplicabilitate biomedicală	20
3.2.1 Polimeri naturali	20
3.2.2 Polimeri sintetici	22
3.2.3 Polimeri biocompatibili	24
3.3 Utilizarea testărilor experimentale pentru evaluările medicale	25
PARTEA SPECIALĂ	35
CAPITOLUL 4. CONTRIBUȚII LEGATE DE TESTAREA PRECLINICĂ IN VITRO ȘI IN OVO A UNOR EXTRACTE/TRITERPENE DE INTERES TERAPEUTIC	36
4.1 Activitatea biologică a extractului din frunze de măslin	36
4.1.1 Introducere	36
4.1.2 Materiale și metode	37
4.1.2.1 Materiale	37
4.1.2.2 Metode	37
4.1.2.3 Date statistice	40
4.1.3 Rezultate și discuții	40
4.1.3.1 Caracterizarea probelor de interes biologic	40
4.1.3.2 Evaluarea activității biologice	41
4.1.4 Concluzii parțiale	50
4.2 Activitatea biologică a acidului betulinic prin asociere cu patologiiile maligne cutanate	51
4.2.1 Introducere	51
4.2.2 Materiale și metode	52
4.2.2.1 Reactivi și celule	52
4.2.2.2 Metode de evaluare a citotoxicității	53
4.2.2.3 Metode detaliate de elucidare a mecanismelor de acțiune	54

4.2.2.4 Date statistice	58
4.2.3 Rezultate și discuții	59
4.2.3.1 Aspecte legate de morfologie și citotoxicitate	59
4.2.3.2 Aspecte legate de membrana mitocondrială	63
4.2.3.3 Impactul acidului betulinic asupra morfologiei celulelor melanomului uman și a organelor celulare	65
4.2.4 Concluzii parțiale	75
CAPITOLUL 5. CONTRIBUȚII LEGATE DE EXTRACTELE DIN PLANTE ASOCIATE CU SĂNĂTATEA POPULAȚIEI	76
5.1 Introducere	76
5.2 Compoziția biochimică a frunzelor de măslin	77
5.3 Activitatea biologică exercitată de extractul de frunze de măslin	79
5.4 Studii clinice bazate pe extract de frunze de măslin	80
5.5 Concluzii parțiale	83
CAPITOLUL 6. POLIMERI BIOCOMPATIBILI - TESTE IN VITRO ADECVATE, OBȚINERE ȘI EVALUARE PRECLINICĂ	84
6.1 Teste in vitro aplicabile polimerilor biocompatibili	84
6.1.1 Introducere	84
6.1.2 Modele in vitro pentru studiile de citotoxicitate	90
6.2 Polimeri compatibili cu triterpene	96
6.2.1 Introducere	96
6.2.2 Materiale și metode	99
6.2.2.1 Materiale	99
6.2.2.2 Metode	99
6.2.2.3 Date statistice	100
6.2.3 Rezultate și discuții	101
6.2.3.1 Caracterizarea și testarea probelor de interes biologic	101
6.2.4 Concluzii parțiale	110
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	113
BIBLIOGRAFIE	117

REZUMAT

Tema de cercetare aleasă s-a bazat pe faptul că, sănătatea populației reprezintă în zilele noastre o provocare pentru specialiștii în domeniu. Datorită evoluțiilor asociate lumii moderne pe toate planurile (economic, educațional, științific etc.), o parte a populației are acces la diferite informații și resurse diferite în timp ce, o altă parte a populației este privată atât de informații cât și de resurse. Indiferent de mediul de proveniență și stilul de viață marea majoritate a oamenilor folosesc plante, derivați din plante sau preparate din plante pentru prevenirea sau combaterea anumitor afecțiuni. Pe măsură ce procesele de îmbătrânire își fac apariția, populația devine mai susceptibilă la boli și dizabilități datorită diferiților factori precum imunitatea scăzută, funcționalitatea scăzută a celulelor, deteriorarea ADN-ului, incidența mai mare a inflamației etc. Prin urmare, îmbătrânirea sănătoasă joacă un rol important în ceea ce privește politicile de sănătate a populației.

Proprietățile medicinale ale plantelor sunt întotdeauna creditate pentru efectele lor terapeutice și eficiența în tratarea a diverse afecțiuni fără efecte adverse sau cu efecte adverse ne semnificative reprezentând o importantă componentă în abordarea sănătății populației din trecut și până în prezent. Rolul fitomedicinei în diminuarea proceselor îmbătrânire este foarte crucial datorită compușilor bioactivi și constituenților importanți (de exemplu polifenoli, triterpene) care sunt considerați că exercită proprietăți anti-îmbătrânire, dar contribuie în egală măsură și la reducerea problemelor asociate vârstei. Mai mult decât atât, stresul oxidativ și inflamația declanșată de stresul oxidativ crescut sunt cauza multor boli cronice. Compușii derivați din plante oferă noi potențiale molecule biologice active capabile să contracareze aceste procese. Produsele naturale sunt optimizate structural prin evoluție pentru a îndeplini anumite funcții biologice, inclusiv reglarea mecanismelor de apărare endogene și interacțiunea cu alte organisme, proprietate care explică relevanța lor în special pentru bolile infecțioase și cancer. Multe studii clinice și studii populaționale evidențiază date importante despre protecția consistentă și eficientă rezultată din aportul prelungit la diferite produse naturale (ca de exemplu uleiul de măsline, ceaiurile, tincturile, fructele și legumele proaspete) împotriva insurgenței patologiilor asociate îmbătrânirii, cum ar fi neurodegenerarea, bolile cardiovasculare, bolile metabolice și cancerul.

Utilizarea resurselor naturale/plantelor pentru prevenirea și tratarea bolilor este aproape universală încadrându-se în preocupările diferitelor arii de cercetare de la nivel local la

nivel internațional. Utilizarea plantelor medicinale este în creștere la nivel mondial, având în vedere expansiunea extraordinară a medicinei tradiționale și un interes tot mai mare pentru tratamentele pe bază de plante. Plantele sunt folosite în medicină pentru a menține și a spori sănătatea (fizică, mentală și spirituală) dar și pentru a trata de la afecțiuni simple până la afecțiuni complexe. Medicina tradițională și-a menținut popularitatea în toate regiunile sau în lumea în curs de dezvoltare și utilizarea sa se răspândește rapid în țările industrializate iar piața globală a medicamentelor pe bază de plante se ridică la sume de zeci de miliarde de euro și crește constant.

Ținând cont de faptul că, resursele naturale reprezintă o parte importantă din viața de zi cu zi dar și că, apariția a numeroase boli este în creștere (din varii motive pornind de la stilul de viață, moștenirea genetică, mediul înconjurător etc.) obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării doctorale s-au axat în principal pe studiul anumitor extracte din plante (bogate în triterpene), molecule naturale biologic active (acidul betulinic) și polimeri biocompatibili încărcăți cu biomolecule, în paralel cu sănătatea populației.

Lucrarea de doctorat este structurată conform normelor metodologice în patru părți principale: (i) partea generală, (ii) partea specială, (iii) concluzii și contribuții personale și (iv) bibliografia. Partea generală cuprinde trei capitole care descriu noțiunile curente legate de: (a) sănătatea populației corelată cu resursele naturale, produsele pe bază de plante și compușii biologic activi, (b) aplicații farmacologice ale triterpenelor și (c) aplicații biomedicale ale polimerilor.

Subiectul este unul foarte vast și care se dezvoltă și actualizează zilnic prin prisma a noi și noi date legate de resursele naturale și rolul lor asupra sănătății. Direcțiile de cercetare asociate temei de studiu sunt foarte variate luând în considerare implicarea interdisciplinară pentru succesul științific. În cadrul părții speciale a lucrării s-au stabilit trei obiective majore: (a) testarea preclinică *in vitro* și *in ovo* a unor extracte/triterpene de interes terapeutic; (b) analize legate de extractele din plante asociate sănătății populației și (c) polimeri biocompatibili cu biocompuși – teste *in vitro* adecvate, obținere și evaluare preclinică. Activitățile de documentare și experimentale desfășurate pentru realizarea obiectivelor menționate au avut drept scop aprofundarea datelor legate de mecanismele exercitate, importanța și siguranța pentru sănătatea umană, selectarea metodelor adecvate de evaluare a compușilor și prezentarea într-un mod cât mai clar și concis a rezultatelor obținute comparativ cu datele existente în literatura de specialitate.

Extractul de frunze de măslin este comercializat la nivel global și este considerat un medicament natural, care are o serie de beneficii pentru menținerea sănătății umane. Este bogat în diferite clase de compuși cu structuri chimice variate, despre care se crede că produc efectele terapeutice ale extractului. O problemă majoră în ceea ce privește produsele de origine naturală este cea legată de variația compoziției chimice datorată în special originii, care accentuează compoziția luând în considerare și nutriția plantei, modul de extracție, forma de depozitare, etc. Scopul primului studiu a fost determinarea citotoxicității extractului etanolic din frunzele de măslin pe celulele melanomului uman și stabilirea potențialului iritant și toxic prin utilizarea testului membranei corioalantoice *in vivo* folosind metoda HET-CAM. Extractul utilizat este bogat în luteolină și rutin, aceștia fiind compușii cei mai abundenți din clasa polifenolilor iar acizii ursolic și oleanolic, din clasa triterpenelor, au fost de asemenea detectați și cuantificați. În vederea evaluării activității biologice, stimularea celulelor de melanom uman a fost efectuată cu concentrații diferite ale extractului, înregistrându-se o scădere a celulelor viabile la cea mai mare concentrație testată (100 μg / mL - ~ 71% celule viabile). În cazul testului CAM, reacția indusă de extractul testat a fost clasificată, după cum urmează: 0-0.9 efect non-iritant, 1-4.9 efect iritant slab, 5-8.9 / 9.9 efect iritant moderat, 8.9 / 9.9-21 efect iritant puternic. Efectele induse de extractul testat la diferite concentrații, împreună cu controalele au fost înregistrate și toate cele trei puncte finale (hemoragie, coagulare și liză). Extractul la 100 μg / mL a prezentat semne tardive și limitate atât de hemoragie cât și de coagulare și semne precoce, deși limitate de vasodilatație, ceea ce sugerează apariția unui efect iritant slab la această concentrație. Prezenta cercetare a fost realizată pentru a evalua citotoxicitatea extractului etanolic din frunzele de măslin pe celulele melanomului uman *in vitro* și pentru a stabili potențialul iritant și toxic *in vivo* prin metoda HET-CAM. Extractul exercită unele efecte citotoxice asupra celulelor melanomului la cea mai mare concentrație testată și *in vivo* la 24 de ore de la tratament a exprimat un efect mai puternic atât în ceea ce privește creșterea celulelor tumorale, cât și vascularizarea celulelor melanomului A375. Agenții care vizează mitocondriile sau interferează cu bioenergetica mitocondriilor ar putea fi considerați o terapie alternativă care, în combinație cu tratamentele antimelanom actuale, mărește eficacitatea chimioterapeutică și întârzie ocurența rezistenței. Un compus care respectă aceste cerințe este acidul betulinic. Acesta exercită un profil farmacologic extins care cuprinde efecte: anticancer, antiinflamator, anti-bacterian, anti-HIV, antihelmintice și antiangiogene. În plus, acidul betulinic prezintă, de asemenea, efecte

antidiabetice, antidislipidemice și alte efecte. Caracteristicile care fac din acidul betulinic un compus foarte atractiv pentru cercetătorii din domeniul carcinogenezei sunt toxicitatea ridicată pentru celulele canceroase și toxicitatea foarte scăzută asupra celulelor normale (așa cum s-a demonstrat *in vitro* pe fibroblastele cutanate și limfocitele din sângele periferic și *in vivo* pe celule / organe normale, la doze terapeutice relativ mari). Studiul de față a avut drept scop caracterizarea detaliată a efectelor acidului betulinic asupra bioenergeticii mitocondriale și a comportamentului celular în celulele melanomului uman. Rezultatele studiilor anterioare privind lipsa de toxicitate indusă de tratamentul cu acid betulinic în celulele normale sunt discutabile. Pe această linie, s-a verificat impactul tratamentului cu acid betulinic timp de 24 de ore asupra viabilității keratinocitelor umane, utilizând testul MTT. Incubația celulelor cu concentrații diferite de acid betulinic a condus la următoarele rezultate: cele mai mici concentrații testate (1, 5 și 10 μM) nu au afectat viabilitatea celulelor, în timp ce dozele mai mari (20, 25 și 50 μM) au indus o scădere dependentă de doză de viabilitate a celulelor, procentul de celule viabile calculat la cea mai mare concentrație testată - 50 μM a fost de 81.42%. Pentru a verifica tipul de moarte celulară indusă de acidul betulinic, nucleeele au fost colorate folosind colorantul Hoechst 33342. Semne de apoptoză, cum ar fi contracția nucleară sau fragmentarea nucleară, au fost observate numai în keratinocitele tratate cu cele mai mari concentrații de acid betulinic - 20 și 50 μM , în timp ce la 10 μM nu s-a observat vreun impact asupra nucleelor celulelor. Nu au fost detectate semne de necroză în keratinocitele tratate cu acid betulinic sau DMSO. Luate împreună, aceste rezultate indică faptul că, concentrațiile scăzute de acid betulinic nu au impact asupra viabilității și morfologiei celulelor HaCaT, în timp ce concentrațiile mai mari (20, 25 și 50 μM) reduc viabilitatea celulelor și induc modificări morfologice (pierderea contactului cu celule învecinate, contracție celulară, fragmentare nucleară) specifice morții apoptotice. Deoarece tratamentul cu acid betulinic a exercitat un efect citotoxic dependent de doză în celulele de melanom, s-a verificat și impactul acestuia în ceea ce privește modificările morfologice. Prezența mai multor celule rotunjite și detașate, dar aderența nemodificată și contactul celulă-celulă au fost observate la o concentrație de 10 μM BA în comparație cu celulele martor (celule netratate). Cea mai mare concentrație de acid betulinic testată - 50 μM a indus modificări morfologice semnificative caracterizate prin prezența celulelor rotunde plutitoare, pierderea aderențelor celulă-celulă, pierderea aderenței, confluenței reduse și a resturilor celulare, semne clare de citotoxicitate. Odată cu creșterea concentrațiilor, semnele apoptotice devin mai evidente,

după cum urmează: contracția nucleară (un semn distinctiv morfologic al apoptozei – acid betulinic 10 μ M), fragmentarea nucleară, prezența corpurilor apoptotice și condensarea cromatinei, caracteristici similare cu cele observate după tratamentul cu Staurosporină (5 μ M) - controlul pozitiv pentru inducerea apoptozei. Nu au fost identificate semne de necroză în celulele tratate cu BA la concentrațiile testate. Aceste rezultate sugerează că acidul betulinic declanșează un efect citotoxic dependent de doză în celulele de melanom prin reducerea viabilității celulelor și inducerea unor caracteristici apoptotice: alterări morfologice atât ale nucleului, cât și ale citoplasmei. Deoarece se știe că acidul betulinic induce apoptoza în celulele canceroase prin calea intrinsecă care implică mitocondriile și datele referitoare la rolul jucat de markerii pro- și anti-apoptotici în acest proces sunt încă stabilite, s-a verificat în continuare efectul acidului betulinic asupra expresiei mRNA pro-apoptotică (Bid, Bax, Bak și Bad) și anti-apoptotice (Bcl-2 și Bcl-XL). Concentrația sub-citotoxică a acidului betulinic - 10 μ M a determinat o reglare în sus a expresiei mARN-ului pentru majoritatea markerilor pro-apoptotici (Bax, Bad și Bak), cu excepția Bid, cea mai semnificativă creștere a expresiei fiind calculată pentru Bak. Tratamentul cu acid betulinic nu a avut niciun impact asupra markerului anti-apoptotic Bcl-XL, în timp ce în cazul Bcl-2 s-a observat și o reglare ascendentă. Mai mult, s-a verificat impactul acidului betulinic asupra expresiei ARNm caspazei 3, caspazei 8 și Apaf 1 și s-a observat o reglare descendentă a expresiilor acestor markeri în celulele tratate cu acid betulinic. S-a arătat aici că atât OCR global, cât și ECAR (măsurate la sfârșitul fiecărui experiment) au fost scăzute într-o manieră dependentă de concentrație atunci când celulele de melanom au fost tratate cu acid betulinic timp de 24 de ore, totuși concentrația de 5 μ M nu a arătat o semnificativă schimbarea ECAR. În ceea ce privește cea mai mare concentrație de BA utilizată în experimente (50 μ M), s-a dovedit că celulele A375 au cea mai mică respirație bazală și nu au mai răspuns la protocolul utilizat pentru a modula atât căile glicolitice, cât și căile mitocondriale pentru producția de ATP; în consecință, OCR global și ECAR au prezentat cel mai mare declin în comparație cu celulele netratate. În cele din urmă, ratele de producție de protoni (PPR) au suferit modificări foarte similare cu ECAR în celulele tratate cu acid betulinic. Acest studiu a avut ca scop în special analiza de noi perspective cu privire la efectele acidului betulinic asupra bioenergeticii mitocondriale în celulele melanomului uman, ca o abordare bazată pe metabolism pentru a înțelege pe deplin proprietatea antitumorală a acestui fitocompus bioactiv. Principala ipoteză de lucru a fost că mecanismul de acțiune al antimelanomic al acidului betulinic implică modularea

metabolismului energetic mitocondrial. Principalele constatări în acest sens sunt următoarele: (i) un efect inhibitor dependent de doză atât asupra ratei consumului de oxigen (OCR), cât și asupra ratei de acidificare extracelulară (ECAR) (markerii clasici ai fosforilării oxidative și glicolizei -sis, respectiv) și (ii) o scădere semnificativă provocată de o concentrație sub-toxică (10 μ M) atât a parametrilor respiratori suportați de complexul I, cât și de cel al II-lea (în special, respirația activă - OXPHOS și capacitatea respiratorie maximă a sistemului de transfer de electroni - respectiv ETS). În plus, s-a demonstrat că acidul betulinic a provocat un efect citotoxic dependent de doză caracterizat prin trăsături apoptotice: alterări morfologice (fragmentare nucleară, corpuri apoptotice), o scădere a potențialului membranei mitocondriale, reglarea în sus a expresiei ARNm a markerilor pro-apoptotici (Bax, Bad și Bak) și modificări ale morfologiei și localizării mitocondriilor în linia celulară a melanomului. Rezultatele indică faptul că acidul betulinic a provocat un efect inhibitor dependent de doză atât asupra respirației mitocondriale cât și asupra glicolizei în celulele melanomului uman. Disfuncția bioenergetică mitocondrială a fost asociată cu reorganizarea citoscheletului (fibre de actină), modificări ale morfologiei mitocondriale, o scădere a potențialului membranei mitocondriale și reglarea ascendentă a markerilor pro-apoptotici (Bax, Bad și Bax). Prin urmare, aceste descoperiri sugerează că direcționarea moleculară a bioenergeticii mitocondriale cu acid betulinic ar putea reprezenta o strategie validă pentru melanomul avansat și ar oferi o perspectivă nouă în subevaluarea mecanismului de acțiune antimelanom al acidului betulinic.

Plantele aromatice și medicinale au fost utilizate din cele mai vechi timpuri pentru tratarea anumitor boli (fiind prima formă cunoscută de îngrijire medicală) și stau la baza dezvoltării industriei medicamentelor, dar și pentru prevenirea având un rol important în sănătatea publică. O plantă medicinală abundă în componente bioactive care exercită o serie de efecte farmacologice, atunci când este consumată în forma sa naturală sau după o pregătire specială, într-o formă de administrare terapeutică pentru abordarea anumitor boli. Diferite studii au analizat activitatea biologică benefică a plantelor, iar efectele antioxidante, antiinflamatorii, antidiabetice și antitumorale au fost printre cele mai frecvent observate. Mai mult, peste jumătate din medicamentele aprobate pentru uz uman sunt de origine vegetală. Efectele terapeutice benefice ale plantelor se bazează pe compoziția chimică care abundă cel mai adesea în compuși fenolici, terpene, alcaloizi, flavonoizi și alții. Datele prezentate de Organizația Mondială a Sănătății au arătat că aproape 80% din populația lumii folosește încă medicina tradițională pe bază de plante. Măslinul a fost folosit pentru

diferite acțiuni legate de sănătatea umană încă din cele mai vechi timpuri. În urma consumului diferitelor părți ale plantei, s-a observat că manifestă activitate biologică benefică împotriva diabetului, inflamației, hipertensiunii, infecțiilor, bolilor intestinale, astmului, reumatismului etc. Consumul de ulei de măsline s-a dovedit a fi benefic pentru sănătatea umană, fiind foarte apreciat în dieta mediteraneană, recunoscut pentru prevenirea bolilor cardiovasculare, a anumitor tipuri de cancer sau a diabetului de tip 2 (boli cronice netransmisibile). Frunzele de măslin au o compoziție chimică variată care include: monoterpene iridoide (predomină oleuropeină), triterpene, flavonoide, calcone, acizi fenolici și cumarine.

În cel de-al doilea studiu se prezintă evaluarea tranziției de la studii preclinice la evaluări clinice ale extractului de plante și importanța extractului de frunze de măslin în sănătatea publică. În ceea ce privește metabolismul compușilor biologic activi predominanți în extractul de frunze de măslin, datele din literatură arată prezența metaboliților conjugați în fluidele biologice *in vivo*. Direcțiile de interes ale studiului, atât pentru prezent, cât și pentru viitor, se concentrează asupra bioactivității principalilor metaboliți care, în unele cazuri, este superioară compușilor părinți (de exemplu, glucuronatul de hidroxitirosol este un agent de eliminare a radicalilor liberi de cinci ori mai puternic decât hidroxitirosolul). Mecanismele implicate în activitatea biologică exercitată de extractul de frunze de măslin nu sunt pe deplin înțelese. În ceea ce privește activitatea antioxidantă, problemele care apar sunt legate de selecția speciilor reactive de oxigen responsabile de stresul oxidativ, dar luând în considerare faptul că asocierea speciilor reactive de oxigen cu dezvoltarea progresivă a bolilor sistemice nu este pe deplin adevărată dacă sunt luate în considerare ia în considerare necesitatea esențială a prezenței superoxizilor pentru metabolismul normal și funcția fiziologică. Etapele necesare pentru a obține o formă finită care reflectă activitatea clinică sunt complexe, iar trecerea de la studiile *in vitro* la evaluarea clinică se bazează pe resurse complexe, atât umane, cât și materiale. Studiile *in vitro*, care predomină în literatura de specialitate, în ciuda varietății metodelor utilizate, furnizează doar o mică parte din informațiile despre posibilele efecte benefice obținute cu administrarea *in vivo*. Pe măsură ce cercetările privind aceste efecte progresează către studii *in vivo*, rezultatele din literatură sunt considerabil reduse și, în final, studiile clinice oferă o cantitate limitată de informații. Sulfatul și glucuronidul (conjugat) metaboliții hidroxitirosolului par a fi principalii metaboliți ai oleuropeinului care se găsesc în fluidele biologice (plasmă, urină) după administrarea extractului de frunze de măslin. Printre principalii factori care

influențează absorbția și metabolismul compușilor biologic activi din extract se numără tipul de preparat administrat (solid, lichid, sirop, capsule etc.), metoda de eliberare sau frecvența administrării. Compușii fenolici individuali din extractul de frunze de măslin sunt cunoscuți pentru activitățile lor biologice puternice testate prin metode *in vitro*. Cu toate acestea, majoritatea rapoartelor evidențiază beneficiile utilizării extractelor datorate combinațiilor de clase de compuși biologic activi care pe baza efectelor sinergice au activități antioxidante și antimicrobiene cel puțin similare cu cele ale compușilor individuali, dar adesea superioare acestora. Compușii naturali derivați din extract de frunze de măslin sunt considerați o sursă valoroasă de modele ca bază a noilor agenți chimiopreventivi sau terapeutici pentru diverse boli umane. În ciuda faptului că, un număr semnificativ de fitocompuși sunt eficienți în studiile preclinice (*in vitro* sau *in vivo* pe un model animal), eficacitatea terapeutică este considerabil redusă atunci când ajung la studii clinice. Găsirea formulărilor optime pentru valorificarea eficacității terapeutice a extractului de frunze de măslin rămâne o provocare pentru cercetătorii implicați în primul rând în studii preclinice și selectarea pacienților pentru studii clinice pe baza problemelor actuale de sănătate a populației rămâne o provocare pentru personalul medical.

Studiul polimerilor biocompatibili este unul de actualitate datorită proprietăților remarcabile de care aceștia dau dovadă. O căutare recentă în mai multe baze de date științifice a scos în evidență un număr mare de lucrări publicate pe bază de polimeri biocompatibili. utilizarea compușilor naturali a fost restricționată din cauza unei stabilități scăzute legate de diverși factori - lumină, pH, condiții de temperatură etc. și solubilitate scăzută de care dau dovadă. O alternativă, pentru a corecta aceste neajunsuri, este încapsularea în polimeri biocompatibili, care oferă atât protecția cât și păstrarea proprietăților biologice.

Cel de-al treilea studiu a fost realizat pentru a observa comportamentul unor celule sănătoase în prezența extractelor din scoarța de mesteacăn brută, a tescovinei de mere și a extractelor de frunze de măslin, formulate sub formă de nanoparticule poli-Lactic-co-glicolice (PLGA). Aceste plante sunt cunoscute pentru conținutul bogat în triterpene, iar studiul este propus pentru a utiliza datele obținute în evaluarea potențialului formulărilor de acest tip în condiții precum inflamația și mediul tumoral malign. Scopul studiului de față a fost de a realiza încapsularea a trei extracte brute diferite bogate în triterpene într-un polimer biocompatibil și de a evalua proprietățile lor *in vitro* pentru alte aplicații ca agenți terapeutici alternativi antiinflamatori și / sau anti-tumoral.

Mărimea particulelor este un parametru important în utilizarea biomedicală a nanoparticulelor. În acest studiu, indicele de polidispersie a fost determinat împreună cu mărimea particulelor. Valorile indicelui diferă semnificativ între nanoparticulele de control și cele încărcate cu extracte. Rezultatele DLS au relevat că diametrul mediu al eşantioanelor de biopolimer a fost între 216-264 nm cu un indice de polidispersie între 0.32-0.41. Valorile potențialelor zeta au fost negative, între – 28.9 și - 32 mV, fapt care indică stabilitatea formulărilor obținute. Soluțiile pregătite pentru evaluare - diferite concentrații de formulări biocompatibile ale acidului poli-lactic-co-glicolic cu extracte de scoarță de mesteacăn, tescovină de mere și măslin obținute prin metoda de evaporare a emulsiei - sunt sigure în doze sub 15 µg / mL și prezintă un efect citotoxic împotriva celulelor normale, keratinocite și fibroblaste, numai la cea mai mare concentrație testată în anumite cazuri. Activitatea pe aceste celule a fost observată prin microscopie. Stimularea extractului brut provoacă diverse transformări în forma celulelor. Evaluările *in vitro* sunt esențiale pentru a elucidă comportamentul diverșilor compuși ca potențiali candidați în tratamentul diferitelor patologii care implică procese inflamatorii și tumorale. Cu toate acestea, studiile *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* și *in vivo* trebuie dezvoltate și corelate pentru a obține o imagine completă a unei anumite direcții cu privire la abordarea și tratamentul patologiei. Originalitatea acestei cercetări constă în elucidarea comportamentului diferitelor celule umane sănătoase, atât imortalizate, cât și primare, în prezența formulărilor de biopolimeri prin utilizarea PLGA împreună cu scoarță de mesteacăn brută, tescovină de mere și extract etanolic de frunze de măslin, în ceea ce privește viabilitatea. Aceste tipuri de celule sunt utilizate în mod obișnuit în studiile *in vitro* efectuate pentru a testa noi compuși cu potențial potențial antiinflamator și cancerigen, iar evaluarea toxicității celulare normale este un pas cheie în studiul noilor compuși curativi.

Teza de doctorat de față, prin prisma activității de cercetare experimentale, a avut trei obiective principale care au presupus: (i) testarea preclinică *in vitro* și *in ovo* a unor extracte/triterpene de interes terapeutic, (b) analiza asocierii extractelor din plante cu sănătatea populației și (c) testarea preclinică *in vitro* a polimerilor biocompatibili încărcăți cu extracte naturale. Toate aceste obiective au fost atinse în totalitate fapt care reiese în principal din articolele științifice publicate.

Contribuțiile originale aduse în urma tuturor experimentelor realizate și diseminate redau pe de o parte activitatea citotoxică a anumitor extracte (împotriva celulelor maligne ale pielii), elucidarea anumitor mecanisme de acțiune în cazul proceselor tumorale a

compușilor biologic activi (de exemplu direcționarea moleculară a bioenergeticii mitocondriilor cu acid betulinic ar putea reprezenta o strategie validă pentru melanomul avansat și ar oferi o perspectivă nouă în subevaluarea mecanismului de acțiune antitumoral a acidului betulinic) și pe de altă parte oferă baza de plecare în ceea ce privește siguranța preliminară citotoxică (neafectarea de către formulări polimerice biocompatibile încărcate cu extracte naturale a celulelor sănătoase).

Elucidarea modului de acțiune și sinergismului trebuie aprofundată în cercetări viitoare. Implicările economice ale cercetărilor propuse sunt substanțiale și necesită de cele mai multe ori un efort financiar pentru obținerea de rezultate concludente, ținând cont de faptul că majoritatea experimentelor se desfășoară cel puțin în triplicat pentru obținerea unor rezultate semnificative statistic și reproductibile.

Datorită complexității și tipicului interdisciplinar a temei prezentate, direcțiile de cercetare viitoare sunt multiple: evaluarea extractelor poate fi analizată în studii clinice atât observaționale cât și intervenționale, mecanismele de acțiune ale acidului betulinic de asemenea pot fi evaluate pe model de țesut uman reconstruit (în caz de utilizare preventivă) sau pe model animal (în caz de utilizare terapeutică), polimerii biocompatibili extrem de utili pentru protejarea și transportul substanțelor active necesită studii de lungă durată pentru finalizarea profilului toxicologic.