

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
Departamentul II – Specializarea Farmacognozie

GHIȚU A. ALEXANDRA-MĂLINA



REZUMAT

Conducător științific

Prof. Univ. Dr. Farm. DANCIU CORINA

Timișoara
2021

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
Departamentul II - Specializarea Farmacognozie**

GHIȚU A. ALEXANDRA-MĂLINA



REZUMAT

**EVALUAREA *IN VITRO* A COMPUSULUI NATURAL
BIOACTIV APIGENINĂ PE MODELE EXPERIMENTALE DE
MELANOM MALIGN: POTENȚIAL ANTIPROLIFERATIV,
PRO-APOPTOTIC, ANTIANGIOGENETIC ȘI
IMUNOMODULATOR**

Conducător Științific
Prof. Univ. Dr. Farm. DANCIU CORINA

**Timișoara
2021**

EVALUAREA *IN VITRO* A COMPUSULUI NATURAL BIOACTIV APIGENINĂ PE MODELE EXPERIMENTALE DE MELANOM MALIGN: POTENȚIAL ANTIPROLIFERATIV, PRO- APOPTOTIC, ANTIANGIOGENETIC ȘI IMUNOMODULATOR

I. INTRODUCERE. OBIECTIVELE STUDIULUI.

Fitoterapia reprezintă una dintre temele de cercetare de actualitate pentru secolul XXI, numeroase studii din literatura de specialitate atestând proprietățile terapeutice ale compușilor de origine vegetală (1). Cele mai recente statistici arată faptul că peste 60 % din medicația actuală are ca sursă de proveniență compușii naturali, eficiența acestor substanțe fiind dovedită atât pentru tratamentul cât și pentru prevenția diferitelor afecțiuni. 83% dintre noile molecule active admise în managementul terapeutic al cancerului sunt derivate din compuși de natură vegetală (2), (3).

Conform ultimelor statisticilor realizate de OMS, cancerul reprezintă una dintre principalele cauze de deces la nivel mondial (10 milioane de decese), iar bolile cardiovasculare (17.9 milioane de decese), bolile respiratorii cronice (3.8 milioane de decese) și diabetul (1.6 milioane de decese) se încadrează în categoria celor mai des întâlnite cauze de deces, alături de cancer (4).

Scopul tratamentelor anticanceroase este de a asigura videcarea, sau de a obține noi tratamente paliative împotriva acestei patologii. Cercetări recente au ca obiectiv dezvoltarea unei strategii de eradicare a acestei maladii, care să acționeze ținut asupra celulelor canceroase, având ca scop stimularea procesele antiproliferative și/, sau pro-apoptotice și/, sau antiangiogenetice. Metodele de tratament în curs de dezvoltare vizează micromediul tumoral, cu activarea /inhibarea unor ținte moleculare ce constituie factori cheie în ceea ce privește evoluția, progresia și rezistența celulelor maligne (5).

Cele mai răspândite tipuri de cancer de piele sunt reprezentate de: cancerul bazocelular, (cel mai frecvent, însă și cel mai puțin periculos); cancerul spinocelular (are o capacitate mare de răspândire în organism și risc mare de suprainfectare) keratozele actinice (reprezintă leziuni precanceroase) și melanomul. Mai puțin întâlnite pot fi: carcinomul cu celule Merkel, sarcomul Kaposi și carcinomul glandelor sebacee. (6) Melanomul reprezintă cea mai agresivă formă de cancer, datorită capacității sale ridicate de metastazare (7).

Unul dintre cele mai des întâlnite inconveniente în terapia cancerului este reprezentat de apariția numeroaselor efecte adverse, chimioterapia nefiind suficient de selectivă în eradicarea procesului malign. În același timp și rapiditatea instalării rezistenței medicamentoase, contribuie la insuccesul tratamentului și la creșterea numărului de decese datorat acestei maladii (8), (9).

Dintre compușii naturali cu proprietăți anticanceroase (studii experimentale preclinice/clinice), respectiv derivații lor pot fi enumerați: resveratrolul, curcuminul, quercitina, kaempferolul, apigenina, daidezina, mircetina, genisteina, lignina, acizii hidroxicinamici și hidroxibenzoici, epigallocatechinele, sulforafanul, β -sitosterolul, campesterolul, stigmasterolul, acidul oleanolic, acidul ursolic, artemisinina, amentoflavona, carnosolul, vinca-alkaloizii, taxanii, epipodofilotoxinele, irinotecanul, topotecanul, antraciclina, berberina, amentoflavona, eudininul, eupatilina, licopenul, luteina, fucoxantina, cantaxantina, hipericina, gingerolul (3), (10).

Câteva exemple de fitocompuși cu acțiune *in vitro* pe diferite linii celulare includ: artemisinina (*Artemisia annua* L.) inhibă multiplicarea liniilor celulare de cancer mamar [MDA-MB-231 și MCF-7], cancer pancreatic [Mia PaCa-2], cancer de prostată [PC-3], cancer pulmonar [A459] (11); quercetina (*Allium cepa* L.) deține efect antimelanom pe linia celulară de melanom murinic [B16-BL6]; amentoflavona (*Biophytum sensitivum* L.) inhibă procesul de metastazare pe linia celulară de melanom

murinic [B16F10]; fucoxantina (*Fucus luminaria* L.) inhibă dezvoltarea liniilor celulare de melanom [SK-MEL-28 și B16F10]; daidzeina și genisteina (*Glycine max* L.) dețin efect sinergic pe linia celulară de carcinom cutanat [A431] (2); galatul de epigallocatechină (EGCG) (*Camellia sinensis* L.) exercită efect citotoxic pe liniile celulare de cancer mamar [MDA-MB-231 și MCF-7] (12). Polizaharidelele (PGL) din *Ganoderma lucidum* L. inhibă dezvoltarea melanomului murinic [B16F10] și a cancerului de colon [HCT-116, SW 480 și AH-130], (13), berberina (*Tinospora cordifolia* L.) este activă pe linia celulară de carcinom cervical uman [SiHa] și carcinomul de cavitate bucală [Kb] (14); boldinele (*Peumus boldus* L.) inhibă dezvoltarea liniilor celulare de cancer mamar [MCF-7 și MDA-MB-231]; timochinona (*Nigella sativa* L.) suprimă dezvoltarea tumorală a liniei celulare de cancer pulmonar uman [A549] (2); licopenul (*Solanum lycopersicum* L.) deține acțiune anticanceră pe diferite linii celulare de cancer de prostată [LNCaP, CaP și PC3] (15), gingerolul (*Zingiber officinale* L.) acționează pe linia celulară de cancer pulmonar [A549], gastric cancer [HGC], cancer mamar uman [MDA-MB-231] (16); acidul ursolic (*Rosmarinus officinalis* L.) diminuează angiogeneza tumorală pe linia celulară de melanom [SK-MEL-2] (17); curcuminul (*Curcuma longa* L.) inhibă dezvoltarea liniei celulare de melanom uman [A375 și C8161] (18), resveratrolul (*Vitis vinifera* L.) suprimă dezvoltarea liniei celulare de cancer colorectal [LoVo], cancer mamar [MCF-7], cancer ovarian [CAOV-3 și OVCAR-3], cancer cervical [HeLa și SiHa], cancer gastric [SGC-7901] (19).

De asemenea, proprietățile antitumorale ale compușilor vegetali au fost atestate și prin numeroase studii *in vivo*. Printre acestea se pot enumera: berberina (*Coptis chinensis* L.) pe model de xenogrefe [linia celulară de cancer gastric uman BGC-823 și SGC7901 inoculată în tulpina de șoareci albino] (20), sulforafanul (*Brassica oleracea* L.) pe model animal experimental [linia celulară de melanom murinic B16F-10 inoculată în tulpina de șoareci C57BL/6], apigenina (*Matricaria chamomilla* L.) pe model animal experimental [linia celulară de cancer de prostată LNCaP inoculată în tulpina de șoareci TRAMP C57BL/TGN] (21), gingerol (*Zingiber officinalis* L.) pe model animal experimental [linia celulară de cancer gastric HGC inoculată pe șoareci atimici albino] (16), acidul ursolic (*Rosmarinus officinalis* L.) pe model CAM [linia celulară de melanom uman SK-MEL-2 inoculată pe model CAM] (17), curcuminul (*Curcuma longa* L.) pe model animal experimental [linia celulară de melanom uman A375 inoculată în tulpina de șoareci albino BALB/c] (18).

Anumiți compuși naturali au fost incluși și în studii clinice. Cateva exemple în acest sens: Homoharingtonina (*Cephalotus fortune* L.) este aprobată pentru tratamentul leucemiei cronice mieloide. Primul tratament combinat antigen-agent anticancer este reprezentat de IgG4 kappa și calicheamicina 101 (*Micromonospora echinospora* L.) studiat în cazul limfomului non-Hodgkin. De asemenea, compusul IMGN-901 (HuN901-DM1) 235, un conjugat al maitansinei (*Actinosynnema pretiosum* L.) și a anticorpului huN901 a fost evaluat pentru tratamentul mielomului multiplu și a cancerului pulmonar (22). În review- ul realizat de Chinembiri și colab. se menționează despre studiile clinice ce vizează efectul curcuminului în cancerul colorectal, cancerul de prostată, mamar, pancreatic și biliar. Este cunoscut faptul că brentuximab vedotinul este aprobat pentru tratamentul limfomului anaplastic și limfomului Hodgkin încă din 2011 (10), iar compușii de origine marină (aplidin (plitidepsina)- limfom non-Hodgkin; bryostatin-1- cancer ovarian, salinosporamida A- mielom multiplu, tumori solide, limfoame și zalypsis- sarcom Ewing) sunt utilizați în schemele terapeutice pentru diferite tipuri de cancer (23).

Numeroși compuși sunt incluși și la momentul actual în diferite studii clinice. Printre care: genisteina pentru cancerul de prostată (24); desmodium (un amestec de triterpene, saponine, alcaloizi, polifenoli, flavonoide și derivați de triptamină pentru cancerul mamar (25); quercitina pentru cancerul de prostată (26); isoquercitină pentru cancerul renal (27); resveratrolul pentru cancerul de colon și tumori gastro-intestinale (28), (29); amestec de fenoli (hidroxitirozol), polifenoli (procianidine, hesperidina, eriocitrina, curcumina, resveratrol, punicagin, acid elagic), metilxantine (teobromină și cafeină) pentru cancerul de sân (30); epirubicina și vinorelbina pentru cancerul mamar (31); vincristina pentru leucemia limfocitară cronică (32); irinotecanul (derivat semisintetic al camptotecinei) pentru cancerul colorectal și metastatic (33).

Procesul de angiogeneză se află într-o strânsă legătură cu evoluția proceselor canceroase, iar printre speciile ce dețin calități anti-angiogenetice se pot preciza următoarele: *Vitis vinifera* L. (resveratrol), *Camelia sinensis* L. (epigallocatechin-3 –galat), *Silybum marianum* L. (silimarină), *Genista tinctoria* L. (genisteină) (34), *Taxus brevifolia* L. (taxol) (35), *Curcuma longa* L. (curcumin) (36), *Panax ginseng* L., (ginsenosida-Rg3) (37), *Magnolia officinalis* L. (magnosalin) (38), *Rabdosia rubescens* L. (oridonină) (39), *Scutellaria baicalensis* L. (baicalină), *Allium hirtifolium* L., (quercitina), *Artemisia annua* L. (artemisinina) (40), *Zingiber officinalis* L. (gingerol) (41), *Glycyrrhiza glabra* L. (glabridin, isoliquiritigenin) (42), *Glycine max* L., (genisteină, daidzeină) (43).

Principalul obiectiv al acestei teze de doctorat este reprezentat de elucidarea mecanismului complex de acțiune anti melanom al flavonei apigenină asupra liniei celulare de melanom uman A375, prin diferite teste *in vitro*, concomitent cu determinarea efectului apigeninei asupra celulelor dentritice și implicit asupra sistemului imunitar. Secundar s-au realizat teste pe alte linii celulare de melanom, uman (SK-MEL-24), respectiv murin (B164A5), respectiv asupra liniei celulare de cancer cervical uman HeLa.

Flavonoidele se numără printre cele mai semnificative clase de compuși farmacologic activi. Acestea sunt prezente în compoziția chimică a numeroase plante medicinale, fructe și legume și se subclasifică în funcție de: numărul/ locul de grefare al radicalului fenil, de prezența/ absența dublei legături de la nivelul poziției 2-3, de natura substituenților, de numărul nucleelor din moleculă în: flavone, flavonoli, flavanone, flavanonoli, izoflavone, biflavonoide, neoflavonoide, chalcone, aurone, catechine și antociani (44).

Apigenina face parte din subclasa flavonelor, iar din punct de vedere farmacologic este caracterizată de o varietate de proprietăți dintre care se pot menționa: efecte vasoprotectoare, antiinflamatoare, hipotensive, antivirale, antibacteriene, iar în ultimii ani, studiile de specialitate au evaluat și confirmat prin diferite studii *in vitro* și *in vivo*, efectele sale antitumorale, pe diferite linii celulare (45),(1).

Mușețelul- *Matricaria chamomilla* L. (sinonim *Matricaria recutita* L.) se evidențiază ca fiind una dintre cele mai importante surse de apigenină. Aparține familiei *Asteraceae* și are un conținut de apigenină cuprins în intervalul 5010- 5320 mg/100 g produs uscat (46), (47). Cantități remarcabile se regăsesc și în: *Petroselinum crispum* L. (1200-1350 mg/100 g produs uscat) (47), *Apium graveolens* L. (108 mg/100 g produs uscat) (48), *Rosmarinus officinalis* L. (43.8 mg/100 g produs uscat) (47), *Camelia sinensis* L. (41.4- 175.7 mg/100 g produs uscat), *Origanum vulgare* L. (15.6- 19.4 mg/100 g produs uscat) (47), *Piper nigrum* L. (4.98 mg/100 g produs uscat) (48), *Capsicum annum* L. (3.5 mg/100 g produs uscat) (49).

II. MATERIALE ȘI METODE

II.1. Studiul I: Evaluarea potențialului antiproliferativ, proapoptotic, anti-angiogenetic și imunomodulator al apigeninei pe linia celulară de melanom uman A375.

II.1.1. Evaluarea potențialului antiproliferativ al apigeninei (Api) pe linia celulară de melanom uman A375 s-a realizat prin intermediul metodei MTT. Acest tip de analiză reprezintă una dintre cele mai utilizate analize pentru determinarea viabilității celulare și constă în reducerea sării de tetrazoliu de culoare galbenă [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazoliu bromură sau MTT] la cristale de formazan de culoare violet. Procesul este realizat de celulele viabile. (50).

II.1.2. Analiza ciclului celular prin citometrie în flux în urma incubării cu Api *in vitro*, pentru linia celulară de melanom uman A375. Principiul acestei metode se bazează pe determinarea simultană a parametrilor fizici și chimici ai fiecărei celule analizate aflate într-un sistem, în același timp realizându-se și sortarea celulelor pentru utilizarea acestora în teste ulterioare. Astfel, în scopul determinării distribuției celulare în urma incubării cu Api asupra liniei celulare de melanom uman A375 s-a evaluat conținutul ADN-ului celular și fazele ciclului celular, prin intermediul analizei de citometrie în flux (51).

II.1.3. Evaluarea efectului antimigrator, prin metoda “Scratch Assay” în urma incubării cu Api, *in vitro*, pentru linia celulară de melanom uman A375. Prin intermediul acestei metode s-a determinat potențialul antimigrator al Api *in vitro*, pe linia celulară de melanom uman A375. Metoda se bazează pe evaluarea capacității de inhibiției a migrării celulare și metastaziere, creșterea și dezvoltarea celulelor de melanom A375 fiind evaluată comparativ cu linia de control (52).

II.1.4. Determinarea activității caspazei 3 prin metoda colorimetrică, în urma incubării cu Api, *in vitro*, pentru linia celulară de melanom uman A375. Pentru a evidenția prezența/ absența caspazei-3 s-a utilizat o metodă colorimetrică prin intermediul căreia s-a determinat activitatea acestei enzime. Determinarea expresiei caspazei-3 a reprezentat un factor important în studiul prezent deoarece caspazele constituie factori cheie în procesul de apoptoză (53).

II.1.5. Evaluarea fenomenului de apoptoză (precoce/târzie și necroză) prin tehnica Annexin V-PI, în urma incubării cu Api *in vitro* pentru linia celulară de melanom uman A375. Evaluarea acestui fenomen s-a realizat prin utilizarea combinației Annexin V-PI, care oferă informații necesare pentru evaluarea și diferențierea celulelor aflate în faza de apoptoză precoce (Annexin- V– pozitiv, PI– negativ), sau târzie (Annexin- V– negativ, PI– pozitiv), de celulele viabile (Annexin-V- negativ, PI- negativ), sau de celulele necrozate (Annexin-V- pozitiv, PI- pozitiv). Asocierea Annexin V- PI, nu realizează colorarea celulelor viabile, ori aflate în apoptoză precoce, ci doar a celulelor necrotice, sau în apoptoză târzie, deoarece acestea au membrana compromisă, permițând PI să patrundă în interiorul celulelor și astfel să reacționeze cu acizii nucleici, formând o fluorescență roșie (54).

II.1.6. Evaluarea citotoxicității prin determinarea cantității de LDH, în urma incubării cu Api, *in vitro*, pentru linia celulară de melanom uman A375. Principiul acestei metode se bazează pe eliberarea enzimei citosolice LDH în mediu, aceasta urmând să fie cuantificată ulterior ca o reacție enzimatică ce produce formazanul. Cantitatea de formazan produsă este direct proporțională cu LDH– ul secretat în mediu și reprezintă un indicator al efectului citotoxic (55).

II.1.7. Evaluarea profilului bioenergetic, cu ajutorul analizorului de flux extracelular (Seahorse XFe24), a liniei celulare de melanom uman A375, în urma incubării cu Api. Modificarea profilului bioenergetic a liniei celulare de interes, oferă informații cu privire la acțiunea antiproliferativă și citotoxică ale flavonei în studiu. Astfel, prin măsurarea parametrilor specifici în timpul experimentului [(a) respirația bazală, b) stadiul Leak, c) respirația maximală, d) turnover-ul adenozintrifosfatului (ATP-ului), e) capacitatea de rezervă- s-a conturat o imagine referitoare la modificarea profilului energetic celular în urma stimulării cu Api (56), (57).

II.1.8. Evaluarea profilului antiangiogenic al Api folosind tehnica membranei corioalantoide normale și tumorale cu celule de melanom uman A375. Evaluarea se realizează atât pe CAM normală, cât și pe CAM tumorală (linia celulară de melanom uman A375). Metoda folosită impune utilizarea ouălor de găina fertilizate (*Gallus gallus domesticus*). În prima etapă s-a urmărit efectul Api asupra CAM în dezvoltare normală, pentru a determina tolerabilitatea Api asupra țesuturilor normale și potențialul efect antiangiogenic, iar în a doua etapă s-a inoculat pe CAM normală linia celulară de melanom uman A375, pentru a dezvolta formațiuni tumorale. Pe aceste zone cu dezvoltare tumorală, s-a aplicat tratament cu: a) Api 30 μ M, b) Api 60 μ M, c) DMSO 1% - folosită ca soluție de control și s-a urmărit evoluția pe o perioadă de câteva zile (58) (59).

II.1.9. Evaluarea potențialului imunomodulator pe celule dendritice umane în urma incubării cu Api, prin analiza efectului asupra diferențierii, morfologiei și proliferării celulare utilizând tehnica XTT și microscopia de fluorescență. Potențialul imunomodulator al Api pe celule dendritice a fost evaluat prin intermediul analizei XTT și a microscopiei de fluorescență. Metoda XTT se bazează pe reducerea sării de tetrazoliu (sodiu 3'- [1- (fenilaminocarbonil) - 3,4-tetrazoliu] -bis (4-metoxi-nitro) benzen hidrat de acid sulfonic sau XTT) de culoare galbenă la formazan de culoare portocalie de către celulele viabile prin NADH produs de mitocondrie; astfel se formează un produs hidrosolubil denumit formazan, de culoare portocalie (60).

În ceea ce privește evidențierea morfologiei CD s-a utilizat microscopia de fluorescență în care s-au folosit ca reactivi soluția DAPI (4',6- Diamidina-2-fenilindol dihidroclorură) (Roche diagnostics,

Mannheim, Germania) și soluția de faloidină Alexa Flour 488. Metoda DAPI presupune marcarea prin fluorescență albastră a materialului nuclear expus, iar prin utilizarea reactivului faloidina- Alexa Flour este vizibilă o colorație violet-fluorescentă. Acest tip de reactivi sunt utilizați, de asemenea, pentru evidențierea fenomenelor de apoptoză, realizând colorarea celulelor ce prezintă alterări la nivelul membranei celulare (61).

II.1.10. Evaluarea potențialului imunomodulator pe celule dendritice umane, în urma incubării cu Api, prin analiza efectului asupra unor citokine (IL6, IL10, factorul de necroză tumorală α , (TNF α)). Această analiză s-a realizat prin intermediul microscopiei de fluorescență, tehnică descrisă anterior (61).

II.2. Studiul II: Evaluarea potențialului antiproliferativ, citotoxic și anti-angiogenic al apigeninei pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24

II.2.1. În prima etapă s-a evaluat activitatea antiproliferativă a Api pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24 prin intermediul tehnicii MTT, metodă utilizată și în studiul anterior. Această determinare a fost efectuată urmărind același protocol (62), iar celulele de melanom uman SK-MEL-24 au fost stimulate cu diferite concentrații de Api [0,3, 1, 3, 10, 30 și 60 μ M] (63).

II.2.2. Evaluarea efectului citotoxic al Api pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24 a fost realizată prin intermediul metodei LDH, de asemenea, utilizată în testele anterioare (63).

II.2.3. Evaluarea potențialului antimigrator al Api asupra liniei celulare de melanom uman SK-MEL-24 s-a realizat prin intermediul metodei Scratch assay. Stimularea celulelor de melanom a fost efectuată cu Api [30 și 60 μ M] (63).

II.2.4. Evaluarea potențialului anti-angiogenic al Api prin metoda CAM cu dezvoltare tumorală. Pentru realizarea acestei analize s-au testat două concentrații de Api [30 și 60 μ M], iar pentru linia de control s-a utilizat DMSO 0.5%. Metoda utilizată a fost reprezentată de metoda dezvoltată de Ribatii și colab., însă cu ușoare modificări (58), (64).

II.3. Studiul III: Evaluarea potențialului citotoxic și anti-angiogenic al apigeninei, pe linia celulară de melanom murinic B164A5.

II.3.1. Evaluarea activității antiproliferative a Api pe linia celulară de melanom murinic B164A5, prin intermediul analizei MTT. S-a respectat același protocol ca în studiile anterioare. Pe linia celulară de melanom murinic B164A5 au fost testate diferite concentrații de Api [1, 3, 10, 30 și 60 μ M] pentru o perioadă de timp de 72 h (65).

II.3.2. Prin intermediul tehnicii LDH a fost evaluat potențialului citotoxic al Api asupra liniei celulare de melanom murinic B164A5, respectând protocolul aferent metodei LDH (65).

II.3.3. Cu ajutorul metodei de analiză CAM s-a realizat evaluarea potențialului anti-angiogenic al Api pe linia celulară melanom murinic B164A5. Metoda este descrisă anterior (58) (59).

II.4. Studiul IV: Evaluarea *in vitro* a apigeninei și a apigeninei-7-O-glicozidă asupra liniei celulare de cancer cervical uman HeLa.

II.4.1. Evaluarea activității antiproliferative a Api și a Api-7-O-glicozidă pe linia celulară de cancer cervical uman HeLa. Metoda a fost realizată prin intermediul analizei MTT, protocolul fiind descris anterior (66).

II.4.2. Evaluarea potențialului pro-apoptotic prin metoda DAPI și a tehnicii Annexin V-PI. Metoda colorimetrică DAPI a fost utilizată pentru evidențierea nucleilor, fiind testate două concentrații de Api (aglicon), respectiv Api-7 (heterozidă) [10 μ M și 30 μ M]. Aceleași concentrații de Api și Api-7 au fost testate și prin metoda Annexin V-PI (66).

III. REZULTATE

III.1. Studiul I

III.1.1. Rezultatele obținute în urma evaluării Api [0.3- 60 μ M] pe linia celulară de melanom uman A375 au demonstrat prezența efectului antiproliferativ al fitocompusului de interes, efectul fiind detectat începând cu concentrația de 30 μ M, iar valoarea IC_{50} fiind atinsă la concentrația de 33.02 μ M (62).

III.1.2. În urma analizării ciclului celular prin citometrie în flux, s-a demonstrat că atât la concentrația de 30 μ M, cât și la 60 μ M, Api induce blocajul celular în faza G2/M și conduce la creșterea procentului de celule A375 din această fază, de la 18.946 \pm 1.91% (linia de control) la 33.423 \pm 0.15% la concentrația de 30 μ M, respectiv la 33.653 \pm 0.96 % la concentrația de 60 μ M (62).

III.1.3. Rezultatele înregistrate au demonstrat faptul că Api 30 μ M, cât și 60 μ M au condus la un efect inhibitor semnificativ asupra migrării celulare ale celulelor de melanom uman A375, comparativ cu linia de control. Modificările înregistrate au fost următoarele: Api 30 μ M- 24 h a produs o modificare a culoarului de migrare al celulelor de melanom [de la 550.84 μ m la 418.90 μ m], iar în cazul Api 60 μ M- 24 h [de la 575.05 μ m la 537.59]. Valorile ratei de refacere celulară induse au fost de 23% pentru Api 30 μ M și 6.84% pentru Api 60 μ M. Rata de inhibiție a migrării celulare indusă de apigenină a înregistrat valori de 77 % pentru Api 30 μ M și de 93,16 % pentru Api 60 μ M. O altă modificare produsă a fost asupra formei și morfologiei celulare după aplicarea Api 60 μ M (62).

III.1.4. La 72 h după stimularea cu Api 30 μ M a fost detectată o activitate crescută a enzimei caspaza-3, fenomenul a fost însă diferit în cazul incubării cu Api 60 μ M, caz în care activitatea caspazei- 3 nu a înregistrat creșteri, efect posibil datorat instalării efectului citotoxic la această concentrație și timp de incubare. În același timp s-au urmărit și valorile caspazei- 2 și a proteinei p53, dar nu a fost înregistrată expresia acestora. Fenomenul instalat în cazul acestei analize poartă numele de fenomene Hormesis, prin creșterea răspunsului bifazic (doze mici– obținere efect terapeutic, doze mari- obținere efect citotoxic (62).

III.1.5. În urma utilizării tehnicii Annexin V-PI s-a evidențiat faptul că post incubare cu Api 30 μ M, cât și cu Api 60 μ M s-au instalat fenomenele de apoptoză timpurie, cât și târzie, respectiv necroză. În cazul Api 30 μ M s-a observat preponderent apariția fenomenului de apoptoză timpurie (8.5 \pm 1.8 % celule), în schimb Api 60 μ M a indus cu precădere fenomenul de apoptoză târzie (12.25 \pm 2.9% celule) (62).

III.1.6. Ca urmare a cuantificării cantității de LDH pentru evaluarea efectului citotoxic indus de Api asupra liniei celulare de melanom uman A375 s-au înregistrat următoarele rezultate: la 72 h post stimulare cu Api, cantitatea de LDH eliberată a fost diferită în funcție de concentrația testată. Rata de citotoxicitate pentru Api 30 μ M a înregistrat o valoare de 20.75%, iar pentru DMSO, rata de citotoxicitate a fost de 1.12%. Odată cu creșterea concentrației de Api la 60 μ M, rata de citotoxicitate asupra liniei de melanom A375 nu a înregistrat creșteri, ci o valoare similară și anume, 19% (62).

III.1.7. Rezultatele obținute în urma înregistrării parametrilor urmăriți în cazul determinării profilului bioenergetic, au evidențiat că în ceea ce privește respirația bazală, celulele au rămas în stadiu nemodificat, iar asupra ratelor bazale s-a observat o creștere dozo-dependentă (respirația bazală pentru Api 30 μ M este de 137.9 \pm 31.4 pmoli/min vs. Control 266.07 \pm 20.8 pmoli/ min, iar în cazul Api 60 μ M respirația bazală este de 22.2 \pm 5.5 pmols/min vs. Control). În stadiul Leak a avut loc o scădere a OCR-ului datorită blocării producției de ATP, după injectarea de oligomicină. La cea mai mare doză de Api aplicată [60 μ M], s-a observat o scădere a stadiului Leak (34.9 \pm 7.1 pmoli/min vs. Control 135.01 \pm 14.6 pmoli/min), și a ratei respiratorii maxime (12.4 \pm 5.3 pmoli/min vs Control 46.5 \pm 5.9 pmoli/min. În cazul acestui experiment respirația maximală a fost mai redusă decât respirația bazală, datorită celulelor tumorale care trec la o stare glicolică. Respirația maximală pentru Api 30 μ M a fost de 53.3 \pm 6.9 pmoli/min, în schimb pentru Api 60 μ M s-au obținut valori de 12.4 \pm 5.3 pmoli/min. Turn-over-ul ATP-ului a înregistrat o scădere după stimularea cu Api, efect observat în cazul ambelor concentrații testate, dar și în cazul DMSO. (Turnoverul ATP-ului pentru Api 60 μ M, fost de 22.1 \pm 8.3 pmols/min vs. Control, iar în cazul Api 30 μ M a fost

înregistrată o valoare de 12.65 ± 6.5 pmoli/ min vs. Control 131.05 ± 7.1 pmoli/ min). Astfel în urma stimulării cu Api s-a produs o modificare a profilului bioenergetic în cazul liniei celulare de melanom uman A375, fenomen mai pregnant în cazul Api $60 \mu\text{M}$. Din ce se cunoaște din literatura de specialitate, acestea ar fi primele date referitoare la efectul Api asupra respirației mitocondriale, cât și asupra glicolizei la nivelul liniei de melanom uman A375. În ceea ce privește modificările asupra capacității de rezervă, Api reduce considerabil capacitatea de rezervă a celulelor tumorale A375 (Capacitatea de rezervă pentru Api $30 \mu\text{M}$ este de -9.8 ± 5.8 pmoli/min vs Control -219 ± 24.5 pmoli/min, iar în cazul Api $60 \mu\text{M}$ -84.6 ± 31.4 pmoli/min vs Control). În ceea ce privește valorile ECAR, tratamentul cu Api a produs o scădere dozo-dependentă semnificativă a ECAR, ceea ce indică faptul că Api induce și o deficiență în activitatea glicolică celulară (Api $30 \mu\text{M}$ -11.4 ± 2.8 mpH/min vs Control 65.04 ± 1.5 mpH/min, iar pentru Api $60 \mu\text{M}$ -45.1 ± 7 mpH/min vs Control) (62).

III.1.8. În cazul CAM normală, stimularea cu Api $30 \mu\text{M}$ a produs o inhibare semnificativă a procesului de angiogenență, comparativ cu linia de control, iar Api $60 \mu\text{M}$ a determinat un proces iritativ și fibrotic ce implică un număr semnificativ de capilare în jurul zonei lezate (62).

În cazul testării Api asupra CAM cu dezvoltare tumorală, s-a constatat faptul că ambele concentrații de Api au produs o afectare a angiogenezei tumorale, afectând migrarea celulelor canceroase și reducând numărul de capilare (62).

III.1.9. Evaluarea efectului asupra celulelor dendritice (CD) s-a realizat în prezența, sau absența lipopolizaharidelor (LPS), după incubarea cu diferite concentrații de Api și DMSO. Post activare cu LPS, CD incubate cu vehicul s-au extins, însă această expansiune celulară a fost semnificativ diminuată prin incubare cu Api $30 \mu\text{M}$, respectiv Api $60 \mu\text{M}$. În cazul dozelor foarte mici de Api [$1 \mu\text{M}$] nu s-a produs nici o modificare comparativ cu proba de control. Un alt aspect înregistrat a fost asupra modificării activității metabolice a CD, fenomen observat în cazul dozelor crescute de Api, atât după 24 h de la aplicarea Api, dar și mai pregnant după 48 h de la stimularea cu Api. Aspectul CD, de asemenea, a fost modificat, observându-se după stimularea cu LPS, o agregare tipică, sub formă de clustere, în cazul liniei de control, însă acest fenomen nefiind prezent în cazul stimulării cu doza crescută de Api [$60 \mu\text{M}$] (62).

Morfologia CD a fost, de asemenea, modificată, în urma stimulării cu Api $60 \mu\text{M}$, CD adoptând o formă rotundă, iar în cazul stimulării cu LPS, nu au fost evidențiate fenomene de dezvoltare standard asupra CD. În cazul Api $1 \mu\text{M}$ și $30 \mu\text{M}$ nu a fost vizibilă nicio modificare asupra morfologiei CD, comparativ cu linia de control. În schimb, în cazul incubării cu Api $60 \mu\text{M}$, morfologia CD a fost afectată. Prin adăugarea LPS, în condiții normale CD s-au activat. În acest caz, în urma aplicării Api 30 și $60 \mu\text{M}$, CD nu s-au dezvoltat în urma activării de către LPS (62).

III.1.10. Pentru a observa dacă activitatea redusă a celulelor stimulate cu LPS a produs anumite consecințe functionale a fost analizată secreția citokinelor. În urma aplicării dozelor mari de Api secreția citokinelor a fost puternic blocată, iar aplicarea DMSO a cauzat o creștere semnificativă a IL-6 și a secreției TNF- α , posibil aceste fenomene sa fie datorate și creșterii permeabilității membranei. Secreția IL-6 și IL-10 a fost blocată aproape total în cazul stimulării cu Api $30 \mu\text{M}$, respectiv $60 \mu\text{M}$ iar secreția TNF- α a fost redusă cu aproximativ 60%. Dozele mici de Api nu au cauzat nici un efect, comparativ cu grupul de control (62).

III.2. Studiul II

III.2.1. În urma analizei MTT, viabilitatea celulară pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24, a fost diminuată, dozele cele mai mari de Api fiind responsabile de efectul cel mai pregnant de afectare a proliferării celulelor de melanom (la $30 \mu\text{M}$ - viabilitatea celulară a fost de 75.08 ± 5.5 % vs. Control iar pentru $60 \mu\text{M}$ – viabilitatea celulară a fost de 62.9 ± 5.4 % vs. Control) (63).

III.2.2. În cazul analizei LDH, concentrațiile de Api testate au fost de $30 \mu\text{M}$ și $60 \mu\text{M}$, deoarece acestea au înregistrat un efect semnificativ antiproliferativ asupra liniei celulare SK-MEL-24. În urma stimulării cu Api, s-a observat un efect citotoxic semnificativ, dependent de doza de Api testată. Rata de citotoxicitate pentru concentrația de $30 \mu\text{M}$ a fost de 9 ± 1.1 % vs. Control (1.6 ± 0.7 %), respectiv pentru concentrația de $60 \mu\text{M}$ a fost de 11.1 ± 2.4 % vs. Control (63).

III.2.3. În intervalul de doze testate, Api a condus la inhibiția migrării celulelor de melanom uman SK-MEL-24, dependent de doza testată. În cazul concentrației de 30 μM , rata de inhibiție a migrării a fost de 6.2%, iar în cazul concentrației de 60 μM , valoarea înregistrată a fost mai scăzută, de 3.4 % (63).

III.2.4. Metoda CAM a arătat faptul că, ambele concentrații de Api au produs modificări asupra creșterii și dezvoltării tumorale (linia celulară de melanom uman SK-MEL-24), zona tumorală devenind mai puțin compactă, iar aspectul vaselor de sânge, a suferit modificări, formând o rețea vasculară densă, de tip spițe de roată convergente către celulele tumorale, aceste aspecte instalându-se la 24 h post stimulare. După 48 h, aria celulelor tumorale a fost limitată, numărul capilarelor a fost redus, de asemenea și procentul de vase de sânge din zonele peritumorale, acestea căpătând un aspect neregulat. Nu au fost observate diferențe majore între cele două concentrații de Api testate, însă în cazul Api 60 μM s-a observat o diminuare mai pregnantă a neoangiogenezei și a dezvoltării celulelor tumorale (63).

III.3. Studiul III

III.3.1. În urma analizei MTT, s-a demonstrat faptul că Api deține efecte antiproliferative pe linia celulară de melanom murinic B164A5, dependent de doza de compus utilizată. Viabilitatea celulară după aplicarea Api a fost de $76 \pm 1.7\%$ vs. Control în cazul concentrației de 30 μM , iar în cazul concentrației de 60 μM s-a obținut o viabilitate celulară de $57.8 \pm 1.8\%$ vs. Control (65).

III.3.2. Valorile înregistrate în urma analizei LDH au demonstrat efectul citotoxic al Api pe linia celulară de melanom murinic B164A5. Rata de citotoxicitate în cazul concentrației de 30 μM a fost de $13.3 \pm 1.7\%$, iar în cazul concentrației de 60 μM rata de citotoxicitate a înregistrat o valoare de $15.1 \pm 1.8\%$, valorile fiind raportate la grupul de control (65).

III.3.3. Ca urmare a analizei CAM cu dezvoltare tumorală cu celule de melanom murinic B164A5, după aplicarea Api [30 și 60 μM - 48 h], s-au observat următoarele aspect: zonele tumorale au fost reduse, aglomerările de celule au fost diminuate, iar în jurul inelului de aplicare a fost observată o densitate celulară mai scăzută. În urma stimulării cu concentrația de 30 μM , capilarele au devenit mai fine și neuniforme, iar în cazul concentrației de 60 μM , vasele de sânge au prezentat un aspect neregulat. În cazul ambelor concentrații de fitocompus testat, a fost diminuată migrarea celulară, însă numărul celulelor a fost redus cu precădere în cazul dozei mari utilizate [60 μM] (65).

III.4. Studiul IV

III.4.1. Prin intermediul metodei MTT s-a demonstrat că atât Api, cât și Api-7-O-glicozida produc afectarea viabilității celulare pe linia celulară de cancer cervical uman HeLa. Intervalul de doze utilizat a fost [0.3; 1; 3; 10; 30 μM]. Valoarea IC_{50} a fost atinsă la concentrația de 12.08 μM pentru Api, respectiv la concentrația de 18.28 μM pentru Api-7-heterozidă. Se poate observa că agliconul a fost mai activ, comparativ cu forma conjugată, însă glucoza (elemental conjugat) nu a produs modificări semnificative asupra proliferării celulelor de cancer cervical uman HeLa (66).

III.4.2. Prin intermediul metodei DAPI s-a evidențiat potențialul pro-apoptotic al compușilor naturali studiați. Condensarea nucleilor și numărul diminuat al acestora reprezintă rezultatul afectării integrității membrane celulare, evenimente vizibile în urma incubării cu Api și Api-7-O- glicozidă, a liniei celulare de cancer cervical uman HeLa (66).

În ceea ce privește potențialul pro-apoptotic pe linia celulară de cancer cervical uman HeLa, în urma analizei Annexin V- PI, s-a dovedit faptul că atât Api, cât și Api- 7- O-glicozidă induc fenomene de apoptoză precoce, târzie și necroză, însă cel mai des se pot observa fenomenele de apoptoză precoce. În urma incubării cu Api [10 μM] procentul de celule viabile a fost de $79 \pm 2\%$, iar pentru Api -7- O-glicozidă [10 μM] s-a obținut o valoare de $84 \pm 3\%$. În cazul stimulării cu Api [30 μM], procentul de celule viabile înregistrat a fost de $67.5 \pm 2.5\%$, iar pentru Api- 7- O- glicozidă [30 μM] a fost determinat un procent de $72.5 \pm 2.5\%$ celule viabile (66).

IV. CONCLUZII

Ca urmare a studiilor efectuate, se pot concluziona următoarele aspecte:

1. Api exercită efecte antiproliferative (dependente de doză și timp) pe linia celulară de melanom uman A375, valoarea IC_{50} , fiind înregistrată la concentrația de 33.02 μM .
2. În urma determinării efectului Api asupra ciclului celular, ambele concentrații testate [30 μM și 60 μM] au condus la blocarea ciclului celular în faza G2/M, la blocarea sintezei de ADN și enzime și a afectat procesul de diviziune celulară a liniei celulare de melanom uman A375. S-au înregistrat următoarele procentaje: $18.946 \pm 1.91\%$ (linia de control), $33.423 \pm 0.15\%$ [Api 30 μM] și $33.653 \pm 0.96\%$ [Api 60 μM].
3. Efectul antimigrator al Api a fost detectat atât la concentrația de 30 μM , cât și la concentrația de 60 μM , prin intermediul analizei Scratch assay. În vederea extrapolării acestui efect *in vitro*, sunt necesare teste ulterioare *in vivo* pentru confirmarea unui potențial efect antimetastatic.
4. Api [30 μM - 72h] a produs activarea enzimei caspaza-3, însă în cazul concentrației de [60 μM - 72h], acest mecanism nu a fost vizibil, obținându-se un efect citotoxic.
5. În urma efectuării analizei Annexin V-PI s-au înregistrat următoarele fenomene: în urma incubării liniei celulare A375 cu fitocompus în concentrație de 30 μM , au fost detectate preponderent fenomene de apoptoză timpurie, iar în cazul concentrației mai mari [60 μM], s-a produs un număr mai mare de evenimente asociate apoptozei târzii. Celulele în stare de necroză, reprezintă un procent scăzut în acest caz.
6. Efectul citotoxic indus de Api [30 μM și 60 μM] a fost prezent, însă s-a manifestat într-o manieră redusă și fără diferențe semnificative între cele două concentrații testate.
7. În urma incubării cu fitocompusul studiat, doar în cazul concentrației de 60 μM , s-au produs modificări asupra profilului energetic al liniei celulare de melanom uman A375. Modificările înregistrate pot fi utilizate în vederea testării ulterioare ale Api ca agent antitumoral activ pe respirația mitocondrială.
8. În ceea ce privește efectele Api asupra procesului de angiogeneză normală, concentrația mai mică a produs un efect inhibitor mai puternic, pe când Api 60 μM , a produs apariția unor procese de iritație, inflamație și fibroză la nivelul CAM. Asupra angiogenezei tumorale (linia celulară de melanom uman A375), Api 30 μM a condus la diminuarea numărului vaselor de sânge din interiorul inelului de aplicare și la afectarea aspectului capilarelor, precum și a diminuării zonelor tumorale. În cazul Api 60 μM limitarea creșterii tumorale a fost mai pronunțată, precum și numărul de capilare interconectate, însă vascularizația nu a suferit modificări ca în cazul Api 30 μM , proces posibil datorat efectului iritativ asupra CAM normală.
9. În urma incubării celulelor dendritice cu fitocompus [30 μM și 60 μM] s-au produs diferite evenimente: expansiunea celulelor dendritice a fost diminuată semnificativ și modificările morfologice au fost vizibile doar în cazul dozei mari de Api. De asemenea, a fost diminuată activitatea specifică lipopolizaharidelor ce activează funcția celulelor dendritice și inițiază procesul inflamator. Concentrația de 60 μM a produs modificarea morfologiei celulelor dendritice, acestea adoptând o formă rotundă, iar în cazul dozelor mici de Api [1 μM și 30 μM] nu s-au produs aceste modificări
10. Ca urmare a testelor *in vitro* pentru a evalua efectul Api asupra secreției de IL-10, IL-6 și TNF- α , secreția citokinelor a fost puternic blocată de către concentrațiile mari de Api, însă dozele mici de Api nu au generat nici un efect. Luând în considerare dozele și timpul de incubare, Api nu conduce la stimularea sistemului imunitar, deși acest eveniment ar fi fost un deziderat al acestui studiu.
11. În ceea ce privesc studiile realizate pe linia celulară de melanom uman SK-MEL-24, Api [30 și 60 μM] a produs afectarea viabilității celulare, înregistrându-se valori ale viabilității

celulare de $75.08 \pm 5.5 \%$ vs. Control [Api 30 μM] și de $62.9 \pm 5.4 \%$ [Api 60 μM], vs. Control. Efectul citotoxic generat de aceleași doze de compus natural a condus la valori dependente de doza testată, astfel că în cazul concentrației de 30 μM , valorile au fost de $9 \pm 1.1\%$ vs. Control ($1.6 \pm 0.7\%$), iar în cazul concentrației de 60 μM au fost de $11.1 \pm 2.4\%$ vs. Control. În urma analizei CAM, s-a demonstrat faptul că Api a condus la inhibiția migrării celulare (linia celulară de melanom uman SK-MEL-24), valorile înregistrate pentru rata de inhibiție a migrării celulare fiind de 6.2% [Api 30 μM] și de 3.4 % [Api 60 μM]. Între cele două concentrații testate, nu au existat diferențe semnificative, doar un efect mai pregnant în cazul Api 60 μM . Ambele concentrații de fitocompus au condus la limitarea dezvoltării și migrării celulelor tumorale SK-MEL-24, de asemenea, au produs inhibarea angiogenezei tumorale și au contribuit la reducerea vaselor de sânge din interiorul inelului.

12. Studiul experimental al Api asupra liniei de melanom murinic B164A5 a evidențiat proprietățile antiproliferative și citotoxice ale acestei flavone la ambele concentrații testate [30 și 60 μM], însă efectele au fost mai puternice în cazul dozei mai mari de Api. Angiogeneza tumorală a fost, de asemenea, afectată în cazul ambelor concentrații utilizate, dependent de doza testată. Aceste rezultate pot reprezenta o nouă direcție de cercetare pentru studiile ulterioare pe modele murinice.

Având în vedere rezultatele prezentate mai sus, se poate concluziona faptul că efectul antiproliferativ al Api s-a manifestat mai pregnant în cazul liniei celulare de melanom uman A375, comparativ cu linia celulară de melanom uman SK-MEL-24 și linia celulară de melanom murinic B164A5. De asemenea, în urma incubării cu acest fitocompus, efectul citotoxic a fost mai vizibil în cazul liniei celulare de melanom uman A375.

13. În ceea ce privește activitatea anticanceroasă *in vitro* a Api, cât și a Api- 7-O-glicozidă, rezultatele au demonstrat faptul că în ambele cazuri a fost afectată proliferarea celulelor de cancer cervical uman HeLa, însă activitatea mai intensă a fost observată în cazul agliconului (Api), comparativ cu heterozida (Api-7). Valorile IC_{50} au fost obținute la 12.08 μM pentru Api, respectiv la 18.28 μM pentru Api-7- O- glicozidă. În privința efectului pro-apoptotic, acesta s-a manifestat, de asemenea, în ambele cazuri, iar fenomenele au fost dependente de doza de Api, respectiv, Api-7-O- glicozidă.

Alături de studiile prezentate anterior, alte grupuri de cercetători au evidențiat activitatea antitumorală a Api pe alte linii celulare de melanom uman [518A2, A2058, C8161, RPMI-7951] și murinic [B164A5, B16F10, B16- BL6]. Rezultatele de față completează datele privitoare la activitatea antiproliferativă, pro-apoptotică și antiangiogenică a flavonei pe liniile celulare de melanom uman A375 și SK-MEL-24. În urma testelor efectuate, Api nu contribuie la stimularea celulelor dendritice, deci nu reprezintă o direcție de cercetare ce merită a fi exploatată.

Pe scurt, mecanismele de acțiune prin care Api inhibă procesul tumoral cuprind inhibarea proliferării celulare, blocarea ciclului celular, diminuarea migrării celulare, manifestarea efectului citotoxic, stimularea proceselor apoptotice, inhibarea angiogenezei tumorale, afectarea profilului energetic.

De asemenea, în prezent există un număr crescut de studii referitoare la mecanismul de acțiune al acestui fitocompus pe diferite modele animale experimentale de melanom. În ceea ce privește trialurile clinice, momentan nu există studii în derulare cu Api pentru managementul cancerului de tip melanom.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze de doctorat oferă un tablou complet și complex asupra acțiunii fitocompusului *in vitro* pe liniile celulare selectate, respectiv *in vivo* pe modelele experimentale de angieneză normală și tumorală. Toate aceste informații sunt noi și completează datele existente în literatura de specialitate pe subiectul de interes, contribuind la elucidarea și înțelegerea mecanismului de acțiune complex al Api pe modele experimentale.

BIBLIOGRAFIE

1. Mateescu I, Paun L, Popescu S, Roata G, Sidorof M. Medicinal and aromatic plants - A statistical study on the role of phytotherapy in human health. *Bull UASVM Anim Sci Biotechnol*. 2014;71(1), p. 14–9.
2. Majolo F, de Oliveira Becker Delwing LK, Marmitt DJ, Bustamante-Filho IC, Goettert MI. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochem Lett.*, 2019;31, p. 196–207.
3. Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2020;13(3), p. 265–85.
4. WHO statistics [Internet]. World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponibil la: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332070/9789240005105-eng.pdf>.
5. Wang JJ, Lei, KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018; 22(12), p. 3855–64..
6. Euromelanoma Disponibil la: <https://www.euromelanoma.org/romania/informa%C8%9Bii-generale/tipuri-de-cancer-de-piele>. 2020.
7. Redondo-Blanco S, Fernández J, Gutiérrez-Del-Río I, Villar CJ, Lombó F. New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. *Front Pharmacol*. 2017; 8, p. 109. Disponibil la: doi:10.3389/fphar.2017.00109
8. Efferth T, Saeed MEM, Mirghani E, Alim A, Yassin Z, Saeed E, et al. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*. 2017 25;8(30), p. 50284–50304. Disponibil la: doi: 10.18632/oncotarget.17466.
9. Aghajan ZM, Schuette P, Fields TA, Tran ME, Siddiqui SM, Hasulak NR et al. Theta oscillations in the human medial temporal lobe during real-world ambulatory movement. *Curr Biol*. 2017, 27(24), p. 3743–3751.e3. Disponibil la: doi: 10.1016/j.cub.2017.10.062. Epub 2017 Nov 30.
10. Chinembiri TN, du Plessis L H, Gerber M, Hamman, JH, du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Mol Basel Switz*. 2014;19(8), p. 11679–721.
11. Lang SJ, Schmiech M, Hafner S, Paetz C, Steinborn C, Huber R, et al. Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. *Phytomedicine*. 2019;62, p. 152962. Disponibil la: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152962>.
12. Costa D, Santos R, Andrade EDS, Themistocles BL, da Silva BG, Fialho E, et al. Green tea extract (*Camellia sinensis*) as a potential antitumoral agent on breast cancer cells (FS13-04-19). *Curr Dev Nutr*. 2019; 3(Suppl 1):nzz030.FS13-04-19.
13. Sohretoglu D, Huang S. Ganoderma lucidum polysaccharides as an anti-cancer agent. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(5), p. 667–74.
14. Bala M, Pratap K, Verma PK, Singh B, Padwad Y. Validation of ethnomedicinal potential of *Tinospora cordifolia* for anticancer and immunomodulatory activities and quantification of bioactive molecules by HPTLC. *J Ethnopharmacol*. 2015;175, p. 131–7.
15. Mirahmadi M, Azimi-Hashemi S, Saburi E, Kamali H, Pishbin M, Hadizadeh F. Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer. *Biomed Pharmacother*. 2020;129, p. 110459. Disponibil la: doi: 10.1016/j.biopha.2020.110459. Epub 2020 Jun 30.
16. Dissanayake KGC, Waliwita WALC, Liyanage RP. A review on medicinal uses of *Zingiber officinale* (ginger). *Int J Health Sci Res*. 2020;10(6), p. 142–8.
17. Caunii A, Oprean C, Cristea M, Ivan A, Danciu C, Tatu C et al. Effects of ursolic and oleanolic on SK MEL 2 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* assays. *Int J Oncol*. 2017;51, p. 1651–60.

18. Zhao G, Han X, Zheng S, Li Z, Sha Y, Ni J et al. Curcumin induces autophagy inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells. *Oncol Rep.* 2016;35, p.1065–74.
19. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(9), p. 1428–47.
20. Wang J, Wang L, Lou GH, Zeng HR, Hu J, Huang QW, et al. Coptidis rhizoma: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Pharm Biol.* 2019;57(1), p. 193–225.
21. Shukla S, Bhaskaran N, Babcook MA, Fu P, MacLennan GT, Gupta S. Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway. *Carcinogenesis.* 2014;35(2), p. 452–60.
22. Butler MS. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep.* 2008, 25(3), p. 475-516. Disponibil la: doi: 10.1039/b514294f.
23. Giddings LA, Newman DJ. Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40, p. 1181–210.
24. Cancer trials- Genistein [Internet]. Disponibil la: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00584532?term=genistein&cond=Cancer+Prostate&draw=2&rank=2>
25. Clinical trials- Desmodium-Breast cancer. Disponibil la: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03959618?term=desmodium&cond=cancer&draw=2&rank=1>
26. Clinical trials-Quercetin. Disponibil la: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01912820?term=quercetin&cond=cancer+prostate&draw=2&rank=2>
27. Clinical trials-Isoquercetin. Disponibil la: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02446795?term=isoquercetin&cond=cancer+kidney&draw=2&rank=1>
28. Clinical trials-Resveratrol-Colon cancer. Disponibil la: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00256334?term=resveratrol&cond=cancer+colon&draw=2&rank=1>
29. Clinical trials-Resveratrol-Gastrointestinal tumors. Disponibil la: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01476592?term=resveratrol&cond=cancer&draw=2&rank=4>
30. Clinical trials-Polyphenols. Disponibil la: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03482401?term=phenolics+polyphenols&cond=breast+cancer&draw=2&rank=1>
31. Clinical trials-Epirubicin and Vinorelbine. Disponibil la: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00176488?term=epirubicin+vinorelbine&cond=breast+cancer&draw=2&rank=1>
32. Clinical trials-Vincristine. Disponibil la: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01463852?term=vincristine&cond=chronic+lymphocytic+leukemia&draw=2&rank=1>
33. Clinical trials-Irinotecan. Disponibil la: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01220063?term=irinotecan+hydrochloride&cond=Colorectal+Cancer&draw=2&rank=3>
34. Lu K., Bhat M. and Basu S. Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis.* 2016;19(3):287–95.
35. Bocci G., Di Paolo A. and Danesi R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis.* 2013/02/07 ed iulie 2013;16(3), p. 481–92.
36. Nagaraju G. P., Zhu S., Ko J. E., et al. Antiangiogenic effects of a novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2015;357(2), p. 557–65.
37. Yu Y., Zhang C, Liu L, Li X. Hepatic arterial administration of ginsenoside Rg3 and transcatheter arterial embolization for the treatment of VX2 liver carcinomas. *Exp Ther Med.* 2013;5(3), p. 761–6.
38. Al-Abd AM, Alamoudi AJ, Abdel-Naim AB, Neamatallah TA, Ashour OM. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies - A review. *J Adv Res.* 2017;8(6), p. 591–605.

39. Tian L, Xie K., Sheng D, Wan X, Zhu G. Antiangiogenic effects of oridonin. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):192. Disponibil la: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1706-3>.
40. Bahmani M, Shirzad H, Shahinfard N, Sheivandi L, Rafieian-Kopaei M. Cancer phytotherapy: Recent views on the role of antioxidant and angiogenesis activities. *J Evid-Based Complement Altern Med.* 2017;22(2), p. 299–309
41. Samad NA, Abdul AB, Rahman HS, Abdullah R, Tengku Ibrahim TA, Othman HH. Antiproliferative and antiangiogenic effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* L. Smith in sprague dawley rat model of hepatocellular carcinoma. *Phcog Mag.* 2019;15 , p .277–82.
42. Shah SL, Wahid F, Khan N, Farooq U, Shah AJ, Tareen S, et al. Inhibitory effects of *Glycyrrhiza glabra* and its major constituent glycyrrhizin on inflammation- associated corneal neovascularization. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2018; 2018, ID 8438101, 8 pages. Disponibil la: <https://doi.org/10.1155/2018/8438101>.
43. Mirossay L, Varinská L, Mojžiš J. Antiangiogenic effect of flavonoids and chalcones: An update. *Int J Mol Sci.* 2017;19 (1), p. 27. Disponibil la: doi: 10.3390/ijms19010027.
44. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5, p. e47. Disponibil la: doi:10.1017/jns.2016.41.
45. Yan X., Qi M., Li P, Zhan Y, Shao H. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci.* 2017; 7,p. 50. Disponibil la: <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>.
46. Fajemiroye JO, Ferreira NL, de Oliveira LP, Elusiyan CA, Pedrino GR, da Cunha LC et al. *Matricaria recutita* and its isolate-apigenin: economic value, ethnopharmacology and chemico-biological profiles in retrospect. *Res Rev J Pharmacogn Phytochem.* 2016; 4(4), p. 2347–2332.
47. Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz SJ. Flavones: food sources, bioavailability, metabolism and bioactivity. *Adv Nutr. Mai* 2017; 8(3), p. 423–35.
48. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop.* 2017; 20: 6, p. 1197–238.
49. Carvalho Lemos V., Reimer JJ, and Wormit A. Color for Life: Biosynthesis and distribution of phenolic compounds in Pepper (*Capsicum annuum*). *Agriculture.* 2019; 9(4), p. 81. Disponibil la: doi:10.3390/agriculture9040081.
50. MTT Assay Disponibil la: <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>.
51. McKinnon K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.:1.1-5.1.11. Disponibil la: doi: 10.1002/cpim.40.
52. Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc.* 2007;2(2)p. 329–33.
53. McIlwain DR, Berger T and Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4), p. a008656. Disponibil la: doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
54. Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology.* 2013;65(2), p. 157–72.
55. Chan F, Moriwaki K and De Rosa, M. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In *Immune Homeostasis: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Snow, A., Lenardo, M. (Eds) Humana Press. 2013;979, p. 65–70.
56. Duicu O.M.; Scurtu, I., Popescu, R. Sturza A, Coricovac D, Danila MD, et al. Assessment of the effects of methylene blue on cellular bioenergetics in H9c2 cells. *Rev Chim.* 2015; 66, p. E519-522.
57. Zhang J, and Zhang Q. Using Seahorse machine to measure OCR and ECAR in Cancer Cells. *Cancer Metab.* 2019, p. 353-363.
58. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2000;1, p. 73–82.

59. Avram S, Coricovac DE, Pavel IZ, Pinzaru I, Ghiulai R, Baderca F, et al. Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncol Rep.* 2017;38, p. 89–99.
60. XTT Assay. Disponibil la: <http://home.sandiego.edu/~josephprovost/XTT%20Protocol.pdf>.
61. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(6), p. 1270–5.
62. **Ghiu A**, Schwiebs A, Radeke HH, Avram S, Zupko I, Bor A, et al. A comprehensive assessment of apigenin as an antiproliferative, proapoptotic, antiangiogenic and immunomodulatory phytochemical. *Nutrients.* 2019;11(4), p. 858. Disponibil la: doi: 10.3390/nu11040858.
63. **Ghiu A**, Pavel IZ, Avram S, Kis B, Minda D, Dehelean CA, et al. An *in vitro-in vivo* evaluation of the antiproliferative and anti-angiogenic effect of flavone apigenin against SK MEL-24 human melanoma cell line. *Analytical Cellular Pathology*, 2021; vol. 2021, Article ID 5552664, 11 pages. Disponibil la: <https://doi.org/10.1155/2021/5552664>.
64. Avram S., Ghiulai R., Pavel I.Z., et al. Phytochemicals Targeting cancer angiogenesis using the chorioallantoic membrane assay. În: *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. Intechopen. 2017. p. 45–66. Disponibil la <https://www.intechopen.com/chapters/55790>.
65. **Ghiu A**, Avram S, Pavel IZ, Scurtu AD, Minda D, Danciu C, et al. Evaluation of the cytotoxic and antiangiogenic potential of flavone apigenin using the B16A5 mouse melanoma cell line. *Med Evol.* 2020; 25, p. 288–95.
66. Minda D, Avram Feflea S, Pavel I, Kis B, **Ghiu A**, Zupko I, et al. An *in vitro* evaluation of apigenin and apigenin-7-O-glucoside against HeLa human cervical cancer cell line. *Rev Chim.* 2020; 71, p. 140–4.